

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**MOLEKULARE MECHANISMEN DER FUNKTIONELLEN INTERFERENZ DES
IMMEDIATE EARLY RESPONSE-3 GENS MIT DEM TRANSKRIPTIONSFAKTOR
NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2-RELATED FACTOR-2**

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

vorgelegt von
IMKE STACHEL
aus Delmenhorst

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25. November 2016

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

Meiner Familie

...

*And as imagination bodies forth
The forms of things unknown, the poet's pen
Turns them to shapes and gives to airy nothing
A local habitation and a name*

William Shakespeare

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.3 Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms	3
1.1.4 Kolitis assoziierte Karzinogenese	5
1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies	6
1.2 Der Transkriptionsfaktor Nrf2	7
1.2.1 Struktur und Aufbau	7
1.2.2 Regulation des Nrf2-Signalweges	8
1.2.3 Bedeutung von Nrf2 in der kolorektalen Karzinogenese	12
1.3 Das multifaktorielle Stressantwortgen IER3	12
1.3.1 Aufbau und Struktur	13
1.3.2 Funktion und Bedeutung von IER3 in der Tumorigenese und Inflammation	14
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2 Materialien und Geräte	17
2.1 Zelllinien und Organgewebekulturen	17
2.1.1 Medien und Medienzusätze	17
2.2 Zellkultur und Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Stimulantien, Inhibitoren und Zytostatika	18
2.4 Transfektion	19
2.4.1 Transiente Transfektion	19
2.4.1.1 siRNA Transfektion	19
2.4.1.2 Plasmid Transfektion	19

2.4.2 Stabile Transfektion	19
2.4.2.1 Bakterientransformation.....	19
2.4.2.2 Plasmidaufreinigung.....	20
2.4.2.3 PstI (<i>Providencia stuartii</i> -I) Restriktionsenzymverdau	20
2.5 Herstellung von Ganzzelllysaten.....	20
2.6 Isolierung von Kernproteinen	21
2.7 Quantitative Bestimmungen der Proteinkonzentration	21
2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
2.9 Proteintransfer (Western-Blotting)	22
2.10 Immunnachweis der Proteine	22
2.11 RNA-Techniken.....	23
2.11.1 RNA-Isolierung.....	23
2.11.2 RNA-Quantifizierung.....	23
2.11.3 Reverse Transkription	24
2.11.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>Realtime</i> -PCR)	24
2.12 Luziferase Reporter Assay	25
2.13 Caspase-3/-7-Assay.....	25
2.14 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies.....	25
2.15 Immunhistochemische Färbungen.....	26
3 Methoden.....	27
3.1 Zelllinien und Organgewebekulturen.....	27
3.1.1 Humane Zelllinien.....	27
3.1.1.1 NCM460.....	27
3.1.1.2 Stabil transfizierte NCM460-Zellen.....	27
3.1.2 Murine Organgewebekulturen.....	28
3.2 Zellkultur	29
3.2.1 Zellkulturbedingungen	29

3.2.2 Kultivierung der Zellen	29
3.2.3 Zellzahlbestimmung	29
3.2.4 Kryokonservierung der Zellen	30
3.3 Stimulantien, Inhibitoren und Zytostatika	30
3.4 Transfektion von Zellen.....	30
3.4.1 Transiente Transfektionen.....	31
3.4.1.1 siRNA-Transfektion	31
3.4.1.2 Plasmid-Transfektion	31
3.4.2 Stabile Transfektion	32
3.4.2.1 Bakterientransformation.....	33
3.4.2.2 Plasmidaufreinigung.....	33
3.4.2.3 PstI (Providencia stuartii I) Restriktionsenzymverdau.....	35
3.4.2.4 Transfektion der Zellen	35
3.5 Herstellung von Ganzzelllysaten	36
3.6 Isolierung von Kernproteinen	36
3.7 Quantitative Bestimmungen der Proteinkonzentration	38
3.7.1 Proteinbestimmung nach Lowry	38
3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	38
3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.9 Proteintransfer (Western-Blotting)	41
3.10 Immunnachweis der Proteine	43
3.11 RNA-Techniken	43
3.11.1 RNA-Isolierung	43
3.11.2 RNA-Quantifizierung.....	44
3.11.3 Reverse Transkription	45
3.11.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>Realtime</i> -PCR)	46
3.12 Luziferase Reporter Assay	47

3.13 Caspase-3/-7-Assay	48
3.14 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies	49
3.14.1 Messung der mitochondrialen ROS-Produktion	49
3.14.2 Messung der intrazellulären ROS-Produktion	49
3.15 Immunhistochemische Färbungen	50
3.15.1 Immunhistochemische Färbungen mit NCM460-Kolonozyten	50
3.15.2 Immunhistochemische Färbungen an Kryogewebe DSS-behandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse	51
3.15.2.1 Konventionelle immunhistochemische Färbungen	51
3.15.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen	52
3.16 Berechnungen, Statistiken, Graphik und Ausarbeitung	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Erhöhte Nrf2-Aktivität im Kolongewebe IER3-defizienter Mäuse	53
4.2 Die Nrf2-Aktivierung wird durch das IER3-Gen moduliert	56
4.2.1 Eine Überexpression von IER3 unterdrückt die Nrf2-Aktivierung	56
4.2.2 Die Nrf2-Signaltransduktion ist unter IER3-Defizienz verstärkt.....	58
4.3 IER3-defiziente Zellen zeigen eine Nrf2-abhängige erniedrigte intrazelluläre ROS-Bildung	61
4.4 Die erhöhte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz führt zur Apoptoseresistenz	63
4.5 Das IER3-Gen moduliert Nrf2 über den PI3K/Akt-Signalweg	65
4.5.1 IER3 inhibiert den PI3K/Akt Signalweg.....	65
4.5.2 IER3 beeinflusst die Nrf2-Aktivität über den PI3K/Akt-Signalweg	67
4.6 Der PI3K/Akt-Signalweg beeinflusst die Nrf2-Aktivität über die Tyrosinkinase Fyn	69
5 Diskussion	72
5.1 Einfluss der Nrf2-Aktivität beim kolorektalen Karzinom	72
5.2 Verstärkte Nrf2-Aktivität unter IER3 Defizienz	73
5.3 Rolle des PI3K/Akt-Konsolidierungs-Signalweges	74

5.4 Die Verbindung zu NFκB als ein weiterer inflammatorischer und onkogener Mediator	76
5.5 Fazit und Ausblick	77
6 Zusammenfassung	80
6 Summary	82
Literaturverzeichnis	84
Erklärung	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010.....	1
Abbildung 2: Zeitliche, stufenweise Entwicklung des sporadischen kolorektalen Karzinoms (Adenom-Karzinom-Sequenz)	4
Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Nrf2.....	8
Abbildung 4: Der Nrf2-Keap1 Signalweg	9
Abbildung 5: Aktivierung des Nrf2-Signalweges.....	11
Abbildung 6: Struktureller Aufbau des IER3-Proteins.....	13
Abbildung 7: Projektskizze über die Untersuchung der molekularen Interferenz des IER3-Gens mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2	16
Abbildung 8: Höhere Nrf2-Aktivität im entzündeten Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter Mäuse	53
Abbildung 9: Höhere epitheliale Nrf2-Aktivität im entzündeten Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter Mäuse.....	54
Abbildung 10: Eine IER3-Defizienz verstärkt die Nrf2-Aktivierung in murinen unbehandeltem Kolongewebe	55
Abbildung 11: Kurzeit-kultivierte IER3-defiziente Kolonozyten zeigen eine verstärkte Induktion der Nrf2-Zielgene GCLC und NQO1	56
Abbildung 12: Das IER3-Gen beeinflusst die Nrf2-Aktivität in humanen NCM460-Kolonozyten	57

Abbildung 13: Erhöhte Nrf2-Aktivität in humanen NCM460-Kolonozyten mit unterdrückter IER3-Expression	59
Abbildung 14: IER3-defiziente NCM460-Kolonozyten zeigen eine verstärkte Nrf2-Aktivität und Induktion von Nrf2-Zielgenen	60
Abbildung 15: Erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentration in humanen IER3 überexprimierenden NCM460-Kolonozyten	61
Abbildung 16: Nrf2-abhängige, erniedrigte ROS-Konzentration in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten	62
Abbildung 17: Eine siRNA vermittelte Ausschaltung von Nrf2 führt zur erhöhten ROS-Konzentration in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten.....	63
Abbildung 18: Die erhöhte Nrf2-Aktivität in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten verleiht Apoptoseschutz	64
Abbildung 19: Eine siRNA-vermittelte Ausschaltung von Nrf2 hebt die Apoptoresistenz in humanen IER3- defizienten NCM460-Kolonozyten auf	65
Abbildung 20: Erhöhte Akt-Phosphorylierung in IER3-defizienten murinen und humanen Kolonozyten	66
Abbildung 21: Die Akt-Inhibition durch LY294002 hebt die erhöhte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz auf	67
Abbildung 22: IER3 beeinflusst die Nrf2-Aktivität über Akt	68
Abbildung 23: Erniedrigter nukleärer Fyn-Proteingehalt in IER3-defizienten murinen und humanen Kolonozyten.....	70
Abbildung 24: Eine IER3-Defizienz bewirkt die nukleäre Akkumulation von Fyn und seine inhibitorische Auswirkung auf die Nrf2-Aktivität	71

Abbildung 25: Molekulare Interferenz des Stressantwortgens IER3 mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2 75

Abbildung 26: Die duale Rolle von Nrf2 in der Karzinogenese..... 78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien und Organgewebekulturen.....	17
Tabelle 2: siRNAs und ihre Bezugsquellen	19
Tabelle 3: Anwendung der Primärantikörper (Westernblot).....	22
Tabelle 4: Anwendung der Sekundärantikörper (Westernblot)	23
Tabelle 5: Verwendete Primer und Sequenzen	24
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen	26
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen	26
Tabelle 8: siRNA-Transfektion mit HiPerFect	31
Tabelle 9: Plasmidtransfektion mit Effectene TM (Qiagen)	32

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	<i>Adenomatosis Polyposis Coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AREs	antioxidative responsive Elemente
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bach1	<i>BTB And CNC Homolog 1</i> (Transkriptionsfaktor)
Bach2	<i>BTB And CNC Homolog 2</i> (Transkriptionsfaktor)
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Leukämieprotein)
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BTB	<i>broad complex-TramTrack-Bric a Brac</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
c-H ₂ DCFDA	5-Carboxy-2',7'-Dichlordihydrofluorescein Diacetat
CHD6	<i>chromodomain helicase DNA-binding protein 6</i>
cIAP1	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis</i> (zelluläre Apoptoseinhibitoren)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratmeter
CMV	Cytomegalievirus
c-Myb	Myeloblastosis Virus-Onkogen
c-Myc	Myelocytomatosis-Virus-Onkogen
CNC-bZIP	<i>Cap'n'Collar basic-leucine-zipper</i> Proteine
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
-COOH	Carboxygruppe
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin

CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminales Ende von Aminosäureketten
C _t -Wert	<i>Cycle-Threshold</i>
Cu	Kupfer
Cul3	Cullin-3-Ligasen
Cys-	Cystein-Rest
DCC	<i>Deleted in Colon Carcinoma</i>
DCF	2',7'-Dichlorofluoreszin
DGR	<i>double glycine repeat</i> (doppelte Glycin-Reste-Region von Keap1)
DIF-2	<i>differentiation inducible factor 2</i>
DLG-Motiv	Asparaginsäure/Leucin/Glycin-Motiv
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphate
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat (<i>dextran sodium sulfate</i>)
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (Gelshiftassay)
ERK	Extrazellulär-Signal-Regulierte Kinase
ETGE-Motiv	Glutaminsäure/Threonin/Glycin/Glutaminsäure-Motiv
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
Fyn	Tyrosinkinase
GCLC	Glutathion-Cystein-Ligase
gly96	IER3-Homolog in der Maus
gly96/ier3 ^{-/-}	IER3-defizient
gly96/ier3 ^{+/+}	IER3-profizient
G-Protein	GTP-bindende Proteine
GS	Glykolysierungsstelle

Gsk3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H6c7	humane Pankreasgangepithelzelllinie
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
HO·	freie Hydroxylradikale
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC	<i>Human Secretory Component</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i> (Hitzeschockprotein 90)
IER3	<i>Immediate Early Response-3</i> Gen
IEX1	<i>Immediate Early Gene on X-Radiation 1</i>
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IVR	<i>intervening region</i> (Zwischendomäne von Keap1)
I κ B	<i>Inhibitor of NFκB</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
Keap1	<i>ECH-kelch-like-activator-protein 1</i>
K-Ras	Kirsten-Ratten-Sarkom-Virus-Onkogen
LBA-Medium	mit Ampicillin versetztes Luria-Bertani Medium
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-aktivierende Proteinkinase
MDR	<i>multi drug resistance</i>
mg	Milligramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ g/ml	Mikrogramm pro Milliliter

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
MLH1	DNA-Reparatur-Gen
MLH3	DNA-Reparatur-Gen
mm	Millimeter
mM	millimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia</i> Retrovirus
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSH2	DNA-Reparatur-Gen
MSH6	DNA-Reparatur-Gen
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
NADPH-Oxidase	Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NCM460	<i>normal-derived colon mucosa cells</i>
ncRNA	nicht kodierende Ribonukleinsäure
Neh	<i>Nrf2-ECH homology domains</i>
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NF-E2	<i>Nuclear factor-erythroid 2</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
-NH ₂	Aminogruppe
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localizing signal</i>)
nm	Nanometer
NQO1	NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase 1
N-Ras	Neuroblastom-Ratten-Sarkom-Virus-Onkogen
Nrf1	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor-1</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor-2</i>
Nrf3	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor-3</i>
N-terminal	Amino-terminales Ende von Aminosäureketten
O ₂	Sauerstoff

O ₂ ^{·-}	Superoxidradikalanionen
OD	optische Dichte
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p53	Protein 53 (Tumorsuppressorgen)
p65/RelA	Untereinheit von NFκB
p300	CREB-Bindungsprotein p300 (<i>CREB Binding Protein p300</i>)
PAA	Polyacrylamid
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pcDNA3.1	<i>plasmid copy DNA 3.1</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PERK	Protein Kinase R-ähnliche Endoplasmatisches Retikulum Kinase
PEST-like-Sequence	Sequenz reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin
pH	potentia Hydrogenii
Phospho-Akt	phosphorylierte Proteinkinase B
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMS1	DNA-Reparatur-Gen
PMS2	DNA-Reparatur-Gen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRG1	<i>PACAP Response Gene 1</i>
PstI	Providencia stuartii I (Restriktionsenzym)
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> (Phosphatase)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	langer Arm eines Chromosoms
Rbx1	<i>Ring box protein 1</i> (Ligase)
RLU	relative Luziferase-Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROO·	Peroxid-Radikale
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 (Zellkulturmedium)
RT	reverse Transkriptase

<i>Realtime-PCR</i>	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SA	Standardabweichung
SCC-35	<i>Squamous carcinoma cells 35</i> (Plattenepithelkarzinomzelllinie)
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SFN	Sulforaphan
-SH	Sulfhydrylgruppen
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sMaf	<i>small Maf-Proteine</i>
SOC Medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression Medium</i>
SOD	Superoxiddismutase
S _{ox}	oxidierte Sulfhydrylgruppe
Sp1	<i>Specificity Protein 1</i> (Transkriptionsfaktor)
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 3</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin Basensequenz
tBHQ	tertiäres Butylhydrochinon
TBP	<i>TATA-Box Binding Protein</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
Temed	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranregion
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>Units</i>
U/ μ l	<i>Units pro Mikroliter</i>
USP-15	Ubiquitin spezifische Protease-15
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
V	Volt

v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Wnt	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i> (extrazelluläre Wachstumsfaktoren)

Nomenklatur der Nucleoside

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

Stachel, I., Geismann, C., Aden, K., Bauer, I., Rosenstiel, P., Schreiber, S., Arlt, A., Schäfer, H. Interferenz des Immediate Early Response-3 (IER3) Gens mit dem Transkriptionsfaktor Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2): ein neuer Mechanismus der Karzinogenese. *Z Gastroenterol.* 2013; 51: 884. Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2013 in Nürnberg.

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Stachel, I., Geismann, C., Aden, K., Deisinger, F., Rosenstiel, P., Schreiber, S., Sebens, S., Arlt, A., Schäfer, H. 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.

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die dritthäufigste maligne Krebserkrankung des Menschen. Mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr stellt Darmkrebs ein globales Gesundheitsproblem dar. Daher gewinnt diese nicht nur häufig auftretende, sondern auch lebensbedrohliche Erkrankung bei weltweit steigender Inzidenz zunehmend an Bedeutung [1].

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland ist etwa jede siebte Krebserkrankung im Darm lokalisiert. Jährlich erkranken hier rund 34.000 Männer und 29.000 Frauen an dieser bösartigen Krankheit. Damit stellt das kolorektale Karzinom in Deutschland die dritthäufigste Krebserkrankung nach dem Prostata- und Lungenkarzinom beim Mann und die zweithäufigste Krebsart nach dem Mammakarzinom bei der Frau dar (Abbildung 1).

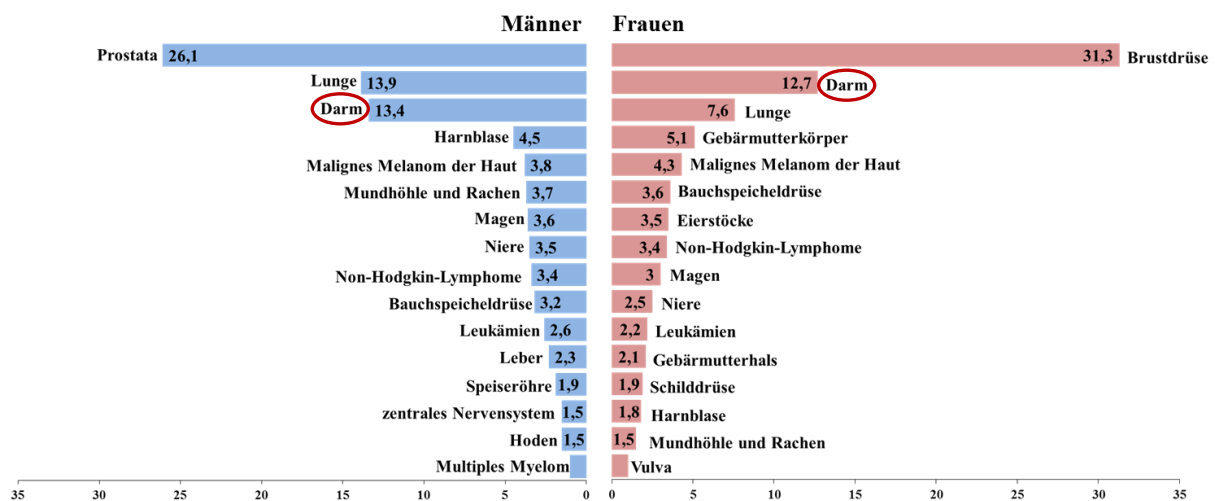


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010. Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland die dritthäufigste Krebserkrankung nach dem Prostata- und Lungenkarzinom beim Mann und die zweithäufigste Krebsart nach dem Mammakarzinom bei der Frau. Modifiziert nach [2].

Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Lebensalter und insbesondere deutlich ab dem 50. Lebensjahr an. Männer erkranken im Mittel mit 71 und Frauen mit 75 Jahren. Neben den Plattenepithelkarzinomen im Analsbereich und den seltener vorkommenden neuroendokrinen Tumoren (1%) zeigen sich histologisch fast ausschließlich Adenokarzinome (85%). Die geschätzte Neuerkrankungsrate von Männern und Frauen ist erfreulicherweise nach einem zunächst zunehmenden Trend in den letzten Jahrzehnten leicht rückläufig. In

Deutschland sterben jährlich etwa 30.000 Patienten an einem kolorektalen Karzinom. Dabei ist die altersstandardisierte Sterberate in den letzten zehn Jahren bei beiden Geschlechtern um mehr als 20% gesunken. Fünf Jahre nach Diagnosestellung lebt etwa noch die Hälfte der Erkrankten, wodurch Darmkrebs zu den Krebserkrankungen mit mittlerer Prognose gezählt wird [2].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms lässt sich in drei wesentliche Gruppen unterteilen. Circa 10% aller kolorektalen Karzinome sind durch hereditäre Krebs syndrome, beispielsweise dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) und den familiären Polyposis-Syndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), bedingt. Ein weiterer Anteil von etwa 5% entwickelt sich auf dem Boden von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie der Colitis ulcerosa oder dem Morbus Crohn. Der größte Anteil von circa 85% wird durch die sporadischen kolorektalen Karzinome gebildet [3, 4]. Als mögliche Auslöser hierfür werden endogene und exogene Ursachen sowie verschiedene Risikofaktoren diskutiert. Zu den bedeutsamen Risikofaktoren, die mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert sind, zählen Lebensstilfaktoren wie eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, Übergewicht, Bewegungsmangel, Nikotinabusus und ein regelmäßiger Alkoholkonsum. Ebenso sind ein höheres Lebensalter, der Diabetes mellitus Typ 2, eine berufliche Exposition z.B. gegenüber Asbest und hormonelle Faktoren wie Nulliparität, hohes Lebensalter bei erster Geburt und eine frühe Menopause mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko behaftet. Ferner spielt auch die Koinzidenz mit anderen Malignomen wie dem Dünndarm-, Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinom sowie dem kolorektalen Karzinom in der Eigenanamnese eine entscheidende Rolle für das Erkrankungsrisiko. Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs weisen eine gegenüber der Normalbevölkerung nahezu verdoppelte bis verdreifachte Erkrankungshäufigkeit auf. Das Risiko steigt weiter an, wenn mehr als ein erstgradig Verwandter betroffen ist oder das Erkrankungsalter unter 45 Jahren liegt. Dabei scheinen sich eine regelmäßige körperliche Aktivität sowie eine ballaststoff- und gemüsereiche, fettarme Ernährung protektiv bezüglich der Entstehung kolorektaler Karzinome auszuwirken [4].

1.1.3 Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms

Die Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms ist ein mehrstufiger Entwicklungsprozess, der als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird. Hierbei bilden sich aus gesundem Kolonepithel über adenomatöse Vorstufen auf dem Boden epithelialer Dysplasien invasive Karzinome aus [5]. Die als Präkanzerosen zu wertenden Adenome können dabei bereits über einen Zeitraum von 10 Jahren gewachsen sein, ehe sie maligne entarten [6]. Fearon und Vogelstein ist es gelungen, der schrittweisen Tumorprogression zu unterschiedlichen Zeitpunkten einzelne genetische Alterationen zuzuordnen [5]. Dieses aufgestellte und allgemein akzeptierte Tumorentstehungsmodell konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden [7, 8, 9, 10]. Nach aktuellem Wissensstand werden dabei zwei Grundmechanismen unterschieden. Bei dem „*Gatekeeper Pathway*“ spielen insbesondere der Verlust von funktionierenden Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen eine entscheidende Rolle (Abbildung 2) [4]. Tumorsuppressorgene sind Proteine, welche an der Zellzykluskontrolle und Induktion der Apoptose beteiligt sind und dadurch die Krebsentstehung hemmen, während Onkogene die Krebsentstehung fördern können [10]. Der tumorinitiierende Schritt in der kolorektalen Karzinogenese ist eine Keimbahnmutation des auf Chromosomen 5q21 lokalisierten Tumorsuppressorgens APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*) [7, 8], die in 85% der Tumoren nachgewiesen werden kann [8]. Die Inaktivierung dieses Gens, welches wesentlich an der Zelladhäsion und der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt ist [7], führt zu einer unkontrollierten Zellteilung und Zellproliferation [9]. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression kommt es zu einer Mutation im Protoonkogen K-Ras (Kirsten-Ratten-Sarkom-Virus-Onkogen) auf Chromosomen 12p12.1 [7], welches in 70% aller kolorektalen Karzinome verändert ist [9]. Das K-Ras Onkogen kodiert für ein membranständiges G-Protein und weist durch die Aktivierung verschiedener Signalwege Hydrolysefähigkeit auf [7]. Durch seine dauerhafte Aktivierung kommt es zur Aussendung ungebremster Wachstumsreize an die Zellen, woraus ein unkontrolliertes Tumorzellwachstum resultiert [7, 10]. Weiterhin können in Kolontumoren auch Amplifikationen anderer Protoonkogene (z.B. N-Ras, c-Myc und c-Myb) detektiert werden und zur Tumorigenese beitragen [4, 10]. Die weitere Tumorentwicklung geschieht schließlich durch den Verlust der als Tumorsuppressor fungierenden Gene DCC (*Deleted in Colon Carcinoma*) und p53 (Protein 53). Mutationen auf Chromosomen 18q21.1 [7] sind in 70% der kolorektalen Karzinome und 50% der fortgeschrittenen Adenome zu finden und betreffen das DCC-Gen [10]. Durch den Verlust des Zellzusammenhaltes begünstigt diese genetische Veränderung die

Entstehung ausgeprägter Dysplasien [10]. Der Ausfall des Tumorsuppressorgens p53 auf Chromosomen 17p13.1 ist letztlich mit dem Übergang eines dysplastischen Adenoms in ein invasives, manifestes Karzinom verbunden [7]. Dieses Gen, welches auch als Wächter des Genoms bezeichnet wird [10], besitzt die regulatorische Aufgabe, die Replikation geschädigter DNA zu verhindern und die Apoptose geschädigter Zellen einzuleiten. Bleibt der programmierte Zelltod durch Inaktivierung dieses Gens aus, kommt es zum ungebremsten Tumorwachstum [7, 10]. Mutationen im p53 Gen stellen die häufigste krankhafte Veränderung bei Krebserkrankungen dar [7, 10].

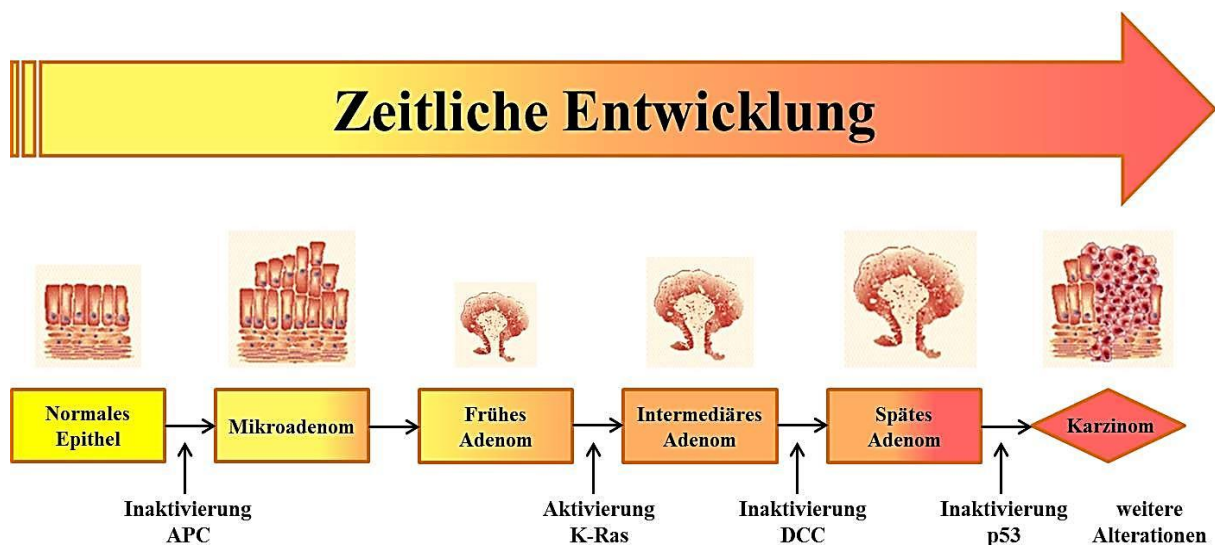


Abbildung 2: Zeitliche, stufenweise Entwicklung des sporadischen kolorektalen Karzinoms (Adenom-Karzinom-Sequenz). Dargestellt sind die einzelnen molekulargenetischen Ereignisse, die zur Tumorentstehung führen. Modifiziert nach [5, 7, 11].

Der als „*Caretaker Pathway*“ bezeichnete, zweite Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese beruht auf epigenetischen Veränderungen und Mutationen der *Mismatch-repair*-Gene MLH1, MLH3, MSH2, MSH6, PMS1 und PMS2, die während der Replikation entstandene Basenfehlpaarungen beseitigen. Auftretende Replikationsfehler führen zu Veränderungen in repetitiven DNA-Sequenzen, die als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet werden [4, 7, 10]. Hierdurch wird die Akkumulation von Mutationen in Zellen begünstigt, die dadurch einen malignen Phänotyp entwickeln können [10]. Des Weiteren können epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen die Genregulation beeinflussen [4]. Hierbei spielen insbesondere Methylierungsreaktionen an CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Inseln), in der Promotorregion eine Rolle. Für die Entstehung kolorektaler Karzinome scheint die Hypermethylierung von MLH1- und

MSH2-Promotorbereichen von besonderer Bedeutung zu sein [7]. Durch diesen zweiten Mechanismus entstehen etwa 15% der kolorektalen Karzinome und das HNPCC [4, 7, 10].

1.1.4 Kolitis assoziierte Karzinogenese

Circa 5% aller kolorektalen Karzinome sind durch CED bedingt [3, 4]. Hierbei kommt insbesondere der auf die Mukosa des Kolorektum beschränkten Colitis ulcerosa eine große Bedeutung zu. Die meist bei jungen Patienten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auftretende Erkrankung [12] zeigt ein typisches Ausbreitungsmuster mit Beginn im Rektum und kontinuierlicher Ausbreitung im restlichen Dickdarm [3, 12, 13]. Abhängig von der Dauer und dem Ausmaß der Entzündung besitzen die an einer Colitis ulcerosa leidenden Patienten ein gegenüber der westlichen Normalbevölkerung zehnfach erhöhtes Risiko, im Krankheitsverlauf ein kolorektales Karzinom zu entwickeln [14, 15].

Die genauen molekularen Mechanismen, die in dem Kolonepithel bei der Kolitis assoziierten Tumorentstehung stattfinden und maligne Transformationen initiieren, sind noch nicht vollständig verstanden [15, 16, 17]. Es wird vermutet, dass die anhaltende Exposition der Enterozyten in der entzündlichen Umgebung zu genetischen und epigenetischen Alterationen führt, die begünstigend für die Tumorentwicklung und das Auftreten transformierter Darmepithelzellen sind [14, 15, 16, 17, 18]. So können die unter 1.1.3 genannten genetischen Alterationen - ähnlich wie bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen - auch in Kolitis assoziierten Tumoren nachgewiesen werden, wobei sie sich in ihrer relativen Reihenfolge und Häufigkeit unterscheiden [14, 15, 17, 18]. In der entzündeten Kolonmukosa bilden sich zunächst hyperplastische Läsionen aus, die sich über Dysplasien schließlich zu einem Adenokarzinom entwickeln [14, 15, 18]. Durch die chronische Entzündung werden Signalkaskaden induziert, die sich gegenseitig beeinflussen und somit zur Tumorentstehung beitragen können [14, 17]. Die an dem Entzündungsprozess beteiligten Zellen setzen verstärkt inflammatorische Mediatoren, Zytokine und Interleukine wie z.B. Prostaglandine, den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin (IL)-6 oder -8, frei, durch die die epitheliale Integrität und der Phänotyp beeinflusst werden [14, 16]. Weiterhin generieren die von dem Entzündungsprozess betroffenen Epithelien sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten verstärkt reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die den oxidativen Stress für die Enterozyten erhöhen und durch auftretende Zellschäden an der Tumorentstehung beteiligt sein können [15, 16, 17, 18]. Unter diesen Bedingungen ergreift das beanspruchte Epithel adaptierte Signalwege, um die oxidative Belastung zu bewältigen. So werden

vermehrt Überlebens- und antiapoptotische Signalwege wie Akt, STAT3, Wnt/ β -Catenin und NF κ B aktiviert, durch die die weitere Tumorprogression begünstigt wird [16, 17]. Diese Mechanismen schaffen eine Umwelt, in der ein anhaltendes Wachstum, die Angiogenese, Migration und Invasion von Tumorzellen und somit die weitere Tumorprogression und Metastasierung gefördert werden können [16].

1.1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Derivate, die im Rahmen des Sauerstoff-Metabolismus gebildet werden. Die Hauptquelle der in Zellen generierten ROS entsteht durch intrazelluläre Enzymsysteme wie der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), dem Cytochrom P450 Komplex, aber vor allem durch Enzymkomplexe der Atmungskette in den Mitochondrien [19, 20, 21]. Im Rahmen der Energiegewinnung kommt es bei der Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) zu Ein-Elektronen-Übertragungen, durch die ROS als intermediäre Zwischenprodukte entstehen. Zu den ROS zählen sowohl freie Hydroxylradikale ($HO\cdot$) als auch nicht-Radikal-Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidradikalanionen ($O_2\cdot^-$), Peroxid-Radikale ($ROO\cdot$) oder Singulett-Sauerstoff (1O_2) [20, 21]. Zur Generierung von ROS tragen allerdings nicht nur endogene, sondern auch exogene Faktoren wie UV-Strahlung, Umweltgifte oder Arzneistoffe bei [19]. In kontrollierten Mengen können ROS als Botenstoffe in der Signaltransduktion wirken und normale zelluläre Funktionen wie die antimikrobielle Abwehr oder die Zellproliferation und das Zellwachstum regulieren. Das Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau der ROS ist für die Erhaltung physiologischer Prozesse in der Zelle entscheidend. Der Abbau von ROS kann in Zellen durch die Induktion enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen konstant gehalten werden. Zu den Enzymsystemen gehören die Superoxiddismutase (SOD), Katalase oder Hämoxxygenase-1 (HO-1), während nicht-enzymatische antioxidative Verbindungen wie Glutathion, Thioredoxin und Vitamin A, C und E ebenso ein Ungleichgewicht des Redoxstatus verhindern können. Werden jedoch mehr ROS generiert als abgebaut, kommt es in den Zellen zu oxidativem Stress. Die hohe Reaktivität von ROS gegenüber anderen Biomolekülen führt zur Bildung von Lipidperoxiden, inaktivierten Proteinen und mutierten DNA-Molekülen, die ihre physiologische Funktion dadurch nicht mehr erfüllen können [19, 20, 21]. Insbesondere unter chronischen Entzündungsbedingungen kommt es durch verstärkt gebildete ROS zu oxidativen Schäden, die sehr früh in der entzündungsassoziierten Karzinogenese genetische Alterationen initiieren können [15, 16, 17, 18]. Unter diesen Bedingungen ergreift das beanspruchte Darmepithel

adaptierte Signalwege, um die oxidative Belastung zu bewältigen [16, 17, 19, 20]. Diese Signalwege schließen die Aktivierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor-2*) ein [22, 23, 24].

1.2 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Antwort gegenüber oxidativem und metabolischem Stress und ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität [22, 23, 24]. Der erstmals in den 90er Jahren bei der Untersuchung des Betaglobin-Gens entdeckte redox-sensitive Transkriptionsfaktor [25] wird ubiquitär in fast allen Zellen und Geweben exprimiert. Zusammen mit den eng verwandten Proteinen Nrf1 und Nrf3 sowie mit NF-E2, Bach1 und Bach2 gehört Nrf2 zur Familie der *Cap`n`Collar basic-leucine-zipper* Proteinen (CNC-bZIP). Allen gemeinsam ist das CNC-Motiv, über das Heterodimere mit weiteren Proteinen ausgebildet werden können [24, 25, 26]. Im Gegensatz zu Nrf2 weisen die beiden später detektierten Isoformen Nrf1 und Nrf3 erhebliche Funktionsunterschiede auf. Nrf1 übernimmt in der Embryonalentwicklung dieselben Funktionen wie Nrf2, welches erst nach Abschluss der Embryogenese aktiv exprimiert wird [27]. Beide sind vermutlich aus dem gleichen Gen entstanden [28]. Dahingegen weist Nrf3 reprimierende Wirkung auf die Expression von Nrf2-Zielgenen auf [29]. Nrf2 induziert durch die Bindung an AREs (antioxidative responsive Elemente) die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Zielgene. Zu diesen zählen antioxidative Enzyme der Phase-II-Antwort wie GST (Glutathion-S-Transferase), NQO1 (NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase 1), GCLC (Glutathion-Cystein-Ligase), ABC-Transporter (*ATP binding cassette-*) und MDR-Transporter (*multi drug resistance-*) sowie Schlüsselproteine des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs und weitere zytoprotektive Mediatoren, die am Zellwachstum und Überleben beteiligt sind, wie z.B. Bcl2 [22, 24, 30, 31].

1.2.1 Struktur und Aufbau

Das humane Nrf2 ist ein aus 605 Aminosäuren (AS) aufgebautes Protein mit einem molekularen Gewicht von 67,8 Kilodalton (kDa). Im murinen System besteht der Transkriptionsfaktor aus 597 AS [32]. Strukturell setzt sich Nrf2 aus sechs Regionen zusammen, welche als *Nrf2-ECH homology domains* (Neh-Domänen) bezeichnet werden (Abbildung 3). Jede dieser Domänen übernimmt unterschiedliche Funktionen. Die Neh1-Domäne ist eine CNC-bZIP-Domäne und erlaubt die Heterodimerisierung von Nrf2 mit *small*

Maf-Proteinen (sMafs) und DNA [26, 33]. In der Neh1-Domäne wurde ein Kernlokalisierungssignal (NLS) detektiert, welches an der Akkumulation von Nrf2 im Zellkern beteiligt ist [26]. Die Neh2-Domäne stellt die N-terminale Region dar und dient dem Nrf2 inhibitorischen Protein Keap1 (*ECH-kelch-like-activator-protein 1*) über das DLG-Motiv (Asparaginsäure/Leucin/Glycin-Motiv) und das ETGE-Motiv (Glutaminsäure/Threonin/Glycin/Glutaminsäure-Motiv) als Interaktionsdomäne [34, 35]. An der C-terminalen Region, der Neh3-Domäne, können Komponenten des Transkriptionsapparates mit Nrf2 interagieren. Hier befindet sich auch eine Bindungsstelle für das CHD6-Protein (*chromodomain helicase DNA-binding protein 6*). Die Neh-Domänen 4 und 5 fungieren als Transaktivator-Domänen und stellen die Möglichkeit einer Wechselwirkung mit CREB-Bindungsproteinen (*cAMP response element-binding protein*) dar, während die Neh6-Domäne an der Vermittlung des proteasomalen Abbaus von Nrf2 beteiligt ist [33].

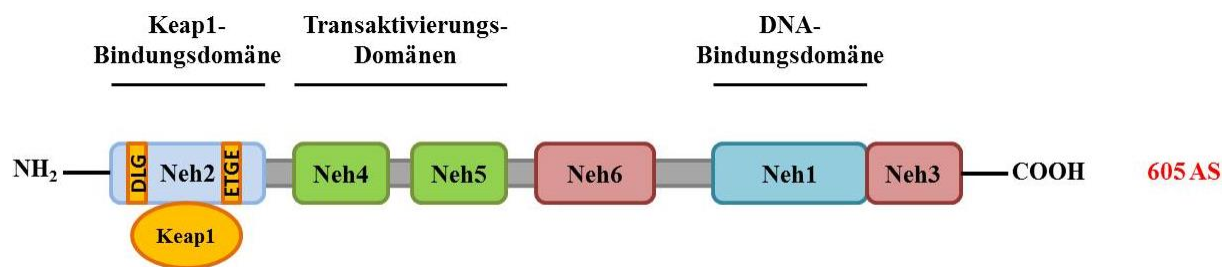


Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Nrf2. Der aus 605 Aminosäuren (AS) aufgebaute humane Transkriptionsfaktor Nrf2 setzt sich aus 6 *Nrf2-ECH homology* (Neh-)Domänen zusammen, die unterschiedliche Funktionen übernehmen. Modifiziert nach [33].

1.2.2 Regulation des Nrf2-Signalweges

Die Regulation der Nrf2-Aktivität unterliegt hauptsächlich der Interaktion von Nrf2 mit seinem zytosolischen Inhibitor Keap1. Unter Abwesenheit von oxidativem Stress liegt Nrf2 unter basalen Bedingungen im Zytosol an Keap1 gebunden vor, wodurch Keap1 die Translokation von Nrf2 in den Zellkern supprimiert und dessen Sequestrierung im Zytoplasma begünstigt [22, 26, 33, 34, 36, 37]. Dabei sind die beiden Keap1 Bindungsstellen von Nrf2 innerhalb der Neh2-Domäne, das sogenannte DLG-Motiv und das ETGE-Motiv, über zwei doppelte Glycin-Reste, den DGR-Regionen (*double glycine repeat*), mit Keap1 verbunden [33, 35, 36, 37]. Die Bindung zum ETGE-Motiv bewirkt ein Einhängen („*hinge*“) von Nrf2, welches dadurch recht beweglich ist, während die Bindung mit dem DLG-Motiv zum Einrasten („*latch*“) führt, wodurch Nrf2 fest mit Keap1 assoziiert ist [32, 36]. Dabei ist die Bindungsaffinität zwischen dem DLG-Motiv und Keap1 im Vergleich zum ETGE-Motiv geringer [32, 33, 36]. Über seine *broad complex-TramTrack-Bric a Brac*-Domäne (BTB-

Domäne) fungiert Keap1 als Adapter für *Ring box protein 1*- und Cullin-3-Ligasen (Rbx1-/Cul3-Ligasen), die ihre Substratproteine spezifisch erkennen und deren Übergang von Ubiquitin katalysieren. Nrf2 wird demnach ohne aktivierende Einflüsse über den Keap1-Rbx1-Cul3-Komplex durch eine Modifikation an Lysin-Rest-48 im Zytoplasma seinem ubiquitinabhängigen proteasomalen Abbau über das 26-S-Proteasomen zugeführt (Abbildung 4) [33, 35, 36, 37].

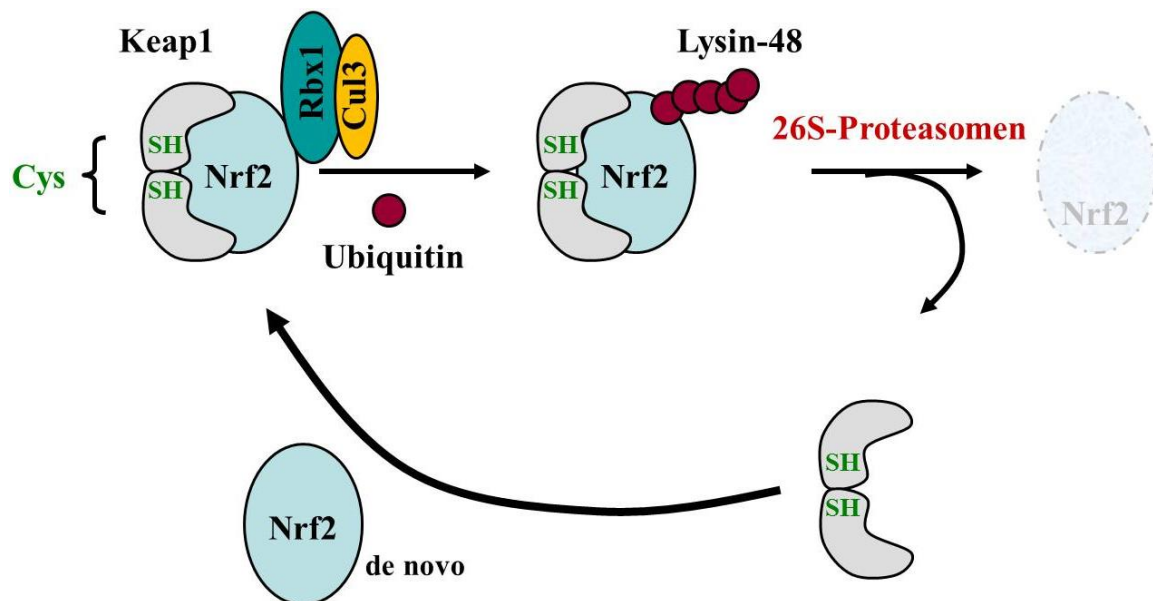


Abbildung 4: Der Nrf2-Keap1 Signalweg. Unter homöostatischen Bedingungen liegt Nrf2 an seinem zytosolischen Inhibitor Keap1 gebunden im Zytoplasma vor. Keap1 fungiert als Adapter für *Ring box protein 1*- und Cullin-3-Ligasen (Rbx1-/Cul3-Ligasen), über die Nrf2 seinem ubiquitinabhängigen proteasomalen Abbau durch eine Modifikation am Lysin-Rest-48 über das 26-S-Proteasomen zugeführt wird. Cys: Cystein-Rest. SH: Sulfhydrylgruppen. Modifiziert nach [36].

Einige Studien postulieren, dass Keap1 über seine BTB-Domäne Nrf2 im Zytosol am aktinassozierten Zytoskelett zurückhält [22, 32, 33, 35]. Des Weiteren wird diskutiert, ob Keap1 auch als eine Art Transporter für Nrf2 zwischen Zytoplasma und Zellkern fungiert. Durch die Entdeckung von Kernexportsignalen (NES = *nuclear export signal*) in der Zwischendomäne IVR (*intervening region*) von Keap1 [33] wird vermutet, dass Keap1 mit Hilfe eines oxidationssensitiven Exportin 1-Transporters Nrf2 aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert [38, 39]. Ebenso wurden Kernlokalisierungssignale (NLS = *nuclear localizing signal*) in verschiedenen Strukturbereichen von Nrf2 detektiert, welche nach Aktivierung des Nrf2-Signalweges zur Akkumulation des Transkriptionsfaktors im Zellkern führen und den Export ins Zytoplasma unterbinden. Hierbei sollen Nrf2 und Keap1 in einem Komplex interagieren, welcher unter basalen Bedingungen durch die Dominanz des NES von Keap1 im Zytoplasma lokalisiert bleibt und Nrf2 seinem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Durch

oxidativen Stress dominiert das NLS von Nrf2, sodass Nrf2 und Keap1 im Zellkern akkumulieren können [32, 33, 39, 40, 41].

Neben der Funktion als Nrf2-Inhibitor fungiert Keap1 auch als Sensor für oxidativen Stress und reagiert auf Aktivatoren des Nrf2-Signalweges [42]. Elektrophile Verbindungen weisen nukleophile Gruppen überwiegend in Form von Sulfhydrylgruppen (-SH) auf [32], über die sie das Keap1-Molekül an seinen insgesamt 27 Cystein-Resten (Cys-) direkt modifizieren können [36, 42, 43, 44]. Dabei scheinen insbesondere die drei Cystein-Reste Cys-151, Cys-273 und Cys-288 von Keap1 direkte Angriffspunkte elektrophiler Verbindungen zu sein [36]. Den in der IVR-Region von Keap1 lokalisierten Cystein-Resten Cys-273 und Cys-288 wird unter basalen Bedingungen eine Beteiligung an der supprimierenden Wirkung auf Nrf2 zugesprochen [37, 42, 43, 44, 45]. Unter oxidativen Bedingungen kann beispielsweise auch das in der Neh5-Domäne von Nrf2 detektierte NES durch Modifikationen am Cys-183 inaktiviert werden, wodurch Nrf2 im Zellkern akkumuliert [37]. Bei Veränderungen des Redoxstatus durch oxidativen Stress kommt es im Keap1-Molekül aufgrund einer Oxidierung an Cys-151 in der BTB-Domäne zu einer Konformationsänderung, die dazu führt, dass der Rbx1-Cul3-Ligasekomplex nicht mehr binden kann, wodurch die Ubiquitinierung und dadurch der proteasomale Abbau von Nrf2 verhindert werden [37, 45]. Es wird vermutet, dass dadurch die schwächere DLG-Keap1-Bindung gestört wird. Möglicherweise bleibt die Verbindung zum ETGE-Motiv dabei bestehen, wodurch Keap1 durch immer noch gebundenes Nrf2 gesättigt bleibt und keine neuen Nrf2-Monomere binden kann [32, 36]. Des Weiteren kann Keap1 durch Nrf2-aktivierende Einflüsse über eine Modifikation an Lysin-Rest-63 polyubiquitiniert werden, wodurch eine Nrf2-Keap1-Interaktion vollständig unterbunden wird. Die Ubiquitin spezifische Protease-15 (USP-15) Deubiquitinase kann diese Polyubiquitinierung von Keap1 aufheben [36]. Somit wird entweder verstärkt synthetisiertes Nrf2 aus einem de novo-Pool oder aber bei völliger Komplexlösung mit Keap1 freigesetztes Nrf2 stabilisiert, aktiviert und transloziert in den Zellkern, wo es dann an ARE-Elementen in Promotoren bindet und nachfolgend die Expression seiner Zielgene induziert [22, 24, 30, 31, 32, 33, 36]. AREs sind „*cis-acting enhancer*“-Elemente, die eine Konsensus-Sequenz in Form von 5'-CTGACNNNGC-3' Wiederholungen in dem 5' untranslatierten Bereich (UTR) von Promotoren vieler fremdstoffmetabolisierender und antioxidativer Enzyme darstellen [30, 46]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 bildet mit anderen regulatorischen Proteinen wie sMafs oder c-Jun-Proteinen Dimere aus, die an die AREs binden, wodurch ein Transkriptom entsteht, welches die Expression antioxidativer Enzyme induziert oder reprimiert [32, 36]. Somit repräsentieren AREs wichtige Regulationselemente, die die zelluläre Antwort auf

Veränderung des Redox-Status in der Zelle steuern. Ebenso entscheidend für die Aktivierung und Dissoziation von Nrf2 scheint seine posttranslationale Modifizierung durch eine Kinasenvermittelte Phosphorylierung an Serin-40 zu sein. Für die Proteinkinase C (PKC), die mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs), die Extrazellulär-Signal-Regulierte Kinase (ERK), die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) und die Protein Kinase R-ähnliche Endoplasmatisches Retikulum Kinase (PERK) konnten derartige Phosphorylierungseigenschaften von Nrf2 nachgewiesen werden [22, 26, 32, 36]. Ferner spielen Acetylierungen der Lysin-Reste innerhalb der Neh1-Domäne, die beispielsweise für das CREB p300 beschrieben sind, eine Rolle bei der Nrf2-Aktivierung. Weiterhin können verschiedene Signalwege wie JNK die Nrf2-Aktivierung modulieren (Abbildung 5) [36].

Oxidativer und elektrophiler Stress

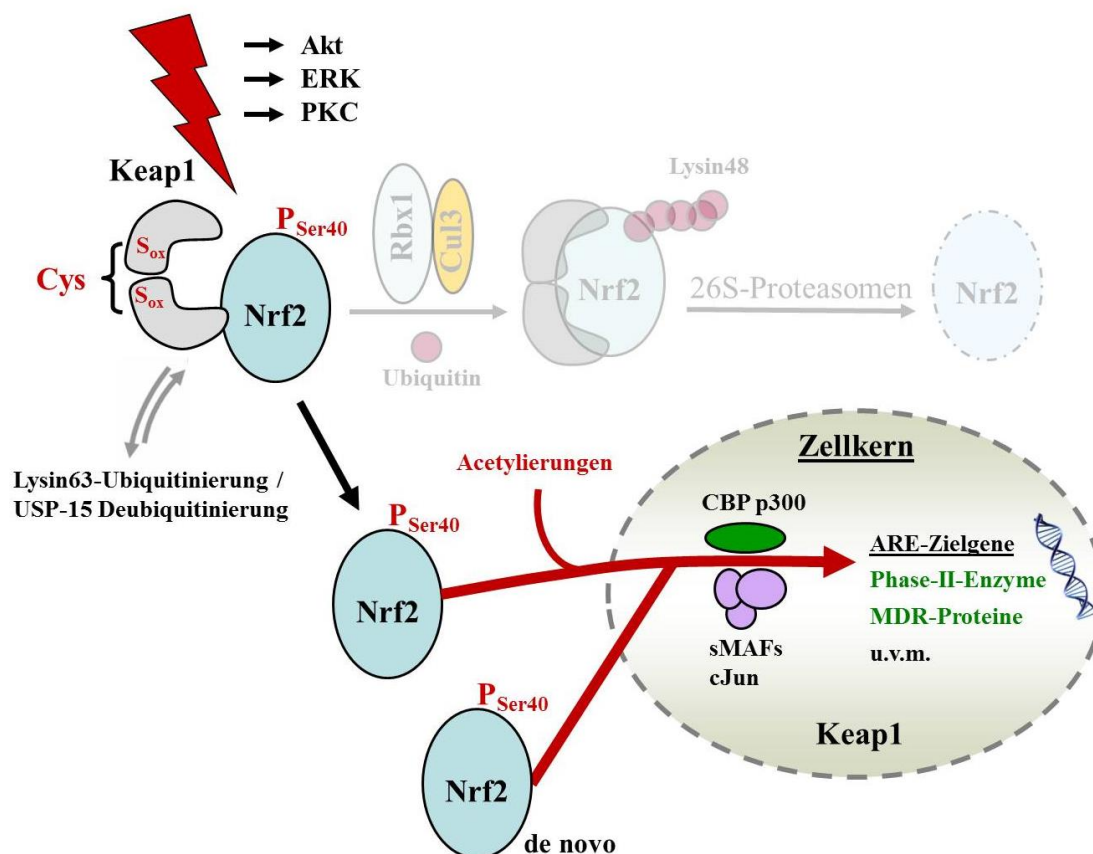


Abbildung 5: Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Kommt es in der Zelle zu oxidativem oder elektrophilem Stress, wird der Nrf2-Signalweg aktiviert. Die Nrf2-Keap1-Interaktion wird dadurch geschwächt oder sogar komplett gelöst, wodurch der proteasomale Abbau von Nrf2 über den *Ring-box protein 1* (Rbx1)- und Cullin-3-Ligasen (Cul3)-Komplex durch das 26S-Proteasom unterbunden wird (hier abgeblast dargestellt). De novo synthetisiertes oder von Keap1 dissoziiertes Nrf2 wird durch verschiedene Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen an Serin-40 (P_{Ser40}) oder Acetylierungen durch das CREB-Bindungsprotein p300) aktiviert und transloziert in den Zellkern, wo es die Expression seiner antioxidativen Zielgene über die Dimerbildung, z.B. mit *small Maf* (sMaf)- oder cJun-Proteinen, an den oxidativen Elementen induzieren kann. Die Nrf2-Aktivierung kann ebenso über andere Signalwege wie Akt (Proteinkinase B), ERK (Extrazellulär-Signal-Regulierte Kinase) oder PKC (Proteinkinase C) moduliert werden. Durch eine Polyubiquitinierung an Lysin-Rest-63 kann Keap1 seinerseits von Nrf2 gelöst werden. Die Ubiquitin spezifische Protease-15 (USP-15) Deubiquitinase kann die Polyubiquitinierung von Keap1 aufheben. Cys: Cystein-Reste. S_{ox}: oxidierte Sulfhydrylgruppe. MDR-Proteine: *multi-drug-resistance*-Proteine. Modifiziert nach [36].

Mögliche Post-Induktionsantworten, die eine Aufhebung der Nrf2-aktivierten Genexpression bewirken, repräsentieren die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), die MAPK p38 und die Glykogensynthase-Kinase 3 beta (Gsk3 β) [36]. Gsk3 β phosphoryliert unter der Kontrolle des PI3K/Akt-Signalweges die Tyrosinkinase Fyn, welche dadurch in den Zellkern transloziert und Nrf2 an Tyrosin-Rest-568 durch Phosphorylierung modifiziert. Der daraus resultierende Kernexport von Nrf2 führt zu seiner anschließenden proteasomalen Degradation [47, 48]. Gerade diesem Regulationsweg wird eine große Bedeutung in der Termination der Nrf2-Aktivierung zugemessen.

1.2.3 Bedeutung von Nrf2 in der kolorektalen Karzinogenese

Nrf2 hat große Aufmerksamkeit bezüglich seiner zentralen Rolle im Zell- und Gewebeschutz gewonnen. So kann Nrf2 unter homöostatischen Bedingungen durch seine zytoprotektive Funktion vor frühzeitigen Zellschäden und mutagenen Ereignissen schützen und einer Tumorentwicklung vorbeugen. Aus diesem Grund wird Nrf2 seit vielen Jahren als zu induzierendes molekulares *Target* mit tumorpräventiver Wirkung propagiert [22, 23, 24, 36, 49]. Für viele Nrf2-induzierende Antioxidantien wurde bereits eine positive Auswirkung in der Chemoprävention beschrieben. Hierzu zählen unter anderem Substanzen wie Sulforaphan (SFN), Oltipraz oder Curcumin [24, 36,50]. Doch basierend auf dem breiten Spektrum seiner Wirkungen und in Abhängigkeit vom zellulären Kontext scheint Nrf2 eine duale Rolle in der Tumorigenese zu spielen. Inzwischen wird dem antioxidativen Transkriptionsfaktor Nrf2 auch onkogenes Potential zugesprochen [51, 52, 53]. Es sind eine Reihe von malignen Tumoren einschließlich des kolorektalen Karzinoms bekannt, die eine verstärkte Nrf2-Aktivität aufweisen [31, 36, 54, 55]. Dabei kann eine Deregulation des Nrf2-Signalweges in Enterozyten aus einer persistierenden Stressexposition, z.B. während CED, resultieren [31, 56, 57]. Ein Gen, das ebenfalls eine wichtige Rolle in der intestinalen Stressadaptation spielt, ist das multifaktorielle Stressantwortgen *Immediate Early Response-3* Gen (IER3) [58, 59, 60].

1.3 Das multifaktorielle Stressantwortgen IER3

Das erstmalig 1996 in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCC-35 entdeckte *Immediate Early Response-3* Gen [61] stellt ein multifaktorielles Stressantwortgen dar, dessen zelluläre Funktion in der Modulation verschiedener Signalwege besteht [58]. Da IER3 bei Untersuchungen zur Wachstumsregulation der Ratte [62], Stressinduktion durch

Röntgenbestrahlung [61] sowie dem Reifungsprozess von Monozyten zu Makrophagen [63] nachgewiesen werden konnte, wurde es ursprünglich als PRG1 (*PACAP Response Gene 1*) [62], IEX1 (*Immediate Early Gene on X-Radiation 1*) [61] bzw. DIF-2 (*differentiation inducible factor 2*) [63] bezeichnet. IER3 weist eine Homologie von über 80% zu dem durch Wachstumsfaktoren induzierbaren Gen gly96 der Maus auf [64] und wird in verschiedenen Geweben exprimiert [65, 66].

1.3.1 Aufbau und Struktur

Beim humanen IER3 handelt es sich um ein 156 AS umfassendes Protein (in der Maus 160 AS) mit einer Größe von 22 kDa, welches auf dem Chromosom 6p21.3 kodiert ist [58, 67, 68, 69, 70]. Das IER3-Gen setzt sich aus einem Intron und zwei Exons mit einer sehr langen untranslatierten Region am 3'-Ende zusammen. Vorangestellt befindet sich eine Promotorregion [58], die als Bindungsstelle für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie p53, NFκB, Sp1, c-Myc, RAR und AP-1 fungiert [66, 67, 70]. Zu den funktionellen Strukturmotiven innerhalb des IER3-Proteins zählen eine ERK-abhängige Threonin-Phosphorylierungsstelle, eine *PEST-like-Sequence* (Sequenz reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin), eine Transmembranregion, eine Glykosylierungsstelle und eine Kernlokalisationssequenz (Abbildung 6) [58]. Bis zum heutigen Zeitpunkt weist IER3 keinerlei Strukturähnlichkeiten mit anderen in Vertebraten beschriebenen Proteinen auf [58, 66]. Neben dem zytoplasmatisch-nukleärem Transport von IER3 [71] wurde ebenso eine Lokalisation in der mitochondrialen Außenmembran nachgewiesen [72], die auf eine vielfältige und komplexe zelluläre Funktion von IER3 hindeutet.

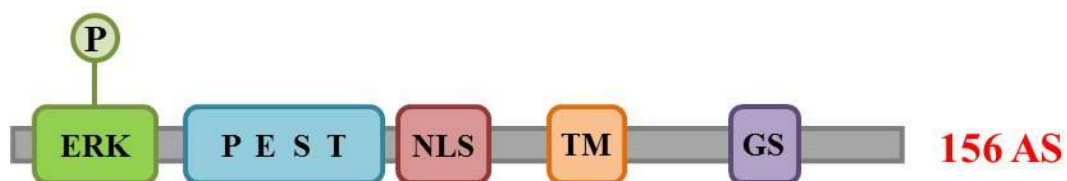


Abbildung 6: Struktureller Aufbau des IER3-Proteins. Das humane IER3-Protein ist aus 156 Aminosäuren (AS) aufgebaut. Zu den funktionellen Strukturmotiven zählen eine ERK-abhängige Phosphorylierungsstelle (P), eine prolin-, glutamat-, serin- und threoninreiche (PEST)-like *Sequence*, ein Kernlokalisierungssignal (NLS), eine Transmembranregion (TM) und eine Glykolysierungsstelle (GS). Modifiziert nach [59].

1.3.2 Funktion und Bedeutung von IER3 in der Tumorigenese und Inflammation

IER3 ist ein kurzlebiges Protein, welches infolge einer Vielzahl von Stimuli und Einflüssen rasch und transient exprimiert wird. Hierzu zählen unter anderem Stressfaktoren wie die γ - und UV-B-Strahlung oder DNA-Schäden, Wachstumsfaktoren wie PACAP (*Pituitary adenylate cyclase activating peptide*) und EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), Zytokine, chemische Karzinogene sowie virale Infektionen. Diese Stimuli induzieren das IER3-Gen direkt über die Aktivität der zahlreichen Transkriptionsfaktoren [58, 61, 62, 64, 66, 73, 74, 75, 76], die an oben beschriebener Promotorregion binden können, v.a. über AP1 und NF κ B.

IER3 ist je nach Zelltyp und Stimulus in diverse Zellfunktionen eingebunden. So ist das Stress-assoziierte Gen an der Zellzykluskontrolle und Regulation des Zellwachstums (Proliferation, Apoptose, Seneszenz) sowie der Zelldifferenzierung beteiligt [63, 66, 67, 68, 69, 73]. Über die Modulation verschiedener apoptose- und inflammationsregulierender Signalwege wie dem MAPK/ERK und PI3K/Akt- sowie dem IKK/I κ B/NF κ B-Signalweg übernimmt IER3 eine wichtige Rolle in der epithelialen Stress-Adaption bei Entzündungsreaktionen und der Tumorigenese [58, 59, 60]. Der NF κ B-Signalweg unterliegt dabei einer inhibitorischen Regulation durch IER3 im Sinne eines klassischen Feedback-Mechanismus [60, 67, 77, 78, 79]. Das IER3-Gen, welches selbst ein NF κ B-Zielgen darstellt [58, 67], führt durch seine Interferenz mit der proteasomalen Degradation von phospho-I κ B α [77, 80] sowie der direkten Wechselwirkung mit der NF κ B-Untereinheit p65/RelA [78] zu einer reduzierten NF κ B-Aktivierung. Ein Verlust von IER3 führt entsprechend zur verstärkten NF κ B-Aktivierung [67, 68, 77, 78, 81], verbunden mit einer erhöhten Expression antiapoptotischer NF κ B-Zielgene wie Bcl2 oder cIAP1 [78, 81] und einem daraus resultierenden Apoptoseschutz von Tumorzellen. Zum anderen ist die inflammatorische Potenz von Immunzellen durch die verstärkte Expression von NF κ B-regulierten Zytokinen wie IL-6 erhöht [60]. Eine negative Interferenz ist ebenso für IER3 und den PI3K/Akt-Signalweg beschrieben worden [82]. Aufgrund der modulierenden Wirkungseigenschaft auf verschiedene Signalwege wird dem IER3-Gen eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen, die kürzlich anhand von IER3-defizienten Mäusen [60] und Studien mit CED-Patienten [83] bestätigt werden konnte. Des Weiteren wird in verschiedenen Tumoren für das IER3-Gen tumorsuppressive Wirkung postuliert [58, 66] – so auch beim Kolonkarzinom, wo eine erniedrigte IER3-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechterer Prognose assoziiert ist. Diese inverse Korrelation zwischen der IER3-Expression und der

Formation kolorektaler Karzinome konnte sowohl tierexperimentell als auch anhand von Patientendaten nachgewiesen werden [84].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

CED wie die Colitis ulcerosa zählen zu den Risikofaktoren für die Entwicklung kolorektaler Karzinome [3, 4, 14, 15]. Es ist mittlerweile anerkannt, dass die anhaltende Exposition von Enterozyten in einer entzündlichen Umgebung molekulare Veränderungen für die Tumorentwicklung begünstigt [14, 15, 16, 17, 18]. Hierbei scheint die Deregulation des Nrf2-Signalweges eine bedeutsame Rolle zu spielen [31, 36, 54, 55, 56, 57, 85]. Das IER3-Gen ist durch seine antiinflammatorische Wirkung in die epitheliale Stress-Adaption involviert, indem es unter anderem verschiedene Signalwege moduliert [58, 59, 60]. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob IER3 möglicherweise auch an der Modulation von Nrf2 beteiligt ist. Eine Attenuierung der Nrf2-Aktivierung durch IER3 würde einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Mechanismus darstellen, durch den Nrf2 im entzündungsassoziierten Kolonkarzinom dereguliert und IER3 tumorsuppressiv wirkt. Dies würde eine weitere Grundlage der Tumorentstehung vor dem Hintergrund einer epithelialen Stressadaption während der entzündlichen Karzinogenese des Darmes darstellen.

Folglich soll die Interferenz von IER3 mit der Nrf2-Aktivierung und deren Auswirkung auf den zellulären Phänotyp im Zusammenhang der Kolitis assoziierten Tumorentstehung genauer untersucht werden. Im Einzelnen ist hierzu herauszufinden, ob:

- (1) ein Einfluss von IER3 auf die Aktivität von Nrf2 besteht,
- (2) die Beeinflussung der Nrf2-Aktivität durch IER3 auf Ebene der nukleären Translokation von Nrf2 oder dessen transkriptioneller Aktivität stattfindet,
- (3) ein veränderter zellulärer Redoxstatus in Abhängigkeit von IER3 die Nrf2-Aktivierung und damit die zelluläre oxidative Stressantwort beeinflusst,
- (4) aus der IER3 abhängigen Regulation von Nrf2 ein verändertes Apoptoseverhalten resultiert.

Dazu sollen verschiedene Parameter der Nrf2-Aktivierung untersucht werden. Zum einen in Ex-vivo-Analysen anhand von murinem Kolongewebe aus dem DSS (Dextran-Natrium-Sulfat)-Kolitis-Modell sowie anhand von murinen (unbehandelten) Kolonorgangewebekulturen unter Verwendung IER3-defizienter (*gly96/ier3^{-/-}*) und -profizienter (*gly96/ier3^{+/+}*) C57BL/6 Mäuse. Als mögliches In-vitro-Modell etablierte sich die humane Kolonepithelzelllinie NCM460 (*normal-derived colon mucosa cells 460*). In dieser aus

gesunder Darmschleimhaut des transversalen Kolons isolierten Zelllinie soll das IER3-Gen sowohl durch die stabile Transfektion mit einer shRNA (*short hairpin* RNA) gegen IER3 dauerhaft ausgeschaltet werden, als auch durch die transiente Transfektion mit einem Expressionsplasmid überexprimiert werden. Durch den Einsatz elektrophiler Nrf2-Aktivatoren wie SFN oder tertiärem Butylhydrochinon (tBHQ) soll hier eine oxidative Stressantwort induziert werden. Ferner sollen unterschiedliche molekulare Effekte durch den Einsatz von Inhibitoren oder siRNA (*small interfering* RNA) zur Untersuchung von möglichen IER3-Nrf2-Konsolidierungs-Signalwegen in der Zelle aufgehoben werden.



Abbildung 7: Projektskizze über die Untersuchung der molekularen Interferenz des IER3-Gens mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2. Im Folgenden sollen Ex-vivo-Analysen anhand von murinem Kolongewebe aus dem DSS (Dextran-Natrium-Sulfat)-Kolitis-Modell sowie anhand von murinen (unbehandelten) Kolonorgangewebekulturen unter Verwendung IER3-defizienter (gly96/ier3^{-/-}) und -profizienter (gly96/ier3^{+/+}) C57BL/6 Mäuse durchgeführt werden. Als mögliches In-vitro-Modell wurde die humane Kolonepithelzelllinie NCM460 verwendet. In der aus gesunder Darmschleimhaut des transversalen Kolons isolierten Zelllinie wurde das IER3-Gen sowohl durch die stabile Transfektion mit einer shRNA (*short hairpin* RNA) gegen IER3 bzw. einer Kontroll-shRNA dauerhaft ausgeschaltet, als auch durch die transiente Transfektion mit entsprechenden Plasmiden überexprimiert. Der blaue Kasten zeigt einen Überblick der Methoden, die in den folgenden Versuchen zur Analyse verschiedener Parameter der Nrf2-Aktivierung angewandt wurden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Zelllinien und Organgewebekulturen

Tabelle 1: Zelllinien und Organgewebekulturen.

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Referenz
NCM460	human	Benignes Kolonmukosaepithel (transversales Kolon)	INCELL-Corporation, San Antonio, Texas, USA
NCM460 co1 NCM460 co2 NCM460 #2-3	human	Benignes Kolonmukosaepithel (transversales Kolon); stabil transfiziert mit Kontroll- bzw. IER3-shRNA	Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer, Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Kolonorgan- gewebekultur	murin	Kolongewebe DSS-behandelter sowie unbehandelter IER3-defizienter (gly96/ier3 ^{-/-}) und -profizienter (gly96/ier3 ^{+/+}) C57BL/6 Mäuse	Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer in Kooperation mit Konrad Aden, IKMB, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

2.1.1 Medien und Medienzusätze

DSS	TdB Consultancy AB, Uppsala, Schweden
FCS	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories, Cölbe
M3A-Medium	INCELL-Corporation, San Antonio, Texas, USA
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Puromycin	Sigma-Aldrich Chemie, München
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Cölbe
Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie, München

2.2 Zellkultur und Verbrauchsmaterialien

6-/12-/24-well Platten	Greiner, Frickenhausen
Autoklav	Systemec, Wetztenberg

Brutschrank CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
FCS	Biochrom, Berlin
Gasbrenner FIREBOY plus	Integra Biosciences, Schweiz
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Basel, Schweiz
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Omnilab, Hamburg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipette Glas 230 mm	Assistent, Sondheim
pH-Meter Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Pipet-Boy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipettenspitzen 10 µl farblos	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten 10/20/100/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe
Vakuumpumpe	KNF Laboport, Freiburg
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen
Wasserbad Julabo 7A	Julabo, Seelbach
Zellkulturflasche, 250 ml (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.3 Stimulantien, Inhibitoren und Zytostatika

DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
Etoposid	Bristol-Myers Squibb, München
Killer-TRAIL	Enzo Life-Sciences über Alexis, Lössach
LY294002, PI3 Kinase Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt

SFN Sigma-Aldrich Chemie, München
 tBHQ Sigma-Aldrich Chemie, München

2.4 Transfektion

2.4.1 Transiente Transfektion

2.4.1.1 siRNA Transfektion

Tabelle 2: siRNAs und ihre Bezugsquellen.

siRNA	Bestell-Nummer	Firma
AllStars Negative Control siRNA	SI1027280	Qiagen, Hilden
Hs_AKT1_10 FlexiTube siRNA	SI02757244	Qiagen, Hilden
Hs_FYN_7 FlexiTube siRNA	SI02654729	Qiagen, Hilden
Hs_NFE2L2_6 FlexiTube siRNA	SI03246614	Qiagen, Hilden

HiPerFect Qiagen, Hilden
 OptiMEM Gibco, Life Technologies, Karlsruhe

2.4.1.2 Plasmid Transfektion

EffecteneTM Transfection Reagent Qiagen, Hilden
 IER3 Überexpressionsplasmid Eigenklonierung (Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer, Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel)
 Signal ARE Reporter Assay Kit Qiagen, Hilden
 pcDNA3.1 (mock) Plasmid Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt

2.4.2 Stabile Transfektion

IER3 SureSilencing shRNA-Plasmid Qiagen, Hilden
 Bestell-Nummer: KH10008

2.4.2.1 Bakterientransformation

Agar-Agar Becton Dickinson, Heidelberg
 Ampicillin Sigma-Aldrich Chemie, München
 Petrischale 100x20 mm Sarstedt, Nümbrecht
 Hefeextrakt Becton Dickinson, Heidelberg

Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
OneShot® TOP10 Chemically Competent	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
E. coli Bakterien	
Schüttelinkubator GFL 3005 Unihood 550	UniEquip, Martinsried
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad Julabo 7A	Julabo, Seelbach

2.4.2.2 Plasmidaufreinigung

EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.4.2.3 PstI (Providencia stuartii-I) Restriktionsenzymverdau

6x loading dye-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Agarose	Roth, Karlsruhe
DNA Marker 2-log DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt am Main
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Gel Doc™ EZ Imager	Bio-Rad Laboratories, München
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden
PstI-Restriktionsenzym	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Tris-Base	Biomol, Hamburg
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau

2.5 Herstellung von Ganzzelllysaten

Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
----------	-------------------------------

PBS	PAA Laboratories, Cölbe
SDS	Biomol, Hamburg
Tris-Base	Biomol, Hamburg
Ultraschall-Laborhomogenisator Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau

2.6 Isolierung von Kernproteinen

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 #P5726	Sigma-Aldrich Chemie, München
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 3 #P0044	Sigma-Aldrich Chemie, München
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, München
Schüttler Tumbling Table	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.7 Quantitative Bestimmungen der Proteinkonzentration

96-well Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
BSA	Serva, Heidelberg
DC TM Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Plattenphotometer Opsys MR5000	Dynex Technologies, Berlin
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München
Revelation QuickLink Software	Dynex Technologies, Berlin

2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid	Biomol, Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammer X-Cell SureLock	Invitrogen, Karlsruhe

Glycin	Merck, Darmstadt
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PageRuler™ Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS	Biomol, Hamburg
Temed	Sigma-Aldrich Chemie, München
Thermomixer/Thermoblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Transferpipette	Sarstedt, Nümbrecht
Tris-Base	Biomol, Hamburg
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, München

2.9 Proteintransfer (Western-Blotting)

6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Blotkammer Fastblot	Biometra, Göttingen
Filterpapier Whatman 3 MM	Biometra, Göttingen
Methanol 100%	Merck, Darmstadt
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Transfermembran Immobilion-PVDF	Milipore, Billerica, Massachusetts, USA
Tris-Base	Biomol, Hamburg

2.10 Immunnachweis der Proteine

Primärantikörper

Tabelle 3: Anwendung der Primärantikörper (Westernblot).

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Akt	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Fyn	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
GCLC	Kaninchen	1:1000	Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom
HSP90	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
IEX-1	Ziege	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Lamin A/C	Ziege	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
NQO1	Maus	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main

Nrf2	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Phospho-Akt	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
α -Tubulin	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie, München

Sekundärantikörper

Tabelle 4: Anwendung der Sekundärantikörper (Westernblot).

Antikörper	Spezies	Anwendung	Hersteller
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:2000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Maus-HRP	Pferd	1:2000	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Ziege-HRP	Esel	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

BSA	Serva, Heidelberg
ChemiDoc XRS™	Bio-Rad Laboratories, München
IKA®-Schüttler MTS2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Quantity One® Software	Bio-Rad Laboratories, München
Rollenmischer roller mixer SRT6D	VWR, Darmstadt
SuperSignal West Dura	Pierce Perbio Science, Bonn
Tris-Base	Biomol, Hamburg
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München

2.11 RNA-Techniken

2.11.1 RNA-Isolierung

Ethanol	Merck, Darmstadt
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
peqGold Total RNA Kit	Qiagen, Hilden
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.11.2 RNA-Quantifizierung

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen
------------------------------------	--------------------------------

2.11.3 Reverse Transkription

10 mM dNTP Mix	Fermentas, Invitrogen, Karlsruhe
5x Reaktionspuffer	Fermentas, Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Fermentas, Invitrogen, Karlsruhe
Oligo-dT-Primer	Fermentas, Invitrogen, Karlsruhe
RiboLock <i>RNase</i> Inhibitor (20 U/μl)	Fermentas, Invitrogen, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Thermoblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.11.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Realtime-PCR*)

Tabelle 5: Verwendete Primer und Sequenzen.

Primer	Vorwärts- und Rückwärtsprimer	Hersteller
humanes GCLC	5`- AGT TGA GGC CAA CAT GCG AA -3` 5`- TGA AGC GAG GGT GCT TGT TT -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
murines GCLC	5`- CAT CAT CAA TGG GAA GGA AG -3` 5`- GGA TGG TTT GCA ATG AAC TC -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
humanes IER3	5`- GAC AGT CGC TCC GTG ACA G -3` 5`- TGC AAG GGT GTG AGA TGT TC -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
murines IER3	5`- GGA CTA TGC GCT GGA TCT TA -3` 5`- GTG TCT CTT GGC GGT AGT GT -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
humanes NQO1	5`- AAA TCC TGG AAG GAT GGA AG -3` 5`- TTG TCA GTT GGG ATG GAC TT -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
murines NQO1	5`- CAC AGG TGA GCT GAA GGA CT -3` 5`- GTA GGC AAA TCC TGC TAC GA -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
humanes TBP	5`- TAT AAT CCC AAG CGG TTT GC -3` 5`- GCT GGA AAA CCC AAC TTC TG -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA
murines β-Actin	5`- AAG AGC TAT GAG CTG CCT GA -3` 5`- TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC -3`	RealTimePrimers®, Elkins Park, USA

96-well PCR-Platte	Bio-Rad Laboratories, München
Folie für 96-well PCR-Platte	Bio-Rad Laboratories, München
iCycler iQ Optical System Software	Bio-Rad Laboratories, München

iCycler MyiQ	Bio-Rad Laboratories, München
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau

2.12 Luziferase Reporter Assay

96-well Platte, weiß-ummantelt	Falcon über BD Biosciences, Hamburg
Berthold Microplate Luminometer LB96V	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Dual-Luziferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
WinGlow Software	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau

2.13 Caspase-3/-7-Assay

15 ml FACS- Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
96-well Platte, weiß-ummantelt	Falcon über BD Biosciences, Hamburg
Berthold Microplate Luminometer LB96V	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Caspase-Glo® 3/7 Assayreagenz	Promega, Mannheim
Eppendorf Centrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe
WinGlow Software	Berthold Technologies, Bad Wildbach

2.14 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies

Brutschrank CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
c-H ₂ DCFDA	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
i-control™-Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
MitoSox™ Red Reagenz	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
OptiMEM	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Tecan Infinite200 Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Wasserbad Julabo 7A	Julabo, Seelbach

2.15 Immunhistochemische Färbungen

Primärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen.

Antikörper	Spezies	Anwendung	Hersteller
IgG ₁ -Kontroll-Antikörper	Kaninchen	1:100/ 1:200	R&D Systems, Abingdon, UK
PE-F4/80	Ratte	1:100	AbD Serotec, Düsseldorf
Phospho-Akt	Kaninchen	1:100	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Ser40-Phospho-Nrf2	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, United Kingdom

Sekundärantikörper

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen.

Antikörper	Spezies	Anwendung	Hersteller
Cy3-anti-Kaninchen	Ziege	1:100	Dianova, Hamburg
anti-Ziege-HRP	Esel	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Aceton	Merck, Darmstadt
AEC Peroxidase Substrat Kit	DakoCytomation, Hamburg
BSA	Serva, Heidelberg
Deckgläser, rund	Menzel Gläser, Braunschweig
EnVision-Konjugat anti-Hase-Peroxidase	DakoCytomation, Hamburg
FluorSave TM Reagenz	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kryotom Leica CM1850	Leica Biosystems, Wetzlar
Mayers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss, Jena
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
SuperFrost Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Tissue-Tek® O.C.T Compound	Science Services, München

3 Methoden

3.1 Zelllinien und Organgewebekulturen

3.1.1 Humane Zelllinien

3.1.1.1 NCM460

Die kultivierte Zelllinie NCM460 wurde aus gesunder Darmschleimhaut des transversalen Kolons eines 68-jährigen an Magenkrebs erkrankten Lateinamerikaners isoliert und von INCELL Corporation bezogen. Die Zellen zeigen in immunhistochemischen Untersuchungen eine für vitale Dickdarmzellen charakteristische Expression von den Epithelzellmarkern Zytokeratin, Villin und HSC (*Human Secretory Component*). Durch In-vivo-Studien anhand von immundefizienten SCID-Mäusen konnte gezeigt werden, dass subkutan injizierte NCM460-Zellen keine tumorigene Wirkung aufweisen. Aufgrund der veränderten Umgebungsbedingungen durch die In-vitro-Selektion ist es möglich, dass die Zelllinie einen transformierten Phänotyp aufweist, aber dennoch im Vergleich zu vitalen Kolonepithelzellen hauptsächliche funktionale Aspekte beibehält [86]. Die adhärent wachsenden Zellen haben eine Verdopplungszeit von 32-38 Stunden (h) und sind weder mit exogenem genetischen Material infiziert noch transfiziert. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ist die Zelllinie NCM460 insgesamt als In-vitro-Modell für benigne Kolonmukosaepithelzellen geeignet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) Medium, dem 10% FCS (fötales Kälberserum) und 1% L-Glutamin zugesetzt wurden.

3.1.1.2 Stabil transfizierte NCM460-Zellen

Mit Hilfe von SureSilencing shRNA-Plasmiden (Qiagen) konnten stabil transfizierte NCM460-Zelllinien nach einem etablierten Protokoll selektiert werden, in denen das IER3-Gen dauerhaft ausgeschaltet wurde. Parallel dazu wurden Kontrollzelllinien mit normaler IER3-Genexpression gewonnen. Unter dem Selektionsdruck von Puromycin konnten die Zellen von herkömmlichen NCM460-Zellen separiert und in die Zellkultur übernommen werden. Das Wachstum und die Zellmorphologie wurden regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert und die genomische Integration der shRNAs mittels *Realtime-Polymerasekettenreaktion* (3.11.4) überprüft. Sowohl die unter dem Namen NCM460 #2-3 geführte Zelllinie, in der das IER3-Gen dauerhaft ausgeschaltet wurde, als auch die Kontrollzelllinien, NCM460 co1 und NCM460 co2, wurden in M3A-Medium kultiviert. Das

Medium wurde mit 10% FCS und 1 µg/ml Puromycin für die Zelllinie NCM460 #2-3 bzw. 0,5 µg/ml Puromycin für die Kontrollzelllinien ergänzt.

3.1.2 Murine Organgewebekulturen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Ex-vivo-Analysen erfolgten anhand IER3-defizienter (*gly96/ier3^{-/-}*) und -profizienter (*gly96/ier3^{+/+}*) C57BL/6 Mäuse. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Zentralen Tierhaltung des UKSH, Campus Kiel. Die Experimente erfolgten gemäß Tierversuchsgenehmigung durch das Umweltministerium des Landes Schleswig-Holstein (Az: V312-72241.121-4 (3-1/07)). In einem Teil der Versuchsreihen wurde das von Okayasu et al. [87] entwickelte Modell der DSS-induzierten Kolitis der Maus angewandt. Das Modell basiert auf einer zyklischen Verabreichung von im Trinkwasser gelöstem DSS. Dextran-Sulfat ist ein Natriumsalz, welches bei der Veresterung des bakteriellen Polysaccharids Dextran mit Chlorschwefelsäure entsteht. Es wird vermutet, dass DSS direkte toxische Auswirkungen auf die Enterozyten hat und die Wechselbeziehung zwischen intraepithelialen Lymphozyten, der extrazellulären Matrix und Epithelzellen beeinflusst. Das klinische Bild und die histologisch feststellbaren Veränderung im Kolon (verkürztes Kolon, Epithelerosionen, Einwanderung von Granulozyten sowie Dysplasien) sind nahezu mit der menschlichen Erkrankung vergleichbar [87, 88]. In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurden die Mäuse für 5 Tage mit 2% in destilliertem Wasser gelöstem DSS behandelt. Anschließend erfolgte die Verabreichung von unbehandeltem Trinkwasser für 5 Tage. Um eine chronische Kolitis zu induzieren, wurde dieser Zyklus insgesamt dreimal wiederholt. Die Präparation des aus dem DSS-Kolitis-Modell gewonnenen als auch unbehandelten Kolongewebes erfolgte durch Konrad Aden (IKMB, Kiel). Nach der Entnahme distaler Kolonanteile aus *gly96/ier3^{-/-}* oder *gly96/ier3^{+/+}* C57BL/6 Mäusen wurde das Darmgewebe längs aufgeschnitten und zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), welche mit 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde, gewaschen. Die Gewebe wurden dann weiter in Segmente von 1 cm² Größe geschnitten und in 24-well Platten in 1 ml RPMI 1640 Medium, welches mit 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde, aufgenommen. Nach einer Inkubation von 16-24 h bei 37°C im Brutschrank wurde ein Teil der kultivierten Enterozyten mit 50 µM tBHQ über verschiedene Zeiträume behandelt, ehe die Aufarbeitung der Zellen zu Kernextrakten, Ganzzelllysaten oder Gesamt-RNA-Lysaten erfolgte.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in 5%-iger Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre (CO₂) und einer Luftfeuchtigkeit von 85% kultiviert. Die Zellkultur wurde regelmäßig auf Mycoplasmen-Kontamination überprüft.

3.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Aufbewahrung der Zelllinien erfolgte in FCS mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff. Für die Inkulturnahme der Zellen wurden die Aliquots in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit dem entsprechenden Kulturmedium versetzt. Nach einer Zentrifugation von 5-10 Minuten (min) bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurde der Überstand abgenommen und die pelletierten Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach der Überführung der Zellsuspension in eine 250 ml Zellkulturflasche wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche bis maximal zur 20. Passage. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Wachstumsrate bei einer Konfluenz von etwa 80% geteilt. Hierzu wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1×Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) für 5 bis 15 min je nach Zelllinie abgelöst. Der Ablösevorgang wurde durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium neutralisiert und die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5-10 min bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellsuspension in 10 ml frisches Medium aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen entweder für die Weiterkultivierung in eine neue Zellkulturflasche mit je 10 ml Medium überführt oder für Versuche plattiert.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Um standardisierte Bedingungen in den Versuchsexperimenten mit einer vergleichbaren Zelldichte zu gewährleisten, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde der Mittelwert der vier ausgezählten Quadranten gebildet und mit dem Kammerfaktor 10000 (10⁴) multipliziert. Alle Versuche, die in 12-well Platten durchgeführt wurden, erhielten dabei

pro well eine Konzentration von 1×10^5 Zellen, während in 6-well Platten pro well 2×10^5 Zellen ausgesät wurden.

3.2.4 Kryokonservierung der Zellen

Zur Aufbewahrung der Zelllinien in einer bestimmten Zellpassage wurden die Zellen zunächst für ca. 20 min in FCS auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 100 μ l DMSO pro ml FCS wurde die Zelllösung in Kryoröhrchen überführt und für 24 h in einer Polystyrolbox bei -80 °C gelagert, um eine gleichmäßige Gefrierate und eine langsame Abnahme des Zellstoffwechsels zu erreichen. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Stimulantien, Inhibitoren und Zytostatika

Die elektrophilen Nrf2-Aktivatoren tBHQ und SFN wurden jeweils nach Herstellerangaben in DMSO gelöst und mit einer Arbeitskonzentration von 50 μ M für tBHQ bzw. 10 μ M für SFN eingesetzt. Die Stimulation erfolgte über verschiedene Zeiträume. Die mit dem PI3K/Akt-Inhibitor LY294002 durchgeführten Versuchsansätze wurden mit 25 μ M LY294002 präinkubiert, bevor in einem Teil der Versuchsreihen eine anschließende Nrf2-Aktivierung durch tBHQ oder SFN über 16 h erfolgte. Die Herstellung des Arbeitsstocks erfolgte nach Herstellerangaben in DMSO. In den Untersuchungen hinsichtlich des Apoptoseverhaltens wurden das Zytostatikum Etoposid über 24 h in einer Konzentration von 20 μ g/ml und der Todesligand TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) in einer Konzentration von 10 ng/ml für 8 h eingesetzt.

3.4 Transfektion von Zellen

Die Transfektion beschreibt das Einbringen von fremdem genetischen Material (DNA oder RNA) in eukaryotische Zellen, wodurch es in der Wirtszelle entweder zur Stimulation der Proteinsynthese unter Bildung des eingebrachten Genprodukts (Plasmidtransfektion) oder zur Ausschaltung bestimmter Gene (siRNA-/shRNA-Transfektion) kommt. Dabei kann die fremde RNA bzw. DNA zeitweilig (transient) oder dauerhaft (stabil) in das Genom der Wirtszelle eingebaut werden.

3.4.1 Transiente Transfektionen

3.4.1.1 siRNA-Transfektion

siRNAs sind kurze, aus 20-30 Nukleotiden bestehende Ribonukleinsäuren. Sie zählen zu den nicht kodierenden RNAs (ncRNAs) und regulieren die Genexpression. Des Weiteren spielen sie im Rahmen der RNA-Interferenz in eukaryotischen Zellen bei der Verteidigung gegen Viren eine entscheidende Rolle. In der Molekularbiologie werden synthetisch hergestellte siRNAs eingesetzt, um durch RNA-Interferenz die Expression spezifischer Zielgene zu verringern. Dazu bindet die siRNA an komplementäre Sequenzen auf zellulärer mRNA (*messenger RNA*), welche dadurch abgebaut wird. Durch den Einsatz von spezifischen siRNAs können Gene also gezielt abgeschaltet und die Funktion des von dem Gen kodierten Proteins genauer analysiert werden.

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Zellen ca. 24 h nach Aussaat unter Verwendung des HiPerFect-Transfektionsreagenz mit siRNA transfiziert. Dazu wurde je nach Plattengröße (Tabelle 8) serumfreies Medium (OptiMEM) mit der entsprechenden siRNA und dem HiPerFect-Transfektionsreagenz vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben. Bis zur weiteren Bearbeitung der Zellen wurde die Zellkultur für mindestens 48 h fortgeführt.

Tabelle 8: siRNA-Transfektion mit HiPerFect.

Platte	OptiMEM	HiPerFect	siRNA	Medium/well vorlegen
12-well	100 µl	6 µl	100 ng (0,4 µl)	1000 µl
6-well	100 µl	12 µl	200 ng (0,8 µl)	2000 µl

3.4.1.2 Plasmid-Transfektion

Plasmide sind kleine, doppelsträngige, ringförmige DNA-Moleküle, welche in vielen Bakterien extrachromosomal vorkommen. In der Molekularbiologie werden Plasmide als Vektoren verwendet, die als Trägermoleküle bei der Integration eines Fremdgens in das Wirtsgenom fungieren.

Die Plasmid-Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz EffecteneTM. Das auf Lipofektion basierende Transfektionsverfahren besteht aus zwei Schritten: Je nach Plattengröße wurden pro Ansatz unterschiedliche Mengen an Reagenzien pipettiert (Tabelle 9). Zunächst wurde den Zellen frisches Medium vorgelegt. Anschließend wurden in einem 50

ml Röhrchen der EC-Puffer, das gewünschte Plasmid und der Enhancer vermischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. In diesem Schritt wird die negativ geladene Plasmid-DNA durch den positiv geladenen Enhancer kondensiert. Der EC-Puffer stellt dabei eine optimale Salzkonzentration für eine effiziente Kondensation der DNA-Moleküle bereit. Nachfolgend wurde das EffecteneTM-Reagenz hinzugefügt, welches die DNA-Moleküle in Form von Mizellen mit kationischen Lipiden ummantelt und mit der kondensierten DNA Komplexe in Form von Liposomen ausbildet, die leicht mit der Zellmembran fusionieren können. In dieser Form kann die Plasmid-DNA durch Endozytose in das Genom der Wirtszelle integriert werden. Nach 10-minütiger Inkubation des Gemisches bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz mit einem Anteil des jeweiligen Kulturmediums versetzt und unmittelbar tröpfchenweise zu den Zellen hinzugefügt. Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel 10 h nach Transfektion. Die Zellen wurden bis zur Aufarbeitung für mindestens 24 h in Kultur gehalten.

Tabelle 9: Plasmidtransfektion mit EffecteneTM (Qiagen).

Platte	Medium/ well	EC-Puffer	Plasmid	Enhancer/ �g Plasmid	Effectene TM / �g Plasmid	Medium zum Ansatz
6-well	1600 Öl	100 Öl	0,8 �g	8 Öl	20 Öl	600 Öl
12-well	750 Öl	50 Öl	0,4 �g	8 Öl	20 Öl	300 Öl

3.4.2 Stabile Transfektion

shRNAs sind kurze haarnadelstrukturbildende RNA-Sequenzen, durch die mit Hilfe der RNA-Interferenz spezifische Gene permanent ausgeschaltet werden können. In dieser Arbeit wurden humane NCM460-Zellen stabil mit SureSilencing shRNA-Plasmiden, die von der Firma Qiagen konstruiert und bezogen wurden, transfiziert, um das IER3-Gen dauerhaft auszuschalten. Die Plasmide exprimieren eine Kontroll-shRNA bzw. eine spezifische shRNA gegen IER3, die unter der Kontrolle eines U1-Promotors transkribiert werden. Zudem tragen die Plasmide zusätzlich ein Ampicillin- und ein Puromycinresistenzgen, wodurch die Selektion stabil transfizierter Klone ermöglicht wird. Die im Transformationsgrad gelieferten Plasmide mussten zunächst in Bakterien repliziert werden.

3.4.2.1 Bakterientransformation

Nach dem Auftauen auf Eis wurden 50 µl der zur Transformation verwendeten chemisch kompetenten OneShot® TOP10 Escherichia coli-Bakterien (E. coli) mit 2 µg des jeweiligen SureSilencing shRNA-Plasmids vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Da E. coli keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme fremder DNA besitzen, erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden (sek) bei 42 °C im Wasserbad, durch den in der Bakterienmembran Poren, die zur Plasmidaufnahme befähigen, entstehen. Danach wurden die Bakterienzellen für 2 min auf Eis abgekühlt und in 250 µl auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur und 225 rpm in einem Schüttelinkubator. Anschließend wurden 15 µl der transformierten Bakteriensuspension auf die mit Ampicillin versetzten, vorgewärmten LB-Agarplatten (Luria-Bertani Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne gewachsene Bakterienkolonien selektiert und mit Hilfe einer sterilen Öse in einer Kultur, bestehend aus der selektierten Bakterienkolonie und 5 ml LBA-Medium, angeimpft. Die Kultur inkubierte unter Schütteln bei 37 °C in einem 50 ml Röhrchen. Nach 8 h wurden 100-200 µl dieser Kultur zu 100 ml frischem selektivem LBA-Medium gegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 300 rpm über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt.

LBA-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Natriumchlorid
	5 g/l	Hefeextrakt
	100 µg/ml	Ampicillin
	ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest.}
	pH 7,4	
LBA-Agar	15 g	Agar
	ad 1000 ml	LBA-Medium

3.4.2.2 Plasmidaufreinigung

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits. Dazu wurde der Überstand der Übernachtskultur nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4000 rpm und 4 °C abgenommen und das Bakterienzellpellet in 10 ml des P1-Puffers

resuspendiert. Dem P1-Puffer wurden zuvor 100 µg/ml RNase A sowie in einer 1:1000-Verdünnung LyseBlue-Puffer zugesetzt. Der LyseBlue-Puffer dient in den folgenden Reaktionsschritten durch Farbumschläge als Indikator für ein optimales Mischverhältnis zwischen der Bakteriensuspension und den Puffern, durch die ineffiziente Zelllysen und inkomplette Präzipitationen von bakteriellen Zelldebris verhindert werden können. Anschließend wurden 10 ml des auf 37 °C vorgewärmten Puffers P2 zu dem Reaktionsansatz gegeben und dieser sorgfältig bis zum Sichtbarwerden eines blauen Farbumschlages vermischt. Der P2-Puffer bewirkt durch die Anwesenheit der RNase A und seiner erhöhten Salzkonzentration den Aufbruch und die Denaturierung der bakteriellen Zellmembranbestandteile, der zellwandgebundenen chromosomalen DNA sowie die Freisetzung der Plasmid-DNA. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurden die Lysate mit 10 ml des auf 4 °C gekühlten Neutralisationspuffers P3 bis zum Erreichen eines farblosen Reaktionsansatzes vermischt. Durch den Puffer P3 kommt es zur Ausfällung der bakteriellen Zellbestandteile, während die Plasmid-DNA renaturiert wird und somit in Lösung bleibt. Die Suspension wurde anschließend auf eine Filterkartusche gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe sie mit dem Stempel in ein 50 ml Röhrchen gepresst wurde. Danach wurden 2,5 ml des Puffers ER zum Filtrat gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Einbringen einer QIAGEN-Tip 500 Säule in ein 50 ml Röhrchen wurden zunächst 10 ml QBT-Puffer auf die Säule pipettiert und dessen Durchfluss vollständig abgewartet. Dieser Schritt dient der Äquilibration der Säule. Anschließend wurde das gewonnene und die Plasmid-DNA enthaltene Lysat auf die QIAGEN-Tip 500 Säule pipettiert. Nun folgten zwei Reinigungsschritte durch die Zugabe von je 30 ml QC-Puffer. Schließlich wurde die QIAGEN-Tip 500 Säule in ein sauberes 50 ml Röhrchen gegeben und die Plasmid-DNA mit 15 ml QN-Puffer eluiert. Um die Plasmid-DNA auszufällen, wurden 10,5 ml Isopropanol zum Elutionsansatz gegeben. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 2,5 ml 70%igem, Endotoxin-freiem Ethanol versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C wurde das Pellet für 10-15 min luftgetrocknet und anschließend in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde im Spectrophotometer NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 mit automatischer Quantifizierung gemessen. Die Aufbewahrung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

3.4.2.3 PstI (*Providencia stuartii* I) Restriktionsenzymverdau

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigten Plasmide das spezifische shRNA-Insert enthalten, wurde ein Restriktionsenzymverdau mit der Restriktions-Endonuklease PstI durchgeführt. Dazu wurde ein 10 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 1 µg der aufgereinigten Plasmid-DNA, 1 µl 10x Restriktionspuffer NEBuffer3, 1 µl (1U) des Restriktionsenzymes PstI, 1 µl 10x Rinderserumalbumin (BSA) und 5 µl Nuklease-freiem Wasser, hergestellt, vermischt und für 2 h bei 37° C inkubiert. Restriktionsenzyme spalten DNA an spezifischen Schnittstellen aus 4-8 Basen, meist Palindromen, wodurch „sticky ends“ (klebrige Enden), d.h. einzelsträngige Enden mit vier Basen, entstehen. Nach der Restriktionsspaltung wurde jede Probe mit 2 µl 6x Ladepuffer versehen und auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen. Um die Größe der Banden zu bestimmen, wurden 6 µl des DNA-Markers 2-log DNA-Ladder auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30-40 min bei 160 V, bis die Markerfront aus dem Gel ausgetreten war. Danach wurde das Gel für 10 min in ein mit Ethidiumbromid (0,1 µl/ml) versetztes TAE-Pufferbad getaucht, um die auf dem Gel farblose DNA sichtbar zu machen. Das von dem Plasmid erzeugte diagnostische Bandenpaar konnte mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel DocTM EZ Imager sichtbar gemacht werden. Dabei lagen die durch PstI geschnittenen Fragmente der SureSilencing-Vektoren, welche zwei Bindungsstellen für PstI enthalten, bei 3209 Basenpaaren (bp) und 1402 bp und bestätigten somit den Erhalt des gewünschten shRNA-Inserts.

Agarosegel 0,8%	0,8 g	Agarose
	ad 100 ml	TAE-Puffer
TAE-Puffer 50x	2 M	Tris-Base
	50 mM	EDTA
	1 M	Essigsäure
	pH 8,0	

3.4.2.4 Transfektion der Zellen

Die NCM460-Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und am nächsten Tag wie gewöhnlich mit dem EffecteneTM-Transfektionsreagenz in nichtselektivem M3A-Medium, dem 10% FCS zugesetzt wurde, transfiziert (3.4.1.2). Dabei wurden jeweils 0,8 µg der spezifischen SureSilencing shRNA-Plasmide verwendet. Nach 48 h erfolgte der Mediumwechsel mit dem

Selektionsmedium, in dem nur die Zellen überlebten, die die transfizierte DNA ins Genom integrierten. Das Selektionsmedium entspricht dem M3A-Medium, welches mit 10% FCS und 0,5 µg/ml Puromycin für die Kontroll-shRNA bzw. 1 µg/ml Puromycin für die IER3-shRNA exprimierenden Zellen supplementiert wurde. Der die untransfizierten, avitalen Zellen enthaltende Mediumüberstand wurde zweimal wöchentlich mit dem Selektionsmedium erneuert, bis die adhärent wachsenden, stabil transfizierten NCM460-Zellen ein konfluentes Wachstumsverhalten aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Passagierung der Zellen in eine 250 ml Zellkulturflasche (3.2.2). Die supprimierte Genexpression wurde durch die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Realtime*-PCR) (3.11.4) verifiziert und nach positivem Ergebnis wurden die Zellen für Versuche plattiert bzw. ein Teil der Zellen bei ausreichendem Wachstum in einer bestimmten Zellpassage kryokonserviert.

3.5 Herstellung von Ganzzelllysaten

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden die Zellen in einer 12-well Platte ausgesät. Die Aufarbeitung der Zelllysate erfolgte nach mindestens 24-stündiger Kultivierung von konfluent gewachsenen Zellen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und je nach Zelldichte in 100-150 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers aus den wells gelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Zum besseren Zellaufschluss folgte eine Ultraschallbehandlung für 4x1 sec. Die Proben wurden bei - 20°C aufbewahrt. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte durch ein Proteinassay nach Lowry (3.7.1) und die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden anschließend mittels SDS-PAGE (3.8) auf ihre Korrektheit überprüft.

2x Lämmli-Puffer	128 mM	Tris-Base
	4,6% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerol
	ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest.}
	pH 7,6	

3.6 Isolierung von Kernproteinen

Eine Aufarbeitung der Zellen mittels EMSA-Puffern dient der Herstellung von einer Zytoplasma- und einer Kernproteinfraction. Hierdurch kann man die vornehmliche Lokalisation eines Proteins genauer analysieren. Zur Gewinnung von Kern- und

Zytoplasmaextrakten wurden die Zellen in 6-well Platten ausgesät und die Zellkultur je nach Fragestellung für mindestens 24 h weitergeführt. Bei der gesamten Aufarbeitung wurde stets auf eine ausreichende Kühlung der Zellen geachtet, um proteolytische Prozesse zu minimieren. Außerdem wurden den Puffern Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt, um mögliche Modifizierungen der gewonnenen Proteinextrakte durch endogene Enzyme zu verhindern. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 350 µl eiskaltem EMSA I-Puffer aufgenommen, mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und für spätere zytoplasmatische Proteinuntersuchungen aufbewahrt. Die verbliebenen pelletierten Zellen wurden erneut in 350 µl EMSA I-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und den Zellen je nach Pelletgröße 50-80 µl eiskalter EMSA II-Puffer zugesetzt. Nun wurden die Proben für 30 min bei 4 °C geschüttelt und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde der die Kernproteine enthaltende Überstand aliquotiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei - 80 °C. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Proteinassay nach Bradford (3.7.2) durchgeführt.

EMSA I-Puffer	10 mM	HEPES
	10 mM	Kaliumchlorid
	0,2 mM	EDTA
	1 mM	DTT (Dithiothreitol)
	0,5 mM	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
	10 µg/ml	Aprotinin
	1% (v/v)	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 #P5726
	1% (v/v)	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 3 #P0044
EMSA II-Puffer	20 mM	HEPES
	0,4 M	Kaliumchlorid
	0,2 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
	1% (v/v)	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 #P5726

1% (v/v)

Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 3 #P0044

3.7 Quantitative Bestimmungen der Proteinkonzentration

3.7.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Ganzzelllysaten erfolgte mit dem DCTM-Proteinassay von Bio-Rad. Dieser kolorimetrische Proteinassay optimiert die Methode nach Lowry aus den 50iger Jahren: Dabei bildet eine basische Kupfersalzlösung (Reagenz A) mit Proteinen im alkalischen Umgebungsmilieu Komplexe aus, wodurch die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Das Folin-Reagenz (Reagenz B), welches Molybdat und Wolframat enthält, wird wiederum von den durch die Biuret-Reaktion entstandenen Cu^{1+} -Ionen durch den Verlust von O_2 -Atomen reduziert, wodurch es zu einer photometrisch messbaren Verschiebung des Absorptionsspektrums des Folinreagenzes kommt. Diese Verschiebung wird durch einen Farbumschlag von gelb nach blau sichtbar. Es wurden je 5 μl der Standards und der Proben im doppelten Ansatz in eine 96-well Microtiterplatte vorgelegt. Nun wurde 25 μl Reagenz A, welches zuvor aus einer 1:50-Verdünnung, bestehend aus Reagenz A und Reagenz S, hergestellt wurde, zu jedem Ansatz pipettiert. Im Anschluss wurde jedem Ansatz 200 μl Reagenz B hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte die photometrische Messung mit Hilfe der Revelation QuickLink Software und des Photometers Opsys MR5000 bei einer Wellenlänge von 630 nm. Die Proteinmenge wurde gegenüber einer Standardreihe mit BSA (0–1,48 mg/ml) ermittelt.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Kern- und zytoplasmatischen Proteinen wurde ein modifizierter Proteinassay nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate durchgeführt. Bei dieser Methode bildet der Farbstoff Coomassie Blue im sauren Milieu mit Proteinen Komplexe aus, welche eine photometrisch messbare Verschiebung des Absorptionsmaximums für Coomassie Blue von 465 zu 595 nm bewirkt. Dadurch kann die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt werden. Im Detail wurden hierzu im doppelten Ansatz 5 μl der Proteinlösung auf Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 200 μl der Biorad-Reagenzverdünnung (1:5 mit destilliertem H_2O) versetzt. Nach 5-10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte in dem Plattenphotometer Opsys MR5000 bei einer Wellenlänge von 630 nm

(Referenzfilter 405 nm) mit Hilfe der Revelation QuickLink Software gemessen. Die Standardkurve wurde aus einer Verdünnungsreihe mit BSA-Konzentrationen von 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 sowie 0 mg/ml in dem jeweiligen EMSA-Puffer hergestellt.

3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Proteine besitzen im Gegensatz zu DNA oder RNA kein festes Massen-Ladungsverhältnis. Um Proteine überhaupt nach ihrer Größe aufzutrennen zu können, müssen die Eiweiße zunächst entfaltet und linearisiert werden. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), das Bestandteil des Laufpuffers und der Gelpuffer ist, bindet effizient an Proteine und zerstört durch seine negativen Ladungen die nicht-kovalenten Bindungen in Proteinen durch gegenseitige Abstoßung. Neben der SDS-Wirkung führt das im Farbpuffer vorkommende Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zu einer Aufbrechung der Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten. Diese das Protein entfaltenden Wirkungen führen zusammen mit einer Denaturierung der Proteine durch 5-minütiges Aufkochen bei 95°C zu einer Linearisierung der Eiweiße, wodurch diese nun ein vergleichbares Massen-Ladungsverhältnis besitzen. Zur Proteinauftrennung wurden Polyacrylamidgele verwendet. Polyacrylamid (PAA) ist ein Polymer von Acrylamid-Monomeren. Die Polymerisation von Acrylamid zu PAA wird durch eine Kettenreaktion hervorgerufen, welche durch die Wirkung von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikal initialisiert werden kann und von Tetramethylethylendiamin (Temed) katalysiert wird. Durch die Zugabe von Wasser entsteht aus dem Gemisch ein porenartiges Gel mit siebartiger Funktion. Das negativ geladene SDS in dem Gel führt dazu, dass die Proteine in einem elektrischen Feld von der Anode zur Kathode wandern. Die Bewegung der Proteine in dem elektrischen Feld ist dabei annähernd proportional zu ihrer Größe. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende des Vorganges sind alle Proteine nach ihrer Größe sortiert. Die Porengröße der Gelmatrix kann durch den PAA-Gehalt variiert und gemäß der Größe des zu detektierenden Proteins angepasst werden. Durch die Verwendung eines Molekulargewichtsstandards (Proteinmarker), welcher Proteine bekannter molekularer Masse enthält, lässt sich die molekulare Masse der Proteine im Gel bestimmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele wurden zunächst in entsprechende Vorrichtungen gegossen. Dabei

unterscheiden sich Sammel- und Trenngele durch unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte. Die Proteine wandern zuerst in das Sammelgel mit neutralem pH-Wert, in dem sie aufkonzentriert werden und anschließend in das Trenngel mit basischem pH-Wert, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngelpuffer führt an der Grenze zum Trenngel zu einem Stapelungseffekt der Proteine. Nach der Konzentrationsbestimmung der aus den Kern- bzw. Ganzzelllysaten gewonnenen Proteinen wurden die zu analysierenden Proben auf eine festgelegte Proteinmenge (8-15 µg Protein) eingestellt. Anschließend wurde das Probenvolumen mit 2x Lämmli- bzw. EMSA-Puffer auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt und mit je 5 µl 4x Farbpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die pipettierten Proben für 5 min bei 95 °C gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Nach der Aushärtung der Gele wurden diese in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammern mit 1x Lauffpuffer befüllt. Abschließend wurden die Geltaschen mit den Proben und dem kommerziellen Proteinmarker PageRuler™ beladen. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 125 mV aufgetrennt, bis die Lauffront aus dem Gel ausgetreten war.

Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-Base
	0,4% (w/v)	SDS
	ad 200 ml	H ₂ O _{bide} st.
	pH 8,8	
Sammelgelpuffer	1,5 M	Tris-Base
	0,4% (w/v)	SDS
	ad 200 ml	H ₂ O _{bide} st.
	pH 6,8	
10% Trenngel	3,0 ml	H ₂ O _{bide} st.
	1,5 ml	Trenngelpuffer pH 8,8
	1,5 ml	40% PAA
	22 µl	10% APS
	4,4 µl	Temed

12% Trenngel	2,7 ml	H ₂ O _{bidest.}
	1,5 ml	Trenngelpuffer pH 8,8
	1,8 ml	40% PAA
	22 µl	10% APS
	4,4 µl	Temed
Sammelgel	1575 µl	H ₂ O _{bidest.}
	625 µl	Sammelgelpuffer
	250 µl	40% PAA
	13 µl	10% APS
	2,5 µl	Temed
4x Farbpuffer	0,005% (w/v)	Bromphenolblau
	2,5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	in 2x Lämmli-Puffer	
SDS-Gellaufpuffer	25 mM	Tris-Base
	0,1% (w/v)	SDS
	192 mM	Glycin

3.9 Proteintransfer (Western-Blotting)

Der Westernblot bezeichnet eine Technik, bei der zuvor aufgetrennte Proteine mit Hilfe eines weiteren elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine immobilisierende Trägermembran übertragen werden (Blotting), um sie für ihren spezifischen Nachweis durch Antikörper zugänglich zu machen. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Semidry-Blot-Apparatur, die sich aus einer Anoden- und einer Kathodengraphitplatte mit hoher Leitfähigkeit zusammensetzt. Auf die Anodenplatte der Blot-Vorrichtung wurden zunächst drei in Blotpuffer B über sechs in Blotpuffer A getränkte Filterpapiere (Whatman-Papiere) geschichtet. Die Blotpuffer fungieren dabei als Anodenpuffer. Nun wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, die zuvor für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, auf die mit Puffer gesättigten Filterpapiere gelegt. PVDF ist ein Fluorpolymer, an dem Proteine aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen beim Transfer aus dem Gel an der Membranoberfläche haften

bleiben und somit immobilisiert werden. Die Gelapparatur, in dem die Proteine zuvor aufgetrennt wurden, wurde auseinandergebaut, das Gel vorsichtig von den Gelplatten abgelöst und über die Membran, gefolgt von sechs weiteren in Blotpuffer C (Kathodenpuffer) vorgeweichten Filterpapieren, platziert. Beim Zusammenstellen des Blots wurde stets darauf geachtet, dass alle Teile gut mit Blotpuffer getränkt waren und keine Luftblasen auftraten. Abschließend wurde die Kathodenplatte des Blotsystems über die Schichtanordnung gelegt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte durch das Anlegen einer zu dem Gel senkrecht stehenden Spannung, wodurch die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode wanderten. Der zum Transfer benötigte Strom war dabei abhängig von der Membrangröße: $\text{Strom (mA)} = \text{Länge (cm)} \times \text{Breite (cm)} \times 1,25 \text{ mA/cm}^2$.

1x TBS	20 mM	Tris-Base
	140 mM	Natriumchlorid
	pH 7,6	
TBS-Tween	100 ml	10x TBS
	500 µl	Tween 20
	ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest.}
Blot-Puffer A	300 mM	Tris-Base
	20% (v/v)	Methanol
	pH 11,0	
Blotpuffer B	25 mM	Tris-Base
	20% (v/v)	Methanol
	pH 10,6	
Blotpuffer C	25 mM	Tris-Base
	20% (v/v)	Methanol
	0,04 M	Aminocaprinsäure
	pH 8,8	

3.10 Immunnachweis der Proteine

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte die spezifische Detektion der Proteine mittels Antikörper. Hierbei macht man sich die Bindungsaffinität von Antikörpern zu antigenen Determinanten auf den nachzuweisenden Proteinen zu Nutze: Primärantikörper binden zunächst an für sie passende Epitope auf den gesuchten Proteinantigenen. Anschließend bindet ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper an die Fc-Region des Erstantikörpers. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym, eine aus dem Meerrettich gewonnene Peroxidase (HRP, *horseradish* Peroxidase), katalysiert abschließend eine Chemilumineszenzreaktion, durch die die Proteine in Form von Banden mit Hilfe der Geldokumentationsanlage ChemiDoc XRS detektiert wurden. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer in ein Schälchen überführt, einmal mit TBS-Tween (TBS-T) gewaschen und anschließend für insgesamt 2 h bei Raumtemperatur mit 5% Magermilch in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T behandelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben (Tabelle 3) entweder in 5% Magermilch in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T verdünnt, die Membran nach einem weiteren Waschschrift in ein 50 ml Röhrchen zu der verdünnten Primärantikörperlösung gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer mit dem Erstantikörper inkubiert. Um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, wurde der Blot am nächsten Tag dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper nach Herstellerangaben (Tabelle 4) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer. Nach drei weiteren Waschgängen mit TBS-T wurde der Blot mit Hilfe der SuperSignal West Dura Reagenzien entwickelt. Dazu wurden die luminolhaltige und die peroxidhaltige Lösung in lichtgeschützter Umgebung in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und direkt mittels ChemiDoc fotografiert, bis ein ausreichendes Ergebnis sichtbar wurde. Der mitgeführte Proteinmarker ermöglichte die Größenordnung der detektierten Banden. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurden konstitutiv exprimierte Proteine wie HSP90, Lamin A/C oder α -Tubulin detektiert.

3.11 RNA-Techniken

3.11.1 RNA-Isolierung

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen dient der Untersuchung der zum Zeitpunkt der Isolierung vorliegenden Zelltätigkeit und Analyse der Genexpression. Die Präparation der Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des peqGold Total RNA Kits durchgeführt, durch das

RNA mit Hilfe spezieller Säulen und durch Zentrifugation gewonnen werden kann. Die Zellen werden hierbei zunächst in chemischer Umgebung lysiert. Da RNA sehr anfällig für den Abbau durch RNasen ist, werden diese im Rahmen der Lyse denaturiert. Durch spezifische DNA-Removing-Säulen wird die RNA von DNA und zellulärem Debris in einem nächsten Schritt separiert. In der Umgebung von 70% Ethanol bleibt die RNA als fester Bestandteil im Ethanol erhalten, während Proteine und Salze in Lösung bleiben. Mit Hilfe von Silikamembranen enthaltenden PerfectBind RNA-Säulen kann die RNA von Proteinen getrennt werden. Durch anschließende Waschgänge mit speziellen Puffern wird die RNA aufgereinigt und kann schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert werden. Im Detail wurde das Medium zunächst aus den wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Aufnahme in 400 µl Lysis Puffer T wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturplatte abgelöst, das Lysat auf eine DNA-Removing-Säule, welche zuvor in ein 2 ml Tube gesteckt wurde, pipettiert und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Removing-Säule wurde entfernt, der die gereinigte RNA enthaltende Säulendurchfluss mit 400 µl 70%igem Ethanol versetzt und durch kurzes Vortexen sorgfältig durchmischt. Nun wurden die Proben auf eine PerfectBind RNA-Säule in ein 2 ml Sammeltube pipettiert und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die PerfectBind RNA-Säule in ein neues 2 ml Tube platziert und die an der Silikamembran haftende RNA mit 500 µl RNA-Waschpuffer I versetzt. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 600 µl RNA-Waschpuffer II, welcher zuvor mit vier Teilen 100%igem Ethanol vermischt wurde. Zwischen jedem Waschschrte wurden die Zellen für 15 sek bei 11000 rpm zentrifugiert und der Säulendurchfluss anschließend verworfen. Danach wurde die PerfectBind RNA-Säule in das geleerte 2 ml Tube gesteckt und durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11000 rpm getrocknet. Die RNA wurde durch die Zugabe von 40 µl sterilem, RNase-freiem Wasser auf die PerfectBind RNA-Säule durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 7000 rpm eluiert. Die isolierte RNA wurde danach sofort auf Eis gekühlt und die Proben bei - 80 °C aufbewahrt.

3.11.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) und 230 bzw. 280 nm (Absorptionsmaximum von Salzen und Lösungsmitteln bzw. Proteinen) in dem UV-Photometer NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 mit automatischer Quantifizierung gemessen. Neben der Konzentration der Gesamt-RNA lieferte die photometrische Messung

anhand des Quotienten aus der OD₂₆₀ und OD₂₃₀ bzw. anhand des Quotienten aus der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ auch ein Maß für die Reinheit der Präparation. Der Quotient für reine RNA liegt dabei optimalerweise bei ungefähr 2,0. Da eine OD₂₆₀ von 1 einem Gehalt von 40 µg/ml RNA entspricht, wurde die RNA-Konzentration durch die Software nach folgender Formel berechnet: Konzentration [µg/ml] = OD₂₆₀ × 40 µg/ml.

3.11.3 Reverse Transkription

Nach der RNA-Isolierung erfolgte die reverse Transkription, bei der mRNA enzymatisch mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in einzelsträngige cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben wird. Hierzu wurden zunächst 0,5-1,0 µg Gesamt-RNA mit Ribonuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,5 µl aufgefüllt und jeder Ansatz mit 1 µl Oligo-dT-Primer versetzt. Der aus mehreren Thyminbasen bestehende Oligo-dT-Primer wird zur Initiation der cDNA-Synthese benötigt und lagert sich selektiv an den komplementären Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA an. Der Reaktionsansatz wurde vermischt, kurz an zentrifugiert, für 5 min bei 65 °C im Thermoblock denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nun wurde der Mastermix, bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl), 2 µl 10 mM dNTP-Mix (Desoxyribonukleintriphosphate-Mix) und 1 µl M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Retrovirus*) RT, mit den Proben vermischt (Gesamtvolumen 20 µl) und für 1 h bei 42 °C im Thermoblock inkubiert. Der 5x Reaktionspuffer bietet dabei ein optimales Arbeitsmilieu für die M-MLV-RT, die bei 42-50 °C ihre hauptsächliche Enzymaktivität zeigt. Da die RNA sehr anfällig auf RNasen reagiert, wurde dem Mastermix als Schutz vor dem RNA-Abbau der rekombinante RNase-Inhibitor RiboLock hinzugefügt. Die dNTPs fungieren als Bausteine der DNA und komplettieren die Synthesevoraussetzung für die cDNA. Schließlich synthetisiert die M-MLV-RT mit Hilfe ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität einen zu der mRNA komplementären cDNA-Einzelstrang, wodurch ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Die mRNA wird später durch die RNase Eigenschaft der M-MLV-RT abgebaut, sodass nur der cDNA-Einzelstrang bestehen bleibt. Um die Reaktion der M-MLV-RT zu stoppen, wurden die Proben abschließend für 5 min bei 70°C im Thermoblock erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei - 20 °C.

3.11.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Realtime-PCR*)

Die *Realtime-PCR* dient der Amplifizierung der hergestellten cDNA und ermöglicht zusätzlich die absolute und relative Quantifizierung des PCR-Produkts. Die PCR-Zyklen bestehen aus drei sich wiederholenden Reaktionen, woraus ein exponentieller Anstieg der Ziel-DNA resultiert: Zunächst wird die DNA-Doppelhelix im Reaktionsansatz durch das Erhitzen auf 95 °C denaturiert und in DNA-Einzelstränge zerlegt. Im nächsten Schritt lagert sich ein chemisch hergestellter Primer durch die Bindung an komplementäre Sequenzen auf der Analyt-DNA an. Dazu müssen je nach Länge und Basenzusammensetzung Primerspezifische Schmelztemperaturen (*Annealing*) zwischen 50-70 °C gewählt werden. Schließlich synthetisiert eine thermostabile Taq-Polymerase bei 72 °C einen zum cDNA-*Template* komplementären DNA-Strang. Zum Nachweis des PCR-Produktes wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. SYBR Green interkaliert während der Amplifikation in die DNA, wodurch dessen Fluoreszenz proportional zur Amplifikation der Ziel-DNA zunimmt. Dieser Fluoreszenzanstieg kann in Echtzeit mit Hilfe optischer Detektionssysteme in der exponentiellen Phase des PCR-Zyklus gemessen und mit Hilfe einer geeigneten Computersoftware ausgewertet werden. Zunächst wird bei der Amplifikation für jede Probe die PCR-Zyklenzahl ermittelt, an der die Fluoreszenzintensität des Zielgens signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet (*Cycle-Threshold*, C_t -Wert). An diesem Schwellenpunkt befindet sich in allen Reaktionsansätzen die gleiche Menge an neusynthetisierter DNA. Der C_t -Wert dient somit als ein indirektes Maß für die eingesetzte Ausgangsmenge der DNA. Die relative Quantifizierung der Daten erfolgte durch die Normalisierung der Zielgen-mRNA auf die parallel detektierten *Housekeeping* Gene β -Aktin oder TBP. Diese Referenzgene werden in allen Proben konstitutiv exprimiert und weisen keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben auf. Dazu wurde der Quotient aus $2^{\Delta C_t \text{ Zielgen}} / 2^{\Delta C_t \text{ Referenzgen}}$ gebildet. Der berechnete Quotient gibt dabei an, wie viel mehr (Quotient >1) oder weniger (Quotient <1) Ausgangskopien von dem gesuchten DNA-Abschnitt in der zu messenden Probe vorhanden sind. Für die *Realtime-PCRs* wurden Primersets von RealTimePrimers® verwendet. Zu Beginn wurden 5 μ l der aus den Proben generierten cDNA nach einer 1:4-Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser im doppelten Ansatz in eine 96-well PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde jede Probe in der PCR-Platte mit 15 μ l eines Mastermix, bestehend aus 10 μ l SYBR Green Supermix, 2 μ l (0,2 μ M) Primer und 3 μ l Nuklease-freiem Wasser, versetzt. Die Primer wurden zuvor mit Aqua dest. 1:50 verdünnt. Die PCR-Platte wurde abschließend mit einer selbstklebenden Folie bedeckt

und kurz an zentrifugiert. Die Amplifizierung der Proben erfolgte für 40 Zyklen im iCycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detektion System und die Analyse der Daten durch die iCycler iQ Optical System Software.

3.12 Luziferase Reporter Assay

Mit Hilfe des Luziferase Reporter Assays konnten Rückschlüsse auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen in 12-well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit Plasmiden des Signal ARE Reporter Assay Kits transient transfiziert (3.4.1.2). Sowohl das Kontroll-Plasmid, als auch das spezifische ARE-Plasmid sind bi-cistronisch konstruiert und tragen das Firefly-Luziferasegen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* sowie das Renilla-Luziferasegen aus der Seefeder *Renilla reniformis* in einem Verhältnis von 40:1. Das Firefly-Luziferasegen auf dem ARE-Plasmid ist mit dem antioxidativen Response Element im Bereich des CMV-Promotors fusioniert und wird nur transkribiert, wenn nukleäres Nrf2 hieran bindet. Hingegen findet die Firefly-Luziferase Expression durch das Kontroll-Plasmid lediglich unter der Regulation eines Minimal-Promotors statt. Zur Kontrolle der Transfektionsausbeute dient das unter dem Thymidin-Promotor konstitutiv exprimierte, Transkriptionsfaktor unabhängige Renilla-Luziferasegen. Die auf diese Weise eingebrachten Luziferasen sind Enzyme, die unter Anwesenheit von O₂ durch die Oxidation ihrer Substrate, den Luciferinen, Chemilumineszenzreaktionen katalysieren. Dabei sind die Renilla-Luziferasen neben O₂ auch auf das Vorhandensein von ATP angewiesen. Die durch Oxidation entstandene Lumineszenz kann schließlich mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden und verhält sich dabei direkt proportional zu der Luziferaseaktivität, durch die somit die Nrf2-Aktivität quantifiziert werden kann. Die Messung der Luziferasenaktivität erfolgte mit dem Dual-Luziferase® Reporter Assay System. Dazu wurden die Zellen 24-48 h nach der Transfektion in PBS gewaschen und nach der Aufnahme in 150 µl 1x Lysis-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers aus den wells gelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Anschließend wurden die Lysate für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 20 µl des Überstandes im doppelten Ansatz in eine 96-well Platte pipettiert. Nach Zugabe von 25 µl des spezifischen LAR II Substrat Reagenz erfolgte die Messung des Lumineszenzsignals für die Firefly-Luziferasen unter Verwendung der WinGlow Software im Luminometer. Analog dazu wurde die Lumineszenz der Renilla-Luziferase durch Zugabe von 25 µl des *Stop and Glow* Substrats bestimmt. Die gemittelten Werte der Firefly

Fluoreszenzmessung wurden auf die der Renilla-Luziferase normalisiert und als ARE-spezifische, relative Luziferase-Einheiten (RLU) ausgedrückt.

3.13 Caspase-3/-7-Assay

Die Apoptose ist in mehrzelligen Organismen unerlässlich für die normale Entwicklung und Funktion eines Organismus. So dient der programmierte Zelltod z.B. der Elimination entarteter sowie potentiell schädlicher Zellen, der Kontrolle der Zellzahl und damit der Größe von Geweben oder der Selektion genetisch intakter Keimzellen. Caspasen sind Proteasen, die eine zentrale Rolle in der Apoptose übernehmen. So leiten Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) die Apoptose ein und aktivieren im Rahmen einer Signalkaskade durch proteolytische Spaltung die sogenannten Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7), die schließlich zum programmierten Zelltod führen. In den Versuchsreihen wurde die Apoptose durch die externe Gabe von Etoposid oder TRAIL induziert (3.3) und hinsichtlich Apoptosesensitivität und -resistenz in Bezug auf Nrf2 bzw. IER3 untersucht. Durch die Effektor-Caspasen-Aktivität kommt es nach Zugabe des Caspase-Glo® 3/7 Assayreagenz zur Freisetzung von Aminoluciferin, welches in einer Luciferase-abhängigen Reaktion katalysiert wird. Die durch die enzymatische Reaktion entstehende Lumineszenz kann in einem Luminometer gemessen werden und ist dabei direkt proportional zu der Effektor-Caspasen-Aktivität, sodass dadurch ein Rückschluss auf den apoptotischen Zustand der Zellen gewonnen werden kann. Hierzu wurde der Mediumüberstand der Zellen abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit je 0,5 ml 1x Trypsin/EDTA abgelöst und zu den korrespondierenden Überständen gegeben. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 4000 rpm wurde der Überstand abgenommen und die pelletierten Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Caspasen-Aktivität wurden jeweils 25 µl der Zellsuspension im doppelten Ansatz in eine 96-well Platte pipettiert und mit 25 µl Caspasereagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Lumineszenz im Luminometer unter Anwendung der WinGlow Software gemessen. Anschließend wurde der Proteingehalt der verbliebenen Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen (3.5) und die Konzentration mittels Proteinassay nach Lowry (3.7.1) ermittelt. Zur Auswertung wurden die erzielten Doppelwerte gemittelt und auf den Proteingehalt bezogen.

3.14 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies

3.14.1 Messung der mitochondrialen ROS-Produktion

Das MitoSoxTM Red Reagenz ist ein fluorogener Farbstoff, mit dem selektiv ROS in den Mitochondrien lebender Zellen detektiert werden können. MitoSoxTM Red ist zellpermeabel und kann somit gut von lebenden Zellen aufgenommen werden. Nach der Diffusion in das Mitochondrium wird MitoSoxTM Red spezifisch nur von gebildeten Superoxiden und nicht durch andere ROS oder reaktive stickstofferzeugende Systeme oxidiert. Wenn das Oxidationsprodukt an Nukleinsäuren bindet, entsteht eine rote Fluoreszenz, die mit Hilfe des Mikroplattenreaders Tecan Infinite200 unter Verwendung der i-controlTM-Software fluorimetrisch erfasst wurde. Die durch Oxidation entstandene Fluoreszenz ist dabei proportional zu mitochondrial generierten ROS. Alle im Folgenden durchgeführten Arbeiten erfolgten in lichtgeschützter Umgebung und mit auf 37 °C vorgewärmten Puffern bzw. Medien. Kurz vor Beginn des Experiments wurde das MitoSoxTM Red Reagenz entsprechend den Herstellerangaben in DMSO gelöst und in PBS auf eine Endkonzentration von 5 µM verdünnt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit je 0,5 ml der in PBS verdünnten MitoSoxTM Red-Lösung versetzt. Parallel zu den MitoSoxTM-Färbungen wurden Kontrollen angefertigt, die nach gleichem Protokoll, jedoch nur mit in PBS verdünnten DMSO behandelt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand der Zellen abgenommen und die Zellen mit PBS gespült. Um eine effiziente Oxidation des MitoSoxTM Red zu gewährleisten, wurden die Zellen für 4 h mit serumfreien OptiMEM-Medium im Brutschrank inkubiert und die Fluoreszenz anschließend gemessen. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Zellen in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen (3.5) und der Proteingehalt der gewonnenen Gesamtzelllysate mittels Proteinassay nach Bradford (3.7.2) bestimmt. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden anschließend auf ihren Proteingehalt bezogen und der mittels DMSO generierte Kontrollwert von den berechneten MitoSoxTM Fluoreszenzwerten subtrahiert.

3.14.2 Messung der intrazellulären ROS-Produktion

Als Indikator für intrazellulär generierte ROS wurde das 5-Carboxy-2',7'-Dichlordihydrofluorescein Diacetat Reagenz (c-H₂DCFDA) verwendet. Es stellt die chemisch reduzierte, acetylierte Form von Fluorescein dar. Das c-H₂DCFDA ist zellpermeabel und wird nach der Aufnahme in lebende Zellen in seine grün-fluoreszierende Form überführt, indem die Acetatgruppen im Zytoplasma durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und die

Moleküle durch die Aktivität von ROS innerhalb der Zelle zu DCF (2',7'-Dichlorofluoreszin) oxidiert werden. DCF interkaliert dann in die DNA und ist als Fluoreszenz im Kern nachweisbar. Die gebildete Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Mikroplattenreaders Tecan Infinite200 unter Verwendung der i-controlTM-Software bestimmt. DCF fluoresziert stark bei 517-527 nm, wenn es mit Licht einer Wellenlänge von 495 nm angeregt wird. Die Färbung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die MitoSoxTM Red-Färbung (3.14.1). Das Reagenz wurde zunächst in DMSO gelöst und anschließend auf eine 10 µM Arbeitslösung in PBS verdünnt.

3.15 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Zell- und Gewebestrukturen durch an Antikörper gekoppelte Enzyme, die eine Farbstoffreaktion katalysieren, sichtbar gemacht werden können. Sind die Antikörper dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, spricht man in diesem Zusammenhang von Immunfluoreszenz.

In den Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten konventionelle immunhistochemische Färbungen zur Detektion von aktiviertem Nrf2 (P_{Ser40}) in stabil mit IER3- und Kontroll-shRNA transfizierten NCM460-Kolonozyten auf Deckgläschen sowie im distalen Kolongewebe anhand von Kryostatschnitten IER3-defizienter und -profizienter Mäuse. Weiterhin wurden mit den Kryostatschnitten der DSS-behandelten IER3-defizienten und -profizienten Mäuse Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis des Oberflächenantigens F4/80 auf Makrophagen, als Indiz für deren Infiltration, und der phosphorylierten Proteinkinase B (Phospho-Akt) als Indikator der inflammatorischen Stressantwort durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258) wurde, analog der Hämalaun Färbung in der konventionellen Immunhistochemie, zur Darstellung von Zellkernen verwendet, um die Zuordnung der Färbungen im Gewebeausschnitt zu ermöglichen

3.15.1 Immunhistochemische Färbungen mit NCM460-Kolonozyten

Die stabil mit IER3- oder Kontroll-shRNA transfizierten NCM460-Zellen wurden in 12-well Platten auf runde Deckgläser ausgesät und ein Teil der Versuchsreihe am nächsten Tag mit tBHQ stimuliert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die immunzytochemische Färbung. Hierzu wurden die Deckgläser vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette aus den wells gelöst, in einen Ständer überführt und einmal mit PBS gespült. Nachfolgend wurden die Zellen für 10

min in eisgekühltem Aceton mit 0,3% H₂O₂ auf den Deckgläsern fixiert, für 10 min luftgetrocknet und in PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Deckgläser mit 4% BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurde der Primärantikörper 1:200 in 1% BSA in PBS verdünnt und die Deckgläser über Nacht in der feuchten Kammer mit dem Antikörper bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen und für 45 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit dem entsprechenden Sekundärantikörper versetzt. Für die Nrf2-Färbungen wurde das EnVision-Konjugat anti-Kaninchen-Peroxidase eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Substratreaktion für die Peroxidase mit Hilfe des AEC-Substrats, welches tröpfchenweise für 10-30 min auf die Deckgläser gegeben wurde. Anschließend wurden die Deckgläser mit destilliertem Wasser gewaschen, die Zellkerne für 3 min in einer Hämalaunlösung angefärbt und unter fließendem Leitungswasser für 10-15 min gebläut. Die Deckgläser wurden in Glyceringelatine auf Objektträger fixiert und lichtgeschützt gelagert. Die parallel zu den spezifischen Nrf2-Färbungen durchgeführten Kontrollfärbungen erfolgten nach gleichem Protokoll, wobei die Präparate nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden und somit keine Färbungen zeigten.

3.15.2 Immunhistochemische Färbungen an Kryogewebe DSS-behandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse

Die aus dem distalen Kolon DSS-behandelter IER3-defizienter und –profizienter Mäuse isolierte Gewebesegmente (3.1.2) wurden zunächst in flüssigem Stickstoff asserviert. Nach Einbettung der Darmgewebe in das Einbettmedium Tissue-Tek® wurden mit dem Kryotom 6 µM starke Kryostatgewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Glasobjektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Gewebeschnitte in eisgekühltem Aceton mit 0,3% H₂O₂, ehe die Präparate nochmals bei Raumtemperatur für 10 min luftgetrocknet und in PBS gewaschen wurden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Schnitte für 20 min mit 4 % BSA in PBS bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer behandelt. Nachfolgend wurden entweder konventionelle Färbungen oder Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

3.15.2.1 Konventionelle immunhistochemische Färbungen

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper gegen aktiviertes Nrf2 (Ser40-Phospho-Nrf2) im Verhältnis 1:200 in 1% BSA/PBS. Nach der

Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen und dann für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer mit dem Sekundärantikörper EnVision-Konjugat anti-Kaninchen-Peroxidase inkubiert. Im Anschluss daran folgten drei Waschschrte mit PBS. Die Substratreaktion erfolgte mit dem AEC Peroxidase Substrat Kit nach Herstellerangaben für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gewaschen, die Zellkerne für 3 min in Mayers Hämalaunlösung angefärbt, für 10 min gewässert und gebläut und abschließend in Glyceringelatine eingedeckelt. Das gleiche Protokoll wurde für die Negativkontrollen angewandt, wobei ein IgG-Kontroll-Antikörper verwendet wurde.

3.15.2.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

Nach der Blockierung der Präparate mit 4% BSA in PBS erfolgte anschließend entweder die Inkubation mit dem direkt Phycoerythrin- (PE-)konjugierten monoklonalen F4/80 Antikörper oder die Inkubation mit dem monoklonalen Phospho-Akt Antikörper jeweils in einer 1:100 Verdünnung in 1% BSA in PBS in der Feuchtkammer für 1 h bei Raumtemperatur. Im Falle des F4/80 Antikörpers wurde der Kernfarbstoff Hoechst 33258 zur Gegenfärbung direkt zum Lösungsansatz gegeben, während zu den mit dem Phospho-Akt Antikörper behandelten Gewebeschnitten der Kernfarbstoff Hoechst 33258 zusammen mit einem Cy3-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper zugesetzt wurde. Nach der Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur erfolgten vier Waschgänge in PBS für jeweils 5 min, bevor die Präparate mit dem FluorSaveTM Reagenz und Nagellack eingedeckelt wurden. Die durchgeführten Negativkontrollen erfolgten nach gleichem Protokoll, wobei die Präparate nur mit dem IgG-Kontroll-Antikörper inkubiert wurden. Die Auswertung erfolgte anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung.

3.16 Berechnungen, Statistiken, Graphik und Ausarbeitung

Die Berechnungen der Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SA) und Signifikanzen sowie die graphischen Darstellungen wurden mit Microsoft Excel 2010 und Powerpoint 2010 (Microsoft, München) erstellt. Die Bearbeitung des digitalisierten Bildmaterials wurde mit Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) durchgeführt. Die Ausarbeitung der Dissertation erfolgte mit Word 2010 (Microsoft, München). Zur Beurteilung der Signifikanzen wurde der doppelseitige Student's t-Test verwendet und bei einem p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Erhöhte Nrf2-Aktivität im Kolongewebe IER3-defizienter Mäuse

Wie bereits beschrieben, wird in verschiedenen Tumoren für das IER3-Gen eine tumor-suppressive Wirkung postuliert [58, 66, 81, 84, 89]. So ist eine erniedrigte IER3-Expression auch beim kolorektalen Karzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert [58, 84]. Die molekularen Veränderungen, die unter IER3-Defizienz zu einem forcierten Tumorwachstum führen, waren bislang nicht bekannt. Die Ex-vivo-Analyse des Kolongewebes DSS-behandelter sowie unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse konnte nun die Aktivierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 als einen wesentlichen Signaltransduktionsweg, der unter IER3-Defizienz hochreguliert ist, identifizieren.

Im entzündeten Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter Mäuse (dargestellt hier für jeweils drei Tiere, I-III) ließ sich mittels Westernblot anhand von Kernextrakten eine deutlich stärkere nukleäre Nrf2-Aktivität feststellen, als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 8A).

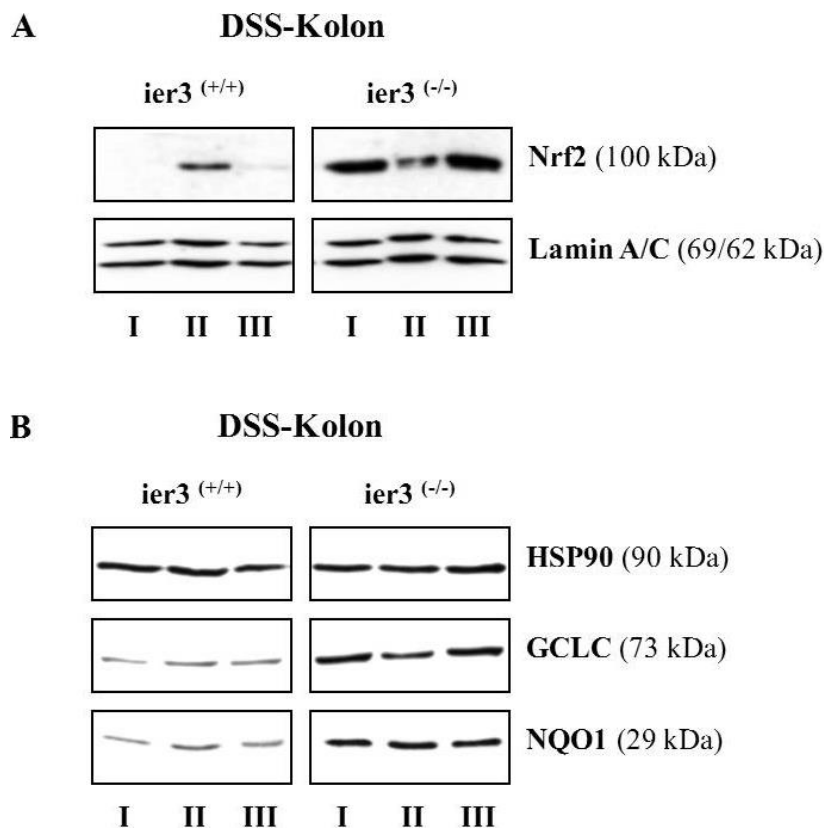


Abbildung 8: Höhere Nrf2-Aktivität im entzündeten Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter Mäuse. Das Kolongewebe IER3-defizienter oder -profizienter Mäuse (jeweils von 3 Tieren, I-III), in denen eine chronische Kolitis induziert wurde, wurde auf den Nrf2-Proteingehalt (A) oder die Expression der Nrf2-Zielgene GCLC und NQO1 in Ganzzelllysaten (B) mittels Westernblot analysiert. Lamin A/C bzw. HSP90 fungieren jeweils als Ladekontrolle. Es ist eins von mehreren replizierten Ergebnissen dargestellt.

Ebenso zeigt der Westernblot in Abbildung 8B, dass die aus dem entzündeten Kolongewebe gewonnenen Ganzzelllysate der IER3-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine stärkere Expression der etablierten Nrf2-Zielgene GCLC und NQO1 aufweisen.

Dieser offensichtlich Nrf2 amplifizierende Effekt der IER3-Defizienz bestätigte sich auch anhand der in Abbildung 9 dargestellten immunhistochemischen Analyse.

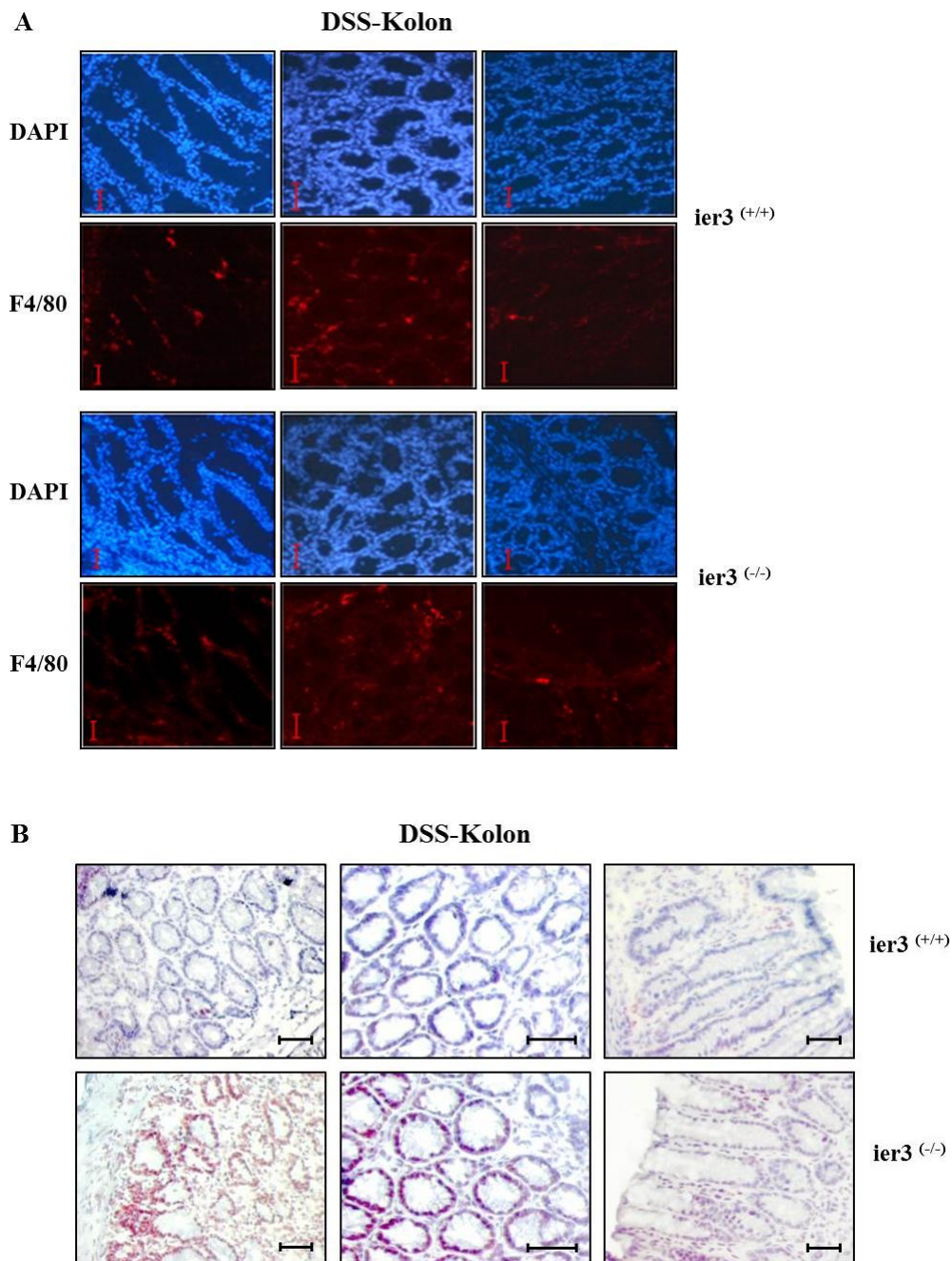


Abbildung 9: Höhere epitheliale Nrf2-Aktivität im entzündeten Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter Mäuse. Die aus dem Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter und –profizienter Mäuse angefertigten Kryostatgewebeschnitte wurden A: hinsichtlich der Makrophageninfiltration durch Fluoreszenzfärbung mit dem spezifischen Marker F4/80 (rote Anfärbung) untersucht. Um die Zuordnung der Färbungen im Gewebeausschnitt zu ermöglichen, erfolgte anschließend die DAPI-Kernfärbung (blaue Färbung) oder B: hinsichtlich der Nrf2-Aktivierung durch konventionelle Immunfärbung mit einem Antikörper, der aktiviertes Nrf2 (P-Ser40) detektiert (braune Anfärbung), analysiert. Es sind jeweils Gewebeausschnitte dreier Tiere beider Genotypen gezeigt. Maßstab: 20 µM.

Kryostatschnitte des Darmgewebes DSS-behandelter Mäuse beider Genotypen wurden hierbei mit einem Antikörper, der aktiviertes Nrf2 (P-Ser40) detektiert, gefärbt. Ausgewählt wurden hierbei solche Areale, die vergleichbare Infiltrate von Makrophagen – detektiert durch die Immunfluoreszenzfärbung mittels des spezifischen Markers F4/80 – aufzeigen (Abbildung 9A), um eine divergente epitheliale Adaption unter ähnlichem inflammatorischen Stress darstellen zu können. Es zeigte sich in der Tat eine deutlich ausgeprägtere, nukleäre Phospho-Nrf2-Färbung der Enterozyten in den Krypten des Darmgewebes IER3-defizienter Tiere als im Gewebe IER3-profizienter Mäuse (Abbildung 9B).

Gleichartige Ergebnisse ließen sich auch anhand von Kurzzeit-kultivierten Kolonepithelzellen aus dem Darmgewebe unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse reproduzieren, von denen ein Teil der Versuchsreihe einer 16-stündigen Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 μ M) unterzogen wurde. Aus den Proben wurden dann entweder Kern- und Gesamtzelllysate aufgearbeitet oder Gesamt-RNA isoliert. Abbildung 10A und 10B veranschaulichen die verstärkte Nrf2-Aktivität in den Kernextrakten und den erhöhten GCLC- sowie NQO1-Proteingehalt in den Ganzzelllysaten unter Abwesenheit von IER3, die sich durch die Behandlung mit tBHQ deutlich potenzierten.

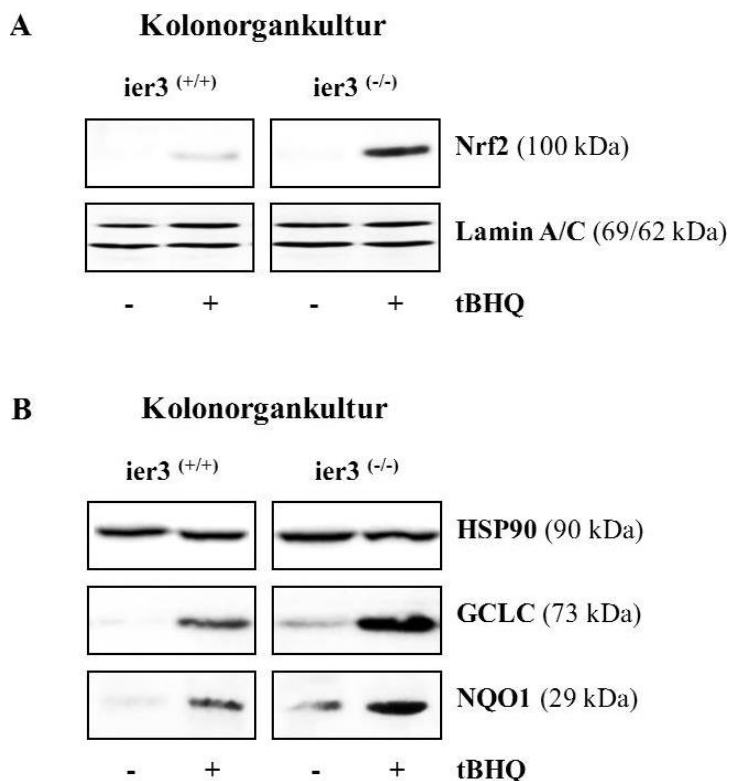


Abbildung 10: Eine IER3-Defizienz verstärkt die Nrf2-Aktivierung in murinen unbehandeltem Kolongewebe. Kolonorgangewebekulturen unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse wurden entweder unbehandelt belassen (-) oder einer 16-stündigen Behandlung mit tBHQ (50 μ M) unterzogen. A: Kernextrakte wurden mittels Westernblot auf den Nrf2-Proteingehalt analysiert; Lamin A/C wurde als Ladekontrolle verwendet. B: Gesamtzelllysate wurden hinsichtlich des GCLC- und NQO1-Proteins untersucht (HSP90 als Ladekontrolle). Eins von mehreren replizierten Ergebnissen ist gezeigt.

Des Weiteren detektieren die durchgeführten *Realtime*-PCR-Analysen in Abbildung 11 eine erhöhte Expression der zytoprotektiven Nrf2-Zielgene NQO1 und GCLC in IER3-defizienten Kolonzellen. Die Ausschaltung des IER3-Gens wurde durch den dargestellten IER3-mRNA-Gehalt nachgewiesen.

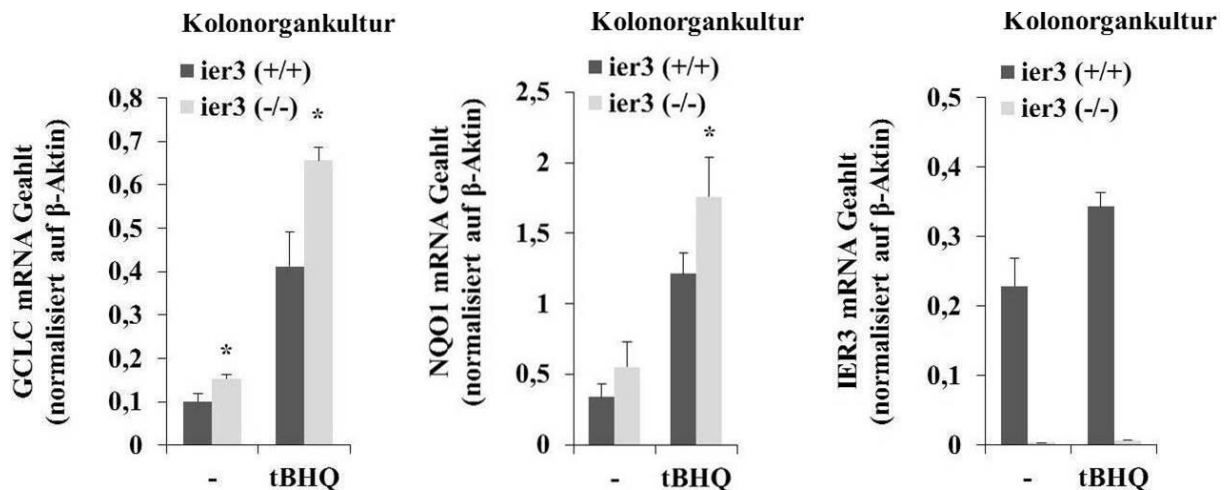


Abbildung 11: Kurzzeit-kultivierte IER3-defiziente Kolonozyten zeigen eine verstärkte Induktion der Nrf2-Zielgene GCLC und NQO1. Kolonorgangewebekulturen unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder einer 16-stündigen Behandlung mit tBHQ (50 μ M) unterzogen. RNA-Lysate wurden mittels *Realtime*-PCR-Analyse hinsichtlich des GCLC-, NQO1- und IER3-mRNA-Gehalts untersucht. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten. * zeigt den p-Wert < 0,05 zwischen beiden Genotypen.

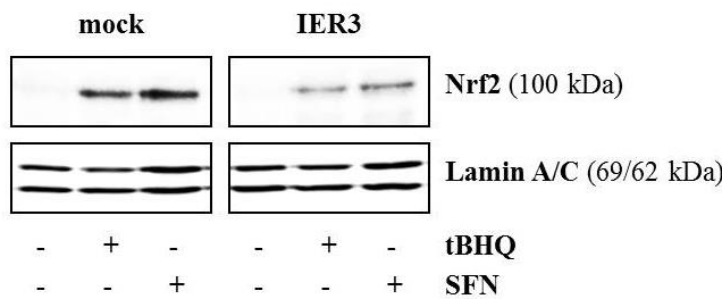
4.2 Die Nrf2-Aktivierung wird durch das IER3-Gen moduliert

Der den unter 4.1 gewonnenen Ergebnissen zu vermutende Nrf2 hemmende Einfluss von IER3 sollte anschließend anhand von In-vitro-Untersuchungen in der humanen Kolonepithelzelllinie NCM460 verifiziert werden. Die Untersuchungen erfolgten zum einen unter IER3-Defizienz in stabil mit IER3-shRNA transfizierten NCM460-Kolonozyten, zum anderen unter IER3-Überexpression in transient mit einem Expressionsvektor transfizierten NCM460-Zellen.

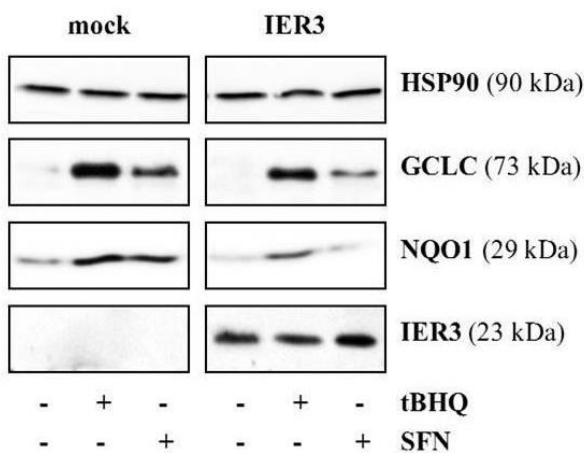
4.2.1 Eine Überexpression von IER3 unterdrückt die Nrf2-Aktivierung

Die transient über 48 h mit einem IER3-Überexpressionsvektor oder einem Leervektor (mock) transfizierten NCM460-Zellen wurden hinsichtlich verschiedener Parameter der Nrf2-Aktivierung untersucht. Dazu wurde ein Teil der Versuchsreihe entweder unbehandelt belassen (-) oder über 16 h mit den Nrf2-Aktivatoren tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M) stimuliert.

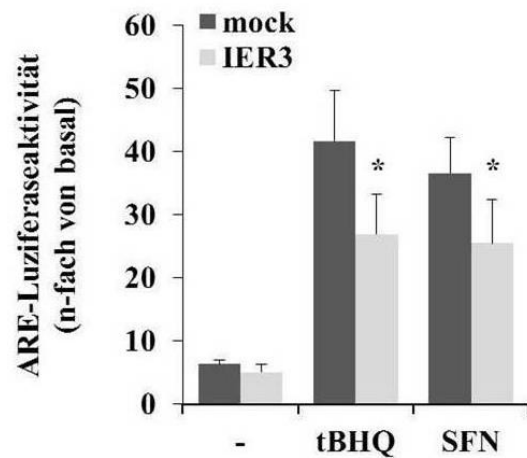
A NCM460-Kolonozyten



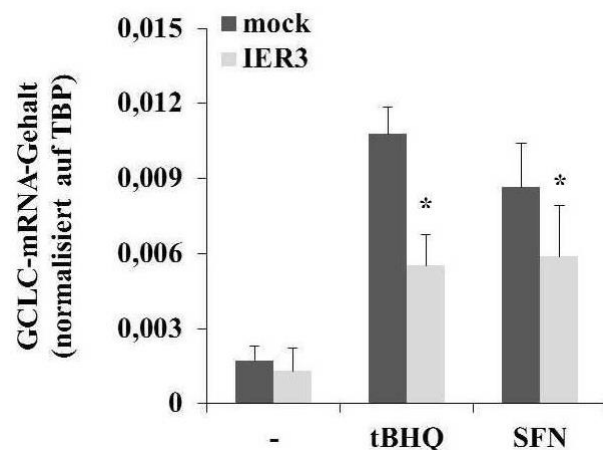
B NCM460-Kolonozyten



C NCM460-Kolonozyten



D NCM460-Kolonozyten



NCM460-Kolonozyten

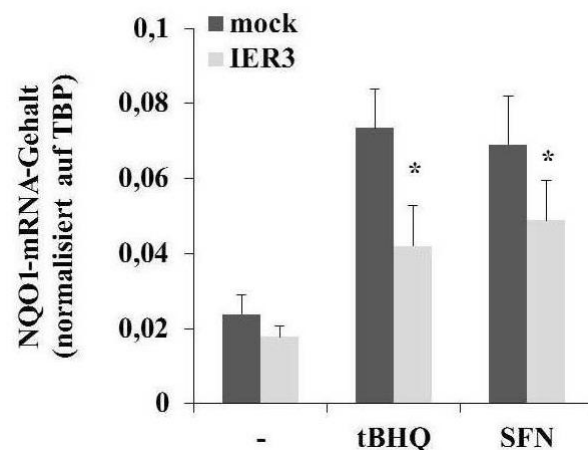


Abbildung 12: Das IER3-Gen beeinflusst die Nrf2-Aktivität in humanen NCM460-Kolonozyten. Humane NCM460-Kolonozyten wurden transient über 48 h mit einem IER3-Überexpressionsvektor oder einem Leervektor (mock) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (-) oder über 16 h mit tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M) stimuliert. A: Kernextrakte wurden mittels Westernblot auf den Nrf2-Proteingehalt untersucht. B: Gesamtzelllysate wurden mittels Westernblot auf den Proteingehalt von GCLC, NQO1 sowie IER3 analysiert. Lamin A/C bzw. HSP90 fungieren jeweils als Ladekontrolle. Es ist jeweils eins von mehreren replizierten Experimenten gezeigt. C: Die Daten der durchgeführten ARE-Luziferase Assays wurden als RLU ausgedrückt und repräsentieren den MW \pm die SA von 4 unabhängigen Versuchen. D: Die Induktion der Nrf2-Zielgene GCLC und NQO1 wurde mittels *Realtime*-PCR untersucht. Das *Housekeeping* Gen TBP wurde zur Normalisierung der ermittelten Daten verwendet. Dargestellt sind die MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten. * indiziert den p-Wert <0,05 zwischen IER3- und mock-Transfektanten.

Der Westernblot in Abbildung 12A verdeutlicht, dass eine überhöhte IER3-Expression in den NCM460-Kolonozyten zu einem verminderten nukleären Nrf2-Proteingehalt führt. Die starke Abnahme der Nrf2-Aktivierung konnte im Vergleich zu den Leervektor exprimierenden Zellen sowohl in unbehandelten als auch in tBHQ- oder SFN-stimulierten NCM460-Kolonozyten beobachtet werden. Ferner ließen sich in den zu Ganzzelllysaten aufgearbeiteten Proben gleichartige supprimierende Effekte durch die IER3-Überexpression auf den Proteingehalt von GCLC und NQO1 nachweisen (Abbildung 12B). Zur Kontrolle einer effizienten Transfektion wurde zudem IER3 in den Gesamtzelllysaten mittels Westernblot detektiert.

Ein ähnliches Resultat spiegelte sich auch im ARE-Luziferase Assay durch die deutliche Abnahme der Transkriptionsfaktoraktivität wieder, wenn NCM460-Kolonozyten IER3 überexprimierten (Abbildung 12C). Die analysierte Induktion der Nrf2-Zielgene NQO1 und GCLC war ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollzellen unter übermäßiger IER3-Expression auch nach der Behandlung mit tBHQ oder SFN verringert (Abbildung 12D).

Diesen Ergebnissen zufolge steht eine vermehrte Expression des IER3-Gens demnach in Zusammenhang mit einer deutlich verminderten Nrf2-Aktivität.

4.2.2 Die Nrf2-Signaltransduktion ist unter IER3-Defizienz verstärkt

Anhand von stabil mit Kontroll- oder IER3-shRNA transfizierten NCM460-Kolonozyten wurde untersucht, ob das IER3-Gen die Nrf2-Aktivierung direkt beeinflusst. Wie durch den Westernblot in Abbildung 13A gezeigt, weisen die Kernextrakte aus den IER3-defizienten Kolonozyten einen wesentlich höheren Nrf2-Proteingehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen auf, der sich durch eine 16-stündige Behandlung mit tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M) deutlich potenzierte. Abbildung 13B zeigt das Ergebnis von durchgeführten konventionellen immunhistochemischen Färbungen, in denen aktiviertes Nrf2 (P-Ser40) durch den verwendeten Antikörper durch eine braune Anfärbung sichtbar gemacht wurde. Die Kerne der IER3-defizienten Kolonozyten ließen sich im Vergleich zu den Kontroll-shRNA exprimierenden Zellen hierbei viel intensiver und besonders nach 16-stündiger tBHQ-Behandlung (50 μ M) anfärben.

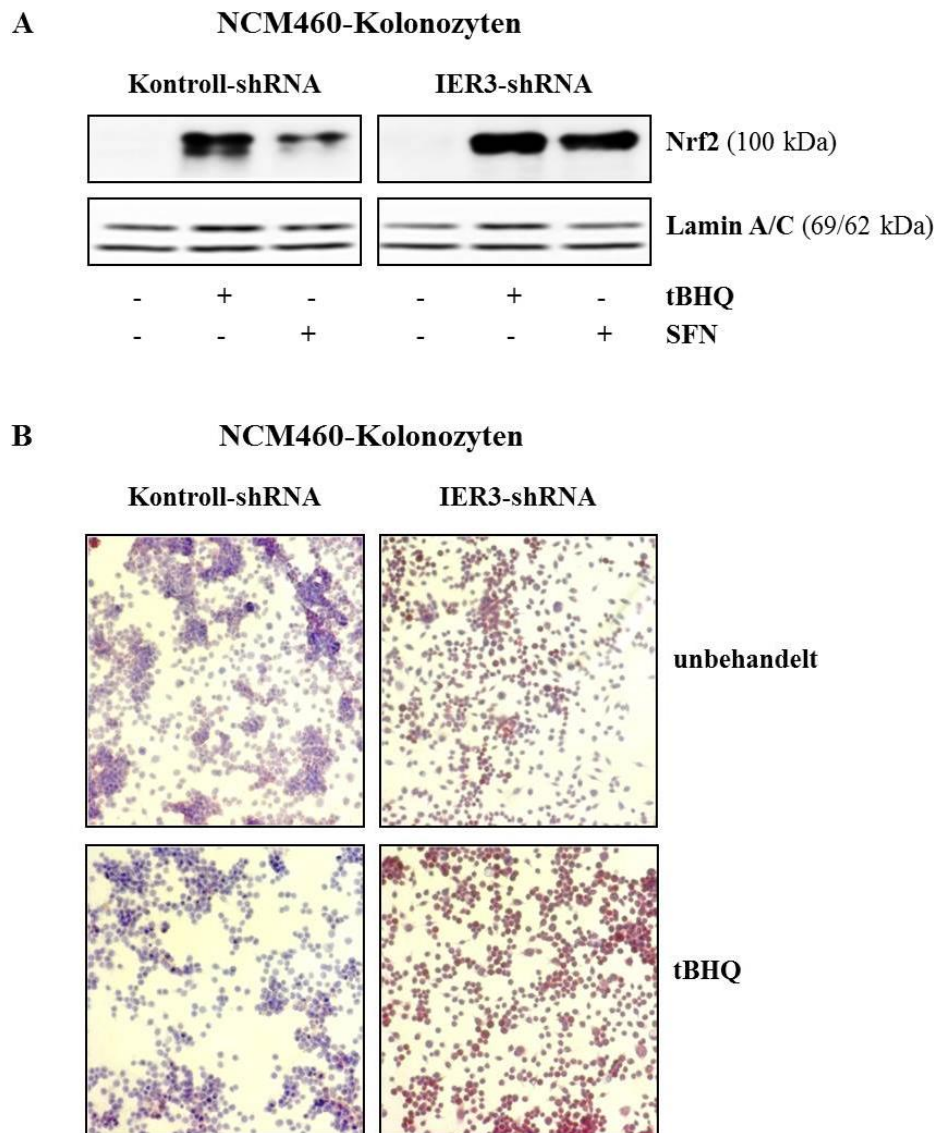


Abbildung 13: Erhöhte Nrf2-Aktivität in humanen NCM460-Kolonozyten mit unterdrückter IER3-Expression. Stabil mit IER3-shRNA oder Kontroll-shRNA transfizierte NCM460-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (-) oder für 16 h mit den Nrf2-Aktivatoren tBHQ (50 µM) oder SFN (10 µM) behandelt. A: Die zu Kernextrakten aufgearbeiteten Zellen wurden mittels Westernblot auf den Nrf2-Proteingehalt untersucht; Lamin A/C dient als Ladekontrolle. B: Die auf runde Deckgläschen ausgesäten NCM460-Zellen wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper, der aktiviertes Nrf2 (P-Ser40) detektiert, gefärbt. Die braune Anfärbung zeigt aktiviertes Nrf2. Es ist jeweils eins von mehreren replizierten Ergebnissen gezeigt.

Unter gleichen Versuchsbedingungen ließ sich auch mittels Luziferase-Assay in den IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen eine verstärkte transkriptionelle Nrf2-Aktivität detektieren (Abbildung 14A). In den Zytoplasmaextrakten der IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen konnten entsprechend auch deutlich gesteigerte Proteingehalte von GCLC und NQO1 nachgewiesen werden (Abbildung 14B). Schließlich wiesen auch die durchgeführten *Realtime*-PCR-Analysen aus den IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten eine erhöhte Expression der Nrf2-Zielgene NQO1 und GCLC auf, die nach 16 stündiger tBHQ- (50 µM) oder SFN-Behandlung (10 µM) verstärkt induziert wurden (Abbildung 14C).

Die stabile Ausschaltung des IER3-Gens wurde durch den deutlich erniedrigten IER3-mRNA-Gehalt verifiziert.

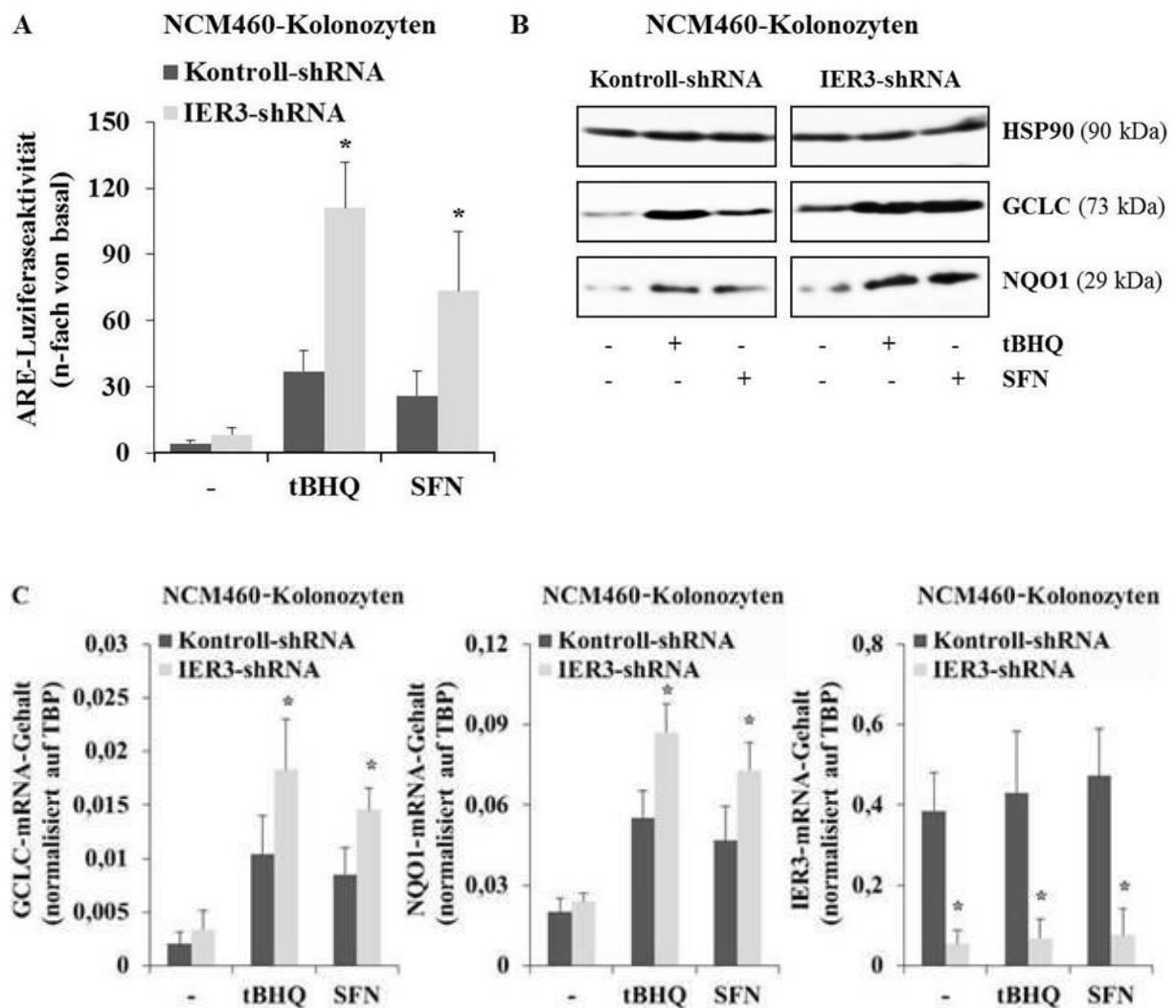


Abbildung 14: IER3-defiziente NCM460-Kolonozyten zeigen eine verstärkte Nrf2-Aktivität und Induktion von Nrf2-Zielgenen. Stabil mit IER3-shRNA oder Kontroll-shRNA transfizierte NCM460-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (-) oder für 16 h mit den Nrf2-Aktivatoren tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M) behandelt. A: Die Daten der durchgeführten ARE-Luziferase Assays sind als RLU dargestellt und repräsentieren den MW \pm die SA 4 unabhängiger Experimente. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen IER3-shRNA und Kontroll-shRNA exprimierenden Zellen an. B: Gesamtzelllysate wurden auf die GCLC- und NQO1-Expression mittels Westernblot analysiert. HSP90 fungiert als Ladekontrolle. Es ist jeweils eins von mehreren replizierten Ergebnissen gezeigt C: Der mRNA-Gehalt von GCLC, NQO1 sowie IER3 wurde mittels *Realtime*-PCR untersucht. Zur Normalisierung der Daten wurde TBP verwendet. Dargestellt sind die Daten 6 unabhängiger Experimente als MW \pm SA. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen IER3-shRNA und Kontroll-shRNA exprimierenden Zellen an.

Insgesamt indizieren die Ergebnisse, dass ein *knockdown* von IER3 zur verstärkten Nrf2-Aktivierung führt. Dieses Resultat konnte sowohl in Ex-vivo-Analysen DSS-behandelter oder unbehandelter IER3-defizienter Mäuse (4.1) festgestellt werden und ließ sich ebenfalls auf das humane In-vitro-Modell IER3-shRNA exprimierender NCM460-Kolonozyten übertragen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass das IER3-Gen den Nrf2-Signalweg negativ moduliert.

4.3 IER3-defiziente Zellen zeigen eine Nrf2-abhängige erniedrigte intrazelluläre ROS-Bildung

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 übernimmt eine wesentliche Funktion in der zellulären Antwort und Adaption an oxidativen Stress durch die Induktion antioxidativer Zielgene [22, 23, 24]. So könnten vermehrt gebildete ROS in Epithelzellen, beispielsweise im Rahmen chronischer Entzündungen oder der Tumorigenese, zur verstärkten Induktion des Nrf2-Signalweges führen. Durch die nachfolgenden Experimente sollte geklärt werden, ob sich die zuvor bewiesene direkte Modulation des IER3-Gens auf die Nrf2-Signaltransduktion somit auch auf die Adaption epithelialer Zellen an oxidativen Stress auswirkt. Auch für das IER3-Gen wird postuliert, dass es modulierende Effekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette, die die Hauptquelle von zellulär generierten ROS darstellen, besitzt [90].

In ersten Untersuchungen wurden die transient mit einem IER3-Überexpressions- bzw. Leervektor transfizierten NCM460-Zellen einer 24-stündigen Behandlung mit tBHQ (50 μ M) ausgesetzt oder unbehandelt belassen (-). Anschließend wurden die Zellen für 4h mit c-H₂DCFDA gefärbt, um intrazellulär generierte ROS zu detektieren, ehe die Fluoreszenzmessung erfolgte. Abbildung 15 zeigt, dass die Zellen, die das IER3-Gen überexprimierten, einen im Vergleich zu den Leervektor exprimierenden Zellen deutlich erhöhten Gehalt intrazellulär gebildeter ROS aufweisen, der durch die tBHQ-Behandlung gemindert werden konnte.

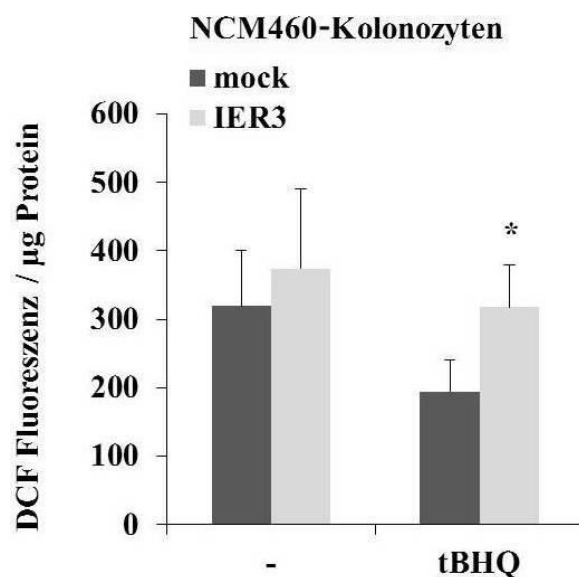


Abbildung 15: Erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentration in humanen IER3 überexprimierenden NCM460-Kolonozysten. NCM460-Kolonozysten, die transient mit einem IER3-Überexpressions- oder einem Leervektor (mock) transfiziert wurden, wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder einer 24-stündigen tBHQ-Behandlung (50 μ M) unterzogen. Dann erfolgte die c-H₂DCFDA-Färbung, um intrazellulär generierte ROS zu detektieren, ehe 4h später die Fluoreszenz gemessen wurde. Die Daten zeigen den MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten.

In einem analogen Versuch mit IER3-shRNA und Kontroll-shRNA exprimierenden NCM460-Kolonocyten konnte ein gegensätzliches Ergebnis beobachtet werden (Abbildung 16A). Hierunter ließen IER3-defiziente Zellen basal eine verminderte Bildung intrazellulärer ROS erkennen, die unter tBHQ-Behandlung weiter und viel stärker als in den Kontroll-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen abnahm. Derartige Effekte konnten in den stabil mit shRNA transfizierten NCM460-Kolonocyten jedoch nicht bei der Anfärbung mit dem Marker für mitochondrial gebildete ROS, MitoSoxTM Red, gesehen werden (Abbildung 16B).

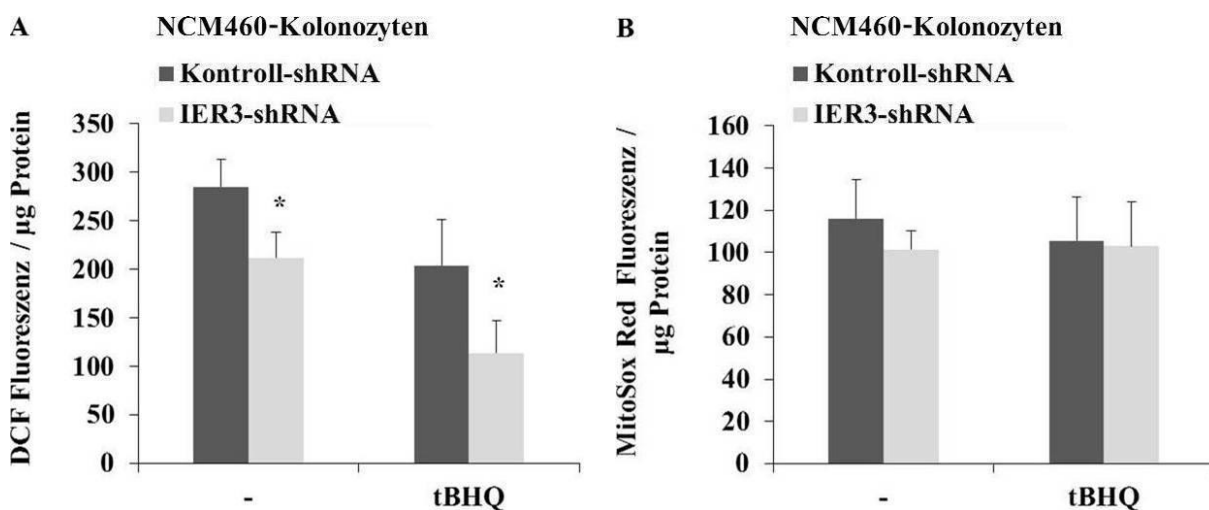


Abbildung 16: Nrf2-abhängige, erniedrigte ROS-Konzentration in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonocyten. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonocyten wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder einer 24-stündigen tBHQ-Behandlung (50 µM) unterzogen. Dann erfolgte die c-H₂DCFDA-Färbung, um intrazellulär generierte ROS (A) oder die Färbung mit MitoSox Red (B), um die mitochondrial gebildeten ROS zu detektieren, ehe 4h später die Fluoreszenz gemessen wurde. Die Daten zeigen den MW ± die SA von jeweils 4 unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine IER3-Defizienz korrespondierend zur erhöhten Nrf2-Aktivität außerdem zu einer verminderten intrazellulären ROS-Konzentration durch die antioxidative und dadurch ROS-neutralisierende Wirkungseigenschaft von Nrf2 führt.

Dieses Resultat wird durch die Feststellung, dass ein *knockdown* von Nrf2 durch eine 40-stündige Behandlung mit einer siRNA zu einer erhöhten c-H₂DCFDA-Färbungsintensität in den IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen führt, belegt (Abbildung 17). Unter diesen Bedingungen ist die sonst zu beobachtende neutralisierende Wirkung von tBHQ gegenüber ROS weitestgehend aufgehoben.

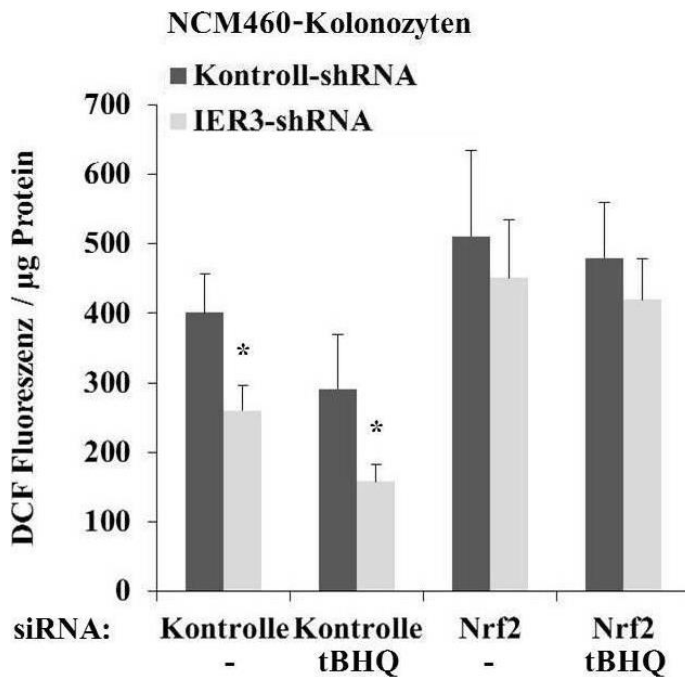


Abbildung 17: Eine siRNA vermittelte Ausschaltung von Nrf2 führt zur erhöhten ROS-Konzentration in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden für 40 h transient mit Nrf2- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Danach wurden die Zellen entweder unbehandelt (-) belassen oder mit tBHQ (50 µM) stimuliert, ehe sie 24 h später mit c-H₂DCFDA gefärbt wurden. Die Daten repräsentieren den MW ± die SA von jeweils 6 unabhängigen Versuchen. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen IER3- und Kontroll-shRNA bzw. IER3- und mock-exprimierenden Zellen.

4.4 Die erhöhte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz führt zur Apoptoseresistenz

Weiterhin wurde untersucht, ob die nachgewiesene molekulare Interferenz zwischen dem IER3-Gen und dem Transkriptionsfaktor Nrf2 auch Auswirkungen auf den zellulären Phänotyp besitzt.

Mit Hilfe von Caspase-3/7-Assays konnte gezeigt werden, dass IER3-defiziente NCM460-Kolonozyten eine ausgeprägte Apoptoseresistenz aufweisen (Abbildung 18). Als Maßstab für die Chemoresistenz diente die Apoptoserate der Zellen nach einer Behandlung mit 10 ng/ml TRAIL für 8 h oder eine 24-stündige Behandlung mit dem Zytostatikum Etoposid (20 µg/ml). Unter Anwesenheit von tBHQ (50 µM, Behandlung über 24 h) wurde die Sensitivität in den IER3-defizienten Zellen gegenüber beiden Apoptosereizen viel stärker reduziert als in den Kontrollzellen.

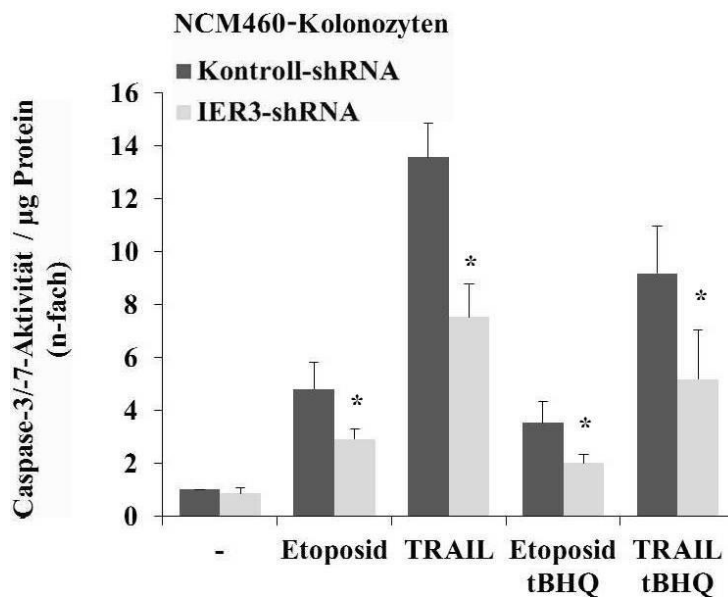


Abbildung 18: Die erhöhte Nrf2-Aktivität in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten verleiht Apoptose-schutz. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder für 24 h mit tBHQ (25 μ M) stimuliert. Anschließend erfolgte entweder keine (-) oder eine 24-stündige Behandlung mit Etoposid (20 μ g/ml) bzw. eine 8-stündige Behandlung mit TRAIL (10 ng/ml), ehe Caspase-3/-7 Assays durchgeführt wurden. Dargestellt ist das Apoptoseverhalten (n-fach von basal) und die MW \pm SA von 4 unabhängigen Experimenten. * indiziert den p-Wert <0,05 zwischen Kontroll- und IER3-shRNA exprimierenden Zellen.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, wie sich das Apoptoseverhalten der Kontroll- oder IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen verhält, wenn die Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 ausgeschaltet wird. Zu diesem Zweck wurden die Zellen transient entweder mit einer siRNA gegen Nrf2 oder einer Kontroll-siRNA für 24 h transfiziert. Anschließend erfolgte in einem Teil der Versuchsreihe eine 24-stündige Stimulation mit tBHQ (50 μ M), ehe die Apoptose induziert wurde.

Abbildung 19A und B verdeutlichen, dass insbesondere die IER3-defizienten Zellen viel sensitiver auf Etoposid bzw. TRAIL reagieren, wenn die Nrf2-Expression ausgeschaltet wurde, sodass der Apoptose-resistentere Phänotyp im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht mehr erkennbar ist.

Die Versuche zeigen, dass die durch den Verlust der IER3-Expression bedingte erhöhte Nrf2-Aktivität in Zusammenhang mit einem Apoptose-resistenten Phänotyp steht. Dieses Ergebnis ist Ausdruck eines tiefen Stressresistenz-induzierenden Effektes von Nrf2, der als wesentliche Grundlage der Nrf2-vermittelten Tumorigenese angesehen werden kann.

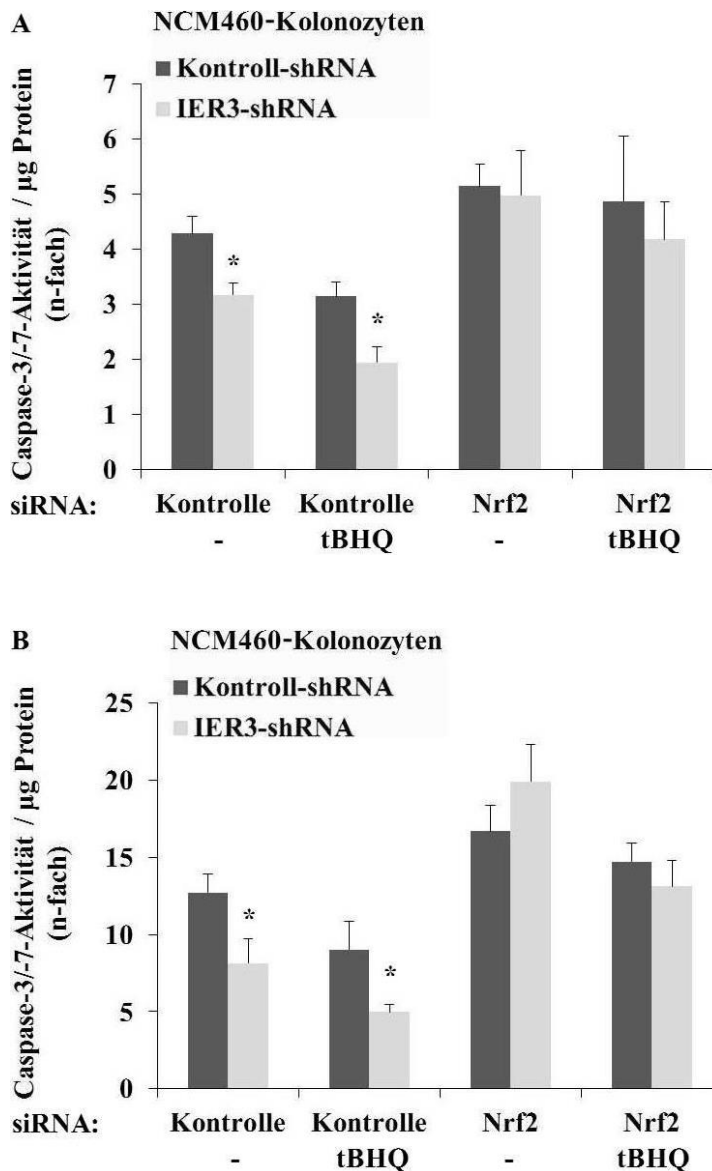


Abbildung 19: Eine siRNA-vermittelte Ausschaltung von Nrf2 hebt die Apoptoseresistenz in humanen IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten auf. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden für 24 h transient mit einer siRNA gegen Nrf2 oder Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen entweder über 24 h mit tBHQ (50 µM) stimuliert oder unbehandelt (-) belassen, ehe die Apoptose A: durch Etoposid (20 µg/ml für 24 h) oder B: TRAIL (10 ng/ml für 8h) induziert wurde. Dargestellt ist jeweils das Apoptoseverhalten (n-fach von basal) und die MW ± SA von 4 unabhängigen Experimenten. * indiziert den p-Wert <0,05 zwischen Kontroll- und IER3-shRNA exprimierenden Zellen.

4.5 Das IER3-Gen moduliert Nrf2 über den PI3K/Akt-Signalweg

4.5.1 IER3 inhibiert den PI3K/Akt Signalweg

Von Osawa et al. ist bereits 2003 beschrieben worden, dass IER3 eine negativ modulierende Wirkung auf den PI3K/Akt-Signalweg besitzt [82]. Dieser Sachverhalt ließ sich anhand von Kryostatgewebeschnitten aus dem Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse sowie in Ganzzelllysaten von Kolonepithelzellen aus der Organkultur unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse bestätigen.

Die Immunfluoreszenzfärbung von DSS-behandelten IER3-defizienten und -profizienten Mäusen zeigte eine deutlich erhöhte Präsenz von phosphoryliertem Akt (Phospho-Akt) im Kryptenepithel (Abbildung 20A).

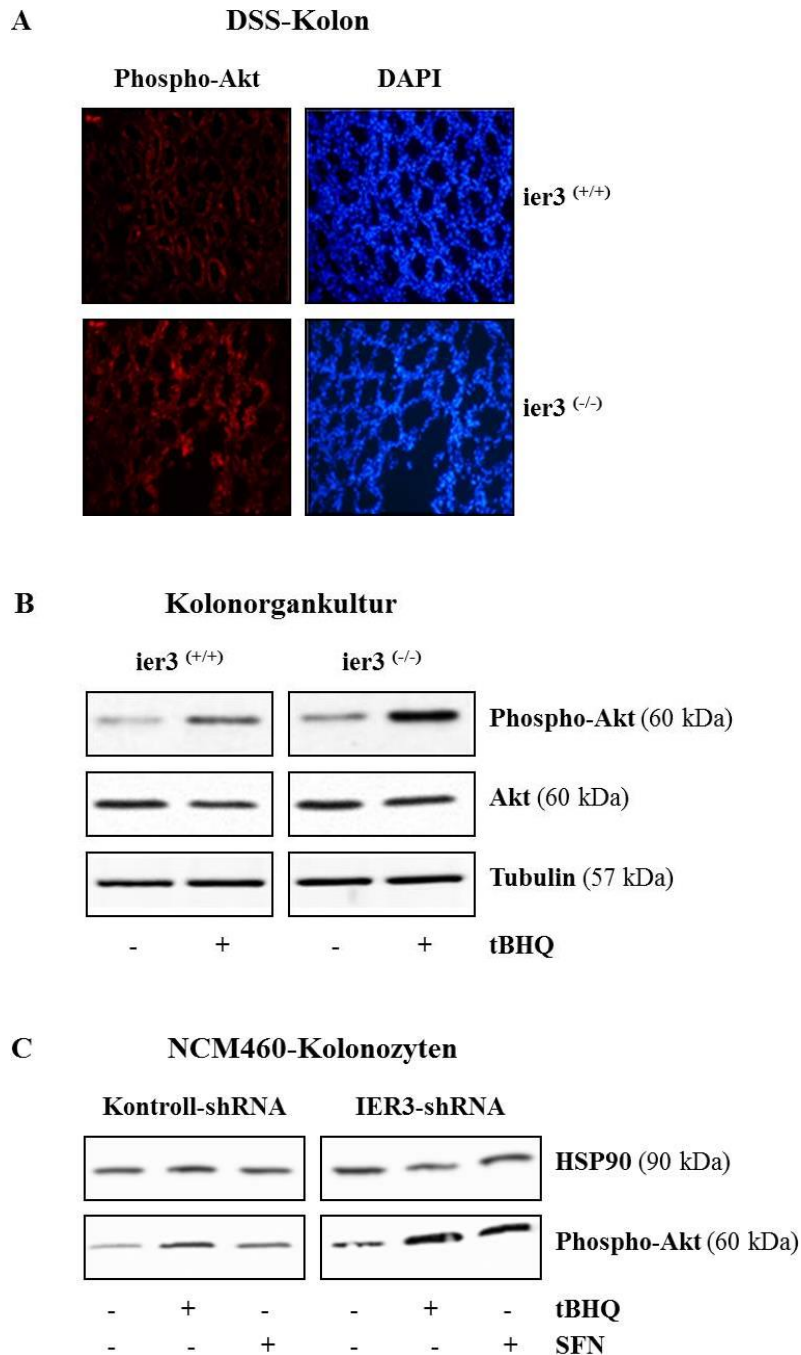


Abbildung 20: Erhöhte Akt-Phosphorylierung in IER3-defizienten murinen und humanen Kolonozyten. A: In den aus dem Kolongewebe DSS-behandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse angefertigten Kryostatgewebeschnitten wurde Phospho-Akt (rote Färbung) durch Fluoreszenzfärbung detektiert. Um die Zuordnung der Färbungen im Gewebeausschnitt zu ermöglichen, erfolgte anschließend die DAPI-Kernfärbung (blaue Färbung). B: Kolonorgankulturen IER3-defizienter und -profizienter Mäuse wurden entweder unbehandelt belassen (-) oder über 16 h mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 µM) stimuliert. Gesamtzelllysate wurden mittels Westernblot auf den phosphorylierten Akt- (Phospho-Akt)- und basalen Akt-Proteingehalt untersucht. C: Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder über 4 h mit tBHQ (50 µM) oder SFN (10 µM) inkubiert. Gesamtzelllysate wurden auf den Proteingehalt von Phospho-Akt analysiert. Tubulin bzw. HSP90 fungieren jeweils als Ladekontrolle. Es ist jeweils eins von mehreren replizierten Experimenten gezeigt.

Abbildung 20B zeigt ferner, dass der Basalgehalt von Phospho-Akt in den Kurzzeit-kultivierten Kolonzellen unter IER3-Defizienz deutlich stärker ausgeprägt ist als in den Wildtyp-Tieren. Nach 4-stündiger Behandlung mit tBHQ erhöhte sich der Phospho-Akt-Proteingehalt in den Versuchsreihen beider Genotypen, wobei der Anstieg in den Lysaten aus den IER3-defizienten Kolonozyten wiederum deutlich stärker war. Der parallel detektierte basale Akt-Spiegel zeigte sich in beiden Versuchsreihen auf einem konstanten Niveau. Höhere Phospho-Akt-Spiegel ließen sich ebenso in unbehandelten sowie tBHQ- oder SFN-behandelten IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen reproduzieren (Abbildung 20C).

Insgesamt bekräftigen die Ergebnisse die bereits postulierte Inhibition der PI3K/Akt-Signaltransduktion durch das IER3-Gen. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der IER3-hemmende Einfluss auf die Nrf2-Aktivität auf der Interferenz mit dem PI3K/Akt-Signalweg und seinem konsolidierenden Effekt auf Nrf2 (siehe 1.2.2) beruht.

4.5.2 IER3 beeinflusst die Nrf2-Aktivität über den PI3K/Akt-Signalweg

Um herauszufinden, ob die erhöhte Nrf2-Aktivität in IER3-defizienten Zellen im Zusammenhang mit dem PI3K/Akt-Signalweg steht, wurden zunächst ARE-Luziferase-Assays durchgeführt.

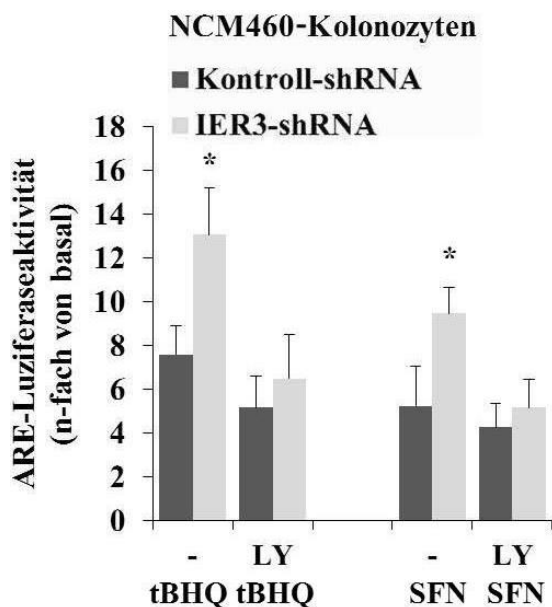


Abbildung 21: Die Akt-Inhibition durch LY294002 hebt die erhöhte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz auf. Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA exprimierende NCM460-Zellen wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder für 1 h mit dem PI3K/Akt-Inhibitor LY294002 (25 μ M) präinkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Versuchsreihe für 16 h mit tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M) behandelt. Die Daten der durchgeführten ARE-Luziferase Assays wurden als n-fache RLU ausgedrückt und stellen den MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten dar. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen Kontroll- und IER3-shRNA exprimierenden Zellen.

Die Verabreichung des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 (25 μM) 1 h vor einer 16-stündigen Behandlung mit tBHQ (50 μM) oder SFN (10 μM) führte in den IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten zu einer Aufhebung der erhöhten Nrf2-Aktivität, die sich hierunter in beiden Zelllinien kaum noch voneinander unterscheiden ließ (Abbildung 21).

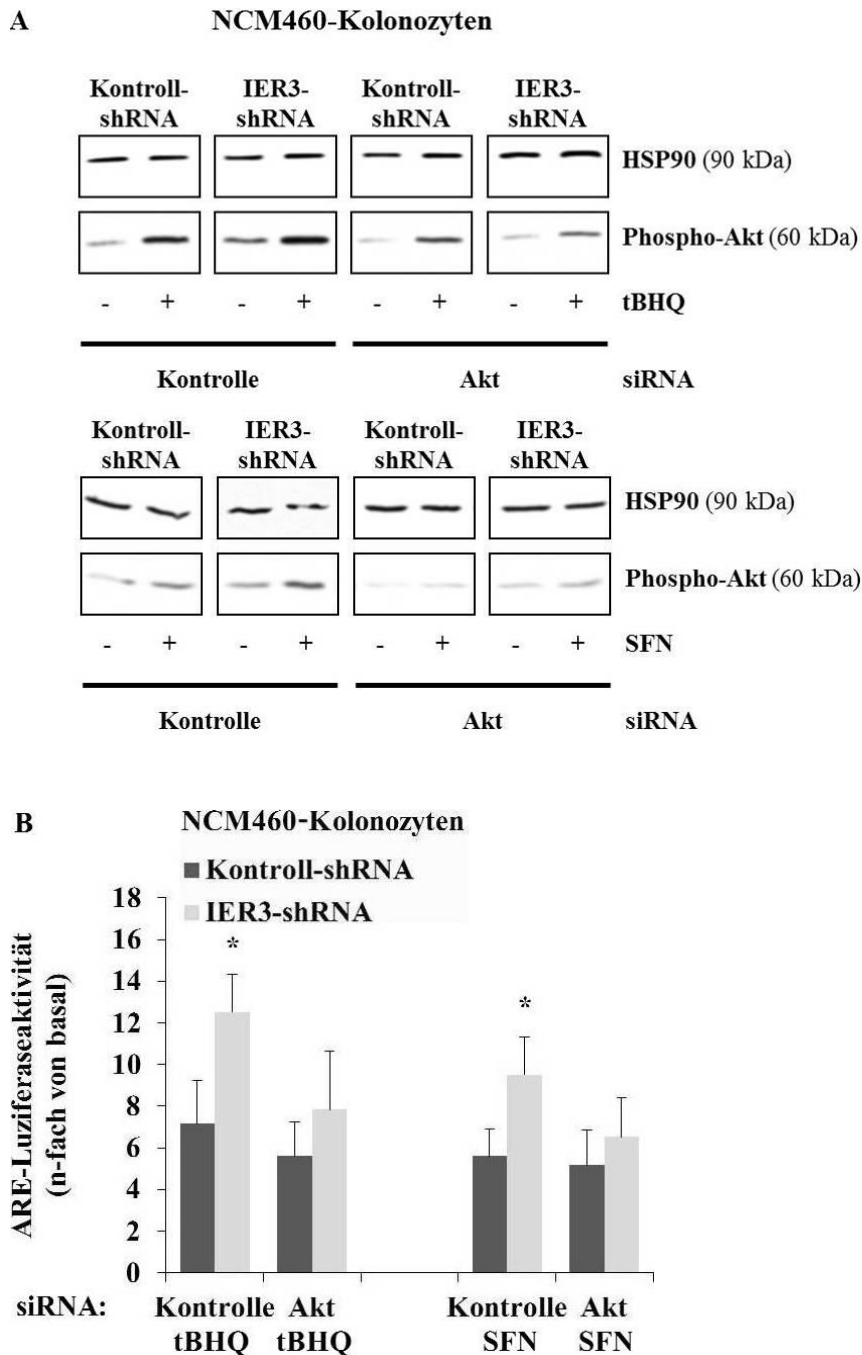


Abbildung 22: IER3 beeinflusst die Nrf2-Aktivität über Akt. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden zunächst transient über 48 h mit Kontroll- oder Akt-siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte entweder keine (-) oder eine 16-stündige Behandlung mit tBHQ (50 μM) oder SFN (10 μM). A: Gesamtzelllysate wurden hinsichtlich des Phospho-Akt-Proteingehalts mittels Westernblot untersucht. HSP90 fungiert als Ladekontrolle. Es ist jeweils eins von mehreren durchgeführten Experimenten gezeigt. B: Die Daten der durchgeführten ARE-Luziferase Assays sind als n-fache RLU ausgedrückt und repräsentieren den MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen Kontroll- und IER3-shRNA exprimierenden Zellen.

Ein gleichartiges Resultat konnte beobachtet werden, nachdem Akt durch die transiente Transfektion mit einer siRNA ausgeschaltet wurde. Unter diesen Bedingungen detektierte der Westernblot in Abbildung 22A eine verstärkte Abnahme des Phospho-Akt-Proteingehalts sowohl in den Kontroll-shRNA als auch in den IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Kolonozyten im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Der Nrf2 induzierende Effekt einer tBHQ- oder SFN-Behandlung war hierunter deutlich geringer ausgeprägt.

Unter analogen Versuchsbedingungen zeigten die durchgeführten ARE-Luziferase Assays, dass der verstärkte Effekt einer IER3-Defizienz in mit Akt-siRNA transfizierten NCM460-Zellen auf die Nrf2-abhängige Luziferaseexpression im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen ausgesprochen vermindert ist (Abbildung 22B). Demnach ist die Abhängigkeit der Nrf2-Amplifikation unter IER3-Defizienz von einer Modulation durch Akt beeinflussbar.

4.6 Der PI3K/Akt-Signalweg beeinflusst die Nrf2-Aktivität über die Tyrosinkinase Fyn

Basierend auf den Ergebnissen, dass IER3 die Nrf2-Aktivierung über Akt reguliert, sollte durch die folgenden Versuche geklärt werden, ob diese Tatsache im Zusammenhang mit der Tyrosinkinase Fyn steht. Fyn wird im Zytoplasma durch Gsk3 β über eine Phosphorylierung aktiviert und transloziert in den Zellkern. Dort modifiziert Fyn Nrf2 an einer Tyrosinseitenkette an Position 568 und indiziert dessen Kernexport, wodurch Nrf2 seiner proteasomalen Degradation zugeführt wird [47, 48, 91]. In anderen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass Akt durch die Inhibition des Fyn-vermittelten nukleären Exports über Gsk3 β eine entscheidende Rolle in der späten Phase der Nrf2-Aktivierung übernimmt [47]. Wie durch den Westernblot in Abbildung 23A gezeigt, enthalten die Kernextrakte aus den Kolonorgankulturen unbehandelter IER3-defizienter Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen weniger Fyn. Ebenso war der nukleäre Fyn-Proteingehalt in IER3-shRNA exprimierenden NCM460-Kolonozyten im Vergleich zu den Kontroll-shRNA exprimierenden Zellen vermindert (Abbildung 23B). Nach einer Behandlung mit tBHQ oder SFN konnte in diesem Zusammenhang sowohl in den IER3-defizienten als auch -profizienten Kolonozyten eine noch weiter abnehmende nukleäre Akkumulation von Fyn beobachtet werden.

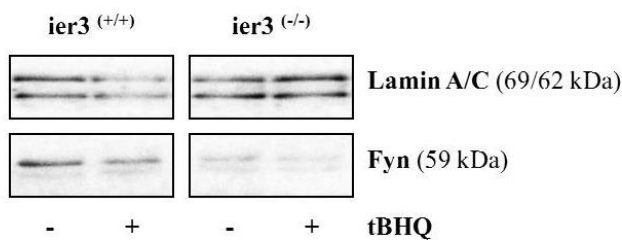
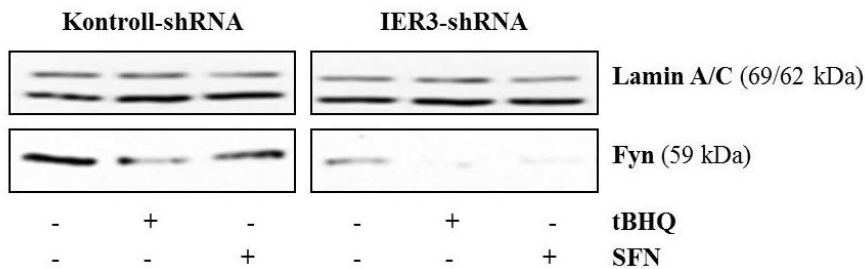
A Kolonorgankultur**B NCM460-Kolonozyten**

Abbildung 23: Erniedrigter nukleärer Fyn-Proteingehalt in IER3-defizienten murinen und humanen Kolonozyten. A: Kolonorgankulturen unbehandelter IER3-defizienter und -profizienter Mäuse wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder für 8 h mit tBHQ (50 μ M) behandelt. B: Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden entweder unbehandelt (-) belassen oder einer 8-stündigen tBHQ- (50 μ M) oder SFN-Behandlung (10 μ M) unterzogen. Kernextrakte wurden jeweilig auf den Fyn-Proteingehalt untersucht, wobei Lamin A/C als Ladekontrolle fungiert. Es ist jeweils eins von mehreren replizierten Ergebnissen gezeigt.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob eine siRNA-vermittelte Inhibition von Fyn die verstärkte Nrf2-Aktivität in IER3-defizienten NCM460-Kolonozyten außer Kraft setzt. Die siRNA-vermittelte Ausschaltung der Fyn-Expression konnte in den gewonnenen Ganzzelllysaten mittels Westernblot in Abbildung 24A verifiziert werden.

Wie durch den ARE-Luziferase Assay gezeigt, verstärkt der Fyn-*knockdown* die Nrf2-Aktivität in tBHQ- oder SFN-behandelten Kontroll-shRNA exprimierenden NCM460-Kolonozyten (Abbildung 24B). Hingegen zeigten die IER3-defizienten NCM460-Zellen eine im Vergleich zur Basalaktivität geringer ausgeprägte Nrf2-Aktivität, wenn Fyn ausgeschaltet wurde.

Abschließend ist somit schlusszufolgern, dass der Effekt einer IER3-Defizienz auf die Nrf2-Aktivierung von der nukleären Lokalisation der Tyrosinkinase Fyn abhängig ist, die wiederum durch den PI3K/Akt-Signalweg inhibiert wird.

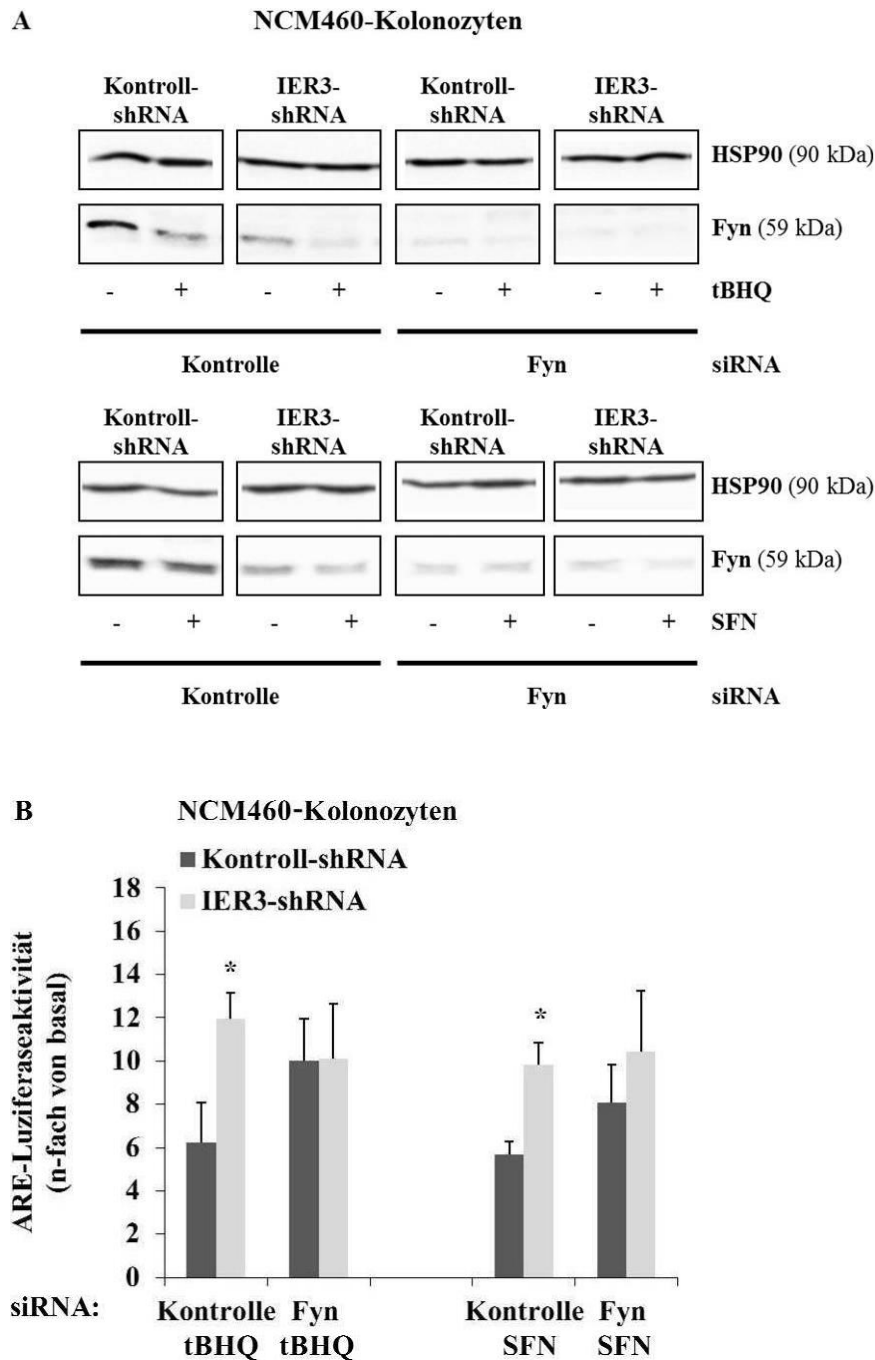


Abbildung 24: Eine IER3-Defizienz bewirkt die nukleäre Akkumulation von Fyn und seine inhibitorische Auswirkung auf die Nrf2-Aktivität. Stabil mit Kontroll-shRNA oder IER3-shRNA transfizierte NCM460-Kolonozyten wurden zunächst 48 h transient mit Kontroll- oder Fyn-siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte in einem Teil der Versuchreihe entweder keine (-) oder eine 16-stündige Behandlung mit tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M). A: In Ganzzelllysaten wurde der Fyn-Proteingehalt mittels Westernblot analysiert. HSP90 dient als Ladekontrolle. Es ist eins von mehreren replizierten Ergebnissen gezeigt. B: Die Daten der durchgeführten ARE-Luziferase Assays sind als n-fache RLU ausgedrückt und repräsentieren den MW \pm die SA von 4 unabhängigen Experimenten. * zeigt den p-Wert <0,05 zwischen Kontroll- und IER3-shRNA exprimierenden Zellen.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Nrf2-Aktivität beim kolorektalen Karzinom

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Tumoren in den westlichen Industrienationen. Aufgrund der Neuerkrankungs- und Mortalitätsrate [1, 2] gewinnen neue Präventions- und Therapiemaßnahmen zunehmend an Bedeutung. Daher ist es notwendig, die grundlegenden Mechanismen zur Entstehung kolorektaler Karzinome zu untersuchen. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war es, spezielle molekulare Mechanismen in der kolorektalen Karzinogenese unter dem besonderen Aspekt der Kolitis assoziierten Tumorentstehung herauszuarbeiten.

Das sporadische kolorektale Karzinom entwickelt sich schrittweise über histologisch definierte genetische Alterationen [5]. Neben bestimmten genetischen Veränderungen beinhaltet die Kolitis-assoziierte Tumorentstehung viele andere molekulare Ereignisse, die in dem Kolonepithel stattfinden und maligne Transformationen initiieren [14, 15, 16, 17, 18]. Wie aus den Befunden der vorliegenden Arbeit erkenntlich wird, spielt unter diesen der Transkriptionsfaktor Nrf2 bei der Umschaltung eines homöostatischen und benignen auf einen malignen Phänotyp eine entscheidende Rolle. Nrf2 übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Zellantwort gegenüber oxidativem Stress [22, 23, 24]. Unter homöostatischen Bedingungen kann der Transkriptionsfaktor durch die Induktion verschiedener zytoprotektiver Zielgene so vor frühzeitigen Zellschäden und mutagenen Ereignissen durch ROS schützen und einer Tumorentwicklung vorbeugen. Aus diesem Grund wird Nrf2 seit vielen Jahren als zu induzierendes molekulares Target mit tumorpräventiver Wirkung propagiert [22, 23, 24, 36, 50]. Bis heute sind viele solcher Nrf2-Aktivatoren beschrieben, die in erster Linie den zelleigenen Schutz verbessern sowie kanzerogene und genotoxische Einflüsse verringern sollen [24, 36, 50].

Allerdings belichtet diese nachgewiesene tumorschützende Wirkungskomponente nur die vorteilhafte Seite des Transkriptionsfaktors. Neueste Befunde belegen, dass Nrf2 durch seine permanente Aktivierung auch onkogene Eigenschaften verleihen kann [51, 52, 53, 92]. Tumorzellen können so im Laufe der Karzinogenese durch die verstärkte Nrf2-Aktivierung einen bedeutsamen anti-apoptotischen Schutz und Wachstumsvorteile erwerben, die sich ebenfalls auf das breite Spektrum der Nrf2-Zielgene sowie Gene des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges auswirken [30, 31, 85]. Inzwischen wurde für viele Tumorentitäten, so auch für das kolorektale Karzinom, das charakteristische Merkmal einer deregulierten Nrf2-Aktivität beschrieben [31, 36, 54, 57, 93]. Dennoch sind die Mechanismen, durch die Nrf2 dereguliert

und dadurch protumorigen wirkt, sehr komplex und bisher nur teilweise verstanden. Neben epigenetischen Veränderungen und etablierten Gen-Mutationen, die vor allem das Nrf2-inhibitorische Protein Keap1 oder seltener direkt Nrf2 betreffen [33, 36, 94, 95], spielen auch metabolische Bedingungen eine Rolle.

Ein charakteristisches Merkmal für Tumorzellen ist ein veränderter Metabolismus, der ausreichend Glucose als Energiequelle für die Biomasseproduktion sicherstellt. Aus diesem Grund weisen die entarteten Zellen eine verstärkte Aktivität von Schlüsselenzymen verschiedener Stoffwechselwege wie der Glykolyse (z.B. Phosphofruktokinase), des Citratzyklus (z.B. Fumarat-Hydratase) oder des Pentosephosphatweges (z.B. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase) auf, die wiederum Nrf2 induzieren können. Dementsprechend ist eine amplifizierte Nrf2-Aktivität in der Karzinogenese beispielsweise mit einem höheren Lactat- oder Inosinmonophosphat-Spiegel und einem niedrigeren Gehalt an Fruktose-6-Phosphat oder Pyruvat assoziiert [36, 96, 97].

Durch seine Schlüsselfunktion in der Zellantwort gegenüber oxidativem Stress kann eine Deregulation des Nrf2-Signalweges ebenso aus einer persistierenden oxidativen Stressexposition, z.B. während CED, resultieren [31, 36, 56, 57]. Hierbei kommt dem multifaktoriellen Stressantwortgen IER3 durch die Regulation intestinaler Entzündungsreaktionen eine wichtige Bedeutung zu [58, 59, 60]. In DSS-behandelten IER3-defizienten Mäusen gelang es Sina et al. zu zeigen, dass eine IER3-Defizienz zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und zu einer vermehrten Zytokinproduktion führt. Während IER3-kompetente Mäuse einen mild ausgeprägten Krankheitsphänotyp aufwiesen, zeigten die Tiere mit aufgehobener IER3-Expression eine schwere entzündliche Krankheitsaktivität [60]. Die durch DSS-induzierte Kolitis führte in allen IER3-defizienten Mäusen zur Entstehung von Tumoren. Im Gegensatz dazu traten in den IER3-kompetenten Tieren deutlich weniger Tumore auf, was auf die tumorsuppressive Wirkung von IER3 hindeutet [Schäfer, H., persönliche Mitteilung].

5.2 Verstärkte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz

Neben einer verstärkten NF κ B-Aktivität [60] konnte durch die Versuche dieser Arbeit in IER3-defizienten Mäusen nun ebenso eine deutlich erhöhte Nrf2-Aktivität im erkrankten Darmepithel detektiert werden. Um auszuschließen, dass die Auswirkung einer verstärkten Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz nicht nur ein Phänomen ist, welches unter chronischen Entzündungssituationen auftritt, wurden die Versuche ex vivo anhand von unbehandelten

murinen Kolonorgangewebekulturen als auch *in vitro* anhand von humanen NCM460-Kolonozyten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der aktivierte Status von Nrf2 beispielsweise in Antwort auf tBHQ oder SFN deutlich durch die IER3-Expression affektiert wird. Demnach ist die verstärkte Nrf2-Aktivität unter IER3-Defizienz nicht nur ein indirektes Resultat einer stärkeren Entzündungsreaktion und des erhöhten oxidativen Stresses, sondern wird ganz offensichtlich direkt durch die Interferenz von IER3 und der Aktivierung von Nrf2 verursacht. Damit stellt die Attenuierung des Nrf2-Signalweges durch das IER3-Gen einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Mechanismus dar, durch den Nrf2 im entzündungsassoziierten Kolonkarzinom dereguliert und IER3 tumorsuppressiv wirkt.

Die Ergebnisse verdeutlichen ebenso, dass eine IER3-Defizienz, korrespondierend zur erhöhten Nrf2-Aktivität, außerdem zu einer verminderten intrazellulären ROS-Konzentration durch die antioxidative und dadurch ROS neutralisierende Wirkungseigenschaft von Nrf2 führt. Das IER3-Gen scheint dabei in der Wechselbeziehung mit Nrf2 keine direkten Auswirkungen auf die ROS-Konzentration zu haben, obwohl für das IER3-Gen ebenso modulierende Effekte auf die Enzymkomplexe der Atmungskette, die die Hauptquelle von zellulär generierten ROS darstellen, postuliert wurden [90].

Unter der durch IER3-Defizienz auftretenden, verstärkten Nrf2-Aktivität war weiterhin die verminderte Sensivität der Kolonzellen gegenüber Apoptosestimuli wie Etoposid oder TRAIL bemerkenswert. Dies ist Ausdruck eines profunden anti-apoptotischen Effektes von Nrf2, der als wesentliche Grundlage der Nrf2-vermittelten Tumorigenese angesehen werden kann. Hierzu zählen zum einen die direkte Induktion von Apoptoseinhibitoren wie Bcl2 und Bcl-xL [98], die verstärkte Detoxifikation von Zytostatika (wie im Falle von Etoposid) oder auch die Herabregulation des TRAIL-Rezeptors-2 (*Death Receptor 5*) durch die Reduktion des zellulären ROS-Gehaltes [99]. Weiterhin trägt auch das in Folge der Nrf2-Aktivierung verstärkte Regulativ des Ubiquitin-Proteasom-Systems essentiell zur Apoptoseresistenz bei, wie kürzlich für das Kolon- und Pankreaskarzinom gezeigt worden ist [31, 85].

5.3 Rolle des PI3K/Akt-Konsolidierungs-Signalweges

Nicht zuletzt sind auch weitere Signalwege an der Deregulation des Nrf2-Signalweges beteiligt. Dazu zählt zum Beispiel der PI3K/Akt-Signalweg [48, 91]. Eine Amplifikation dieses Signalweges tritt unter anderem durch die Mutation im PTEN-Tumorsuppressorgen auf [48]. Ein weiterer Mechanismus in diesem Zusammenhang stützt sich auf die negative Modulation des PI3K/Akt-Signalweges durch das Stressantwortgen IER3 [82]. Die

vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass IER3-defiziente murine oder humane NCM460-Kolonozyten durch einen erhöhten Gehalt an Phospho-Akt charakterisiert sind. Die Konsequenz dieser Akt-Amplifikation ist eine verstärkte Nrf2-Aktivierung, die sich besonders unter verstärktem oxidativem Stress im Rahmen chronischer Entzündungsreaktionen manifestiert. Dementsprechend wird die IER3-abhängige Kontrolle der Nrf2-Aktivierung in Darmgewebe von Mäusen, die an einer DSS-Kolitis litten, beobachtet. In den durchgeführten Versuchen kann SFN dabei als ein Induktor von Akt angesehen werden. Die Diskrepanz zur Literatur, in der für SFN z.T. inhibitorische oder schwache Auswirkungen auf Akt beschrieben werden, erschließt sich möglicherweise aus einem Zeit-, Zelltyp- und Dosisphänomen [100, 101]. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass unter IER3-Defizienz neben des verstärkten Phospho-Akt-Gehalts die nukleäre Präsenz der Tyrosinkinase Fyn deutlich vermindert ist.

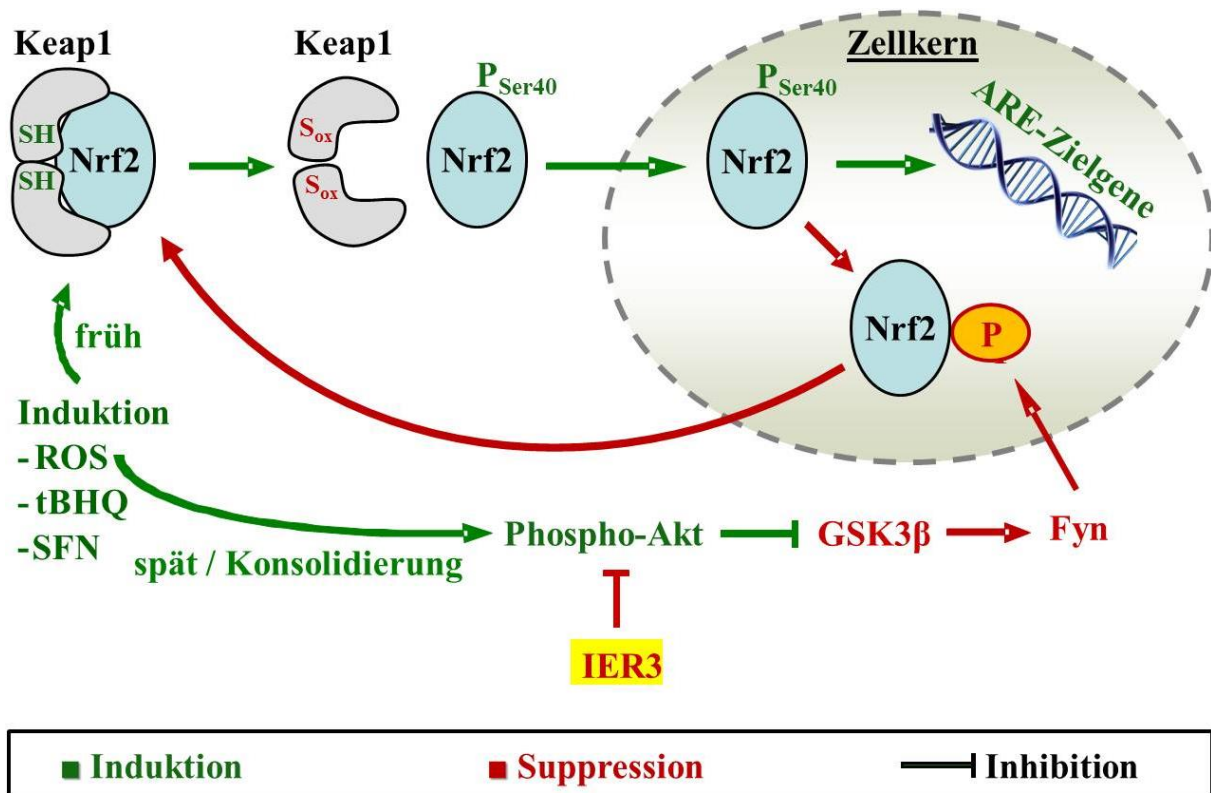


Abbildung 25: Molekulare Interferenz des Stressantwortgens IER3 mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2. Der Nrf2-Signalsweg kann früh durch ROS im Rahmen von oxidativem Stress oder Effektoren wie tBHQ oder SFN induziert werden. Entsprechend wird de novo synthetisiertes (hier nicht dargestellt) oder von Keap1 dissoziiertes Nrf2 durch verschiedene Modifikationen wie der Phosphorylierung an Serin-40 (P_{Ser40}) aktiviert und transloziert in den Zellkern, wo es die Expression seiner antioxidativen Zielgene durch die Bindung an AREs induzieren kann. Dabei unterliegt die Nrf2-Aktivität einer Modulation durch das Stressantwortgen IER3, worüber die späte Phase der Nrf2-Aktivierung durch die Konsolidierung mit weiteren Signalwegen reguliert wird. Unter IER3-Defizienz inhibiert aktiviertes Akt (Phospho-Akt) die Glykogensynthese GSK3 β , durch die wiederum die Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn ausbleibt. In IER3-kompetenten Zellen würde aktiviertes Fyn in den Zellkern translozieren und dort durch die Phosphorylierung (P) von Nrf2 an der Tyrosinseitenkette an Position 568 den Kernexport von Nrf2 einleiten. Im Zytoplasma wird Nrf2 schließlich seiner proteasomalen Degradation zugeführt (nicht dargestellt). SH: Sulfhydrylgruppe. S_{ox}: oxidierte Sulfhydrylgruppe.

Aus der Arbeit von Jain und Jaiswel war bereits bekannt, dass Akt durch die Inhibition des Fyn-vermittelten nukleären Exports über Gsk3 β eine entscheidende Rolle in der späten Phase der Nrf2-Aktivierung übernimmt [47]. Fyn wird im Zytoplasma durch GSK3 β über eine Phosphorylierung aktiviert und transloziert in den Zellkern. Dort modifiziert aktiviertes Fyn Nrf2 durch Phosphorylierung an Position 568 der Tyrosinseitenkette, wodurch der Kernexport und die anschließende proteasomale Degradation von Nrf2 im Zytoplasma eingeleitet werden [47, 48, 91]. Dies zeigt, dass der IER3-hemmende Einfluss auf Nrf2 aus der Konsolidierung mit dem PI3K/Akt- und Fyn-Signalweg resultiert (Abbildung 25).

5.4 Die Verbindung zu NF κ B als ein weiterer inflammatorischer und onkogener Mediator

Neben der beschriebenen Auswirkung von IER3 auf die Nrf2-Aktivierung moduliert IER3 weitere Signalwege, die eine wichtige Rolle in der epithelialen Stressadaption im Rahmen von Entzündungsreaktionen und der Tumorigenese spielen.

Hierzu zählt der NF κ B-Signalweg, der einer inhibitorischen Regulation durch IER3 im Sinne eines klassischen *Feedback*-Mechanismus unterliegt [60, 67, 77, 78, 79]. IER3 bewirkt dabei durch die Interferenz mit der proteasomalen Degradation von phospho-I κ B α [77, 80] sowie der direkten Wechselwirkung mit der NF κ B-Untereinheit p65/RelA [78] eine reduzierte NF κ B-Aktivität. Diese Modulation repräsentiert einen weiteren Mechanismus, durch den das IER3-Gen ein inflammatorisches Stresssignal dämpft. Demnach würde ein Verlust der IER3-Funktion in Verbindung mit einer verstärkten NF κ B- [67, 77] und Nrf2-Aktivität stehen und durch die Überlebenseffekte von Nrf2 und NF κ B [53, 102, 103] einen tumorigenen Phänotyp begünstigen.

Kürzlich wurde ebenso eine direkte Attenuierung zwischen NF κ B und Nrf2 beschrieben, bei der Nrf2 als ein Zielgen der NF κ B-Untereinheit p65/RelA in akuten myeloischen Leukämiezellen detektiert wurde [104]. Durchgeführte Versuche (nicht gezeigt) ließen in diesem Zusammenhang allerdings keine Veränderungen des IER3-hemmenden Einflusses auf Nrf2 erkennen. Des Weiteren triggert NF κ B inflammatorischen Stress und die Bildung von ROS, die wiederum zur Aktivierung des Nrf2-Signalweges führen würden [56, 105]. Diese Wechselwirkung würde einen weiteren Mechanismus repräsentieren, durch den Nrf2 unter IER3-Defizienz verstärkt dereguliert. In entzündeten Geweben wird IER3, welches selbst ein Zielgen von NF κ B darstellt [58, 67], als Teil eines Kompensationsmechanismus durch die NF κ B-abhängige Induktion von Zytokinen wie TNF α vermehrt exprimiert [67]. IER3 würde

durch die negative Modulation von NFκB nachfolgend auch inhibierende Auswirkungen von NFκB auf Nrf2 bedingen. Somit würde das IER3-Gen sowohl den Nrf2- als auch NFκB-Signalweg regulieren und könnte Nebensignaleffekte, die durch die Interferenz zwischen beiden Transkriptionsfaktoren entstehen, ausbalancieren. Ein Ausfall dieses Regulativs würde demnach zur forcierten entzündlichen Karzinogenese des Darmes beitragen. Angesichts dieser einzigartigen Funktion von IER3, könnte seine Expression in der Tat mittelfristig als ein wertvoller diagnostischer und/oder prognostisch/prädiktiver Biomarker dienen [59, 106].

5.5 Fazit und Ausblick

Obwohl Nrf2 in erster Linie Schutz vor der DSS-induzierten Kolitis gibt und somit frühe Gewebeschäden und dadurch die entzündungsassoziierte Tumorigenese vermeidet [49], ist seine anhaltende Aktivierung später durch die Nrf2-abhängige Anpassung des Kolonepithels an oxidativen Stress schädlich und protumorigen (Abbildung 26) [36]. Auf diese Weise moduliert IER3 im entzündeten Kolongewebe einen Signalweg, der eine entscheidende Rolle in der Onkogenese spielt. Ein Verlust dieser Modulation durch eine IER3-Defizienz trägt somit zur Tumorinitiation bei. Diese gewonnene Erkenntnis kann auch auf andere entzündungsbasierte Krebsarten, wie das Pankreaskarzinom, welches sich im Rahmen einer chronischen Pankreatitis entwickelt hat, übertragen werden. Eine Nrf2-modulierende Wirkung von IER3 konnte auch in der humanen Pankreasgangepithelzelllinie H6c7 beobachtet werden (unveröffentlichte Daten).

Eine Abschätzung des Zeitpunktes, an dem Nrf2 noch unter homöostatischer Regulation antitumorigen wirkt, und dem Zeitpunkt, an dem diese Kontrolle verloren geht und der Transkriptionsfaktor dadurch onkogenes Potential aufweist, gestaltet sich schwierig [36]. Gegenwärtig soll deshalb die duale Rolle von Nrf2 in der Karzinogenese anhand von konditionalen Nrf2-defizienten Mäusen detaillierter untersucht werden. Um eine Aussage treffen zu können, in welchem zellulären Kontext dieser Wirkungsdualismus steht, ist sicherlich zu beachten, dass die Auswirkungen von Nrf2 auf den zellulären Phänotyp von zahlreichen Wechselwirkungen mit weiteren, zum Teil onkogenen Signalwegen abhängig sind. Nrf2 könnte so mittelfristig einen nützlichen Marker für die klinische Beurteilung der Chemo- und Strahlenresistenz darstellen.

Nach neuesten Untersuchungen scheint dem Stressantwortgen IER3 ebenfalls eine duale Rolle bezüglich der Regulation von Entzündungsreaktionen und der Tumorigenese zuzukommen [66, 107].

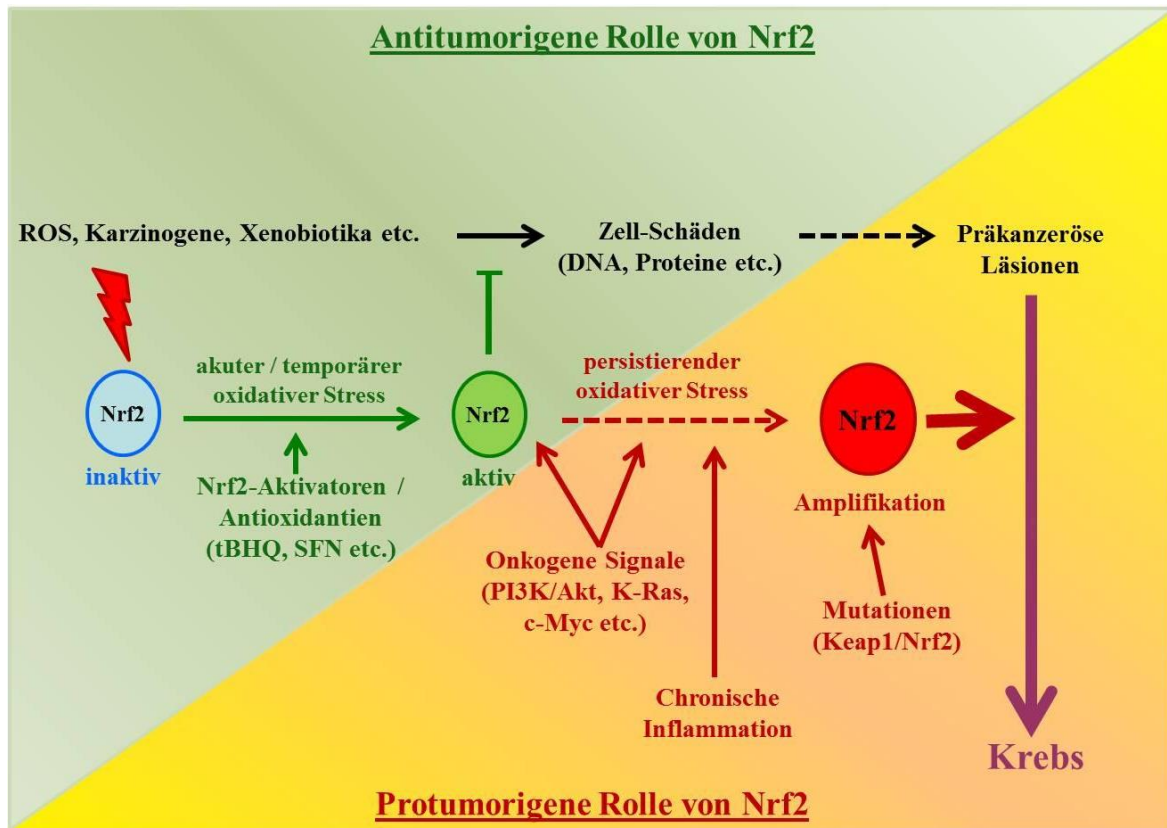


Abbildung 26: Die duale Rolle von Nrf2 in der Karzinogenese. Solange die Nrf2-Aktivität unter homöostatischer Kontrolle gehalten wird (linke Seite, grüner Hintergrund), kann der Transkriptionsfaktor Nrf2 Enterozyten vor schädigenden Auswirkungen durch akuten, temporären oxidativen Stress, schützen. Hierdurch beugt Nrf2 einer Tumorentwicklung vor und wirkt tumorpräventiv. Sobald es zu einer Deregulation des Nrf2-Signalweges (rechte Seite, gelb-orangefarbiger Hintergrund) kommt, weist Nrf2 jedoch onkogenes Potential auf und wirkt protumorigen. Eine deregulierte Nrf2-Aktivität kann durch epigenetische und genetische Alterationen des Keap1 Proteins oder Nrf2 selbst, durch persistierenden, oxidativen Stress, z.B. im Rahmen chronischer Entzündungen wie der Colitis ulcerosa, oder durch onkogene Signalwege induziert werden. Hierdurch wird das Zellwachstum und –überleben transformierter Zellen gefördert. Modifiziert nach [36].

In epithelialen Zellen und Tumorzellen wirkt IER3 unter stress- oder wachstumsinadäquaten Bedingungen, z.B. durch DNA-Schädigungen, apoptosefördernd. Aus diesem Grund wird IER3 in verschiedenen Tumorentitäten als Tumorsuppressor postuliert. Im leukozytären Kompartiment hingegen scheint IER3 das Zellwachstum von Immunzellen (T-Zellen) zu begünstigen oder ist mitunter selbst Bestandteil des Wachstumssignals, wodurch IER3 eine antiapoptotische Funktion zugesprochen wird [58, 69]. Es wurde beschrieben, dass die daraus resultierende verstärkte Immunantwort sogar eine Lupus ähnliche Autoimmunkrankheit oder ein T-Zell-Lymphom hervorrufen kann [108].

Ustyogova et al. beschrieben kürzlich anhand konstitutiver IER3-defizienter Mäuse eine deutlich verminderte intestinale Entzündungsreaktion nach DSS-Gabe sowie eine reduzierte Tumorzinzidenz unter IER3-Defizienz im DSS-/Azoxymethan-Modell. Diese konträre und offenbar antitumorogene Wirkungseigenschaft einer IER3-Defizienz wurde einer noch nicht nachgewiesenen Funktion von IER3 in T-Lymphozyten zugeschrieben. Hierbei soll es zu

einer gesteigerten Ausdifferenzierung von Th17-Zellen und einer gleichzeitig gesteigerten Apoptose von Th1-Zellen kommen, woraus eine Modulation der T-Zellantwort in der Darmmukosa resultiert [107]. IER3 besitzt somit offensichtlich vielfältige und komplexe zellkontextabhängige Wirkungen. Aus diesem Grund sollen weitere Studien anhand des DSS- und Azoxymethan-Modells mit konditionellen IER3-*knockout* Mäusen (*ier3-FloxP*) erfolgen und die Auswirkungen einer IER3-Defizienz in einzelnen Zellkompartimenten, v.a. im Darmepithel (*villin-Cre*) oder in Makrophagen (*LysM-Cre*), analysiert werden.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gewinnt mit über 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland zunehmend an Bedeutung. Zu den Risikofaktoren kolorektaler Karzinome zählen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie die Colitis ulcerosa, die das Darmkrebsrisiko abhängig von der Dauer und dem Ausmaß der Entzündung auf das Zehnfache erhöht. Neben bestimmten genetischen Alterationen umfasst die Kolitis assoziierte Tumorentstehung viele andere molekulare Ereignisse, die im Kolonepithel stattfinden und maligne Transformationen initiieren. Unter diesen kommt dem Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor-2* (Nrf2) eine bedeutsame Rolle zu. Nrf2 übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Zellantwort gegenüber oxidativem Stress. Aus diesem Grund wird Nrf2 seit vielen Jahren als zu induzierendes molekulares Target mit tumorpräventiver Wirkung propagiert. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass Nrf2 auch onkogene Eigenschaften aufweist. Entsprechend ist Nrf2 in vielen Tumoren dereguliert, was zum Teil auf einer inadäquaten Adaption an persistierenden oxidativen Stress, z.B. während CED, beruht. Hierbei spielt das multifaktorielle Stressantwortgen *Immediate Early Response-3* Gen (IER3) eine entscheidende Rolle. Durch die Modulation apoptose- und inflammationsregulierender Signalwege werden dem IER3-Gen tumorsuppressive Wirkungen zugesprochen – so auch beim Kolonkarzinom, wo eine erniedrigte IER3-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechterer Prognose assoziiert ist. In diesem Zusammenhang war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die molekulare Interferenz zwischen dem IER3-Gen und dem Transkriptionsfaktor Nrf2 sowie deren Auswirkung auf den zellulären Phänotyp unter dem besonderen Aspekt der Kolitis assoziierten Tumorentstehung zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Parameter der Nrf2-Aktivierung anhand von murinen DSS-behandelten (Dextran Natrium Sulfat) sowie unbehandelten Kolonorgangewebekulturen unter Verwendung IER3-defizienter und -profizienter C57BL/6-Mäuse untersucht. Als mögliches In-vitro-Modell etablierte sich die humane Kolonepithelzelllinie NCM460, in der das IER3-Gen sowohl dauerhaft durch die stabile Transfektion mit einer shRNA gegen IER3 ausgeschaltet als auch durch die transiente Transfektion mit entsprechenden Plasmiden überexprimiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass der aktivierte Status von Nrf2 deutlich durch die IER3-Expression affektiert wird. Unter IER3-Defizienz war die Nrf2-Aktivität, z.B. durch tertiäres Butylhydrochinon oder Sulforaphan, stark erhöht, ebenso wie die Expression der Nrf2-Zielgene GCLC (Glutathion-Cystein-Ligase) und NQO1 (NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase 1). Weiterhin wiesen IER3-defiziente NCM460-Kolonozyten einen

erniedrigten Gehalt intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf und verhielten sich resistenter gegenüber Apoptosereizen durch Etoposid oder TRAIL. Dieser Effekt wurde jeweils durch einen siRNA-vermittelten *knockdown* von Nrf2 aufgehoben. Die Überexpression von IER3 in NCM460-Zellen verminderte hingegen die Nrf2-Aktivität sowie die ROS- und Apoptoseresistenz. Resultierend aus diesen Ergebnissen stellt die Attenuierung des Nrf2-Signalweges durch das IER3-Gen einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Mechanismus dar, durch den Nrf2 im entzündungsassoziierten Kolonkarzinom dereguliert und IER3 tumorsuppressiv wirkt. Ferner zeigten die Ergebnisse, dass der IER3-hemmende Einfluss auf die Nrf2-Aktivierung aus der Konsolidierung mit dem Phosphatidylinositol-3 Kinase/Proteinkinase B-Signalweg (PI3K/Akt)- und Fyn-Signalweg beruht. So wiesen murine oder humane Kolonozyten unter IER3-Defizienz einen erhöhten Phospho-Akt-Proteingehalt auf, während die nukleäre Präsenz der Tyrosinkinase Fyn jedoch deutlich vermindert war. Dabei besitzt IER3 eine supprimierende Wirkung auf Akt, die wiederum zu einer Desinhibition des Nrf2-regulierenden Fyn-Signalweges über die Glykogensynthase-Kinase 3 beta führt. Entsprechend ist unter IER3-Defizienz der hemmende Einfluss von Fyn auf Nrf2 vermindert. Angesichts dieser einzigartigen Funktion von IER3, könnte seine Expression somit mittelfristig als ein wertvoller diagnostischer und/oder prognostisch/prädiktiver Biomarker dienen.

6 Summary

Colorectal cancer gains with an incidence of 70.000 new cases a year in Germany more and more in importance. Risk factors of colorectal cancer include inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis, which increases the colon cancer risk depending on the duration and extent of inflammation tenfold. Besides certain genetic alterations, colitis associated carcinogenesis involves many other molecular events taking place in the colonic epithelium that can initiate malignant transformation. Amongst these, the transcription factor Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) has an important role. Nrf2 acts mainly as key regulator of cellular response to oxidative stress. For this reason Nrf2 has been publicized as inducible molecular target with tumor preventive effects for many years. However, meanwhile it is known that Nrf2 exhibits oncogenic qualities. Accordingly Nrf2 is deregulated in many cancers, which is partly due to an inadequate adaptation to persistent oxidative stress, e.g. during IBD. In this connection the multifactorial stress response gene Immediate Early Response-3 gene (IER3) plays a crucial role. Through the modulation of apoptosis- and inflammation-regulated pathways the IER3-gene is attributed to tumorsuppressive effects - also in colon carcinoma, where a reduced IER3-expression is associated with advanced tumor stage and poor prognosis. In this context, the aim of the present study was to investigate the molecular interference between the IER3-gene and the transcription factor Nrf2 as well as their impact on the cellular phenotype under the special aspect of the colitis associated tumor genesis. Therefore various parameters of Nrf2 activation were examined in murine DSS-treated (dextran sodium sulfate) and untreated IER3-deficient and -proficient mice on C57BL/6 background. The human colon epithelium cell line NCM460 was established as a possible in-vitro-model, in which the IER3-gene was permanently disabled by the stable transfection with an IER3-shRNA as well as overexpressed by the transient transfection with corresponding plasmids. At this juncture it was found, that the activated status of Nrf2 was significantly affected by the IER3-expression. Under IER3-deficiency the Nrf2-activity was greatly increased, e.g. through tertiary butylhydroxyquinone or sulforaphane, as well as the expression of the Nrf2-target genes GCLC (glutathione-cysteine ligase) and NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1). Furthermore IER3-deficient NCM460-colonozytes exhibited lower levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and behaved more resistant to etoposide- or TRAIL-induced apoptosis-stimuli. This effect was each time abolished by a siRNA-mediated knockdown of Nrf2. In contrast, the overexpression of IER3 in NCM460-cells decreased the Nrf2-activity as

well as ROS- and apoptosis-resistance. As a result of these findings the attenuation of the Nrf2-pathway through the IER3-gene represents a new, previously unknown mechanism, by which Nrf2 deregulates and IER3 acts tumorsuppressive in inflammation associated colorectal cancer. Furthermore the findings show, that the IER3-inhibitory effect on the Nrf2-activation based on the consolidation with the phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase B-pathway (PI3K/Akt)- and Fyn-pathway. Thus murine or human colonozytes exhibited greater phospho-Akt-protein levels under IER3-deficiency, while the nuclear presence of the tyrosine kinase Fyn was clearly reduced. Thereby IER3 has a suppressing effect on Akt, which leads to a disinhibition of the Nrf2-regulated Fyn-pathway over the glycogen synthase kinase 3 beta. Accordingly the inhibitory effect of Fyn on Nrf2 is diminished under IER3-deficiency. In view of this unique function of IER3, its expression could therefore serve as a valuable diagnostic and/or prognostic/predictive biomarker middle-term.

Literaturverzeichnis

- [1] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Maxwell Parkin, D., Forman, D., Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int. J. Cancer* 2015; 136: 359-386
- [2] Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013; 9: 36-39, Berlin
- [3] Scharl, M., Biedermann, L., Rogler, G. [Colitis-associated colorectal carcinoma: epidemiology, pathogenesis and early diagnosis]. *Praxis* 2014; 103(3): 149-154
- [4] Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R., Büchler, M. W. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165
- [5] Fearon, E. R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61(5): 759-767
- [6] Herold, G. *Innere Medizin*. Herold, G. 2010; 473-478, Köln
- [7] Moràn, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frias, C., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A. J., Diaz-Rubio, E., Iniesta, P., Benito, M. Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2(3): 151-158
- [8] Michor, F., Iwasa, Y., Rajagopalan, H., Lengauer, C., Nowak, M. A. Linear model of colon cancer initiation. *Cell Cycle* 2004; 3(3): 358-362
- [9] Michor, F., Iwasa, Y., Lengauer, C., Nowak, M. A. Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(6): 484-493

- [10] Calvert, P. M., Frucht, H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2002; 137(7): 603-612
- [11] Toribara, N. W., Sleisenger, M. H. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995; 332(13): 861-867
- [12] Herold, G. *Innere Medizin.* Herold, G. 2010; 461-468, Köln
- [13] Lautenschläger, C., Schmidt, C., Fischer, D., Stallmach, A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014; 71: 58-76
- [14] Clevers, H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 2004; 118: 671-674
- [15] Seril, D. N., Liao, J., Yang, G. Y., Yang, C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 353-362
- [16] O'Connor, P. M., Lapointe, T. K., Beck, P. L., Buret, A. G. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16: 1411-1418
- [17] Grivennikov, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(2): 229-244
- [18] Rogler, G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Letters* 2014; 345: 235-241
- [19] Finkel, T., Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809): 239-247
- [20] Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95

- [21] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40
- [22] Kensler, T. W., Wakabayashi, N., Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 89-116
- [23] Osburn, W. O., Kensler, T. W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 2008; 659: 31-39
- [24] Zenkov, N. K., Menshchikova, E. B., Tkachev, V. O. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry* 2013; 78(1): 19-36
- [25] Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(21): 9926-9930
- [26] Zhang, D. D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 769-789
- [27] Chen, L., Kwong, M., Lu, R., Ginzinger, D., Lee, C., Leung, L., Chan, J. Y. Nrf1 is critical for redox balance and survival of liver cells during development. *Mol Cell Biol* 2003; 23(13): 4673-4686
- [28] Chan, J. Y., Cheung, M. C., Moi, P., Chan, K., Kan, Y. W. (1995). Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bzip transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1995; 95(3): 265-269
- [29] Sankaranarayanan, K., Jaiswal, A. K. Nrf3 negatively regulates antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* 2004; 279(49): 50810-50817

- [30] Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M., Kensler, T. W. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8786-8794
- [31] Arlt A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Sebens Mürköster, S., Brosch, M., Röder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M. P., Fölsch, U. R., Schäfer, H. 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* 2009; 28: 3983-3996
- [32] Tkachev, V. O., Menshchikova, E. B., Zenkov, N. K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry*, 2011; 76(4): 407–422
- [33] Hayes, J. D., McMahon, M. Nrf2 and Keap1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 176-188
- [34] Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K, Engel. J. D., Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13: 76-86
- [35] McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24756-24768
- [36] Geismann, C., Arlt, A., Sebens, S., Schäfer, H. Cytoprotection "gone astray": Nrf2 and its role in cancer. *OncoTargets and Therapy* 2014; 7: 1497-1518
- [37] Li, W., Yu, S. W., Kong, A. N. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* 2006; 281: 27251-27263
- [38] Karapetian, R. N., Evstafieva, A. G., Abaeva, I. S., Chichkova, N. V., Filonov, G. S., Rubtsov, Y. P., Sukhacheva, E. A., Melnikov, S. V., Schneider, U., Wanker, E. E., Vartapetian A. B. Nuclear oncoprotein prothymosin α is a partner of Keap1:

- implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25(3): 1089-1099
- [39] Velichkova M., Hasson T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol* 2005; 25(11), 4501-4513
- [40] Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., Pickett, C. B. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of are-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by keap1. *J Biol Chem* 2005; 280(37): 32485-32492
- [41] Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S. P., Villalta, F., Arinze, I. J. Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 2008; 283: 8984-8994
- [42] Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 221-229
- [43] Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2040-2045
- [44] Zhang, D. D., Hannink, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8137-8151
- [45] Zhang, D. D., Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J., Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10941-10953

- [46] Favreau, L. V., Pickett, C. B. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *J Biol Chem* 1993; 268: 19875-19881
- [47] Jain, A. K., Jaiswal, A. K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem.* 2007; 282(22): 16502–16510
- [48] Niture, S. K, Jain, A. K., Shelton, P.M., Jaiswal, A. K. 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
- [49] Khor, T. O., Huang, M. T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W. K., Chan, J. Y., Reddy, B. S., Yang, C. S., Kong, A. N. Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis associated colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008; 1: 187-191
- [50] Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 13: 1713-1748
- [51] Lau, A., Villeneuve, N. F., Sun, Z., Wong, P. K., Zhang, D.D. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 2008; 58: 262-270
- [52] Kensler, T. W., Wakabayashi, N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 2010; 31: 90-99
- [53] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine* 2010; 49: 1603-1616

- [54] Kim, T. H., Hur, E. G., Kang, S. J., Kim, J. A., Thapa, D., Lee, Y. M., Ku, S. K., Jung, Y., Kwak, M. K. Nrf2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia induced activation of HIF-1 α . *Cancer Res.* 2011; 71: 2260-2275
- [55] Chang, L. C., Fan, C. W., Tseng, W. K., Chen, J. R., Chein, H. P., Hwang, C. C., Hua, C. C. Immunohistochemical study of the Nrf2 pathway in colorectal cancer: Nrf2 expression is closely correlated to Keap1 in the tumor and Bach1 in the normal tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013; 21(6): 511-517
- [56] Singh, S., Vrishni, S., Singh, B.K., Rahman, I., Kakkar, P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free radical research* 2010; 44: 1267-1288
- [57] Sebens, S., Bauer, I., Geismann, C., Grage-Griebenow, E., Ehlers, S., Kruse, M. L. Inflammatory macrophages induce Nrf2 dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 40911–40921
- [58] Arlt, A., Schäfer, H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 2010; 90: 545-552
- [59] Kapoor S. Emerging role of IEX-1 in tumor pathogenesis and prognosis. *Ultrastruct Pathol.* 2012; 36 (4):285
- [60] Sina, C., Arlt, A., Gavrilova, O., Midtling, E., Kruse, M. L., Muerköster Sebens, S., Kumar, R., Fölsch, U. R., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Schäfer, H. Ablation of gly96/immediate early gene-X1 (gly96/iex-1) aggravates DSS-induced colitis in mice: role for gly96/iex-1 in the regulation of NF- κ B. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010; 16: 320–331
- [61] Kondratyev, A. D., Chung, K. N., Jung, M. O. Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Res* 1996; 56: 1498-1502

- [62] Schäfer, H., Trauzold, A., Siegel, E. G., Fölsch, U. R., Schmidt, W. E. PRG1: a novel early-response gene transcriptionally induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a pancreatic carcinoma cell line. *Cancer Res* 1996; 56: 2641-2648
- [63] Pietzsch, A., Büchler, C., Aslanidis, C., Schmitz G. Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation-dependent gene that is responsive to lipopolysaccharide, ceramide, and lysophosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 235(1): 4-9
- [64] Charles, C. H., Yoon, J. K., Simske, J. S., Lau, L. F. Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein. *Oncogene* 1993; 8(3): 797-801
- [65] Feldmann, K. A., Pittelkow, M. R., Roche, P. C., Kumar, R., Grande, J. P. Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues. *Histochem Cell Biol* 2000; 115: 489-497
- [66] Jin, H., Dae-Shik, S., Tae-Hyoung, K., Ji-Hyun, Y., Kangseok, L., Jeehyeon, B. IER3 is a crucial mediator of Tap73 β -induced apoptosis in cervical cancer and confers etoposide sensitivity. *Sci. Rep.* 2015; 5: 8367
- [67] Arlt, A., Grobe, O., Sieke, A., Kruse, M. L., Fölsch, U. R., Schmidt, W. E., Schäfer, H. Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in Hela cells. *Oncogene* 2001; 20: 69-76
- [68] Grobe, O., Arlt, A., Ungefroren, H., Krupp, G., Fölsch, U. R., Schmidt, W. E., Schäfer, H. Functional disruption of IEX-1 expression by concatemeric hammerhead ribozymes alters growth properties of 293 cells. *FEBS Lett* 2001; 494(3): 196-200
- [69] Wu, M. X. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 2003; 8: 11-18

- [70] Schäfer, H., Diebel, J., Arlt, A., Trauzold, A., Schmidt, W.E. The promoter of human p22/PACAP response gene 1 (PRG1) contains functional binding sites for the p53 tumor suppressor and for NFkappaB. *FEBS Lett* 1998; 436(2):139-143
- [71] Kruse, M. L., Arlt, A., Sieke, A., Grohmann, F., Grossmann, M., Minkenberg, J., Fölsch, U. R., Schäfer, H. Immediate early gene X1 (IEX-1) is organized in subnuclear structures and partially co-localizes with promyelocytic leukemia protein in HeLa cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 24849-24856
- [72] Shen, L., Guo, J., Santos-Berrios, C., Wu, M. X. Distinct domains for anti- and proapoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem* 2006; 281: 15304-15311
- [73] Kumar, R., Kobayashi, T., Warner, G. M., Wu, Y., Salisbury, J. L., Lingle, W., Pittelkow, M. R. A novel immediate early response gene, IEX-1, is induced by ultraviolet radiation in human keranocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(2): 336-341
- [74] Domachowske, J. B., Bonville, C. A., Mortelliti, A. J., Colella, C. B., Kim, U., Rosenberg, H. F. Respiratory syncytial virus infection induces expression of the anti-apoptosis gene IEX-1L in human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* 2000; 181(3): 824-830
- [75] Huang, Y. H., Wu, J. Y., Zhang, Y., Wu, M.X. Synergistic and opposing regulation of the stress-responsive gene IEX-1 by p53, c-Myc, and multiple NF- κ B/rel complexes. *Oncogene* 2002; 21(44): 6819-6828
- [76] Pietzsch, A., Buchler, C., Schmitz, G. Genomic organization, promotor cloning, and chromosomal localization of the Dif-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(3): 651-657
- [77] Arlt, A., Kruse, M. L., Breitenbroich, M., Gehrz, A., Koc, B., Minkenberg, J., Fölsch, U.R., Schafer, H. The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. *Oncogene* 2003; 22: 3343-3351

- [78] Arlt, A., Rosenstiel, P., Kruse, M. L., Grohmann, F., Minkenberg, J., Perkins, N.D., Fölsch, U.R., Schreiber, S., Schäfer, H. IEX-1 directly interferes with RelA/p65 dependent transactivation and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1783: 941-952
- [79] Billmann-Born, S., Till, A., Arlt, A., Lipinski, S., Sina, C., Latiano, A., Annese, V., Häslar, R., Kerick, M., Manke, T., Seegert, D., Hanidu, A., Schäfer, H., VanHeel, D., Li, J., Schreiber, S., Rosenstiel P. Genome-wide expression profiling identifies an impairment of negative feedback signals in the Crohn disease-associated NOD2 variant L1007fsinsC1. *J. Immunol.* 2011; 186: 4027-4038
- [80] Arlt, A., Minkenberg, J., Kruse, M. L., Grohmann, F., Fölsch, U. R., Schäfer, H. 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* 2007; 402: 367-375
- [81] Sebens Mürköster, S., Rausch, A. V., Isberner, A., Minkenberg, J., Blaszcuk, E., Witt, M., Fölsch, U. R., Schmitz, F., Schäfer, H., Arlt, A. The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF- κ B inhibition. *Oncogene* 2008; 27: 1122-1134
- [82] Osawa, Y., Nagaki, M., Banno, Y., Brenner, D. A., Nozawa, Y., Moriwaki, H., Nakashima S. J. Expression of the NF-kappa B target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation. *J. Immunol.* 2003; 170: 4053-4060
- [83] Costello, C. M., Mah, N., Hasler, R., Rosenstiel, P., Waetzig, G. H., Hahn, A., Lu, T., Gurbuz, Y., Nikolaus, S., Albrecht, M., Hampe, J., Lucius, R., Kloppel, G., Eickhoff, H., Lehrach, H., Lengauer, T., Schreiber, S. Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med* 2005; 8(2): 771-787
- [84] Nambiar, P. R., Nakanishi, M., Gupta, R., Cheung, E., Firouzi, A., Ma, X. J., Flynn, C., Dong, M., Guda, K., Levine, J., Raja, R., Achenie, L., Rosenberg, D. W. Genetic

- signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 6394-6401
- [85] Arlt, A., Sebens, S., Krebs, S., Geismann, C., Grossmann, M., Kruse, M. L., Schreiber, S., Schäfer, H. 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* 2013; 32: 4825-4835
- [86] Moyer, M. P., Manzano, L. A., Merriman, R. L., Stauffer, J. S., Tanzer, L. R. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1996; 32(6): 315-317
- [87] Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98(3): 694-702
- [88] Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., Singh Jaggi, A. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 279-288
- [89] Sasada, T., Azuma, K., Hirai, T., Hashida, H., Kanai, M., Yanagawa, T., Takabayashi, A. Prognostic significance of the immediate early response gene X-1 (IEX-1) expression in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(2): 609-617
- [90] Shen, L., Zhi, L., Hu, W., Wu, M. X. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 603–612
- [91] Kaspar, J. W., Jaiswal, A. K. Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression *FASEB J.* 2011; 25: 1076-1087
- [92] Zhang, D.D. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer. *Antioxid. Redox Signal* 2010; 13: 1623-1626

- [93] Akhdar, H., Loyer, P., Rauch, C., Corlu, A., Guillouzo, A., Morel, F. Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. *Eur. J. Cancer* 2009; 45: 2219-2227
- [94] Yoo, N. J., Kim, H. R., Kim, Y. R., An, C. H., Lee, S. H. Somatic mutations of the Keap1 gene in common solid cancers. *Histopathology* 2012; 60: 943-952
- [95] Wang, R., An, J., Ji, F., Jiao, H., Sun, H., Zhou, D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 151-154
- [96] Adam, J., Hatipoglu, E., O'Flaherty, L., Ternette, N., Sahgal, N., Lockstone, H., Baban, D., Nye, E., Stamp, G. W., Wolhuter, K., Stevens, M., Fischer, R., Carmeliet, P., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Frizzell, N., Soga, T., Kessler, B. M., El-Bahrawy, M., Ratcliffe, P. J., Pollard, P. J. 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* 2011; 20: 524-537
- [97] Kinch, L., Grishin, N. V., Brugarolas, J. Succination of Keap1 and Activation of Nrf2-dependent antioxidant pathways in FH-deficient papillary renal cell carcinoma Type 2. *Cancer Cell* 2011; 20: 418-420
- [98] Niture, S.K., Jaiswal, A.K. Nrf2-induced anti-apoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med.* 2013; 57: 119-131
- [99] Kong, R., Jia, G., Cheng, Z., Wang, Y., Mu, M., Wang, S., Pan, S., Gao, Y., Jiang, H., Dong, D., Sun, B. Dihydroartemisinin Enhances Apo2L/TRAIL-Mediated Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells via ROS-Mediated Up-Regulation of Death Receptor 5. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e37222
- [100] Deng, C., Tao, R., Yu, S. Z., Jin, H. Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K/Akt-dependent manner. *Mol Med Rep.* 2012; 5: 847-851

- [101] Leoncini, E., Malaguti, M., Angeloni, C., Motori, E., Fabbri, D., Hrelia, S. Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci.* 2011; 76: H175-181
- [102] Mürköster, S., Arlt A., Sipos, B., Witt, M., Großmann, M., Klöppel, G., Kalthoff, H., Fölsch, U. R., Schäfer, H. Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit bTRCP1 relates to constitutive NF- κ B activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 1316-1324
- [103] Arlt A, Schäfer H, Kalthoff H. The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF- κ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis.* 2012; 1: e35
- [104] Rushworth, S.A., Zaitseva, L., Murray, M. Y., Shah, N. M., Bowles, K. M., MacEwan, D. J. The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF κ B and underlies its chemo-resistance. *Blood* 2012; 120: 5188-5198
- [105] Kim, J., Cha, Y. N, Surh, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res.* 2010; 690: 12-23
- [106] Wu, M. X., Ustyugova, I. V., Han, L., Akilov, O. E. (2013) Immediate early response gene X-1, a potential prognostic biomarker in cancers. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17: 593-606
- [107] Ustyugova, I. V., Zhi, L., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Wu, M. X. IEX-1 deficiency protects against colonic cancer. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(6): 760-767
- [108] Zhang, Y., Schlossman, S. F., Edwards, R. A., Ou, C. N., Gu, J., Wu, M. X. Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99: 878-883

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Molekulare Mechanismen der funktionellen Interferenz des Immediate Early Response-3 Gens mit dem Transkriptionsfaktor Nuclear factor erythroid 2-related factor-2“ abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meines Doktorvaters und der Betreuung im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Ich versichere, dass in dieser Arbeit keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel in der jeweils gültigen Fassung war mir dabei bekannt und die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden eingehalten.

Weiterhin bestätige ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Delmenhorst, den 20. Oktober 2015

Imke Stachel, Verfasserin

