

Aus der Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie,
Hepatology, Pneumologie, internistische Intensivmedizin, Endokrinologie,
Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Rolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Chemoresistenz des duktales
Pankreasadenokarzinoms und dessen Bedeutung als therapeutisches Ziel

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

vorgelegt von
Susanne Krebs
aus Worms

Kiel 2016

Referent:

Prof. Dr. Heiner Schäfer, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten
Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

Korreferent:

Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2016

1. Vorsitz: Fr. Prof. Dr. Fritscher-Ravens

2. Vorsitz: Hr. Prof. Dr. Alexander Arlt

Zum Druck genehmigt am 21.07.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. PDAC	1
1.2. Nrf2.....	2
1.2.1. Rolle von Nrf2 in der Tumorentstehung	3
1.2.2. Nrf2 abhängige Resistenzmechanismen.....	6
1.2.3. Nrf2 abhängige Kontrolle der Proteasomaktivität.....	6
1.2.4. Nrf2 inhibierende Therapiestrategien	8
1.3. Ziele der Arbeit	8
2. Material und Methoden	10
2.1. Spezielle Materialien	10
2.1.1. Zellkultur	10
2.1.2. Proteasomenassay.....	10
2.1.3. Westernblotanalyse	10
2.1.4. RNA-Aufarbeitung und Realtime PCR	12
2.1.5. siRNA Transfektion	12
2.1.6. Plasmid-Transfektion.....	12
2.1.7. Apoptoseanalyse Caspase 3/7-Assay.....	12
2.1.8. Subkutanen Xenograft Tumormodell in SCID Mäusen.....	12
2.1.9. Immunhistochemie	12
2.2. Methoden	13
2.2.1. Allgemeine Zellkultur	13
2.2.2. Zellkultur HPDE	13
2.2.3. Zellkultur PDAC	14
2.2.4. Proteasomenassay	14
2.2.5. Westernblotanalyse	14
2.2.5.1. Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen	15
2.2.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	15
2.2.5.3. Denaturierende Proteinbestimmung nach Laemmli	15
2.2.5.4. Proteintransfer	15
2.2.5.5. Färbung der Membran.....	16
2.2.5.6. Immundetektion.....	16
2.2.6. Realtime PCR.....	16
2.2.6.1. Isolation der RNA	16
2.2.6.2. Herstellen von cDNA	17
2.2.6.3. Echt-Zeit Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)	17

2.2.7.	siRNA Transfektion	18
2.2.8.	Plasmid DNA-Transfektion	18
2.2.8.1.	Luciferaseassay	18
2.2.9.	Caspase Assay	19
2.2.10.	Subkutanes Xenograft Tumormodell in SCID Mäusen.....	19
2.2.11.	Immunhistochemie	20
2.2.12.	Statistik.....	21
3.	Ergebnisse	22
3.1.	Basale und induzierbare Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen.....	22
3.1.1.	Das Nrf2 Aktivitätsniveau korreliert mit der nukleären Nrf2 Konzentration	22
3.2.	Testung von atRA, DY131, Luteolin und Trigonellin in Colo357 und Panc1 Zellen auf die Fähigkeit einer Nrf2 Inhibition.....	23
3.3.	Der Effekt von Trigonellin auf die Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen.....	25
3.3.1.	Einfluss von Trigonellin auf die tBHQ induzierte ARE-Luziferase.....	25
3.3.2.	Trigonellin-Effekte auf die nukleäre Lokalisation von Nrf2	26
3.4.	Der Effekt von Trigonellin auf die Proteasomaktivität in PDAC und H6c7 Zellen	29
3.5.	Nrf2-abhängige Genexpression unter Trigonellin Behandlung	33
3.6.	Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid auf induzierte Apoptose in PDAC und H6c7 Zellen.....	35
3.7.	Der Apoptose sensitivierende Effekt von Trigonellin ist abhängig von Nrf2 und proteasomaler Genexpression.....	39
3.8.	Verstärkte Tumorreduktion durch kombinierte Behandlung mit Trigonellin und Etoposid bei Colo357- und Panc1-Tumortragenden SCID-Mäusen	43
3.9.	Der Einfluss von einer Trigonellin/Etoposid-Kombinationstherapie auf die Nrf2 Aktivität in Colo357 und Panc1 Tumoren	46
4.	Diskussion.....	48
4.1.	Chemoresistenz von Pankreaskarzinomzellen und die Bedeutung von Nrf2	48
4.2.	Strategien der Nrf2 Inhibition	50
4.2.1.	Unterschiedliche Effizienz von Luteolin, Trigonellin, atRA und DY131 in Bezug auf die Nrf2 Inhibition	51
4.2.2.	Wirkungsmechanismus von Trigonellin in Bezug auf Nrf2 und die Nrf2-abhängige Proteasomaktivität.....	53
4.3.	Trigonellin als Sensitizer gegenüber Todesliganden und Zytostatika.....	56
4.3.1.	Aufhebung der Nrf2-bedingten Apoptoseprotektion durch Trigonellin und Einfluß des Proteasomsystems	56

4.3.2. Vorteile des Einsatzes von Trigonellin und Perspektiven auf diesem Wirkstoff basierender Therapiestrategien in der Onkologie.....	58
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literaturverzeichnis.....	63
7. Danksagung.....	79
8. Lebenslauf.....	79
9. Anhang.....	83
9.1. Anhang I.....	83
9.2. Anhang II.....	84
9.3. Erklärung Doktorarbeit.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die zwei Seiten von Nrf2 in der Tumorgenese	5
Abbildung 2:	Nukleäre Nrf2 Expression in PDAC und H6C7 Zellen	22
Abbildung 3:	Die spezifische Nrf2-Luciferaseaktivität in PDAC und H6C7 Zellen	23
Abbildung 4:	Der Effekt von atRA, DY131, Luteolin und Trigonellin auf die basale Nrf2-Aktivität in Colo357 und Panc1 Zellen.....	24
Abbildung 5:	Der Effekt von Trigonellin auf die induzierte Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen.....	26
Abbildung 6:	Westernblotanalyse der Nrf2 Expression im Zusammenhang mit Trigonellin und tBHQ in PDAC und H6c7 Zellen.....	27
Abbildung 7:	Westernblotanalyse der Trigonellin Effekte auf die zytoplasmatische und nukleäre Nrf2- und Keap1 Verteilung in Gegenwart von LMB	28
Abbildung 8:	Effekte von Trigonellin in Bezug auf die Luciferase-Aktivität von Nrf2 in Gegenwart von LMB.....	29
Abbildung 9:	Effekte von Trigonellin und tBHQ auf die Proteasomaktivität in PDAC und H6c7 Zellen.....	30
Abbildung 10:	Die Effekte von Trigonellin auf die Proteasomaktivität nach siRNA Behandlung.....	32
Abbildung 11:	Trigonellin vermindert die mRNA Expression der proteasomalen Gene s5a und alspha5 sowie des PhasII-Enzyms GCLC in PDAC und H6c7 Zellen.....	34
Abbildung 12:	Westernblotanalyse zum Nachweis der reduzierten Proteinmengen von S5a und alpha5 in PDAC und H6c7 Zellen	35
Abbildung 13:	Der Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid induzierte Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in Colo357 und Panc1 und Zellen.....	36
Abbildung 14:	Der Einfluss von Trigonelline auf die durch TRAIL und Etoposid induzierte Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca und H6c7 Zellen.....	38
Abbildung 15:	Die Untersuchung der Caspaseaktivität und PARP1-Spaltung in Panc1 Zellen nach Nrf2 Knockdown und anschließender Trigonellin-Gabe	39

Abbildung 16:	Die Untersuchung der Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca2 Zellen nach Nrf2 Knockdown und im Zusammenhang mit Trigonellin und tBHQ.....	40
Abbildung 17:	Die Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in Panc1 Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen proteasomale Gene	41
Abbildung 18:	Die Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca2 Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen proteasomale Gene	42
Abbildung 19:	Wirkung einer Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf das Wachstum von palpablen subkutanen Colo357 und Panc1 Tumoren in SCID beige Mäusen.....	44
Abbildung 20:	Wirkung einer Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf das Wachstum von subkutanen Colo357 und Panc1 Tumoren in SCID Mäusen gemessen nach der Exzision.....	45
Abbildung 21:	Einfluss der Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf die Nrf2 Aktivität in Colo357 und Panc1 Tumoren.....	47
Abbildung I:	Nachweis des nukleären Nrf2-Proteins durch Immunfluoreszenzfärbung	83
Abbildung II:	Nachweis der Effizienz von Nrf1- und Nrf2-siRNA anhand qPCR	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	siRNA Verzeichnis.....	12
Tabelle 2:	Therapieschema SCID Mäuse	20

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette, aktiver Substrattransport durch ATP
ARE	Antioxidant-Response-Pathway
atRa	All-Trans-Retinoic-Acid, Vitamin-A-Säure
BCL	B-Cell Lymphoma, Regulatorprotein Apoptose, Protoonkogen
B-Raf	Protoonkogen
BSA	Bovines Serumalbumin
CABP2	Calcium binding protein
CDDO	Bardoxolone Methyl, Nrf2-Induktor
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
clAP1	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2, Apoptoseinhibitor
CPT11	Camtothecin-11, Irinotecan
Crm1	Chromosomal maintenance1, Exportprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DY131	Agonist für den Östrogenrezeptor ERB
ECa	Endometrium Carcinom
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	Epidermal growth factor
EpRE	Electrophil-Response-Element
FABP5	Fatty acid binding protein
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
ff	Firefly luciferase
GCLC	Glutamate-Cysteine Ligase Complex
HPDE	Humane Pankreatische duktaile Epithelzelllinie
Hsp90	Hitzeschockprotein, Zellprotein
Ig	Immunglobulin
IM3829	4-(2-Cyclohexylethoxy)anilline, Nrf2-Inhibitor

INK4	Tumorsuppressorprotein
I κ B	Inhibitor of Nf- κ B
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein, Nrf2-Repressor Protein
K-ras	Kirsten-ras Gen, Onkogen
LMB	Leptomycin B
Mcl1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl1 , Apoptoseinhibitor
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog, Onkogen
mRNA	Messenger-RNA
MRP	Multidrug Resistance Protein
NFAT	Nuclear factor of Activates T-cells, Transkriptionsfaktor
NF- κ B	Nuclear factor`kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells, Transkriptionsfaktor
NQO1	NADPH Dehydrogenasequinone 1, Oxidoreduktase
Nrf1	Nuclear Respiratory Factor1, Transkriptionsfaktor
Nrf2	Nuclear Factor E2-related factor 2, Transkriptionsfaktor
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase1, DNA-Reparatur Enzym
PBS	Phosphate buffered saline
PCa	Prostatate Cancer
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PIK75	PI3-Kinase a Inhibitor
PK	Proteinkinase
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PSM	Proteasome subunit
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog, Tumorsuppressor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RARa/RXR	Retinoidrezeptoren

Rel	Protoonkogen, Nfk Proteinfamilie
rl	Renilla luciferase
RLU	Relative Light Units, Chemilumineszenzeinheit
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotations per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
Rpn2	RibophorinII
Rpt1	Proteasome regulatory particle base subunit
SCID	Severe combined immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFN	Sulforaphan, Antioxidans
shRNA	Small hairpin RNA, RNA-Molekül, mit dem künstlich Gene still gelegt werden können
siRNA	Small interfering RNA, kurze RNA-Moleküle, die keine Proteine codieren
SMAD4	Tumorsuppresorgen
Suc-LLVY-AMC	N-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-Lvalyl-L-tyrosyl-7-amido-4-methylcumarin, Proteasomfluoreszenzsubstrat
tBHQ	Tert-Butylhydrquinone, Antioxidans
TBS	Tris buffered saline
TNF	Tumornekrosefaktor, Zytokin im Entzündungsprozess
TRAIL	TNF-related apoptosis-Inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UPS	Ubiquitin proteasom system
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Veröffentlichung

Oncogene. 2013 Oct;32(40):4825-35. doi: 10.1038/onc.2012.493. Epub 2012 Oct 29.

„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“

Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse ML, Schreiber S, Schäfer H.

Abstract

Evidence accumulates that the transcription factor nuclear factor-E2 related factor-2 (Nrf2) has an essential role in cancer development and chemoresistance, thus pointing to its potential as anti-cancer target and undermining its suitability in chemoprevention. Through the induction of cytoprotective and proteasomal genes, Nrf2 confers apoptosis protection in tumor cells, and inhibiting Nrf2 would be therefore an efficient strategy in anti-cancer therapy. In the present study, pancreatic carcinoma cell lines (Panc1, Colo357, MiaPaca2) and H6c7 pancreatic duct cells were analysed for the Nrf2 inhibitory effect of the coffee alkaloid trigonelline as well as for its impact on Nrf2 dependent proteasome activity and resistance to TRAIL and anti-cancer drug induced apoptosis. Chemoresistant Panc1 and Colo357 cells exhibit high constitutive Nrf2 activity, whereas chemosensitive MiaPaca2 and H6c7 cells display little basal but strong tBHQ-inducible Nrf2 activity and drug resistance. Trigonelline efficiently decreased basal and tBHQ induced Nrf2 activity in all cell lines, an effect relying on a reduced nuclear accumulation of the Nrf2 protein. Along with Nrf2 inhibition, trigonelline blocked the Nrf2 dependent expression of proteasomal genes (e.g. s5a/psmd4, α 5/psma5) and reduced proteasome activity in all cell lines tested. These blocking effects were absent after treatment with Nrf2 siRNA, a condition at which proteasomal gene expression and proteasome activity already decreased, whereas siRNA against the related transcription factor Nrf1 did not affect proteasome activity and the inhibitory effect of trigonelline. Depending on both Nrf2 and proteasomal gene expression, the sensitivity of all cell lines to anti-cancer drug and TRAIL induced apoptosis was enhanced by trigonelline. Moreover, greater anti-tumor responses

towards anti-cancer drug treatment were observed in tumor bearing mice when receiving trigonelline. In conclusion, representing an efficient Nrf2 inhibitor capable of blocking Nrf2 dependent proteasome activity and thereby apoptosis protection in pancreatic cancer cells, trigonelline might be beneficial in improving anti-cancer therapy.

1. Einleitung

1.1. PDAC

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) gehört mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8% in Deutschland (Krebs in Deutschland 2009/2010) und 6% in den USA (Siegel et al 2012) zu den häufigsten malignombedingten Todesursachen der westlichen Welt. Dieser Umstand ist vor allem darauf zurückzuführen, dass durch das rasche und infiltrierende Wachstum der Tumorzellen sich die Mehrzahl der Patienten bei Diagnosestellung bereits im metastasierten Stadium befindet. Außerdem nimmt die Erkrankung häufig einen fulminanten klinischen Verlauf und es existiert bis dato noch keine therapeutische Maßnahme, diese Tumorentität adäquat behandeln zu können (Nieto et al 2008). Für nur 15-20% der Patienten besteht die Option einer chirurgischen Resektion des Tumors, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate dieser behandelten Gruppe lediglich circa 20% beträgt (Li et al 2004). Diesen Umständen Rechnung tragend, sind die Anstrengungen groß, die molekularen Mechanismen besser zu verstehen, durch welche die hohe Malignität des PDAC und dessen ausgeprägte Therapieresistenz bedingt sind.

90% der Pankreaskarzinome entwickeln sich aus den Gangepithelzellen im exokrinen Teil des Organs. Die Entstehung des invasiven Pankreaskarzinoms folgt einem Tumorprogressionsmodell, das drei verschiedene Neoplasievorstufen unterscheidet. Diese sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien, kurz PanIN, werden in die Schweregrade I bis III eingeteilt. Das Modell führt die Veränderung der Zellen auf die Summe genetischer und epigenetischer Modifikationen, besonders der von Onkogenen, zurück, deren Häufigkeit im Laufe der Erkrankung zunimmt. Diese Umwandlungen tragen schlussendlich zur Entwicklung des Pankreaskarzinoms bei und bedingen außerdem dessen biologisches Verhalten. Als Mutationen, die man in entarteten Zellen oft findet, gehören jene im INK4a-, p53- oder SMAD4-Gen. Die am häufigsten (~ 90%) und auch schon in frühen Stadien des Tumorprogressionsmodell auftretende genetische Veränderung in Zellen des Pankreasadenokarzinoms, stellt aber die Mutation im Codon 12 oder 13 des K-RAS Gens dar. (Cowan and Maitra 2014, Maitra and Hruban 2008). Des Weiteren wurde die konstitutive Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NFAT und Nrf2 in einer Mehrzahl der Pankreaskarzinome nachgewiesen (Arlt et al 2001, Arlt et al 2003, Arlt et al 2012, Hruban et al 2008, Lister et al 2011), die unter anderem die ausgeprägte

Therapieresistenz dieser Tumore bedingen (Arlt et al 2001, Arlt et al 2003, Arlt et al 2012, Arlt et al 2013, Schneider et al 2005).

Wie bereits ausgeführt, stellt das duktales Pankreasadenokarzinom einen wenig erfolgreich therapierbaren Tumor dar (Herreros-Villanueva et al 2012), und in der überwiegenden Zahl der Fälle sind gegenwärtig die Therapieansätze lediglich palliativer Natur und bedienen sich konventioneller Chemo- und oder Radiotherapie (Vincent et al 2011). Seit seiner Einführung 1996, hat sich hierbei das Nukleosidanalogen Gemcitabin auf Grund eines geringen Vorteils hinsichtlich des medianen Überlebens und seines günstigeren Nebenwirkungsprofils zunehmend als Standardtherapeutikum durchgesetzt. Aber eine signifikante Verbesserung der infausten Prognose konnte auch dieses Zytostatikum weder als Monotherapie noch im Rahmen von Kombinationsansätzen bewirken (Nieto et al 2008, Schneider et al 2005). So hat zum Beispiel die heute als Firstline-Therapie eingesetzte Kombination mit Erlotinib allenfalls einen minimalen Vorteil gegenüber einer Monotherapie mit Gemcitabin (Vulfovich and Rocha-Lima 2008). Neueste klinische Studien zeigten, dass FOLFIRINOX, eine aggressive Kombinationstherapie aus verschiedenen Chemotherapeutika (Folinsäure, Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin), die Lebenserwartung im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin um circa vier Monate erhöhen kann (Conroy et al 2011). Wegen des ebenfalls erhöhten Nebenwirkungsprofils und der starken Toxizität besteht weiterhin die große Notwendigkeit, wirksamere Therapeutika insbesondere zur Behandlung metastasierter Karzinome zu etablieren (Shi et al 2012, Conroy et al 2011), v.a. im Sinne deutlich verbesserter palliativer oder sogar kurativer Behandlungsoptionen beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Saif 2008, Saif and Chabot 2011).

Ein Ansatz hierfür kann die Aufklärung von Resistenzmechanismen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli sein. Besonders die Analyse der molekulargenetischen und tumorbiologischen Eigenschaften von Pankreas-karzinomzellen sind hierbei interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Eine molekulare Determinante, die diesbezüglich in den Blickpunkt geraten ist und die eine aussichtsreiche Zielstruktur solcher Strategien sein könnte, stellt der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor E2-related factor 2 (Nrf2) dar.

1.2. Nrf2

Dem Transkriptionsfaktor Nrf2, wird vor allem eine wichtige Funktion in Bezug auf den Schutz der Zelle vor oxidativem und xenobiotischem Stress beigemessen (Kang et al.

2005, Osburn & Kensler 2008). Nrf2 ist wie viele andere Transkriptionsfaktoren ein Leucine Zipper Protein und gehört zu der Cap'n Collar Proteinfamilie. Unter physiologische Bedingungen liegt Nrf2 gebunden an ein Homodimer seines Regulatorproteins Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) im Zytosol vor (Itoh et al 1999). Keap1 rekrutiert dabei Nrf2 an den Rbx1/Cullin3 E3-Ligasekomplex und führt hierdurch zur K43-Polyubiquitinierung von Nrf2 und nachfolgend zu dessen Degradation durch das 26S-Proteasom (Arlt et al 2012, Nguyen et al 2009). Hierdurch wird unter homeostatischen Bedingungen die Menge an Nrf2 Protein niedrig gehalten. Die Aktivierung von Nrf2 kann durch oxidativen oder elektrophilen Stress verursachende Stimuli ausgelöst werden. Dabei kommt es durch Oxidation oder Phosphorylierung zur Abnahme der Bindungsaffinität der Nrf2-Keap1-Cystein-Verbindung, was nach dem Hinge-Latch Modell zur Unterbindung der Nrf2 Polyubiquitinierung führt, wobei Nrf2 jedoch an das Keap1 Dimer gebunden bleibt und somit dessen Absättigung bedingt. De novo synthetisiertes Nrf2 wird nunmehr nicht durch Keap1 komplexiert sondern kann in den Zellkern translozieren (Itoh et al 1999, Tian et al 2012). Dort führt Nrf2 dann als Transkriptionsfaktor zur Aktivierung von spezifischen Zielgenen, die durch ein anti-oxidative-response-element (ARE) im Promotor charakterisiert sind. Hierbei bedarf es der Wechselwirkung von Nrf2 mit anderen Kofaktoren, wie den small Maf Proteinen, sowie auch der Kooperation mit anderen Leu-ZIP Proteinen wie c-Jun.

Die Zielgene von Nrf2 umfassen Enzyme, die den oxidativen und metabolischen Stressbedingungen entgegenwirken. Klassischerweise gehören dazu Phasell-Enzyme wie Glutathione-S-transferase oder NAD(P)H-quinone-oxidoreduktase-1 (hNQO-1) (Arlt et al 2012, Nguyen et al 2009), oder aber ABC Transporterproteine (MRP3, MRP4, or MRP5) (Duong et al 2014). Außerdem kann Nrf2 durch Expression proteasomaler Gene Einfluss auf die Proteasomaktivität nehmen. Als potentielle Nrf2-Zielgene identifiziert wurden bisher aufgrund der Anwesenheit einer oder mehrerer AREs in ihrem Promotor zum Beispiel die Zielgene alpha5 und S5a (Arlt et al 2007, Kwak et al 2003b, Kwak and Kensler 2006, Sebens et al 2011).

1.2.1. Rolle von Nrf2 in der Tumorentstehung

Lange Zeit wurde für Nrf2 ein Tumor inhibierendes Potential postuliert, was v.a. dessen protektiver Wirkung gegenüber Karzinogenen zugeschrieben wurde (Hayes and McMahon 2009, Osburn and Kensler 2008). Auf Grundlage präklinischer Befunde

wurden über viele Jahre Chemopräventionsstrategien unter Verwendung Nrf2-induzierender Substanzen (z.B. Oltipraz, CDDO, Sulforaphan) formuliert, deren klinische Wirksamkeit in Bezug auf eine Tumorprävention jedoch noch nicht zweifelsfrei belegt ist bzw. mehr und mehr sogar in Zweifel gezogen wird. Der Hauptgrund hierfür ist in der Tatsache begründet, dass für Nrf2 inzwischen auch eine protumorigene Wirkung nachgewiesen worden ist. Dies wird nicht zuletzt durch die Erkenntnis untermauert, dass eine Vielzahl maligner Tumoren wie zum Beispiel das Kolon-, Schilddrüsen-, Endometrium-, Lungen-, Ovarial-, Mamma- sowie auch das Pankreaskarzinom eine erhöhte und deregulierte Nrf2 Aktivität aufweisen (Akhdar et al 2009, Arlt et al 2009, DeNicola et al 2011, Hong et al 2010, Jiang et al 2010, Kim et al 2008, Kim et al 2011, Konstantinopoulos et al 2011, Lister et al 2011, Singh et al 2006, Solis et al 2010). Ursache für eine amplifizierte und deregulierte Nrf2-Aktivierung sind zum einen vielfältige loss-of-function-Mutationen (Nioi and Nguyen 2007) des Keap1 Gens sowie epigenetische Veränderungen wie Keap1-Promotor-Hypermethylierungen (Wang et al 2008a) oder die Expression Keap1 spezifischer microRNAs (Eades et al 2011). Zum anderen können auch gain-of-function-Mutationen des Transkriptionsfaktors selbst für eine Nrf2 Amplifikation verantwortlich sein (Hu et al 2012, Kim et al 2010b).

Neben diesen genetischen und epigenetischen Änderungen, kann eine erhöhte Nrf2-Aktivität ebenso durch zelluläre Adaptation an metabolischen Stress hervorgerufen werden. So führt beispielsweise eine Defizienz des Enzyms Fumarat Hydratase-1 zur Succinylierung von Cysteinresten im Keap1 Protein (Adam et al 2011, Kinch et al 2011) mit der Folge, dass Nrf2 nicht mehr genügend gehemmt wird und demnach in erhöhter Konzentration im Zellkern vorliegt. Des Weiteren kann es im Zusammenhang mit der Einwirkung von oxidativem Stress über einen längeren Zeitraum, wie es beispielsweise bei chronischen Entzündungsprozessen der Fall ist, zu einer verstärkten Präsenz von Nrf2 im Zellkern und entsprechend dessen persistierender Aktivität kommen. Dieser Prozess wird während chronischer Entzündungsprozesse wie Pankreatitis und Kolitis beobachtet (Kim et al 2010a, Sebens et al 2011, Singh et al 2010b).

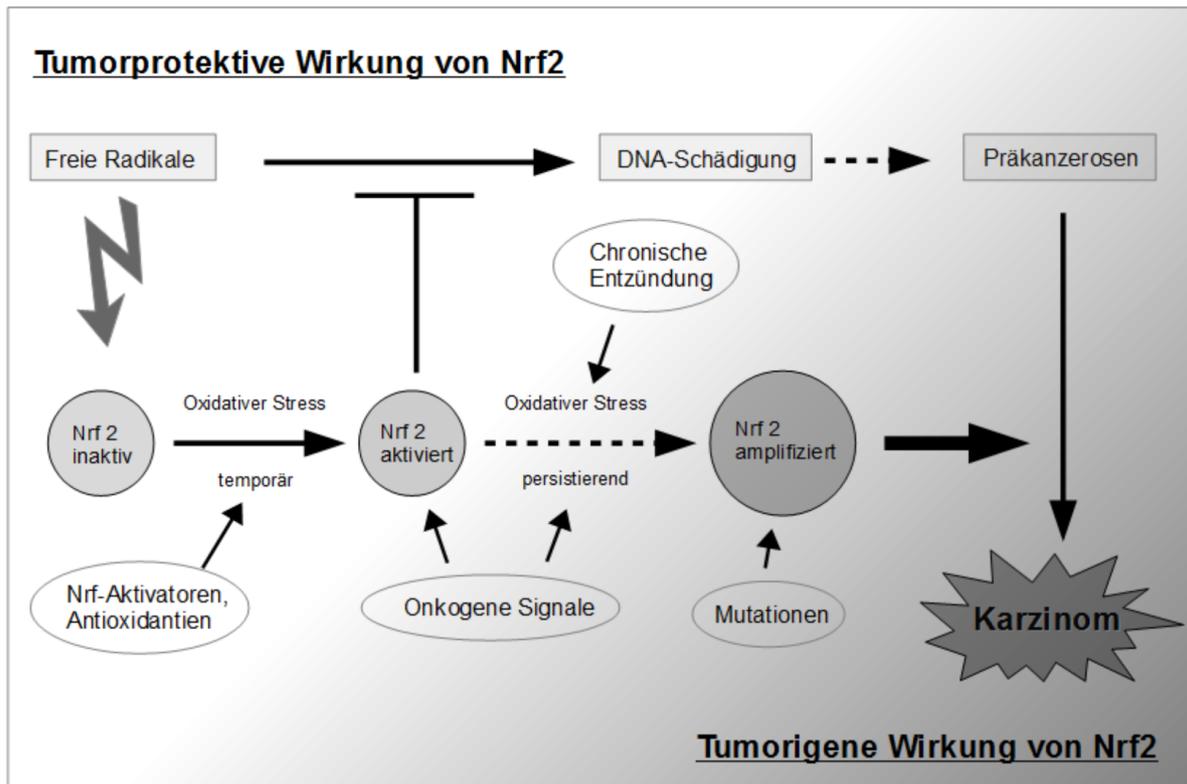


Abbildung 1: Die zwei Seiten von Nrf2 in der Tumorgenese

Unter homöostatischen Bedingungen liegt Nrf2 in inaktivem Zustand vor, indem es an seinen Inhibitor Keap1 gebunden ist (siehe Abschnitt 1.2). Unter Einfluss von oxidativem Stress, wird es aus dieser Inaktivierung befreit und schützt u.a. vor DNA-Schädigung. Unter persistierendem oxidativen Stress kann die andauernde Aktivierung von Nrf2 jedoch auch Zellantworten auslösen, welche die Tumorentstehung fördern. (Aus Geismann et al. 2014)

Diese Erkenntnisse untermauern die Sichtweise, dass Nrf2 ein neben der Eigenschaft des Zellschutzes ein ausgeprägtes tumorigenes Potenzial besitzt (Lau et al 2008, Reuter et al 2010), dessen Manifestation von verschiedenen bislang noch nicht vollständig geklärten Bedingungen abhängig ist. Offensichtlich verhält es sich aber so, dass in gesunden Zellen, die eine stark kontrollierte Nrf2-Aktivität aufweisen, der Einfluss des Transkriptionsfaktors eher einen präventiven Effekt auf die Tumorentstehung hat. Im Gegensatz dazu wirkt die dysregulierte Nrf2-Aktivität in durch Entzündung gestressten oder gar atypisch veränderten Zellen kanzerogen (Lau et al 2008, Wang et al 2008b). Unter der Maßgabe eines besseren Verständnisses der genauen Modalitäten der protumorigenen Wirkung, ist Nrf2 als künftiges Angriffsziel in der Antitumorthherapie, speziell bei der des PDAC, von großem Interesse (Singh et al 2010a, Taguchi et al 2011).

1.2.2. Nrf2 abhängige Resistenzmechanismen

Durch die Induktion von Phase-II-Enzymen und ABC Transportern (MRP-3, -4, -5), welche die Tumorzellen effektiv vor Chemotherapeutika schützen, führt Nrf2 direkt zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika, aber auch zu einem Schutz vor Strahlentherapie. Dieser Sachverhalt konnte in verschiedenen Tumorentitäten (Shim et al 2009, Zhang 2010) einschließlich des PDAC beobachtet werden (DeNicola et al 2011, Hong et al 2010, Jiang et al 2010, Lister et al 2011). Darüber hinaus resultiert aus der gesteigerten Nrf2-Aktivität in Tumorzellen eine verstärkte Expression zytoprotektiver Gene, welche zusätzlich einen grundlegenden Apoptoseschutz vermitteln (Arlt et al 2009, Sebens et al 2011, Singh et al 2010b). Aufgrund dieser Mechanismen ist Nrf2 eine wichtige Determinante der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie (Akhdar et al 2009, Jiang et al 2010, Singh et al 2010a).

Des Weiteren kann Nrf2 auf die Angiogenese in Tumorzellen Einfluss nehmen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt die Rolle von Nrf2 im Zusammenhang mit HIF-1alpha/VEGF Signalwegen und unterstreicht hierbei die Fähigkeit von Nrf2 in vielerlei Hinsicht auf Tumorwachstum und –überleben einzuwirken (Kim et al 2011). Ferner beeinflusst Nrf2 die Befähigung von Zellen zur Autophagie bzw. führt zum Überleben defizienter Tumorzellen. Neuere Befunde belegen darüber hinaus, dass Nrf2 auch an der metabolischen Reprogrammierung von Tumorzellen wesentlich beteiligt ist (Mitsuishi et al. 2012).

Von großer Bedeutung ist gleichfalls die Rolle von Nrf2 als Modulator des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) als wesentlichem Regulativ essentieller Zellprozesse wie Proliferation und Apoptose.

1.2.3. Nrf2 abhängige Kontrolle der Proteasomaktivität

Die Proteasomaktivität spielt eine entscheidende Rolle für die zelluläre Homöostase und das physiologische Zellwachstum. Wichtige Signalwege bedienen sich des turnovers regulatorischer Proteine indem diese nach K48-Polyubiquitinierung an das aus 40-50 unterschiedlichen Proteinen zusammengesetzte 26S-Proteasom (26S-Pr) adressiert werden. Vor der proteolytischen Degradation des Zielproteins in der 20S Untereinheit (core particle, CP) kommt es in der 19S Untereinheit (regulatory particle, RP) des 26S-Proteasoms zunächst zur Deubiquitinierung. Dies dient zum einen der Integration weiterer UPS assoziierter Signalwege zum anderen aber auch dem

schnellen Recycling von monomerem Ubiquitin. Eine inadäquate Ausstattung mit 26S-Proteasomaktivität führt entsprechend sowohl zu einem verminderten turnover regulatorischer Proteine, verbunden mit Zellzyklusarrest oder Apoptose, als auch zur Depletion von Ubiquitin was z.B. Autophagie zur Folge haben kann. Modifikationen dieses 26S-Pr-Aktivitätsniveaus können unter anderem bei der Tumorentstehung beteiligt sein. So ist eine verstärkte Expression proteasomaler Gene und eine daraus resultierende Erhöhung der Proteasomaktivität beispielsweise in einigen Tumoren (Arlt et al 2009, Chen and Madura 2005, Hu et al 2009, Ren et al 2000, Rho et al 2008) zu beobachten, was auf eine Abhängigkeit von Tumorzellen von einer hohen 26S-Pr Aktivität hinweist. Entsprechend sind Tumorzellen nicht jedoch normale Zellen höchst sensitiv gegenüber Proteasominhibitoren, allerdings sind gerade Zellen solider Tumoren in der Lage, die Proteasominhibition rasch zu kompensieren. Hier kommt Nrf2 eine wichtige Rolle zu, da es durch transkriptionelle Induktion von mindestens 30 proteasomaler Gene direkt zur Erhöhung der Proteasomaktivität beiträgt. Diese Eigenschaft spiegelt v.a. den Schutz eukaryoter Zellen vor oxidativer Schädigung von Proteinen wieder, was entsprechend eine ausreichend hohe Kapazität an Proteasomaktivität verlangt. Interessanterweise sind gerade einige proteasomale Proteine oxidationsempfindlich, was mit verminderter Proteasomaktivität verbunden ist (Grune et al. 2013). Als deren Folge, kommt es zur Stagnation des turnovers von Nrf2 als Zielprotein des UPS und entsprechend zur gesteigerten Nrf2 Aktivierung (s.o.). Durch die forcierte Nrf2 abhängige proteasomale Genexpression wird die ausreichende Proteasomaktivität letztlich wiederhergestellt. Einem ähnlichen Prinzip scheint auch die Kompensation Proteasominhibition zu unterliegen. Durch seinen steigernden Einfluss auf die proteasomale Genexpression und entsprechend auf die 26S/20S Proteasomaktivität, kommt Nrf2 somit bezüglich erhöhter Überlebensfähigkeit sowohl in Tumor-, als auch in Entzündungszellen eine entscheidende Bedeutung zu. (Arlt et al 2009, Kapeta et al 2010, Kwak et al 2003a, Kwak et al 2003b, Schaedler et al 2010). Es wurde bereits eine Vielzahl proteasomaler Gene identifiziert, die durch die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 gesteuert werden. Über eine oder multiple anti-oxidant-response elements im Promotor werden beispielsweise die Gene alpha5/PSMA5, PSMB5, beta1/PSMB6 und s5a/PSMD4 durch Nrf2 reguliert (Kwak et al 2002, Kwak and Kensler 2006). Es konnte bereits in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass die erhöhte Nrf2-Aktivität mit einer

gesteigerten Funktion des Proteasoms einhergeht (Arlt et al 2009, Hu et al 2009, Rho et al 2008)

1.2.4. Nrf2 inhibierende Therapiestrategien

Der Tatsache Rechnung tragend, dass Nrf2 in vielfältiger Weise das Wachstum und Überleben von Tumorzellen fördert, was sich v.a. auch in deren Resistenz gegenüber Zytostatika manifestiert, werden inzwischen Strategien einer Nrf2 Inhibition zur maßgeblichen Therapieverbesserung in Betracht gezogen. Neben dem Einsatz von shRNA/siRNA basierten Verfahren, deren Effizienz in der Klinik jedoch nicht gesichert scheinen, bedienen sich andere Strategien der Interferenz verschiedener Signalwege mit Nrf2. Hierzu zählen die Retinoidrezeptoren RAR α /RXR welche eine inhibitorische Wirkung von Retinoiden auf Nrf2 vermitteln können oder der ER β sowie der ERR β welche gleichfalls die Nrf2 Aktivierung unterdrücken können (Wang et al 2007, Zhou et al 2007). Allerdings ist die Wirkung dieser Signalwege zum einen in Tumorzellen nicht immer gewährleistet z.B. durch fehlende ERR β Expression oder aberrante RAR α Funktion, zum anderen können auch Nrf2 steigernde Effekte auftreten, z.B. durch RAR α (Tan et al. 2008).

Als aussichtsreichste Strategien werden daher pharmakologische Inhibitionsprotokolle favorisiert, so dass entsprechend Anstrengungen unternommen werden neue Substanzen mit spezifisch Nrf2 hemmender Wirkung zu etablieren und präklinisch hinsichtlich ihres Einsatzes in der Tumorthherapie zu validieren. Ein vor kurzem beschriebener Wirkstoff stellt das Alkaloid Trigonellin dar, welches Nrf2 hemmende Eigenschaften besitzt (Boettler et al 2011) und für welches in einem anderen klinischen Zusammenhang bereits gute Verträglichkeit beim Menschen dokumentiert wurde (van Dijk et al. 2009).

1.3. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst anhand verschiedener PDAC Zelllinien bzw. der nichtmalignen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE der Status der Nrf2 Aktivität vergleichend untersucht werden.

Unter Heranziehung dieser Zelllinien sollte dann die Nrf2 hemmende Wirkung verschiedener potentieller Nrf2 Inhibitoren getestet werden. Der hierbei als am wirksamsten getestete Inhibitor sollte daraufhin eingehend untersucht werden hinsichtlich seiner Wirkung auf Nrf2 sowie die proteasomale Genexpression und Proteasomaktivität. Anschließend sollte zunächst im Zellkulturmaßstab und dann in

einem subkutanen SCID beige Mausmodell die Wirkung von Trigonellin auf die Nrf2 abhängige Resistenz gegenüber TRAIL und Zytostatika sowohl in vitro als auch in vivo untersucht werden.

Diese Untersuchungen sollten dazu beitragen, Nrf2 als Zielstruktur einer verbesserten Therapiestrategie beim PDAC zu etablieren und zu validieren.

2. Material und Methoden

2.1. Spezielle Materialien

Alle verwendeten Chemikalien genügten mindestens dem Reinheitsgrad pro analysis.

2.1.1. Zellkultur

Humane pankreatische duktale Epithelzellen	M.S. Tsao, Ontario Cancer Center, Toronto
Pankreatische duktale Adenokarzinomzellen MiaPaca2, Panc1	ATCC/LSC
Colo357	H.Kalthoff, UKSH Kiel
Zellkulturmedien, L-Glutamin, Trypsin/EDTA, PBS	BiochromKG,(Berlin)

2.1.2. Proteasomassay

Suc-LLVY-AMC (N-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-7- amido-4-methylcumarin)	Biomol, Taunusstein
Mg132	Biomol, Taunusstein
DMSO	Biomol, Taunusstein
Spektralfluormeter	Infinite F200, Tecan

2.1.3. Westernblotanalyse

Antikörper <ul style="list-style-type: none">Nrf2, Keap1, lamin-A/C, Hsp90	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Antikörper <ul style="list-style-type: none">PARP1	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Chemidoc-XRS gel documentation,	Biorad München
Quantity One Software	
Tubulin Sigma, Sekundär-Antikörper	Santa Cruz, München
Dura Detection Kit	Perbio Sciences, Bonn
PVDF Membran (Immobilon-P)	Millipore, Bedford, USA
Whatmann 3MM, Filterpapier	Walter, Kiel

Puffer A:

Tris	300 mM; 36,34 g/l
Methanol	20% (v/v)
pH	11,0

Puffer B:

Tris	25 mM; 3,03 g/l
Methanol	20 % (v/v)
pH	10,6

Puffer C:

Tris	25 mM; 36,34 g/l
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (v/v)
pH	8,8

TBS (1x):

Tris	50mM; 2,42 g/l
NaCl	150mM; 8,18 g/l
pH	7,6

Ponceau-Färbelösung:

Ponceau-S	1,25 g
Essigsäure	15 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)

ad 500 ml mit Wasser, filtrieren

Blockierungspuffer: PBS 1x

	Magermilchpulver	5%
	Tween 20	0,05%
<u>Waschpuffer (10 x):</u>	Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	10 mM

Graphitkammer

Biometra, Göttingen

2.1.4. RNA-Aufarbeitung und Realtime PCR

RNA-Bestimmung

Nanodrop Photometer, Paqlab

PCR

icycler, BioRad

2.1.5. siRNA Transfektion

HiPerfect

Quiagen, Hilden

siRNA	Nrf2	Nrf1	S5a	alpha5
Nummer	SI03246614	SI00657909	SI03019331	SI100043316

Tabelle 1: siRNA Verzeichnis**2.1.6. Plasmid-Transfektion**

ARE-pathway detection kit

SABioscience/Quiagen

2.1.7. Apoptoseanalyse Caspase 3/7-Assay

Proteinbestimmungs-Assay

BioRad, München

2.1.8. Subkutanes Xenograft Tumormodell in SCID Mäusen

SCID-beige Mäuse, weiblich

Charles River, Sulzfeld

2.1.9. Immunhistochemie

Aceton

Merck, Darmstadt

Serum Albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Anti-rabbit Antikörper, Ser40-Phospho-Nrf2	Epitomics
EnVision Peroxidase	DakoCytomation, Hamburg
AEC Peroxidase	DakoCytomation, Hamburg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt

Die nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel waren von analytischer Reinheit und wurden von der Fa. Merck bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine Zellkultur

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5%CO und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte der Zellkultur erfolgten unter einer Sterilwerkbank. Die benutzten Materialien und Geräte waren autoklaviert, benutzte Lösungen steril filtriert. Zum Ausschluss von Mycoplasmen-Kontaminationen wurde die Zellkultur regelmäßig mit dafür vorgesehenen Produkten überprüft (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) überprüft.

Bei einer Konfluenz von circa 80 % wurde das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Nach einem sich anschließenden Waschschrift mit 10 ml PBS-Lösung, erfolgte die Ablösung der Zellen mit 5ml 1x Trypsin/EDTA in PBS. Nach circa 15 Minuten wurde diese Reaktion durch Zugabe von 5ml Medium gestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 7 Minuten sedimentiert. Nach Absaugen des Überstands, wurde das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.2. Zellkultur HPDE

Die humane pankreatische duktales Epithelzelllinie (HPDE) ist eine adhären wachsende Zelllinie isoliert aus unverändertem humanem Pankreasgewebe. Diese Zelllinie dient als in-vitro-Modell für benigne Pankreasgangzellen, da sie selbst nach Immortalisierung in Morphologie, Genotyp und Wachstumsverhalten von normal kultivierten epithelialen Gangzellen vergleichbar sind. Die Kultivierung der HPDE

Zellen erfolgte in RPMI Medium und Keratinozytenmedium im Verhältnis 1:1. Hinzu kamen 0,5 % (w/v) L-Glutamin, 5 % (w/v) FCS, 5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) und 50 g/ml Rinderhypophysenextrakt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5%CO und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.3. Zellkultur PDAC

Als duktale pankreatische Adenokarzinomzellen wurden die Zelllinien MiaPaca2, Panc1 und Colo357 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640, welches zusätzlich mit 10% FCS, 1% L-Glutamine und 1% Natrium Pyruvat versetzt wurde.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5%CO und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.4. Proteasomassay

Zu Bestimmung der Proteasomaktivität in lebenden Zellen, wurden diese mit dem Proteasomsubstrat Suc-LLVY-AMC behandelt.

Zuvor wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet um sie dann in jeweils 5×10^5 500 μ l Medium zu resuspendieren. Dann wurden sie entweder mit 5 μ g/ml des Proteasom Inhibitors MG132 versetzt oder blieben ohne diese Vorbehandlung. Nach 30 Minuten Inkubation wurden 5 μ l Suc-LLVY-AMC (5 mM gelöst in DMSO) hinzugegeben. Mit Hilfe des Spektralfluorometers wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Umsetzung des Substrates unter Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffes (λ_{ex} 380 nm / λ_{em} 460 nm) AMC. Die spezifische proteasomale Aktivität wurde ermittelt durch die Subtraktion der Fluoreszenz in Ab- und Anwesenheit von MG132 (Proteasom unabhängige Fluoreszenz). Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die errechneten Mittelwerte wurden normiert auf den Proteingehalt.

2.2.5. Westernblotanalyse

Die Analyse der Genexpression auf Proteinebene wurde mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens durchgeführt. Dabei übertrug man die durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen und machte sie anschließend autoradiografisch sichtbar. Dafür wurde die Membran. in der nachfolgenden Immundetektion erst mit dem primären Antikörper gegen das untersuchte Protein und dann mit dem sekundären, Alkalische Phosphatase-gekoppelten Konjugat-Antikörper (Anti-rabbit- bzw. Anti-mouse IgG) behandelt. Anschließend wurden die Membrane mit einem Chemilumineszenz-Substrat inkubiert und die Proteine in der Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.2.5.1. Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen

Um aus den kultivierten Zellen das Gesamtprotein zu extrahieren, wurden diese direkt in 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Das Lysat bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Ein modifizierter Proteinassay nach Bradford (1976) der Firma BioRad wurde zur Konzentrationsbestimmung der Proteinmenge durchgeführt. Auf Mikrotiterplatten wurden jeweils 5 µl der Probe bzw. deren Verdünnung vorgelegt und 250 µl der Reagenzverdünnung (1:5) hinzugefügt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in einem Plattenphotometer (Dynatec) bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen. Die Proteinmenge wurde gegenüber einer Standardreihe (0,5 - 5 µg BSA) ermittelt.

2.2.5.3. Denaturierende Proteinbestimmung nach Laemmli

Um die Kern- oder Zellextrakte auf Qualität und Quantität zu überprüfen oder die Proteine für die Western-Blot-Analyse aufzutrennen, wurde eine 12,5%iger SDS-PAA-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt und nach Denaturierung bei 95 °C für eine Dauer von fünf Minuten, bei 1400 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach dem Auftragen bei 20 mA (Sammelgel) und 25 mA (Trenngel). Analytische Gele wurden nach der Elektrophorese 20 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung fixiert und gefärbt und dann über Nacht in Entfärbelösung entfärbt. Danach wurden die Gele auf Whatmann-3MM-Papier übertragen und vakuumgetrocknet.

2.2.5.4. Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde mittels semidry-Verfahren unter Benutzung einer Graphit-Kammer (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das Sammelgel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung entfernt, das Trenngel ausgemessen und 10-15 min in Puffer C geschwenkt. Währenddessen schnitt man eine PVDF-Transfer-Membran und vier Stücke Whatman-3MM-Filterpapier auf das Gelmaß zu. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet, mit Wasser gewaschen und in Puffer B für 10-15 min inkubiert. Die sich daran anschließende Schichtung des Blots wurde nach stets gleicher Anordnung durchgeführt. Zuerst legte man ein Stück Whatmann-Papier in Puffer A und brachte es dann auf die Anodenplatte. Es folgte ein Stück in Puffer B

getauchtes Stück Whatmann-Papier, die PVDF-Membran, das PAA-Gel und abschließend zwei Stück in Puffer C getränkte Stück Whatmann-Papier. Die Luftblasen wurden vorsichtig entfernt und die Kathodenplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei $1,25 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 30 min.

2.2.5.5. Färbung der Membran

Um den Transfer zu überprüfen wurde die PVDF-Membran kurz mit Ponceau-S gefärbt. Man entfernte die Gelreste und spülte anschließend mit Wasser und TBS (0,05% Tween), bis eine vollständige Entfärbung erreicht war.

2.2.5.6. Immundetektion

Zur Immundetektion wurde die PVDF-Membran für 3-5 h mit Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend wurden die primären Antikörper (im Verhältnis 1:1000) über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer inkubiert. Abschließend wurde die Membran 1 h, 10 min und 2x5 min mit dem Blockierungspuffer gewaschen und mit dem sekundären Konjugat-Antikörper (1:1000-Verdünnung) in Blockierungspuffer 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin schlossen sich die Waschschriffe an. Zuerst wurde 10 min und 2x5 min mit dem Blockierungspuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Dann reinigte man die Membran zweimal 5 min mit 1x Waschpuffer. Um nun die Banden sichtbar zu machen, folgte eine Inkubation mit dem Dura detection kit für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Datenerfassung wurde schließlich mit dem Chemidoc-XRS gel documentation system unter Verwendung der QuantityOne software durchgeführt.

2.2.6. Realtime PCR

2.2.6.1. Isolation der RNA

Zur Isolation von mRNA wurden die Zellen wie zuvor beschrieben ausgesät und in Kultur gehalten. Je nach Versuchsansatz erfolgte dann die Weiterbehandlung der Zellen. Unter dem Abzug wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Isolation der mRNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Total RNA Kits nach den Angaben des Herstellers.

Zur Bestimmung ihrer Konzentration wurde die RNA photometrisch bei 260/280 nm gemessen. Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80°C .

2.2.6.2. Herstellung von cDNA

Um die isolierte mRNA zu quantifizieren, ist es notwendig daraus cDNA herzustellen. Hierfür wurden 1,5 µg der RNA in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 11,4 µl aufgefüllt.

Im nächsten Schritt wurden zur RNA 1 µg Oligo-dT-Primer gegeben, kurz gemischt und anzentrifugiert, bevor die Proben für 5 min bei 70°C im Thermoblock erwärmt wurden. Nach der Abkühlung der Proben auf Eis wurden 11,6 µl Mastermix zugegeben. Der Ansatz wurde erneut gemischt und für 90 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Mastermix je Probe:

- 5µl M-MLV-FirstStrandBuffer
- 1,25 µl dATP (10 mM)
- 1,25 µl dGTP (10 mM)
- 1,25 µl dTTP (10 mM)
- 1,25 µl dCTP (10 mM)
- 0,6 µl RNAsin RNase Inhibitor (40U/l)
- 1,0 µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/l)

2.2.6.3. Echt-Zeit Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)

Für die Realtime PCR wurden 5 µl der hergestellten cDNA zunächst mit 20 µl Aqua dest. verdünnt. Dann überführte man 10 µl dieser verdünnten Proben in Doppelbestimmungen in eine 96-well-Platte. Zu der cDNA wurden 20 µl des Mastermixes gegeben und die fertige Platte mit einer selbstklebenden PCR Folie verschlossen. Es folgte dann die PCR im iCycler MyiQ Single Color Realtime.PCR Detection System (BioRad) unter Verwendung der MyiQ-Software.

Des Weiteren wurde in den untersuchten Proben eines der Housekeeping Gene -Aktin oder TBP detektiert und zur Normierung der Ergebnisse genutzt.

Mastermix je Probe:

- 15 µl SYBR Green
- 0,15 µl Vorwärtsprimer
- 0,15 µl Rückwärtsprimer
- 4,7 µl Aqua dest.

2.2.7. siRNA Transfektion

Um die Expression der Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2 gezielt auf molekulargenetischer Ebene zu unterbinden, wurden die PDAC- und H6c7-Zelllinien mit siRNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 12-well-Platten. Hierzu wurde ein Transfektionsansatz bestehend aus 6µl HiperFect Reagenz (Quiagen, Hilden, Deutschland) mit 150ng/well der jeweiligen Negativkontrolle siRNA (Qiagen), Nrf2 siRNA (SI03246614, Qiagen), Nrf1 siRNA (SI00657909, Qiagen) S5a (SI03019331, Qiagen) oder α -5 siRNA (SI100043316, Qiagen) und jeweils 300µl OPTI-MEM angesetzt. Nach zehn Minuten Inkubationszeit, wurde der Ansatz zum 700µl frisch vorgelegten zellspezifischen Medium pro well tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen je nach Versuchsansatz weiter behandelt. Bis dahin wurden diese unter Zellkulturbedingungen kultiviert.

2.2.8. Plasmid DNA-Transfektion

Die Transfektion mit Promega Dual Luciferase Assay Kitys erfolgte in 12-well-Platten. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 1×10^5 (zehn hoch 5) Zellen pro well ausgesät. Der Transfektionsansatz bestehend aus 0,5 µg des spezifischen Firefly Plasmids sowie 0,1 µg des Renilla Referenzplasmids wurde für acht Stunden auf die zuvor mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben. Danach erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Nach einer Ruhezeit von circa 14 Stunden wurden die Zellen weiter behandelt.

2.2.8.1. Luciferaseassay

Nach Beendigung der jeweiligen Versuchsreihe wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1ml PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Passive Lysis Puffer versehen. Danach konnten die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. Nachdem man die Zellsuspension 30 s bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert hat, konnte man 20µl des Überstandes in eine 96-well-Platte pipettieren. Hierbei wurden stets Doppelwerte einer jeden Probe verwendet. Danach wurden in jedes well 25µl der LARII-Lösung gegeben und im direkten Anschluss die Firefly Luciferase Aktivität über die Dauer von 20 s gemessen. In einem zweiten Schritt wurden zusätzlich 25µl Stop&Glo-Substrat auf die Proben gegeben und ebenfalls die Luciferase Aktivität über 20s gemessen. Die Messwerte der Firefly-Luciferase wurden auf die der Renilla-Luciferase normiert.

2.2.9. Caspase Assay

Zur Durchführung des Caspaseassays (Promega) wurden der Mediumüberstand der Zellen in 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Behandlung mit Trypsin EDTA, konnten die Zellen abgelöst und dem zugehörigen Überstand hinzugefügt werden. Im Anschluss daran wurden die Zellen mittels Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) pelletiert und der verbleibende Überstand abgesaugt. Nach der Spülung mit PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 500µl PBS aufgenommen. Nun wurden die Zellen wie folgt unterteilt:

a) Zur Messung der Caspaseaktivität wurden 2 mal 25 µl der Zellsuspension in eine 96 well Platte pipettiert und mit 25 µl des Caspasereagenzes (Promega) versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation konnten die Messung im Luminometer erfolgen.

b) Aus dem verbliebenen Teil der Zellsuspension wurde nach der Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße Gesamtzelllysate gewonnen. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit dem Proteinassay DC der Firma Biorad nach Anleitung des Herstellers. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Photometers Opsys MR (Dynec Technologies) sowie der Revelation QuickLink Software.

2.2.10. Subkutanes Xenograft Tumormodell in SCID Mäusen

Diese tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit behördlicher Genehmigung durch das Land Schleswig-Holstein (Az: V312-72241.122-4).

Colo357 und Panc1 Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 pro 200 µl 0.9% NaCl-Lösung in die zuvor rasierten Flanken der SCID Mäuse (kommerziell bezogen von Charles River, Sulzfeld) injiziert. Es wurden weibliche Mäuse behandelt, die acht Wochen alt waren und ein Gewicht von circa 20g erreicht hatten. Sobald die Tumoren eine Größe von $5 \times 5 \text{mm}^2$ und mehr erreicht hatten, wurden die Tiere in drei Gruppen aufgeteilt. Jede der Gruppen wurde einem festgelegtes Behandlungsschema mit intraperitonealen Injektionen von 200 µl unterzogen.

Bezeichnung	Therapie	Behandlungstage
Gruppe I	0.9% NaCl	Tag 1-5 & 9-13
Gruppe II	10 mg/kg Körpergewicht Etoposid in 0,9%NaCl	Tag 2-5 & 10-13
Gruppe III	0,02 mg/kg Körpergewicht Trigonellin + 0,2 mg/kg Körpergewicht Etoposid in 0,9% NaCl	Tag 1-5 & 9-13 Tag 2-5 & 9-13

Tabelle 2: Therapieschema SCID Mäuse

Die Tumorgroße wurde jeweils vor, während und nach der Behandlung in wöchentlichem Abstand gemessen. 21 Tage nach Beginn der Behandlung wurden die Mäuse getötet und die Tumoren exzidiert.

Nach dem Vermessen und Wiegen wurden diese dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

2.2.11. Immunhistochemie

Die sechs µm großen Cryostat Ausschnitte wurden auf Glasobjektträger aufgetragen bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet, danach für zehn Minuten in Aceton fixiert und anschließend nochmals bei Raumtemperatur zehn Minuten getrocknet. Dann wurden die Präparate in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Präparate für 20 Minuten mit 4% BSA (bovine serum albumine) behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Ser40-Phospho-Nrf2 (Epitomics) im Verhältnis 1:200 in 1% BSA/PBS. Nach der Inkubation mit diesem über Nacht bei 4°C wurden die Proben erneut in PBS gewaschen und dann 30 Minuten mit EnVision Peroxidase Konjugaten behandelt. Im Anschluss daran folgten drei Waschschrte in PBS. Die Peroxidase Substrat Reaktion wurde daraufhin mit dem AEC Peroxidase Substrat Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden die Proben in Wasser zusammen mit 50% Hämalaun gewaschen und abschließend Glycerol-Gelatine konserviert. Das gleiche Protokoll wurde für die Negativkontrollen durchgeführt. Die Behandlung mit dem Primärantikörper wurde entweder ausgelassen oder mit einem Kontrollantikörper durchgeführt. Um die Nrf2-Expression auszuwerten,

wurde die prozentuale Verteilung (0=0%, 1=1-10%, 2=10-50%, 3=50-90%, 4=>90%) und Intensität der Ausprägung (0=keine, 1=gering, 2=mittel, 3=hoch) in jeder Probe gezählt. Durch Multiplikation von Intensität und Verteilung wurde dann ein Wert für den Ausprägungsgrad ermittelt.

2.2.12. 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

3.1. Basale und induzierbare Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen

Mit Hilfe der Westernblotanalyse wurde zunächst untersucht, in wie fern sich die basale Nrf2-Aktivität in den hier verglichenen Zellreihen unterscheidet oder sich durch den Induktor tBHQ beeinflussen lässt. Als Kriterium wurde die Konzentration von Nrf2 im Zellkern herangezogen, Ausdruck seiner Aktivierung (siehe Abschnitt 1.2).

In den PDAC Zelllinien Panc1 und Colo 357 Zellen konnte bereits basal eine deutlich größere nukleäre Nrf2 Proteinmenge nachgewiesen werden als in der PDAC Zelllinie MiaPaca2 und der präneoplastischen dukatelen Pankreas-epithelzelllinie H6c7 (Abbildung 2). In Gegenwart von 50 μ M des Induktors tBHQ über 8h war die Menge an Nrf2 in den Kernextrakten aller vier Zelllinien erhöht, wobei die deutlichsten Effekte durch tBHQ in Miapaca2 und H6c7Zellen sichtbar waren (Abbildung 2).

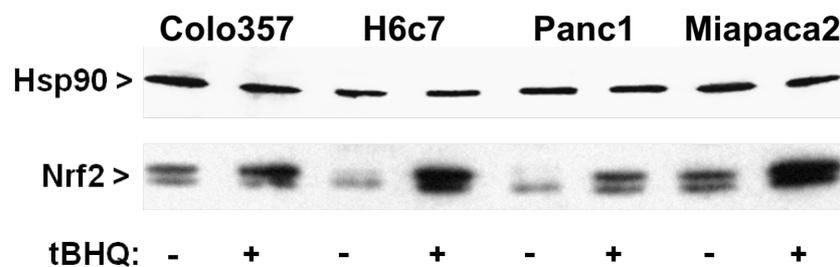


Abbildung 2: Nukleäre Nrf2 Expression in PDAC und H6C7 Zellen

Die nukleäre Proteinkonzentration von Nrf2 kann durch den Nrf2-Induktor tBHQ in den PDAC Zellreihen und den H6c7 Zellen induziert werden. Die zunächst unbehandelten PDAC Zelllinien Colo 357, MiaPaca2 und Panc1 und die Zelllinie H6c7 wurden auf ihre basale Nrf2-Konzentration im Zellkern untersucht und mit den Proteinmengen nach 8-stündiger tBHQ-Inkubation verglichen. Als Ladekontrolle diente Hsp 90. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen.

3.1.1. Das Nrf2 Aktivitätsniveau korreliert mit der nukleären Nrf2 Konzentration

Des Weiteren konnte mittels ARE-Luziferaseassay gezeigt werden, dass die Erhöhung der nukleären Konzentration von Nrf2 mit einer Steigerung dessen transkriptioneller Aktivität einhergeht.

Korrespondierend zur bereits basal erhöhten nukleären Nrf2 Konzentration war in Colo357 und Panc1 Zellen anhand der deutlich höheren ARE-Luziferaseaktivität auch eine stärkere transkriptionelle Nrf2-Aktivität festzustellen als in MiaPaca2 und H6c7 Zellen, die sich durch Inkubation mit 50 μ M tBHQ weiter steigern ließ (Abbildung 3).

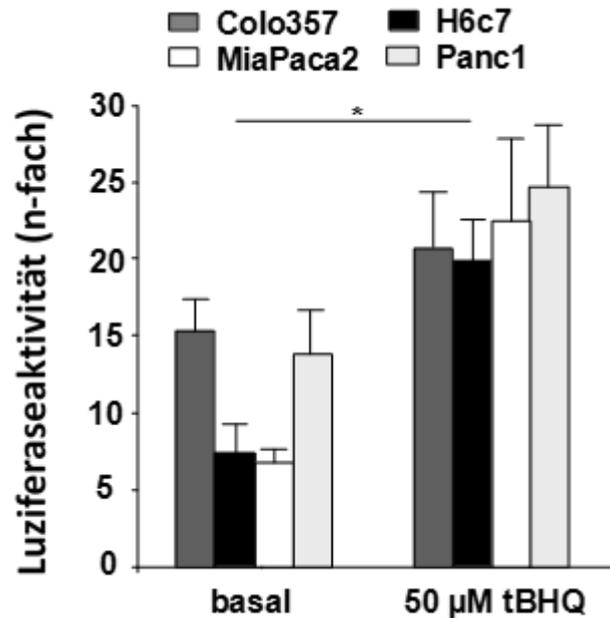


Abbildung 3: Die spezifische Nrf2-Luciferaseaktivität in PDAC und H6C7 Zellen

Die oben genannten Zellreihen wurden mit ARE-gesteuerter Firefly Luciferase (ff) Lösung kombiniert mit einer Renilla Luciferase (rl) exprimierenden Lösung transfiziert oder mit einer Negativkontrolle versehen. Danach erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Stimulation mit tBHQ für acht Stunden. So konnte die basale Luziferaseaktivität der Zellen mit der durch tBHQ beeinflussten Aktivität verglichen werden. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und die relativen Luziferase-Einheiten (RLU) im Verhältnis ff/rl berechnet. Die gewonnenen Daten wurden angegeben in n-fache Aktivität von ARE-gesteuerter RLU normiert auf den Leervektor RLU. Es wurden Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten gezeigt; $p < 0.05$.

In MiaPaca und H6c7 Zellen war die basale ARE-Luziferaseaktivität niedriger, gleichwohl jedoch durch tBHQ Gabe stark induzierbar (Abbildung 3).

3.2. Testung von atRA, DY131, Luteolin und Trigonellin in Colo357 und Panc1 Zellen auf die Fähigkeit einer Nrf2 Inhibition

Anhand der durch ihre erhöhte Nrf2-Basalaktivität charakterisierten Colo357 und Panc1 Zellen wurden die potentiellen Nrf2 Inhibitoren in einer Dosisbreite von drei 10-er Potenzen eingesetzt, die sich an den in der Erstbeschreibung genannten Konzentrationen orientierte. Für atRA wurden entsprechend ein Dosisbereich zwischen 0,1 und 100 µM (Wang et al. 2007), für DY131 zwischen 0,2 und 200 µM (Yu & Forman 2005), für Luteolin zwischen 0.05 und 50 µM (Tang et al. 2011) und für Trigonellin zwischen 0,01 µM - 10µM (Boettler et al. 2011) behandelt und anschließend die Nrf2 Aktivität im ARE-Luziferase Assay überprüft (Abbildung 4).

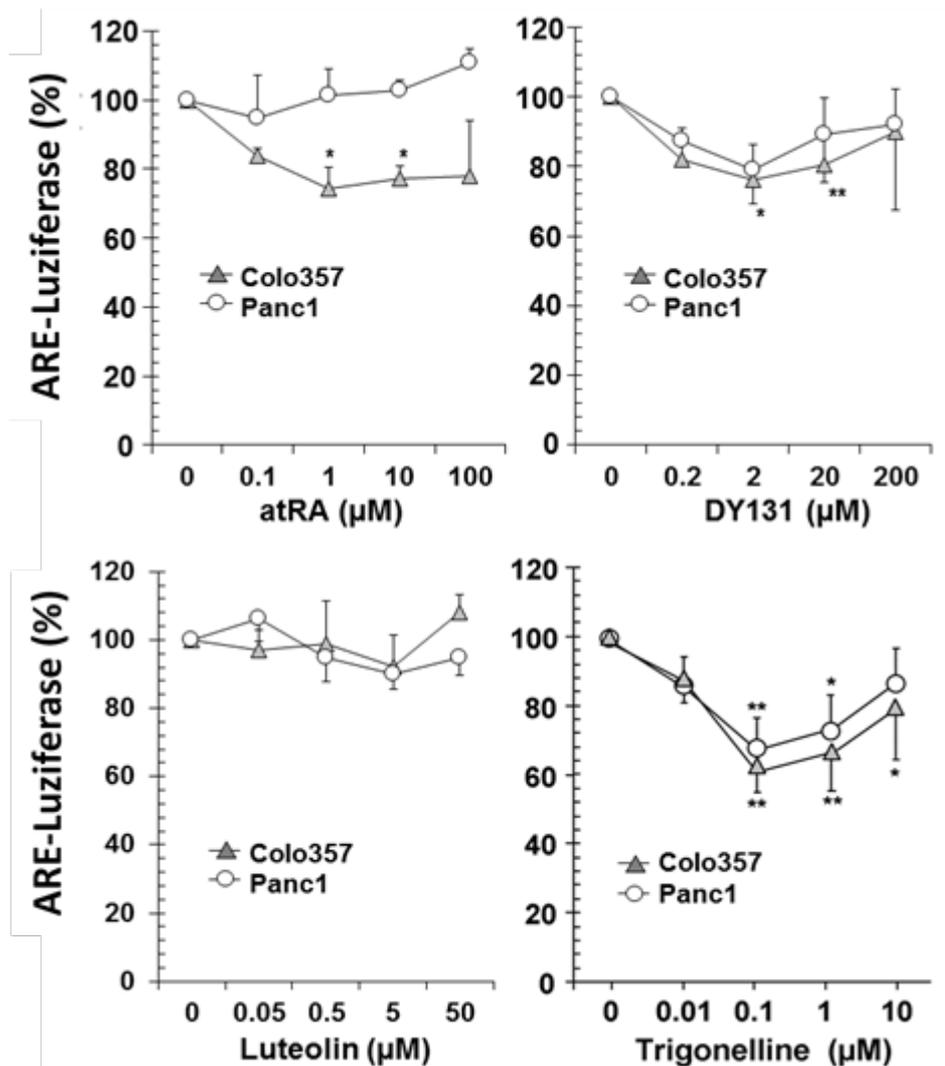


Abbildung 4: Der Effekt von atRA, DY131, Luteolin und Trigonellin auf die basale Nrf2-Aktivität in Colo357 und Panc1 Zellen

Die oben genannten Zelllinien wurden mit ARE-gesteuertem Firefly Luciferase (ff) Reporterplasmid bzw. einem ff-Plasmid ohne ARE (Leervektor) zusammen mit einem durch den konstitutiven TK-Promotor gesteuerten Renilla Luciferase (rl) Referenzplasmid transfiziert. Anschließend wurde Trigonellin in dem angegebenen Konzentrationsbereich zugesetzt, danach erfolgte entweder nach 1h oder nach 16h die Stimulation mit 50 µM tBHQ für 8h. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und die relativen Luziferase-Einheiten (RLU) wurden im Verhältnis ff/rl berechnet. Die Daten drücken das n-fache der Aktivität von ARE-gesteuerter RLU normiert auf den Leervektor RLU aus. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von sechs unabhängigen Experimenten, *p>0.05, **p>0.01.

Hierbei ließ sich zeigen, dass es lediglich durch Trigonellin in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen und hochsignifikanten Hemmung der transkriptionellen Nrf2 Aktivität kam. Besonders deutlich wurde dieser Effekt bei einer Trigonellin-Dosis von 0,1 und 1 µM, wobei die Reduktion der ARE-Luziferase Aktivität zwischen 32 und 40% betrug (Abbildung 4). In höherer Konzentration war hingegen der hemmende Effekt von

Trigonellin deutlich niedriger, was in der Erstbeschreibung (Boettler et al. 2011) ebenfalls beobachtet wurde.

Im Gegensatz zu Trigonellin, waren weder atRA noch DY131 noch Luteolin zu einer vergleichbaren Nrf2 Inhibition in der Lage (Abbildung 4). Luteolin war vollständig ohne Einfluss auf die Nrf2 Aktivität in beiden PDAC Zelllinien. Der RAR Agonist atRA zeigte in einer Konzentration von 0,1 oder 1 μ M lediglich in Colo357 Zellen eine moderate Hemmung der ARE-Luziferase Aktivität zwischen 15 und 20%, die bei höherer Konzentration nicht weiter zunahm. Der ERBb Agonist DY131 war immerhin in der Lage in beiden Zelllinien Nrf2 zu inhibieren, allerdings in einem Dosisbereich zwischen 0,2 und 2 μ M nur um 10-20 %.

Somit war Trigonellin hinsichtlich seiner Nrf2-inhibierenden Potenz und Effektivität den anderen drei getesteten Substanzen eindeutig überlegen und wurde somit einer weiteren Charakterisierung hinsichtlich seines Wirkmechanismus und seiner Eignung als Chemosensitizer untersucht.

3.3. Der Effekt von Trigonellin auf die Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen

3.3.1. Einfluss von Trigonellin auf die tBHQ induzierte ARE-Luziferase.

Die Hemmung der Nrf2 Aktivität durch Trigonellin wurde nachfolgend zusätzlich auch in MiaPaca2 und H6c7 Zellen untersucht, in denen, wie auch in Colo357 und Panc1 Zellen, Nrf2 durch anschließende Gabe von tBHQ aktiviert wurde.

Hier zeigte sich der Zeitpunkt der Zugabe von Trigonellin eine Stunde vor tBHQ-Gabe effektiver als 16 Stunden vor der Behandlung mit dem Nrf2 Induktor. Der am meisten signifikante inhibitorische Effekt auf die ARE-Luziferase-Aktivität unter dieser Kombinationsbehandlung konnte mit einem Abfall von 54 % bei den MiaPaca2 Zellen zum Ausdruck gebracht werden. Beobachtet wurde dies bei einer Trigonellin Konzentration von 0,1 μ M im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 5).

Dieser Nrf2 hemmende Effekt war bei den anderen beobachteten Zellreihen mit einem Abfall der Luziferase-Aktivität zwischen 35 und 50 Prozent ebenfalls deutlich ausgeprägt. Es zeigte sich außerdem, dass eine Konzentrationserhöhung auf 1 μ M und 10 μ M Trigonellin eine schwächere oder sogar keine Hemmung der tBHQ induzierten Luziferaseaktivität zur Folge hatte.

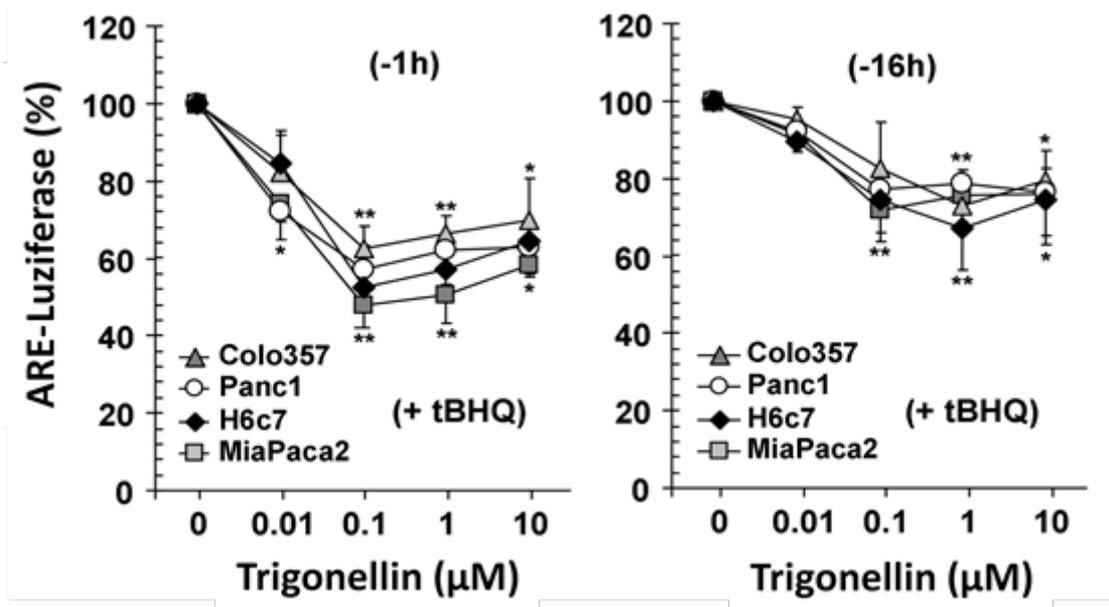


Abbildung 5: Der Effekt von Trigonellin auf die induzierte Nrf2-Aktivität in PDAC und H6c7 Zellen

Die oben genannten Zelllinien wurden mit ARE-gesteuertem Firefly Luciferase (ff) Reporterplasmid bzw. einem ff-Plasmid ohne ARE (Leervektor) zusammen mit einem durch den konstitutiven TK-Promotor gesteuerten Renilla Luciferase (rl) Referenzplasmid transfiziert. Anschließend wurde Trigonellin in dem angegebenen Konzentrationsbereich zugesetzt, danach erfolgte entweder nach 1h oder nach 16h die Stimulation mit 50 µM tBHQ für 8h. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und die relativen Luziferase-Einheiten (RLU) wurden im Verhältnis ff/rl berechnet. Die Daten drücken das n-fache der Aktivität von ARE-gesteuerter RLU normiert auf den Leervektor RLU aus. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD von sechs unabhängigen Experimenten, *p>0.05, **p>0.01.

3.3.2. Trigonellin-Effekte auf die nukleäre Lokalisation von Nrf2

Zur weiteren Verifizierung der inhibitorischen Wirkung von Trigonellin auf die Nrf2-Aktivität, wurde die intrazelluläre Verteilung von Nrf2 mittels Westernblot genauer untersucht. In Panc1 und Colo357 Zellen konnte nach achtstündiger Inkubation mit Trigonellin eine deutliche Verringerung der nukleären Proteinmenge von Nrf2 nachgewiesen werden, was auf Gesamtproteinebene nicht festzustellen war. (Abbildung 6 A).

Ein hemmender Effekt von Trigonellin auf die nukleäre Konzentration von Nrf2 konnte ebenfalls in MiaPaca und H6C7 Zellen gezeigt werden, wenn diese mit tBHQ behandelt wurde. Während tBHQ allein zu einer deutlichen Steigerung der Nrf2 Proteinkonzentration im Zellkern führte, war dieser Effekt in Anwesenheit von Trigonellin deutlich reduziert (Abbildung 6B). Auch hier waren keine Auswirkungen auf den Nrf2 Gesamtproteingehalt festzustellen. Die Tatsache, dass unter Einfluss von

Trigonellin zwar die nukleäre Konzentration von Nrf2, nicht aber dessen Konzentration in den Gesamtzelllysaten beeinflusst wird, führt zu der Annahme, dass Trigonellin Einfluss hat auf die Akkumulation von Nrf2 in den Zellkern.

Dies konnte auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (Abbildung I im Anhang).

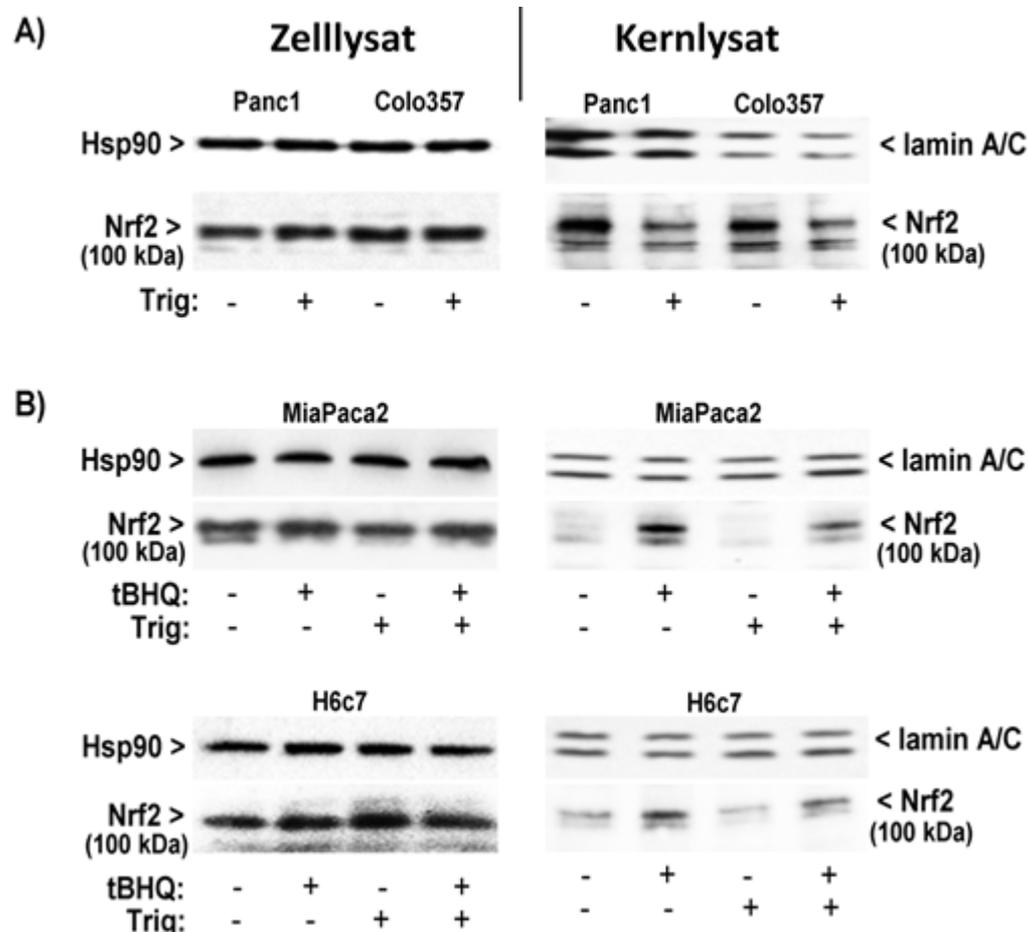


Abbildung 6: Westernblotanalyse der Nrf2 Expression im Zusammenhang mit Trigonellin und tBHQ in PDAC und H6c7 Zellen

Panc1 und Colo357 Zellen wurden mit 0.5 μ M Trigonellin für 24 Stunden (Abbildung A). H6c7 und MiaPaca2 Zellen wurden mit 50 μ M tBHQ für die Dauer von acht Stunden. Zum Teil erfolgte eine Präinkubation mit Trigonellin, das dann eine Stunde vor tBHQ hinzugegeben wurde. Dann wurden die Gesamtzelllysate oder Kernextrakte aufbereitet und Westernblotanalysen zur Erfassung von Nrf2 und Hsp90 beziehungsweise lamin-A/C durchgeführt. Es wurden repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die verminderte nukleäre Konzentration von Nrf2 unter Einfluss von Trigonellin auf dessen gesteigerten Export unter Mitwirkung von Keap1 zurückzuführen ist, wurden die 4 Zelllinien mit Leptomycin B (LMB) behandelt. Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor des nukleären Crm1 Exportproteins, durch den auch

Nrf2 zusammen mit Keap1 aus dem Kern in das Zytoplasma zurücktransportiert wird (Kannan and Jaiswal 2006). Es zeigte sich, dass nach Vorbehandlung mit LMB und anschließender Stimulation mit tBHQ der hemmende Effekt von Trigonellin auf den tBHQ abhängigen Anstieg der nukleären Nrf2 Proteinkonzentration nach wie vor nachweisbar war. So war auch in Gegenwart von LMB der nukleäre Gehalt von Nrf2 unter Trigonellin Behandlung vermindert, wohingegen die Proteinmenge von Keap1 durch Trigonellin nicht beeinflusst wurde (Abbildung 7 unten).

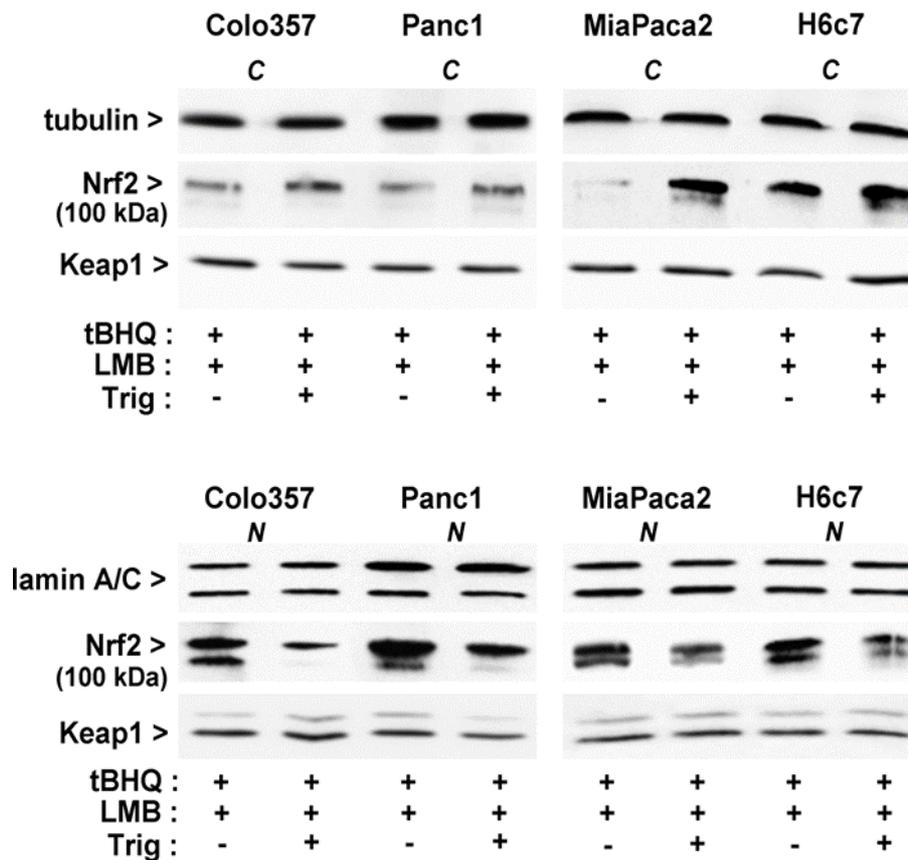


Abbildung 7: Westernblotanalyse der Trigonellin Effekte auf die zytoplasmatische und nukleäre Nrf2- und Keap1 Verteilung in Gegenwart von LMB

Panc1, Colo 357, MiaPaca und H6c7 Zellen wurden für jeweils acht Stunden mit 50 μ M tBHQ und 20 ng/ml des crm1-Inhibitors Leptomycin-B (LMB) inkubiert. Dies erfolgte entweder zusammen, mit Präinkubation mit Trigonellin (0.5 μ M) oder ohne diese. Danach wurden Zelllysate oder Kernextrakte aufbereitet und mittels Westernblotanalyse die Proteinmengen von Nrf2, Keap1 und Tubulin bzw. Lamin-A/C untersucht. Repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen wurden gezeigt.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die verminderte nukleäre Lokalisation von Nrf2 unter Trigonellin Behandlung nicht auf dessen gesteigertem Export aus dem Zellkern, sondern auf dessen verringertem Import in den Zellkern zurückzuführen ist (Kannan and Jaiswal 2006). Dies zeigte sich auch in der erhöhten Konzentration von Nrf2 im Zytoplasma aller untersuchten Zelllinien unter Trigonellin Behandlung, ein Effekt, der wiederum nicht durch LMB beeinflusst wurde (Abbildung 7, oben).

Um zu überprüfen, ob sich der anhaltende inhibitorische Effekt von Trigonellin in Gegenwart von LMB auch auf transkriptioneller Ebene darstellt, wurden ARE-Luziferaseassays durchgeführt (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass auch in Gegenwart von LMB die Hemmung der transkriptionellen Nrf2 Aktivität durch Trigonellin sowohl basal (Colo357 und Panc1 Zellen) als auch unter tBHQ Stimulation (alle vier Zelllinien) fortbestand.

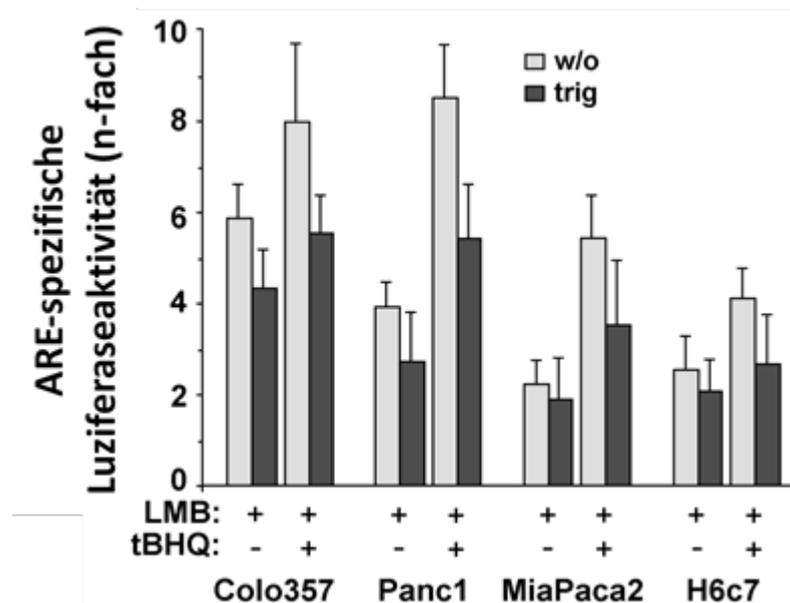


Abbildung 8: Effekte von Trigonellin in Bezug auf die Luziferase-Aktivität von Nrf2 in Gegenwart von LMB

Es wurden Panc1 und Colo 357 Zellen entweder mit einem Leervektor oder mit dem ARE-Rezeptorgen transfiziert und in Gegenwart von 20 ng/ml LMB für acht Stunden mit 50 μ M tBHQ behandelt. Dies erfolgte entweder nach einer Präinkubation mit 0.5 μ M Trigonellin oder ohne diese. Danach wurde die Luziferaseaktivität ermittelt und die relativen Luciferaseeinheiten (RLU) wurden mit Hilfe der ff/rl Verhältnisses berechnet. Die Daten wurden im Verhältnis der spezifischen ARE-gesteuerten RLU zum Leervektor der RLU angegeben. Es wurden Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen gezeigt, * $p < 0.05$.

3.4. Der Effekt von Trigonellin auf die Proteasomaktivität in PDAC und H6c7 Zellen

Auf Grundlage des nachweislich hemmenden Effekts von Trigonellin auf die Nrf2 Aktivierung sowie der Tatsache, dass Nrf2 maßgeblich an der Regulation der proteasomalen Genexpression beteiligt ist (siehe Abschnitt 1.2.3) wurde weiterhin untersucht, ob Trigonellin die Proteasomaktivität beeinflusst. Hierfür wurden die PDAC und H6c7-Zelllinien mit Hilfe eines fluorometrischen Proteasomassays mit Suc-LLVY-AMC als Substrat untersucht. Um diesbezüglich die Abhängigkeit von Nrf2 darzustellen, wurde der Einfluss von Trigonellin in zusätzlicher Anwesenheit von tBHQ untersucht. In Abbildung 9 ist dargestellt, dass die Proteasomaktivität in allen vier Zellreihen durch tBHQ aktiviert wird.

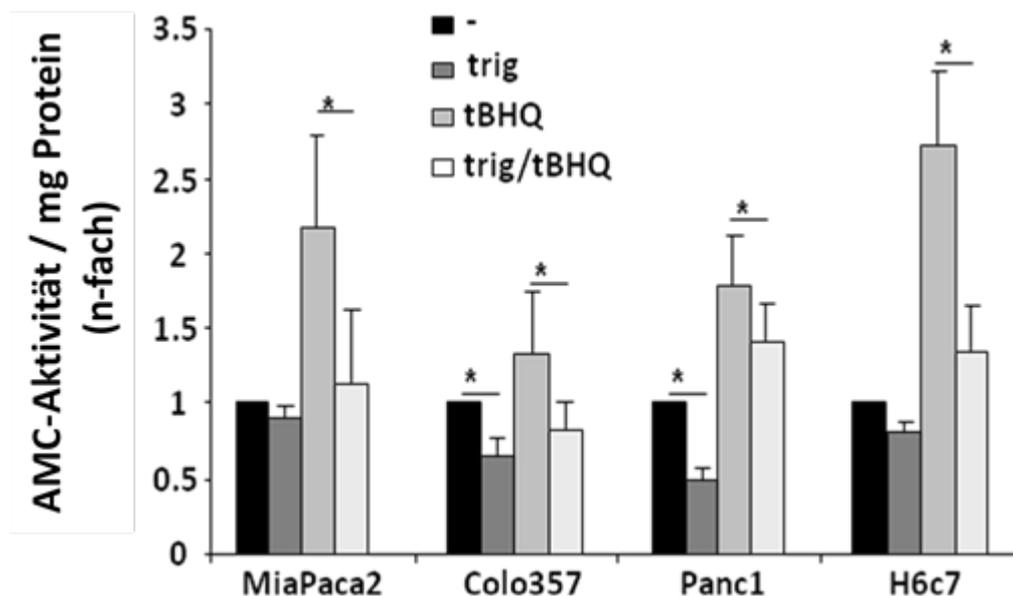


Abbildung 9: Effekte von Trigonellin und tBHQ auf die Proteasomaktivität in PDAC und H6c7 Zellen

Die oben genannten Zelllinien wurden mit 50 μM tBHQ für 24 Stunden inkubiert oder blieben ohne diese Behandlung. Um den Effekt von Trigonellin auf die Proteasomaktivität zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen mit dieser Substanz alleine oder eine Stunde vor der Hinzugabe von tBHQ behandelt. Dies erfolgte mit 0.01 μM Trigonellin. Somit blieb ein Teil der Zellen unbehandelt und konnte für Referenzwerte genutzt werden. Dann wurde ein Suc-LLVY-AMC Proteasomassay durchgeführt. Die Fluoreszierenden Elemente wurden auf den parallel ermittelten Proteinwert normiert. Die Daten sind als n-fache AMC-Aktivität in Bezug auf den Proteingehalt in Milligramm angegeben und es wurden Mittelwerte \pm Abweichung der Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten gezeigt; * $p < 0.05$.

In Gegenwart von Trigonellin war sowohl der induzierende Effekt von tBHQ vermindert (H6c7 um 58%, MiaPaca2 um 64%, Colo357 um 72% und Panc1 um 36%) als auch die basale Proteasomaktivität in Colo357 und Panc1 Zellen (Abnahme um 39% und 57%). Um die Abhängigkeit von Nrf2 in Zusammenhang mit dem blockierenden Effekt von Trigonellin auf die Proteasomaktivität weiter zu verifizieren, wurden alle Zelllinien mit Kontroll- und Nrf2-siRNA transfiziert, anschließend mit tBHQ in Ab- oder Anwesenheit von Trigonellin behandelt und daraufhin der Bestimmung der Proteasomaktivität zugeführt (Abbildung 10).

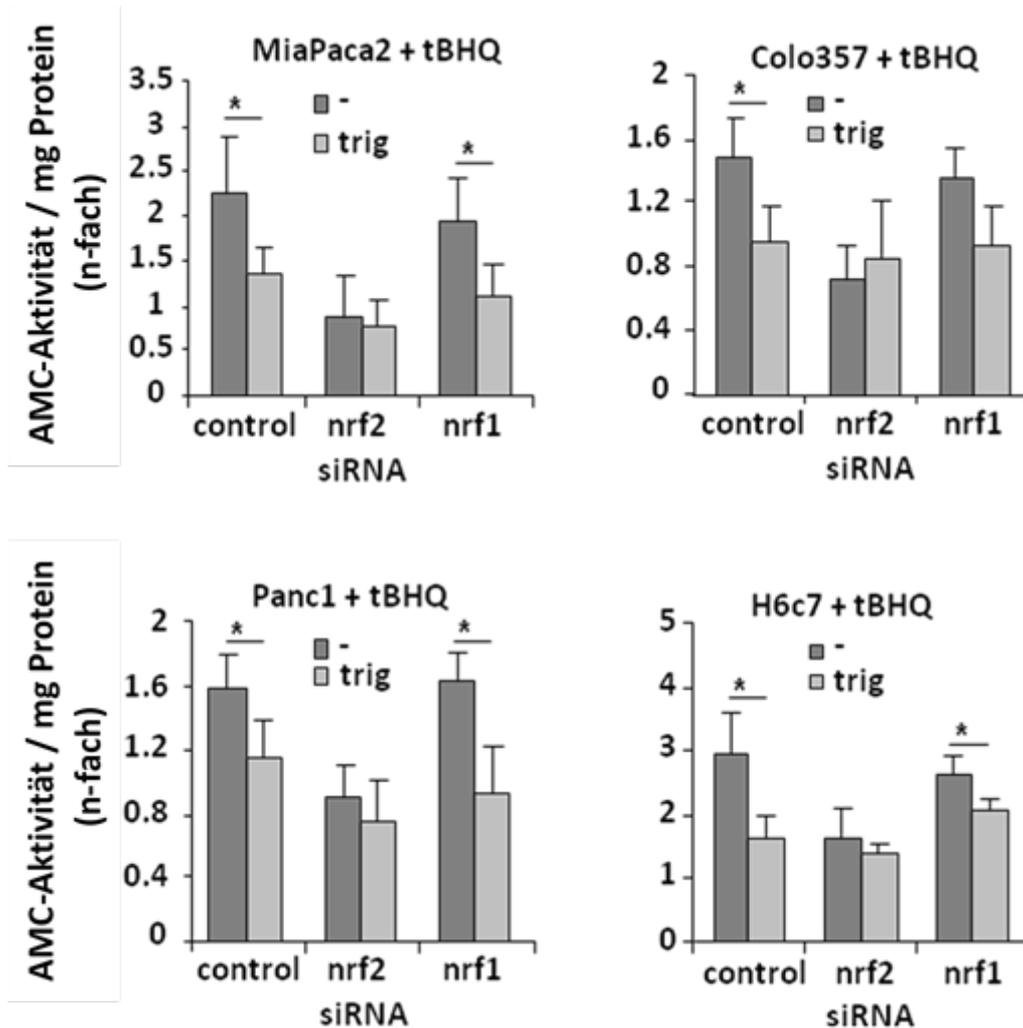


Abbildung 10: Die Effekte von Trigonellin auf die Proteasomaktivität nach siRNA Behandlung

Die oben genannten Zelllinien wurden mit NRF2, Nrf1 oder mit einer Negativkontroll-siRNA behandelt. Die Versuche erfolgten in 12-well-Platten, sodass nach 48 Stunden ein festgelegtes Stimulationsschema durchgeführt werden konnte. Somit wurden alle Zellen mit 50 μM tBHQ behandelt und ein Teil davon noch zusätzlich mit 0.01 μM Trigonellin. Die Effektivität der transfizierten siRNAs wurde mittels quantitativer PCR Analyse validiert. Die Daten sind als n-fache AMC-Aktivität in Bezug auf den Proteingehalt in Milligramm angegeben und es wurden Mittelwerte \pm Abweichung der Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten gezeigt; * $p < 0.05$.

Es war zu beobachten, dass nach Nrf2-siRNA Vorbehandlung der tBHQ induzierende Effekt auf die Proteasomaktivität im Vergleich zur Kontroll-siRNA Vorbehandlung in H6c7, MiaPaca2, Colo357 und Panc1 Zellen um 28%, 41%, 29% bzw. 32% geringer war (Abbildung 10). In den mit Nrf2-siRNA behandelten Zellen bewirkte die Zugabe von 100nM Trigonellin nur noch eine marginale Verringerung der tBHQ induzierten Proteasomaktivität.

Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob auch die Regulation der Proteasomaktivität durch den Nrf2 verwandten Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 (Steffen et al 2010) durch Trigonellin beeinflusst wird. Hierzu wurden alle 4 Zelllinien auch mit Nrf1-siRNA vorbehandelt und analog untersucht. Ein ähnlich signifikanter Effekt der Nrf1-siRNA Vorbehandlung (deren Effektivität wurde mittels Nrf1 qPCR überprüft, Abbildung II im Anhang) auf die tBHQ-induzierte Proteasomaktivität wie unter Nrf2-siRNA war in allen Zelllinien nicht festzustellen, lediglich eine geringe Reduktion war in Colo357, MiaPaca2 und H6c7 Zellen zu beobachten.

Darüber hinaus war in Gegenwart der Nrf1-siRNA der hemmende Einfluss von Trigonellin auf die tBHQ induzierte Proteasomaktivität in allen untersuchten Zelllinien weiterhin deutlich ausgeprägt (Abbildung 10). Eine etwas abgeschwächte Hemmung bestand jedoch in Colo357 und H6c7 Zellen.

3.5. Nrf2-abhängige Genexpression unter Trigonellin Behandlung

Um zu klären, ob der hemmende Effekt von Trigonellin auf die Nrf2-abhängige Proteasomaktivierung aus einer veränderten Expression proteasomaler Gene resultiert, wurde mit Hilfe von Realtime-PCR und Westernblot die Expression zweier Proteinbestandteile der Proteasomuntereinheiten 19S und 20S untersucht. Als Zielgene dienten hier S5a (psmd4) für die 19S- und alpha5 (psma5) für die 20S-Untereinheit.

Es konnte gezeigt werden, dass die in Panc1 und Colo357 bereits basal deutlich erhöhten Konzentrationen an S5a- und alpha5-mRNA nach der Behandlung mit Trigonellin deutlich vermindert waren. In gleichem Maße wurde auch die durch tBHQ-Behandlung erzielte Erhöhung der s5a und alpha5 mRNA Level in MiaPaca und H6c7 Zellen durch Zugabe von Trigonellin gehemmt (Abbildung 11). Darüber hinaus wurde die mRNA Expression des Phasell-Enzyms GCLC nach Behandlung mit tBHQ und Trigonellin untersucht. Es zeigt sich, dass auch die bereits basal erhöhte GCLC mRNA-Expression in Panc1 und Colo357 Zellen durch Trigonellin unterdrückt wurde, wie auch in H6c7 und MiaPaca2 Zellen die GCLC Expression nach vorheriger tBHQ-Stimulation (Abbildung 11).

Die Westernblotanalyse konnte den hemmenden Effekt von Trigonellin sowohl auf die basal erhöhte s5a- und alpha5-Expression in Colo357 und Panc1 Zellen als auch auf die in MiaPaca2 und H6c7 Zellen durch tBHQ induzierte s5a- und alpha5-Expression bestätigen. Entsprechend konnte in allen vier Zellreihen eine Trigonellin abhängige Abnahme der s5a und alpha5 Proteinkonzentration gezeigt werden (Abbildung 12).

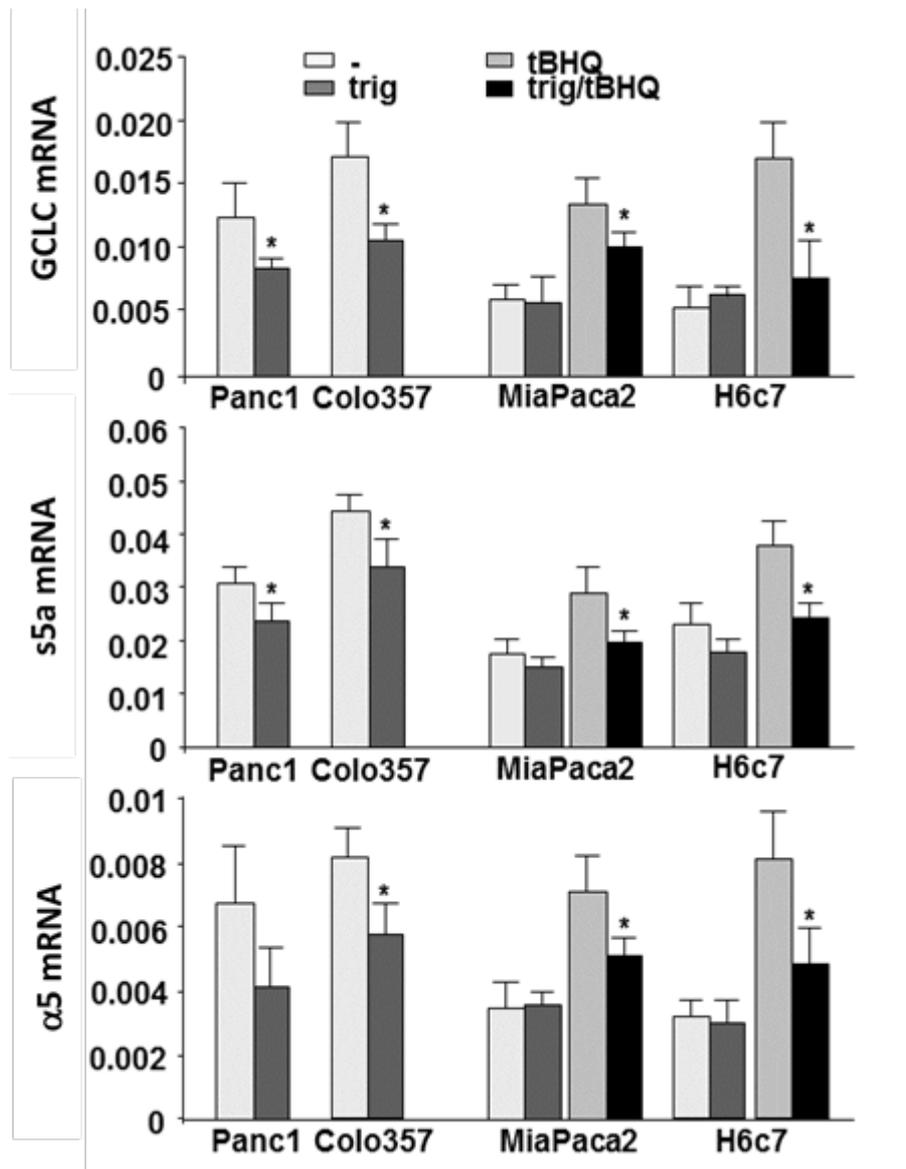


Abbildung 11: Trigonellin vermindert die mRNA Expression der proteasomalen Gene s5a und alpha5 sowie des Phasell-Enzyms GCLC in PDAC und H6c7 Zellen

Colo 357 und Panc1 Zellen wurden entweder gar nicht oder für 16 Stunden mit 0.01 μM Trigonellin behandelt. MiaPaca und H6c7 Zellen erhielten entweder keine, 0.01 μM Trigonellin, 50 μM tBHQ oder die Kombination 0.01 μM Trigonellin und 50 μM tBHQ, wobei tBHQ ebenfalls für die Dauer von 16 Stunden zugesetzt wurde. Es folgte eine quantitative RNA Analyse mit Realtime PCR der proteasomalen Gene s5a und alpha5 sowie des Phasell-Enzyms GCLC. Zur Kontrolle wurde Beta-Actin analysiert und die Werte daraufhin normalisiert. Die gewonnenen Daten werden hier als normalisierte mRNA-Werte dargestellt und stehen für Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$.

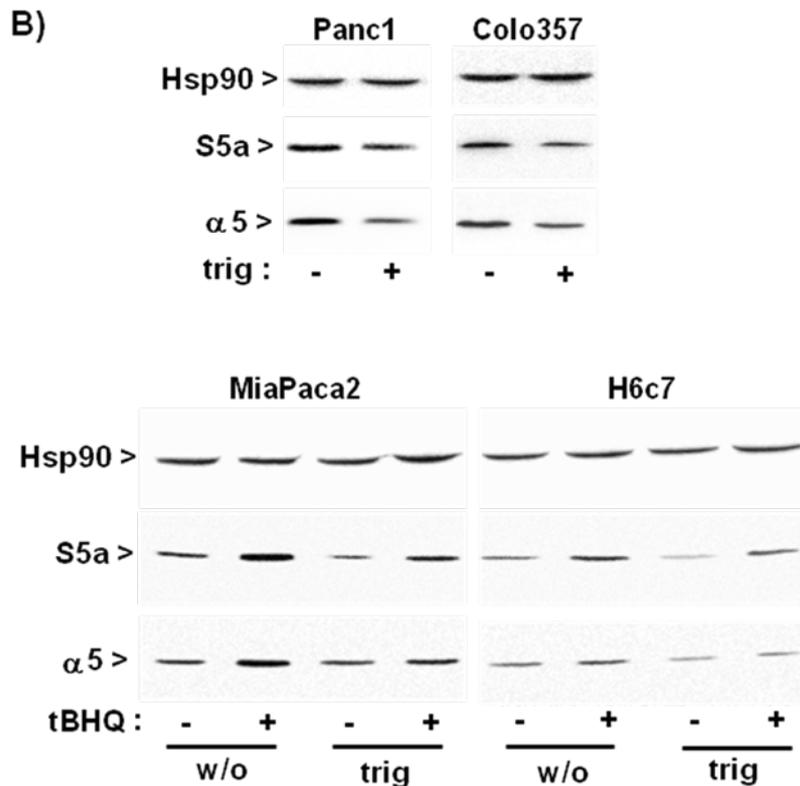


Abbildung 12: Westernblotanalyse zum Nachweis der reduzierten Proteinmengen von S5a und alpha5 in PDAC und H6c7 Zellen

Colo 357 und Panc1 Zellen wurden entweder gar nicht oder für 16 Stunden mit 0.01 μM Trigonellin behandelt. MiaPaca und H6c7 Zellen erhielten entweder keine, 0.01 μM Trigonellin, 50 μM tBHQ oder die Kombination 0.01 μM Trigonellin und 50 μM tBHQ, wobei tBHQ ebenfalls für die Dauer von 16 Stunden zugesetzt wurde. Zum Nachweis der Proteine s5a und alpha5 folgte die Analyse der Gesamtzelllysate mittels Westernblot. Als Ladungskontrolle diente Hsp90. Repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen.

3.6. Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid auf induzierte Apoptose in PDAC und H6c7 Zellen

Da, wie unter Abschnitt 1.2.2 beschrieben, von Nrf2 eine antiapoptotische Wirkung ausgeht, was sich auch in der Chemoresistenz von Tumorzellen manifestiert, wurde nachfolgend untersucht ob die Nrf2-Hemmung durch Trigonellin Einfluss auf die Apoptoserate hat. Zunächst wurden hierfür die chemoresistenten und bereits basal mit erhöhter Nrf2 Aktivität ausgestatteten Colo 357 und Panc1-Zellen vor Zugabe der zwei Apoptosestimuli Etoposid (einem als Zytostatikum eingesetzten Inhibitor der Topoisomerase-II) oder TRAIL (einem Todesliganden der TNF-Familie) entweder mit 100nM Trigonellin für 1h vorbehandelt oder unbehandelt gelassen. Auf Etoposid wurde als Apoptosestimulus zurückgegriffen, da in chemoresistenten PDAC Zellen diesem

Zytostatikum gegenüber die größte pharmakologische Sensitivierbarkeit besteht (Arlt et al 2001, Fritsche et al 2009).

Nach Zugabe von Etoposid für 24h oder TRAIL für 6h zeigten Colo357 und Panc1 Zellen gegenüber unbehandelten Zellen nur einen geringfügigen Anstieg (Etoposid um das 1,4- bzw. 1,7-fache, TRAIL um das 1,8 bzw. 2,8 fache) der Apoptoserate, wie mittels Caspase-3/-7 Aktivitätsmessung festgestellt wurde (Abbildung 13).

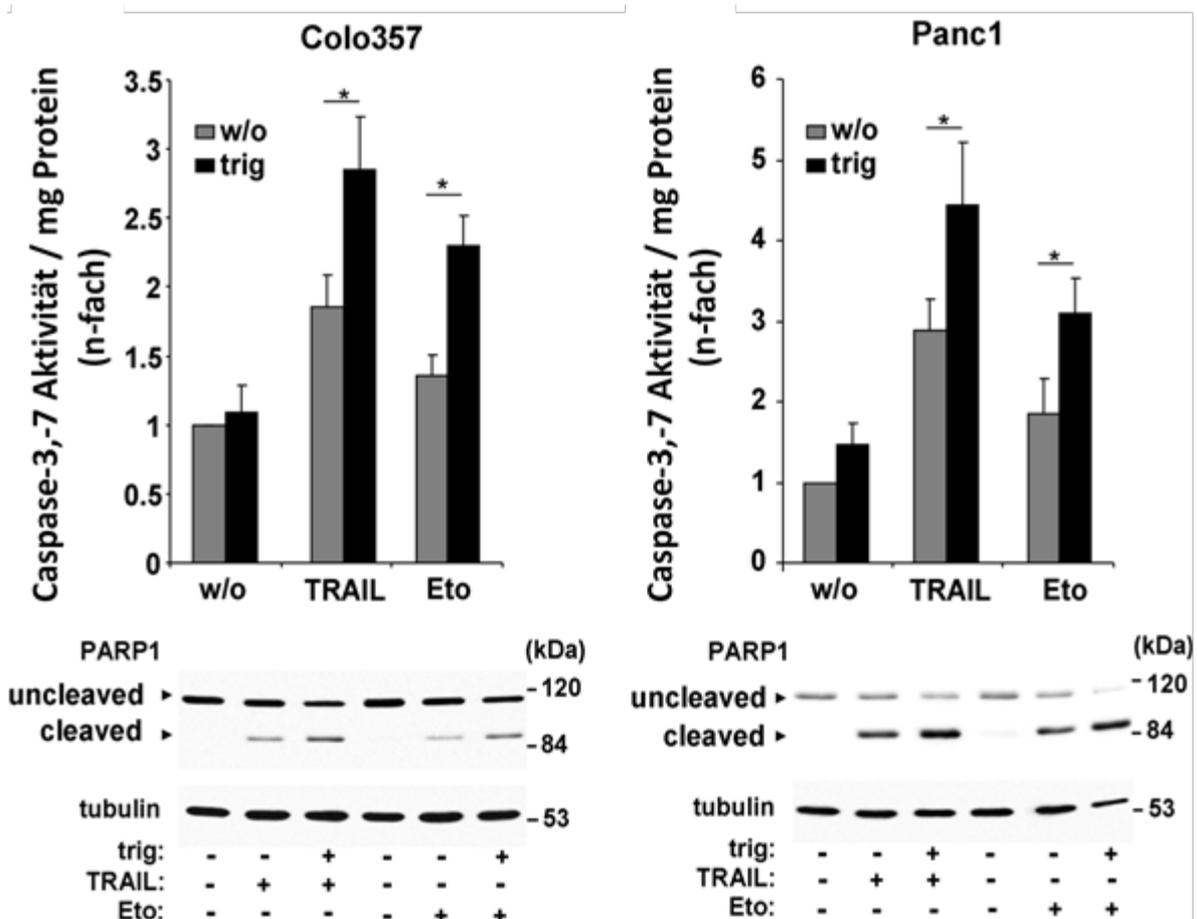


Abbildung 13: Der Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid induzierte Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in Colo357 und Panc1 und Zellen

Den oben genannten Zellreihen wurden entweder für 16 Stunden 0.01 μ M Trigonellin zugefügt oder sie blieben unbehandelt. Danach wurde ihnen entweder 20 μ g/ml Etoposid für 24 Stunden, 10 ng/ml TRAIL für sechs Stunden oder keine der angegebenen Substanzen zugefügt. Die Apoptoserate wurde zum einen durch die Messung der Caspase 3/7 Aktivität gemessen (obere Grafik) oder durch Bestimmung von PARP1 mit Hilfe der Westernblotanalyse (untere Grafik). Hierbei diente Tubulin als Ladungskontrolle. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$. Die Westernblotanalyse steht repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Wurden beide Zelllinien jedoch zuvor mit Trigonellin behandelt, erhöhte sich die durch TRAIL induzierte Caspase-3/-7-Aktivität um das 2,7- bzw. 4,3-fache. Die Behandlung mit Etoposid (Abbildung 13) zeigte nach Vorbehandlung mit Trigonellin ebenfalls eine verstärkte Aktivierung der Caspaseaktivität (2,3- bzw. 3,1-fach). Die alleinige Behandlung mit Trigonellin führte in Colo357 zu keiner (1,1-fach) und in Panc1 Zellen zu einer geringen (1,4-fach) Erhöhung der Caspaseaktivität.

Zur Bestätigung dieses sensitivierenden Effekts von Trigonellin, wurde die Apoptoseantwort von Colo357 und Panc1 Zellen auch mittels PARP1 Westernblots untersucht. Während der Apoptose kommt es zu einer charakteristischen Caspase-abhängigen Spaltung des PARP1 Proteins (110 kDa) und infolgedessen zum Auftreten eines 87 kDa Spaltproduktes. Wie in Abbildung 13 (unten) zu erkennen, kommt es in beiden Zelllinien nach Behandlung mit Etoposid oder TRAIL zu einem verstärkten Auftreten des 87 kDa PARP1-Spaltproduktes, wenn zuvor Trigonellin zugegeben worden war.

Die deutlich weniger chemoresistenten und mit geringer Nrf2-Basalaktivität ausgestatteten Zelllinien MiaPaca2 und H6c7 wurden dahingehend untersucht, ob die Induktion von Nrf2 durch tBHQ zur Desensitivierung gegenüber Etoposid oder TRAIL induzierter Apoptose führt, und ob sich dieser Effekt durch Trigonellin entsprechend unterdrücken lässt (Abbildung 14).

Mittels Bestimmung der Caspaseaktivität ließ sich zeigen, dass die Apoptoserate nach Zugabe von Etoposid in MiaPaca2 Zellen vom 6,7-fachen auf das 4,5-fache und in H6c7 Zellen vom 4,8-fachen auf das 3,6-fache abnahm, wenn die Zellen mit tBHQ vorbehandelt worden waren. Ebenso reagierten die mit tBHQ präinkubierten Zellen auf die Zugabe von TRAIL mit einer Abnahme der Caspaseaktivität (MiaPaca2 Zellen vom 5,5-fachen auf das 3,6-fache und H6c7 Zellen vom 4,4-fachen auf das 3,5-fache). In Gegenwart von Trigonellin war hingegen der protektive Effekt der tBHQ Vorbehandlung sowohl gegenüber Etoposid als auch gegenüber TRAIL induzierter Caspaseaktivität in MiaPaca2 Zellen wesentlich geringer und in H6c7 Zellen vollständig aufgehoben (Abbildung 14).

Auch in MiaPaca2 und H6c7 Zellen bestätigte der PARP1-Westernblot, dass Trigonellin eine Sensitivierung gegenüber beiden Apoptosestimuli bewirkte. Dies war anhand des 87 kDa PARP1-Spaltproduktes nachzuvollziehen, das jeweils unter Einfluss von tBHQ in geringerer Menge nachzuweisen war, nicht jedoch bei zusätzlicher Anwesenheit von Trigonellin (Abbildung 14, unten).

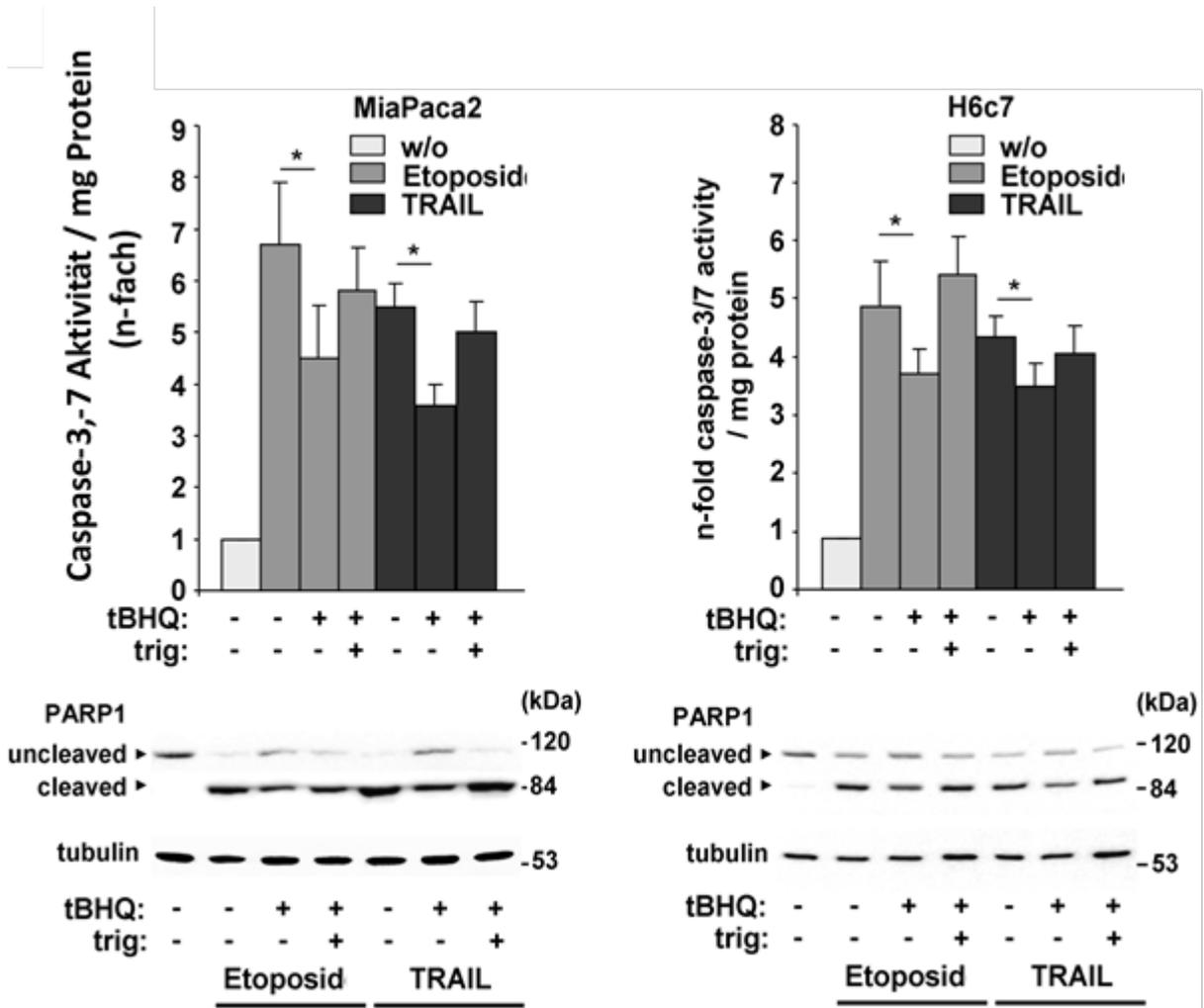


Abbildung 14: Der Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid induzierte Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca und H6c7 Zellen

Den oben genannten Zellreihen wurden entweder für 16 Stunden 50 μM tBHQ hinzugefügt oder sie blieben unbehandelt. Außerdem wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit 0.01 μM Trigonellin behandelt. Danach wurde ihnen entweder 20 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid für 24 Stunden, 10 ng/ml TRAIL für sechs Stunden oder keine der angegebenen Substanzen zugegeben. Die Apoptoserate wurde zum einen durch die Messung der Caspase 3/7 Aktivität gemessen (obere Grafik) oder durch Bestimmung von PARP1 mit Hilfe der Westernblotanalyse (untere Grafik). Hierbei diente Tubulin als Ladungskontrolle. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$. Die Westernblotanalyse steht repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.7. Der Apoptose sensitivierende Effekt von Trigonellin ist abhängig von Nrf2 und proteasomaler Genexpression

Um zu klären, ob der durch Trigonellin erreichte Effekt der Apoptosesensitivierung abhängig von Nrf2 und dessen induzierter proteasomaler Genexpression ist, wurden Panc1 und MiaPaca2 Zellen für weitere siRNA Experimente ausgewählt.

Anhand der erhöhten Caspase 3/7-Aktivität nach der Transfektion mit Nrf2-siRNA konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der Panc1 Zellen für TRAIL und Etoposid induzierte Apoptose deutlich zunimmt (Abbildung 15a).

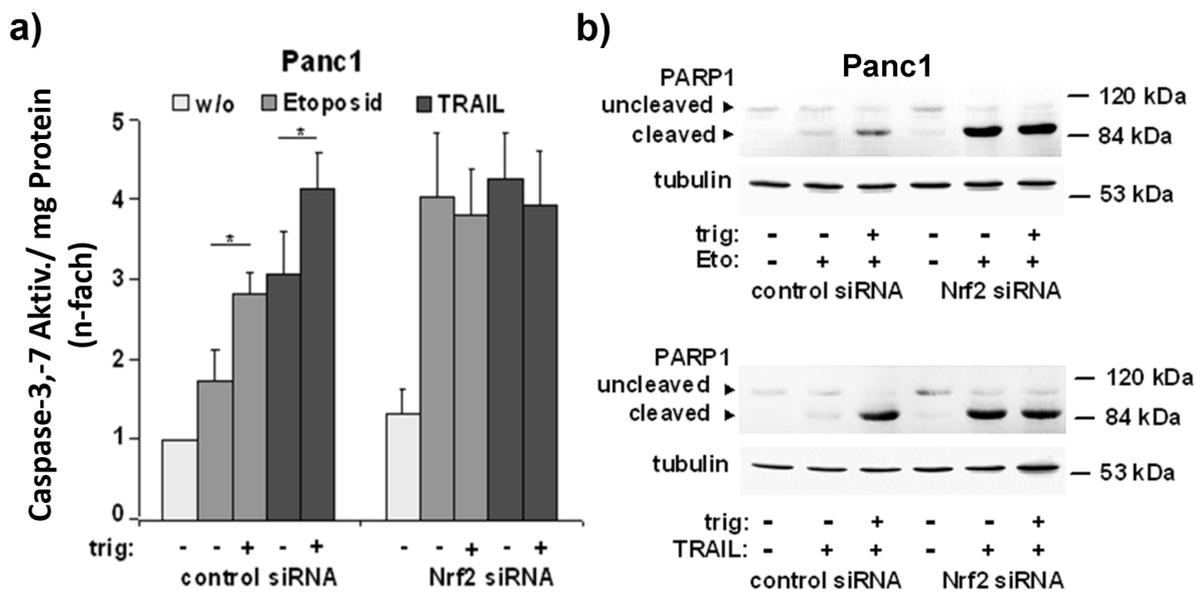


Abbildung 15: Die Untersuchung der Caspaseaktivität und PARP1-Spaltung in Panc1 Zellen nach Nrf2 Knockdown und anschließender Trigonellin-Gabe

Die oben genannten Zellen wurden mit Nrf2- und Kontroll-siRNA über den Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Dann wurden Panc1 Zellen für 16 Stunden mit 0.01 μ M Trigonellin behandelt gefolgt von der Zugabe von 20 μ g/ml Etoposid für 24 Stunden oder 10 ng/ml TRAIL für sechs Stunden. Ein Teil der Zellen blieb unbehandelt. A) Danach wurde die Apoptoserate anhand der Caspase-3/7-Aktivität gemessen. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte +/- Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; *p<0.05. B) Gesamtzelllysate wurden einer PARP1 Westernblot Analyse unterzogen zur Darstellung der Apoptose assoziierten PARP1 Spaltung und Generierung des 87 kDa Spaltproduktes. Tubulin wurde als Ladekontrolle detektiert.

Darüber hinaus konnte in den mit Nrf2 siRNA behandelten Zellen kein Einfluss von Trigonellin auf die durch TRAIL und Etoposid induzierte Apoptose beobachtet werden. Entsprechend blieb unter Einfluss der Nrf2-siRNA die Etoposid oder TRAIL induzierte Caspase-3/-7 Aktivität in Gegenwart von Trigonellin unverändert, nicht jedoch in

Kontroll-siRNA behandelten Zellen wo Trigonellin eine deutliche Steigerung der moderaten Caspaseaktivitäten bewirkte (Abbildung 15a). PARP1-Westernblots bestätigten diese Nrf2-Abhängigkeit des Apoptose sensitivierenden Effektes von Trigonellin in Panc1 Zellen (Abbildung 15b).

Gleichermaßen zeigte sowohl der der Caspaseassay als auch der PARP1 Westernblot eine Aufhebung des desensitierenden Effektes von tBHQ in MiaPaca2 Zellen gegenüber Etoposid oder TRAIL induzierter Apoptose (Abbildung 16), wenn zuvor Nrf2-siRNA appliziert worden war. Unter diesen Bedingungen war wiederum kein zusätzlicher Apoptoseschutz durch Trigonellin zu verzeichnen.

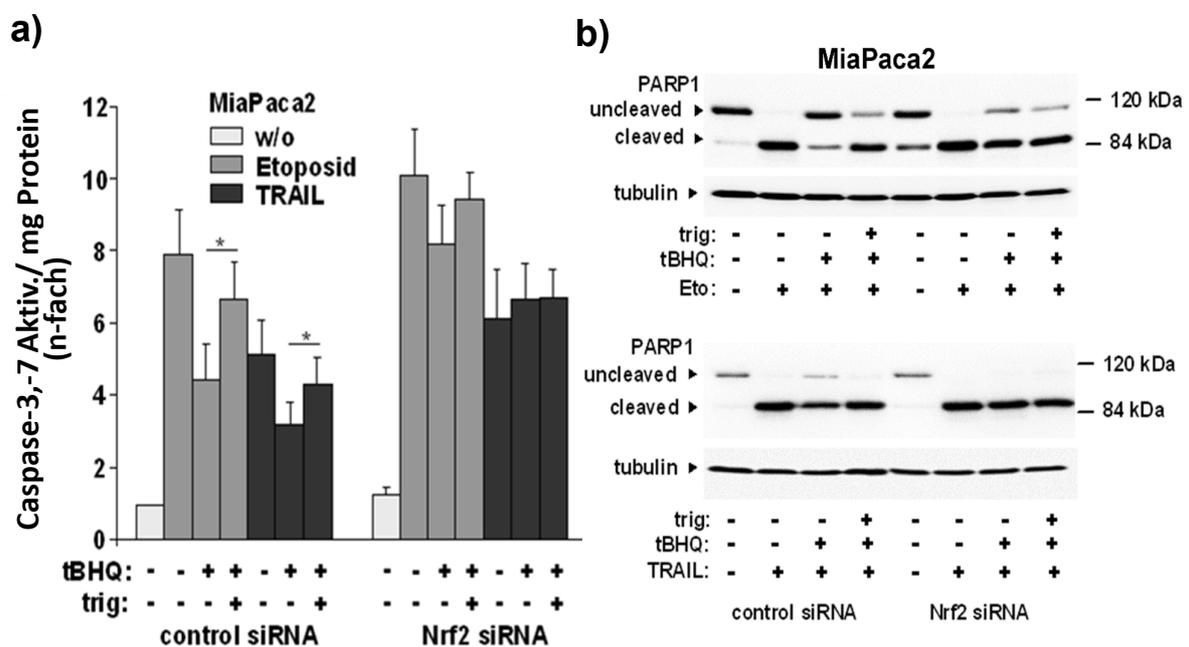


Abbildung 16: Die Untersuchung der Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca2 Zellen nach Nrf2 Knockdown und im Zusammenhang mit Trigonellin und tBHQ

Die oben genannten Zellen wurden mit Nrf2- und Kontroll- siRNA über den Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Dann wurden MiaPaca Zellen zum Teil über den Zeitraum von 16 Stunden mit 50 μ M tBHQ behandelt oder blieben ohne dessen Zugabe. Dies erfolgte zum Teil mit zusätzlicher Vorbehandlung durch 0.01 μ M Trigonellin, was dann wiederum eine Stunde vor tBHQ hinzugefügt wurde. Gefolgt wurde dies von der Zugabe von 20 μ g/ml Etoposid für 24 Stunden oder 10 ng/ml TRAIL für sechs Stunden. Ein Teil der Zellen blieb unbehandelt. A) Danach wurde die Apoptoserate anhand der Caspase-3/7-Aktivität gemessen. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$. B) Gesamtzelllysate wurden einer PARP1 Westernblot Analyse unterzogen zur Darstellung der Apoptose assoziierten PARP1 Spaltung und Generierung des 87 kDa Spaltproduktes. Tubulin wurde als Ladekontrolle detektiert.

In analoger Weise wurden beide hier ausgewählten Zelllinien auf ihr Apoptoseverhalten und den Einfluss von tBHQ und Trigonellin nach Transfektion mit s5a und alpha5-siRNA untersucht.

Mittels Caspase-3/-7 Assay konnte gezeigt werden, dass die mit s5a- und alpha5-siRNA transfizierten Panc1 Zellen einen Anstieg der Apoptoserate nach TRAIL und Etoposidbehandlung im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen aufweisen. Die Zugabe von Trigonellin konnte in Gegenwart der s5a- und alpha5-siRNA keine weitere Verstärkung der TRAIL und Etoposid induzierten Caspase-3/-7-Aktivität bewirken, wie das in Kontroll-siRNA behandelten und gleichzeitig Apoptose resistenteren Panc1 Zellen der Fall war (Abbildung 17a).

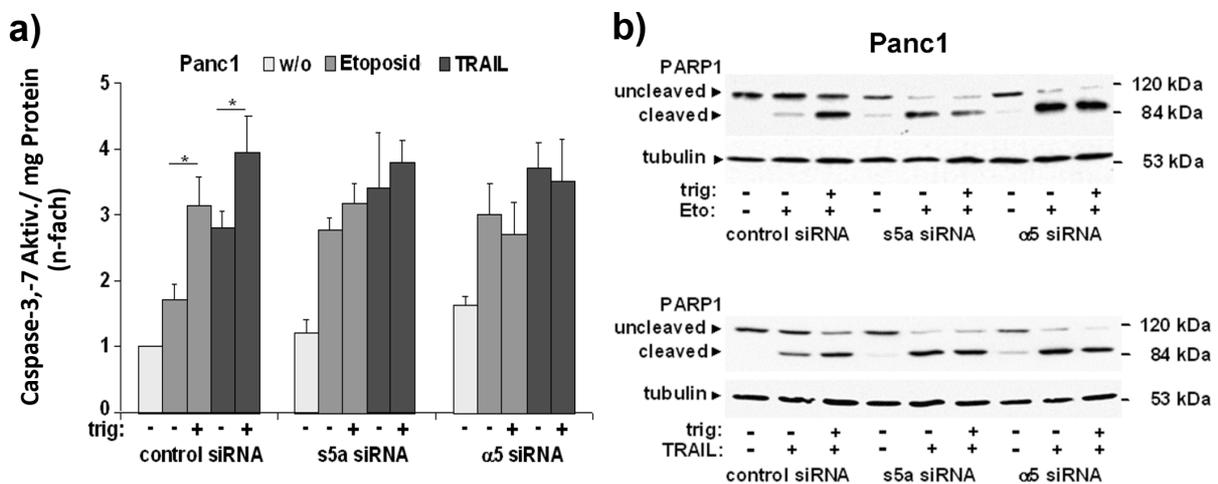


Abbildung 17: Die Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in Panc1 Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen proteasomale Gene

Die oben genannten Zellen wurden Kontroll-, s5a- oder alpha-5-siRNA über den Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Dann wurden Panc1 Zellen für 16 Stunden mit 0.01 μ M Trigonellin behandelt gefolgt von der Zugabe von 20 μ g/ml Etoposid für 24 Stunden oder 10 ng/ml TRAIL für sechs Stunden. Ein Teil der Zellen blieb unbehandelt. A) Danach wurde die Apoptoserate anhand der Caspase-3/7-Aktivität gemessen. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$. B) Gesamtzelllysate wurden einer PARP1 Westernblot Analyse unterzogen zur Darstellung der Apoptose assoziierten PARP1 Spaltung und Generierung des 87 kDa Spaltproduktes. Tubulin wurde als Ladekontrolle detektiert.

Ebenso konnte in MiaPaca2 Zellen die durch tBHQ Vorbehandlung bewirkte Resistenz gegenüber TRAIL und Etoposid induzierter Apoptose weitgehend aufgehoben werden, wenn zuvor die Genexpression von s5a und alpha 5 durch siRNA Behandlung unterdrückt wurde. Zudem reagierten die mit s5a- und alpha5-siRNA transfizierten MiaPaca2 Zellen sehr viel weniger auf den re-sensitivierenden Effekt von Trigonellin

auf tBHQ und dessen Schutz gegenüber Etoposid und TRAIL induzierter Apoptose (Abbildung 18a).

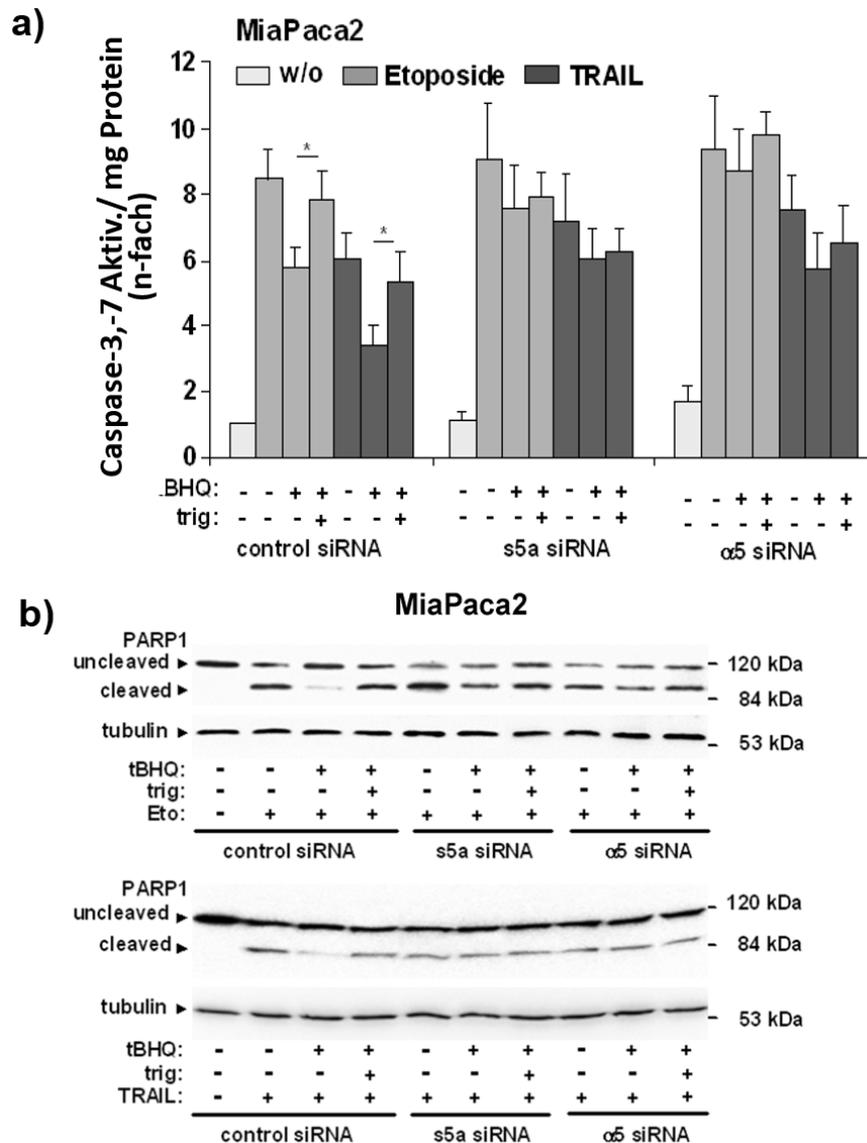


Abbildung 18: Die Caspaseaktivität und PARP1 Spaltung in MiaPaca2 Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen proteasomale Gene

MiaPaca2 Zellen wurden mit Kontroll-, s5a- oder alpha-5-siRNA über den Zeitraum von 48 Stunden behandelt, gefolgt von einer Behandlung mit 50 μ M tBHQ für 16h oder ohne. Dies erfolgte mit oder ohne Vorbehandlung (1h) mit 0.01 μ M Trigonellin. Gefolgt wurde dies von der Zugabe von 20 μ g/ml Etoposid für 24 h oder 10 ng/ml TRAIL für 6h oder ohne diese. A) Danach wurde die Apoptoserate anhand der Caspase-3/7-Aktivität gemessen. Die erhobenen Daten sind dargestellt als n-fache Caspase-Aktivität und wurden normiert auf den zellulären Proteingehalt. Repräsentative Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen durchgeführt in Doppelbestimmung; * $p < 0.05$. B) Gesamtzelllysate wurden einer PARP1 Westernblot Analyse unterzogen zur Darstellung der Apoptose assoziierten PARP1 Spaltung und Generierung des 87 kDa Spaltproduktes. Tubulin wurde als Ladekontrolle detektiert.

PARP1 Westernblots zeigten anhand der unveränderten Intensität des 87 kDa PARP1-Spaltproduktes gleichfalls den weitgehenden Verlust der Apoptose sensitivierenden Eigenschaften von Trigonellin in Panc1 Zellen und in tBHQ behandelten MiaPaca2 Zellen, wenn beide Zelllinien zuvor mit s5a oder alpha5-siRNA behandelt worden waren.

Unter Einfluss der Kontroll-siRNA war hingegen in beiden Zelllinien eine deutliche Steigerung der Etoposid oder TRAIL induzierten PARP1 Spaltung durch Trigonellin zu beobachten (Abbildung 17b,18b).

3.8. Verstärkte Tumorreduktion durch kombinierte Behandlung mit Trigonellin und Etoposid bei Colo357- und Panc1-Tumortragenden SCID-Mäusen

Die anhand der Zellkulturexperimente erhobenen Befunde zeigten eine Nrf2 hemmende Wirkung von Trigonellin, die sich u.a. in einer Unterdrückung der Proteasomaktivität und davon bedingt in einer Sensitivierung von PDAC Zellen gegenüber Apoptose manifestiert.

Um nun die Wirkung von Trigonellin auch in Hinblick auf das Tumorstadium bzw. die Chemosensitivität dieser PDAC Zellen in einem komplexen Organismus zu untersuchen, wurde nachfolgend auf ein subkutanes Tumor-Xenotransplantat-Modell in weiblichen SCID-Mäusen zurückgegriffen. Hierfür wurden Colo357 und Panc1 Zellen subkutan in die rechte Flanke oberhalb des Femurs von jeweils 24 Tieren inokuliert. Nach Erreichen von einer Tumorstadiumgröße von 5x5 mm² (im Falle der Colo357 Zellen 3 Wochen nach Inokulation und im Falle der Panc1 Zellen 5 Wochen nach Inokulation) wurden drei Behandlungsgruppen von je 8 Tieren gebildet, die einer Kontrollbehandlung mit 0.9% NaCl-Lösung (Gruppe I), mit 10mg/kg KG Etoposid (Gruppe II) oder mit einer Kombination aus Etoposid und Trigonellin in der Dosierung 1mg/kgKG (Gruppe III) zugeführt wurden. Die Gabe erfolgte jeweils durch intraperitoneale Injektion, wobei an Tag 1 und 9 des Behandlungszeitraumes in Gruppe I und II zunächst jeweils 0.9% NaCl bzw. in Gruppe III zunächst 1mg/kgKG Trigonellin appliziert wurden. An den Behandlungstagen 2,3,4,5,10,11,12 und 13 erfolgte dann die Applikation von 0.9% NaCl, 10mg/kg KG Etoposid allein oder die Kombination von Etoposid und Trigonellin. Während der Behandlung zeigten die Tiere der Gruppen II und III zwischen Tag 6 und 15 eine leichte Fellveränderung und einen mäßigen Gewichtsverlust (8-12%), diese Phänomene waren jedoch innerhalb der Woche bis Versuchsende weitgehend rückläufig.

Bereits während der Behandlung war bei den Mäusen, die mit der Etoposid/Trigonellin-Kombination behandelt wurden eine rasche Stagnation des oberflächlich messbaren, d.h. palpablen, Tumorwachstums festzustellen (Abbildung 19).

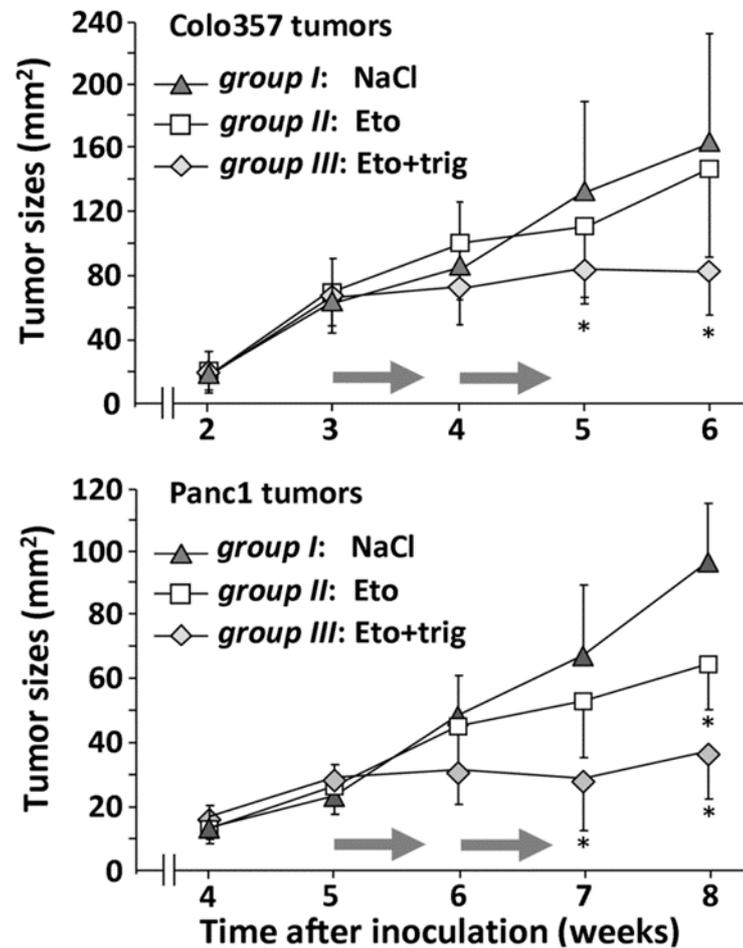


Abbildung 19: Wirkung einer Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf das Wachstum von subkutanen Colo357 und Panc1 Tumoren in SCID beige Mäusen

SCID beige Mäuse, die durch Colo357 und Panc1 injizierte Zellen, subkutane Tumoren ausgebildet hatten, wurden täglich vier Tage lang eine 0.9 % NaCl-Lösung injiziert (Gruppe I) oder mit 10mg/kg Körpergewicht Etoposid behandelt (Gruppe II). Eine dritte Gruppe (Gruppe III) erhielt eine Kombination von 1 mg/kg Körpergewicht Etoposid und Trigonellin. Wobei die Tiere der einzelnen Gruppen jeweils am Tag zuvor entweder 0.9% NaCl oder Trigonellin erhielten. Nach drei Tagen wurde die gleiche Behandlung erneut durchgeführt. Die Tumorentwicklung wurde in 2-tägigem Abstand kontrolliert und die Fläche der palpablen Tumore wurde über den gesamten Zeitverlauf in 1 wöchigem Abstand ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, $p < 0,05$. Die Behandlungszeiträume sind durch Pfeile gekennzeichnet.

So war in Gruppe III zwischen Tag 5 nach Behandlungsbeginn bis Versuchsende an Tag 21 ein Persistieren der Tumorgößen von Colo357 bei $71 \pm 21 \text{ mm}^2$ und von Panc1 bei $27 \pm 14 \text{ mm}^2$ zu beobachten. Hingegen zeigten während und nach der Behandlung die Tiere der Gruppe I eine fortschreitende Zunahme der palpablen Colo357 und Panc1 Tumorgößen, wobei zwischen Tag 8 nach Behandlungsbeginn und dem Versuchsende jeweils eine Verdopplung von $84 \pm 36 \text{ mm}^2$ auf $161 \pm 76 \text{ mm}^2$ bzw. von $48 \pm 17 \text{ mm}^2$ auf $94 \pm 21 \text{ mm}^2$ auftrat.

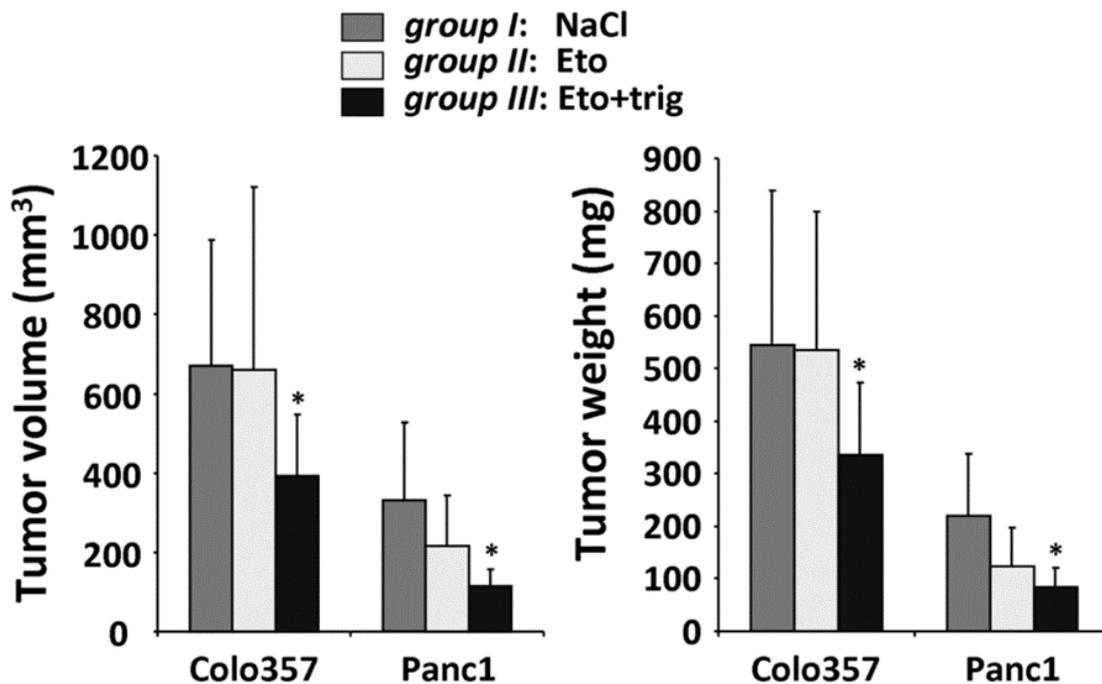


Abbildung 20: Wirkung einer Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf das Wachstum von subkutanen Colo357 und Panc1 Tumoren in SCID Mäusen

Am Ende des Experiments wurden nach Explantation das Volumen und Gewicht der frisch exzidierten Tumoren ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=8 pro Gruppe); $p < 0.05$.

Nach Abschluss des Versuchs betrug das Volumen der explantierten Colo357 und Panc1 Tumore aus den Tieren der Gruppe I $671 \pm 318 \text{ mm}^3$ bzw. $328 \pm 203 \text{ mm}^3$ (Abbildung 20 links). Das Gewicht dieser Tumore aus der jeweiligen Gruppe I betrug $549 \pm 293 \text{ mg}$ bzw. $220 \pm 118 \text{ mg}$ (Abbildung 20 rechts). In den jeweiligen Gruppe II Tieren (Etoposid allein) betrug das Tumolvolumen $661 \pm 461 \text{ mm}^3$ bzw. $216 \pm 126 \text{ mm}^3$ und das Tumorgewicht $536 \pm 264 \text{ mg}$ bzw. $124 \pm 74 \text{ mg}$. In den Gruppe III Tieren

(Etoposid/Trigonellin Kombination) wurde ein Tumolvolumen von $391 \pm 155 \text{ mm}^3$ bzw. $113 \pm 45 \text{ mm}^3$ und ein Tumorgewicht von $336 \pm 136 \text{ mg}$ bzw. $84 \pm 38 \text{ mg}$ bestimmt.

Somit bestätigte sich der während des Versuchs bereits beobachtete Reduktion des Wachstums sowohl der Colo357 als auch der Panc1 Tumore in Gruppe III. Gegenüber ersteren zeigten Panc1 Tumore eine partielle Remission durch die alleinige Etoposid-Behandlung, die durch Trigonellin signifikant verstärkt wurde. Colo357 Tumore waren hingegen vollständig resistent gegenüber der alleinigen Etoposid-Behandlung und erst die zusätzliche Gabe von Trigonellin vermochte hier einen deutlichen Remissionseffekt zu erzielen.

3.9. Der Einfluss von einer Trigonellin/Etoposid-Kombinationstherapie auf die Nrf2 Aktivität in Colo357 und Panc1 Tumoren

Nachfolgend wurde der Frage nachgegangen ob sich der chemosensibilisierende Effekt von Trigonellin auch in einer verminderten Nrf2 Aktivierung abbildet. Hierzu wurden Kryostatschnitte von Colo357 und Panc1 Tumoren der jeweiligen Behandlungsgruppen einer immunhistochemischen Analyse unterzogen. Hierzu wurde eine Antikörperfärbung von P-Ser40-Nrf2 gewählt, was der Tatsache Rechnung trägt, dass das Erscheinen des phosphorylierten Nrf2 im Zellkern sehr spezifisch die Aktivierung von Nrf2 widerspiegelt.

Wie in Abbildung 21 dargestellt ist, konnte in beiden Tumoren der Gruppe I eine starke nukleäre Färbung von P-Nrf2 nachgewiesen werden. Diese Färbung war zu 80% in allen Colo357 bzw. Panc1 Zellen innerhalb des Tumors nachweisbar, Bestandteile des Stromas, die murinen Ursprungs waren blieben negativ (der hier verwendete Antikörper ist allerdings in der Lage auch murines P-Nrf2 zu detektieren).

In Gruppe II zeigte sich bei den Colo357 Tumoren ein marginale Zunahme von Tumorzellen mit erhöhter Nrf2-Aktivität, in Panc1 Tumoren hingegen nahm die Zahl P-Nrf2 positiver Zellen leicht ab. In letzteren zeigte sich stattdessen auch eine partielle Umverteilung der P-Nrf2 Färbung von nukleär zu zytoplasmatisch. Der Grund hierfür ist unbekannt.

In Gruppe III war bei beiden Tumoren übereinstimmend eine starke Reduktion der P-Nrf2 Färbung zu erkennen. Diese offensichtliche Hemmung durch Trigonellin war v.a. bei den gänzlich chemoresistenten Colo357 Tumoren (vgl. Gruppe II) auszumachen.

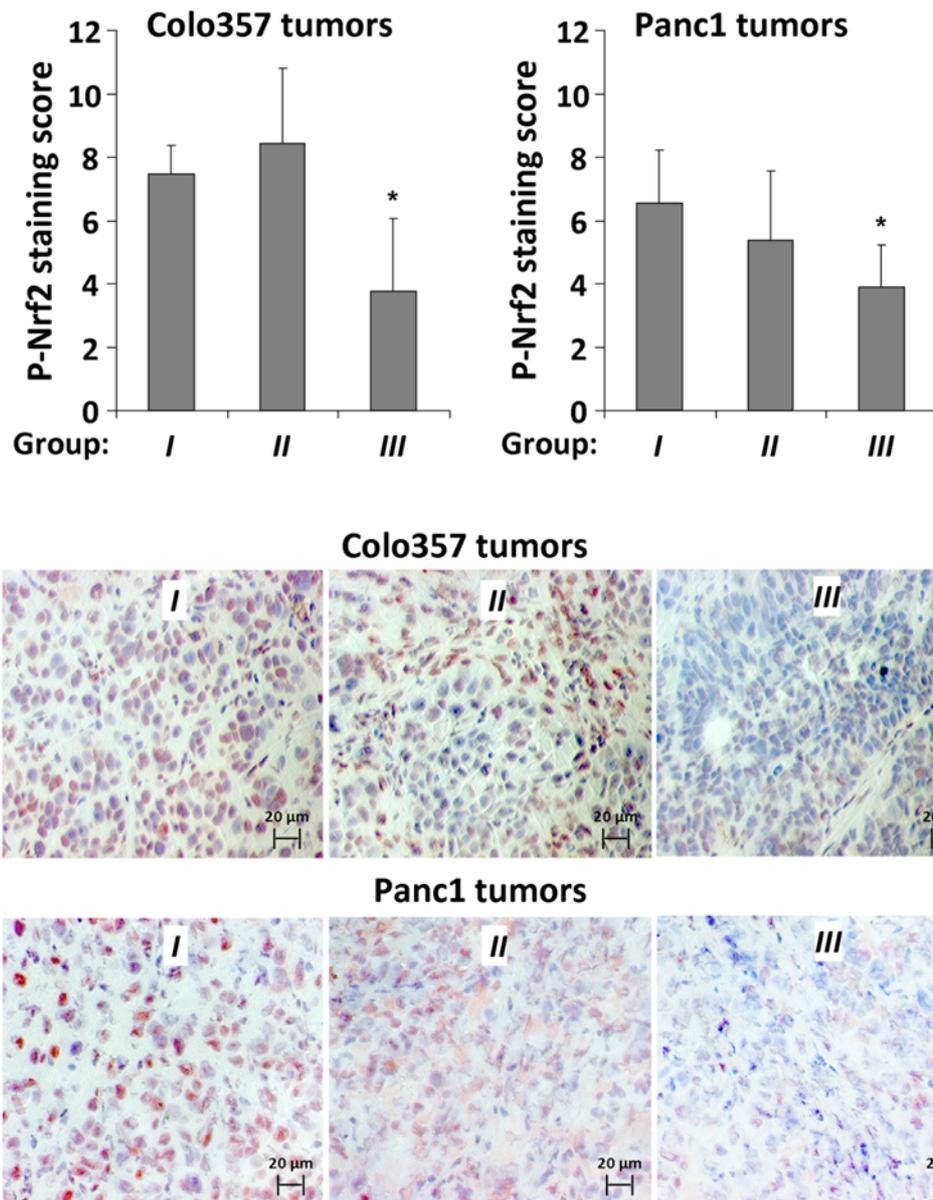


Abbildung 21: Einfluss der Trigonellin/Etoposid Kombinationstherapie auf die Nrf2 Aktivität in Colo357 und Panc1 Tumoren

Die Gefrierpräparate von Tumoren wurden mit dem Antikörper Phospho-Nrf2 (Ser40) angefärbt, der aktiviertes Nrf2 im Zellkern sichtbar macht. Repräsentative Bilder sind in der unteren Grafik gezeigt. Die im oberen Abschnitt gezeigte Auswertung bediente sich des unter Abschnitt 2.2.11 beschriebenen Scoring Verfahrens. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $p < 0,05$ ($n=8$ je Gruppe).

4. Diskussion

4.1. Chemoresistenz von Pankreaskarzinomzellen und die Bedeutung von Nrf2

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), charakterisiert durch sein rasches und infiltrierendes Wachstum, zählt noch immer zu den häufigsten Ursachen krebserkrankter Todesfälle. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, befinden sich die Patienten meist bereits in einem Stadium der Erkrankung, die nur noch palliativ zu behandeln ist. Neben dem extrem schnellen und zugleich ausgedehnten Wachstum der Tumorzellen sowie der ausgeprägten Neigung zur Metastasierung, weisen die malignen Zellen, die zumeist aus dem duktalem Epithel hervorgehen, eine hochgradige Resistenz gegenüber den bislang zur Verfügung stehenden Strategien von Radio- und Chemotherapie auf (Wormann and Algul 2013, Stathis and Moore 2010).

Ursächlich für diese ausgeprägte Therapieresistenz sind neben Mutationen in Protoonkogenen (K-Ras, B-Raf) oder Tumorsuppressorgenen (z.B. PTEN, p53) vor allem Veränderungen in der Signaltransduktion und hierbei die Aktivität von bestimmten Transkriptionsfaktoren. So wurde beim Pankreaskarzinom in Verbindung mit einem Resistenzphänotyp die konstitutive Aktivierung von NF-kappaB und NFAT festgestellt (Arlt et al 2003, Arlt et al 2001, Arlt et al 2012, Arlt et al 2013, Schneider et al 2005). In chemoresistenten PDAC Zellen ließ sich zeigen, dass eine konstitutive NF-kappaB Aktivierung vor Zytostatika wie Gemcitabin schützt, indem hierdurch ein potenter Apoptoseschutz vermittelt wird (Arlt et al. 2001, Muerkoester et al. 2003). Interessanterweise ist eine solche Protektion nicht durch die induzierbar, das heißt durch das Zytostatikum selbst verursachte NF-kappaB Aktivität festzustellen (Arlt et al. 2003). Dies deutet auf komplexe Veränderungen auf Ebene diverser Apoptoseregulatoren hin, die vornehmlich aus einer dauerhaften (konstitutiven) NF-kappaB Aktivierung resultieren. Hier spielt sicher eine wesentliche Rolle, dass unterschiedliche Mitglieder der NF-kappaB Proteinfamilie, hier vor allem solche der Rel-Familie (RelA, c-Rel & RelB) an der Ausprägung konstitutiver NF-kappaB-Aktivität beteiligt sind. Die Entstehung einer konstitutiven NF-kappaB-Aktivität beruht u.a. auf der para- und autokrinen Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFalpha und IL-1beta (Arlt et al. 2002, Muerkoester et al. 2005). Diese sind bedeutender Bestandteil von Tumor-Stroma-Interaktionen und tragen wesentlich zur malignen Transformation des PDAC bei (Muerkoester et al. 2004).

Gerade das PDAC ist durch sein ausgeprägtes Stroma charakterisiert, in dem reziproke Wechselwirkungen zwischen epithelialen Zellen und stromalen Zellen, vor allem zwischen Myofibroblasten und Immunzellen wie Makrophagen, ganz wesentlich zur Tumorigenese beitragen. Neben den proinflammatorischen Zytokinen spielt auch oxidativer Stress während solcher Tumor-Stroma-Interaktionen eine wichtige Rolle. Entzündungszellen wie Makrophagen sezernieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die auf die prämaligen und malignen Epithelzellen einwirken. Als ein wichtiger Mechanismus der Adaptation der Epithelzellen an oxidativen Stress wird in diesen der Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert. In erster Linie führt Nrf2 hierbei zur Expression von reduktiven (z.B. GCLC) und Phase-II Enzymen (NQO1), aber auch von anderen zytoprotektiven Genprodukten (s.u.). Eine wesentliche Schutzfunktion, die von Nrf2 ausgeht ist die Protektion vor oxidativ verursachter DNA-Schädigung und damit vor Mutationen. Dies ist auch gegenüber chemischen Karzinogenen der Fall, so dass Nrf2 grundsätzlich als ein potentes Ziel in der Chemoprävention angesehen wird (Kwak & Hensler 2010, Hayes et al. 2010). Hierzu haben eine Vielzahl von Studien anhand von Zellkultur und Tiermodellen zeigen können, dass Nrf2 in der Tat die Entstehung von Tumoren verhindern kann, beziehungsweise, dass das Fehlen von Nrf2 (knock-out Mäuse) eine erhöhte Inzidenz von v.a. chemisch induzierter Tumore (AOM/Kolon, Aflatoxin/HCC) zur Folge hat (Slocum & Hensler 2011). Hieraus entstand die Idee, durch Verabreichung Nrf2 induzierender Agenzien, die Bildung bestimmter Tumore zu verhindern. Eine ganze Reihe von Wirkstoffen sind hierzu präklinisch getestet worden, unter Anderem tBHQ, SFN, Oltipraz, Protrandim, CDDO und Reseveratrol (Liu et al. 2009, Kumar et al. 2014). Alle diese zeigen Nrf2 aktivierendes und zytoprotektives Potential, sowie in diversen Tiermodellen tumorpräventive Eigenschaften (Hayes et al. 2010). In ersten klinischen Studien zeigte sich jedoch kein nennenswerter Effekt (Kensler et al. 2012). Stattdessen waren diverse Nebenwirkungen – z.B. Nephro- und Hepatotoxizitäten – festzustellen (Zoja et al. 2014), die einen Einsatz der bislang konzipierten Strategien Nrf2 abhängiger Chemoprävention in Frage stellen.

Diese Infragestellung wird nun zunehmend auch dadurch genährt, als dass inzwischen die Tumor fördernden Eigenschaften zweifelsohne nachgewiesen sind (Lau et al 2008, Sporn and Liby 2012, Zhang 2010, Sporn & Liby 2012, Geismann et al. 2014). Eine wesentliche Eigenschaft von Nrf2 in diesem Zusammenhang ist dessen induktiver Effekt auf die proteasomale Genexpression und hierüber auf die Proteasomaktivität. Hierdurch werden gerade malignen Zellen entscheidende Wachstumsvorteile

verliehen, vor dem Hintergrund der Tatsache, dass viele regulatorische Signalwege in Tumorzellen von einem hohen Protein-Turnover abhängig sind – z.B. NFKappaB (durch Ikb α) oder auch p53 (durch Mdm2). Entsprechend sind Tumorzellen stark von einer hohen Proteasomaktivität charakterisiert (Ren et al. 2000, Chen and Madura 2005, Rho et al. 2008, Arlt et 2009, Shaughnessy et al. 2011, Yuan et al. 2013) und gleichzeitig potentiell hochsensitiv gegenüber Proteasominhibitoren wie Bortezomib. Als wesentlicher Resistenzmechanismus gegenüber diesen gilt auch hier die Aktivierung von Nrf2 und zusätzlich auch von Nrf1 (Radhakrishnan et al. 2010).

Ein wichtige Folge der amplifizierten Proteasomaktivität in Tumorzellen – wie auch PDAC-Zellen – ist die Protektion vor Apoptose infolge der Heraufregulation NF-kappaB induzierter Gene wie Mcl1 und cIAP1 (Arlt et al. 2009) und entsprechend auch die Entstehung von Chemoresistenz. Eine solche wurde entsprechend mit Nrf2 in diversen Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht darunter NSCLC, PCa, ECa und auch das PDAC (Hong et al. 2010) beschrieben dies für verschiedene PDAC Zelllinien wie AsPC1, Panc1 oder Colo357. So sind diese Zelllinien in Abhängigkeit von Nrf2 resistent gegenüber Gemzitabin und Nrf2 entsprechend als wichtige Determinante der Chemoresistenz auch beim PDAC anzusehen (Lister et al 2011). Vor diesem Hintergrund sind daher Strategien in Betracht zu ziehen, die auf die Inhibition von Nrf2 in Tumorzellen abzielen und hierdurch deren Ansprechen auf Zytostatika erhöhen.

4.2. Strategien der Nrf2 Inhibition

Durch Einsatz verschiedener Nrf2 siRNA oder shRNAs konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Aufhebung der Nrf2 Aktivität in Tumorzellen zur Sensitivierung gegenüber einer Chemo- oder Radiotherapie führt. Dies wurde für Bronchial-, Zervix-, Endometrium-, Kolon-, Magen-, Prostata-, Cholangio- und Leberzellkarzinome gezeigt, sowie auch für das PDAC (Geismann et al. 2014, Ganangomez et al. 2013). Zumindest für diese Tumorentitäten sollte eine Nrf2-Inhibition als Therapiestrategie formuliert werden, um die entsprechenden Resistenzen gegenüber Zytostatika wie z.B. Doxorubicin, Cisplatin 5-FU, Etoposid, CPT11 oder Gemzitabin aufzuheben. Diesbezüglich waren zunächst vorhergehende Beobachtungen von Relevanz nach denen Nrf2 einer negativen Kontrolle durch den Retinoidrezeptor RARa/RXR unterliegt. Entsprechend vermag die Gabe von atRA als spezifischem RARa Liganden die Aktivität von Nrf2 zu inhibieren. Eine ähnliche negative Interferenz wurde auch für den Estrogen receptor related Rezeptor beta (ERR β) beschrieben. Dies untermauert die potentielle Eignung von Nrf2 als zu inhibierendes Ziel in der

Chemo- und Radiosensitivität. Wegen ihrer Eignung in der klinischen Anwendung sind pharmakologische Interventionsoptionen einer Nrf2 Inhibition zu bevorzugen, so dass der Suche nach Nrf2 inhibierenden Substanzen großes Augenmerk zukommt. Die erste Generation solcher potentiellen Inhibitoren umfasste Luteolin (Tang et al. 2011) und Trigonellin (Boettler et al 2011). Letzteres ist ein aus der Kaffeebohne stammendes Alkaloid, Ersteres ein in Sellerie, Petersilie und grünem Paprika vorkommendes Flavonoid. Zusammen mit atRA und einem neu etablierten Agonisten für ERR β , DY131 (Yu & Forman 2005), wurden Luteolin und Trigonellin in Bezug auf ihre Nrf2 hemmende Potenz und ihre Wirkungen auf Proteasomaktivität und Apoptosefähigkeit in PDAC Zellen bzw. Tumoren eingehend untersucht.

4.2.1. Unterschiedliche Effizienz von Luteolin, Trigonellin, atRA und DY131 in Bezug auf die Nrf2 Inhibition

Anhand der PDAC Zelllinien Colo357, Panc1 und MiaPaca2 sowie der prämaligen Pankreasgangzelllinie HPDE wurde nach Erhebung des Nrf2 Status dieser Zelllinien die Hemmeigenschaften der vier Substanzen getestet.

Mittels Westernblots zur Detektion des nukleären Nrf2 Proteins und ARE-Luziferaseassays wurden in Colo357 und Panc1 höhere Basalaktivitäten von Nrf2 nachgewiesen als in MiaPaca2 und HPDE Zellen. Diese Befunde deckten sich mit den Ergebnissen von Hong et al. 2010, und ähnlich wie von diesen publiziert, korrelierte der Nrf2-Status mit der erhöhten Resistenz dieser beiden Zelllinien im Vergleich zu MiaPaca2 und HPDE Zellen. In allen Zelllinien konnte gleichwohl durch die Gabe des Nrf2 Aktivators tBHQ eine Verstärkung der Nrf2 Aktivität erzielt werden und überdies eine deutliche Steigerung der Resistenz gegenüber Zytostatika und TRAIL in den MiaPaca2 und HPDE Zellen.

Die Testung der vier Substanzen in Colo357 und Panc1 Zellen bewirkte lediglich im Falle von Trigonellin eine signifikante Hemmung der basalen wie auch tBHQ induzierten Nrf2 Aktivität und ebenso in MiaPaca2 und HPDE Zellen der tBHQ induzierten Nrf2 Aktivität. Interessanterweise war der Effekt von Trigonellin hinsichtlich seiner Dosis-Wirkungsbeziehung biphasisch, indem zwischen 0.01 und 10 μ M eine zunehmende Nrf2 Inhibition auftrat, bei einer Konzentration über 100 μ M jedoch kein Effekt mehr bestand. Offensichtlich geht von Trigonellin in höherer Konzentration ein divergierender Wirkmechanismus aus als bei niedriger Dosis, der möglicherweise indirekt zur Induktion von Nrf2 beziehungsweise zur Aufhebung des inhibitorischen

Effekts führt. Diese Auffälligkeit in der Dosis-Wirkungsbeziehung wurde auch bereits von Boettler et al (Boettler et al. 2011) beschrieben.

Nur in Colo357 Zellen zeigte die Behandlung mit atRA eine moderate Hemmung von Nrf2, nicht jedoch in Panc1 Zellen. Der Grund für die abweichende Wirksamkeit von atRA ist dabei nicht der fehlenden Responsivität gegenüber Retinoiden oder der Abwesenheit von RARalpha in Panc1 Zellen zuzuschreiben (Guo et al. 2006), sondern unterliegt einer komplexen Modulation der Wirkung von Retinoiden, zum Beispiel durch FABP5 und CABP2 (Gupta et al. 2012). Dies beinhaltet auch die Bildung von Homo- und Heterodimeren (RAR/RXR) von Retinoidrezeptoren, die unterschiedliche Wirkungen gegenüber Nrf2 zeigen können (Wang et al. 2008). Entsprechend ist für atRA auch eine gegenteilige, das heißt Nrf2-aktivierende Wirkung, beschrieben worden. Dies unterstreicht die Problematik des Einsatzes von Retinoidrezeptor-Agonisten auch in Zusammenhang mit einer beabsichtigten Nrf2 Inhibition, da Tumorzellen, einschließlich PDAC-Zellen (Bleul et al. 2014, Gupta et al. 2012) häufig eine kompromittierte Wirkung von Retinoiden und erniedrigte Expressionslevel von Retinoidrezeptoren zeigen. In H6c7-Zellen (moderat inhibitorisch) und MiaPaca2 Zellen (kein Effekt) waren ähnlich abweichende Effekte von atRA auf die tBHQ induzierte Nrf2 Aktivität fest zu stellen (Daten nicht gezeigt), was daraufhin deutet, dass insgesamt die Einsatzmöglichkeit von atRA als Nrf2-Inhibitor stark limitiert oder sogar gänzlich ausgeschlossen zu sein scheint. Umgekehrt sind solche auf Retinoidrezeptoren basierende Therapiekonzepte hinsichtlich ihrer Effizienz und Toxizität durchaus auch vom Nrf2 Status abhängig. So könnte auch die Retinoidtherapie bei gleichzeitiger Nrf2 Hemmung – zum Beispiel durch Trigonellin (s.o) - in seiner Effizienz gesteigert werden.

Eine ebenfalls moderate Inhibition durch DY131 war in Colo357 und Panc1 Zellen gleichermaßen zu beobachten. In beiden Zelllinien war gleichwohl die Expression von ERRβ nicht nachweisbar und darüber hinaus zeigte sich kein Einfluss einer ERRβ-siRNA Vorbehandlung auf den Effekt von DY131 auf die Nrf2 Aktivität (Daten nicht gezeigt). Somit deutet einiges darauf hin, dass DY131 unabhängig von ERRβ zur Hemmung von Nrf2 führen kann. Der zugrundeliegende Mechanismus ist diesbezüglich jedoch vollkommen unbekannt. Darüber hinaus ist grundsätzlich der Zusammenhang von Östrogenrezeptoren und der Aktivität von Nrf2 sehr komplex. Östrogen ist durch verschiedene Vorgänge an der Karzinogenese beteiligt und es ist

bekannt, dass oxidative Östrogen-Metaboliten selbst reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren (Gaikwad et al 2009) und somit die Karzinogenese direkt stimulieren können. Durch die Induktion detoxifizierender Enzyme trägt Nrf2 wesentlich zur Entgiftung dieser toxischen Agenzien und damit zur Tumorprotektion bei (Yao et al 2010). Hierbei kommt der differenziellen Wirkung der Östrogenrezeptoren auf Nrf2 große Bedeutung zu. Während ERalpha in der Lage ist, Nrf2 Aktivität zu inhibieren (Ansell et al 2005), geht von ERbeta eine Nrf2-induzierende Wirkung aus (Gorrini et al 2014, Montano et al 2004, Zhang et al 2013).

Keine Wirkung auf Nrf2 ging von Luteolin aus, obgleich verschiedene Autoren eine Nrf2 inhibierende und chemosensitivierende Wirkung für diese Substanz berichtet haben (Tang et al. 2011, Chian et al. 2014, Sabzichi et al. 2014). Im Gegensatz dazu ist aber auch ein Nrf2 aktivierender Effekt von Luteolin beobachtet (Lin et al. 2010, Xu et al. 2014, Sun et al. 2012) und hierdurch eine entsprechend tumorpräventive Wirkung beschrieben worden (Pandurangan et al. 2014). Darüber hinaus ist Luteolin in gleicher Dosis bekanntermaßen auch effektiv gegenüber anderen Signalwegen und regulatorischen Proteinen. Hierzu zählt beispielsweise der PI3K/Akt-Signalweg, p38 oder NFκ-B (Park & Song 2013, Chen et al. 2013, Xia et al 2014). Somit kann das Ausbleiben des Nrf2 inhibierenden Effektes von Luteolin in den hier getesteten Zelllinien auf eine Überlagerung der unterschiedlichen Effekte von Luteolin zurückzuführen sein.

4.2.2. Wirkungsmechanismus von Trigonellin in Bezug auf Nrf2 und die Nrf2-abhängige Proteasomaktivität

Die weitere Charakterisierung von Trigonellin hinsichtlich seiner Wirkungsweise auf Nrf2 ergab zunächst, dass die Expression von Nrf2 selbst weder auf mRNA noch auf Proteinebene vermindert wurde. Dies unterscheidet Trigonellin von anderen Nrf2-Inhibitoren wie auch Luteolin, das laut der Studie von Tang et al. direkt eine Reduktion der Nrf2 mRNA bewirkt (Tang et al. 2011). Gleichwohl konnte der diesbezügliche Mechanismus bislang nicht geklärt werden. In hoher Dosis ist zu einem solchen Effekt auch Epigallocatechin 3-gallat in der Lage (Kweon et al. 2006) oder IM3829, eine vor kurzem vorgestellte synthetische Substanz mit Nrf2 inhibierender Wirkung (Lee et al. 2012). Brusatol, ein ebenfalls pflanzlicher Wirkstoff führt zu einer verstärkten Polyubiquitinierung von Nrf2, was eine forcierte Nrf2 Degradation und damit erniedrigte Nrf2 Expression bedingt (Ren et al. 2011). Der PI3K Inhibitor PIK-75 wurde

kürzlich ebenfalls als Nrf2 Inhibitor beschrieben und als Sensitizer gegenüber Gemcitabin in PDAC Zellen dargestellt (Duong et al. 2014). Die Autoren beobachteten dabei eine Destabilisierung von Nrf2 auf Proteinebene, ein Effekt der auf den PI3K/Akt Signalweg zurückzuführen sein könnte. So führt Akt zur Unterdrückung des nukleären Exportes von Nrf2 und über die Retention von Nrf2 im Zellkern damit indirekt zur Erhöhung des Nrf2 Proteingehaltes (Kannan and Jaiswal 2006, Niture & Jaiswal 2009, Niture 2011, Stachel et al. 2014).

Um zu überprüfen, ob Trigonellin den nukleären Im- oder Export von Nrf2 und damit dessen Aktivität beeinflusst, wurde der Effekt von Trigonellin auf die nukleär-zytoplasmatische Verteilung des Nrf2 Proteins in An- oder Abwesenheit des Crm1-Inhibitors Leptomycin B untersucht. Hierbei ließ sich kein Unterschied in der Unterdrückung der nukleär-zytoplasmatischen Verteilung von Nrf2 durch Trigonellin feststellen, wie auch kein Unterschied in der Suppression der Nrf2 induzierten Luziferaseaktivität. Auch bei zusätzlicher Gabe des Proteasominhibitors MG132 zur Unterdrückung einer über nukleäres Keap1 bedingten Degradation von Nrf2 im Zellkern (Kannan and Jaiswal 2006) blieb der unter Trigonellin zu beobachtende Effekt auf die Menge an nukleärem Nrf2 unverändert. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass der Nrf2-inhibierende Effekt von Trigonellin auf eine Blockade des Imports von Nrf2 in den Zellkern beruht. Hierfür sind posttranslationale Modifikationen von Nrf2 verantwortlich, vor allem die Ser-40 Phosphorylierung, durch welche Nrf2 in Keap1-ungebundener Form vorliegt und einer Translokation in den Zellkern frei zugänglich ist. Als hierfür verantwortliche Kinase ist PKC δ identifiziert worden (Bloom & Jaiswal 2003), gleichwohl ist Trigonellin nicht zur direkten Hemmung von PKC δ befähigt (H. Schäfer, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise bewirkt Trigonellin eine Blockade der Interaktion von PKC δ mit Nrf2, was aber bislang noch eines Nachweises bedarf.

Als Konsequenz der verminderten Präsenz von Nrf2 im Zellkern der mit Trigonellin behandelten H6c7 oder PDAC Zellen verringerte sich entsprechend auch die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen unter Kontrolle des Antioxidant-Response-Elements (ARE) oder auch Electrophil-Response-Element (EpRE). Daher war die Expression von ausgewählten Zielgenen wie GCLC sowohl basal (in Colo357 oder Panc1 Zellen) als auch unter tBHQ-Behandlung (Miapca2, H6c7) durch Trigonellin deutlich vermindert. Neben den antioxidativen Genen, die unter Kontrolle durch Nrf2 stehen, sind hierbei auch eine Reihe proteasomaler Gene zu nennen (Malhorta et al

2009). Sowohl die Expression der insgesamt 14 Proteine (7 alpha und 7 beta Proteine) der katalytischen 20S Untereinheit als auch 16 von 21 Proteinen der regulatorischen 19S Untereinheit des 26S-Proteasoms sind über das ARE durch Nrf2 induzierbar (Kwak et al. 2003, Kwak et al. 2006, Arlt et al. 2009, Pickering et al. 2012). Dies hat seine Bedeutung vornehmlich darin, dass unter Einfluss von oxidativem Stress ein erhöhter Bedarf an der proteolytischen Entfernung oxidierter Proteine besteht, was weniger durch das 26S-Proteasom als durch die 20S Untereinheit geschieht (Davies 2001). Da Nrf2 selbst ein Ziel proteasomaler Degradation darstellt, ist vor allem die kompromittierte Proteasomaktivität infolge der oxidativen Schädigung bestimmter proteasomaler Proteine ein wesentliches Feedback-Regulativ. So kommt es durch oxidative Schädigung bestimmter Proteine der 19S Untereinheit (z.B: Rpt1, Rpn2) zur Dissoziation des 26S-Proteasoms (Kurepa et al. 2008), wobei die freie 20S Untereinheit lediglich zur Ubiquitin-unabhängigen, jedoch für die Beseitigung oxidierter (toxischer) Proteine essentiellen, Proteindegradation befähigt ist (Jung & Grune et al. 2013). Zugunsten dieser Detoxifikation sind hingegen die regulierten proteasomalen Abbauege unter Kontrolle der Polyubiquitinierung in ihrer Funktion beeinträchtigt. Dies hat neben der Retardierung diverser Prozesse der zellulären Signalvermittlung auch eine Depletion des freien Ubiquitins zur Folge, da dieses im Rahmen der 26S-Proteasomaktivität durch die Prozessierungsschritte des polyubiquitinierten Substrates in den Ubiquitinpool der Zelle zurückgeführt wird.

Entsprechend seiner Nrf2-inhibierenden Wirkung führte Trigonellin auch zur

Hemmung der Expression proteasomaler Proteine, wie in der vorliegenden Arbeit exemplarisch für das 19S Protein s5a und das 20S-Protein alpha5 gezeigt wurde. Einhergehend damit bewirkte Trigonellin auch eine Reduktion der Proteasomaktivität sowohl in den nicht stimulierten, jedoch von konstitutiver Nrf2 Aktivität charakterisierten Panc1 und Colo357 Zellen, als auch in tBHQ-stimulierten MiaPacac2 oder H6c7 Zellen. Die Nrf2 Abhängigkeit manifestierte sich darüber hinaus darin, dass in Gegenwart von Nrf2 siRNA die Effekte von Trigonellin auf die Proteasomaktivität aufgehoben waren. Demgegenüber war Trigonellin diesbezüglich weiterhin von Wirkung, wenn die PDAC oder H6c7 Zellen mit Nrf1 siRNA behandelt worden waren. Da Nrf1 ebenfalls für die Regulation der proteasomalen Genexpression verantwortlich ist, insbesondere aber zum Erhalt basaler Proteasomaktivität (Steffen et al. 2010) weniger jedoch für die stressadaptierte Proteasomaktivität verantwortlich ist, greift Trigonellin somit bei letzterem über eine Nrf2-Hemmung inhibitorisch ein.

4.3. Trigonellin als Sensitizer gegenüber Todesliganden und Zytostatika

Als wesentliche Auswirkung der Nrf2 Inhibition durch Trigonellin war eine Verstärkung der Apoptosesensitivität der PDAC und der H6c7 Zellen zu vermuten. In der Tat war in den Zelllinien mit erhöhter Nrf2 Basalaktivität (Colo357 und Panc1) die Resistenz gegenüber TRAIL deutlich höher als in MiPaca2 und H6c7 mit nur geringer Nrf2-Basalsaktivität. In letzteren Zelllinien wie auch in Colo357 und Panc1 Zellen war nach Zugabe des Nrf2 Aktivators tBHQ entsprechend die Sensitivität gegenüber TRAIL induzierter Apoptose vermindert beziehungsweise die Resistenz weiter verstärkt. Auch gegenüber Zytostatika war dies festzustellen, was anhand des Topoisomerase-2 Inhibitors Etoposid gezeigt werden konnte. Dessen Wirkung ist in PDAC Zellen durch eine profunde Resistenz unterdrückt, erfährt jedoch gegenüber anderen Zytostatika wie Gemcitabin eine stärker ausgeprägte Steigerung in Gegenwart von Sensitizern, wie dies in vergangenen Studien bereits für Proteasominhibitoren oder den IKK Inhibitor Sulfasalazin gezeigt wurde (Arlt et al. 2001, Muerköster et al. 2003).

In Gegenwart von Trigonellin kam es in allen Zelllinien entweder in An- oder Abwesenheit von tBHQ zu einer deutlichen Zunahme der TRAIL oder Etoposid induzierten Apoptose beziehungsweise zur Unterdrückung der resistenzinduzierenden Wirkung von tBHQ (MiaPaca2 und H6c7 Zellen). Als Parameter für Apoptose wurden zum einen die Aktivität der Effektor-Caspasen Caspase-3 und -7 direkt gemessen, zum anderen auch die Spaltung des Caspase Substrates PARP-1.

4.3.1. Aufhebung der Nrf2-bedingten Apoptoseprotektion durch Trigonellin und Einfluss des Proteasomsystems

Die Nrf2 Abhängigkeit des Apoptose steigernden bzw. Resistenz verminderten Effektes der Trigonellin Behandlung konnte durch eine zuvor vorgenommene Nrf2 siRNA nachgewiesen werden. Unter Suppression der Nrf2 Expression war die Resistenz von Colo357 und Panc1 Zellen beziehungsweise der mit tBHQ behandelten MiaPaca2 und H6c7 bereits deutlich unterdrückt und Trigonellin führte zu keiner weiteren Sensitivierung. Demgegenüber war nach dem Silencing der Nrf1 Expression keine Veränderung der Apoptoseverhaltens aller untersuchten Zelllinien zu beobachten, was die Spezifität der Wirkung von Trigonellin bezüglich Nrf2 unterstreicht. Dies hatte sich bereits in Zusammenhang mit dem Effekt von Trigonellin auf die Proteasomaktivität gezeigt, so dass von letzterer in entscheidendem Maße die

sensitivierende Wirkung von Trigonellin gegenüber Apoptose abhängen könnte. Dies wurde dadurch bewiesen, dass auch in Gegenwart spezifischer siRNAs gegen zwei essentielle Untereinheiten des 26S Proteasoms - der katalytischen Komponente alpha5 und der regulatorischen Komponente s5a – nicht nur eine Aufhebung der basalen beziehungsweise tBHQ induzierten Apoptoseresistenz zeigte, sondern auch eine Aufhebung des sensitivierenden Effektes von Trigonellin. Eine solche Apoptosesensitivierung ist entsprechend auch mittels Proteasominhibitoren wie Mg132 oder Bortezomib zu erzielen deren hauptsächliche Wirkung diesbezüglich auf der Blockade proteasomabhängiger Überlebens- und Wachstumssignale, wie den I κ B α /NF κ B Weg oder den Anaphase-promoting-complex. Da der durch Trigonellin bewirkte Effekt auch gegenüber TRAIL induzierter Apoptose besteht, ist durch diesen Wirkstoff im Gegensatz zu den sensitivierenden Effekten anderer Nrf2 Inhibitoren somit ein fundamentaler Apoptoseschutz aufgehoben. Als ein Einfluss über die proteasomale Genexpression hinaus ist zudem die beobachtete Suppression weiterer Nrf2-Zielgene aus der Gruppe anti-oxidativer (z.B. GCLC) oder Phase-II Enzyme (z.B. NQO1) als zusätzlicher Wirkmechanismus von Trigonellin gegenüber Zytostatika zu vermuten. Ein weiterer antiapoptotischer Mechanismus der durch Nrf2 direkt induziert werden kann, ist die Expression von Bcl2 und Bcl-xL. Durch die Auswirkung von Nrf2 auf die Proteasomaktivität und dadurch auf NF- κ B ist jedoch der direkte Effekt auf Bcl2 und Bcl-xL als gleichzeitige Zielgene von NF- κ B vermutlich durch letzteres überlagert (Arlt et al. 2009) und somit von untergeordneter Bedeutung. Durch seine nachweisliche Wirkung auf die Nrf2 regulierte Proteasomaktivität entfaltet sich das die Chemoresistenz vermindernde Potential von Trigonellin somit auf einer eher übergeordneten Ebene, was die Wahrscheinlichkeit einer Manifestation von kompensatorischen Mechanismen in Tumorzellen minimieren sollte.

Für eine Reihe anderer Nrf2-hemmender Substanzen wurde hingegen ausschließlich eine Unterdrückung der Detoxifikation von Zytostatika beschrieben. Das schon oben erwähnte PIK-75 entfaltet seine Chemoresistenz aufhebende Wirkung in PDAC-Zellen über die verminderte Induktion des Multi Drug Resistance (MDR) Gens MRP5, das zur Aufhebung der Wirkung von Gemcitabin führt (Duong et al. 2013). Über MRP5 und Aldoketoreduktase AKR1B10 wird offensichtlich auch die sensitivierende Wirkung der kürzlich beschriebenen Nrf2-Inhibitoren Chrysin, Wogonin und Apigenin gegenüber Doxorubicin in Leber- und Mammakarzinomzellen vermittelt (Gao et al. 2013a, Gao et al. 2013b, Zhong et al 2013). Ein anderer Wirkstoff - das Brusatol - entfaltet in

Lungenkarzinomzellen eine sensitivierende Wirkung gegenüber Cisplatin indem es dessen Nrf2 abhängige Glutathion-Konjugierung und damit den zellulären Export verhindert (Ren et al. 2011). Wahrscheinlich auf ähnlichen Effekten beruht die sensitivierende Wirkung von Luteolin gegenüber Zytostatika wie Bleomycin, Oxaliplatin oder Doxorubicin in Lungenkarzinomzellen und auch anderen Tumorzelllinien (Chian et al. 2014, Sabzichi et al. 2014).

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie mit Trigonellin fehlen für die oben genannten Wirkmechanismen der anderen Nrf2-Inhibitoren allerdings bislang ein direkter Nachweis der mutmaßlich beteiligten Nrf2-Zielgene, z.B. anhand entsprechender siRNA/shRNA- basierter Kontrollversuche analog zu den alpha5 und s5a siRNA Versuchen mit Trigonellin. Für andere Nrf2-Inhibitoren ist der genaue Mechanismus einer verstärkten Therapieantwort bislang nicht bekannt, zum Beispiel für IM3829.

4.3.2. Vorteile des Einsatzes von Trigonellin und Perspektiven auf diesem Wirkstoff basierender Therapiestrategien in der Onkologie

Auch wenn die Dualität der Rolle von Nrf2 in der Tumorgenese nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussion ist und obgleich Nrf2 als zu induzierendes Ziel für Präventionsstrategien potentiell geeignet erscheint, wird die Sicherheit einer dauerhaften Applikation von Nrf2 Induktoren beim Menschen zunehmend in Frage gestellt. Vielmehr besteht in einer fehlenden Regulation von Nrf2 auf Dauer ein signifikantes tumorigenes Risiko so dass Präventionskonzepte kritisch zu hinterfragen sind. Gesichert scheint diesbezüglich, dass Nrf2 zur Konsolidierung eines malignen Phänotyps maßgeblich beitragen kann (Shelton & Jaiswal 2013, DeNicola et al. 2011), was vornehmlich auf den vielfältigen zytoprotektiven Effekten beruht (s.o.), die von Nrf2 ausgehen und die sich Tumorzellen häufig zu eigen machen. Dies betrifft auch die Resistenz gegenüber Zytostatika, die wie oben dargelegt über diverse Zielgene von Nrf2 vermittelt wird, so dass Nrf2 Inhibitoren zweifelsohne von großem Interesse und entsprechend mittlerweile eine Vielzahl von Substanzen diesbezüglich untersucht worden sind.

Ein Vergleich mit den anderen oben dargestellten Nrf2 inhibierenden Substanzen zeigt, dass Trigonellin durch seine profunde Wirkung auf Nrf2 sowie die dadurch bewirkte Blockade eines essentiellen Überlebensmechanismus - die stressadaptierte Proteasomaktivität - von gleicher Effizienz bei der Aufhebung von Chemoresistenz ist. Dies wurde nicht zuletzt im Mausmodell von Colo357 und Panc1 Tumoren

eindrucksvoll belegt, wo Trigonellin das Ansprechen auf Etoposid dramatisch steigern konnte, ohne selbst nennenswerte toxische Effekte zu offenbaren. Dies steht im Einklang mit einer Vielzahl anderer Studien, die Trigonellin in vivo untersucht haben. So konnte für Trigonellin beispielsweise im Mausmodell eine schützende Wirkung vor einer diabetischen Hypertonie und hypertensiver Nephropathie gezeigt werden, die auf einer Inhibition von Nrf2 beruht (Abdo et al, 2014). Ein wesentlicher Vorteil von Trigonellin ist zudem, dass der Wirkmechanismus hinsichtlich der Apoptosesensitivierung geklärt werden konnte und daher auch etwaige Resistenzphänomene, wie sie etwa für Brusatol beschrieben wurden, (Ren et al 2011) gegebenenfalls leichter erkannt werden können. Diese Ergebnisse unterstreichen die Eignung von Trigonellin in Bezug auf seine gesteigerte Effektivität der Anti-Tumor-Antwort auf Chemotherapeutika.

Unter der Maßgabe, dass Nrf2 gerade bei ausgeprägt chemoresistenten Tumorentitäten wie dem PDAC eine wichtige molekulare Determinante darstellt, die in >90% der PDACs dereguliert ist, sollte eine Inhibition von Nrf2 zur Sensitivierung gegenüber Zytostatika nachdrücklich in Betracht gezogen werden (Hong et al. 2010, Lister et al. 2011). Da zudem der Zusammenhang von Malignität und einer amplifizierten Proteasomaktivität ebenfalls sehr häufig in soliden Tumoren beobachtet wird, Proteasominhibitoren gleichwohl ohne nachhaltige therapeutische Wirkung sind, stellt die Inhibition von Nrf2 als wichtigem Regulator der proteasomalen Genexpression einen bedeutenden Angriffspunkt von Trigonellin dar, der mit besonderer Effizienz gerade maligne Zellen betreffen sollte. Hierdurch ist möglicherweise eine gute Toleranz nichtmaligner Zellen gegenüber Trigonellin zu erklären, die sich in der fehlenden Toxizität in den bislang erfolgten in vivo Testungen ausdrückt. So wurden keine gegenteiligen Effekte beobachtet in zwei Studien am Menschen zur verbesserten Behandlung von Diabetes und dem metabolischen Syndrom (Olthof et al 2011, van Dijk et al 2009). Somit erscheint eine rasche Testung von Trigonellin in klinischen Studien zur verbesserten Chemotherapie bei PDAC Patienten sehr sinnvoll und aussichtsreich.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt, bedingt durch seine Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie, einen schwierig und wenig erfolgreich therapierbaren Tumor dar. Durch seine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer Vielzahl zytostatischer Medikamente, ist derzeit beim metastasierten bzw. lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom die Gemcitabin Monotherapie das Therapeutikum der Wahl wodurch jedoch lediglich eine Prognose-verbesserung von 18-20% für die 1-Jahres-Überlebensrate möglich wird. Als Alternative wird derzeit bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und günstigem Risikoprofil eine Kombination von 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll angewendet werden. Das mediane Überleben kann hierbei zwar von 6,8 auf 11,1 Monate verlängert werden, was hingegen mit deutlich erhöhter Toxizität einhergeht. Demzufolge ist die Erforschung der molekularen Vorgänge in Pankreaskarzinomzellen immer wieder Inhalt klinischer Studien, um für die Zukunft geeignete Therapien zu finden. Die ausgeprägte Therapieresistenz des pankreatischen Adenokarzinoms wird neben Mutationen in Protoonkogenen (K-Ras, B-Raf) oder Tumorsuppressorgenen (z.B. PTEN, p53) vor allem durch Veränderungen in der Signaltransduktion und hierbei die Aktivität von bestimmten Transkriptionsfaktoren verursacht. So wurde in malignen und prämaligen Pankreasepithelzellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 als wichtiger Mechanismus zur Adaptation an oxidativen Stress identifiziert. Aufgrund der durch Nrf2 vermittelten Protektion gegenüber zellulärer Schädigung, aber auch Apoptose, ist Nrf2 wesentlich an malignen Eigenschaften von Tumorzellen und deren Resistenz gegenüber Chemotherapie beteiligt. Eine Verringerung des Aktivitätsniveaus von Nrf2 erscheint somit als attraktiver Angriffspunkt, um die ausgeprägte Chemoresistenz von PDAC Zellen reduzieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst vier Substanzen mit beschriebener Nrf2 hemmender Wirkung (atRA, DY131, Luteolin und Trigonellin) in den PDAC Zellen Panc1, Colo357 und MiaPcac2 sowie in der prämaligen Gangepithelzelllinie H6c7 vergleichend untersucht. Sowohl in den bereits durch hohe Nrf2 Basalaktivität und Chemoresistenz ausgewiesenen Panc1 und Colo357 Zellen als auch in Nrf2 induzierten (tBHQ Behandlung) und gegenüber Zytostatika desensitivierten MiaPaca2 und H6c7 Zellen zeigte Trigonellin im Vergleich zu atRa, DY131 und Luteolin die größten Effekte auf die Reduktion der basalen bzw. induzierten Nrf2-Aktivität. Dies

wurde durch Abnahme der nukleären Nrf2 Expression und der Reduktion der Nrf2 abhängigen Promotoraktivierung (ARE-Luziferase) nachgewiesen.

Bei der Herausarbeitung des Wirkmechanismus von Trigonellin ergab sich, dass es zu keiner Verringerung der Nrf2-Konzentration auf mRNA- und Proteinebene kommt. Somit war zu überprüfen, ob eine Hemmung der Nrf2-Aktivität durch Trigonellin Folge eines veränderten nukleären Im- und Exportes von Nrf2 ist. Dazu wurde der Effekt von Trigonellin auf die nukleäre und zytoplasmatische Verteilung des Nrf2-Proteins überprüft. Durch Leptomycin B, einem Inhibitor des nukleären Crm1 Exportproteins, welches Nrf2 zusammen mit Keap1 aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert, ließ sich kein Unterschied in der nukleär/zytoplasmatischen Verteilung oder in der Suppression der ARE Luziferaseaktivität von Nrf2 unter Trigonellin feststellen. Ebenso blieb der Effekt von Trigonellin auf die Menge des nukleären Nrf2 Protein nach Zugabe des Proteasominhibitors MG132, der die Degradation von zuvor exportiertem Nrf2 Protein verhindert, unverändert. Dies deutete eindeutig daraufhin, dass die Nrf2-inhibierende Wirkung von Trigonellin auf einer Blockade des Imports von Nrf2 in den Zellkern beruht. Eine weitere wichtige Wirkung von Trigonellin infolge der Hemmung der Nrf2-Aktivität war eine Suppression der Expression von s5a und alpha 5, beides Zielgene von Nrf2 sowie wichtige Bestandteile des 26S-Proteasoms und damit der Proteasomaktivität. Die Spezifität dieses Effektes wurde mit Hilfe von siRNA deutlich gemacht. Bei den mit Nrf2-siRNA stimulierten Zellen blieb ein Effekt auf die Proteasomaktivität nach der Trigonellinbehandlung aus.

Durch diese Nrf2- und Proteasom-hemmende Wirkung bedingt Trigonellin weiterhin eine deutlichen Apoptosezunahme von PDAC und H6c7 unter Einfluss von TRAIL und dem Zytostatikum Etoposid (mit dem erfahrungsgemäß die größten Wirkungen in sensitivierten PDAC Zellen erzielt werden), wie anhand der Aktivität der Effektor-Caspasen Caspase-3 und -7 und der Spaltung des Caspase Substrates PARP-1 bestätigt wurde. Auch die Apoptose steigernden Effekte durch Trigonellin wurden mit Hilfe von siRNA auf eine Nrf2 Abhängigkeit überprüft. So führte Trigonellin nach Suppression der Nrf2 Expression zu keiner Sensitivierung der PDAC und H6c7 Zellen. In ähnlicher Weise unterlag der Apoptose fördernde Effekt von Trigonellin einem Einfluss einer Behandlung mit siRNAs gegen s5a und alpha 5. Die hiermit nachgewiesene Wirkung von Trigonellin auf eine durch Nrf2 regulierte Proteasomaktivität machte deutlich, dass Trigonellin direkt auf die Chemoresistenz der PDAC und H6c7 Zellen einwirken kann. Dies konnte auch durch Versuche an

Mausmodellen eindrucksvoll bestätigt werden, bei denen subkutan inokulierte Colo357 und Panc1 Tumore nach der Kombinationsbehandlung mit Etoposid und Trigonellin eine signifikante Remission zeigten, was bei der alleinigen Etoposidtherapie nicht der Fall war.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die in vielen malignen Tumorentitäten, so auch im Pankreaskarzinom, dysregulierte Nrf2-Aktivität als wichtiger Angriffspunkt hinsichtlich der Aufhebung von Chemosensitivität angesehen werden kann. Somit erscheint eine Modulation der Aktivität mit Nrf2 hemmenden Substanzen wie Trigonellin als eine aussichtsreiche Strategie zur Steigerung der Effektivität einer Therapie des Pankreaskarzinoms.

6. Literaturverzeichnis

Abdo S, Shi Y, Otoukesh A, Ghosh A, Lo CS, Chenier I, Filep JG, Ingelfinger JR, Zhang SL, Chan JS (2014). Catalase Overexpression Prevents Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Stimulation of Renal Angiotensinogen Gene Expression, Hypertension and Kidney Injury in Diabetic Mice. *Diabetes*. 2014 Oct;**63(10)**:3483-96.

Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, Ternette N, Sahgal N, Lockstone H *et al* (2011). Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* **20**: 524-537.

Akhdar H, Loyer P, Rauch C, Corlu A, Guillouzo A, Morel F (2009). Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. *Eur J Cancer* **45**: 2219-2227.

Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Folsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE *et al* (2001). Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* **20**: 859-868.

Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR *et al* (2003). Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* **22**: 3243-3251.

Arlt A, Minkenberg J, Kruse ML, Grohmann F, Folsch UR, Schafer H (2007). Immediate early gene-X1 interferes with 26 S proteasome activity by attenuating expression of the 19 S proteasomal components S5a/Rpn10 and S1/Rpn2. *Biochem J* **402**: 367-375.

Ansell PJ, Lo SC, Newton LG, Espinosa-Nicholas C, Zhang DD, Liu JH *et al* (2005). Repression of cancer protective genes by 17beta-estradiol: ligand-dependent interaction between human Nrf2 and estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol* **243**: 27-34.

Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Folsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE *et al* (2001). Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* **20**: 859-868.

Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR *et al* (2003). Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* **22**: 3243-3251.

Arlt A, Bauer I, Schafmayer C, Tepel J, Muerkoster SS, Brosch M *et al* (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, Schafer H, Kalthoff H (2012). The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF-kappaB, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis* **1**: e35.

Arlt A, Muerkoster SS, Schafer H (2013). Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Lett* **332**: 346-358.

Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse ML *et al* (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* **32**: 4825-4835.

Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV (2014). Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival *Mol Carcinog*. Apr 11. doi: **10.1002/mc.22158**

Bloom DA, Jaiswal AK (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression *J Biol Chem*. **278(45)**:44675-82

Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V *et al* (2011). Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res* **55**: 798-802.

Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V *et al* (2011). Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J Nutr Biochem* **22**: 426-440.

Chen KC, Chen CY, Lin CR, Yang TY, Chen TH, Wu LC, Wu CC. Luteolin attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells by interfering in the PI3K/Akt-NF- κ B-Snail pathway. *Life Sci*. 2013 Dec 5;93(24):924-33.

Chen L, Madura K. (2005). Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res*. **65**: 5599-5606

Chian S, Li YY, Wang XJ, Tang XW (2014). Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs via inhibition of the Nrf2 pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;**15**(6):2911-6,

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y *et al* (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* **364**: 1817-1825.

Cowan RW, Maitra A (2014). Genetic progression of pancreatic cancer. *Cancer J* **20**: 80-84.

Davies KJ (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochemie*. **83**(3-4):301-10.

DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K *et al*. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011. **475**: 106-109.

Du ZX, Yan Y, Zhang HY, Liu BQ, Gao YY, Niu XF *et al* (2011). Proteasome inhibition induces a p38 MAPK pathway-dependent antiapoptotic program via Nrf2 in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E763-771.

Duong HQ, Yi YW, Kang HJ, *et al*. Inhibition of NRF2 by PIK-75 augments sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Oncol*. 2014;**44**(3):959-969.

Eades G, Yang M, Yao Y, Zhang Y, Zhou Q (2011). miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J Biol Chem* **286**: 40725-40733.

Elangovan M, Oh C, Sukumaran L, Wojcik C, Yoo YJ (2010). Functional differences between two major ubiquitin receptors in the proteasome; S5a and hRpn13. *Biochem Biophys Res Commun* **396**: 425-428.

Fritsche P, Seidler B, Schuler S, Schnieke A, Gottlicher M, Schmid RM *et al* (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut* **58**: 1399-1409.

Gaikwad NW, Yang L, Rogan EG, Cavalieri EL (2009). Evidence for NQO2-mediated reduction of the carcinogenic estrogen ortho-quinones. *Free Radic Biol Med* **46**: 253-262.

Ganan-Gomez I, Wei Y, Yang H, Boyano-Adanez MC, Garcia-Manero G. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2013;**65**:750-764

Gao AM, Ke ZP, Shi F, Sun GC, Chen H. (2013a) Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chem Biol Interact*. **206**(1):100-108.

Gao AM, Ke ZP, Wang JN, Yang JY, Chen SY, Chen H. (2013b) Apigenin sensitizes doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma BEL-7402/ADM cells to doxorubicin via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Carcinogenesis*. **34**(8):1806-1814

Geismann C, Arlt A, Sebens S, Schäfer H. Cytoprotection gone astray: the role of Nrf2 in cancer. (2014). *Oncol Target Ther.*7, 1497-1518.

Gorrini C, Gang BP, Bassi C, Wakeham A, Baniasadi SP, Hao Z *et al* (2014). Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K-NRF2-regulated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 4472-4477.

Guo JM, Xiao BX, Lou YR, Wang DH, Yan CH, Zhan L, Zhao WH (2006). The effects of all-trans-retinoic acid on cell cycle and alkaline phosphatase activity in pancreatic cancer cells. *Med Chem.* **(5)**:457-461.

Gupta S, Pramanik D, Mukherjee R, Campbell NR, Elumalai S, de Wilde RF, Hong SM, Goggins MG, De Jesus-Acosta A, Laheru D, Maitra A (2012). Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer *Clin Cancer Res.* **18(1)**:280-289.

Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2010;**13(11)**:1713-1748.

Hayes JD, McMahon M (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* **34**: 176-188.

Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L (2012). Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **18**: 1286-1294.

Hohn TJ, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol.* 2014;**2**:388-394.

Hong YB, Kang HJ, Kwon SY, Kim HJ, Kwon KY, Cho CH *et al*. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 regulates drug resistance in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2010. **39**: 463-472

Hruban RH, Maitra A, Schulick R, Laheru D, Herman J, Kern SE *et al* (2008). Emerging molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res* **2**: S10-15.

Hu XT, Chen W, Zhang FB, Shi QL, Hu JB, Geng SM *et al* (2009). Depletion of the proteasome subunit PSMA7 inhibits colorectal cancer cell tumorigenicity and migration. *Oncol Rep* **22**: 1247-1252.

Hu Y, Ju Y, Lin D, Wang Z, Huang Y, Zhang S *et al* (2012). Mutation of the Nrf2 gene in non-small cell lung cancer. *Mol Biol Rep* **39**: 4743-4747.

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

Jiang T, Chen N, Zhao F, Wang XJ, Kong B, Zheng W *et al* (2010). High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* **70**: 5486-5496.

Jung T, Grune T (2103). The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I-structure of proteasomes. *Redox Biol.* 1(1):178-82.

Kang KW, Lee SJ, Kim SG. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(11-12):1664-1673.

Kannan S, Jaiswal AK (2006). Low and high dose UVB regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2. *Cancer Res* **66**: 8421-8429.

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, 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.

Kim J, Cha YN, Surh YJ (2010a). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* **690**: 12-23.

Kim SK, Yang JW, Kim MR, Roh SH, Kim HG, Lee KY *et al* (2008). Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* **45**: 537-546.

Kim TH, Hur EG, Kang SJ, Kim JA, Thapa D, Lee YM *et al* (2011). NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α . *Cancer Res* **71**: 2260-2275.

Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY *et al* (2010b). Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* **220**: 446-451.

Kinch L, Grishin NV, Brugarolas J (2011). Succination of Keap1 and activation of Nrf2-dependent antioxidant pathways in FH-deficient papillary renal cell carcinoma type 2. *Cancer Cell* **20**: 418-420.

Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Fountzilas E, Francoeur N, Sanisetty S, Grammatikos AP *et al* (2011). Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **71**: 5081-5089.

Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep* **31**: 109-139.

Kurepa J, Toh-E A, Smalle JA (2008). 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *Plant J*. 53(1):102-14.

Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* **22**: 2883-2892.

Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW (2003a). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **23**: 8786-8794.

Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003b). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* **278**: 8135-8145.

Kwak MK, 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.

Kwak MK, Kensler TW (2010). Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;**244(1)**:66-76.

Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H (2006). Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem*. 2006;**281(44)**:33761-33772.

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

Lee S, Lim MJ, Kim MH, et al (2012). An effective strategy for increasing the radiosensitivity of Human lung Cancer cells by blocking Nrf2-dependent antioxidant responses. *Free Radic Biol Med*. 2012;**53(4)**:807-816.

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* **363**: 1049-1057.

Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD, Yen JH (2010). Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *J Agric Food Chem* **58**: 4477-4486.

Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR, Campbell F, Costello E, Lloyd B *et al* (2011). Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol Cancer* **10**: 37.

Liu J, Gu X, Robbins D, *et al*. Protandim, a fundamentally new antioxidant approach in chemoprevention using mouse two-stage skin carcinogenesis as a model. *PLoS One*. 2009;4(4):e5284.

Maitra A, Hruban RH (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* **3**: 157-188.

Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, *et al*. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012;22(1):66-79.

Montano MM, Deng H, Liu M, Sun X, Singal R (2004). Transcriptional regulation by the estrogen receptor of antioxidative stress enzymes and its functional implications. *Oncogene* **23**: 2442-2453.

Müerköster, S., Arlt, A., Gehrz, A., Witt, M., Haye, S., March, C., Wegehenkel, K., Grohmann, F., Kalthoff, H., Fölsch, U.R. & Schäfer, H. (2003). Usage of the NFκB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Intl. J. Cancer* **104**: 469-476.

Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. (2004). Tumorstroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* **64**: 1331-7.

Müerköster, S., Arlt A., Sipos, B., Witt, M., Großmann, M., Klöppel, G., Kalthoff H., Fölsch UR, & Schäfer, H. (2005). Increased expression of the E3-ubiquitin ligase

receptor subunit β TRCP1 relates to constitutive NF-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*, **65**: 1316-24

Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* **280**: 32485-32492.

Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**: 13291-13295.

Nieto J, Grossbard ML, Kozuch P (2008). Metastatic pancreatic cancer 2008: is the glass less empty? *Oncologist* **13**: 562-576.

Nioi P, Nguyen T (2007). A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 816-821.

Niture SK, Jain AK, Shelton PM, Jaiswal AK. Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J Biol Chem.* 2011;**286**(33):28821-28832

Niture SK, Jaiswal AK (2009). Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* **284**: 13856-13868.

Olthof MR, van Dijk AE, Deacon CF, Heine RJ, van Dam RM (2011). Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on incretin hormones. *Nutr Metab (Lond)* **8**: 10.

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

Pandurangan AK, Ananda Sadagopan SK, Dharmalingam P, Ganapasam S. Luteolin, a bioflavonoid inhibits Azoxymethane-induced colorectal cancer through activation of Nrf2 signaling. *Toxicol Mech Methods.* 2014;**24**(1):13-20.

Park CM, Song YS. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract.* 2013 Dec;7(6):423-9

Pickering AM, Linder RA, Zhang H, Forman HJ, Davies KJ (2012) Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem.* **287(13)**:10021-31

Radhakrishnan SK, Lee CS, Young P, Beskow A, Chan JY, Deshaies RJ (2010). Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol Cell* **38**: 17-28.

Ren S, Smith MJ, Louro ID, McKie-Bell P, Bani MR, Wagner M, et al. (2000). The p44S10 locus, encoding a subunit of the proteasome regulatory particle, is amplified during progression of cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* **19**: 1419-1427

Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;**108(4)**:1433-1438.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* **49**: 1603-1616.

Rho JH, Qin S, Wang JY, Roehrl MH. (2008). Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *J Proteome Res.* **7**: 2959-2972

Sabzichi et al (2014). Luteolin-loaded phytosomes sensitize human breast carcinoma MDA-MB 231 cells to doxorubicin by suppressing Nrf2 mediated signalling. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;**15(13)**: 5311-5316.

Saif MW (2008). New developments in the treatment of pancreatic cancer. Highlights from the "44th ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. May 30 - June 3, 2008. *JOP* **9**: 391-397.

Saif MW, Chabot J (2011). Chemotherapy: Metastatic pancreatic cancer--is FOLFIRINOX the new standard? *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 452-453.

Schaedler S, Krause J, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Lieder F, Klingel K *et al* (2010). Hepatitis B virus induces expression of antioxidant response element-regulated genes by activation of Nrf2. *J Biol Chem* **285**: 41074-41086.

Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* **128**: 1606-1625.

Sebens S, Bauer I, Geismann C, Grage-Griebenow E, Ehlers S, Kruse ML *et al* (2011). Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *J Biol Chem* **286**: 40911-40921.

Shaughnessy Jr. JD, Qu P, Usmani S, Heuck CJ, Zhang Q, Zhou Y *et al.* (2011) Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood* **118**: 3512–3524.

Shelton P, Jaiswal AK. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* 2013;27(2):414-423

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**: 10-29.

Shi S, Yao W, Xu J, Long J, Liu C, Yu X (2012). Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer? *Cancer Lett* **317**: 127-135.

Shim GS, Manandhar S, Shin DH, Kim TH, Kwak MK (2009). Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic Biol Med* **47**: 1619-1631.

Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO *et al* (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**: e420.

Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, Bunz F, Biswal S (2010a). Gain of Nrf2 function in non-small-cell lung cancer cells confers radioresistance. *Antioxid Redox Signal* **13**: 1627-1637.

Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P (2010b). Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res* **44**: 1267-1288.

Slocum SL, Kensler TW Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol*. 2011;**85**(4):273-284.

Solis LM, Behrens C, Dong W, Suraokar M, Ozburn NC, Moran CA *et al* (2010). Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* **16**: 3743-3753.

Sporn MB, Liby KT (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* **12**: 564-571.

Stachel I, Geismann C, Aden K, *et al*. Modulation of nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activation by the stress response gene immediate early response-3 (IER3) in colonic epithelial cells: a novel mechanism of cellular adaption to inflammatory stress. *J Biol Chem*. 2014;**289**(4):1917-1929.

Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Mar;**7**(3):163-72.

Steffen J, Seeger M, Koch A, Kruger E (2010). Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol Cell* **40**: 147-158.

Sun GB, Sun X, Wang M, Ye JX, Si JY, Xu HB, Meng XB, Qin M, Sun J, Wang HW, Sun XB. Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Dec 1;**265(2)**:229-40.

Taguchi A, Politi K, Pitteri SJ, Lockwood WW, Faca VM, Kelly-Spratt K *et al* (2011). Lung cancer signatures in plasma based on proteome profiling of mouse tumor models. *Cancer Cell* **20**: 289-299.

Tan KP, Kosuge K, Yang M, Ito S (2008). NRF2 as a determinant of cellular resistance in retinoic acid cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **45**: 1663-1673.

Tang X, Wang H, Fan L, Wu X, Xin A, Ren H, Wang XJ (2011) Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs *Free Radic Biol Med*. 50(11): 1599-609.

Tian H, Zhang B, Di J, Jiang G, Chen F, Li H *et al* (2012). Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Lett* **325**: 26-34.

van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, van Dam RM (2009). Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* **32**: 1023-1025.

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

Vulfovich M, Rocha-Lima C (2008). Novel advances in pancreatic cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**: 993-1002.

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

Wang XJ, Hayes JD, Henderson CJ, Wolf CR (2007). Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19589-19594.

Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y *et al* (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**: 1235-1243.

Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y *et al* (2008b). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**: 1235-1243.

Wormann SM, Algul H (2013). Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol* **3**: 282.

Xia F, Wang C, Jin Y, Liu Q, Meng Q, Liu K, Sun H. Luteolin protects HUVECs from TNF- α -induced oxidative stress and inflammation via its effects on the Nox4/ROS-NF- κ B and MAPK pathways. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(8):768-83.

Xu J, Wang H, Ding K, Zhang L, Wang C, Li T, Wei W, Lu X. Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE pathway. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jun;71:186-95.

Yuan F, Ma Y, You P, Lin W, Lu H, Yu Y, Wang X, Jiang J, Yang P, Ma Q, Tao T (2013). A novel role of proteasomal β 1 subunit in tumorigenesis *Biosci Rep*. 2013 Jul 16;33(4). pii: e00050. doi: 10.1042/BSR20130013.

Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q (2010). Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **124**: 585-591.

Yu DD, Forman BM (2005). Identification of an agonist ligand for estrogen-related receptors ERRbeta/gamma *Bioorg Med Chem Lett.* 15(5):1311-3

Zhang DD (2010). The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxid Redox Signal* **13**: 1623-1626.

Zhang T, Liang X, Shi L, Wang L, Chen J, Kang C *et al* (2013). Estrogen receptor and PI3K/Akt signaling pathway involvement in S-(-)equol-induced activation of Nrf2/ARE in endothelial cells. *PLoS One* **8**: e79075.

Zhong Y, Zhang F, Sun Z, et al. Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7/DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response. *Mol Carcinog.* 2013;52(10):824-834.

Zhou W, Lo SC, Liu JH, Hannink M, Lubahn DB (2007). ERRbeta: a potent inhibitor of Nrf2 transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* **278**: 52-62.

Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29 Suppl 1:i19-i24

*http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Heiner Schäfer für die beständige Unterstützung bei der Entstehung und Fertigstellung dieser Dissertation. Er leitete mich in die Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens an und war maßgeblich an der Planung und Durchführung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Durch seinen Enthusiasmus und sein fundiertes Wissen in Bezug auf die Erforschung des Pankreaskarzinoms, war es für mich ein Leichtes mit Elan und Freude die Arbeit voran zu bringen.

Des weiteren gilt mein Dank dem Direktor der Klinik für Innere Medizin I der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie am Campus Kiel.

Ein weiterer Unterstützer, dem ich danken möchte ist mein Betreuer Prof. Dr. med. Alexander Arlt für die stetige Hilfsbereitschaft und ein zu jeder Zeit offenes Ohr.

Ebenso gilt ein besonderer Dank dem gesamten Team des Labors für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie für die Allzeit gute Zusammenarbeit und die herzliche Aufnahme in ein tolles Kollegium.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei Frauke Grohmann, an deren Seite ich die Laborwerkbank nutzen durfte und die mich in die Grundlagen der praktischen Laborarbeit einführte. Danke für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, die dargebrachte Geduld und tolle fachliche sowie private Gespräche.

Ebenso möchte ich Maike Großmann und Iris Bauer für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Flexibilität danken die bedeutenden Anteil bei der Integration von Dissertation und Studienalltag und somit am Fortgang dieser Arbeit hatten.

Außerdem gilt mein Dank Dr. rer. nat. Claudia Geismann die mir mit ihrem fachlichen Wissen gerne und zu jeder Zeit zur Seite stand.

Abschließend ein herzliches Dankeschön alle oben genannten sowie die hier nicht erwähnten Unterstützer, die durch moralischen Einsatz ebenso maßgeblich an Fortgang und Fertigstellung meiner Dissertation beteiligt waren.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 16.11.1984 in Worms

Familienstand ledig

Beruflicher Werdegang

Seit 08/15 bis heute	Assistenzärztin Dermatologie, Helios Kliniken Schwerin
05/15 -08/15	Assistenzärztin Innere Medizin, Sana Klinik Eutin
08/14-04/15	Assistenzärztin Frauenklinik, UKSH Lübeck
05/14-08/14	Assistenzärztin Frauenklinik, Sana Hanse-Klinikum Wismar
09/13-04/14	Ärztin im DRK Blutspendedienst Nord-Ost
05/2013	Ärztliche Prüfung
04/09-05/13	Studium der Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
03/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2006-03/09	Studium der Humanmedizin, Georg-August-Universität Göttingen
11/2005-09/2006	Rettungssanitäterin Rhein-Main-Taunus gGmbH, RW Flörsheim/Main
10/2004-10/2005	Freiwilliges Soziales Jahr,

RW Flörsheim/ Main

05/2005 Abschluss Rettungssanitäterin

08/2004-10/2004 Ausbildung zum Rettungshelfer, DRK Hessen

Praktisches Jahr

10/12-01/13 Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin, UKSH, Campus Kiel

06/12-10/12 Gynäkologie und Geburtshilfe
Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster GmbH

02/12-06/12 Chirurgie, imland Klinik Rendsburg

Famulaturen

07/11-08/11 Hautklinik und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz, mit anschließender Anstellung als studentische Hilfskraft

03/11-03/11 Klinik für Innere Medizin UKSH Campus Kiel

09/10-10/10 Helios-Albert-Schweitzer-Klinik Northeim, Innere Medizin

08/10-09/10 Klinik für Innere Medizin UKSH Campus Kiel

08/09-09/09 Western Regional Hospital Pokhara; Nepal, Gynäkologie und
Pädiatrie

Schulbildung

Juni 2004 Abitur
1995-2004 Max-Planck-Gymnasium Rüsselsheim

Sonstiges

Promotion

05/10-01/14 Labor für molekulare Gastroenterologie und Hepatologie (Prof. Dr. Heiner Schäfer). Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Schittenhelmstr.12, 24105 Kiel

Thema: “ Rolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Chemoresistenz des duktaalen Pankreasadenokarzinoms und dessen Bedeutung als therapeutisches Ziel“

9. Anhang

9.1. Anhang I

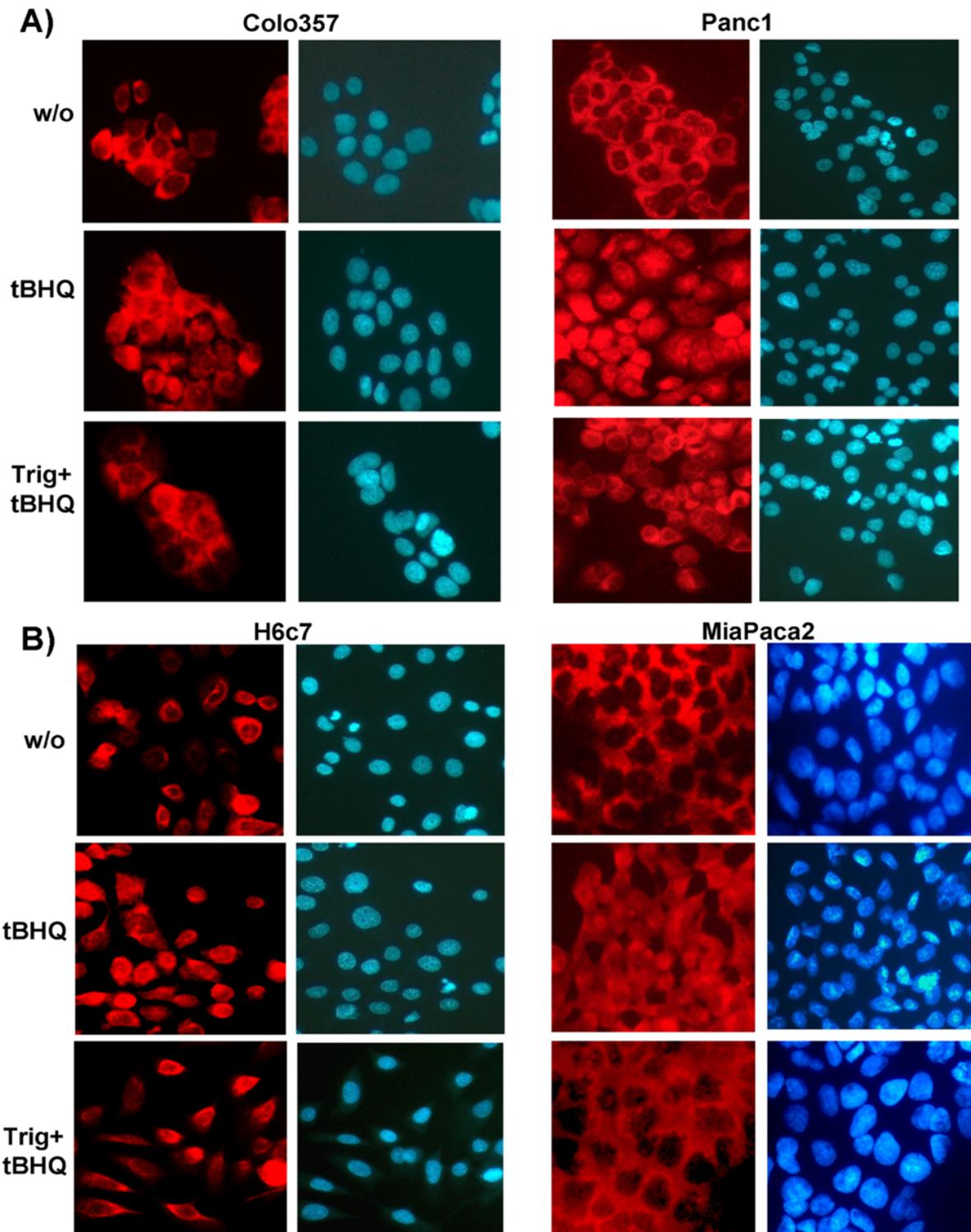


Abbildung I: Nachweis des nukleären Nrf2-Proteins durch Immunfluoreszenzfärbung

Nachweis nukleären Nrf2-Proteins durch Immunfluoreszenzfärbung gegen Nrf2 (rot) und Gegenfärbung mit dem Hoechst DNA-Farbstoff (blau). Dargestellt ist eine Färbung von auf

Deckgläschen ausgesät und nachfolgend mit tBHQ (50 μ M, 8h) behandelten bzw. unbehandelten A) Panc1 und Colo357 sowie B) MiaPaca2 und H6c7 Zellen in An- oder Abwesenheit von 0,5 μ M Trigonellin. 40 x Vergrößerung

9.2. Anhang II

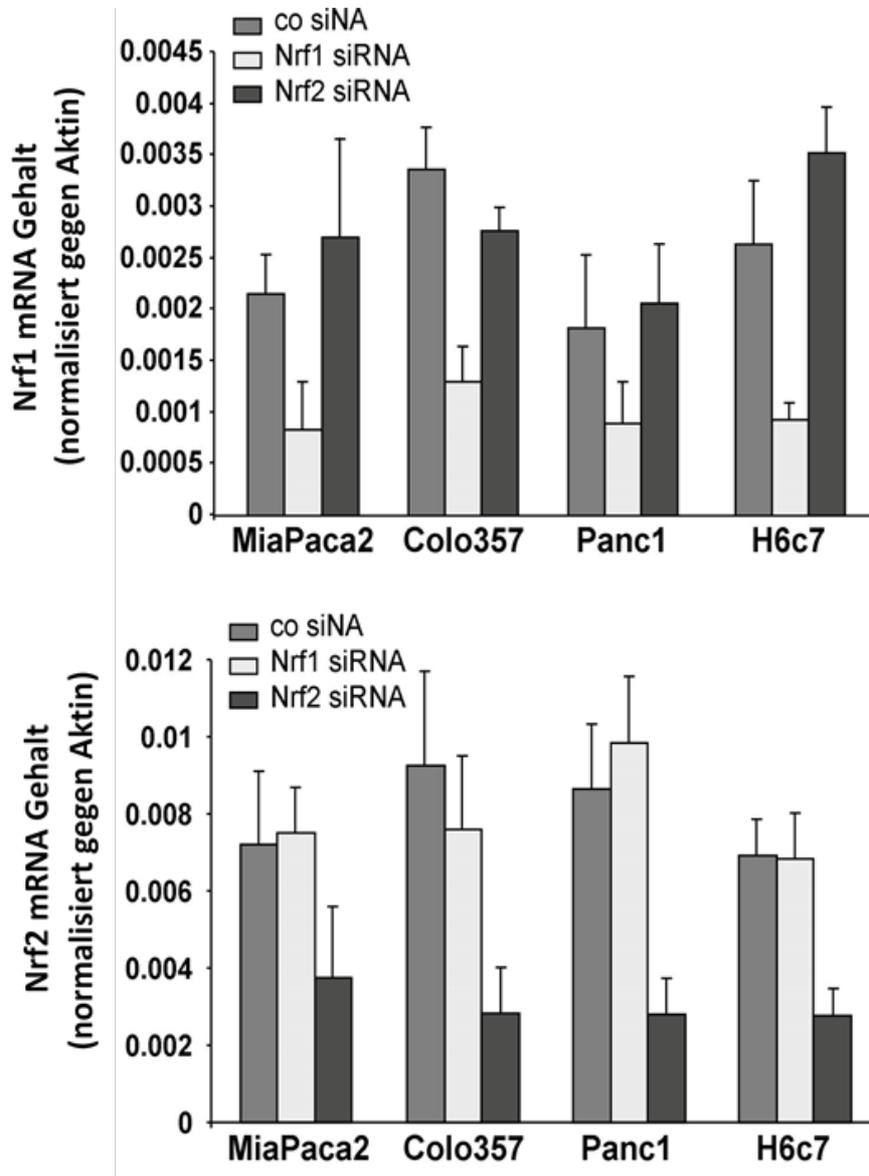


Abbildung II: Nachweis der Effizienz von Nrf1- und Nrf2-siRNA anhand qPCR

Nachweis der Effizienz der Nrf1 und Nrf2 siRNAs in Colo357, Panc1, MiaPaca2, HPDE Zellen anhand qPCR unter Verwendung von TBP mRNA zur Normalisierung. Analysiert wurden die mRNA-Gehalte von Nrf1 und Nrf2 nach 48h-stündiger siRNA-Behandlung.

9.3. Erklärung Doktorarbeit

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

„Rolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Chemoresistenz des duktales Pankreasadenokarzinoms und dessen Bedeutung als therapeutisches Ziel“
abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Veröffentlichung

Oncogene. 2013 Oct;32(40):4825-35. doi: 10.1038/onc.2012.493. Epub 2012 Oct 29.

„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“

Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse ML, Schreiber S, Schäfer H.

Ich widerspreche nach §5, Abs. 2k der Promotionsordnung der Teilnahme von Zuhörern an der mündlichen Doktorprüfung.