

Aus der Klinik für Innere Medizin I  
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische  
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und  
Alterungsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EINFLUSS DES ANTI-OXIDATIVEN  
TRANSKRIPTIONSFAKTORS *NUCLEAR FACTOR-E2 RELATED*  
*FACTOR-2* (NRF2) AUF DIE EPITHELIAL-MESENCHYMALE  
TRANSITION VON BENIGNEN UND MALIGNEN  
PANKREASGANGEPITHELZELLEN

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von

SARAH CARINA ARFMANN-KNÜBEL

aus Troisdorf

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Heiner Schäfer
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt
- Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.09.2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren.....	1
1.1.3 Pathologie .....	1
1.2 Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2).....	2
1.2.1 Struktur .....	2
1.2.2 Regulation.....	3
1.2.3 Zielgene .....	4
1.2.4 Nrf2-Aktivatoren .....	4
1.2.5 Tumorpräventive Funktionen .....	5
1.2.6 Onkogene Funktionen.....	5
1.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	7
1.3.1 Allgemeines .....	7
1.3.2 EMT-Marker.....	7
1.3.3 EMT in der Karzinogenese .....	8
1.3.4 Nrf2 und EMT .....	9
1.4 Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	9
1.4.1 Allgemeines .....	9
1.4.2 Signalwege.....	10
1.4.3 Rolle von TGF- $\beta$ in der Karzinogenese.....	10
1.4.4 Nrf2 und TGF- $\beta$ .....	11
1.5 Ziel der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Geräte .....	13
2.2 Chemikalien .....	14
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.4 Antikörper .....	16
2.5 Primer.....	17

2.6	siRNAs .....	18
2.7	Plasmide .....	18
2.8	Zellbiologische Methoden.....	18
2.8.1	Zelllinien.....	18
2.8.2	Zellkultur .....	18
2.8.3	Stimulation.....	19
2.8.4	Transfektion .....	19
2.9	Proteinbiochemische Methoden .....	20
2.9.1	Herstellung von Ganzzelllysaten .....	20
2.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	20
2.9.3	Einstellen des Proteingehaltes .....	20
2.9.4	Gelelektrophorese .....	21
2.9.5	Proteintransfer (Western-Blotting) .....	22
2.10	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.10.1	RNA-Isolierung .....	23
2.10.2	Herstellung von cDNA (reverse Transkription).....	24
2.10.3	Realtime PCR .....	24
2.11	Analytische Methoden.....	24
2.11.1	Migrations-/Scratch-Assay .....	24
2.11.2	Boyden-Invasionsassay.....	25
2.11.3	Luziferaseassay.....	26
2.11.4	Messung der Apoptose-Aktivität .....	27
2.12	Statistik.....	28
3	Ergebnisse – Malignität förderndes Potential von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 .....	29
3.1	Morphologische Eigenschaften und Migrationsverhalten .....	29
3.2	Veränderungen der Invasivität.....	32
3.3	Expression von EMT-Markern .....	34
3.4	Smad-Aktivierung.....	44
3.5	Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Aktivierung.....	48
3.6	Apoptoseverhalten.....	50
4	Diskussion.....	55

5	Zusammenfassung .....	66
6	Literaturverzeichnis .....	68
7	Abbildungsverzeichnis.....	78
8	Danksagung .....	80
9	Lebenslauf.....	81

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CP	Chronische Pankreatitis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPDE	Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie
Hsp90	Heat Shock Protein 90
l	Liter
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
M	Molar
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derives2)-like2

nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Medium, Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFN	Sulforaphan
siRNA	small interfering RNA
tBHQ	tert-Butylhydroquinone
TBS	Tris Buffered Saline
TBP	TATA-Box Binding Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1
u.a.	unter anderem
ub	unbehandelt
UpM	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Veröffentlichung:

Arfmann-Knübel S, Struck B, Genrich G, Helm O, Sipos B, Sebens S, Schäfer H. The crosstalk between Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic duct epithelial cells. PLoS One. 2015 Jul 30;10(7):e0132978.

**Abstract:** Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 both affect tumorigenesis in a dual fashion, either by preventing carcinogen induced carcinogenesis and suppressing tumor growth, respectively, or by conferring cytoprotection and invasiveness to tumor cells during malignant transformation. Given the involvement of Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 in the adaptation of epithelial cells to persistent inflammatory stress, e.g. of the pancreatic duct epithelium during chronic pancreatitis, a crosstalk between Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 can be envisaged. By using premalignant human pancreatic duct cells (HPDE) and the pancreatic ductal adenocarcinoma cell line Colo357, we could show that Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 independently but additively conferred an invasive phenotype to HPDE cells, whereas acting synergistically in Colo357 cells. This was accompanied by differential regulation of EMT markers like vimentin, Slug, L1CAM and E-cadherin. Nrf2 activation suppressed E-cadherin expression through an as yet unidentified ARE related site in the E-cadherin promoter, attenuated TGF- $\beta$ 1 induced Smad2/3-activity and enhanced JNK-signaling. In Colo357 cells, TGF- $\beta$ 1 itself was capable of inducing Nrf2 whereas in HPDE cells TGF- $\beta$ 1 per-se did not affect Nrf2 activity, but enhanced Nrf2 induction by tBHQ. In Colo357, but not in HPDE cells, the effects of TGF- $\beta$ 1 on invasion were sensitive to Nrf2 knock-down. In both cell lines, E-cadherin re-expression inhibited the proinvasive effect of Nrf2. Thus, the increased invasion of both cell lines relates to the Nrf2-dependent downregulation of E-cadherin expression. In line, immunohistochemistry analysis of human pancreatic intraepithelial neoplasias in pancreatic tissues from chronic pancreatitis patients revealed strong Nrf2 activity already in premalignant epithelial duct cells, accompanied by partial loss of E-cadherin expression. Our findings indicate that Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 both contribute to malignant transformation through distinct EMT related mechanisms accounting for an invasive phenotype. Provided a crosstalk between both pathways, Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 mutually promote their tumorigenic potential, a condition manifesting already at an early stage during inflammation induced carcinogenesis of the pancreas.

# 1 Einleitung

## 1.1 Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Beim Pankreaskarzinom handelt es sich nach wie vor um einen Tumor mit infauster Prognose. Auf Grund fehlender Frühsymptome wird es meist erst spät erkannt. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt in Deutschland bei insgesamt 8 %. Selbst bei vollständiger chirurgischer Resektion des Tumors liegt das 5-Jahresüberleben bei 15-20 %. Insgesamt handelt es sich beim Pankreaskarzinom um die 4. häufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland (*Zentrum für deutsche Krebsregisterdaten*).

Trotz intensiver Erforschung gibt es derzeit noch keine effektive Therapie gegen diesen aggressiven Tumor. Daher ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Therapieresistenz von Nöten, um effizientere Therapeutika zu entwickeln (*Arumugam et al., 2009*).

### 1.1.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist unbekannt. Prädisponierende Faktoren sind Nikotin- und Alkoholabusus, Diabetes mellitus, Adipositas, chronische Pankreatitis, zystische Neoplasien des Pankreas und genetische Faktoren (*Bieber et al., 2012; Herold, Innere Medizin*). Hereditäre Syndrome mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms sind das Peutz-Jeghers-Syndrom, das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM-Syndrom), das hereditäre Brust- und Ovarialkarzinom (HBOC-Syndrom), das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC-Syndrom) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP-Syndrom). Daneben haben auch Patienten mit hereditärer Pankreatitis ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (*Reznik et al., 2014*). Insgesamt liegen diese familiären Dispositionen bei 5-10 % der Patienten vor (*Geismann, 2010*).

### 1.1.3 Pathologie

Maligne Pankreastumoren gehen überwiegend vom exokrinen Teil des Pankreas aus; es

handelt sich um Adenokarzinome. Dabei tritt in großer Mehrzahl der Fälle das duktales Adenokarzinom des Pankreas auf. Seltener sind benigne Veränderungen des exokrinen Drüsengewebes, bei denen es sich um zystische Veränderungen, wie z.B. das muzinöse Zystadenom, handelt. Neben den Tumoren des exokrinen Anteils gibt es ebenso Tumoren des endokrinen Teils, darunter z.B. die Insulinome (*Bieber et al., 2012*).

Auf Grund seiner infausten Prognose sind Risikofaktoren und genetische Prädispositionen des Pankreaskarzinoms Gegenstand reger Forschung. Sie sollen die Grundlage bilden für die Tumorprävention, eine bessere Frühdiagnostik sowie für wirkungsvollere Therapeutika.

Eine häufig auftretende Mutation in Zellen des duktales Pankreasadenokarzinoms ist die des Protoonkogens k-ras, die in 80 % der Fälle vorliegt. Sie ist bereits in Vorläuferläsionen, den Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasien (PanIn), nachweisbar. k-ras-Mutationen treten auch in anderen nicht-pankreatischen Neoplasien auf, sodass sie sich nicht als spezifischer Tumormarker eignen (*Löhr et al., 2005*). Ebenso wurden häufig Inaktivierungen von TP53, SMAD4 und BRCA2 in fortgeschrittenen Neoplasien beschrieben. Seltener sind die Onkogene BRAF oder EGFR und die Tumorsuppressorgene TGFBR1 und TGFBR2 mutiert (*Vincent et al., 2011*).

Darüber hinaus spielt die Entzündung eine bedeutende Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms. Die chronische Pankreatitis zählt zu den Risikofaktoren des PDAC und es konnte gezeigt werden, dass Zytokine, ROS und Entzündungsmediatoren wie NFkB die Zellproliferation steigern, zu einem Verlust von Tumorsuppressorfunktionen und zu einem Zugewinn der Onkogen Expression führen. All diese Faktoren begünstigen die Tumorigenese und die Herunterregulation der Entzündung könnte ein denkbarer Therapieansatz für die Prävention des PDAC darstellen (*Farrow und Evers, 2002*). Ein weiterer Mediator der entzündlichen Karzinogenese stellt der Transkriptionsfaktor Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) dar.

## **1.2 Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2)**

### **1.2.1 Struktur**

Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor der *Cap'n'Collar basic*

*leucin zipper* Familie und essentiell für die oxidative Stressantwort, indem er die Expression von vielen Phase II und antioxidativen Enzymen reguliert (Itoh et al., 1997). Moi et al. klonierten und beschrieben Nrf2 als Erste und benannten ihn wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit nach dem Transkriptionsfaktor NF-E2. Nrf2 besitzt eine *basic leucine zipper* DNA Bindungsdomäne im C-Terminus und eine *acidic activation* Domäne in N-Terminus (Moi et al., 1994). Nrf2 besteht aus sechs sogenannten Neh-Domänen. Die Neh1-Domäne enthält die CNC-bZIP-Domäne, die essentiell für die DNA-Bindung und -Dimerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren ist. An die Neh2-Domäne kann Keap1, der Inhibitor von Nrf2, binden und Nrf2 ubiquitinieren. Neh3 ist wichtig für die transkriptionelle Aktivierung mit Hilfe des Ko-Aktivators CHD6. Neh4 und Neh5 sind unabhängige Transaktivierungsdomänen und agieren mit dem CREB-Protein (Lau et al., 2008). Die Funktion der Neh6-Domäne dient der Destabilisierung Nrf2's unter oxidativem Stress (Villamena, 2013). In seiner inaktiven Form befindet sich Nrf2 im Zytoplasma und wird proteasomal abgebaut. Bei Aktivierung, z.B. durch oxidativen Stress, transloziert Nrf2 in den Nukleus und bildet dort ein Heterodimer mit Maf, was die Bindung an ARE (antioxidative responsive element) ermöglicht (Itoh et al., 1997; Zhang, 2006). Darüber wird die Transkription der ARE kontrollierten Gene moduliert. ARE zählt zu den cis-Elementen, d.h. es liegt in der Promotorregion verschiedener Gene und steigert als Enhancer deren Transkription (Rushmore et al., 1991).

### 1.2.2 Regulation

Unter normalen Bedingungen ist Nrf2 durch die Bindung seines Inhibitors Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) inaktiviert (Itoh et al., 1999). Keap1 agiert dabei als Adapterprotein und ermöglicht die Bildung eines Cul3 abhängigen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der Nrf2 für den proteasomalen Abbau markiert (Zhang et al., 2004). Oxidativer Stress, z.B. in Form von *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), führt zu Veränderungen der freien Thiol- (SH-) Gruppen in den Cysteinresten von Keap1. Diese Modifizierungen führen zu Formveränderungen und zur Dissoziation Keap1's von Nrf2. Damit wird der proteasomale Abbau Nrf2's gehemmt und Nrf2 kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription seiner Zielgene steuern (Sporn und Liby, 2012).

### 1.2.3 Zielgene

Es sind mittlerweile mehr als 100 Nrf2-abhängige Zielgene bekannt (*Sporn und Liby, 2012*). Dazu zählen v.a. Phase-II-Enzyme, wie z.B. NAD(P)H:quinon-Oxidoreductase 1 (NQO1), Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronyltransferase, Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Thioredoxin, Glutamatcysteinylgase (GCL) (*Bakin et al., 2004; Moinova und Mulcahy, 1999; Ishii et al., 1999*) und proteasomale Proteine (*Arlt et al., 2009; Kwak et al. 2003; Hu R et al., 2006-2*). Viele Gene für proteasomale Untereinheiten haben ARE in ihren Promotoren, welche bekanntermaßen Nrf2-abhängig reguliert werden (*Arlt et al., 2009; Kwak et al., 2003; Kwak und Kensler, 2006*). Nrf2 reguliert zudem auch Gene, die Einfluss auf die Zelldifferenzierung, -proliferation, Entzündung und Apoptose haben (*Sporn und Liby, 2012*). Dieser weitgreifende Einfluss lässt sich u.a. durch die Verknüpfung Nrf2's mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-kB (*Arlt et al., 2012; Lee et al., 2009*), p53 (*Rotblat et al., 2012; You et al., 2011*) oder NOTCH1 (*Wakabayashi et al., 2010*), erklären. Zusammengefasst handelt es sich bei Nrf2 um einen multifunktionalen Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene und Interaktionen noch weiterer Erforschung bedürfen.

### 1.2.4 Nrf2-Aktivatoren

Nrf2 kann durch verschiedene Einflussfaktoren aktiviert werden. Neben ROS sind einige Antioxidantien, wie z.B. Sulforaphan (SFN) und tert-Butylhydroquinone (tBHQ), bekannte Induktoren von Nrf2 und stimulieren so die Expression von Phase-II-Enzymen (*Geismann et al., 2014*). Dabei kommt es zur Nrf2-Aktivierung durch Veränderungen der Cysteinreste von Keap1 (*Sporn und Liby, 2012*). Diese Modifikation der Cysteinreste ist jedoch unspezifisch und die Antioxidantien sind ebenso in der Lage andere Proteine zu verändern (*Sporn und Liby, 2012*). So wirkt beispielsweise SFN auch auf NF-kB (*Heiss et al., 2001*).

SFN gehört zu den Isothiocyanaten und wurde erstmals von *Zhang et al.* beschrieben. SFN ist u.a. in Broccoli enthalten (*Zhang et al., 1992*) und durch die Aktivierung Nrf2's ein starker Phase-II-Enzyminduktor (*Kensler und Wakabayashi, 2010*). Durch seine antioxidativen Effekte hemmt SFN die Karzinogenese in verschiedenen Organen (*Sporn und Liby, 2012*). tBHQ ist ein synthetisches phenolisches Antioxidant (*Kim Ji et al., 2009*), welches Lebensmitteln als Konservierungsstoff zugesetzt wird (*World Health Organization,*

*International Programme On Chemical Safety*) und gleichfalls die Nrf2-Aktivität steigert.

### **1.2.5 Tumorpräventive Funktionen**

Nrf2 schützt die Zellen vor der zellschädigenden und mutagenen Wirkung von ROS (*Kensler et al., 2007; Osburn und Kensler, 2008*) und stellt damit einen wichtigen Faktor in der Prävention der Karzinogenese dar (Abb. 1.1). Nrf2 agiert dabei in den frühen Stadien der Karzinogenese als Tumorsuppressor, wohingegen er in späteren Stadien die Karzinogenese fördert (*Lau et al., 2008*). Schon lange ist die antitumorigene Wirkung von Antioxidantien bekannt, wobei die Rolle von Nrf2 sich erst Jahre später herauskristallisierte (*Kensler und Wakabayashi, 2010*). SFN war Gegenstand einer Vielzahl experimenteller (*Hu R et al., 2006-1; Zhang et al., 1992*) und in jüngster Zeit auch klinischer Studien (*Kensler et al., 2012; Shapiro et al., 2006*). Xu et al. konnten mittels Nrf2-*knockout*-Mäusen zeigen, dass die SFN-vermittelte antitumorigene Wirkung Nrf2-abhängig ist (*Xu et al., 2006*). Neben SFN befinden sich auch andere Nrf2-Aktivatoren, wie z.B. Curcumin, Dimethylfumarat und Resveratrol in klinischer Testung (*Sporn und Liby, 2012*). Die Sinnhaftigkeit einer dauerhaften Applikation von Nrf2-Aktivatoren in der Prävention von Krebserkrankungen oder auch von Diabetes und kardiovaskulären Krankheiten ist jedoch nach wie vor fraglich und u.U. risikobehaftet.

### **1.2.6 Onkogene Funktionen**

Mittlerweile ist neben der tumorsuppressiven Wirkung auch eine protumorigene Wirkung Nrf2's nachgewiesen worden. Durch seine deutlichen Effekte auf die Zellproliferation und die Apoptoseresistenz in späteren Stadien der Karzinogenese, kann Nrf2 als Protoonkogen angesehen werden (*Kensler und Wakabayashi, 2010; Lau et al., 2008*). Eine erhöhte Nrf2-Aktivität konnte in verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Kolon-, Ovarial-, Lungen-, Brust- und Pankreastumor, nachgewiesen werden (*Arlt et al., 2009; Hong et al., 2010; Kim SK et al., 2010; Konstantinopoulos et al., 2011; Singh et al., 2006*).

Es konnten Mutationen von Nrf2 und Keap1 in verschiedenen Tumorarten aufgedeckt werden, die zu einer erhöhten Nrf2-Aktivität führen (*Kim YR et al., 2010; Singh et al., 2006; Yoo et al., 2012*) und infolgedessen mit einer verstärkten Therapieresistenz und einem geringeren Überleben assoziiert sind (*Konstantinopoulos et al., 2011, Wang XJ et al., 2008*). Die ermittelten Mutationsraten sind jedoch eher gering (*Sporn und Liby, 2012*), so dass noch

andere Faktoren für die erhöhte Nrf2-Aktivität in Tumoren eine Rolle spielen müssen. Neben den genetischen Alterationen, tragen häufig auch epigenetische Effekte – v.a. hinsichtlich der Keap1 Expression – zur Deregulation von Nrf2 in Tumorzellen bei (Sporn und Liby, 2012; Wang R et al., 2008). Metabolische Veränderungen sowie die zelluläre Adaptation an persistierenden Stress, was sich v.a. bei einer chronischen Entzündung manifestiert, bedingen gleichfalls eine amplifizierte Nrf2-Aktivierung in Tumorzellen (Abb. 1.1). Letzteres macht Nrf2 dementsprechend zu einer molekularen Determinante der entzündlichen Karzinogenese.

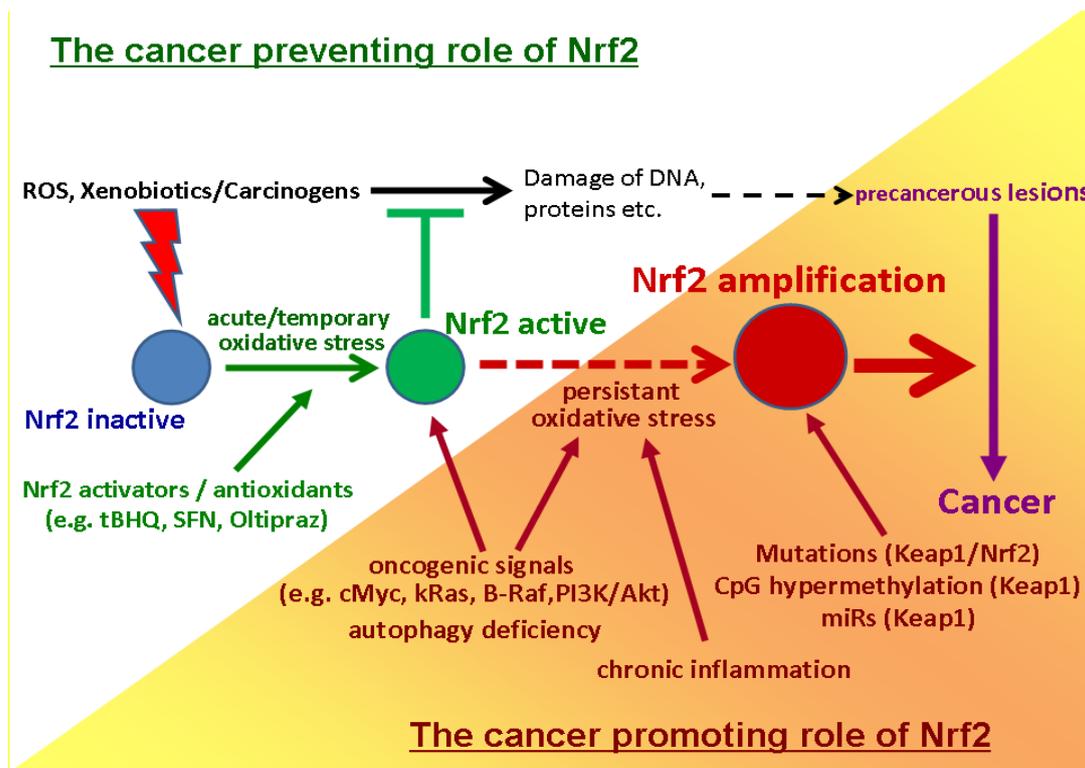


Abbildung 1.1: Duale Rolle von Nrf2 in der Tumorigenese (aus Geismann et al., 2014).

Die Präsenz amplifizierter Nrf2-Aktivität in Tumorzellen führt zu einer Vielzahl phänotypischer Veränderungen, die zur malignen Transformation beitragen können. Dies schließt v.a. den Erwerb einer profunden Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika ein. Ein wesentlicher Mechanismus der verstärkten Therapieresistenz scheint die durch Nrf2-induzierte Protektion gegenüber Apoptose zu sein. Arlt et al. beschrieben eine Schutzfunktion Nrf2's vor TRAIL-induzierter Apoptose (Arlt et al., 2009). Weitere bedeutsame Einflussfaktoren sind die Verminderung des oxidativen Stresses, die Entgiftung mittels Glutathion sowie die Stimulation von Effluxpumpen, wie die des *Multi Drug Resistance*

Systems (*Sporn und Liby, 2012*). Eine gesteigerte Angiogenese von Tumoren und ein erhöhtes invasiv metastatisches Potential sind weitere Malignität-fördernde Eigenschaften von NrF2. Letzteres ist bei Adenokarzinomen insbesondere durch diverse zelluläre Veränderungen bedingt, die zusammenfassend als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet werden.

### **1.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)**

#### **1.3.1 Allgemeines**

Bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), erstmals beschrieben von Garry Greenburg und Elisabeth Hay (*Greenburg und Hay, 1982*), handelt es sich um einen biologischen Prozess, bei dem sich Zellen mit epithelialen Merkmalen zu Zellen mit mesenchymalen Merkmalen verändern. Dadurch erhöht sich u.a. die Motilität und Invasivität von Epithelzellen (*Gianonni et al., 2012; Kalluri und Weinberg, 2009*). Kalluri und Weinberg teilen die EMT in drei Subtypen ein. Die Typ I EMT spielt eine bedeutende Rolle bei der Implantation, Embryogenese und Organentwicklung. Typ II der EMT ist mit der Wundheilung und Geweberegeneration assoziiert. Schließlich ist Typ III der EMT an der Karzinogenese beteiligt (*Kalluri und Weinberg; 2009*). Die Typ I EMT ist unabhängig von Entzündung und Verletzung, wohingegen die Typen II und III von diesen Faktoren abhängig sind. Ein wichtiger Punkt hinsichtlich der Tatsache, dass viele Tumoren im Rahmen entzündlicher Erkrankungen entstehen, wie z.B. das PDAC bei chronischer Pankreatitis (*Farrow und Evers, 2002*). Wenn epitheliale Tumorzellen sich gemäß der Typ III EMT verändern, so nehmen ihre mesenchymalen Eigenschaften zu. Damit erhöht sich die Invasivität der Tumorzellen und infolgedessen die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung.

#### **1.3.2 EMT-Marker**

Es gibt eine Vielzahl an Veränderungen bei der Wandlung einer Epithel- bis hin zu einer mesenchymalen Zelle. Durch die unterschiedliche Expression von Proteinen eignen sich diese als Marker der EMT.

Epithelzellen sind polar gebaute Zellen, die in einem dichten Zellverband liegen und von wenig Extrazellulärmatrix (EZM) umgeben sind. Sie bilden Zellkontakte wie Adhärens-

Kontakte, Desmosomen, Tight Junctions und Gap Junctions untereinander aus und sind an ihrer Basalmembran, u.a. über Integrine, fest verankert (*Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie*). Als epitheliales Markerprotein wird zum einen das Adhäsionsprotein E-Cadherin gesehen. E-Cadherin ist wichtig für die Ausbildung der Adhärens-Kontakte und eine Desintegration von Adhärens-Kontakten ist mit einer transkriptionellen Repression E-Cadherins assoziiert (*Zavadil und Böttinger, 2005*). Der Verlust von E-Cadherin wird als ein ausschlaggebendes Ereignis der EMT angesehen (*Giannoni et al., 2012*). Zum anderen kann der Verlust von Claudin, Occludin, Desmoplakin und Zytokeratinen als typischer Marker der EMT herangezogen werden (*Natalwala et al., 2008*).

Mesenchymale Zellen sind spindelförmige Zellen, die mit dünnen Fortsätzen ein dreidimensionales Netz ausbilden (*Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie*) und eine erhöhte Motilität aufweisen. Die mesenchymalen Zellen bilden untereinander meist nur Fokalkontakte und seltener Gap junctions aus (*Geismann, 2010*). Als mesenchymale Markerproteine eignen sich Vimentin, N-Cadherin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Fibronectin, Desmin (*Thiery et al., 2006*) und L1CAM (*Kiefel et al., 2012; Geismann et al., 2009*), sowie das EMT assoziierte Protein Slug (*Alves et al., 2009*). Das Intermediärfilament Vimentin nimmt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Kern ein und scheint wichtig für die Reorganisation des Zytoskeletts und damit für die Zellmotilität und Migration (*Geismann, 2010*). Vimentin ist dabei vermutlich ein Marker der wahren, vollständigen und nicht einer partiellen EMT (*Zavadil und Böttinger, 2005*).

### **1.3.3 EMT in der Karzinogenese**

Die Charakteristika der EMT sind der Verlust der epithelialen Polarität, das Remodeling der epithelialen Zellkontakte und des Zytoskeletts sowie die de novo Synthese von EZM (*Zavadil und Böttinger, 2005*). Daneben ist auch die EZM-Proteolyse durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) von entscheidender Bedeutung (*Giannoni et al., 2012*). Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten Migrationsfähigkeit, Invasivität und erhöhten Apoptoseresistenz in malignen Epithelzellen (*Kalluri und Weinberg, 2009*).

Insgesamt spielt die EMT eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese, indem sie die Motilität der Tumorzellen erhöht und so zu einem malignen Phänotyp führt. Dies konnte bereits in

einigen Studien, so z.B. für das Pankreaskarzinom (*Arumugam et al., 2009; Nakajima et al., 2004*), belegt werden. Bei der Initiation der EMT sind neben Molekülen der EZM ebenso das tumorassoziierte Stroma, extrazelluläre Wachstumsfaktoren (Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Epidermal growth factor (EGF)), Rezeptor-Tyrosinkinasen, Ras,  $\beta$ -Catenin und Integrine beteiligt (*Geismann, 2010; Guarino et al., 2007; Kiefel et al., 2012*).

### **1.3.4 Nrf2 und EMT**

Die Daten über einen Zusammenhang zwischen Nrf2 und der EMT sind rar. Bekannt ist, dass Nrf2 maßgeblich am Erwerb eines malignen Phänotyps beteiligt ist, indem er die Zellproliferation triggert und vor Apoptose schützt. Damit fördert Nrf2 die Tumorigenese und erhöht die Chemoresistenz von malignen Zellen (*Arlt et al., 2009*). ROS induziert, ebenso wie Nrf2, einen malignen Phänotyp in Tumorzellen. ROS ist protumorigen, indem er die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Migration steigert sowie die Tumorgenität durch DNA-Schäden erhöht (*Storz et al., 2005*). Zellen, die eine EMT durchgemacht haben, weisen eine erhöhte ROS-Produktion auf (*Kim WD et al., 2012*) und ROS ist ein wesentlicher Induktor von Nrf2.

## **1.4 Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

### **1.4.1 Allgemeines**

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein Wachstumsfaktor mit drei verschiedenen Isoformen, dazu gehören TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 (*Miettinen et al., 1994*). Diese Zytokine sind an der Regulation des Zellwachstums, der -differenzierung, der Apoptose sowie der Karzinogenese beteiligt (*Bakin et al., 2004*). TGF- $\beta$ 1 ist darunter die am besten beschriebene Isoform und wurde auch in dieser Arbeit verwandt.

TGF- $\beta$  ist das bekannteste profibrotische Zytokin. Es führt durch die Synthese und den Abbau von EZM Proteinen zur Entwicklung von Organfibrosen, wie z.B. in der Leber. Dabei werden Bestandteile des Bindegewebes wie Kollagen und Fibronectin vermehrt exprimiert, wohingegen die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) durch Heraufregulation ihrer Inhibitoren (TIMP-1, PAI-1) gehemmt wird (*Oh et al., 2012*).

### 1.4.2 Signalwege

TGF- $\beta$  liegt als inaktives Homodimer vor. Bei Aktivierung bindet TGF- $\beta$  an einen Typ-II-TGF- $\beta$ -Rezeptor und aktiviert diesen, welcher wiederum einen Typ-I-TGF- $\beta$ -Rezeptor phosphoryliert und aktiviert. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor leitet das Signal durch Phosphorylierung von „Rezeptor-regulierten“ Smads (R-Smads), unter anderem Smad2 und Smad3, weiter. Die R-Smads können anschließend über eine Komplexbildung mit Smad4 in den Nukleus translozieren und dort direkt an die DNA binden oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (*Massagué, 2008; Shi et Massagué, 2003*).

Neben diesem Smad-abhängigen Signalweg ist TGF- $\beta$  in der Lage unabhängig von Smads zu agieren. Dabei spielen u.a. die MAP-Kinase-Wege, die Rho-ähnlichen GTPase-Wege und der PI3K/Akt-Signalweg eine entscheidende Rolle (*Zhang Y, 2009*).

Die Smad-abhängigen und -unabhängigen Signalwege kommunizieren untereinander, so dass davon auszugehen ist, dass eine Vielzahl an zum Teil noch unbekanntem Signalwegen zu der letztlich vermittelten Wirkung TGF- $\beta$ 's führt (*Zhang Y, 2009*).

### 1.4.3 Rolle von TGF- $\beta$ in der Karzinogenese

Seit längerem ist die duale Rolle von TGF- $\beta$  in der Tumorigenese bekannt. Einerseits hemmt TGF- $\beta$  die Zellproliferation und wirkt damit tumorsuppressiv. Andererseits kann TGF- $\beta$  in späteren Stadien der Karzinogenese maligne Eigenschaften von Zellen fördern und proonkogen wirken (*Roberts und Wakefield, 2003*). Die tumorsuppressive Wirkung auf normale Zellen geht im Verlauf der Tumorigenese verloren. Durch Mutations-bedingte Inaktivierung oder Dysregulationen der Genexpression kommt es zum Verlust der wachstumshemmenden Funktion TGF- $\beta$ 's. Dadurch werden andere TGF- $\beta$ -abhängige Signalwege hochreguliert, welche einen malignen Phänotyp induzieren (*de Caestecker, 2000*). TGF- $\beta$  ist in vielen Tumoren, wie dem Pankreaskarzinom (*Friess et al., 1998*), hochreguliert und stimuliert die Tumorzellen durch autokrine Sekretion sowie durch parakrine Sekretion von Zellen des Stromas (*Bates und Mercurio, 2005*). Zu den proonkogenen Eigenschaften, welche durch TGF- $\beta$  induziert werden, zählen die Motilität, Invasivität und Metastasierung. Jungert et al. zeigten, dass TGF- $\beta$  die EMT und Zellmigration in Pankreastumoren stimuliert (*Jungert et al., 2007*).

Ferner ist TGF- $\beta$  in der Lage oxidativen Stress in Form von ROS zu induzieren (*Bakin et al., 2004; Herrera et al., 2004*). Damit verstärkt TGF- $\beta$  seine protumorigene Wirkung, indem ROS zu DNA-Schädigungen führt und zur Steigerung der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Migration fähig ist (*Storz et al., 2005*).

#### 1.4.4 Nrf2 und TGF- $\beta$

Nrf2 und TGF- $\beta$  nehmen eine wichtige Rolle im Rahmen der Karzinogenese ein. Dabei weisen sie beide eine duale Rolle – Tumorsuppressor versus Protoonkogen – auf. Der Einfluss dieser Faktoren untereinander ist jedoch bisher wenig bekannt.

Bakin et al. zeigten, dass TGF- $\beta$  über die Suppression von Phase-II-Enzymen zur Steigerung von ROS führt. Enzyme wie GCLC, GST oder Katalase werden zum Großteil ARE-abhängig – und damit Nrf2-abhängig – reguliert (*Bakin et al., 2004*). Ein Mediator für die offensichtliche Hemmung von Nrf2 durch TGF $\beta$ 1 ist der Transkriptionsfaktor ATF3 (*Bakin et al., 2004*), für den eine negative Interferenz mit Nrf2-Aktivität beschrieben wurde (*Brown et al., 2008*). Darüber hinaus wurde ein induzierender Effekt von ATF3 auf die EMT in Brustkrebszellen beschrieben (*Yin et al., 2010*).

Zudem waren Oh et al. in der Lage die Inhibition des TGF- $\beta$ /Smad Signalwegs durch Nrf2 aufzuzeigen. Sie konnten darlegen, dass SFN die TGF- $\beta$ -induzierte fibrotische Genexpression in humanen Ito-Zellen durch Nrf2-abhängige Inhibition des TGF- $\beta$ /Smad-Signalwegs hemmt (*Oh et al., 2012*).

Gerade bei der entzündlichen Genese des PDAC spielt vermutlich eine persistierende Stressexposition des Gangepithels im reaktiven Stroma eine große Rolle. Hierbei ist auch TGF- $\beta$  bereits frühzeitig involviert, welcher v.a. durch die EMT maßgeblich an der Initiation eines malignen Phänotyps beteiligt ist. Da auch Nrf2 bei persistierender Stressexposition eine entscheidende Rolle spielt, könnte hierbei ein *Cross-talk* zwischen Nrf2 und TGF- $\beta$  das frühe Geschehen der Karzinogenese des PDAC beeinflussen, was Gegenstand der folgenden Untersuchungen ist.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Am Beispiel der pankreatischen Tumorigenese soll der Einfluss von Nrf2 auf EMT assoziierte Veränderungen untersucht werden. Dies erfolgt anhand der malignen pankreatischen Zelllinie Colo357 sowie der prämaligen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE, die unter Nrf2-aktivierenden Bedingungen (SFN, tBHQ) bzw. einer Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 hinsichtlich ihres invasiven bzw. migratorischen Phänotyps sowie der EMT-Markerexpression und Signaltransduktion analysiert werden sollen. Weiterhin soll unter diesen Bedingungen das Wachstums- und Apoptoseverhalten analysiert werden.

Aus den Befunden sollen sich Anhaltspunkte ergeben, ob und wie Nrf2 schon frühzeitig in der entzündlichen Karzinogenese – z.B. des Pankreas – an der Ausbildung eines malignen Phänotyps, im Wesentlichen durch EMT assoziierte Veränderungen, beteiligt ist und ob hier ggf. ein Zusammenspiel zwischen Nrf2 und dem Zytokin TGF- $\beta$ 1 besteht. Ein solches Szenario stützt sich auf dem Umstand, dass Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 beide an der epithelialen Adaptation an eine chronische Entzündung, z.B. während einer chronischen Pankreatitis, entscheidend beteiligt sind. Aufgrund dessen könnte das Zusammenwirken von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 im Rahmen der Adaptation an oxidativen Stress – sowie im Fortgang der EMT – ein entscheidender Mechanismus der entzündlichen Tumorigenese des Pankreas sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Autoklav	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Kendro, Langenselbold
Blotkammer Fastblot	Biometra, Göttingen
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer XCell SureLock	Invitrogen, Karlsruhe
Kipptisch WT17	Biometra, Göttingen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Zaventem, Belgien
iCycler MyiQ	Bio-Rad, München
Infinite 200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Luminometer LB96V	EG&G Berthold, Pforzheim
Nano Drop Spectrophotometer 10-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen
pH-Meter Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Photometer Opsys MR	Dynex Technologies, USA
Pipetboy	Integra, Fernwald
Pipetten, diverse	
Rollenmischer roller mixer SRT6D	VWR, Darmstadt
Schüttler Tumbling Table	Biometra, Göttingen
Sonicator Sonopuls	Bandelin, Berlin
Sterilwerkbank	Kendro, Langenselbold
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer/Thermoblock 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumpumpe KNF	Laboport, Freiburg
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

## 2.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Biomol, Hamburg
BSA Fraktion V	Biomol, Hamburg
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Caspase-Assay	Promega, Heidelberg
DcFdA	Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
DTT	Biomol, Hamburg
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Effectene™ Reagenz	Qiagen, Hilden
EGF	Life Technologies, Darmstadt
Essigsäure, 10 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	Merck, Darmstadt
HiperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
IQ Sybr Green Supermix	Bio-Rad, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagen Typ I, from calf skin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kollagen Typ I, bovine	Advanced BioMatrix, San Diego, USA
Kristallviolettlösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
LumiGlo Lösung	Cell Signaling, Frankfurt am Main

*Material und Methoden*

Methanol 100 %	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MitoSOX	Life Technologies, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PCR Auftragspuffer (5x)	Qiagen, Hilden
PeqGOLD TOTAL RNA Kit	Peqlab, Erlangen
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, München
Polyacrylamid-Lösung	Biomol, Hamburg
Propanolol	Merck, Darmstadt
Proteinbestimmungsassay D <sub>c</sub>	Bio-Rad, München
Proteinmarker PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkription Reagenzien	Promega, Heidelberg
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Darmstadt
RPMI Medium	Biochrom KG, Berlin
Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
SDS	Biomol, Hamburg
SFN	Sigma-Aldrich Chemie, München
Signal ARE Reporter Assay Kit	Quiagen, Hilden
SuperSignal Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
tBHQ	Sigma-Aldrich Chemie, München
Temed	Roth, Karlsruhe
TGF-β1	BioLegend, Fell
Tris Base	Biomol, Hamburg
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

3,5 ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well PCR Platten	Corning, Amsterdam, Niederlande
96-Well Platte, weiß ummantelt	Falcon über BD Biosciences, Hamburg
Deckgläser 18 mm	Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim
Filterpapier, Whatman 3 MM	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Microtest Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transfermembran	Immobilon-PVDF Millipore, USA
Transwells	Greiner bio-one, Frickenhausen
Wattestäbchen	Noba Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.4 Antikörper

### Primärantikörper

E-Cadherin	Maus	Cell Signaling, Frankfurt a. M
Hsp90	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Keap1	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M
L1CAM	Maus	Acris, Hiddenhausen
Lamin A	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
NQO1	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology,

		Heidelberg
Nrf2	Kaninchen	Abcam, Cambridge
Phospho-JNK	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M
Phospho-Smad2	Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt a. M
Tubulin	Maus	Sigma Aldrich Chemie, München
Vimentin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

### Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen-HRP	Ziege/IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
Anti-Maus-HRP	Pferd/IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a.M.

## 2.5 Primer

Primer	Vorwärts- und Rückwärtsprimer	Hersteller
E-Cadherin	5' - TGC TCT TGC TGT TTC TTC GG-3' 5' - TGC CCC ATT CGT TCA AGT AG-3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
L1CAM	5' - GAA CTG GAT GTG GTG GAC AG -3' 5' - GAG GGT GGT AGA GGT CTG GT- 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
NFE2L2	5' - GCG ACG GAA AGA GTA TGA GC -3' 5' - GTT GGC AGA TCC ACT GGT TT-3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
NQO1	5' - AAA TCC TGG AAG GAT GGA AG - 3' 5' - TTG TCA GTT GGG ATG GAC TT - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
Slug	5' - ACA CAC ACA CAC CCA CAG AG - 3' 5' - AAA TGA TTT GGC AGC AAT GT - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
TBP	5' - TAT AAT CCC AAG CGG TTT GC-3'	RealTimePrimers, Elkins

	5' - GCT GGA AAA CCC AAC TTC TG-3'	Park, USA
TGF-β1	5' - CGT GGA GCT GTA CCA GAA ATA-3'	RealTimePrimers, Elkins
	5' - TCC GGT GAC ATC AAA AGA TAA-3'	Park, USA
Vimentin	5' - TCC AAG TTT GCT GAC CTC TC-3'	RealTimePrimers, Elkins
	5' - TCA ACG GCA AAG TTC TCT TC-3'	Park, USA

## 2.6 siRNAs

pcDNA3.1 Kontrollplasmid	Invitrogen, Karlsruhe
Keap1	Qiagen, Hilden
Nrf2-6 1027418	Qiagen, Hilden

## 2.7 Plasmide

Kontrollplasmid	Eigenherstellung
Keap1	Eigenherstellung
Nrf2	Eigenherstellung

## 2.8 Zellbiologische Methoden

### 2.8.1 Zelllinien

Die Zelllinie Colo357 von Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff, Sektion für Molekulare Medizin, Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH Kiel, wurde in RPMI Medium, supplementiert mit 1 % (w/v) L-Glutamin, 10 % (w/v) FCS und 1 % (w/v) Natriumpyruvat, kultiviert.

Die Zelllinie HPDE von Prof. MD. Ming-Sound Tsao, Ontario Cancer Institut, Princess Margaret Hospital, Toronto, essentiell beschrieben u.a. in Geismann et al. (*Geismann et al., 2009*), wurde in RPMI Medium und Keratinozytenmedium (1:1), supplementiert mit 0,5 % (w/v) L-Glutamin, 5 % (w/v) FCS, 5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) und 50 g/ml Rinderhypophysenextrakt, kultiviert.

### 2.8.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in

Brutflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich gemäß der Zellzahl geteilt. Dafür wurde das Medium abgesaugt und 5 ml 1xTrypsin-EDTA in die Flaschen gegeben. Das Trypsin-EDTA diente dem Ablösen der Zellen, welches abhängig von der verwendeten Zellart etwa 15 bis 20 Minuten dauerte. Diese Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und sieben Minuten bei 12.000 U<sub>p</sub>M zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für die Versuche meist in 12-Well-Platten ausgesät und die übrig gebliebenen Zellen auf neue Brutflaschen verteilt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % kultiviert.

### 2.8.3 Stimulation

Zur Stimulation der Zellen wurden 10 ng/ml TGF-β1, 50 μM tBHQ und / oder 10μM SFN eingesetzt.

### 2.8.4 Transfektion

#### Transfektion mit siRNA

Diese Transfektion dient dem *Knockdown* bestimmter Gene und wurde mit Nrf2- und Keap1-siRNA jeweils im Vergleich mit einer Kontroll-siRNA durchgeführt.

Sie wurde bei Zellen in 12-Well-Platten vorgenommen. Pro Well wurden 100 μl Optimem-Medium und 6 μl Transfektionsreagenz (HiperFect) mit 75 ng der jeweiligen siRNA zusammengegeben und vermischt. Nach einer zehnmütigen Inkubationszeit und einem Mediumwechsel der Zellen mit 1 ml Medium pro Well, wurden 106μl des Ansatzes tröpfchenweise in die Wells gegeben.

#### Transfektion mit Plasmiden

Die Transfektion mit Plasmiden wurde mit dem Transfektionsreagenz Effectene bei Zellen in 12-Well-Platten durchgeführt. Hierfür wurden pro Well 100 μl EC-Puffer mit 0,3 μg Plasmid-DNA und 8 μl Enhancer/μg Plasmid-DNA vermischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Darauf folgend wurden 20 μl Effekten/μg Plasmid-DNA dazugegeben, vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden noch 300 μl Medium mit dem Ansatz vermischt und nach einem Mediumwechsel der Zellen, wurden 350 μl tröpfchenweise in die

Wells gegeben. Nach 6-12 Stunden wurde ein erneuter Mediumwechsel vorgenommen.

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Bei den ausgesäten und kultivierten Zellen, wie unter 2.8 beschrieben, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Dann wurden je nach Zelldichte 70-250  $\mu$ l Lämmli-Puffer in die Wells gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

Zur Homogenisierung wurden die Proben mittels Sonicator Sonopuls (Bandelin) geschallt und danach bei -20 °C eingefroren.

**2x Lämmli-Puffer:**            128 mM Tris Base  
                                      4,6 % (w/v) SDS  
                                      10 % (v/v) Glycerol  
                                      ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
                                      pH 7,6

### 2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mittels Proteinassay D<sub>C</sub> der Firma Bio-Rad nach Herstellerangabe ermittelt. Hierzu wurden je 5  $\mu$ l der Proben in Doppelwerten auf 96-Well Microtest-Platten pipettiert und die Reagenzien dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Konzentration mit dem Photometer Opsys MR (Dynec Technologies) sowie der Revelation QuickLink Software ausgewertet. Als Vergleich diente eine Verdünnungsreihe aus einem Proteinstandard und Lämmli-Puffer (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 0).

### 2.9.3 Einstellen des Proteingehaltes

**4 x Farbpuffer:**            0,005 % (w/v) Bromphenolblau  
                                      2,5 % (v/v) Mercaptoethanol  
                                      in 2x Lämmli-Puffer

Nach Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Proben mittels Lämmli-Puffer auf eine einheitliche Konzentration (8-12 µg Protein) eingestellt. Hierfür wurde das benötigte Volumen der Probe mit Lämmli-Puffer auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt.

Dann wurden 5 µl des 4x Farbpuffers dazugegeben, die Proben fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert.

#### 2.9.4 Gelelektrophorese

<b>10 % Trenngel:</b>	3 ml Aqua dest. 1,5 ml Trenngelpuffer pH 8,8 1,5 ml 40 % PAA 22 µl 10 % APS 4,4 µl Temed
<b>Trenngelpuffer:</b>	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH-Wert mit HCl auf 8,8 eingestellt
<b>Sammelgel:</b>	1575 µl Aqua dest. 625 µl Sammelgelpuffer pH 6,8 250 µl 40 % PAA 13 µl 10 % APS 2,5 µl Temed
<b>Sammelgelpuffer:</b>	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst das Polyacrylamid-Gel gegossen. Dafür wurde 10 %-Trenngel angesetzt und zwischen zwei Glasplatten gefüllt. Darauf wurde eine Schicht Iso-Propanolol gegossen. Das Gel wurde getrocknet und anschließend in feuchte Tücher

gewickelt, luftdicht verpackt und bei 4 °C über Nacht gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurde das Sammelgel als oberste Schicht auf das Trenngel gegossen und eine weitere Stunde getrocknet.

Die vorbereiteten Proben wurden anschließend in die Taschen des Polyacrylamid-Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer bei 35 mA. Die Proteine wurden mittels Blotkammer auf eine Membran übertragen.

### **2.9.5 Proteintransfer (Western-Blotting)**

1xTBS	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
TBS-Tween	100 ml 10xTBS 500 µl Tween-20 ad 1000 ml Aqua dest.
Blot-Puffer A	300 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 11
Blot-Puffer B	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 10,6
Blot-Puffer C	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 0,04 M Aminocaprinsäure pH 10,6

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurden Whatman-Papiere genutzt.

Davon wurden sechs Blätter in Blot-Puffer A und drei Blätter in Blot-Puffer B getränkt und übereinander geschichtet. Darüber wurden die Membran, das Gel und drei in Blot-Puffer C getränkte Blätter Whatman-Papier gelegt.

Der Transfer wurde mittels Blotkammer bei 70 mV über eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde die Membran auf dem Schüttler in TBS-Tween gewaschen und eine Stunde mit 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween blockiert.

Der jeweilige Erstantikörper wurde nach Herstellerangabe in 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween oder 5 % (w/v) BSA in TBS-Tween verdünnt und mit der Membran in ein 50-ml-Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Kipp-/Rollmischer gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Blot drei Mal je zehn Minuten in TBS-Tween gewaschen und dann für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Bei dem Zweitantikörper handelte es sich um einen Horseradish-Peroxidase-gekoppelten (HRP) Antikörper.

Dafür wurde der Zweitantikörper mit 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween verdünnt und mit der Membran in ein 50-ml-Röhrchen gegeben. Bei Raumtemperatur wurde das Röhrchen auf einem Kipp-/Rollmischer gelagert. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-Tween für je zehn Minuten gewaschen. Die Entwicklung des Blots wurde mit SuperSignal-Substrat von Thermo Scientific durchgeführt. Die Lichtreaktion wurde mittels ChemiDoc XRS von Bio-Rad gemessen und in Form von Banden detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde in jedem Gel das *Houskeeping Gene* Hsp90 detektiert.

## **2.10 Molekularbiologische Methoden**

### **2.10.1 RNA-Isolierung**

Die Zellen wurden wie unter 2.8 beschrieben ausgesät und kultiviert. Die RNA-Isolierung wurde mit dem peqGOLD Total RNA Kit von Peqlab nach Herstellerangabe durchgeführt.

Dafür wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt und diese mit 1ml PBS gewaschen. Nach der Isolierung der mRNA in 40 µl RNA-freies Wasser wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrop Photometers bei 260/280 nm bestimmt.

Die Proben wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

### **2.10.2 Herstellung von cDNA (reverse Transkription)**

Für die reverse Transkription wurden die Reagenzien von Promega verwendet. Nachdem die Konzentration der Proben bekannt war, wurden die Proben für die reverse Transkription auf 0,5 µg RNA pro Probe eingestellt. Das benötigte Probenvolumen wurde mit nucleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl Oligo-dT-Primer gegeben. Die Proben wurden im Folgenden fünf Minuten bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz an zentrifugiert. Dann wurden 4 µl 5x Reaktion Buffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl RevertAid M-MLV Reverse Transcriptase dazugegeben, die Proben gemischt und erneut kurz an zentrifugiert. Die Proben wurden 60 Minuten bei 42 °C und abschließend fünf Minuten bei 70 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.10.3 Realtime PCR**

Die hergestellte cDNA wurde 1:4 mit nucleasefreiem Wasser verdünnt. Es wurden je 5 µl der cDNA in Doppelwerten in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert und 15 µl des Mastermixes dazugegeben. Die PCR-Platte wurde mit einer selbstklebenden PCR-Folie verschlossen. Die PCR erfolgte im iCycler MyiQ Single Color Realtime PCR Detection System von Bio-Rad unter Verwendung der MyiQ-Software. Zur Kontrolle des cDNA-Gehaltes der Proben wurde das Housekeeping Gene TBP detektiert.

**Mastermix je Probe:**            10 µl SYBR Green Mix  
   2 µl Primer-Mix (2 nM)  
   3 µl Aqua dest.

## **2.11 Analytische Methoden**

### **2.11.1 Migrations-/Scratch-Assay**

#### **Prinzip**

Bei diesem Versuch wurde die Fähigkeit von Zellen untersucht in einen zellfreien Spalt (Wunde) zu migrieren.

## **Durchführung**

Die Zellen wurden in Zweikammer-Inserts auf einer 35-mm-Kulturschale (Ibidi GmbH) ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit tBHQ oder TGF- $\beta$ 1 stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Anschließend wurde durch Entfernen des Inserts ein 500  $\mu$ m breiter Spalt im zellulären Monolayer gebildet. Die Zellen wurden sofort und dann nach 4h, 8h, 16h und 24h Stunden unter dem Mikroskop (bei 10-facher Vergrößerung) beobachtet und fotografiert.

### **2.11.2 Boyden-Invasionsassay**

#### **Prinzip**

Bei diesem Versuch wurde die Migrationsfähigkeit der unterschiedlich transfizierten und / oder stimulierten Zellen, wie unter 2.8 beschrieben, durch ein Transwell (=Transmigration/Invasion) untersucht. Dazu wurden  $7 \times 10^4$  Zellen im Doppelansatz in ein mit Kollagen beschichtetes Transwell gegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Transmigrationsrate mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Pro Doppelansatz wurden einmal die migrierten Zellen und einmal die Gesamtheit der Zellen angefärbt. Die Farbintensität wurde photometrisch gemessen. Der Quotient aus den migrierten Zellen zu der Gesamtheit der Zellen ergab die Transmigrationsrate.

#### **Durchführung**

Beschichtungslösung	400 $\mu$ g/ml Kollagen I in PBS
Kristallviolett-Lösung	300 mg Kristallviolett, gelöst in 6 ml Ethanol (2 %; v/v) 300 ml Borat Puffer (0,1 M pH 8,5)

Die Transwell-Einsätze (Porengröße: 8  $\mu$ m) wurden mit 50  $\mu$ l einer Kollagen-I-Lösung beschichtet und 1,5 Stunden unter einer Sterilbank getrocknet. Die Einsätze wurden dann in eine 12-Well-Platte eingehängt, die Platte verschlossen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die behandelten Zellen, wie unter 2.8 beschrieben, vorbereitet. Dazu wurde das Medium aus den 12-Well-Platten abgesaugt und 500  $\mu$ l Trypsin-EDTA in die Wells

gegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die abgelösten Zellen in dem Trypsin-EDTA und mit je 500 µl frischem Medium in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben. Die Zellsuspensionen wurden fünf Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 750 µl frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden die Zellsuspensionen mit frischem Medium auf eine Konzentration von  $1,4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

Schließlich wurden 500 µl Medium in die Wells der vorbereiteten 12-Well-Platte gegeben und je 500 µl der Zellsuspensionen in Doppelansätzen in die Transwells gegeben. Die Platte wurde für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium vorsichtig aus den Wells und Transwells abgesaugt und je ein Transwell des Doppelansatzes von innen mit einem Wattestäbchen gesäubert. Alle Transwells wurden in eine neue 24-Well-Platte umgesetzt. Dann wurden 400 µl Kristallviolett-Lösung in die Wells und 100 µl in die Transwells pipettiert und die Zellen für 30 Minuten gefärbt. Die Farbe wurde wieder abgesaugt und die Wells wurden dreimal mit 1000 µl, die Transwells mit 500 µl Aqua dest. für je 15 Minuten gewaschen. Die Entfärbung der Zellen erfolgte mit 500 µl 10 % (v/v) Essigsäure über eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Auswertung in Doppelbestimmungen fand mit Hilfe einer 96-Well-Platte am Plattenphotometer Opsys MR (Dynec Technologies) bei 550 nm statt. Mit den gemessenen OD-Werten wurde die Migrationsrate wie folgt errechnet:

$$\text{Prozentuale Migrationsrate} = \frac{\text{OD } 500 \text{ nm der migrierten Zellen} \cdot 100}{\text{OD } 500 \text{ nm der gesamten Zellen}}$$

### 2.11.3 Luziferaseassay

Der Luziferaseassay wurde mit dem Promega Dual Luciferase Reporter Assay System durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion (siehe Abschnitt 2.8.4) mit 0,5 µg des spezifischen Firefly-Luziferase-Plasmids (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Hendrik Ungefroren, Lübeck) unter Kontrolle des *Smad response elements* (SRE) in 6-facher Konfiguration oder dem Kontrollplasmid pGL3 (Promega) sowie mit 0,1 µg des Renilla-Luziferase-Referenzplasmids (Promega). 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Stimulation über verschiedene

Zeitpunkte. Abschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen mit einem Zellschaber in 120 µl 1 x Passive Lysisbuffer (Promega) abgelöst und 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Darauffolgend wurden je 20 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte pipettiert und 25 µl der Lösung LAR II dazugegeben. Direkt im Anschluss wurde die Lumineszenz der Firefly-Luziferase über 20 Sekunden gemessen. Dann wurden 25 µl Stop-and-Glow-Substrat dazugegeben und es wurde die Lumineszenz der Renilla-Luziferase über 20 sec gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Microplate Luminometer LB96V von EG&G Berthold und der WinGlow Software (Berthold Technologies) durchgeführt. Zur Analyse wurden die Werte der Firefly-Luziferase auf die der Renilla-Luziferase normiert.

#### **2.11.4 Messung der Apoptose-Aktivität**

##### **Prinzip**

Die Messung der Apoptose-Aktivität wurde mittels Caspase-Assay von Promega durchgeführt. Hierbei wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Lumineszenz-Messung ermittelt. Das Caspase-Substrat führt zur Zelllysis und wird bei diesem Vorgang gespalten, was zur Freisetzung von Aminoluciferin führt, welches von der Luziferase verbraucht wird. Dadurch wird ein Lumineszenz-Signal erzeugt, welches proportional zur Menge der Caspase-3/7-Aktivität ist.

##### **Durchführung**

Die Zellen wurden wie unter 2.8 beschrieben in 12-Well-Platten ausgesät und kultiviert. Anschließend wurde der Zellüberstand abgenommen und in ein Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden mit 500 µl trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden dann zu dem Zellüberstand gegeben und die gesamte Zellsuspension wurde zehn Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Zellen wurden in 600 µl PBS resuspendiert. Dann wurden je 25 µl der Zellsuspension als Doppelwerte mit 25 µl Caspase-Substrat in eine weißwandige 96-Well-Platte pipettiert und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung fand mittels Microplate Luminometer LB96V von EG&G Berthold statt.

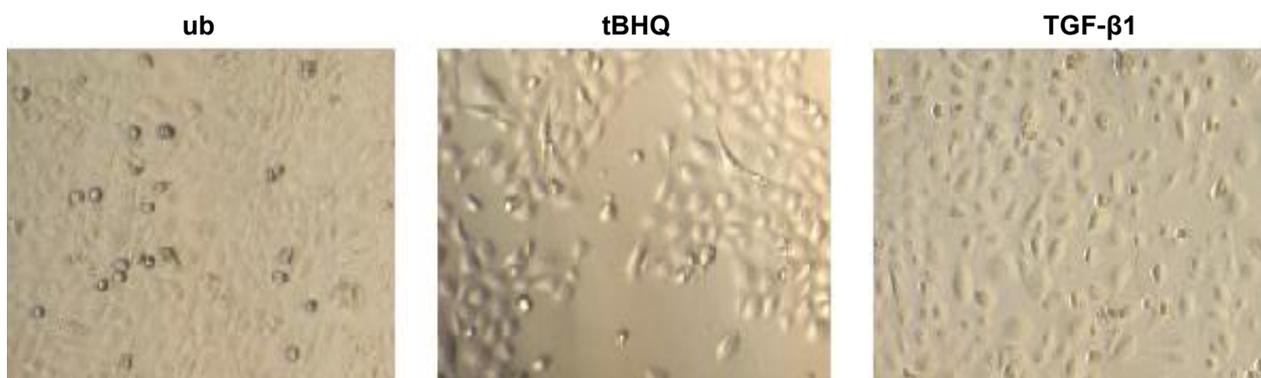
## **2.12 Statistik**

Die hier gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte nach der Standardabweichung. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des student's t-test, prädiktive Werte 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse – Malignität förderndes Potential von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1

#### 3.1 Morphologische Eigenschaften und Migrationsverhalten

Wesentliche Merkmale von malignen Epithelzellen sind die veränderte Zellmorphologie und die Migrationsfähigkeit. Um den Einfluss von Nrf2 hinsichtlich seines malignitätsfördernden Potentials zu untersuchen, wurden zunächst die Morphologie und das Migrationsverhalten von HPDE Zellen unter Nrf2-Induktion mittels tBHQ untersucht. Im Vergleich erfolgte zudem eine Stimulation mit dem Zytokin TGF- $\beta$ 1, welches für seinen Einfluss auf die Wandlung des epithelialen Phänotyps in Richtung mesenchymaler Phänotyp bekannt ist (Kiefel et al., 2012).



**Abbildung 3.1: Stimulation mit tBHQ und TGF- $\beta$ 1 verändert die Morphologie der HPDE Zellen.** HPDE Zellen wurden unbehandelt (ub) oder nach 24-stündiger Inkubation mit tBHQ bzw. TGF- $\beta$ 1 betrachtet. Die Stimulation durch tBHQ und TGF- $\beta$ 1 induzierte einen fibroblastoiden Phänotyp. 5-fache Vergrößerung.

HPDE Zellen, bereits eingehend charakterisiert in Furukawa et al. (Furukawa et al., 1996), besitzen einen epithelialen Phänotyp. Die Zellen sind entsprechend von polygonaler Struktur, haben feste Zell-Zell-Kontakte und liegen als epithelialer Monolayer vor. Dieser feste Zellverband löste sich nun unter Nrf2-Induktion mittels tBHQ zunächst auf. Der Monolayer zerfiel dabei und die Zellinteraktionen gingen deutlich verloren. Die HPDE Zellen bildeten des Weiteren spindelförmige Ausläufer und veränderten ihre Form zu lang ausgestreckten Strukturen. Diese morphologische Erscheinungsform entsprach dabei einem fibroblastoiden/mesenchymalen Phänotyp. Ein gleichartiger Effekt war ebenso unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation, wenn auch nicht ganz so deutlich, zu beobachten. Auch hier veränderten sich die Zellen

## *Ergebnisse*

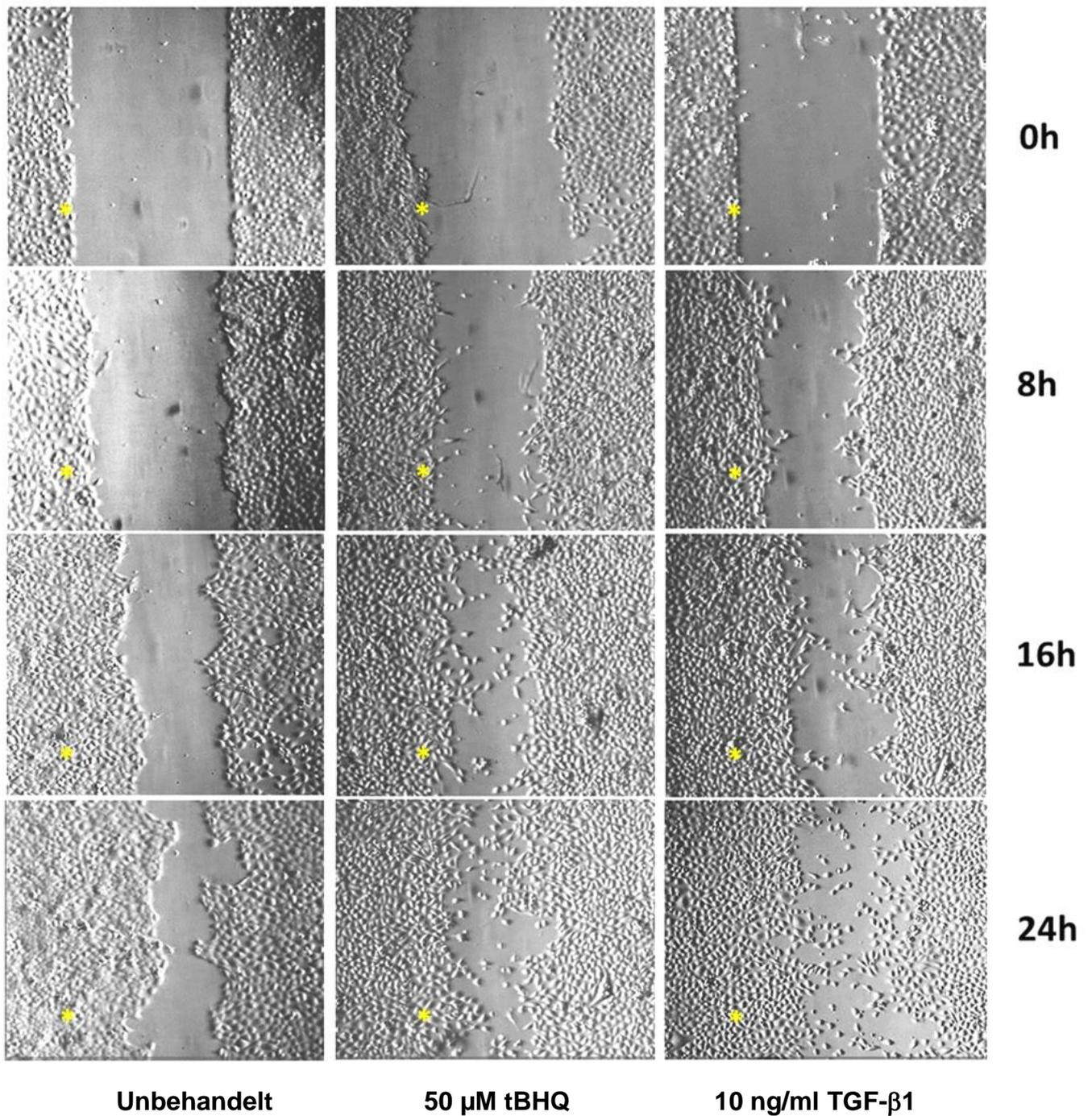
morphologisch und bildeten einen spindelförmigen, fibroblastoiden Phänotyp aus. Die Tatsache, dass diese morphologischen Effekte weniger deutlich auftraten als unter tBHQ-Behandlung, könnte Ausdruck einer geringeren Zelldichte, als Resultat der verminderten Zellteilung durch TGF- $\beta$ 1, sein (Abb. 3.1).

Welchen Einfluss diese Veränderungen auf das migratorische Verhalten der HPDE Zellen haben, wurde nachfolgend zunächst mittels Scratch-Assay untersucht.

Bei den unbehandelten HPDE Zellen lagen die Zellen, wie oben beschrieben, in einem dichten epithelialen Zellverband vor, so dass nach Setzen der Wunde (Scratch) durch Entfernung des Zweikammer-Inserts an beiden Seiten glatte Ränder zu sehen waren. Nach vier Stunden waren noch keine wesentlichen Veränderungen dieser Ränder wahrzunehmen; nach 8h begann sich der Spalt jedoch zu verkleinern. Da die Zellen weder ihre Morphologie, noch ihre Lage zueinander veränderten, die Ränder des Spaltes glattrandig blieben und keine einzelnen Zellen innerhalb des Spaltes zu beobachten waren, ist eine proliferative – und keine migrationsbedingte – Verengung des Spaltes anzunehmen. Nach 16h und 24h war der Spalt noch stärker und weitgehend gleichmäßig verengt (Abb. 3.2), wobei die Morphologie der Zellen weiterhin der Morphologie der Zellen vor dem Scratch glich (siehe Abb. 3.1).

Die tBHQ-stimulierten HPDE Zellen zeigten ein anderes Bild. Schon wenige Stunden (8h) nach dem Scratch lockerte sich der Zellverband im Randbereich des Spaltes auf und einige vereinzelt Zellen befanden sich in dem Spalt. Nach 16h waren die Ränder des Scratches nicht mehr deutlich abgrenzbar. Die Zellen hatten sich aus ihrem Zellverband gelöst und es waren einige spindelförmige Zellen zu erkennen, die den gesamten Zwischenraum zwischen den ursprünglichen Wundrändern besiedelt hatten. Nach 24 h war dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach Behandlung der HPDE Zellen mit TGF- $\beta$ 1. Auch hier zeigte sich innerhalb von 8-24 h ein Einwandern morphologisch veränderter Zellen in den Spalt (Abb. 3.2).

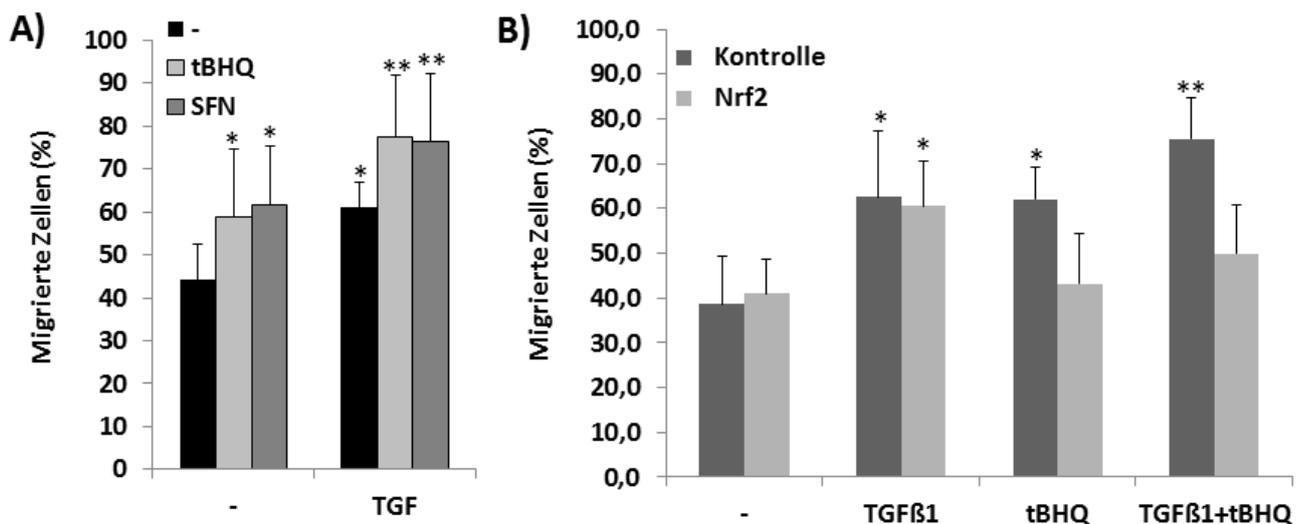


**Abbildung 3.2: Scratch-Assay von HPDE Zellen.** Lichtmikroskopische Betrachtung von unbehandelten im Vergleich mit tBHQ- bzw. TGF-β1-stimulierten HPDE Zellen zum Zeitpunkt des Scratches (0h), sowie 8h, 16h und 24h danach. \*gibt die Wundränder zum Zeitpunkt 0h. 10-fache Vergrößerung.

### 3.2 Veränderungen der Invasivität

Nachfolgend wurden der Einfluss von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, 24h) auf die Invasivität von benignen und malignen Pankreasgangepithelzellen mit Hilfe des Boyden-Invasionsassays untersucht. Die Versuche erfolgten wiederum mit HPDE Zellen, sowie mit der Pankreasadenokarzinomzelllinie Colo357. Als Nrf2-Induktoren wurden 50  $\mu$ M tBHQ und 20  $\mu$ M Sulforaphan (SFN) verwandt.

Bei den unbehandelten HPDE Zellen zeigten prozentual 44,2 % ( $\pm$  8,4 %) der Zellen eine Transmigration durch die mit Kollagen beschichteten Transwells (Abb. 3.3, A). Die Behandlung mit tBHQ (40h) erhöhte die Invasivität der HPDE Zellen auf 59,0 % ( $\pm$  15,4), mit SFN (40h) auf 61,5 % ( $\pm$  13,9) und mit TGF- $\beta$ 1 (24h) auf 61,0 % ( $\pm$  6,1 %). Die Kombination aus beiden Stimuli führte zu einer weiteren Steigerung der Transmigrationsrate auf 77,7 % ( $\pm$ 14,3) bzw. 76,6 % ( $\pm$  15,6).

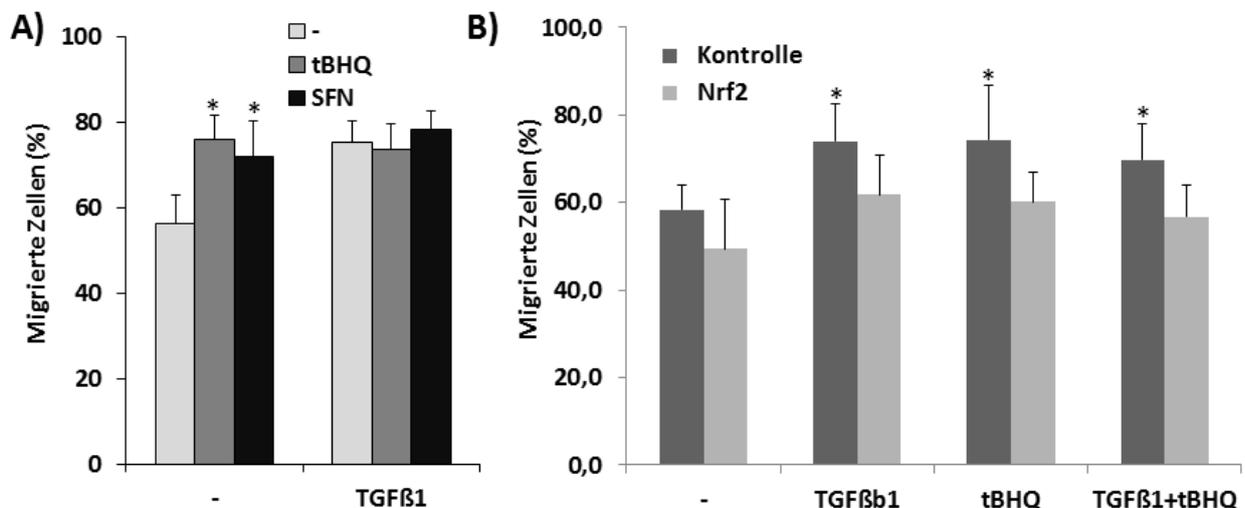


**Abbildung 3.3: Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 erhöhen die Invasionsrate von HPDE Zellen.** A) HPDE Zellen wurden über 40 h mit tBHQ oder SFN bzw. für 24h mit TGF- $\beta$ 1 alleine oder in Kombination stimuliert und ihre Transmigrationsfähigkeit im Vergleich mit unbehandelten HPDE Zellen im Boyden-Assay analysiert. B) HPDE Zellen wurden über 24 h mit Kontroll- bzw. Nrf2-siRNA transfiziert und anschließend mit tBHQ und TGF- $\beta$ 1 alleine oder in Kombination stimuliert. Die Invasionsrate wurde im Vergleich mit nicht stimulierten, aber transfizierten HPDE Zellen mittels Boyden-Assay bestimmt. \* $p$ <0,05 und \*\* $p$ <0,01 gegenüber unbehandelt. (MW $\pm$ SD, n=4).

Zur Verifikation der Nrf2-Abhängigkeit wurde die Invasivität unter tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-Behandlung nach *Knockdown* der Nrf2-Expression mittels siRNA untersucht. Es war zu

beobachten, dass hierdurch der Invasions-induzierende Effekt von tBHQ sowohl alleine als auch in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 stark vermindert wurde. Während tBHQ in den mit Kontroll-siRNA behandelten HPDE Zellen die Transmigration von 38,6 % ( $\pm$  10,7) auf 51,8 % ( $\pm$  5,9 %) und die Kombination aus tBHQ und TGF- $\beta$ 1 auf 67,5 % ( $\pm$  7,9 %) steigerten (Abb. 3.3, B), waren diese induzierenden Effekte nach Behandlung mit Nrf2-siRNA deutlich geringer (von 41,0 ( $\pm$  7,6) auf 39,7 % ( $\pm$  10,2) bzw. auf 50,8 % ( $\pm$  11,1)). Die Transmigrationsrate nach alleiniger TGF- $\beta$ 1-Behandlung entsprach hingegen in Nrf2-siRNA-transfizierten HPDE Zellen derjenigen in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (57,0 % ( $\pm$  13,5) versus 60,6 % ( $\pm$  10,0)).

Colo357 Zellen hatten bereits basal mit 56,3 % ( $\pm$  7,2 %) eine höhere Invasionsrate als HPDE Zellen. Die Invasivität von Colo357 Zellen ließ sich durch tBHQ auf 75,8 % ( $\pm$  6,5), durch SFN auf 72,1 % ( $\pm$  8,5) und durch TGF- $\beta$ 1 auf 75,1 % ( $\pm$  5,0 %) steigern. Im Gegensatz zu HPDE Zellen, zeigte die Kombination aus tBHQ bzw. SFN mit TGF- $\beta$ 1 keine weitere Steigerung der Transmigrationsrate von Colo357 Zellen (74,6 %  $\pm$  6,0 bzw. 78,3 %  $\pm$  4,4).



**Abbildung 3.4: Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 erhöhen die Invasionsrate von Colo357 Zellen.** A) Colo357 Zellen wurden über 40 h mit tBHQ oder SFN bzw. für 24h mit TGF- $\beta$ 1 alleine oder in Kombination stimuliert und ihre Transmigrationsfähigkeit im Vergleich mit unbehandelten Colo357 Zellen im Boyden-Assay analysiert. B) Colo357 Zellen wurden über 24 h mit Kontroll- bzw. Nrf2-siRNA transfiziert und mit tBHQ und TGF- $\beta$ 1 alleine oder in Kombination stimuliert. Die Invasionsrate wurde im Vergleich mit nicht stimulierten, aber transfizierten Colo357 Zellen mittels Boyden-Assay bestimmt. \* $p$ <0,05 gegenüber unbehandelt. (MW $\pm$ SD, n=4).

In gleicher Weise zu den HPDE Zellen, wurde der induzierende Effekt von tBHQ allein, sowie in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, unter Nrf2-*Knockdown* vermindert (von 74,3 % ( $\pm$  12,6) bzw. 69,8 % ( $\pm$  11,4) auf 59,9 % ( $\pm$  6,8) bzw. 56,7 ( $\pm$  7,3)). Interessanterweise waren in Nrf2-siRNA-transfizierten Colo357 Zellen auch bereits die basale Transmigrationsrate sowie der induzierende Effekt der alleinigen TGF- $\beta$ 1-Behandlung schwächer ausgeprägt. Während in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen TGF- $\beta$ 1 zu einer Erhöhung der Transmigrationsrate von 58,9 % ( $\pm$  9,1 %) auf 74,1 % ( $\pm$  8,5 %) führte, war dies in Nrf2-siRNA-transfizierten Zellen mit einem Anstieg von 49,8 % ( $\pm$  14,0) auf 61,6 % ( $\pm$  9,1) deutlich erniedrigt.

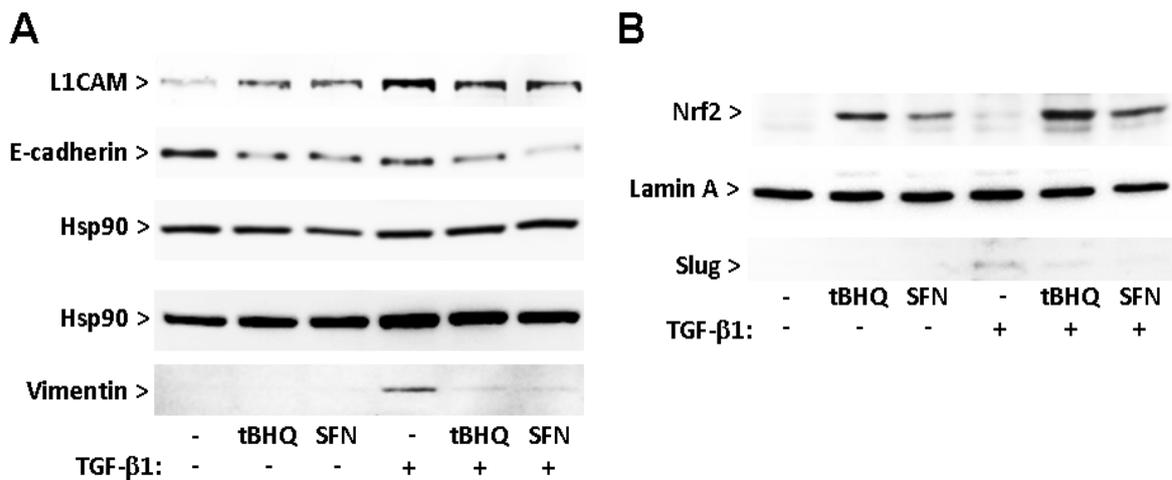
### 3.3 Expression von EMT-Markern

Wie oben gezeigt, induziert Nrf2, in ähnlichem Maße wie TGF- $\beta$ 1, morphologische Veränderungen und ein gesteigertes Migrationsverhalten in benignen (HPDE), wie auch malignen (Colo357) Pankreasgangepithelzellen. Diese Effekte sind für TGF- $\beta$ 1 bereits in anderen Arbeiten untersucht worden. Dort konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 über eine Induktion der EMT wesentlich an der frühen Initiation eines malignen Phänotyps, mit oben genannten Eigenschaften, beteiligt ist (*Ellenrieder et al., 2001; Zavadil et Böttinger, 2005; Kiefel et al., 2012*).

Es wurde nun der Frage nachgegangen, ob Nrf2 auf die gleiche Art zu diesen ähnlich erscheinenden morphologischen und migratorischen Veränderungen führt. Dazu wurde die Expression bestimmter EMT-Marker zunächst auf Proteinebene anhand von Westernblots analysiert.

Die HPDE Zellen wurden hierfür mit tBHQ oder SFN und / oder mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung als Gesamtzelllysat oder Kernextrakt und die Analyse der Proteine mittels Westernblot. Dabei wurden E-Cadherin, L1CAM, Vimentin und Slug als EMT-assoziierte Marker, sowie Hsp90 und Lamin A zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung, analysiert. Die Induktion von Nrf2 durch tBHQ und SFN wurde durch dessen nukleäre Akkumulation nachgewiesen.

Wie den Westernblots aus Abb. 3.5 zu entnehmen ist, führte die Stimulation von HPDE Zellen mit TGF- $\beta$ 1 zu einer Induktion der Expression der mesenchymalen Marker L1CAM, Vimentin und Slug, die allesamt eine sehr geringe Basalexpression aufwiesen.



**Abbildung 3.5: Nrf2-Induktion hebt den TGF-β1-induzierenden Effekt auf die Proteinexpression von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.** HPDE Zellen wurden (A) mit tBHQ oder SFN über 64 h und / oder mit TGF-β1 über 48 h bzw. (B) mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF-β1 über 4 h inkubiert. Abbildung A bildet ein Ergebnis der Westernblotanalysen von E-Cadherin, L1CAM, Vimentin und Hsp90 ab. Abbildung B zeigt ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Nrf2, Slug und Lamin A.

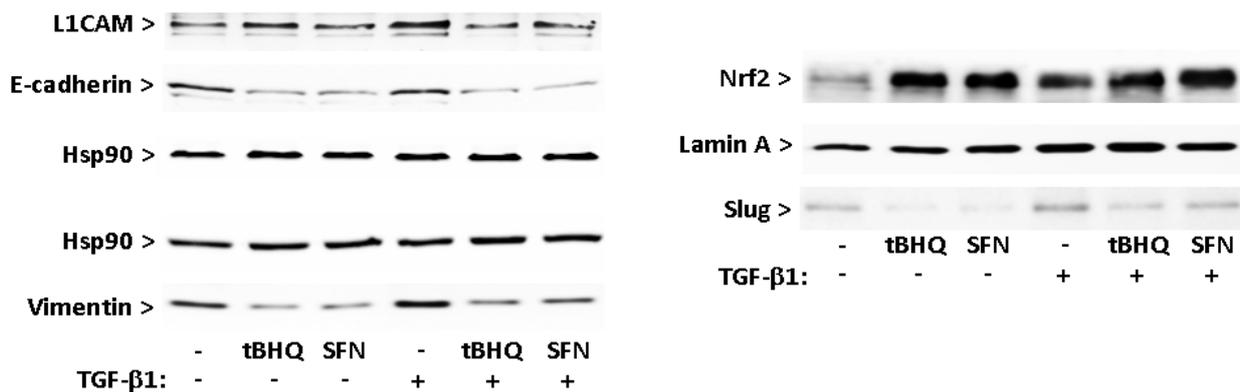
Die Behandlung mit tBHQ oder SFN hingegen führte zu keiner Veränderung der Expression von Vimentin oder Slug, jedoch zu einer leichten Erhöhung von L1CAM. Zu bemerken war ferner eine Suppression der TGF-β1-induzierten Vimentin- und L1CAM-Expression durch beide Nrf2-Aktivatoren. Weiterhin führte die Behandlung mit tBHQ und SFN zu einer deutlichen Reduktion der Proteinmenge des epithelialen Markers E-Cadherin, wohingegen dessen Expression durch TGF-β1-Behandlung nur marginal inhibiert wurde. Die kombinierte Behandlung mit tBHQ bzw. SFN mit TGF-β1 führte zu einer noch stärkeren Suppression von E-Cadherin.

In den Kernextrakten ließ sich unter Einfluss beider Nrf2-Aktivatoren eine deutliche Zunahme des Gehaltes an Nrf2-Protein detektieren, wobei die nachfolgende Gabe von TGF-β1 eine Verstärkung dieses Effektes bewirkte. Ganz anders verhielt sich der nukleäre Proteingehalt des EMT-assoziierten Transkriptionsfaktors Slug. Unter Nrf2-Aktivierung alleine war kein Effekt auf die Proteinmenge an Slug zu beobachten, hingegen kam es zu einer deutlichen Hemmung des Slug-induzierenden Effektes von TGF-β1, wenn zuvor Nrf2 aktiviert wurde.

Wie bereits bei den HPDE Zellen beobachtet, zeigte sich ebenso in Colo357 Zellen eine starke Reduktion der E-Cadherin-Expression durch beide Nrf2-Aktivatoren.

## Ergebnisse

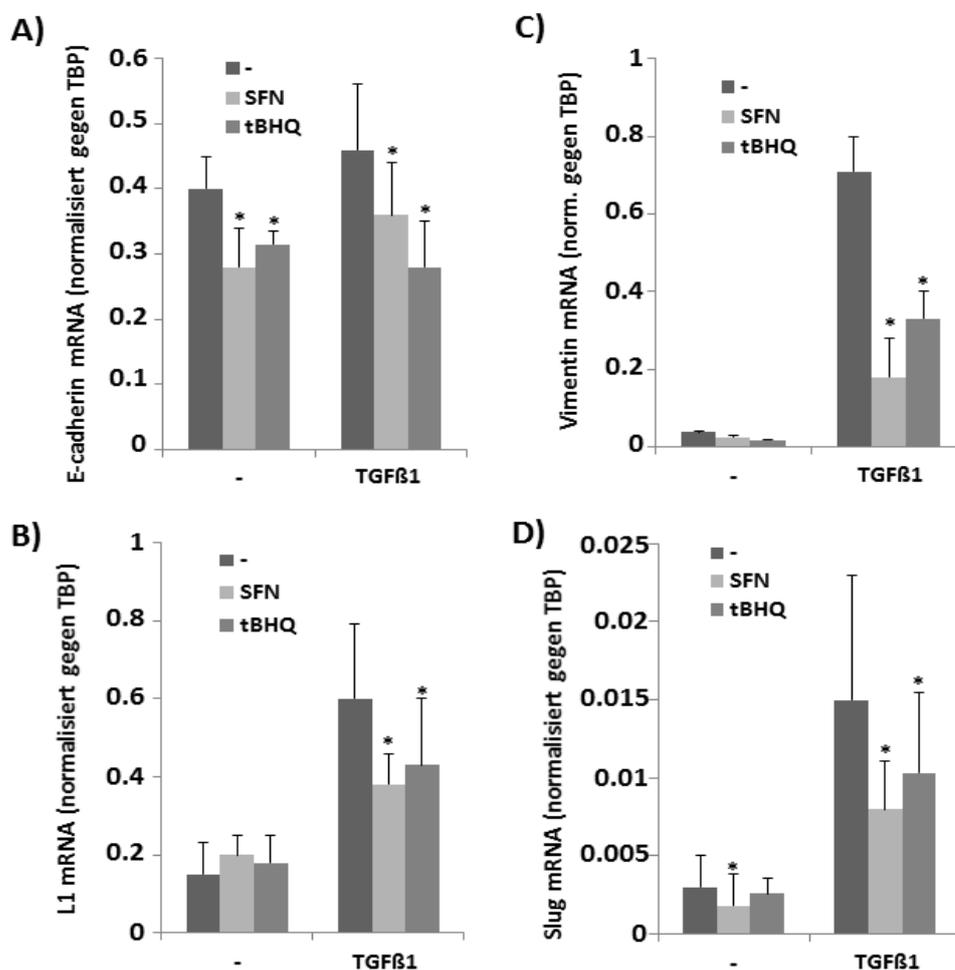
Interessanterweise war diese Hemmung der E-Cadherin-Expression am deutlichsten ausgeprägt nach anschließender Gabe von TGF- $\beta$ 1, welches alleine sogar eine leichte Erhöhung des Proteingehaltes bewirkte. Beide Nrf2-Aktivatoren führten in Colo357 Zellen überdies zur Aufhebung des induktiven Effektes von TGF- $\beta$ 1 auf die L1CAM-Expression. Die in Colo357 Zellen gleichfalls höhere Basalexpression von Vimentin wurde durch tBHQ / SFN ebenfalls stark vermindert, wie auch der induzierende Effekt von TGF- $\beta$ 1 (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: Nrf2-Induktion hemmt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Proteinexpression von EMT-Markern in Colo357 Zellen.** Colo357 Zellen wurden (A) mit tBHQ oder SFN über 64 h und / oder mit TGF- $\beta$ 1 über 48 h bzw. (B) mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF- $\beta$ 1 über 4 h inkubiert. Abbildung A bildet ein Ergebnis der Westernblotanalysen von E-Cadherin, L1CAM, Vimentin und Hsp90 ab. Abbildung B zeigt ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Nrf2, Slug und Lamin A.

In den Kernextrakten von Colo357 Zellen waren bereits in Abwesenheit von Stimulatoren größere Mengen an Slug-Protein detektierbar. Die alleinige Nrf2-Aktivierung führte zu deren deutlicher Abnahme. Wie schon bei den HPDE Zellen beobachtet, kam es unter Einfluss von TGF- $\beta$ 1 zu einer Zunahme der nukleären Proteinmenge von Slug. Die Nrf2-Aktivierung hob diesen Effekt nahezu vollständig auf. Weiterhin war in den Colo357 Zellen die Menge an nukleärem Nrf2-Protein basal deutlich höher als in den HPDE Zellen und die alleinige TGF- $\beta$ 1-Behandlung führte bereits zur Nrf2-Induktion. Dies ist Ausdruck der bereits dokumentierten, amplifizierten Nrf2-Aktivität in Colo357 Zellen (Arlt *et al.*, 2013, Hong *et al.*, 2010). Anschließend wurde die Expression der EMT-Marker auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden die Zellen über 24 h mit tBHQ oder SFN und / oder über 8 h mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Dann wurde die mRNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anhand *Realtime-PCR* analysiert. Als Kontrolle fungierte das *Housekeeping Gene* TBP.

In den HPDE Zellen führte die Stimulation mit SFN oder tBHQ zu einer Verminderung der E-Cadherin-mRNA-Expression von 0,4 ( $\pm$  0,05) um etwa 30 % bzw. 13 %. Die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bewirkte hingegen eine Erhöhung der Menge an E-Cadherin-mRNA um 15 % auf 0,46 ( $\pm$  0,102). Dieser Effekt wurde durch die Nrf2-Aktivatoren SFN und tBHQ aufgehoben und die E-Cadherin-mRNA-Expression deutlich um 22 % bzw. 39 % gesenkt. Gegensätzlich zu der schwachen Reduktion der Expression von E-Cadherin durch TGF- $\beta$ 1-Stimulation auf Proteinebene, ließ sich demnach auf mRNA-Ebene ein Anstieg des mRNA-Levels nachweisen. Dieser Effekt wurde durch Nrf2-Induktion aufgehoben (Abb. 3.7, A).



**Abbildung 3.7: Nrf2-Induktion hebt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Expression der mRNA von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.** HPDE Zellen wurden über 24 h mit tBHQ, SFN und / oder über 8 h mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR-Analyse der Gehalte an E-Cadherin-, Vimentin-, L1- und Slug-mRNAs. \* $p$ <0,05. (MW  $\pm$  SD, n=6).

## *Ergebnisse*

SFN- und tBHQ-Stimulation hatten alleine keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression der L1CAM-mRNA. TGF- $\beta$ 1 hingegen induzierte die Expression um das 4-fache von 0,15 ( $\pm$  0,08) auf 0,6 ( $\pm$  0,19). Zusätzliche Stimulation mit SFN und tBHQ reduzierte diesen Effekt wiederum um 37 % bzw. 28 % (Abb. 3.7, B).

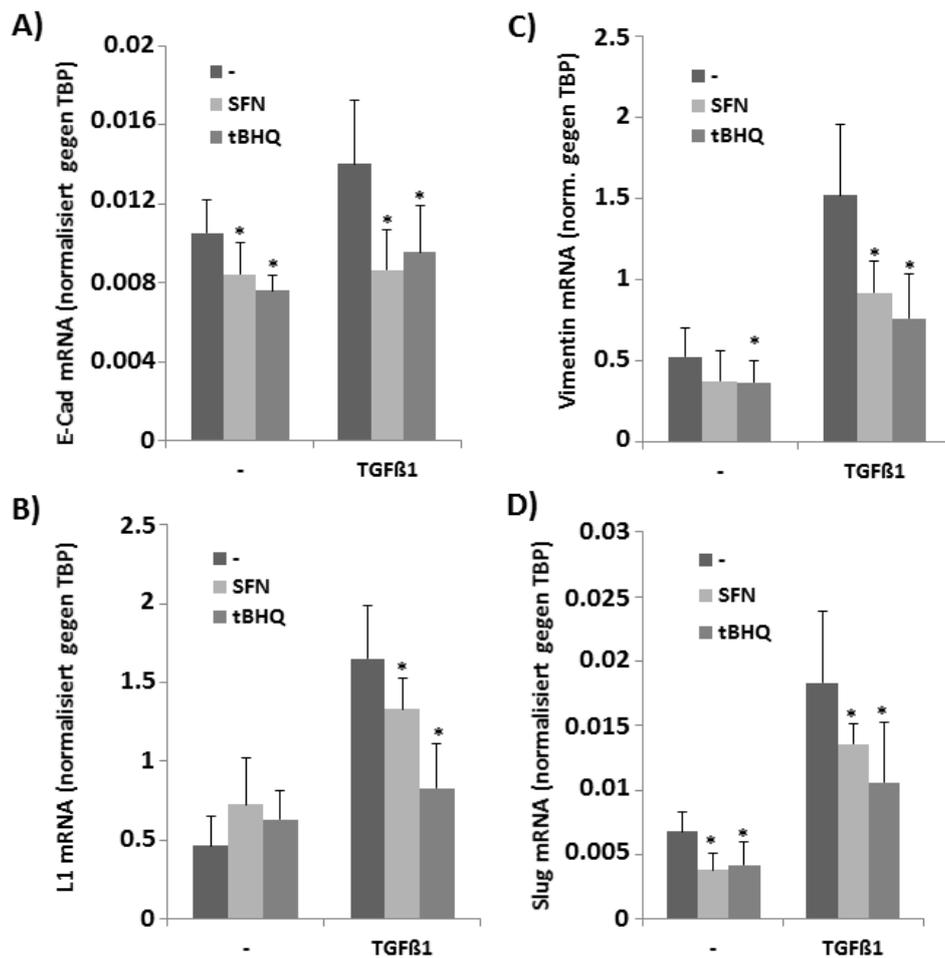
Die Expression der Vimentin-mRNA wurde durch TGF- $\beta$ 1-Behandlung deutlich von 0,038 ( $\pm$  0,002) auf 0,71 ( $\pm$  0,09) gesteigert. Dieser Effekt wurde nach Nrf2-Induktion durch SFN um 75 % und durch tBHQ um 55 % abgeschwächt (Abb. 3.7, C). Ebenso führte TGF- $\beta$ 1 zu einer Induktion der Expression der Slug-mRNA um das 5-fache von 0,003 ( $\pm$  0,002) auf 0,015 ( $\pm$  0,008). Auch hier konnte die SFN- oder tBHQ-Behandlung diesen Effekt um 47 % bzw. 31 % abschwächen (Abb. 3.7, D).

Kongruent zu den Ergebnissen auf Proteinebene, zeigte sich somit insgesamt eine weitgehende Verminderung des TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekts auf die mesenchymalen EMT-Marker L1CAM, Vimentin und Slug durch Nrf2-Induktion.

In gleicher Weise wurden Colo357 Zellen untersucht. Auch in den malignen Pankreasgangepithelzellen führte die Stimulation mit SFN und tBHQ zu einer leichten Verminderung der E-Cadherin-mRNA, während TGF- $\beta$ 1 diese um etwa 33 % von 0,0105 ( $\pm$  0,0017) auf 0,014 ( $\pm$  0,0032) steigerte. Diese Induktion wurde durch zusätzliche SFN- oder tBHQ-Stimulation aufgehoben (Abb. 3.8, A). Die Expression der L1CAM-mRNA wurde durch TGF- $\beta$ 1 um das 2,5-fache von 0,47 ( $\pm$  0,18) auf 1,65 ( $\pm$  0,34) gesteigert. Die Nrf2-Induktion mittels SFN und tBHQ schwächte diesen Effekt um 20 % bzw. 50 % ab (Abb. 3.8, B).

Auch die Expression der Vimentin-mRNA erhöhte sich unter TGF- $\beta$ 1-Behandlung um etwa 87 % von 0,53 ( $\pm$  0,17) auf 1,52 ( $\pm$  0,435). Durch SFN- oder tBHQ-Behandlung wurde dieser Effekt um 39 % bzw. 50 % reduziert (Abb. 3.8, C). Die Expression der Slug-mRNA erhöhte sich durch TGF- $\beta$ 1 um das 2,7-fache von 0,0068 ( $\pm$  0,0015) auf 0,0183 ( $\pm$  0,0056); die zusätzliche Behandlung mit SFN reduzierte die mRNA-Menge um 26 % und mit tBHQ um 42 % (Abb. 3.8, D).

Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, führte die Induktion von Nrf2 via SFN und tBHQ zu einer Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression der EMT-Marker L1CAM, Vimentin und Slug.

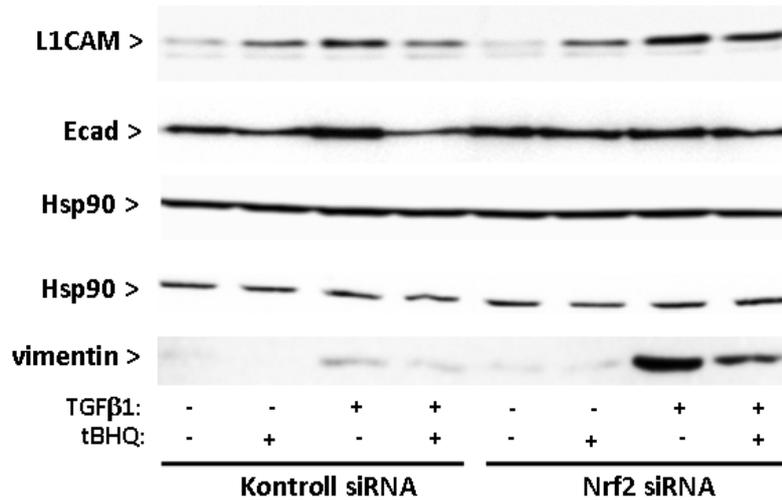


**3.8: Nrf2-Induktion hebt den TGF-β1-induzierenden Effekt auf die Expression der mRNA von EMT-Markern in Colo357 Zellen auf.** Colo357 Zellen wurden mit tBHQ oder SFN über 24 h und / oder mit TGF-β1 über 8 h stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR-Analyse der Gehalte an E-Cadherin-, Vimentin-, L1- und Slug-mRNAs. \*p<0,05. (MW ± SD, n=6).

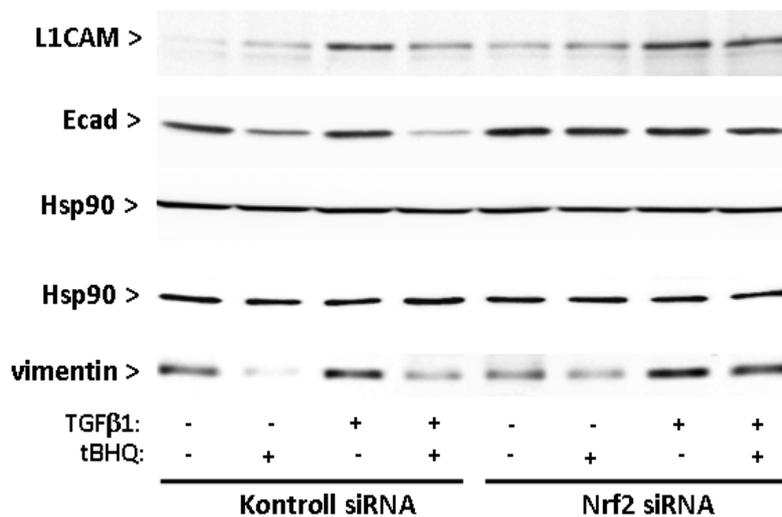
Um die Nrf2-Abhängigkeit der Effekte von SFN und tBHQ zu belegen, wurde nachfolgend die Nrf2-Aktivität mittels Nrf2-siRNA herunterreguliert. Zunächst wurden die Veränderungen der Expression der EMT-Marker auf Proteinebene betrachtet. Die Zellen wurden dafür 48 h vor Aufarbeitung transfiziert und mit tBHQ über 64 h und / oder TGF-β1 über 48 h stimuliert.

In HPDE Zellen führte der *Knockdown* von Nrf2 zu einer Aufhebung des inhibierenden Effektes von tBHQ auf die E-Cadherin-Expression, sowohl nach alleiniger Gabe als auch in Kombination mit TGF-β1. Weiterhin war die Expression von Vimentin nach TGF-β1-Gabe deutlich verstärkt, wenn HPDE Zellen mit Nrf2-siRNA behandelt wurden (Abb. 3.9). Unter

Nrf2-Knockdown war ferner der suppressive Effekt von tBHQ auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von L1CAM deutlich vermindert.



**Abbildung 3.9: Nrf2-Knockdown hebt die hemmende Wirkung von Nrf2 auf die EMT-Marker Expression in HPDE Zellen auf.** HPDE Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert und mit tBHQ über 64 h und / oder mit TGF- $\beta$ 1 über 48 h stimuliert. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis der Westernblotanalysen von L1CAM, E-Cadherin, Vimentin und der jeweiligen Ladekontrolle in Form von Hsp90.



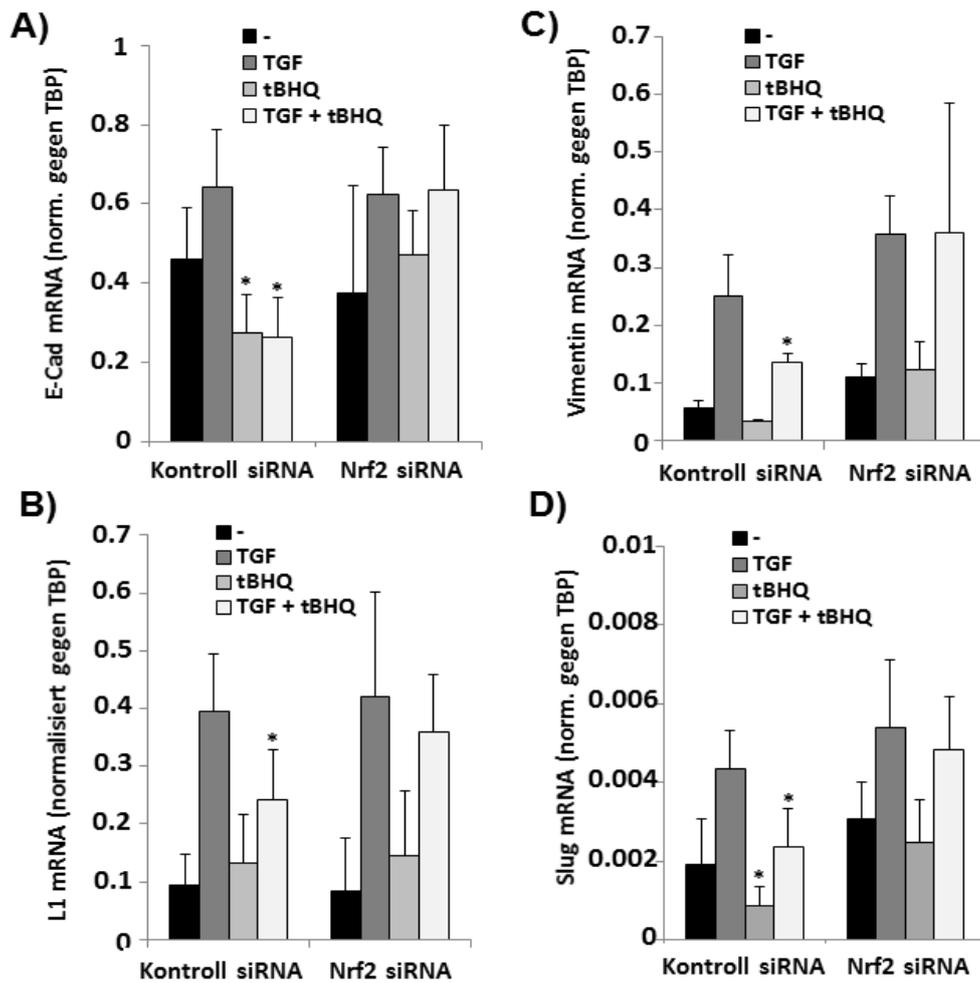
**Abbildung 3.10: Nrf2-Knockdown hebt die hemmende Wirkung von Nrf2 auf die EMT-Marker Expression in Colo357 Zellen auf.** Colo357 Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert und mit tBHQ über 64 h und / oder mit TGF- $\beta$ 1 über 48 h stimuliert. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis der Westernblotanalysen von L1CAM, E-Cadherin, Vimentin und der jeweiligen Ladekontrolle in Form von Hsp90.

Wie der Westernblotanalyse in Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, wurde ebenso in Colo357 Zellen die hemmende Wirkung von tBHQ auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT-Marker-Expression durch Nrf2-*Knockdown* abgeschwächt. Dies manifestierte sich besonders deutlich an der Proteinexpression von E-Cadherin und Vimentin. In beiden Fällen war in Gegenwart der Nrf2-siRNA der supprimierende Effekt von tBHQ allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 kaum noch auszumachen. Auch bei der L1CAM-Expression war festzustellen, dass die Reduktion des induzierenden Effektes von TGF- $\beta$ 1 infolge der tBHQ-Gabe unter Nrf2-*Knockdown* aufgehoben wurde (Abb. 3.10).

Darauffolgend wurden die Veränderungen der EMT-Marker-Expression auf mRNA-Ebene analysiert. Dafür wurden HPDE und Colo357 Zellen mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert und über 24 h mit tBHQ und / oder über 8 h mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert.

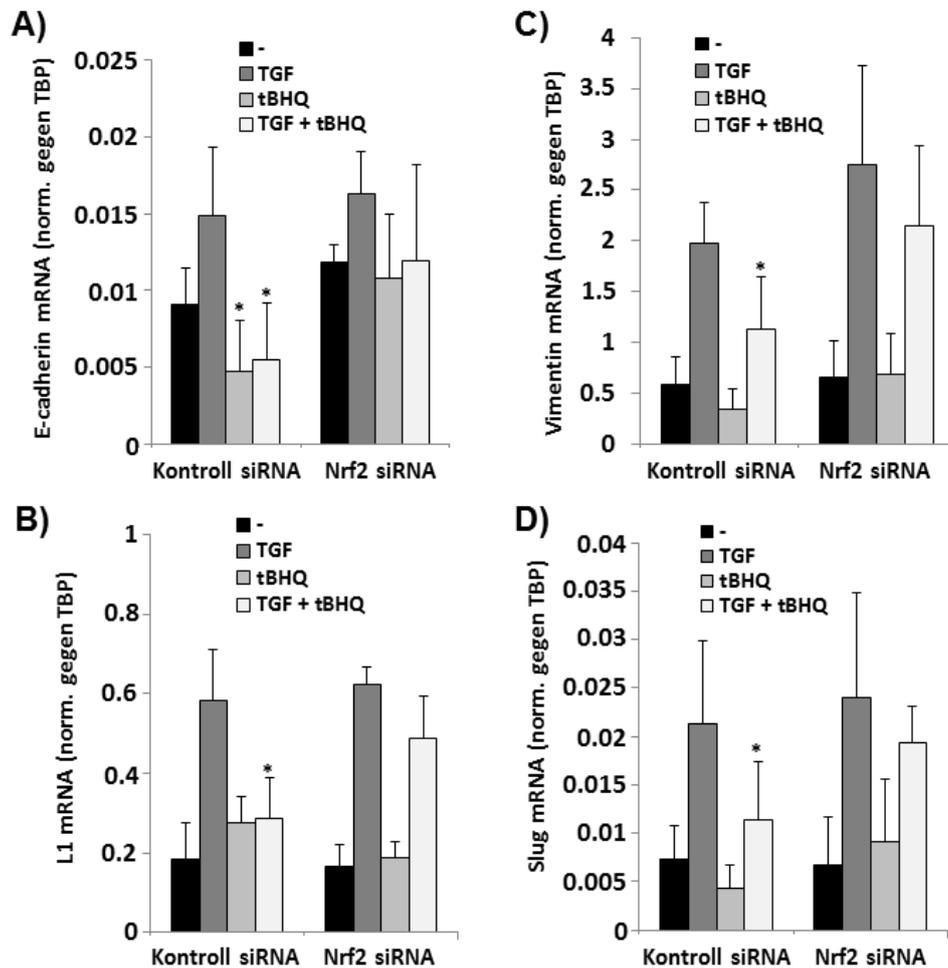
In den HPDE Zellen führte weder der reine Nrf2-*Knockdown*, noch die zusätzliche Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 zu starken Veränderungen der Expression der E-Cadherin-mRNA, jedoch wurde der hemmende Effekt von tBHQ durch Nrf2-*Knockdown* aufgehoben. Durch zusätzliche tBHQ-Stimulation ließ sich die E-Cadherin-mRNA der TGF- $\beta$ 1-stimulierten, kontrolltransfizierten Zellen um circa 59 % von 0,64 ( $\pm$  0,14) auf 0,26 ( $\pm$  0,16) senken. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz der Nrf2-siRNA in Gänze aufgehoben (Abb. 3.11, A).

Ebenso wurde die Expression der L1CAM-mRNA in HPDE Zellen durch den reinen Nrf2-*Knockdown* bzw. die zusätzliche TGF- $\beta$ 1-Stimulation nur wenig beeinflusst. In den kontrolltransfizierten, TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen führte tBHQ zu einer Verminderung der L1CAM-mRNA um 40 % von 0,2 ( $\pm$  0,06) auf 0,12 ( $\pm$  0,06). Unter Nrf2-*Knockdown* reduzierte sich die L1CAM-mRNA um 24 % von 0,21 ( $\pm$  0,09) auf 0,16 ( $\pm$  0,03) (Abb. 3.11, B). Die Expression der Vimentin-mRNA wurde bereits durch Nrf2-*Knockdown* bzw. zusätzliche Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 leicht hochreguliert. Ebenso ließ sich der hemmende Effekt von tBHQ auf TGF- $\beta$ 1-stimulierte Zellen durch Nrf2-siRNA ausschalten (Abb. 3.11, C). In gleicher Weise veränderte sich die Expression der Slug-mRNA. Der alleinige Nrf2-*Knockdown* führte, ebenso wie die zusätzliche Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, zu einer verstärkten Expression. tBHQ senkte die Slug-mRNA der kontrolltransfizierten, TGF- $\beta$ 1-stimulierten HPDE Zellen um etwa 44 % von 0,0043 ( $\pm$  0,0024) auf 0,0024 ( $\pm$  0,001). Unter Nrf2-siRNA verminderte tBHQ die Slug-Expression nur um circa 24 % von 0,0054 ( $\pm$  0,0027) auf 0,0041 ( $\pm$  0,003) (Abb. 3.11, D).



**Abbildung 3.11: Nrf2-Knockdown hebt die tBHQ-vermittelte Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression der mRNA von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.** HPDE Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder Nrf2-siRNA transfiziert und anschließend mit tBHQ über 24 h und / oder TGF- $\beta$ 1 über 8 h stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR-Analyse der Gehalte an E-Cadherin-, Vimentin-, L1- und Slug-mRNAs. \* $p < 0,05$ . (MW  $\pm$  SD, n=6).

In den Colo357 Zellen ließen sich ähnliche Resultate feststellen. Der alleinige Nrf2-Knockdown bzw. die zusätzliche TGF- $\beta$ 1-Stimulation führten zu keinen starken Veränderungen der E-Cadherin-, L1CAM-, Vimentin- und Slug-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.12). Bei den kontrolltransfizierten, TGF- $\beta$ 1-stimulierten Colo357 Zellen reduzierte sich die E-Cadherin-Expression unter zusätzlicher tBHQ-Stimulation um ca. 63 % von 0,0149 ( $\pm$  0,007) auf 0,0055 ( $\pm$  0,004). Bei Einsatz der Nrf2-siRNA wurde die Expression um lediglich 17 % von 0,013 ( $\pm$  0,004) auf 0,0108 ( $\pm$  0,006) gesenkt (Abb. 3.12, A).



**Abbildung 3.12: Nrf2-Knockdown hebt die tBHQ-vermittelte Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression der mRNA von EMT-Markern in Colo357 Zellen auf.** Colo357 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder Nrf2-siRNA transfiziert und anschließend mit tBHQ über 24 h und / oder TGF- $\beta$ 1 über 8 h stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse einer qPCR-Analyse der Gehalte an E-Cadherin-, Vimentin-, L1- und Slug-mRNAs. \* $p < 0,05$ . (MW  $\pm$  SD,  $n=6$ ).

Die Expression der L1CAM-mRNA der kontrolltransfizierten, TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen wurde durch tBHQ um die Hälfte von 0,58 ( $\pm$  0,13) auf 0,29 ( $\pm$  0,1) herunterreguliert. Der Nrf2-Knockdown hob diesen Effekt weitestgehend auf. Hier betrug die Herunterregulation circa 21 % (Abb. 3.12, B). In gleicher Weise reduzierte tBHQ die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Vimentin-mRNA-Expression um etwa 43 % von 1,97 ( $\pm$  0,4) auf 1,13 ( $\pm$  0,51), wohingegen diese Reduktion unter Nrf2-Knockdown circa 22 % betrug (Abb. 3.12, C). Bezüglich der Expression der Slug-mRNA, konnten ähnliche – allerdings schwächer ausgeprägte – Effekte

beobachtet werden. So wurde die Expression der kontrolltransfizierten, TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen unter tBHQ-Behandlung um etwa 43 % von  $0,021(\pm 0,01)$  auf  $0,012 (\pm 0,008)$  reduziert. Unter Nrf2-*Knockdown* wurde die Slug-mRNA um circa 33 % von  $0,024 (\pm 0,01)$  auf  $0,016 (\pm 0,004)$  gesenkt (Abb. 3.12, D).

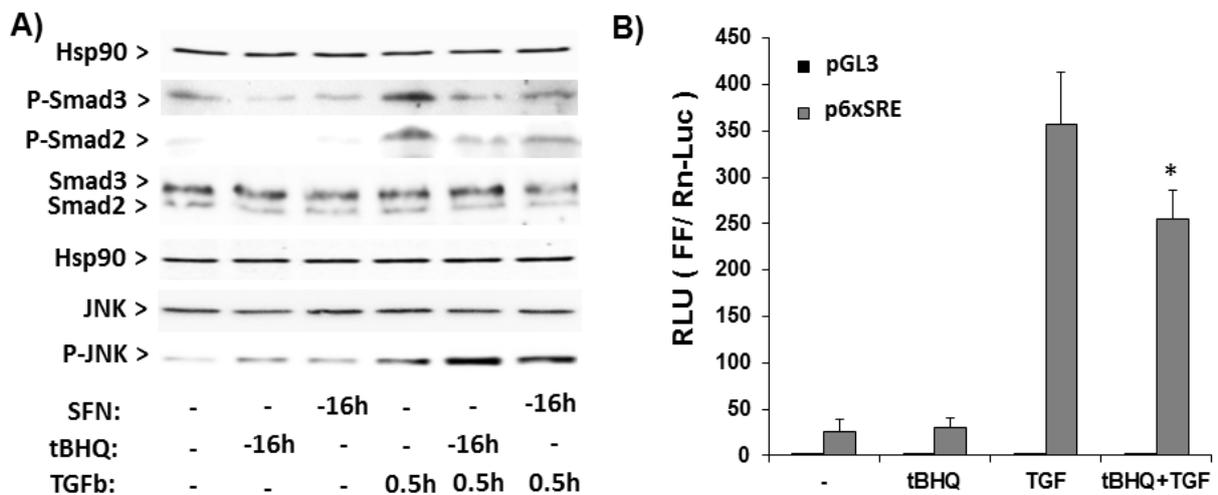
### 3.4 Smad-Aktivierung

Des Weiteren wurde der Einfluss von Nrf2 auf das TGF- $\beta$ 1-*Signaling* untersucht. Hierfür wurden die Auswirkungen der Nrf2-Induktion auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 anhand von Westernblots, sowie auf die Luziferase-Aktivität des *Smad responsive element* (SRE) analysiert. TGF- $\beta$ 1 bindet an einen Typ-II-Rezeptor und aktiviert diesen, welcher anschließend einen Typ-I-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert wiederum die „Rezeptor-regulierten“ Smads (R-Smads), unter anderem Smad2 und Smad3, welche dann über eine Komplexbildung mit Smad4 als Transkriptionsfaktoren im Nukleus agieren (*Shi et Massaqué. 2003*).

Bei den Westernblotanalysen der HPDE Zellen zeigte sich nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation eine Phosphorylierung von Smad3 und Smad2 innerhalb von 0,5 h. Diese Aktivierung von Smad2 und Smad3 wurde durch gleichzeitige Nrf2-Induktion durch tBHQ oder SFN gehemmt (Abb. 3.13, A). Dieses Ergebnis ließ sich in dem in Abbildung 3.13 B dargestellten Luziferaseassay bestätigen. Die alleinige Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 führte zu einer Steigerung der SRE-Luziferase-Aktivität (RLU) von  $27 \pm 9$  auf  $357 \pm 62$ . Die zusätzliche Stimulation mit tBHQ reduzierte diesen Effekt hingegen um 32 % auf  $254 \pm 40$ . Damit konnte gezeigt werden, dass Nrf2-Induktion die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Smad-Aktivierung vermindert.

Als alternativer, Smad-unabhängiger Signalweg, der durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden kann, dient der JNK-Signalweg. Nach alleiniger Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 kam es in HPDE Zellen zu einer leichten JNK-Aktivierung nach 0,5 h (Abb. 3.13, A), repräsentiert durch die erhöhte Menge an phosphoryliertem JNK (P-JNK). Die vorhergehende Nrf2-Aktivierung via tBHQ oder SFN führte zu einer deutlichen Amplifikation der JNK-Aktivierung durch TGF- $\beta$ 1.

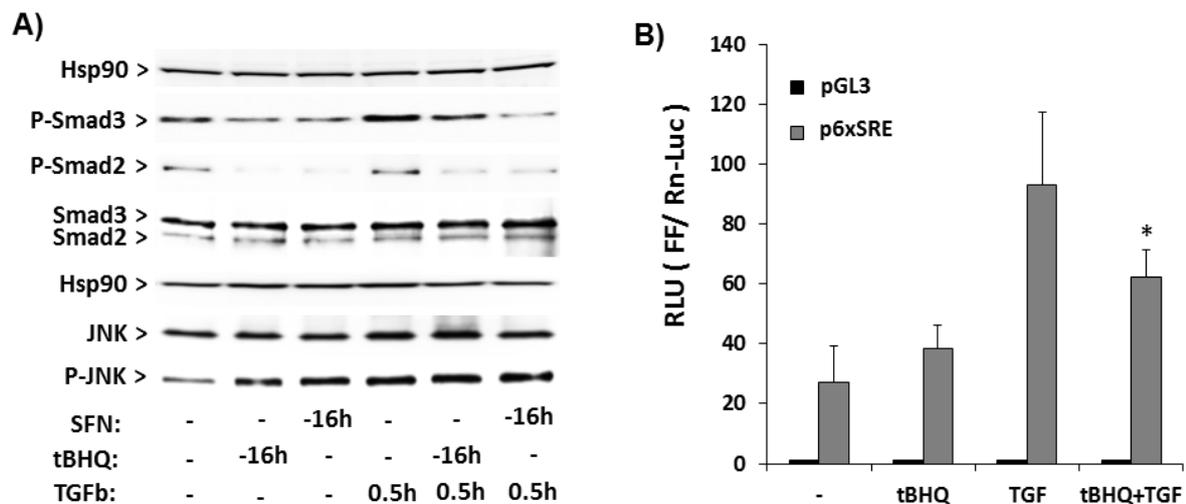
Somit scheint die Unterdrückung des Smad-Signalweges durch Nrf2-Aktivierung zu Gunsten des JNK-Signalweges zu erfolgen.



**Abbildung 3.13: Nrf2-Induktion unterdrückt die TGF-β1-vermittelte Aktivierung des Smad-Signalweges in HPDE Zellen zugunsten verstärkter JNK-Aktivierung.** **A)** HPDE Zellen wurden mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF-β1 über 0,5 h inkubiert. Dargestellt ist ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Phospho-Smad2 (P-Smad2), Phospho-Smad3 (P-Smad3), Smad2/3, Phospho-JNK (P-JNK), JNK und Hsp90 in HPDE Zellen. **B)** Mit pGL3- (Kontrolle) oder p6xSRE-Luziferase Plasmid transfizierte HPDE Zellen wurden über 24 h mit tBHQ und / oder über 8 h mit TGF-β1-stimuliert, die Luziferase-Aktivität gemessen, sowie wie unter 2.11.3 beschrieben ausgewertet. \*p<0,05 gegenüber alleiniger TGF-β1-Applikation (MW±SD; n=4).

Gleichermaßen führte TGF-β1 auch in Colo357 Zellen zu einer Induktion der Phosphorylierung von beiden R-Smads auf Proteinebene (Abb. 3.14, A), wobei der Effekt weniger ausgeprägt war, als in den HPDE Zellen. Dies ist auf die per se höhere R-Smad-Basalaktivität der Colo357 Zellen zurückzuführen, welche bereits autokrin TGF-β1 produzieren. Die Smad-aktivierende Wirkung wurde wiederum durch Nrf2-Induktion via tBHQ und SFN deutlich abgeschwächt. Darüber hinaus wurde die SRE-Luziferase-Aktivität (RLU) durch TGF-β1 von  $24 \pm 15$  auf  $93 \pm 26$  gesteigert, unter Nrf2-Aktivierung durch tBHQ zeigte sich diesbezüglich eine Verminderung um 34 % auf  $61 \pm 10$  (Abb. 3.14, B).

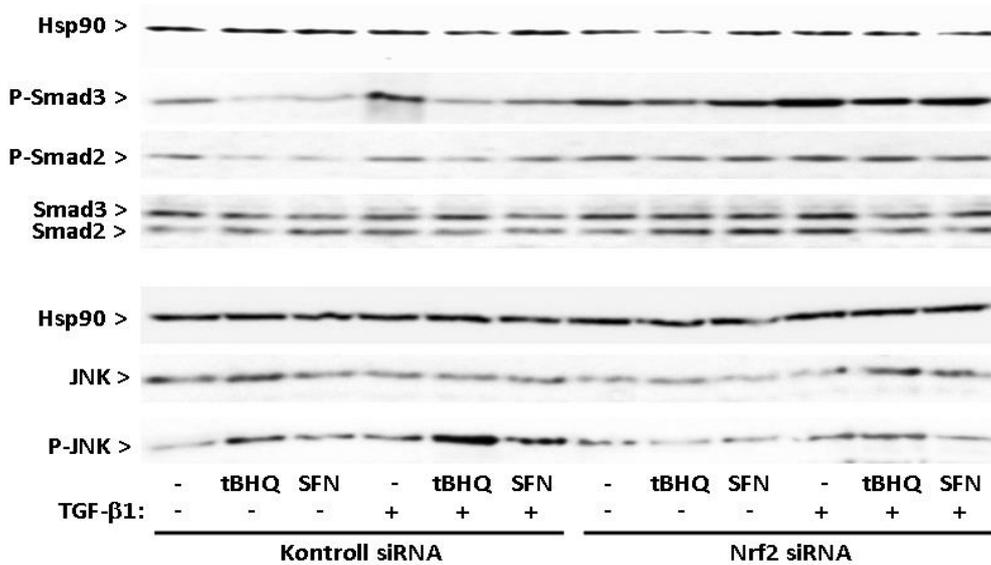
Weiterhin ließ sich feststellen, dass in Colo357 Zellen die Aktivierung von JNK im Vergleich zu den HPDE-Zellen sowohl unter Einfluss von TGF-β1, als auch unter Nrf2-Aktivierung deutlicher ausgeprägter war. Die bereits starke Erhöhung der Menge an P-JNK durch TGF-β1 wurde bei gleichzeitiger Nrf2-Aktivierung mittels tBHQ oder SFN nicht weiter amplifiziert.



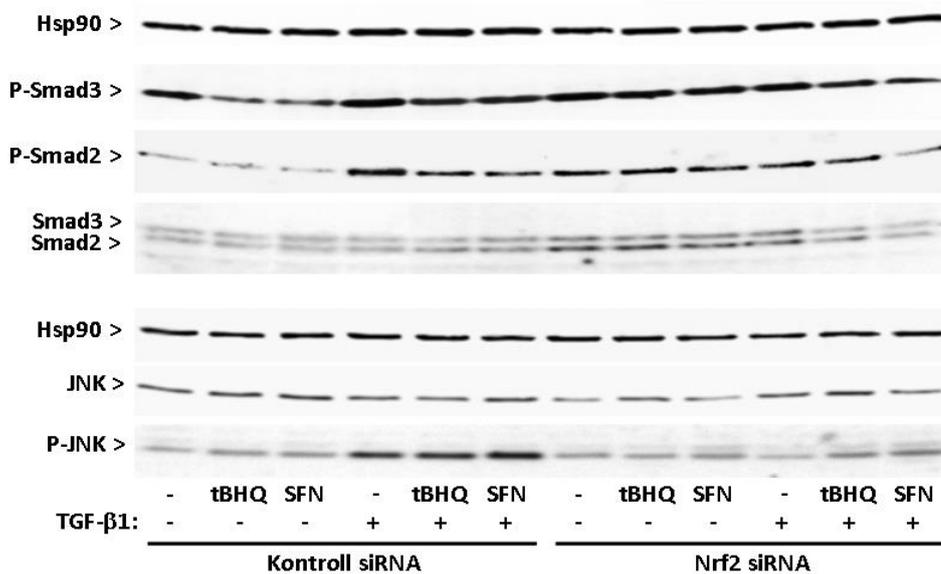
**Abbildung 3.14: Nrf2-Induktion unterdrückt die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung des Smad-Signalweges in Colo357 Zellen zugunsten verstärkter JNK-Aktivierung.** **A)** Colo357 Zellen wurden mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF- $\beta$ 1 über 0,5 h inkubiert. Dargestellt ist ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Phospho-Smad2 (P-Smad2), Phospho-Smad3 (P-Smad3), Smad2/3, Phospho-JNK (P-JNK), JNK und Hsp90 in Colo357 Zellen. **B)** Mit pGL3- (Kontrolle) oder p6xSRE-Luziferase Plasmid transfizierte Colo357 Zellen wurden über 24 h mit tBHQ und / oder über 8 h mit TGF- $\beta$ 1-stimuliert und die Luziferase-Aktivität gemessen, sowie wie unter 2.11.3 beschrieben ausgewertet. \* $p < 0,05$  gegenüber alleiniger TGF- $\beta$ 1-Applikation (MW $\pm$ SD, n=4).

Offenbar wird in Colo357 Zellen der alternative Signalweg bereits stark durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert, so dass eine ähnliche Verlagerung vom Smad- zum JNK-Signalweg durch Nrf2-Aktivierung, wie in den HPDE Zellen, nicht mehr eintritt. Dies könnte auf die verstärkte Nrf2-Basalaktivität in Colo357 Zellen zurückzuführen sein.

Zur Überprüfung dieses möglichen Zusammenhanges wurden nachfolgend die Smad und JNK Aktivierung in HPDE und Colo357 Zellen unter *Knockdown* von Nrf2 und nachfolgender Behandlung mit tBHQ, SFN und / oder TGF- $\beta$ 1 mittels Westernblot analysiert. Wie Abbildung 3.15 zeigt, wurde der deutlich inhibierende Effekt der tBHQ- / SFN-Behandlung auf die R-SMAD-Phosphorylierung unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation in HPDE Zellen (Kontroll-siRNA) durch deren Transfektion mit Nrf2-siRNA aufgehoben. So war unter Nrf2-*Knockdown* die Intensität der P-Smad2- und P-Smad3-Banden nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung deutlich stärker. Gleichzeitig verminderte sich die TGF- $\beta$ 1-induzierte JNK-Aktivierung in HPDE Zellen nach deren Behandlung mit Nrf2-siRNA. Vor allem aber war der amplifizierende Effekt durch tBHQ / SFN nicht mehr zu beobachten.



**Abbildung 3.15: Einfluss des Nrf2-Knockdowns auf die TGF-β1-vermittelte Aktivierung des Smad- und JNK-Signalweges in HPDE Zellen.** HPDE Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert und mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF-β1 über 0,5 h stimuliert. Dargestellt ist ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Phospho-Smad2 (P-Smad2), Phospho-Smad3 (P-Smad3), Smad2/3, Phospho-JNK (P-JNK), JNK und Hsp90 in HPDE Zellen.



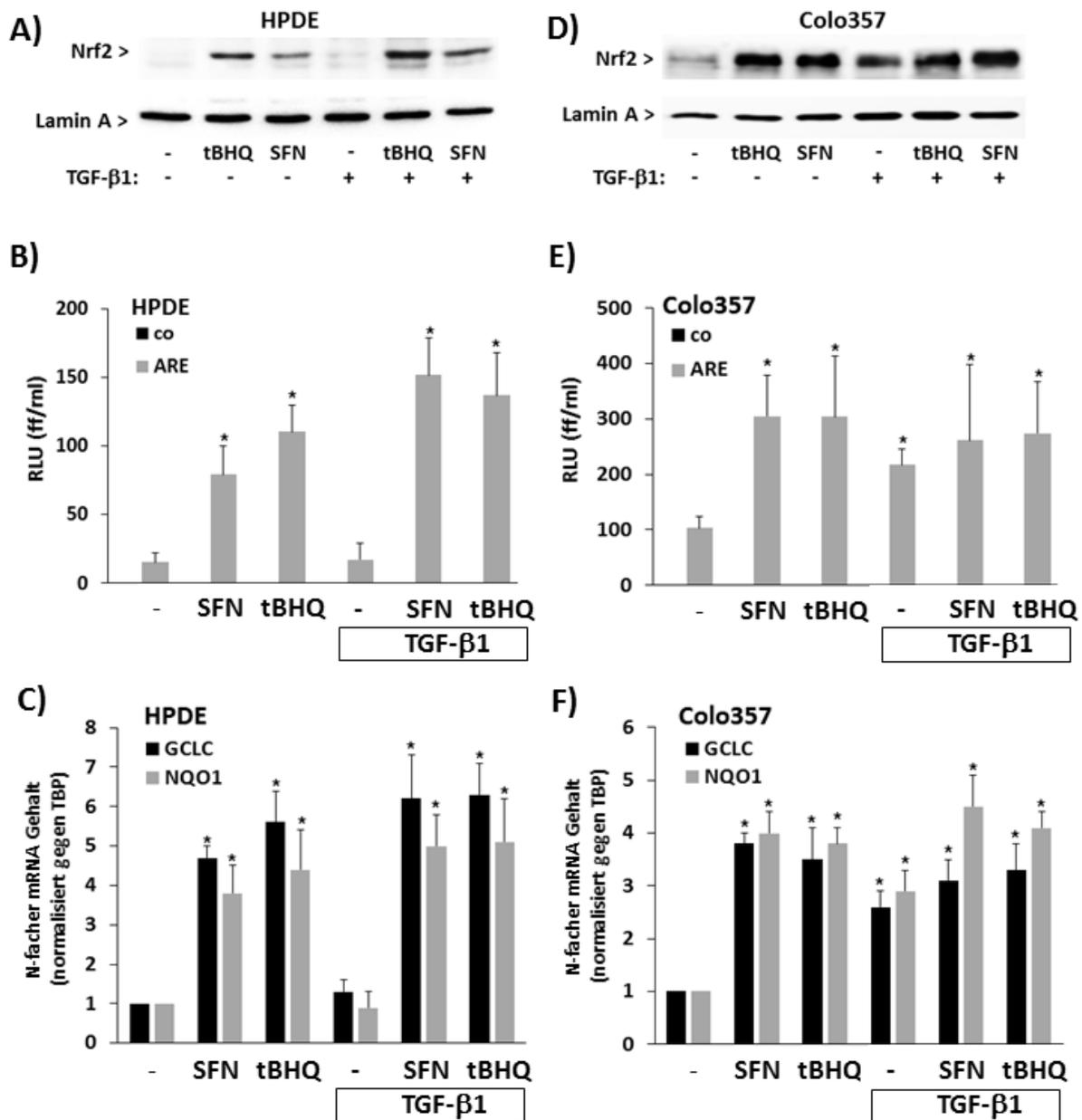
**Abbildung 3.16: Einfluss des Nrf2-Knockdowns auf die TGF-β1-vermittelte Aktivierung des Smad- und JNK-Signalweges in Colo357 Zellen.** Colo357 Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert und mit tBHQ oder SFN über 16 h und / oder mit TGF-β1 über 0,5 h stimuliert. Dargestellt ist ein Ergebnis der Westernblotanalysen von Phospho-Smad2 (P-Smad2), Phospho-Smad3 (P-Smad3), Smad2/3, Phospho-JNK (P-JNK), JNK und Hsp90 in Colo357 Zellen.

Der *Knockdown* von Nrf2 führte ebenfalls in Colo357 Zellen zu einer deutlichen Verstärkung der R-Smad-Phosphorylierung, welche bereits basal festzustellen war (Abb. 3.16). Wiederum war die Hemmung der Smad-Aktivierung durch tBHQ oder SFN deutlich vermindert, so dass die Intensitäten von P-Smad2 und P-Smad3 entsprechend deutlich stärker waren als in den Kontroll-siRNA transfizierten Colo357 Zellen. Umgekehrt war der verstärkende Effekt von tBHQ oder SFN auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte JNK-Aktivierung aufgehoben.

### 3.5 Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Aktivierung

Um festzustellen, ob in HPDE und Colo357 die Nrf2-Aktivität durch TGF- $\beta$ 1 beeinflusst wird, wurden Kernextrakte beider Zelllinien nach jeweils alleiniger oder kombinierter Behandlung (8h) mit tBHQ, SFN und TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Expression hin untersucht. Im Westernblot zeigte sich, dass in HPDE Zellen durch tBHQ oder SFN eine starke Zunahme des nukleären Gehaltes an Nrf2-Protein induziert wurde, ein Effekt, der durch TGF- $\beta$ 1 verstärkt wurde (Abb. 3.17, A). Demgegenüber zeigte die alleinige TGF- $\beta$ 1-Behandlung keinen Effekt. In Colo357 Zellen war bereits die basale Menge an nukleärem Proteingehalt von Nrf2 deutlich höher und die Zugabe von sowohl tBHQ / SFN, als auch TGF- $\beta$ 1 alleine steigerte den Nrf2-Gehalt im Zellkern. Die kombinierte Gabe von tBHQ bzw. SFN und TGF- $\beta$ 1 führte zu keiner nennenswerten Steigerung der Einzeleffekte beider Stimuli (Abb. 3.17, D).

Nachfolgend wurde die Wirkung von tBHQ, SFN und TGF- $\beta$ 1 auf Nrf2 mittels ARE-Luziferaseassays untersucht. In HPDE Zellen kam es zu einer starken Zunahme der ARE-vermittelten Luziferase-Expression nach Behandlung (16h) mit tBHQ oder SFN sowie zu einer weiteren Steigerung nach kombinierter Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 bzw. SFN und tBHQ (Abb. 3.17, B). Die alleinige Gabe von TGF- $\beta$ 1 resultierte in keiner Veränderung der ARE-vermittelten Luziferase-Expression. In Colo357 Zellen führten alle drei Stimuli alleine zu einer signifikanten Erhöhung der Luziferase-Expression, wohingegen keine weitere Verstärkung nach kombinierter Gabe von tBHQ bzw. SFN und TGF- $\beta$ 1 auftrat (Abb. 3.17, E). Ein ähnliches Bild ergab sich auf Ebene der Genexpression etablierter Nrf2-Zielgene, wie NQO1 oder GCLC. Wie mittels qPCR-Analyse gezeigt werden konnte, wird in HPDE die Expression beider Gene durch alleinige Gabe (24h) von tBHQ oder SFN deutlich verstärkt, während TGF- $\beta$ 1 allein keinen Effekt zeigt (Abb. 3.17, C).



**Abbildung 3.17: Einfluss von TGF-β1 auf die Nrf2-Aktivität in HPDE und Colo357 Zellen.** HPDE (A-C) oder Colo357 (D-F) Zellen wurden mit tBHQ oder SFN und / oder mit TGF-β1 wie angegeben stimuliert. **A,D)** Kernextrakte wurden mittels Nrf2-Westernblot unter Verwendung von Lamin A als Ladekontrolle analysiert (dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 Versuchen). **B,E)** Zuvor mit einem Kontroll- (co) oder Nrf2-induziblen (ARE) Reportergenvektor transfizierte Zellen wurden nach Stimulation mittels Luciferaseassay analysiert (Firefly Luciferase (ff) normalisiert gegenüber renilla Luciferase (rl), MW ± SD, n=4). **C,F)** RNA Proben wurden mittels qPCR auf die Expression von NQO1 und GCLC hin analysiert (TBP wurde zur Normalisierung verwandt, MW ± SD, n=6). \*p<0,05 gegenüber unbehandelt.

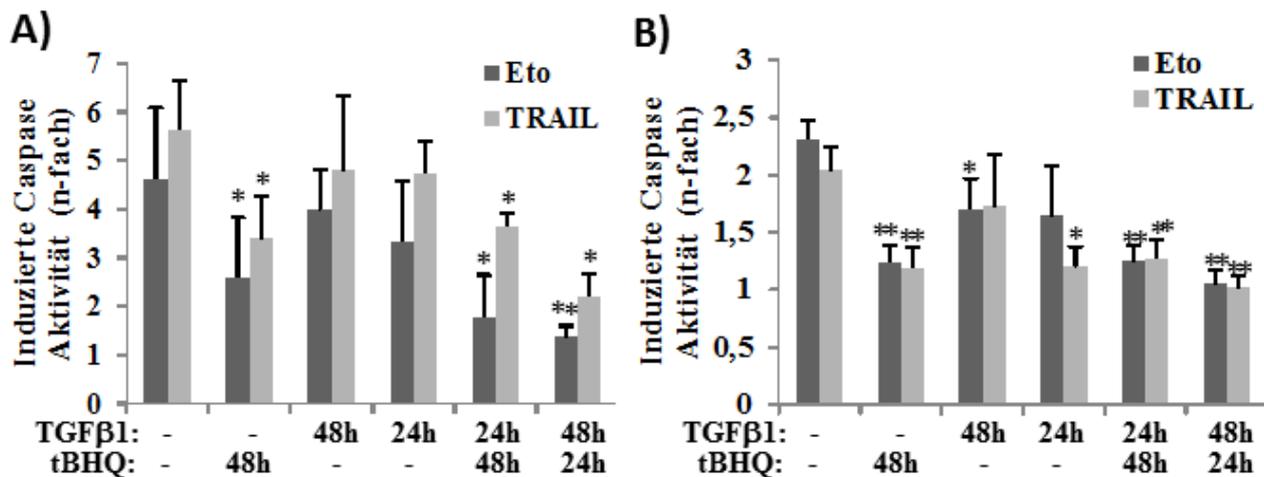
Die kombinierte Gabe von tBHQ bzw. SFN und TGF- $\beta$ 1 führte zu einer weiteren deutlichen Steigerung der NQO1 und GCLC Expression. Zu einer ähnlich stark ausgeprägten Expressions-steigerung von NQO1 und GCLC kam es in Colo357 Zellen nach alleiniger tBHQ-, SFN- oder TGF- $\beta$ 1-Behandlung. Wiederum zeigten sich keine amplifizierenden Effekte nach kombinierter Gabe der Nrf2-Stimuli und TGF- $\beta$ 1 (Abb. 3.17, F).

### **3.6 Apoptoseverhalten**

Um das malignitätsfördernde Potential von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 genauer zu untersuchen, wurde neben den Migrationsanalysen deren Einfluss auf die Apoptose analysiert. Hierfür wurden HPDE und Colo357 Zellen zunächst 48 h vor Aufarbeitung mit tBHQ oder TGF- $\beta$ 1 behandelt und 24 h später erfolgte die in Abbildung 3.17 dargestellte, erneute Zugabe von tBHQ und / oder TGF- $\beta$ 1. Als Apoptosestimuli wurden entweder 20  $\mu$ g/ml des Zytostatikums Etoposid für 24 h oder 10 ng/ml des Todesliganden TRAIL für 8 h zugesetzt. Anschließend wurde die Apoptoserate durch Messung der Aktivität von Caspase-3 und -7 in den unterschiedlich behandelten Zellen mittels eines fluorometrischen Assays bestimmt (siehe Abschnitt 2.11.5).

Die Caspaseaktivität in HPDE Zellen wurde durch Etoposid- bzw. TRAIL-Behandlung um etwa das 5-fache gesteigert. Die vorherige Induktion von Nrf2 mittels tBHQ (48h) reduzierte diese Apoptoseraten signifikant um etwa 40 %. Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Apoptoseraten war unabhängig vom Zeitpunkt der Behandlungsdauer (24h oder 48h) geringer ausgeprägt. So wurde unter 24h Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 die Caspaseaktivität unter Etoposid um 14 % und unter TRAIL um 28 % gesenkt. Die kombinierte Behandlung von tBHQ und TGF- $\beta$ 1 führte hingegen zu einer noch stärkeren Reduktion der Caspaseaktivität. Die deutlichsten Effekte wurden unter voriger TGF- $\beta$ 1- (48h) und nachfolgender tBHQ-Zugabe (24h) beobachtet. Dabei wurde die Etoposid-induzierte Caspaseaktivität um 70 %, die TRAIL-induzierte Caspaseaktivität um 61 % erniedrigt.

Somit vermag in HPDE Zellen eine Nrf2-Aktivierung, nicht jedoch die alleinige TGF- $\beta$ 1-Stimulation, vor Etoposid- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose zu schützen. Interessanterweise wird dieser Nrf2-Effekt durch TGF- $\beta$ 1-Behandlung deutlich verstärkt, v.a. bei vorangegangener TGF- $\beta$ 1-Gabe, was auf einen additiven Wirkmechanismus schließen lässt (Abb. 3.18, A).



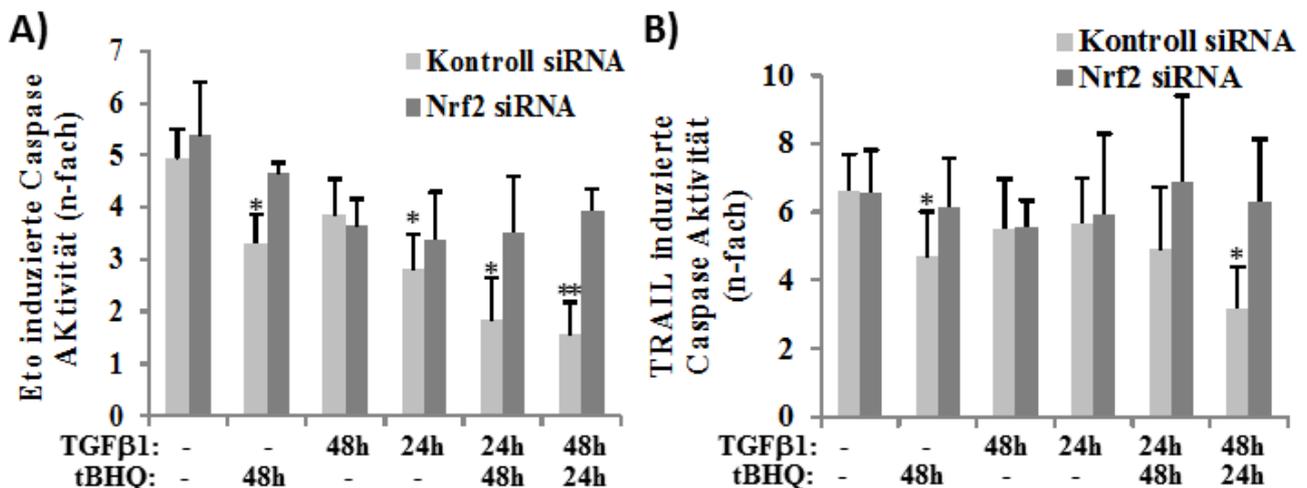
**Abbildung 3.18: Nrf2-Induktion und TGF-β1 führen zu einer Apoptoresistenz gegenüber Etoposid (Eto) und TRAIL in HPDE (A) und Colo357-Zellen (B).** HPDE und Colo357 Zellen wurden 48 h und 24 h vor der Apoptoseinduktion wie angegeben mit tBHQ und / oder TGF-β1 behandelt. Die Apoptose wurde anschließend durch Gabe von Etoposid (20 μg/ml) für 24 h oder TRAIL (10 ng/ml) für 8 h induziert. Dargestellt ist die n-fache Erhöhung der spezifischen Caspase-3/-7-Aktivität, \*p<0,05 bzw. \*\*p<0,01 gegenüber unbehandelt. (MW±SD, n=6).

In Colo357 Zellen ließ sich die Caspaseaktivität durch Etoposid- bzw. TRAIL-Stimulation auf das Doppelte steigern. Analog zu den HPDE Zellen, führte auch hier die Nrf2-Induktion durch tBHQ zu einer signifikanten Reduktion des Caspaseaktivitätsniveau um circa 45 %, wohingegen die Behandlung mit TGF-β1 zu einer geringeren Reduktion von rund 20 % führte. Wiederum konnte der stärkste Apoptose-reduzierende Effekt nach früher TGF-β1- und nachfolgender tBHQ-Behandlung verzeichnet werden. So ließ sich die Etoposid- bzw. TRAIL- induzierte Caspaseaktivität hierdurch signifikant um etwa die Hälfte reduzieren. Die Steigerung der Abnahme der Caspaseaktivität durch die kombinierte Gabe von tBHQ und TGF-β1 war aber im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit tBHQ sehr viel geringer ausgeprägt als in HPDE Zellen, so dass vermutlich ein ähnlich additiver Mechanismus zwischen tBHQ und TGF-β1 in Colo357 Zellen nicht existent ist (Abb. 3.18, B).

Zusammengenommen führen tBHQ und in geringerem Maße TGF-β1 zu einer Resistenz gegenüber Etoposid und TRAIL in HPDE und Colo357 Zellen und wirken damit antiapoptotisch. Dieser Effekt war Etoposid gegenüber etwas deutlicher ausgeprägt, als gegenüber TRAIL (Abb. 3.18).

Daraufhin wurde die Abhängigkeit dieses antiapoptotischen Effektes von Nrf2 durch Nrf2-*Knockdown* näher untersucht. HPDE und Colo357 Zellen wurden 72 h vor der Aufarbeitung mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert. Die Stimulation mit tBHQ, TGF- $\beta$ 1, Etoposid und TRAIL wurde analog des vorangegangenen Versuches durchgeführt (s. Abb. 3.19).

In HPDE Zellen war unter Nrf2-*Knockdown* eine deutlich verminderte Reduktion der Etoposid- (Abb. 3.18, A) und TRAIL-induzierten (Abb. 3.19, B) Caspaseaktivität durch tBHQ oder durch die kombinierte tBHQ- / TGF- $\beta$ 1-Behandlung festzustellen. So betrug die Reduktion der Etoposid-induzierten Caspaseaktivität durch die kombinierte Gabe von TGF- $\beta$ 1 und tBHQ in Kontroll-siRNA behandelten HPDE Zellen 69 %, in Nrf2-siRNA behandelten Zellen jedoch nur 27 % (Abb. 3.19, B).



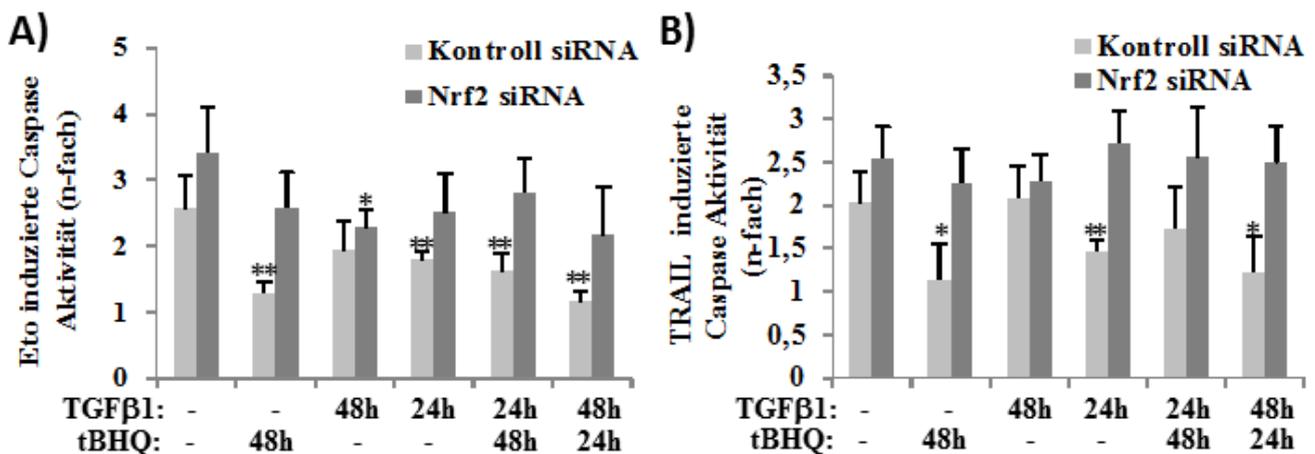
**Abbildung 3.19: Nrf2-*Knockdown* hebt die tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid (A) und TRAIL (B) in HPDE Zellen auf.** HPDE Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert. Nach 24h erfolgte die Behandlung mit tBHQ und / oder TGF- $\beta$ 1 wie angegeben. Die Apoptose wurde anschließend durch Gabe von Etoposid (20  $\mu$ g/ml) für 24 h oder TRAIL (10 ng/ml) für 8 h induziert. Dargestellt ist die n-fache Erhöhung der spezifischen Caspase-3/-7 Aktivität, \* $p < 0,05$  bzw. \*\* $p < 0,01$  gegenüber unbehandelt. (MW $\pm$ SD, n=4).

Bei den TRAIL-behandelten HPDE Zellen mit kombinierter Gabe von TGF- $\beta$ 1 und tBHQ ging die Herunterregulation der Caspaseaktivität durch Nrf2-siRNA von 52 % auf 4 % zurück (Abb. 3.19B). Die durch die alleinige Gabe von TGF- $\beta$ 1 bedingte Reduktion der Etoposid- oder TRAIL-induzierten Caspaseaktivität wurde durch den Nrf2-*Knockdown* in HPDE Zellen

hingegen kaum beeinflusst.

In Colo357 Zellen wurde gleichermaßen eine verminderte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid und TRAIL durch Nrf2-Knockdown, nach alleiniger tBHQ- oder kombinierter tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-Gabe, beobachtet. Der Einsatz der Nrf2-siRNA verminderte die Abnahme der Etoposid-induzierten Caspaseaktivität durch alleinige tBHQ- bzw. durch kombinierte TGF- $\beta$ 1- und tBHQ-Gabe, signifikant von 51% auf 30% und von 55% auf 37%. Die Verminderung der TRAIL-induzierten Caspaseaktivität durch alleinige tBHQ- oder kombinierte TGF- $\beta$ 1- und tBHQ-Behandlung wurde durch die Herunterregulation von Nrf2 sogar vollständig aufgehoben (Abb. 3.20).

Bemerkenswerterweise war auch der inhibierende Effekt der alleinigen TGF- $\beta$ 1-Gabe (24h) auf die Etoposid- und die TRAIL-induzierte Caspaseaktivität (ca. 20% bzw. 24% unter Behandlung mit Kontroll-siRNA) durch die Behandlung mit Nrf2-siRNA nahezu vollständig aufgehoben. Somit scheint die antiapoptotische Wirkung von TGF- $\beta$ 1 in Colo357 Zellen von Nrf2-abhängig zu sein.



**Abbildung 3.20: Nrf2-Knockdown hebt die tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid (A) und TRAIL (B) in Colo357 Zellen auf.** Colo357 Zellen wurden mit Kontroll- oder Nrf2-siRNA transfiziert. Nach 24h erfolgte die Behandlung mit tBHQ und / oder TGF- $\beta$ 1 wie angegeben. Die Apoptose wurde anschließend durch Gabe von Etoposid (20  $\mu$ g/ml) für 24 h oder TRAIL (10 ng/ml) für 8 h induziert. Dargestellt ist die n-fache Erhöhung der spezifischen Caspase-3/-7-Aktivität, \*p<0,05 bzw. \*\*p<0,01 gegenüber unbehandelt. (MW $\pm$ SD, n=4).

## *Ergebnisse*

Insgesamt zeigte sich demzufolge eine Aufhebung der tBHQ- sowie der tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelten Resistenz gegenüber Etoposid- und TRAIL-induzierter Apoptose durch Nrf2-*Knockdown* in benignen (HPDE) und malignen (Colo357) Pankreasgangepithelzellen. In Colo357 Zellen wurde zudem die antiapoptotische Wirkung von TGF- $\beta$ 1 durch Nrf2-*Knockdown* aufgehoben.

## 4 Diskussion

Eine wichtige Grundlage der entzündlichen Karzinogenese – so auch beim Pankreaskarzinom auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis – stellt die persistierende Exposition von z.B. Epithelzellen gegenüber einer entzündlichen Mikroumgebung und deren Adaptation an verschiedene Stressfaktoren dar. An dieser Adaptation sind eine Vielzahl von zellulären Mediatoren beteiligt, die zum einen der lokalen Entzündungsreaktion entgegenwirken und zum anderen die Epithelzellen vor der zytotoxischen und schädigenden Wirkung der inflammatorischen Stressfaktoren schützen.

TGF- $\beta$ 1 stellt hierbei einen wichtigen Mediator dar, dessen primäre Wirkung zunächst die Herabregulation der lokalen Entzündungsreaktion beinhaltet. Neben IL-10 vermag TGF- $\beta$ 1 die Aktivität proinflammatorischer Zellen zu Gunsten antiinflammatorischer Zellen zu inhibieren, was sich zum Beispiel in der Ausprägung eines immunsuppressiven Makrophagen- oder T-Zell-Phänotyps (M2-Makrophagen bzw. Tregs) manifestiert. Außer dieser immunmodulatorischen Wirkung von TGF- $\beta$ 1 ist seine dauerhafte Anwesenheit im Zuge einer chronischen Entzündung Ursache von Veränderungen der Epithelzellen selbst. Einerseits unterdrückt TGF- $\beta$ 1 in diesen Zellen das Wachstum, indem verschiedene Zellzyklusregulatoren wie p21/waf1, p27/Kip1 und p15 durch TGF- $\beta$ 1 induziert werden (*Elliott und Blobel, 2005*); andererseits bewirkt TGF- $\beta$ 1 vielfältige Veränderungen der Morphologie und Motilität. Darüber hinaus geht von TGF- $\beta$ 1 eine potente fibrotische Wirkung aus, resultierend aus der Stimulation von Myofibroblasten.

In der frühen Phase der Adaptation gegenüber entzündlichem Stress sollte TGF- $\beta$ 1 einer irregulären Propagation von epithelialen Zellen entgegenwirken – z.B. in Folge sporadisch aufgetretener Mutationen in Protoonkogenen wie kRas (*Elliott und Blobel, 2005*). Dies ist v.a. während einer chronischen Pankreatitis ein recht häufig zu beobachtendes Phänomen (*Rane et al., 2006*). Über einen längeren Verlauf der Stressadaptation sind verschiedene molekulare Veränderungen beschrieben, die zu einer veränderten TGF- $\beta$ 1-Antwort der Epithelzellen beitragen (*Meulmeester et al., 2011; Birnbaum et al., 2012*). Dies betrifft beispielsweise Schlüssel-moleküle der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion, wie z.B. Smad4/DPC4, welches sehr häufig Ziel genetischer Veränderungen mit dessen funktionellem Verlust ist. Charakteristisch für den persistierenden Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf epitheliale Zellen ist die epithelial-

mesenchy-male Transition (EMT). Die EMT ist ein biologischer Prozess, welcher zu Veränderungen von Zellen mit epithelialen Merkmalen bis hin zu Zellen mit mesenchymalen Merkmalen führt. Dieser Prozess erhöht u.a. die Migrationsfähigkeit und Invasivität von Epithelzellen und führt zu einer verstärkten Resistenz gegenüber Stress und Apoptose (*Gianonni et al., 2012; Kalluri und Weinberg; 2009*). Ebendiese Faktoren begünstigen die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen und gehen mit einer schlechteren Überlebensprognose einher.

Einen weiteren wichtigen Faktor der epithelialen Adaptation an die persistierende Exposition gegenüber einer inflammatorischen Mikroumgebung stellt der antioxidative Transkriptionsfaktor Nrf2 dar. Nrf2 dient primär der Protektion des Epithels vor oxidativem Stress und wird v.a. durch die ROS-Produktion und –Freisetzung durch inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Granulozyten induziert. Dabei gehen von Nrf2 vielfältige Wirkungen aus, die wie TGF- $\beta$ 1 auf unterschiedliche Weise den Phänotyp stressadaptierter Epithelzellen beeinflussen.

Wie in Abschnitt 1.N.N. bereits ausführlich dargelegt, schützen Nrf2-abhängige Zellantworten zum einen vor der toxischen Wirkung von ROS (*Hayes et al., 2010; Kensler und Wakabayashi, 2010; Ramos-Gomez et al., 2000*) indem diese direkt neutralisiert (z.B. durch NQO1 oder GST) oder toxische Metaboliten und auch potentielle Karzinogene aus der Zelle eliminiert werden (z.B. durch *Multi Drug Resistance* Transporter (MDRs)). Zum anderen verleiht Nrf2 gestressten Zellen weitere Überlebensvorteile. Diese resultieren u.a. aus der Modulation verschiedener Signalwege, z.B. dem *Ubiquitin-Proteasom Pathway* (*Kwak und Kensler, 2006; Arlt et al., 2009*) sowie aus der direkten Induktion antiapoptotischer Gene, wie Bcl-xL und Bcl2 (*Niture und Jaiswal, 2012*). Weiterhin ist Nrf2 für einen Schutz gegenüber Autophagie (*Rao et al., 2010; Digaleh et al., 2013*) und Seneszenz (*Leiser und Miller, 2010; Kapeta et al., 2010*) mitverantwortlich.

All diese Eigenschaften machen, wie eingangs erläutert, ein erhebliches onkogenes Potential aus, das Nrf2 zu eigen ist. In ähnlicher Weise wie im Falle des TGF- $\beta$ 1 geht somit von Nrf2 ein duale Wirkung in Bezug auf die Karzinogenese aus (*Kim YR et al., 2010; Konstantinopoulus et al., 2011; Singh et al., 2006*). Welche Modalitäten diesem Dualismus genau zugrunde liegen und unter welchen Bedingungen die onkogene Wirkung von Nrf2 dominiert, ist Gegenstand vielfältiger Untersuchungen.

Inwieweit hierbei ein *Cross-talk* mit TGF- $\beta$ 1 besteht und welchen Einfluss Nrf2 auf die EMT hat, war nun Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ zu ähnlichen morphologischen Veränderungen von Epithelzellen führt, hier am Beispiel der humanen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE, wie TGF- $\beta$ 1, im Sinne der Ausbildung eines fibroblastoiden, mesenchymalen Phänotyps. Advers zu diesen Beobachtungen, beschreiben Rachakonda et al. den Verlust von Nrf2 in humanen Kolonadenokarzinomzellen als ursächlich für solche morphologischen Veränderungen von epithelartigen hin zu spindelförmigen Zellen (Rachakonda et al., 2010). Diese differentiellen Ergebnisse könnten auf Unterschiede bei der Transfektion – stabil versus transient – sowie zwischen den verwendeten Zelllinien zurückgeführt werden.

Neben den morphologischen Veränderungen führte die Aktivierung von Nrf2 zu einem gesteigerten Migrationsverhalten im Scratch-Assay. Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Nrf2 die Migration und Invasivität von Tumorzellen erhöht bzw. Nrf2-*Knockdown* zu einer Verminderung dieser führt (Pan et al., 2013; Shen et al., 2013). Die kausalen Mechanismen sind bisweilen jedoch unklar. Zudem konnte in weiteren Analysen anhand des Boyden-Assays gezeigt werden, dass Nrf2 promigratorisch wirkt. Die Stimulation mit dem Nrf2-Aktivator SFN führte zu einer Steigerung der Invasivität in HPDE und Colo357 Zellen, wobei dieser Effekt durch Nrf2-*Knockdown* aufgehoben wurde. Interessanterweise konnte ebenso der Invasivitäts-induzierende Effekt von TGF- $\beta$ 1 in beiden Zelllinien durch die Herunterregulation von Nrf2 abgeschwächt werden.

TGF- $\beta$ 1 ist bekanntermaßen an der Initiation eines malignen Phänotyps – u.a. durch Induktion der EMT – beteiligt (Miettinen et al., 1994). Es wurde nun der Frage nachgegangen, inwieweit Nrf2 Einfluss auf die EMT hat und ob die beobachteten Effekte von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 durch gleichartige Signalwege vermittelt werden. Mittels Westernblot wurde die Induktion bekannter EMT-Marker auf Proteinebene und mittels PCR auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei wurde der Fokus auf die mesenchymalen Marker Vimentin, L1CAM und Slug, sowie auf den epithelialen Marker E-Cadherin gelegt.

Die Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin wurde in HPDE und Colo357 Zellen durch Nrf2 stark beeinflusst. Die Nrf2-Aktivatoren tBHQ und SFN verringerten die E-Cadherin-Expression auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene merklich. Vor allem aber kam es zu einer

deutlichen Reduktion der E-Cadherin-Expression bei gleichzeitiger Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1. Dieser ganz offensichtliche, suppressive Effekt von Nrf2 auf die E-Cadherin-Expression konnte entsprechend durch den *Knockdown* von Nrf2 aufgehoben werden. Diese Befunde deckten sich mit den Ergebnissen einer Studie von Shen et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass die Blockade von Nrf2 mittels shRNA die E-Cadherin-Expression steigert (Shen et al., 2013). Insgesamt könnte die ausgeprägte Herunterregulation von E-Cadherin durch Nrf2 entscheidend für die Induktion der Zellmotilität und die Ausbildung eines malignen Phänotyps in Epithelzellen sein. Der Einfluss von E-Cadherin auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Initiation der EMT scheint unklar. Zwar sprechen die Ergebnisse auf Protein- und mRNA-Ebene deutlich dafür, dass TGF- $\beta$ 1 die E-Cadherin-Expression steigert, die in der Literatur beschriebenen Resultate weichen allerdings deutlich auseinander. So zeigten Kim WD et al., dass TGF- $\beta$ 1 die E-Cadherin-Expression inhibiert, wohingegen Schäfer et al. keinen Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression feststellten (Kim WD et al., 2012; Schäfer et al., 2012).

Das Adhäsionsmolekül L1CAM wurde durch Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 weitestgehend hochreguliert. Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führte in HPDE und Colo357 Zellen zur Steigerung der L1CAM Protein- und mRNA-Expression, wohingegen Nrf2-Induktion lediglich in Colo357 Zellen zu einem erhöhten L1CAM-Niveau führte. In den HPDE Zellen konnten keine deutlichen Effekte durch tBHQ- / SFN-Behandlung festgestellt werden. Die kombinierte Stimulation von tBHQ / SFN mit TGF- $\beta$ 1 reduzierte die bei alleiniger TGF- $\beta$ 1-Stimulation auftretende Heraufregulation deutlich. Des Weiteren führte der Nrf2-Knockdown in Colo357 Zellen zu einer insgesamt erhöhten, die Nrf2-Überexpression durch Keap1-Knockdown zu einer insgesamt erniedrigten L1CAM Proteinexpression, jedoch waren keine Effekte durch zusätzliche tBHQ- oder TGF- $\beta$ 1-Stimulation detektierbar. Auf mRNA-Ebene führte der alleinige Nrf2-*Knockdown* von unbehandelten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen zu keinen wesentlichen Veränderungen, allerdings wurde die tBHQ- sowie die kombinierte tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion von L1CAM aufgehoben.

Kongruent zu anderen Studien konnte gezeigt werden, dass L1CAM von TGF- $\beta$ 1 hochreguliert wird (Geismann et al., 2009; Kiefel et al., 2012; Schäfer et al., 2012). Schäfer et al. zeigten, dass die Überexpression von L1CAM zu verstärkter Zellmigration und Apoptoseresistenz führt und diese Effekte TGF- $\beta$ 1-abhängig sind (Schäfer et al., 2012). Des Weiteren führte Nrf2 insgesamt zu einer Induktion von L1CAM. Die beobachteten Effekte

waren allerdings deutlich geringer ausgeprägt als nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung. Die Heraufregulation von L1CAM scheint für die Nrf2-abhängige Migration von geringerer Relevanz, wofür u.a. die Aufhebung der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Induktion durch Nrf2 spricht. Dies könnte zudem auf einen *Cross-talk* zwischen Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 hindeuten, da TGF- $\beta$ 1 die Migrationsfähigkeit bei Anwesenheit von Nrf2 scheinbar in anderer Art und Weise induziert als bei dessen Abwesenheit.

Bekanntlich findet sich das Intermediärfilamentprotein Vimentin besonders in mesenchymalen Zellen wieder und wird daher als ein Hauptmarker der EMT herangezogen. Die zu beobachteten Effekte auf die Vimentin-Expression waren im Vergleich zu den anderen EMT-Markern insgesamt am deutlichsten. Hinsichtlich des Einflusses von Nrf2 auf die Vimentin-Expression dominierte die Aufhebung der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Induktion nach tBHQ- / SFN-Behandlung. Die in der Literatur beschriebene Hochregulation Vimentins durch TGF- $\beta$ 1 (*Ellenrieder et al., 2001*) konnte in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Vimentin scheint dabei essentiell zu sein für die TGF- $\beta$ 1-abhängigen Veränderungen auf morphologischer und migratorischer Ebene.

Für Nrf2 dahingegen scheint die Vimentin-Expression weniger relevant zu sein. So führte die Behandlung mit tBHQ / SFN zu keinen prägnanten Veränderungen auf Protein- oder mRNA-Ebene. Die Vimentin-Expression wurde durch die Nrf2-Aktivatoren tBHQ oder SFN leicht herunterreguliert. Ähnliches zeigten auch Rachakonda et al., die eine Heraufregulation von Vimentin bei Überexpression des Nrf2-Inhibitors Keap1 feststellten (*Rachakonda et al., 2010*). Hinsichtlich dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Nrf2-abhängige Migration unabhängig von Vimentin ist.

Schließlich wurden die Veränderungen auf den Transkriptionsfaktor Slug untersucht. Die beobachtete Induktion der Slug-Expression durch TGF- $\beta$ 1, wurde in der Literatur bereits beschrieben (*Choi et al., 2007*). Durch tBHQ / SFN wurden keine Veränderungen der Slug-Expression induziert, jedoch wurde die beobachtete nukleäre Akkumulation von Slug nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation durch Nrf2-Aktivierung abgeschwächt.

Insgesamt waren die beobachteten Effekte der Slug-Expression mit denen der Vimentin-Expression vergleichbar. Dies ist ein schlüssiges Ergebnis hinsichtlich des Umstandes, dass Vimentin Slug-abhängig reguliert wird (*Vuoriluoto et al., 2011*). Die gesteigerte Expression dieser Proteine, u.a. TGF- $\beta$ 1-vermittelt, führt zu einer verstärkten Motilität der Zellen. Diese

Signalachse wird vermutlich durch Nrf2 unterbrochen.

Der TGF- $\beta$ 1-regulierte Signalweg inkludiert z.T. die Phosphorylierung von Smads (*Hata et al., 1998*) und es wurde analysiert, inwieweit Nrf2 Einfluss auf diese Phosphorylierung hat und ob die beobachtete Herunterregulation der TGF- $\beta$ 1-Wirkung durch Nrf2-Aktivierung auf Ebene der Smad-Phosphorylierung stattfindet. Passend zu den angestellten Vermutungen, führte die alleinige Nrf2-Aktivierung via tBHQ oder SFN zu keinen prägnanten Veränderungen der Smad-Phosphorylierung. In HPDE Zellen kam es unter tBHQ-Behandlung zu einer leichten Erhöhung der Phospho-Smad2 und -Smad3 Proteinexpression, sowie der SRE-Luziferase-Aktivität. In Colo357 Zellen führten tBHQ oder SFN zu einer leichten Verminderung der Phospho-Smad2 und -Smad3 Proteinexpression und zu einer leichten Erhöhung der SRE-Luziferase Aktivität. TGF- $\beta$ 1 führte in beiden Zellreihen zu einer enormen Heraufregulation der Smad Phosphorylierung. Dieser Effekt wurde wiederum durch Nrf2-Aktivierung mittels tBHQ oder SFN abgeschwächt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Nrf2 den Smad abhängigen Signalweg von TGF- $\beta$ 1 hemmt.

Da durch TGF- $\beta$ 1 auch eine Aktivierung von JNK als alternativer, Smad-unabhängiger Signalweg initiiert werden kann, wurde dies ebenso in Abhängigkeit von Nrf2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass in HPDE Zellen die deutliche Hemmung der TGF- $\beta$ 1-abhängigen Smad-Aktivierung unter Nrf2-Aktivierung zu Gunsten einer forcierten JNK-Phosphorylierung stattfand. In Colo357 Zellen war bereits durch TGF- $\beta$ 1 eine stärkere JNK Aktivierung zu beobachten, die gleichwohl durch Nrf2-Induktion weiter erhöht wurde. Unter *Knockdown* von Nrf2 war die aktivierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf JNK sowohl in HPDE als auch in Colo357 Zellen deutlich vermindert, ebenso war keine Amplifikation diesbezüglich durch die Nrf2-Aktivatoren festzustellen.

Dies untermauert die Vermutung, dass die veränderte TGF- $\beta$ 1-abhängige Signaltransduktion in PDAC Zellen, die mit der Reduktion bestimmter Smad-vermittelter Zellantworten und der Verstärkung JNK-vermittelter Zellantworten einhergeht, durch Nrf2 entscheidend beeinflusst wird. Kürzlich wurde der hemmende Effekt von Nrf2 auf den Smad-Signalweg mit einer direkten Wechselwirkung von Nrf2 mit Smad3 in Verbindung gebracht (*Oh et al., 2012*). Da laut der hier gezeigten Befunde auch die Aktivierung von Smad2 durch Nrf2 inhibiert wird, könnte auch Smad2 in ähnlicher Weise das Ziel einer solchen Interaktion mit Nrf2 sein. Weitere Untersuchungen sind jedoch von Nöten, um den genauen Mechanismus dieser

inhibitorischen Wirkung von Nrf2 auf den Smad-Signalweg besser zu verstehen.

In jüngsten Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass in der Tat vor allem der wachstumshemmende Effekt von TGF- $\beta$ 1 unter Vermittlung der Zellzyklusregulatoren p15, p21 und p27 durch Nrf2 aufgehoben werden kann. Dies stellt offenkundig eine direkte Konsequenz der Aufhebung Smad-abhängiger Zellantworten dar. Die Tatsache, dass unter Nrf2-Aktivierung der invasive und migratorische Effekt von TGF- $\beta$ 1 nicht nur erhalten bleibt (wie es in Colo357 Zellen der Fall ist), sondern sogar verstärkt wird (wie es in HPDE Zellen der Fall ist), deutet daraufhin, dass die Nrf2-abhängig veränderte Signaltransduktion durch TGF- $\beta$ 1 eindeutig maligne Zelleigenschaften begünstigt. Dies wird zusätzlich auch dadurch untermauert, dass der *Knockdown* von Nrf2 in Colo357 Zellen nicht nur zur Aufhebung der promigratorischen Wirkung von tBHQ oder SFN alleine führte, sondern sogar zu einer signifikant verminderten Migrationsrate nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung. Dies legt als Umkehrschluss die Vermutung nahe, dass Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 zusammen eine höhere Migration induzieren als alleine. Da die Smad-abhängige Signalkaskade von TGF- $\beta$ 1 durch Nrf2 gehemmt wurde, müssen andere, derzeit unbekannte Mechanismen Invasivitätssteigernd wirken. Ob hierfür die Aktivierung von JNK verantwortlich ist, wird gegenwärtig untersucht.

Neben dem Einfluss von Nrf2 auf die TGF- $\beta$ 1-Signalwege untersuchten wir ebenso den Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Aktivität. Dabei zeigte sich in HPDE Zellen eine verstärkte Nrf2-Induktion nur bei simultaner Stimulation mit den Nrf2-Aktivatoren tBHQ und SFN, jedoch nicht bei alleiniger Stimulation. Gleichermäßen ließ sich dies für die ARE-Induktion, sowie die Heraufregulation der Nrf2-Zielgene NQO1 und GCLC feststellen. Somit scheint TGF- $\beta$ 1 nur bei bereits vorhandener Nrf2-Aktivität diese weiter zu steigern. Dies untermauern auch die Ergebnisse in Colo357 Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Colo357 Zellen bereits eine erhöhte Nrf2-Basalaktivität besitzen und TGF- $\beta$ 1 zu einer Induktion von Nrf2, ARE und NQO1 bzw. GCLC führt.

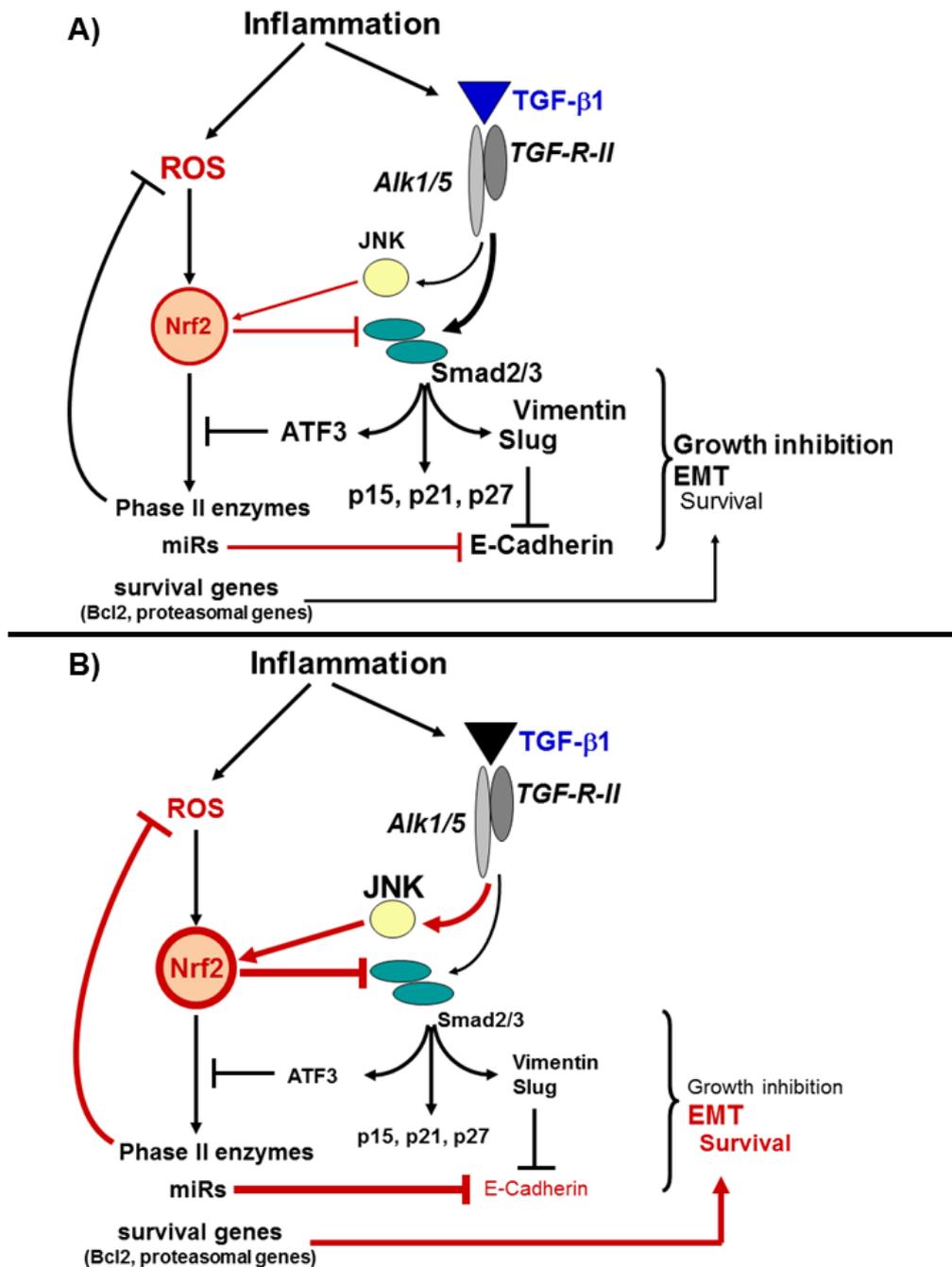
Als weiterer Faktor der protumorigenen Wirkung von Nrf2 wurde neben Veränderungen der Invasivität von Epithelzellen, die Auswirkung auf die Apoptose untersucht. Bekanntermaßen führt ROS zu Zellschäden und wirkt damit proapoptotisch. Nrf2 kann als antioxidativer Transkriptionsfaktor vor diesen Zellveränderungen durch die Induktion von Phase-II-Enzymen, wie z.B. NAD(P)H:quinon-Oxidoreductase 1 (NQO1), Glutathion-S-Transferase

(GST) und Glutamatcysteinylgase (GCL) schützen (*Bakin et al., 2004; Venugopal und Jaiswal, 1996*). Die Nrf2-vermittelte Apoptoseresistenz wird u.a. für die bei Nrf2-Überexpression beobachtete Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (*Konstantinopoulus et al., 2011; Wang XJ et al., 2008*).

In HPDE Zellen führte die Stimulation mit tBHQ zu einer deutlichen Reduktion der Etoposid- bzw. TRAIL-induzierten Caspaseaktivität. Die TGF- $\beta$ 1-Behandlung führte zwar ebenso zu einer Reduktion der Caspaseaktivität; jedoch in geringerem Maße. Die ausgeprägteste Reduktion ließ sich unter kombinierter Stimulation mit tBHQ und TGF- $\beta$ 1 verzeichnen. Auch in Colo357 Zellen konnten tBHQ und TGF- $\beta$ 1 vor Etoposid- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose schützen. Die stärkste Reduktion der Caspaseaktivität konnte unter tBHQ-Behandlung beobachtet werden, wobei die zusätzliche Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 diese Wirkung nicht verstärkte. Insgesamt schützt Nrf2, ebenso wie TGF- $\beta$ 1, vor Etoposid- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose, wobei in HPDE Zellen ein additiver Effekt von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 beobachtet werden konnte, der in Colo357 Zellen nicht vorlag. In Colo357 Zellen war interessanterweise die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Desensibilisierung gegenüber beiden Apoptosestimuli – v.a. aber gegenüber TRAIL – abhängig von Nrf2, wie durch Aufhebung des TGF- $\beta$ 1-Effektes unter Nrf2-*Knockdown* gezeigt werden konnte. Das nährt die Vermutung, dass in malignen Pankreasgangepithelzellen – wie den Colo357 Zellen – TGF- $\beta$ 1 nicht mehr zu Nrf2-Hemmung, sondern zu dessen Induktion führt. Dies bestätigten die Ergebnisse der Westernblotanalysen und ARE-Luziferaseassays (Abb. 3.17), die in der Tat einen solchen Nrf2-aktivierenden Effekt in Colo357 Zellen nachweisen konnten.

Zusammengenommen könnten die ermittelten Ergebnisse wichtig sein für das Verständnis der entzündlichen Karzinogenese. Vorstellbar ist, dass zu Beginn der epithelialen Adaptation an den inflammatorischen Stress zunächst TGF- $\beta$ 1 die Aktivität von Nrf2 über die Smad-abhängige Induktion der ATF3-Expression unterdrückt (*Bakin et al., 2004; Brown et al., 2008*), was entsprechend zu einem Anstieg der ROS-Konzentration führt. Zusätzlich bewirkt TGF- $\beta$ 1 über den Smad2/3-Signalweg EMT-assozierte Veränderungen sowie eine Inhibition der Proliferation.

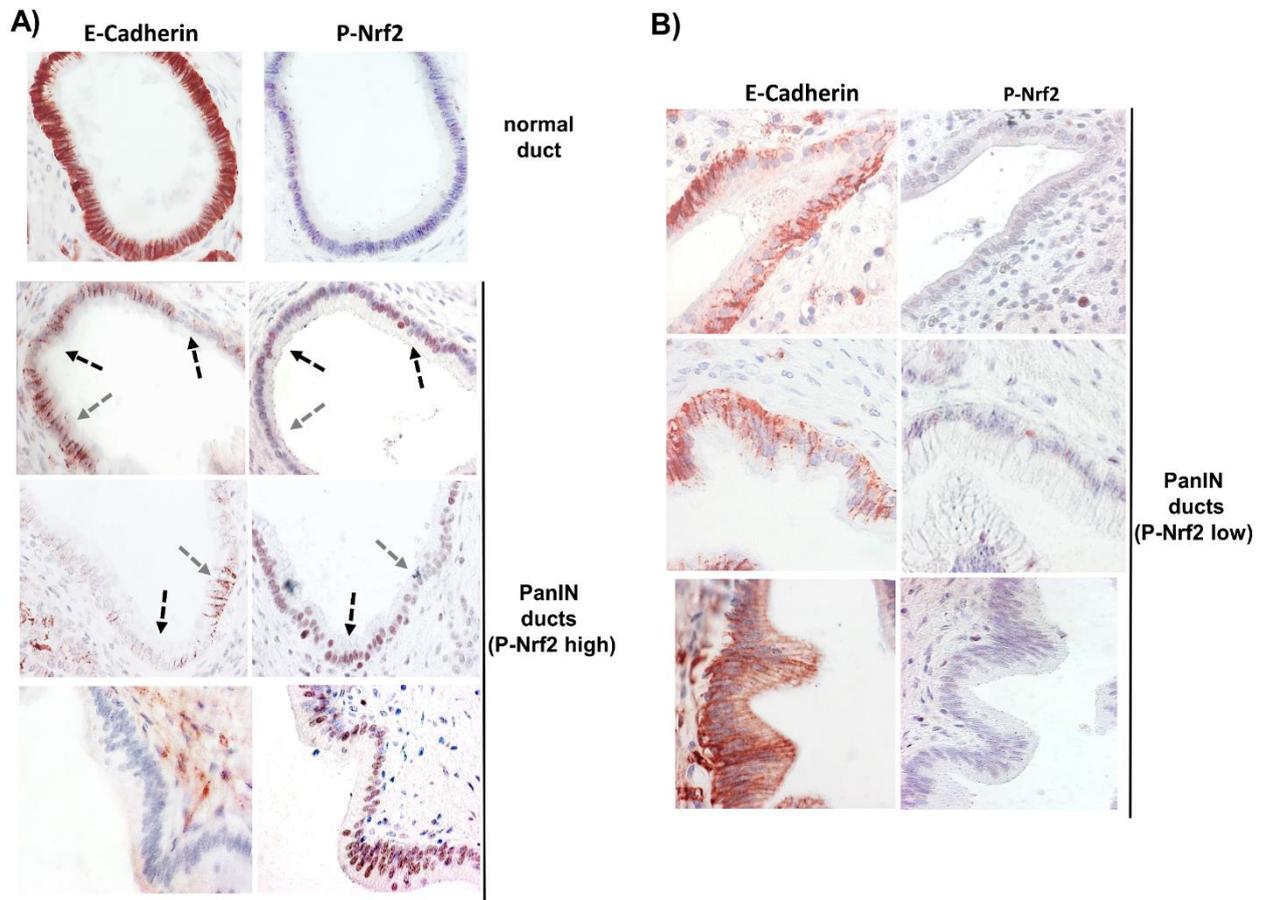
Aus diesen Effekten resultiert ein prämaligener Phänotyp von z.B. pankreatischen Gangepithelzellen, der durch einen Anstieg oxidativen Stresses und den Erwerb migratorischer / invasiver Eigenschaften charakterisiert ist (Abb. 4.1 oben).



**Abbildung 4.1: Zusammenspiel von Nrf2 und TGF-β1 anfangs und im Verlaufe der entzündlichen Karzinogenese.** Dargestellt ist im oberen Teil (A) die anfängliche, TGF-β1-dominierte Adaptation von Epithelzellen an inflammatorischen Stress, während dem unteren Teil (B) die spätere und Nrf2-dominierte Phase zu entnehmen ist.

Im weiteren Verlauf führt der persistierende oxidative Stress zur forcierten Aktivierung von Nrf2, welches bei gleichzeitiger Amplifikation der JNK-Aktivierung direkt zur Inhibition der

Smad2/3 Aktivierung durch TGF- $\beta$ 1 und damit zur Aufhebung der ATF3-vermittelten Nrf2-Regulation führt (Abb. 4.1 unten).



**Abbildung 4.2: Reziproke Expression von aktiviertem Nrf2 und E-Cadherin in PanIN Strukturen von CP Geweben.** Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe von CP Patienten wurde der immunohistochemischen Analyse von E-Cadherin und P-Nrf2 zugeführt; 400x Vergrößerung. **A)** PanIN Läsionen mit hoher P-Nrf2-Expression und gleichzeitig verminderter E-Cadherin-Expression, oben ist zum Vergleich ein normaler Gang gezeigt. **B)** PanIN Läsionen mit geringer P-Nrf2-Expression und gleichzeitig ausgeprägter E-Cadherin-Expression (Arfmann-Knübel *et al.*, 2015).

Weiterhin geht unter diesen Bedingungen der antiproliferative Effekt von TGF- $\beta$ 1 verloren. Gleichzeitig kommt es zum forcierten Verlust der E-Cadherin-Expression. Daraus resultiert ein potentiell malignerer Phänotyp der pankreatischen Gangepithelzelle, indem diese unter Erhalt der invasiven / migratorischen Eigenschaften zusätzliche Wachstumsvorteile (Aufhebung der Zellzykluskontrolle, größere Apoptoseresistenz) erlangt. Hiernach könnte das

## *Diskussion*

Zusammenwirken von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 im Laufe der entzündlichen Karzinogenese in bedeutender Weise zur malignen Transformation des pankreatischen Gangepithels beitragen. Dabei spielt die Modulation der EMT durch Nrf2 eine wichtige Rolle, was sich vor allem in dessen direkter inhibitorischer Wirkung auf die E-Cadherin Expression widerspiegelt.

Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass im pankreatischen Gangepithel eine zunehmende Nrf2-Aktivität während der inflammatorischen Karzinogenese nachzuweisen ist (*Arfmann-Knübel et al. 2015*). Im Gewebe chronischer Pankreatitiden (CP) ist bereits in prämaligen Strukturen des Gangepithels (PanINs) eine erhöhte Nrf2-Aktivität auszumachen (hierdurch verstärkte Akkumulation von Phospho-Ser40-Nrf2 im Zellkern), wohingegen E-Cadherin in diesen Zellen bereits deutlich herunterreguliert ist (Abb. 4.2).

## 5 Zusammenfassung

Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 sind durch die Regulation oxidativen Stresses beide an der epithelialen Adaptation an eine chronische Entzündung beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des Pankreaskarzinoms der Frage nachgegangen, inwiefern Nrf2 in der entzündlichen Karzinogenese beteiligt ist und ob ggf. ein *Cross-talk* mit dem Zytokin TGF- $\beta$ 1 besteht. Dabei wurde speziell der Einfluss von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 auf die Ausbildung eines malignen Phänotyps im Rahmen der EMT sowie der Induktion einer Apoptoseresistenz untersucht.

Anhand von Migrationsanalysen konnte gezeigt werden, dass Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 einen fibroblastoiden Phänotyp in Pankreasgangepithelzellen induzieren sowie ihre Migration und Invasivität steigern. In der benignen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE konnten additive Effekte bei Kombination beider Stimuli erzielt werden, wohingegen dieser Effekt bei der malignen Pankreasgangepithelzelllinie Colo357 nicht auftrat.

Protein- und molekularbiochemischen Methoden ließen auf unterschiedliche Mechanismen von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 in der Initiation der EMT schließen. So schien vor allem die Herunterregulation von E-Cadherin entscheidend für die Nrf2-abhängige EMT, wohingegen TGF- $\beta$ 1 zu einer Expression der mesenchymalen Marker L1CAM, Vimentin und Slug führte. Trotz dieser unterschiedlichen Mechanismen konnten die Untersuchungen den Verdacht einer Interaktion von Nrf2 mit TGF- $\beta$ 1 bestätigen, da TGF- $\beta$ 1 zu einer gesteigerten Expression von Nrf2 führte und die TGF- $\beta$ 1-abhängigen Effekte durch Nrf2-*Knockdown* aufgehoben wurden. Dabei verminderte Nrf2 die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Smad-Aktivierung zu Gunsten eines Smad-unabhängigen, alternativen Signalwegs (u.a. über JNK).

TGF- $\beta$ 1-induzierte Nrf2 nur bei bereits vorhandener Nrf2-Aktivität, z.B. durch eine Behandlung mit den Nrf2-Aktivatoren tBHQ bzw. SFN (HPDE Zellen) oder bei vorhandener Nrf2-Basalaktivität (Colo357 Zellen).

Anhand von Messungen der Caspaseaktivität konnte eine verstärkte Apoptoseresistenz durch Nrf2 nachgewiesen werden. Auch hier reduzierte TGF- $\beta$ 1 die Apoptoserate in HPDE Zellen nicht alleine, sondern nur in Kombination mit Nrf2-Aktivierung in erheblichem Maße, wohingegen TGF- $\beta$ 1 in Colo357 Zellen alleine zu einem Apoptoseschutz führte. Dabei konnte durch Nrf2-Aktivierung keine weitere Apoptoseresistenz erzielt werden, jedoch hob Nrf2-

### *Zusammenfassung*

*Knockdown* den TGF- $\beta$ 1-induzierten Effekt auf. Auch hier zeigte sich, dass Nrf2 von enormer Bedeutung für die TGF- $\beta$ 1-vermittelte protumorigene Wirkung in Form eines Apoptoseschutzes ist. Welche Signalwege dabei von Bedeutung sind, bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen. Insgesamt sind diese Ergebnisse wichtig für das Verständnis der Initiation der entzündlichen Karzinogenese, sowie die dualen Wirkungen von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 im Rahmen dieser. Nrf2 könnte dabei einen Schlüsselfaktor in der Wandlung der antitumorigenen hin zur protumorigenen Wirkung TGF- $\beta$ 1's darstellen.

Zusammengenommen spielen Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 eine entscheidende Rolle im Rahmen der entzündlichen Karzinogenese, z.B. des Pankreaskarzinoms im Rahmen einer chronischen Pankreatitis, durch Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition und damit der Motilität und Invasivität sowie der Apoptoseresistenz.

## 6 Literaturverzeichnis

Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, Becker KF (2009). Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 3035-3050.

Arfmann-Knübel S, Struck B, Genrich G, Helm O, Sipos B, Sebens S, Schäfer H. The crosstalk between Nrf2 and TGF- $\beta$ 1 in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic duct epithelial cells. *PLoS One*. 2015 Jul 30;10(7):e0132978.

Arlt A, Schäfer H, Kalthoff H (2012). The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF- $\kappa$ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis*, 1, e; doi:10.1038/oncsis.2012.35

Arlt A, Bauer I, Schafmayer C, Tepel J, Sebens M, Muerkoster S, Brosch M, Röder C, Kalthoff H, Hampe J, Moyer MP, Fölsch UR, Schäfer H (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 28, 3983–3996.

Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse ML, Schreiber S, Schäfer H (2013). Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 324, 825-835.

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69(14):, 5820-5828.

Bakin AV1, Stourman NV, Sekhar KR, Rinehart C, Yan X, Meredith MJ, Arteaga CL, Freeman ML (2004). Smad3-ATF3 signaling mediates TGF-beta suppression of genes encoding Phase II detoxifying proteins. *Free Radic Biol Med.* 38, 375-387.

Bates RC1, Mercurio AM (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 4, 365-370.

Bieber C, Baenkler H, Arastéh K, Brandt R, Chatterjee T (2012). *Duale Reihe Innere Medizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 664-669.

Birnbaum DJ, Mamessier E, Birnbaum D (2012). The emerging role of the TGF $\beta$  tumor suppressor pathway in pancreatic cancer. *Cell Cycle*, 11, 683-686.

Brown SL, Sekhar KR, Rachakonda G, Sasi S, Freeman ML (2008). Activating transcription factor 3 is a novel repressor of the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)-regulated stress pathway. *Cancer Res.* 68, 364-368.

Choi J1, Park SY, Joo CK (2007). Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 2708-2718.

de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 92, 1388–1402.

Digaleh H, Kiaei M, Khodaghali F (2013). Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 70, 4681-4694.

Ellenrieder V1, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM (2001). Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res.* 61, 4222-4228.

Elliott RL, Blobe GC (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 23, 2078-2093.

Jungert K1, Buck A, von Wichert G, Adler G, König A, Buchholz M, Gress TM, Ellenrieder V (2007). Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1563-1570.

Farrow B1, Evers BM (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol.* 10, 153-169.

Friess H, Lu Z, Riesle E, Uhl W, Bründler AM, Horvath L, Gold LI, Korc M, Büchler MW (1998). Enhanced expression of TGF-betas and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann Surg.* 227, 95–104.

Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA, Tsao MS (1996). Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts

transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol.* 148, 1763-1770.

Geismann C1, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, Arlt A, Tsao MS, Bachem MG, Altevogt P, Sipos B, Fölsch UR, Schäfer H, Mürköster SS (2009). Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69, 4517-4526.

Geismann C (2010). Beteiligung des promigratorischen Moleküls L1CAM an der Epithelialen Mesenchymalen Transition des pankreatischen Gangepithels. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Geismann C, Arlt A, Sebens S, Schäfer H (2014). Cytoprotection „gone astray“: Nrf2 and its role in cancer. *Onco Targets Ther.* 7, 1497-1518.

Giannoni E1, Parri M, Chiarugi P (2012). EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. *Antioxid Redox Signal.* 16, 1248-1263.

Greenburg G, Hay ED (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 95, 333-339.

Guarino M1, Rubino B, Ballabio G (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39, 305-318 .

Hata A1, Shi Y, Massagué J (1998). TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 4, 257-262.

Hayes JD1, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal* 13, 1713-1748.

Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhäuser C (2001). Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem.* 276(34), 32008-32015.

Herold G (2012). *Innere Medizin.* Köln: Herold Gerd, 497-498.

Herrera B1, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Beltrán J, Fernández M, Fabregat I (2004). Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 36, 16-26.

Hong YB1, Kang HJ, Kwon SY, Kim HJ, Kwon KY, Cho CH, Lee JM, Kallakury BV, Bae I (2010). Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 regulates drug resistance in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 39, 463-472.

Hu R1, Khor TO, Shen G, Jeong WS, Hebbar V, Chen C, Xu C, Reddy B, Chada K, Kong AN (2006-1). Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. *Carcinogenesis* 27, 2038-2046.

Hu R1, Xu C, Shen G, Jain MR, Khor TO, Gopalkrishnan A, Lin W, Reddy B, Chan JY, Kong AN (2006-2). Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett.* 243, 170-192.

Ishii T1, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. (1999). Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.* 275, 16023-16029.

Itoh K1, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236, 313-322.

Itoh, Wakabayashi, Katoh, Ishii, Igarashi, Engel, Yamamoto (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76-86.

Kalluri R1, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119, 1420-1428.

Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos ES (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 285, 8171-8184.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47, 89-116.

Kensler TW1, Wakabayashi N (2010). Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 31, 90-99.

- Kensler TW, Ng D, Carmella SG, Chen M, Jacobson LP, Muñoz A, Egner PA, Chen JG, Qian GS, Chen TY, Fahey JW, Talalay P, Groopman JD, Yuan JM, Hecht SS (2012). Modulation of the metabolism of airborne pollutants by glucoraphanin-rich and sulforaphane-rich broccoli sprout beverages in Qidong, China. *Carcinogenesis*. 33(1), 101-107.
- Kiefel H1, Bondong S, Pfeifer M, Schirmer U, Erbe-Hoffmann N, Schäfer H, Sebens S, Altevogt P (2012). EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 33, 1919-1929.
- Kim JI1, Lee JH, Choi DS, Won BM, Jung MY, Park J (2009). Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by common synthetic antioxidants (tert-butylhydroxyanisol, tert-di-butylhydroxytoluene, and tert-butylhydroquinone) as compared with alpha-tocopherol. *J Food Sci*. 74, C362-369.
- Kim SK1, Yang JW, Kim MR, Roh SH, Kim HG, Lee KY, Jeong HG, Kang KW (2010). Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 45, 537-546.
- Kim YR1, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, Eom HS, Yoo NJ, Lee SH (2010). Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol*. 220, 446-451.
- Kim WD1, Kim YW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG (2012). E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *J Cell Sci*. 125, 1284-1295.
- Konstantinopoulos PA1, Spentzos D, Fountzilias E, Francoeur N, Sanisetty S, Grammatikos AP, Hecht JL, Cannistra SA (2011). Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2011 71, 5081-5089.
- Kwak MK1, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW (2003). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 23, 8786-8794.
- Kwak MK1, Kensler TW (2006). Induction of 26S proteasome subunit PSMB5 by the bifunctional inducer 3-methylcholanthrene through the Nrf2-ARE, but not the AhR/Arnt-XRE, pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 345, 1350-1357.

Lau A1, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD (2008). Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 58, 262-270.

Lee DF1, Kuo HP, Liu M, Chou CK, Xia W, Du Y, Shen J, Chen CT, Huo L, Hsu MC, Li CW, Ding Q, Liao TL, Lai CC, Lin AC, Chang YH, Tsai SF, Li LY, Hung MC (2009). KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell.* 36, 131-140.

Leiser SF, Miller RA (2010). Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice. *Mol Cell Biol.* 30, 871-884.

Löhr M1, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 7, 17-23.

Lüllmann-Rauch R (2009). *Histologie.* 3. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 32-40, 96, 114.

Massagué J (2008). TGF $\beta$  in Cancer. *Cell.* 134, 215–230.

Meulmeester E, Ten Dijke P (2011). The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol.* 223, 205-218.

Miettinen PJ1, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 127, 2021-2036.

Moi P1, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9926-9930.

Moinova HR1, Mulcahy RT (1999). Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun.* 261, 661-668.

Nakajima S1, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M (2004). N-cadherin expression

and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10, 4125-4133.

Natalwala A1, Spychal R, Tselepis C (2008). Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 14, 3792-3797.

Niture SK, Jaiswal AK (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem.* 287, 9873-9886.

Oh CJ, Kim JY, Min AK, Park KG, Harris RA, Kim HJ, Lee IK (2012). Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling. *Free Radic Biol Med.* 52, 671-682.

Osburn, Kensler (2008). Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 659, 31-39.

Pan H1, Wang H, Zhu L, Mao L, Qiao L, Su X (2013). The role of Nrf2 in migration and invasion of human glioma cell U251. *World Neurosurg.* 80, 363-370.

Rachakonda G1, Sekhar KR, Jowhar D, Samson PC, Wikswo JP, Beauchamp RD, Datta PK, Freeman ML (2010). Increased cell migration and plasticity in Nrf2-deficient cancer cell lines. *Oncogene* 29, 3703-3714.

Ramos-Gomez M1, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW (2000). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3410-3415.

Rane SG, Lee JH, Lin HM (2006). Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 107-119.

Rao VA, Klein SR, Bonar SJ, Zielonka J, Mizuno N, Dickey JS, Keller PW, Joseph J, Kalyanaraman B, Shacter E (2010). The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone. *J Biol Chem.* 285, 34447-34459.

Reznik R, Hendifar AE, Tuli R (2014). Genetic determinants and potential therapeutic targets for pancreatic adenocarcinoma. *Front Physiol.* 5, 87.

- Roberts AB1, Wakefield LM (2003). The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8621-8623.
- Rotblat B1, Melino G, Knight RA (2012). NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget* 3, 1272-83.
- Rushmore TH1, Morton MR, Pickett CB (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 266, 11632-11639.
- Schäfer H, Struck B, Feldmann EM, Bergmann F, Grage-Griebenow E, Geismann C, Ehlers S, Altevogt P, Sebens S (2012). TGF- $\beta$ 1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells. *Oncogene* 32, 180-189.
- Shapiro TA1, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Stephenson KK, Wade KL, Ye L, Talalay P (2006). Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer* 55, 53-62.
- Shen H1, Yang Y, Xia S, Rao B, Zhang J, Wang J (2013). Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment. *Dis Esophagus* 27, 685-692.
- Shi et Massagué (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113, 685-700.
- Singh A1, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 3, e420.
- Sporn und Liby (2012). Nrf2 an cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* 12, 564-571.
- Storz P (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 10, 1881-1896.
- Thiery JP1, Sleeman JP (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 131-142.
- Venugopal R1, Jaiswal AK (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively

regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14960-14965.

Villamena, FA (2013). *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*. New York: John Wiley & S, 269-281

Vincent A1, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011). Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620.

Vuoriluoto K1, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens JB, Ivaska J (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 30, 1436-1448.

Wang R1, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D (2008). Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 373, 151-154.

Wang XJ1, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235-1243.

Wakabayashi N1, Shin S, Slocum SL, Agoston ES, Wakabayashi J, Kwak MK, Misra V, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW (2010). Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. *Sci Signal* 3, ra52.

World Health Organization, International Programme On Chemical Safety (20.03.14). <http://www.who.int/ipcs/en/>.

Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Kong AN (2006). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res.* 66, 8293-8296.

Yin X, Wolford CC, Chang YS, McConoughey SJ, Ramsey SA, Aderem A, Hai T (2010). ATF3, an adaptive-response gene, enhances TGFβ1 signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *J Cell Sci.* 123, 3558-3565.

Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH (2012). Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. *Histopathology* 60, 943-952.

You A, Nam CW, Wakabayashi N, Yamamoto M, Kensler TW, Kwak MK (2011). Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Arch Biochem Biophys.* 507, 356-364.

Zavadil J, Böttinger EP (2005). TGF beta and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 24, 5764 – 5774.

Zentrum für deutsche Krebsregisterdaten (20.03.14).

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html)

Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2399-2403.

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* 24, 10941-10953.

Zhang DD (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev.* 38, 769-789.

Zhang YE (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128-139.

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Duale Rolle von Nrf2 in der Tumorigenese (aus *Geismann et al.*, 2014).
- Abbildung 3.1: Stimulation mit tBHQ und TGF- $\beta$ 1 verändert die Morphologie der HPDE Zellen.
- Abbildung 3.2: Scratch-Assay von HPDE Zellen.
- Abbildung 3.3: Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 erhöhen die Invasionsrate von HPDE Zellen.
- Abbildung 3.4: Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 erhöhen die Invasionsrate von Colo357 Zellen.
- Abbildung 3.5: Nrf2-Induktion hebt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Proteinexpression von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.
- Abbildung 3.6: Nrf2-Induktion hemmt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Proteinexpression von EMT-Markern in Colo357 Zellen.
- Abbildung 3.7: Nrf2-Induktion hebt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Expression der mRNA von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.
- Abbildung 3.8: Nrf2-Induktion hebt den TGF- $\beta$ 1-induzierenden Effekt auf die Expression der mRNA von EMT-Markern in Colo357 Zellen auf.
- Abbildung 3.9: Nrf2-*Knockdown* hebt die hemmende Wirkung von Nrf2 auf die EMT-Marker Expression in HPDE Zellen auf.
- Abbildung 3.10: Nrf2-*Knockdown* hebt die hemmende Wirkung von Nrf2 auf die EMT-Marker Expression in Colo357 Zellen auf.
- Abbildung 3.11: Nrf2-*Knockdown* hebt die tBHQ-vermittelte Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression der mRNA von EMT-Markern in HPDE Zellen auf.
- Abbildung 3.12: Nrf2-*Knockdown* hebt die tBHQ-vermittelte Hemmung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression der mRNA von EMT-Markern in Colo357 Zellen auf.
- Abbildung 3.13: Nrf2-Induktion unterdrückt die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung des Smad-Signalweges in HPDE Zellen zugunsten verstärkter JNK-Aktivierung.

- Abbildung 3.14: Nrf2-Induktion unterdrückt die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung des Smad-Signalweges in Colo357 Zellen zugunsten verstärkter JNK-Aktivierung.
- Abbildung 3.15: Einfluss des Nrf2-*Knockdowns* auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung des Smad- und JNK-Signalweges in HPDE Zellen.
- Abbildung 3.16: Einfluss des Nrf2-*Knockdowns* auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung des Smad- und JNK-Signalweges in Colo357 Zellen.
- Abbildung 3.17: Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Aktivität in HPDE und Colo357 Zellen.
- Abbildung 3.18: Nrf2-Induktion und TGF- $\beta$ 1 führen zu einer Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid (Eto) und TRAIL in HPDE (A) und Colo357-Zellen (B).
- Abbildung 3.19: Nrf2-*Knockdown* hebt die tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid (A) und TRAIL (B) in HPDE Zellen auf.
- Abbildung 3.20: Nrf2-*Knockdown* hebt die tBHQ- und TGF- $\beta$ 1-vermittelte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid (A) und TRAIL (B) in Colo357 Zellen auf.
- Abbildung 4.1: Zusammenspiel von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 anfangs und im Verlaufe der entzündlichen Karzinogenese.
- Abbildung 4.2: Reziproke Expression von aktiviertem Nrf2 und E-Cadherin in PanIN Strukturen von CP Geweben.

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer, der mir mit großem Engagement stets zur Seite stand. Besonders die hervorragende Betreuung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank dafür. Aber auch für die gute Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die Bereitstellung der benötigten Mittel zur Durchführung der Doktorarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bin ich sehr dankbar.

Dem Direktor der Klinik für Allgemeine Innere Medizin der Universität Schleswig-Holstein Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für ihre geduldige Einarbeitung und Hilfsbereitschaft in allen praktisch-technischen Bereichen, ihr fundiertes Fachwissen sowie für die äußerst nette, kollegiale Arbeitsatmosphäre danke ich Iris Bauer, Maike Großmann, Dagmar Leisner, Maike Witt-Ramdohr und meiner Mitdoktorandin Imke Stachel.

Meinen Freunden danke ich für die Unterstützung, die stetige Bestärkung und die hilfreichen Tipps in allen Phasen dieser Arbeit.

Ich danke meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, für die tatkräftige Unterstützung in jeglicher Art und Weise, sowie für die pausenlose Motivation.

## **9 Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name: Sarah Carina Arfmann-Knübel  
Geburtsdatum: 23.04.1990  
Geburtsort: Troisdorf  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Schulbildung  
08/1996 – 06/2000 Adolf-Kolping Grundschule, Siegburg  
08/2000 – 06/2009 Gymnasium Alleestraße, Siegburg, allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

10 / 2009 – 12 / 2015 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
09 / 2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10 / 2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
*voraussichtlich 11 / 2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*  
*voraussichtlich 12 / 2015 Approbation als Ärztin*

### **Praktisches Jahr**

11 / 2014 – 03 / 2015 Innere Medizin, Klinik für Allgemeine Innere Medizin I., UKSH Campus Kiel  
03 / 2015 – 06 / 2015 Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Kiel  
06 / 2015 – 10 / 2015 Pädiatrie, Krankenhaus Porz am Rhein, Köln

### **Dissertation**

Seit 07 / 2012 Arbeit an dem Thema „EINFLUSS DES ANTI-OXIDATIVEN TRANSKRIPTIONSFAKTORS NUCLEAR FACTOR E2 RELATED FACTOR-2 (NRF2) AUF DIE MIGRATION UND

*Lebenslauf*

EPITHELIAL- MESENCHYMALE TRANSITION  
VON BENIGNEN UND MALIGNEN  
PANKREASGANGEPITHELZELLEN“ im Labor  
für molekulare Gastroenterologie und Hepatologie,  
Klinik für Allgemeine Innere Medizin I., UKSH  
Campus Kiel

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss des anti-oxidativen Transkriptionsfaktors Nuclear factor-E2 related factor-2 (Nrf2) auf die epithelial-mesenchymale Transition von benignen und malignen Pankreasgangepithelzellen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Kiel, den 14.09.2015