

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung  
(Direktorin: Prof. Dr. Susanne Sebens)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2)  
mit TGF- $\beta$ 1 sowie deren Einfluss auf malignitätsassoziierte Eigenschaften  
in Pankreasgangepithelzellen**

**INAUGURALDISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Marcus Kruppa**

aus Hannover

Kiel, 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.06.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Teile der Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Genrich G\*, **Kruppa M\***, Lenk L, Helm O, Broich A, Freitag-Wolf S, Röcken C, Sipos B, Schäfer H, Sebens S (2016), *The anti-oxidative transcription factor Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) counteracts TGF- $\beta$ 1 mediated growth inhibition of pancreatic ductal epithelial cells - Nrf2 as determinant of pro-tumorigenic functions of TGF- $\beta$ 1*, BMC Cancer, 2016 Feb 25;16(1): 155. DOI: 10.1186/s12885-016-2191-7. \*geteilte Erstautorenschaft

Genrich G, Broich A, Helm O, **Kruppa M**, Reiling N, Schäfer H, Sebens S (2014), *Einfluss von pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen auf die Nrf2-Expression und Proliferation von Pankreasgangepithelzellen*, Z Gastroenterol 2014; 52 - KG168. DOI: 10.1055/s-0034-1386190.

**Kruppa M**, Arfmann-Knübel S, Simon R, Sauter G, Izbicki IR, Schäfer H, Sebens S (2014), *The anti-oxidative transcription factor Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) counteracts the effect of TGF- $\beta$ 1 on proliferation in pancreatic ductal epithelial cells – a pro-tumorigenic function of Nrf2?* Oncol Res Treat 37(suppl1): 127

Arfmann-Knübel S, **Kruppa M**, Großmann M, Lenk L, Helm O, Sebens S, Schäfer H (2013), *Einfluss des anti-oxidativen Transkriptionsfaktors Nuclear factor E2 related factor-2 (Nrf2) auf die Migration und EMT von benignen und malignen Pankreasgangepithelzellen*, Z Gastroenterol 2013; 51 - K48. DOI: 10.1055/s-0033-1352688.

## INHALT

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren .....	1
1.1.2	Therapie und Herausforderungen .....	2
1.1.3	Pathogenese und <i>K-ras</i> -Mutation .....	3
1.2	<b>Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)</b> .....	<b>5</b>
1.2.1	Eigenschaften epithelialer und mesenchymaler Zellen .....	5
1.2.2	Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) .....	6
1.2.3	Rolle der EMT in der Karzinogenese .....	8
1.2.4	<i>Transforming Growth Factor-beta1</i> (TGF- $\beta$ 1) .....	8
1.3	<b>Oxidativer Stress und <i>Nuclear factor E2-related factor 2</i> (Nrf2)</b> .....	<b>10</b>
1.3.1	Oxidativer Stress .....	10
1.3.2	<i>Nuclear factor E2-related factor 2</i> (Nrf2) .....	10
1.3.3	Nrf2 in der inflammatorischen Karzinogenese .....	12
1.4	<b>Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>15</b>
2.1	<b>Geräte</b> .....	<b>15</b>
2.1.1	Sterilbänke und Zubehör .....	15
2.1.2	Pipetten .....	15
2.1.3	Inkubationsgeräte .....	15
2.1.4	Zentrifugen .....	16
2.1.5	Mikroskope .....	16
2.1.6	Wägeinstrumente .....	16
2.1.7	Messgeräte .....	16
2.1.8	Mischer .....	16
2.1.9	Westernblot-Analyse .....	17
2.1.10	Kühlschränke .....	17
2.2	<b>Computerprogramme</b> .....	<b>17</b>
2.3	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>17</b>

<b>2.4 Chemikalien</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5 Rezepturen</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6 Kits</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7 Antikörper</b> .....	<b>22</b>
<b>2.8 Primer</b> .....	<b>23</b>
<b>2.9 siRNAs</b> .....	<b>23</b>
<b>2.10 Plasmide</b> .....	<b>23</b>
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Zellkulturmethoden und Viabilitätsbestimmungen</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 Zelllinien .....	24
3.1.2 Kultivierung .....	25
3.1.3 Mikroskopische Analyse .....	26
3.1.4 Zellzahlbestimmung .....	26
3.1.5 MTS-Assay .....	27
3.1.6 Ki-67-Färbung .....	27
<b>3.2 Transfektion</b> .....	<b>28</b>
3.2.1 Transfektion mit siRNA.....	28
3.2.2 Transfektion mit Plasmiden .....	28
<b>3.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten .....	29
3.3.2 Bestimmung des Proteingehalts .....	29
3.3.3 Herstellung von Kernextrakten .....	30
3.3.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese .....	30
3.3.5 Westernblot.....	31
<b>3.4 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.4.1 RNA-Isolierung.....	32
3.4.2 Herstellung von cDNA .....	33
3.4.3 Realtime PCR .....	33
<b>3.5 Apoptoseassay</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6 Invasionsassay mit modifizierter Boyden-Kammer</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7 Statistik</b> .....	<b>36</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Nrf2 auf Wachstum, Proliferation und Apoptoseverhalten von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen</b> .....	<b>37</b>
4.1.1	tBHQ führt in HPDE Zellen zu einem verminderten Zellwachstum .....	37
4.1.2	tBHQ führt zu einer verminderten Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	38
4.1.3	tBHQ führt zu einer verminderten Apoptoserate in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	39
4.1.4	Nrf2 führt in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu einem erhöhten Zellwachstum und antagonisiert den wachstumsinhibitorischen Effekt von TGF- $\beta$ 1.....	40
4.1.5	Nrf2 erhöht die Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	43
4.1.6	Nrf2 steigert die Zellproliferation von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	45
4.1.7	Nrf2 vermindert den Anteil apoptotischer HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	49
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Nrf2 auf EMT-assoziierte Veränderungen und Invasionsvermögen von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen</b> .....	<b>52</b>
4.2.1	TGF- $\beta$ 1- und tBHQ-Stimulation führen in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu einem aufgelockerten Zellrasen mit spindelförmigen Zellen .....	52
4.2.2	TGF- $\beta$ 1 moduliert die Expression von EMT-Markern in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mehr als tBHQ.....	53
4.2.3	Nrf2 hat keinen Einfluss auf die Morphologie von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen .....	56
4.2.4	Nrf2 beeinflusst die Expression von EMT-Markern auf transkriptioneller Ebene nur gering .....	59
4.2.5	Der Effekt von Nrf2 auf die EMT-Markerepression ist auch auf Proteinebene gering.....	62
4.2.6	TGF- $\beta$ 1 und tBHQ steigern nur in HPDE-pBp Zellen, nicht aber in HPDE-kras Zellen die Invasionsfähigkeit .....	65
4.2.7	Die Zellinvasion von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen erfolgt Nrf2-unabhängig	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Wechselwirkung von TGF-<math>\beta</math>1, Nrf2 und K-<i>ras</i> und dessen Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Apoptoserate in HPDE Zellen</b> .....	<b>70</b>
<b>5.2</b>	<b>Die TGF-<math>\beta</math>1-vermittelte EMT in HPDE Zellen wird durch Nrf2 nicht beeinflusst</b> .....	<b>74</b>

<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>84</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>96</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>98</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)

#### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Obwohl das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) mit einer steigenden Inzidenz von etwa 15/100.000 Einwohnern in Deutschland die dritthäufigste bösartige Tumorerkrankung des Verdauungstraktes darstellt und mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 8 % die schlechteste aller Karzinome besitzt, hat sich, trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen und zahlreichem Erkenntnisgewinn auf zellulärer Ebene, die Überlebensrate in den letzten 20 Jahren kaum verändert [1-3]. Dies zeigt die noch immer bestehende Machtlosigkeit und Notwendigkeit der intensiven Erforschung dieser hochmalignen Erkrankung.

Trotz des geringen Lebenszeitriskos von 1,6 % stellt das PDAC die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache dar. Da die Krankheit zum Diagnosezeitpunkt in der Regel schon weit fortgeschritten ist und daher für 80 % der Patienten nur noch ein palliativer Eingriff in Frage kommt, ist die Zahl der Neuerkrankungen der Sterberate immer noch nahezu gleichzusetzen [3, 4]. Die Ursache dafür liegt in der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung und in der späten Manifestation klinischer Symptome, welche darüber hinaus recht unspezifisch sind und meist zu einer späten Diagnosestellung führen. Dazu gehören Beschwerden, die denen einer differentialdiagnostisch auszuschließenden chronischen Pankreatitis (CP) sehr ähnlich sind, wie unspezifische Oberbauchschmerzen, Appetit- und Gewichtsverlust, Übelkeit und Rückenschmerzen. Ein schmerzloser Ikterus wird bei einem Großteil der Patienten allerdings erst im Spätstadium manifest [5]. Der langjährige aktive und passive Konsum von Tabakwaren gilt als einer der gesicherten Risikofaktoren und ist ursächlich für ca. 30 % der PDAC-Erkrankungen [5, 6]. Patienten mit einer langandauernden CP haben ein 17-fach erhöhtes Risiko, an einem PDAC zu erkranken [7, 8]. Ferner steigt das Erkrankungsrisiko mit erhöhtem Lebensalter (durchschnittliches Erkrankungsalter: 71 Jahre bei Männern, 75 Jahre bei Frauen), hohem Alkoholkonsum, erhöhter Kalorienzufuhr bei einer Adipositas mit einem *Body-Mass-Index*  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ , bei manifestem Diabetes mellitus Typ II, familiärer Prädisposition und zystischen Neoplasien des Pankreas [5, 9]. Zu den wenigen protektiven Faktoren scheinen der regelmäßige Konsum Vitamin C-reicher Kost in Form von Früchten und Gemüse und der Verzicht auf Alkohol zu zählen [4, 10, 11].

### 1.1.2 Therapie und Herausforderungen

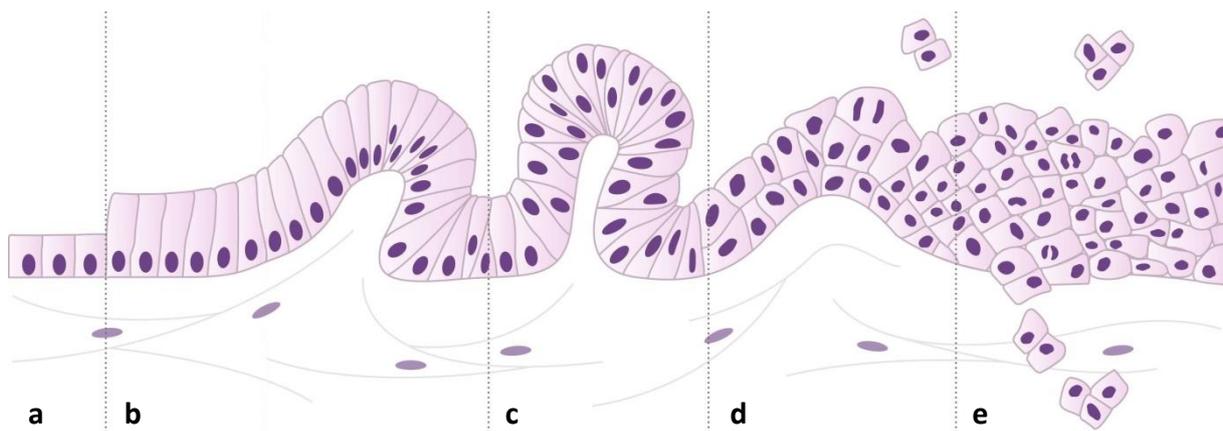
Wie bereits erwähnt besitzt das PDAC eine äußerst schlechte Prognose. Weniger als 20 % der Patienten kommen für die einzige potentiell kurative Therapie, die R0-Resektion, also eine operative Entfernung der Raumforderung im Gesunden, in Frage, da zum Diagnosezeitpunkt in der Regel schon Fernmetastasen vorhanden sind [12]. Voraussetzung für eine solche R0-Resektion ist die Tumorlokalisation im Pankreaskopf, welche klinisch in Form eines schmerzlosen Ikterus auffallen kann. Bereits vorhandene Metastasen und Gefäßeinbrüche stellen hingegen Kontraindikationen dar. Als Operationsverfahren kommen die totale Pankreatektomie, Pankreatikoduodenektomie oder die „Kausch-Whipple-Operation“ in Frage, wobei die Eingriffe durch die posteriore Lage und die enge Nachbarschaft der Bauchspeicheldrüse zu wichtigen anatomischen Strukturen wie Zwölffingerdarm, extrahepatischen Gallengängen, Arteria mesenterica superior und Pfortader zusätzlich erschwert werden [1]. Die „kurativen“ Therapieverfahren resultieren aufgrund der dennoch hohen Rezidivrate in einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 10 %, welche aber im Vergleich zum mittleren Überleben von 6 Monaten bei palliativer Therapie bereits ein deutlicher Zeitgewinn ist. Die palliative Therapie erfolgt symptomorientiert, wobei die Erhaltung der Kontinuität oder Umleitung der Gallenwege und Magendarmpassage im Vordergrund stehen [6].

Ein etwas besseres Langzeitüberleben konnte durch adjuvante oder neoadjuvante Chemo- oder Strahlentherapie erzielt werden und ist daher Bestandteil der S3-Leitlinie zur Therapie des PDAC [11]. Darüber hinaus ist das desmoplastische Stroma an der Vermittlung der geringen Chemosensitivität des PDAC ursächlich maßgeblich beteiligt, die unter anderem gegeben sein kann durch die räumliche Isolation des Primarius einerseits oder durch die erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) andererseits [13, 14]. Trotz der geringen Chemosensitivität wird die postoperative Verabreichung von Gemcitabin oder 5-Fluoruracil/Folinsäure empfohlen [11]. In der palliativen Situation erwies sich neben der Kombination von Gemcitabin und Erlotinib jüngst auch die Kombination von 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) und die Kombination von Gemcitabin und Paclitaxel als gering lebenszeitverlängernd [15, 16]. Eine Indikation zur Strahlentherapie besteht beim PDAC weiterhin nicht.

### 1.1.3 Pathogenese und K-ras-Mutation

Der überwiegende Teil der malignen Raumforderungen des Pankreas hat seinen Ursprung im exokrinen Drüsengewebe. Dazu gehören das intraduktales papillär-muzinöses Karzinom, das Azinuszellkarzinom, das muzinöse Zystadenokarzinom und das PDAC, welches mit 90 % den mit Abstand häufigsten Vertreter dieser Gruppe darstellt [1].

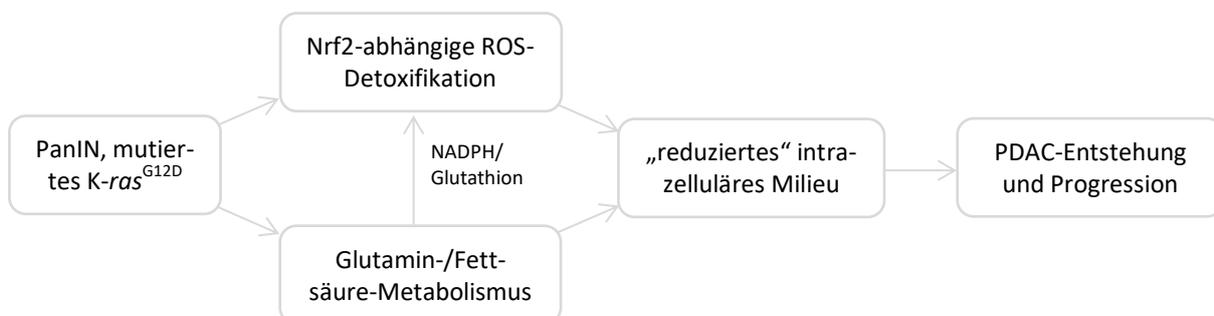
Als am besten charakterisierte und wichtigste Vorläuferläsionen des PDAC gelten die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN-1 bis -3), welche typische dysplastische histopathologische Merkmale aufweisen. Während PanIN-1-Läsionen (**Abbildung 1 b**) nur ein geringes Risiko der malignen Entartung bergen und ab dem 40. Lebensjahr in einem Großteil der Bevölkerung nachweisbar sind, gelten PanIN-2-Läsionen (**Abbildung 1 c**) als Startpunkt progressiver neoplastischer Veränderungen, welche über die PanIN-3-Läsion (**Abbildung 1 d**, auch als *Carcinoma in situ* bezeichnet) letztlich zum invasiven Karzinom führen (**Abbildung 1 e**) [17]. Weitere neoplastische Vorläuferläsionen des Pankreas sind die intraduktal-papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN), die muzinös-zystische Neoplasie (MZN) und die atypisch flachen Läsionen (AFL) [18].



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der histopathologischen Veränderungen auf dem Weg der Karzinogenese des PDAC. Zunehmender Dysplasiegrad von (a) nach (e). (a) Normales gesundes Pankreasepithel, (b) PanIN-1 a und b, (c) PanIN-2, (d) PanIN-3 bzw. *Carcinoma in situ*, (e) Karzinom. Modifiziert nach [19].

Mit steigendem Dysplasiegrad steigt auch die Häufigkeit typischer genetischer Mutationen, die zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen. Mit einer Häufigkeit von über 85 % gilt die aktivierende Punktmutation im Protoonkogen K-ras als wichtigstes molekularbiologisches Ereignis in frühen Stadien, wie dem PanIN-1-Stadium des humanen PDAC [6]. Das K-ras-Protein ist eine GTPase, welche als zentrales Regulatorprotein fungiert und Einfluss auf

Wachstum und Differenzierung von Zellen ausübt. In dem im PDAC mutierten *K-ras*-Gen ist zu 98 % das Codon G12 durch eine Punktmutation betroffen (*K-ras*<sup>G12D</sup>). Die GTPase ist dadurch kontinuierlich aktiv und setzt Signalwege in Gang, die denen einer Entzündung oder Fibrose ähnlich sind und in PanIN-Läsionen zur spontanen Entartung führen können [20]. Ferner wurde im Mausmodell gezeigt, dass mutiertes *K-ras*<sup>G12D</sup> zur Hochregulation von Antioxidantien führt (u.a. über *Nuclear factor E2-related factor 2* [Nrf2], siehe 1.3.2), welche für die Detoxifikation von *Reactive Oxygen Species* (ROS, siehe 1.3.1) zuständig sind. Anhand des durch *K-ras* induzierten Glutamin- und Fettsäuremetabolismus werden Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und reduziertes Glutathion bereitgestellt, welche für die ROS-Detoxifikation essentiell sind. Der verminderte ROS-Spiegel und der modifizierte Metabolismus führen zu einem „reduzierten“ intrazellulären Milieu, was einen wichtigen Schritt in der pankreatischen Karzinogenese darstellt. Niedrige ROS-Level können so zur onkogenen *K-ras*-vermittelten PDAC-Entstehung beitragen (**Abbildung 2**) [21]. Zudem trägt eine manifeste Mutation im *K-ras*-Gen zur Vermittlung von Invasivität und Metastasierung bei [22].



**Abbildung 2.** Beitrag der *K-ras*<sup>G12D</sup>-Mutation zur pankreatischen Karzinogenese. Mutiertes *K-ras*<sup>G12D</sup> in PanIN-Läsionen aktiviert die Nrf2-abhängige ROS-Detoxifikation, welche auf das Vorhandensein von reduziertem Glutathion angewiesen ist. Dies wird ebenfalls durch mutiertes *K-ras*<sup>G12D</sup> anhand der Bereitstellung von NADPH via Verstoffwechslung von Glutamin oder Fettsäuren generiert. Durch niedrige ROS-Level wird ein „reduziertes“ intrazelluläres Milieu hergestellt, welches den malignen Entartungsprozess begünstigt. Modifiziert nach [21].

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass *K-ras*-Mutationen unter anderem durch die persistente Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade in der Initiation, Aufrechterhaltung und Metastasierung des PDAC eine entscheidende Rolle spielen [23, 24]. Daher ist die Mutation häufig Zielstruktur neuer Therapieversuche in der Behandlung des PDAC. Aufgrund der zellulären Heterogenität des humanen PDAC ist die im Mausmodell beobachtete *K-ras*-Abhängigkeit jedoch nicht ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragbar [25, 26].

Zusätzlich kommen im weiteren Verlauf der Krankheit häufig Mutationen in Tumorsuppressorgenen hinzu, wie z.B. p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A), Smad4 und p53 sowie eine erhöhte Aktivität des ubiquitären Transkriptionsfaktors NF-κB [27]. Letzterer ist im PDAC konstitutiv aktiv und ist an der Erlangung der Chemoresistenz und der Fähigkeit zur Metastasierung und Angiogenese maßgeblich beteiligt [14, 28].

PDAC-Zellen lösen typischerweise eine Umstrukturierung des umliegenden Bindegewebes, die sogenannte desmoplastische Stromareaktion, aus. Durch autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren (u. a. *Transforming Growth Factor-beta1* [TGF-β1], siehe 1.2.4) kommt es zur starken Vermehrung von Fibroblasten und Myofibroblasten. Die von ihnen intensiv produzierte extrazelluläre Matrix (Kollagen-I und -III, Fibronectin), die Ansammlung von Lymphozyten, Makrophagen, Stammzellen und Nervenfasern führen letztlich dazu, dass das nicht-neoplastische desmoplastische Stroma größer ist als der eigentliche Anteil an Tumorzellen [13, 29]. Diesem entzündlichen Tumorbett, welches in ähnlicher Weise auch in den präkanzerösen PanIN-Läsionen zu finden ist, wurde ein entscheidender Beitrag zur Proliferation, Invasion, Metastasierung, Angiogenese und Chemoresistenz von PDAC-Zellen zugewiesen [30, 31].

## 1.2 Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

### 1.2.1 Eigenschaften epithelialer und mesenchymaler Zellen

Epithelien sind grenzbildende Gewebe, die zusammen mit der bindegewebigen *Lamina propria* die Mukosa bilden. Sie bedecken alle Körperoberflächen und kleiden die Hohlräume und Drüsen des Körpers aus, indem sie einen flächigen Zellverbund hochdifferenzierter, polar gebauter Zellen formen, die die gewebespezifischen Aufgaben erfüllen [32]. Typisches Charakteristikum sind die ausgeprägten Zell-Zell-Kontakte, die den sogenannten Schlussleistenkomplex bilden. Dazu gehören die Adhärenskontakte, *Tight Junctions*, *Gap Junctions* und Desmosomen [33, 34]. Die sich dadurch ergebende Barriere gegenüber mechanischen Reizen und Diffusion stellt einen wesentlichen Schutzmechanismus des Körpers vor äußeren Umwelteinflüssen dar. Die durch die *Tight Junctions* gebildete *Zonula occludens* verleiht Epithelzellen ihre typische Zellpolarität. Über den basolateralen Pol wird die Verankerung auf der extrazellulären Basalmembran sichergestellt und die extrazelluläre Matrix sezerniert. Auf der gegenüberliegenden Seite bildet der apikale Zellpol die Abgrenzung gegen das äußere

re Milieu. Er ist ggf. für die Sekretion von Drüsenprodukten verantwortlich und/oder besitzt spezielle Differenzierungen wie Mikrovilli [35, 36]. Das membranständige E-Cadherin ist als Bestandteil der Adhärenskontakte und Desmosomen der wichtigste epitheliale Proteinmarker. Über Catenine fungiert es als Verbindungsstück zum intrazellulären Aktin-Zytoskelett. Die Verbindung zu benachbarten Zellen wird über Immunglobuline hergestellt. Darüber hinaus sind die Biomarker Occludin, Claudin und Zytokeratine typischerweise mit dem epithelialen Phänotyp assoziiert [37].

Mesenchymale Zellen hingegen sind weitaus weniger differenziert, haben eher eine unterstützende Funktion für das restliche Gewebe und sind als Zellen des embryonalen Keimblatts ontogenetischer Ursprung einer ganzen Reihe hochdifferenzierter Zellen [32, 35]. Sie zeigen sich unter Kulturbedingungen als vornehmlich spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellen, welche einzeln liegen und lediglich fokale Zell-Zell-Kontakte in Form von *Gap Junctions* aufbauen [38]. Eine apikal-basolaterale Polarität und Kontakt zur Basalmembran bestehen nicht. Unter anderem dadurch besitzen sie eine hohe Motilität und Plastizität [39]. Als wichtige mesenchymale Marker gelten das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin, Fibronectin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) und N-Cadherin [40].

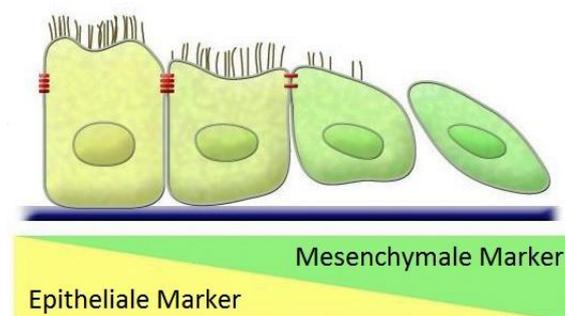
### **1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET)**

Die Tatsachen, dass Zellen im menschlichen Körper viele unterschiedliche Differenzierungen aufweisen und alle Zellen von nur einer befruchteten Eizelle abstammen, machen Vorgänge notwendig, die Zellen einen Wechsel zwischen verschiedenen Differenzierungsstufen ermöglichen [41]. Im Jahre 1982 wurde erstmals die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) beschrieben, ein wichtiger Erklärungsansatz, wie Zellen die Plastizität erlangen, einen epithelialen Phänotyp zugunsten mesenchymaler Eigenschaften aufzugeben. Es wurde herausgefunden, dass dieser Prozess nicht nur während der Gastrulation in der Embryogenese stattfindet, sondern auch in adulten Zellen im Rahmen der Wundheilung, Organfibrose, Karzinogenese und Metastasierung induzierbar ist [32, 36].

Die Auslöser dieses Prozesses sind sehr vielfältig. Beispielhaft zu nennen sind Komponenten der extrazellulären Matrix wie pankreatische Myofibroblasten (PMF), Kollagen oder Hyaluronsäure, Wachstumsfaktoren wie die Mitglieder der TGF-Superfamilie (u.a. auch TGF- $\beta$ 1)

sowie Hypoxie und oxidativer Stress. Bei der EMT kommt es über intrazelluläre Signalkaskaden, beispielsweise über die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, SIP1, ZEB2 und Twist, zu den im Folgenden beschriebenen Veränderungen [39, 40, 42-44].

Der Verlust von E-Cadherin ist eines der prägnantesten frühen Anzeichen für den Ablauf der EMT.  $\beta$ -Catenin, als dessen intrazelluläre Domäne, transloziert in den Zellkern, wo es EMT-aktivierende Transkriptionsfaktoren induziert. Dies führt, zusammen mit der Aktivierung von membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an der Zellmembran, zur Stabilisierung des mesenchymalen Zustandes, welcher von einem Anstieg mesenchymaler Marker begleitet ist (siehe 1.2.1). Ein weiteres bedeutendes EMT-assoziiertes Protein ist das Adhäsionsmolekül L1CAM (CD171), dem eine PMF- und TGF $\beta$ -1-abhängige Aktivierung in Pankreasgangepithelzellen und ein bedeutender Beitrag zur Initiation, Metastasierung und Chemoresistenz des PDAC nachgewiesen wurde [45, 46]. Morphologisch kommt es im Folgenden zur Herauslösung der veränderten Zellen aus dem Zellverband und zum Verlust von Differenzierungsmerkmalen, der Zellpolarität und des Kontaktes zur Basalmembran (**Abbildung 3**). Darüber hinaus erlangen Zellen im Zuge der Transition mesenchymale Eigenschaften, wie gesteigerte Motilität, Invasivität und Apoptose- bzw. Chemoresistenz.



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen während der EMT. Die Erlangung des mesenchymalen Phänotyps ist gekennzeichnet durch den Verlust von Differenzierungsmerkmalen (Mikrovilli), Zell-Zell-Kontakten, Zellpolarität und Kontakt zur Basalmembran. Damit einher geht der Verlust epithelialer Marker zugunsten der Expression typischer mesenchymaler Marker wie z.B. Vimentin, Fibronectin,  $\alpha$ -SMA und N-Cadherin. Modifiziert nach [32].

Nach der räumlichen Dissemination verschmelzen und repolarisieren die mesenchymalen Zellen erneut, um sekundäres Epithel auszubilden. Dieser Vorgang, bei dem die Zellen wieder ihre ursprünglichen differenzierten Merkmale erlangen, ist das Gegenstück zur EMT, die sogenannte Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET). Sie macht die Reversibilität der EMT deutlich und spielt ebenso eine wichtige Rolle in der Embryogenese. Ihr Beitrag zur Karzino-

genese bei der Metastasenausbildung ist wahrscheinlich, aber noch unzureichend beschrieben [40, 41].

### 1.2.3 Rolle der EMT in der Karzinogenese

In Anbetracht der inflammatorischen Karzinogenese ist die EMT an den zwei wichtigsten Prozessen, die für die krebsassoziierte Mortalität verantwortlich sind, maßgeblich beteiligt: Die erhöhte Motilität und Invasivität mesenchymaler Zellen führt zur metastatischen Dissemination, welche letztlich nach Progression zum Organversagen führen kann; daneben ist die Apoptoseresistenz mit der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika ein Grund der gesteigerten Therapieresistenz der malignen Erkrankung [47]. Aus diesem Grund gehen Tumore, die eine EMT durchlaufen haben, in der Regel mit einem kürzeren metastasefreien Intervall und einem schlechteren klinischen *Outcome* einher [40]. In der Karzinogenese des PDAC ist die EMT daher eine plausible Erklärung für die frühe metastatische Absiedlung und die ausgeprägte Chemoresistenz. Dies unterstützend konnten die EMT-assoziierten Proteine L1CAM und  $\beta$ -Catenin nicht nur in PDAC-Zellen, sondern auch schon in Vorläuferläsionen nachgewiesen werden [48, 49]. Neben dem PDAC wurde die EMT auch in anderen Tumoren, unter anderem des Gastrointestinaltraktes, beschrieben, wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom oder dem Magenkarzinom [43]. Die oben genannten EMT-Regulatoren gelten als vielversprechende therapeutische Angriffspunkte im Kampf gegen den Krebs. Probleme, die sich dabei ergeben, sind jedoch die Ähnlichkeit mesenchymaler Zellen zu Stammzellen und die Reversibilität der EMT sowie die damit verbundene lange Dauer der Therapie [40].

### 1.2.4 *Transforming Growth Factor-beta1* (TGF- $\beta$ 1)

Dem zur Gruppe der *Transforming Growth Factors* (TGF) gehörenden TGF-*beta1* (TGF- $\beta$ 1) kommt neben seiner zentralen Rolle während der Embryogenese eine bedeutende Rolle in der Biologie adulter Zellen zu. Seine stark anti-proliferative Wirkung auf expandierende epitheliale und neuronale Gewebe ist essentiell für deren Homöostase und verhindert eine unkontrollierte regenerative Zellproliferation, etwa nach Verletzungen oder Entzündungen. Zusätzlich hat der ubiquitär produzierte Botenstoff Einfluss auf die Zelldifferenzierung, die Immunregulation und die Mikroumgebung aller Zellen des Körpers. Seine Wirkung ist dabei immer zelltyp- und kontextabhängig [50, 51]. Im gesunden Gewebe hat TGF- $\beta$ 1 daher eine

tumorsuppressive Wirkung, welche vor einer malignen Entartung überwunden werden muss. Ist dieser Schritt einmal geschehen, so kehrt sich die einst anti-tumorigene Wirkung um und der maligne Prozess wird TGF- $\beta$ 1-abhängig vorangetrieben [52].

Wie auch seine beiden Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 liegt das kurze Polypeptid TGF- $\beta$ 1 als Homodimer vor und bewirkt nach seiner Aktivierung die Homodimerisierung zweier Rezeptoren und der damit verbundenen Serin/Threonin-Kinasen (Typ I- und Typ II-TGF- $\beta$ -Rezeptoren). Im Folgenden kommt es nach deren Phosphorylierung zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, bei denen die phosphorylierten Proteine Smad2/3, entweder Smad4-abhängig oder -unabhängig, die Transkription verschiedener Gene wie z.B. Vimentin im Zellkern induzieren. Zusätzlich kann TGF- $\beta$ 1 über die Aktivierung des *Mitogen-Activated Protein-Kinase-Weges* (MAP-Kinase-Weg, z.B. über p38, ERK, JNK) auch Smad-unabhängige Wirkungen entfalten. Die im Rahmen dieser Signalkaskaden aktivierten *Downstream*-Effektoren induzieren wiederum die Transkription weiterer Gene, wodurch ein TGF- $\beta$ 1-Stimulus mehrere hundert Zielgene gleichzeitig erreichen kann [53].

Durch mutagene Inaktivierung eines dieser *Downstream*-Effektoren oder eines Rezeptors können die tumorsuppressiven Effekte des TGF- $\beta$ 1 umgangen werden und die verbleibenden Effekte des Zytokins anschließend zum Vorteil des Tumors genutzt werden. Die vorherige Unterdrückung der prä-malignen Progression des TGF- $\beta$ 1 wendet sich folglich in der späten Phase der Karzinogenese grundlegend, weshalb das Polypeptid auch als „zweischneidiges Schwert“ der Karzinogenese bezeichnet wird [54].

Deutlich wird dies am Beispiel des mutierten *K-ras*-Gens, welches die Aktivität von Smad2/3 negativ beeinflusst und damit letztlich den Smad-abhängigen Weg des TGF- $\beta$ 1 unterdrückt [55]. Darüber hinaus gelten die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie als die am besten charakterisierten Induktoren der EMT [40]. Besonders das vom Tumorstroma sezernierte TGF- $\beta$ 1 wirkt auf die Zellen an der Tumorfront und resultiert in einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und einer erhöhten Motilität [51]. Da dies während der inflammatorischen Karzinogenese des PDAC eine entscheidende Rolle spielt, liegt ein besonderer Fokus dieser Arbeit auf diesem Wachstumsfaktor. Alterationen im TGF- $\beta$ 1-Signalweg resultieren somit auch im Rahmen der Entstehung des PDAC in einer Dysregulation der tumorsuppressiven Effekte und im Folgenden in einem gesteigerten Tumorwachstum, der Erlangung der Invasionsfähigkeit, der Freisetzung autokriner Mitogene, der Umgehung des endogenen Immunsystems und der Dissemination und damit verbundenen Metastasierung bösartigen Gewebes [51, 56].

### 1.3 Oxidativer Stress und *Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)*

#### 1.3.1 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) sind reaktionsfreudige, für den Organismus toxische Derivate des Sauerstoffs, die durch dessen Reduktion etwa bei der Mikrobenabwehr durch Makrophagen oder ubiquitär als Nebenprodukt der Atmungskette anfallen. Beispiele sind die radikalischen Hyperoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $OH\cdot$ ), welche über ein ungepaartes Elektron verfügen, oder die nicht-radikalischen Verbindungen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Ozon ( $O_3$ ). Obwohl sie wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität erfüllen, bergen sie auch, vor allem in hohen Konzentrationen, ein hohes pathophysiologisches Potential und leisten einen Beitrag zu verschiedensten Erkrankungen sowie Alterungsprozessen des Körpers. Alle organischen Makromoleküle (z.B. Lipide, Proteine, DNA) können Ziel von ROS-vermittelten Oxidationsreaktionen werden und somit den Erhalt der Zellfunktionen gefährden [21, 57].

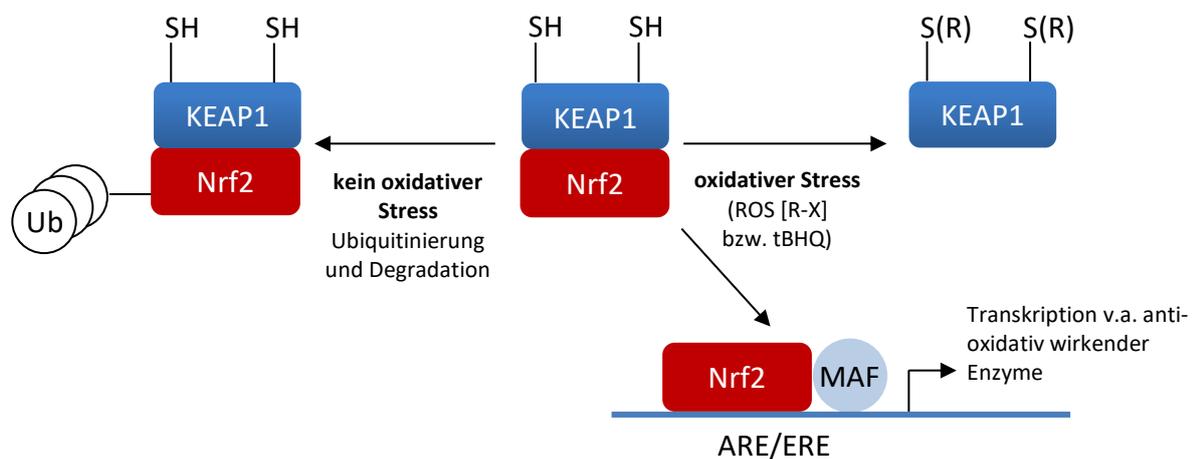
#### 1.3.2 *Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)*

Die zelluläre Abwehr von ROS mittels Antioxidantien, die durch konjugative Reaktionen die Detoxifikation und Elimination derer bewirken, wird über ein komplexes feinabgestimmtes Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden reguliert. Elementarer regulatorischer Bestandteil dieses Netzwerks ist der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)*. Dieser bindet im aktiven Zustand an sog. *Antioxidant Response Elements (ARE)* und *Electrophile Response Elements (ERE)*, welche Bestandteil der regulatorischen Regionen von antioxidativen und detoxifizierenden Genen sind, welche im Folgenden hochreguliert werden [58, 59]. Nrf2 gehört zur Familie der *Cap'n Collar Basic Region Leucine Zipper-Transkriptionsfaktoren (bZIP)* und reguliert sowohl die konstitutive als auch die durch oxidativen Stress induzierte Expression von mehr als hundert verschiedenen Antioxidantien (z.B. NADPH-Quinon Oxidoreduktase 1 [NQO1], Hämoxygenase-1 [HO-1] und *Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit [GCLC]*) [60]. Gleichzeitig unterliegen eine Reihe von Phase II-Enzymen, die für die anschließende Konjugation mit wasserlöslichen Molekülen und damit für die Elimination verantwortlich sind, der Regulation durch Nrf2 [61].

Nrf2 transloziert nach seiner Transkription und posttranslationalen Modifikation in den Zellkern, wo es nach Heterodimerisierung mit anderen bZIPs (c-JUN oder *Musculo-Aponeurotic-*

*Fibrosarcoma* [MAF]) seine Rolle als Transkriptionsfaktor ausführt [57]. Die kurze Halbwertszeit von 15 Minuten ergibt sich aus der Interaktion mit seinem zytoplasmatischen Inhibitor *Kelch Like-ECH-Associated Protein 1* (KEAP1), welcher unter normalen, nicht-gestressten Bedingungen in das nukleäre Kompartiment wechselt und mit Nrf2 einen Komplex über dessen Neh1-Domäne bildet. Die anschließende Polyubiquitinierung von Nrf2 durch Cullin 3 / RING box protein 1 (Rbx 1) findet nach der erneuten Translokation ins Zytoplasma statt und resultiert in dessen proteasomalen Degradation. Dadurch wird eine unkontrollierte Akkumulation und überschießende Wirkung von Nrf2 verhindert (**Abbildung 4 links**) [58].

Steht die Zelle unter oxidativem, metabolischem oder xenobiotischem Stress, so kommt es zur Modifikation von KEAP1 durch die anwesenden ROS. Seine an die Cysteine 251, 273 und 288 gebundenen Thiolgruppen werden dadurch redoxabhängig modifiziert, sodass es zur Dissoziation des Nrf2-KEAP1-Komplexes kommt. Die zytoplasmatische Translokation und proteasomale Degradation bleiben aus und Nrf2 kann seine oben beschriebene Funktion im Zellkern erfüllen (**Abbildung 4 rechts**) [57, 58, 62].



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung der Regulation von Nrf2 durch KEAP1. Unter Normalbedingungen kommt es nach Nrf2-KEAP1-Komplexbildung zur Polyubiquitinierung (Ub) und proteasomalen Degradation (linke Seite). Bei oxidativem Stress (ROS) oder Anwesenheit von tBHQ werden die Thiolgruppen von KEAP1 redoxabhängig modifiziert (-S(R)) und der Komplex zerfällt. Nrf2 initiiert nach Heterodimerisierung mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren (hier exemplarisch MAF) die Transkription u.a. von Antioxidantien im Zellkern (rechte Seite). Modifiziert nach [63].

Ein etablierter und auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Nrf2-Aktivator ist das tertiäre Butylhydroquinon (tBHQ). Es nutzt das beschriebene Phänomen der Nrf2-KEAP1-Interaktion über Modifikation der Thiolgruppen an den Cysteinen 273 und 288 des KEAP1 aus. Im Fol-

genden unterbleibt die Ubiquitinierung und es kommt zur zellulären Anreicherung von Nrf2 [64].

Durch die Abwehr potentiell kanzerogener Ereignisse wird Nrf2 als Tumorsuppressor gesehen, welcher die Karzinogenese in frühen Stadien verhindern kann. Aufgrund dessen ist Nrf2 eine vielversprechende Zielstruktur in der Chemoprävention von malignen und chronisch degenerativen Erkrankungen [65]. Nrf2 stellt also die Anpassung gesunden Epithels an chronischen Stress dar und hat in diesem Zusammenhang durchaus positive Funktionen inne.

### 1.3.3 Nrf2 in der inflammatorischen Karzinogenese

Überraschenderweise wurde in vielen Krebsentitäten, so auch dem PDAC, ein entscheidender Beitrag des eigentlich zytoprotektiven Nrf2 zum malignen Progress nachgewiesen und eine Korrelation zwischen seiner erhöhten Präsenz mit einem schlechten klinischen *Outcome* einher [60, 66-69]. Die wesentliche Grundlage für die erhöhte Nrf2-Aktivität bietet das entzündliche Tumorstroma, in welchem oxidativer Stress gegeben ist. Nrf2 ist ein Protoonkogen, also eine Onkogen-Vorstufe, die durch genetische oder epigenetische Alterationen (z.B. durch microRNA) in den mit ihm verknüpften Signalkaskaden zum Onkogen transformieren kann. Diese Mutationen betreffen meistens dessen Repressor KEAP1 oder Cullin 3, wodurch es zu einer Desinhibition von Nrf2 kommt [70, 71].

Die Tatsache, dass Nrf2 eine onkogene Funktion besitzt, erscheint einleuchtend, da es bezüglich seiner zytoprotektiven Wirkung auch bei entarteten Zellen keine Ausnahme macht. So ist das Protein, sowohl aufgrund seiner oben beschriebenen Induktion zytoprotektiver Enzyme (z.B. NQO1 oder HO-1), als auch wegen des gesteigerten Effluxes durch den Einbau von ABC-Transportern in die Zellmembran, Ursache der tiefen Resistenz von PDAC-Zellen gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie [61, 72-74]. Überdies kommt es mittels Interaktion von Nrf2 mit Onkogenen und Tumorsuppressoren wie mit *K-ras*, *c-Myc* oder EGFR, als auch über einen veränderten Metabolismus (Pentose-Phosphat-Weg, Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) zu einer gesteigerten Proliferation und verstärktem Tumorwachstum. Weiterhin wird ein direkter aktivierender Zusammenhang zwischen der im PDAC elementaren *K-ras*-Mutation und der erhöhten Nrf2-vermittelten ROS-Detoxifikation, welche das Tumorwachstum begünstigt, vermutet [21, 66] (siehe 1.1.3).

Weitere Vorgänge, die zur Etablierung eines malignen Phänotyps beitragen, sind die Nrf2-vermittelte Apoptoseresistenz durch Induktion der Bcl-2- und Bcl-xL-Gene und Wechselwirkung mit p53 oder mit NF- $\kappa$ B, die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs und der Wechselwirkung mit dem TGF- $\beta$ 1-Signalweg durch direkte Hemmung von Smad3 [61, 75-78]. Resultat sind Zellen mit erhöhter Fähigkeit zur Motilität, Invasion und Angiogenese. Ausschlaggebend scheinen dabei die hypoxischen Bedingungen in der Tumormikroumgebung zu sein [79].

Zusammenfassend wird eine dem TGF- $\beta$ 1-ähnliche (siehe 1.2.4), kontext- und zeitabhängige duale Rolle von Nrf2 im Kontext der inflammatorischen Karzinogenese postuliert. Auch zur entzündungsbedingten Entartung des Pankreas wird für Nrf2 ein wichtiger Beitrag beschrieben. Während die anti-tumorigenen Effekte in der frühen Phase der Tumorentstehung scheinbar noch überwiegen, profitieren bereits entartete Zellen von dessen Effekten in Form von gesteigertem Wachstum, Überleben, Tumolvaskularisation, Invasivität und Metastasierung. Aus diesen Gründen wird der Nutzen einer therapeutischen Modifikation dieses komplexen Netzwerks bereits erforscht und kontrovers diskutiert. Der Einsatz von Nrf2-Inhibitoren im prämaligen Stadium oder nach stattgefundenener maligner Entartung erwies sich dabei bis jetzt erfolgsversprechender als die Nrf2-Aktivierung zur Krebsprävention [57]. So waren Stoffe wie das vom Kaffee abstammende Alkaloid Trigonellin oder der PI3K-p110a-Inhibitor PIK-75 gut verträglich und befinden sich teilweise bereits in der klinischen Testphase [73, 80]. Trotzdem bleibt ein langer Weg bis zur sicheren selektiven Therapie, da Nrf2 in ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden eingebunden ist, welches bislang noch unzureichend verstanden wird. Insbesondere müssen dafür die Mechanismen und Umstände, die zum „Switch“ von Nrf2 von einem anti- zu einem pro-tumorigenen Faktor führen, noch besser verstanden werden.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Die inflammatorische Karzinogenese des PDAC beruht auf einer Vielzahl molekularer Ereignisse und Signalkaskaden, die bisher noch nicht komplett verstanden sind. Die Bedeutung einiger Meilensteine dieses komplexen Prozesses ist allerdings schon gesichert. Dazu gehört die EMT und der damit verbundene Botenstoff TGF- $\beta$ 1 (siehe 1.2). Des Weiteren ist auch die Mutation im Onkogen *K-ras* für die Pathogenese dieser Krebserkrankung von elementarer Bedeutung (siehe 1.1.3). Im Fokus dieser Arbeit steht ein weiterer Prozess, der für die entzündungsbedingte Entartung der Bauchspeicheldrüse unabdingbar ist – der oxidative Stress und der damit in enger Verbindung stehende Transkriptionsfaktor Nrf2 (siehe 1.3).

All diese Prozesse und Signalwege begegnen und beeinflussen sich gegenseitig an vielen Stellen der Karzinogenese. Jedoch ist bisher noch nicht ausreichend geklärt, in welcher Form und zu welchem Zeitpunkt dies auch im Fall der Karzinogenese des PDACs geschieht. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, in welcher Weise mutiertes *K-ras* Einfluss auf die von TGF- $\beta$ 1 und Nrf2 vermittelten Zellantworten in noch prämaligen Pankreasgangepithelzellen hat. Folgende Fragen stellen sich in diesem Zusammenhang:

- Welchen Einfluss haben Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 - allein und in Kombination - auf Zellwachstum von Pankreasgangepithelzellen in Abhängigkeit von mutiertem *K-ras*?
- Welchen Einfluss haben Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 - allein und in Kombination - auf EMT und Zellinvasion von Pankreasgangepithelzellen in Abhängigkeit von mutiertem *K-ras*?

Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Versuchen mit der prämaligen humanen pankreatischen Gangepithelzelllinie HPDE (siehe 3.1.1), die entweder mutiertes *K-ras* exprimiert (HPDE-*kras*) oder nicht (HPDE-pBp), durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit TGF- $\beta$ 1 oder dem Nrf2-Aktivator tBHQ stimuliert, um neben der oxidativen Zellantwort EMT-assoziierte Veränderungen, wie beispielsweise die Morphologie, die Expression verschiedener EMT-Marker und die Invasion, aber auch das Zellwachstum durch Ermittlung der Proliferationsrate und des Apoptoseverhaltens zu untersuchen. Zusätzlich wurden diese Versuche unter vermindertem oder erhöhtem Einfluss von Nrf2 wiederholt, um die Abhängigkeit dieser Prozesse vom zentralen Regulator der anti-oxidativen Zellantwort zu evaluieren.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Sterilbänke und Zubehör

HERA Safe	Thermo Scientific, Schwerte, D
HERA Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, D
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D

#### 2.1.2 Pipetten

Finnpipette 0,2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Pipetboy-acu	Ingtegra-Biosciences, Fernwald, D
Ripette	Ritter, Schwabmünchen, D

#### 2.1.3 Inkubationsgeräte

BBD 6200 CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific, Schwerte, D
GyroTwister Schwänker	Labnet, Woodbridge, USA
Hera Cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Schwerte, D
QBA1 Tisch-Inkubator	Grant, Cambridge, UK
Stuart SRT9 Rollmixer	Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
WTC ED-53 Inkubationsschrank	Binder Tuttlingen, D

**2.1.4 Zentrifugen**

Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, D
Rotina 420 T	Hettich, Tuttlingen, D
Sprout mini centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

**2.1.5 Mikroskope**

AE2000	Motic, Wetzlar, D
Evo <sub>s</sub> <sub>XL</sub> Core	AMG, Bothell, USA

**2.1.6 Wäageinstrumente**

Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

**2.1.7 Messgeräte**

Fusion SL Detektionssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
LightCycler 480 II	Roche, Basel, CH
Microplate Luminometer LB96V	Berthold Technologies, Pforzheim, D
NanoDrop Spectrophotometer 10-1000	PeqLab, Erlangen, D
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, D
Sonicator Sonoplus	Bandelin, Berlin, D
Surise Remote Control	Tecan, Crailsheim, D

**2.1.8 Mischer**

IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke, Stauffen, D
PMS 1000 Microplate Shaker	Grant bio, Essex, UK

### 2.1.9 Westernblot-Analyse

CS-300V Powersupply	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
OmniPAGE VS10D Gelkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, UK

### 2.1.10 Kühlschränke

Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Tiefkühler (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Tiefkühler HERAFreeze Basic (-80 °C)	Thermo Scientific, Schwerte, D

## 2.2 Computerprogramme

Fusion CAPT Software 16.06	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Lightcycler480 Software	Roche, Basel, CH
Magellan V6.4	Tecan, Crailsheim, D
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
WinGlow	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
15 ml / 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
20 µl / 200 µl / 1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
25 µl / 50 µl / 100 µl Ritips	Ritter, Schwabmünchen, D
5 ml / 10 ml / 25 ml serologische Pipetten	Greiner Bio-one GmbH, Frickhausen, D
6- / 12- / 24- / 96-Well-Flachbodenplatten	Greiner Bio-one GmbH, Frickhausen, D
24-Well-TranswellEinsätze 8 µm Porengröße	Greiner Bio-one GmbH, Frickhausen, D
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Well-PCR-Platten (weiß)	Roche, Basel, CH
CryoPure Gefäß 1,0 ml weiß	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläser Cover Slip, 18 mm, Stärke 1, rund	Thermo Scientific, Schwerte, D
Nitril-Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, Braunschweig, D

Parafilm „M“	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
Serumpipette 153 mm, lang	Greiner Bio-one, Frickhausen, D
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, D
Whatman-3MM Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Westran® Clear Signal, Pore Size 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

## 2.4 Chemikalien

Aceton zur Analyse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
AEC Substrat Chromogen Ready-to-Use	Dako Diagnostika, Hamburg, D
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Ammoniumperoxodisulfat	Merck Millipore, Darmstadt, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Biomol, Hamburg, D
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Ras Laboratories, München, D
DTT	Sigma-Aldrich, München, D
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
EnVision + System-HRP <i>anti mouse</i>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
Essigsäure 10 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
HEPES	Biochrom, Berlin, D
Kaiser's Glyceringelatine	Waldeck GmbH, Münster, D
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Kollagen Typ I (Kalbshaut)	Sigma-Aldrich, München, D
Kristallviolett-Lösung	Walter CMP, Kiel, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, CH
Mayer's Haemalaun	Applichem, Darmstadt, D
Methanol	Th. Greyer GmbH, Renningen, D
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Opti-MEM® I Medium	Life Technologies, Darmstadt, D
PageRuler	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PBS	PAA, Pasching, A
Penicillin-Streptomycin	PAA, Pasching, A
PMSF	Sigma-Aldrich, München, D
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Darmstadt, D
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
SDS ultra-pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
tBHQ	Sigma-Aldrich, München, D
TGF- $\beta$ 1	R&D Systems, Wiesbaden, D
Tris Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, A
Tween 20	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid 30 % (stab.) zur Analyse	Chemsolute, Renningen, D

## 2.5 Rezepturen

2x-Laemmli-Puffer	128 mM Tris-Base
	4,6 % (w/v) SDS
	10 % (v/v) Glycerol
	pH 7,6
10x TBS	20 mM Tris-Base
	140 mM NaCl
	pH 7,6
Blot-Puffer A	300 mM Tris-Base
	20 % (v/v) Methanol
	pH 11
Blot-Puffer B	25 mM Tris-Base
	20 % (v/v) Methanol
	pH 10,6

Blot-Puffer C	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 40 mM Aminocaprinsäure pH 10,6
Blotto	5 mg Milchpulver 100 ml TBS-T (1X)
EMSA I-Puffer	5 ml HEPES 10 mM (pH 7,9) 0,3728 g KCl 10 mM 0,2 ml EDTA 0,2 mM 0,5 ml DTT 1,0 mM 2,5 ml PMSF 0,5 mM 10 µg/ ml Aprotinin (frisch zusetzen)
EMSA II-Puffer	10 ml HEPES 20 mM (pH 7,9) 11,68 g NaCl 0,4 M 0,2 ml EDTA 0,2 mM 0,5 ml DTT 1,0 mM 2,5 ml PMSF 0,5 mM 10 µg/ml Aprotinin (frisch zusetzen)
Kristallviolettlösung	300 mg Kristallviolett 6 ml Ethanol 2 % (v/v) 300 ml Boratpuffer (0,1 M; pH 8,5)
TBS-Tween (TBS-T)	100 ml TBS (10X) 1000 µl Tween 20 ad 1000 ml Aqua dest.
Westernblot Sammelgel	0,75 ml Aqua dest. 312,5 µl Tris-Puffer pH 6,8 162,5 µl Acrylamid 30 % (w/v) 6,75 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 1,25 µl TEMED

Westernblot Trenngel (10 %)	2,5 ml Aqua dest. 1,5 ml Tris-Puffer pH 8,8 2 ml Acrylamid 30 % (w/v) 22 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 4,4 µl TEMED
Westernblot Farbpuffer	2,5 % (v/v) Mercaptoethanol 0,005 % (w/v) Bromphenolblau in 2x-Laemmli-Puffer

## 2.6 Kits

Caspase-Glo® 3/7-Assay	Promega, Mannheim, D
Effectene® Transfection Reagent	Quiagen, Hilden, D
HiPerFect® Transfection Reagent	Quiagen, Hilden, D
Proteinassay DC	Bio-Rad Laboratories, München, D
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen, D
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Schwerte, D

## 2.7 Antikörper

Primärantikörper	Donor	Verdünnung	Solvens	Hersteller, Ort, Land
anti-E-Cadherin	Maus	1:1000	5 % BSA/TBST	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-HA	Kaninchen	1:2000	Blotto	Sigma-Aldrich, München, D
anti-HSP90	Kaninchen	1:2000	Blotto	Santa Cruz Biotechno- logy, Heidelberg, D
anti-Ki-67	Maus	1:125	5 % BSA/TBST	BD Bioscience, Heidelberg, D
anti-L1CAM (9.3)	Maus	1:1000	Blotto	*
anti-Nrf2	Kaninchen	1:2000	Blotto	Abcam, Cambridge, MA, USA
anti-phospho38 (p38)	Kaninchen	1:1000	5 % BSA/TBST	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-phospho- Smad3 (C-Terminus)	Kaninchen	1:500	Blotto	R&D Systems, Wiesbaden, D
anti-total38 (anti-t38)	Kaninchen	1:1000	5 % BSA/TBST	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-total-Smad2/3 (anti-t-Smad2/3)	Ziege	1:200	Blotto	Santa Cruz Biotechnol- ogy, Heidelberg, D
anti-Vimentin	Maus	1:50	Blotto	Santa Cruz Biotechnol- ogy, Heidelberg, D

\* generiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Gerd Moldenhauer, DKFZ Heidelberg

Sekundärantikörper	Donor	Verdünnung	Solvens	Hersteller
anti-Kaninchen	Ziege	1:2000	Blotto	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-Maus	Pferd	1:2000	Blotto	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti-Ziege	Esel	1:2000	Blotto	Santa Cruz Biotechnol- ogy, Heidelberg, D

## 2.8 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
E-Cadherin	<i>Forward:</i> 5'-TCT TCC CCG CCC TGC CAA TC-3' <i>Reverse:</i> 5'-GCC TCT CTC GAG TCC CCT AG-3'	Biometra, Göttingen, D
HO-1	<i>Forward:</i> 5'-TCC GAT GGG TCC TTA CAC TC-3' <i>Reverse:</i> 5'-TAA GGA AGC CAG CCA AGA G-3'	Biometra, Göttingen, D
L1CAM	<i>Forward:</i> 5'-TCA CGG GCA ACA ACA GCA ACT-3' <i>Reverse:</i> 5'-CGG CTT CCT GTC AAT CAT GCT-3'	Biometra, Göttingen, D
NQO1	<i>Forward:</i> 5'-AAA TCC TGG AAG GAT GGA AG-3' <i>Reverse:</i> 5'-TTG TCA GTT GGG ATG GAC TT-3'	Biometra, Göttingen, D
Nrf2	<i>Forward:</i> 5'-TTT GAG GAT TCC TTC AGC AG-3' <i>Reverse:</i> 5'-GCA TGC TGT TGC TGA TAC TG-3'	Biometra, Göttingen, D
Slug	<i>Forward:</i> 5'-ATA TTC GGA CCC ACA CAT TAC CT-3' <i>Reverse:</i> 5'-GCA AAT GCT CTG TTG CAG TGA-3'	Biometra, Göttingen, D
TBP	<i>Forward:</i> 5'-GCT GGC CCA TAG TGA TCT TT-3' <i>Reverse:</i> 5'-CTT CAC ACG CCA AGA AAC AG-3'	Biometra, Göttingen, D
Vimentin	<i>Forward:</i> 5'-TGG CAC GTC TTG ACC TTG AA-3' <i>Reverse:</i> 5'-GGT CAT CGT GAT GCT GAG AA-3'	Biometra, Göttingen, D

## 2.9 siRNAs

siRNA	Hersteller
<i>control</i> siRNA	Qiagen, Hilden, D
Nrf2 siRNA	Qiagen, Hilden, D

## 2.10 Plasmide

Plasmid	Hersteller
Nrf2-HA	Paul Nioi, Thousand Oaks, CA, USA
pcDNA3.1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 3 METHODEN

#### 3.1 Zellkulturmethoden und Viabilitätsbestimmungen

##### 3.1.1 Zelllinien

Für die Experimente wurde eine nicht-maligne humane pankreatische duktale Epithelzelllinie verwendet, welche unter dem Namen HPDE geführt wird [81, 82]. Diese Zelllinie entstammt dem normalen Pankreasgewebe einer erwachsenen 63-jährigen Frau, deren Pankreaschwanz auf Grund eines Zystadenokarzinoms resezziert werden musste. Repräsentative Probenentnahmen des Resektionspräparates bestätigten das Bild einer Pankreatitis bzw. normalen pankreatischen Gewebes. Es bestehen demnach keine Anzeichen für Malignität. Darüber hinaus sind in diesen Zellen keine Genmutationen nachgewiesen worden, welche mit der Entstehung eines PDAC assoziiert werden (z.B. Smad4, p53, p16). Somit tragen die Zellen auch die Wildtypform des Protoonkogens *K-ras*. In der Immunzytochemie sind HPDE Zellen positiv für die Cytokeratine 7, 8, 18 und 19, negativ für das p53-Protein und stellten sich in einem Zeitraum von 6 Monaten als nichttumorigen in Nacktmäusen heraus. Die Zellen wurden mit einem retroviralen Vektor, welcher das E6/E7-Onkogen des humanen Papillomavirus-16 trägt (HPV16-E6E7), transduziert und somit immortalisiert. Um eine Zelllinie zu generieren, die mutiertes *K-ras* exprimiert, wurden HPDE-pBp Zellen mit dem retroviralen Vektor pBABEpuro-*K-ras4B*<sup>G12V</sup> transduziert. Die dadurch entstandene Zelllinie HPDE-6c7eR-Kr (HPDE-*kras*) weist im Vergleich zur Kontrollzelllinie HPDE-pBp eine höhere Aktivität entsprechender *K-ras*-assoziierter *Downstream*-Effektoren (z.B. AKT, ERK und JNK) auf. Im Nacktmausmodell konnte in nahezu 50 % der Tiere nach subkutaner Injektion von HPDE-*kras* Zellen eine Karzinomentstehung beobachtet werden [83]. Ferner wurde im Folgenden die Zelllinie HPDE-pBp mit dem retroviralen Kontrollvektor pBABEpuro transduziert, um sie als Kontrollzelllinie für HPDE-*kras* Zellen verwenden zu können.

Name	Herkunft	Referenz	Transduktion
HPDE-pBp	benignes Pankreasgangepithel	Ming-Sound Tsao, Universität Toronto	HPV16-E6E7 pBABEpuro
HPDE- <i>kras</i>	benignes Pankreasgangepithel	Ming-Sound Tsao, Universität Toronto	HPV16-E6E7 pBABEpuro- <i>K-ras4B</i> <sup>G12V</sup>

Kultiviert wurden beide Zelllinien in einem Medium, welches aus einer 1:1 Mischung aus RPMI-Medium und Keratinozytenmedium besteht und mit 0,5 % (w/v) L-Glutamin, 5 % (w/v) Fötalem Kälberserum (FKS), 5 ng/ml *Epidermal Growth Factor* (EGF) und 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt supplementiert ist (im Folgenden „HPDE-Medium“ genannt). Die Kultivierung in Zellkulturflaschen zur Zelllinienexpansion erfolgte in HPDE-Medium, welches mit 0,5 µg/ml Puromycin versetzt war.

### 3.1.2 Kultivierung

Die Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff unter Zugabe von 10 % DMSO und FKS kryokonserviert und somit unbegrenzt haltbar gemacht. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie in vorgewärmtem HPDE-Medium aufgenommen und anschließend bei 1200 U/Minute für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit dem zytotoxischen DMSO mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde, konnte das Zellpellet in 10 ml Puromycin-versetztem HPDE-Medium resuspendiert werden und in eine Polystyrol-Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche überführt werden. Die im Rahmen der Zellkultivierung durchgeführten Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank mit autoklavierten Materialien durchgeführt, um die Kontamination mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. In der Zellkulturflasche wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C Umgebungstemperatur, 5 % CO<sub>2</sub> und 86 % Humidität kultiviert.

Da die Zellen während des Wachstums die im Medium enthaltenen Nährstoffe verstoffwechseln und im Laufe der Zeit einen dichten Zellrasen bilden, müssen sie in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Hierfür wurde das HPDE-Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und anschließend 5 ml 1x Trypsin-EDTA in PBS hinzugegeben, um die Zellen voneinander und vom Untergrund zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Brutschrank wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 ml HPDE-Medium gestoppt. Im Folgenden wurde die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, bei 1200 U/Minute für 5 Minuten sedimentiert, das Pellet in 20 ml frischem HPDE-Medium aufgenommen und auf zwei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Mit zunehmender Anzahl der Passagen ist mit Veränderungen in den Zellen zu rechnen, weswegen diese maximal 20-25-mal passagiert wurden. Danach wurden neue Zellen aufgetaut und in Kultur genommen

Die Kultivierung für die Versuche erfolgte in 6-, 12-, 24- oder 96-*Well*-Platten mit gegebener Zellzahl in Puromycin-freiem HPDE-Medium (siehe 3.1.1). Nach 24 Stunden wurden die Zellen ggf. mit Stimulanzen versetzt bzw. mit siRNA oder Plasmiden transfiziert (siehe 3.2). Die dafür verwendeten Stimulanzen wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- TGF- $\beta$ 1                      10 ng/ml
- tBHQ                              50  $\mu$ M

### 3.1.3 Mikroskopische Analyse

Die Morphologie der Zellen wurde mithilfe des Mikroskops Evos<sub>xL</sub> Core der Firma AMG (Bothell, USA) beurteilt und fotografisch festgehalten.

### 3.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die durchgeführten Versuche mussten die Zellen in einer standardisierten Zellzahl pro *Well* ausgesät werden, um die Versuchsergebnisse vergleichbar zu machen. Vor diesem Hintergrund und für die Bestimmung des Zellindex als Vitalitätsparameter einer Zellpopulation nach einer bestimmten Kultivierungszeit müssen Zellzahlbestimmungen durchgeführt werden.

Die Zellen wurden nach der Kultivierung (siehe 3.1.2) wie oben beschrieben trypsiniert (siehe 3.1.2), zentrifugiert und in 200  $\mu$ l PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe im Verhältnis von 10:1 mit Trypanblau versetzt - ein Farbstoff mit der Eigenschaft, nur in tote Zellen einzudringen und diese blau anzufärben. Vitale Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Nach dem Pipettieren von 10  $\mu$ l dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer wurden die Zählung und die Unterscheidung von vitalen und bereits toten Zellen unter dem Mikroskop möglich. Der Aufbau der Kammer besteht aus vier Großquadraten, die in jeweils 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die Zählung zweier Großquadraten, Mittelwertbildung und Berücksichtigung des Kammer- ( $=10^4$ ) und Verdünnungsfaktors ( $=10^1$ ) machte so die Bestimmung der Zellzahl  $\times 10^5$  pro Milliliter der zu bestimmenden Probe möglich.

### 3.1.5 MTS-Assay

Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der Zellviabilität ist die Durchführung eines MTS-Assays. Der eingesetzte Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, ein Tetrazoliumsalz, wird durch NADH bzw. NADPH und teilweise durch die Succinat-Dehydrogenase zu Formazon umgesetzt. Anhand der ermittelten Extinktion bzw. der optischen Dichte (OD MTS) lässt sich photometrisch eine Aussage über die Glykolyserate und die Zellatmung treffen, welche proportional zur Zellebensfähigkeit ist.

Für diesen Test wurden  $3 \times 10^3$  Zellen/200  $\mu$ l HPDE-Medium (siehe 3.1.1) pro *Well* in Triplikaten in eine 96-*Well*-Platte ausgesät. Nach 144 Stunden Inkubation wurden 20  $\mu$ l des oben genannten Farbstoffs pro *Well* hinzugegeben und über einen Zeitraum von drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden aus jedem *Well* 200  $\mu$ l Überstand abgenommen und in eine neue 96-*Well*-Platte überführt, in der letztlich die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm durchgeführt wurde.

### 3.1.6 Ki-67-Färbung

Eine etablierte Methode, die Proliferation einer Zellpopulation darzustellen, ist die Anfärbung des Proteins Ki-67. Die Tatsache, dass Ki-67 in ruhenden, sich in der  $G_0$ -Phase befindlichen Zellen fehlt, jedoch in allen Phasen des aktiven Zellzyklus ( $G_1$ -, S-,  $G_2$ - und M-Phase) vorhanden ist, macht es zu einem zuverlässigen Marker für sich teilende Zellen [84].

Nachdem die *Wells* einer 12-*Well*-Platte mit Deckgläsern bestückt worden waren, wurden HPDE-pBp bzw. HPDE-kras Zellen in HPDE-Medium (siehe 3.1.1) ausgesät, anschließend transfiziert (siehe 3.2), stimuliert (siehe 3.1.2) und für insgesamt 96 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Aceton mit 30 %-igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4 % BSA in PBS blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren. Nach der ersten Inkubation mit einem Antikörper gegen humanes Ki-67 (1:250 in 1 % BSA in PBS) für 45 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Saccharose-Polymer *Envision-a-mouse-HRP* für 30 Minuten. Beide Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer Feuchtkammer. Es wurde anschließend jeweils dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun wurden die an Ki-67 gebundenen Antikörper mit einem Tropfen AEC Substrat Chromogen für 5 Minuten visualisiert. Nach

dreimaligem Waschen für 5 Minuten in PBS wurden die Kerne für 5 Minuten mit Mayers Haemalaun gefärbt und anschließend für 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Glycerin-Gelatine, welche zuvor in der Mikrowelle bei 300 W flüssig gemacht wurde, eingedeckelt. Unter dem Mikroskop war nun die Identifizierung aller zellzyklusaktiven Zellen möglich.

## 3.2 Transfektion

Um die Abhängigkeit der untersuchten Phänomene von Nrf2 zu überprüfen, wurde die Nrf2-Expression der Zellen entweder durch die Transfektion mit Nrf2-siRNA supprimiert oder mit einem Nrf2-kodierenden Plasmid verstärkt.

### 3.2.1 Transfektion mit siRNA

Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro *Well* in 12-*Well*-Platten in 1 ml HPDE-Medium (siehe 3.1.1) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium im *Well* durch 1 ml frisches HPDE-Medium ersetzt. Der für die Transfektion verwendete *Master Mix* setzte sich wie folgt zusammen:

- 100  $\mu$ l FKS-freies Medium (OptiMEM)
- 6  $\mu$ l HiPerFect® Transfection Reagent
- 75 ng der jeweiligen siRNA (*control* siRNA, Nrf2 siRNA)

Als Negativkontrolle wurde die AllStars Negative *control* siRNA (Quiagen, Hilden, D) und zur Nrf2-Supprimierung die Nrf2 siRNA (Quiagen, Hilden, D) verwendet. Nach 10-minütiger Reaktionszeit wurden 106,3  $\mu$ l des *Master Mixes* tröpfchenweise in die *Wells* pipettiert und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden wurden die Zellen stimuliert.

### 3.2.2 Transfektion mit Plasmiden

Um die HPDE Zellen zur Nrf2-Überexpression zu bringen, wurden die Zellen mit einem Nrf2-kodierenden Vektor (Nrf2-HA, Nrf2 gekoppelt an Hämagglutinin zur besseren Detektion) bzw. mit einem Leervektor (pcDNA3.1) als Kontrolle transfiziert. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  Zel-

len pro *Well* in HPDE-Medium (siehe 3.1.1) in 6-*Well*-Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Nachdem das Medium abgesaugt und durch 1600 µl frisches HPDE-Medium ersetzt wurde, wurden 700 µl/*Well* eines *Master Mixes* tröpfchenweise hinzugegeben, welcher sich folgendermaßen zusammensetzte:

- 100 µl                      EC-Buffer
- 0,3 µg                      Plasmid (pcDNA3.1 bzw. Nrf2-HA)
- 8 µl/µg Plasmid          Enhancer  
mischen, 5 Minuten Reaktionszeit bei RT
- 20 µl/µg Plasmid        Effectene® Transfection Reagent  
mischen, 10 Minuten Reaktionszeit bei RT
- 600 µl                      HPDE-Medium (siehe 3.1.1)

Nach 18 Stunden wurde das HPDE-Medium mit dem *Master Mix* von den Zellen abgenommen und durch 2 ml frisches HPDE-Medium ersetzt.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Zum Nachweis von Proteinen wurden Ganzzelllysate hergestellt. Nach Kultivierung und Transfektion der Zellen (siehe 3.1.2 und 3.2) wurde das Medium abgesaugt, jedes *Well* einmal mit PBS gespült und die Zellen mit 150 µl 2x-Lämmli-Puffer/*Well* lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden gelöst und mit einer Pipette in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Die anschließende stoßweise Ultraschallbehandlung (4 x 1 Sekunde) führte zu einer besseren Homogenisierung der Probe. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.2 Bestimmung des Proteingehalts

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Ganzzelllysate wurde deren Proteingehalt bestimmt, um die Auftragung einheitlicher Proteinmengen zu gewährleisten und die bessere Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu ermöglichen. Hierfür wurde das Proteinassay

D<sub>C</sub> der Firma BIO-RAD verwendet, welches auf der Proteinbestimmung nach Lowry beruht. Dieser quantitative Nachweis beruht auf zwei Reaktionen. Zuerst bildet sich ein blauvioletter, quadratisch-planarer Komplex zwischen den Peptidbindungen des Proteins und den Kupfer(II)-Ionen des Kupfertartrats (Reagenz A', Biuretreaktion). Im Anschluss wird durch diesen Komplex das Folin-Ciocalteu-Reagenz (Reagenz B) zu Molybdänblau reduziert, welches bei einer Wellenlänge von 650 nm photometrisch nachweisbar ist und quantitativ gemessen werden kann. Der umgesetzte Farbstoff ist proportional zum Proteingehalt der Probe. Es wurden je Probe 5 µl Zellysate, 20 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B eingesetzt und in Doppelwerten bestimmt. Als Referenz diente der in den Ganzzelllysaten eingesetzte Lämmli-Puffer. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe des BSA-Proteinstandards mit einer Konzentration von 1,55 mg/ml zur Konzentrationsbestimmung mitgemessen.

### 3.3.3 Herstellung von Kernextrakten

Ebenfalls zum Nachweis von Proteinen wurden Kernextrakte von den zuvor kultivierten und transfizierten Zellen (siehe 3.1.2 3.2) angefertigt. Hierfür wurde das Medium im *Well* abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Nach Zugabe von 300 µl EMSA I-Puffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, in ein Eppendorfggefäß überführt und bei 4 °C und 1300 UpM für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand (zytosolische Proteinfraction) wurde bei -80 °C gelagert, wohingegen das Pellet in 300 µl EMSA I-Puffer resuspendiert, erneut für eine Minute zentrifugiert (4 °C, 1300 UpM), der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet letztlich in 50 - 80 µl EMSA II-Puffer resuspendiert wurde. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 Minuten auf einem Mikroplattenschüttler geschüttelt, erneut für 10 Minuten zentrifugiert (4 °C, 1300 UpM) und der entstandene Überstand als Kernextrakt bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

### 3.3.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, um Proteine in einem Ganzzelllysate entsprechend ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Im Vorfeld müssen die Proteine allerdings bezüglich ihrer Ladung und räumlichen Struktur (Sekundär- und Tertiärstruktur) einander angepasst werden. Dafür wurden 10 µg Protein aus dem Lysat eingesetzt und mit β-Mercaptoethanol versetzt, welches intramolekulare Disulfidbrücken durch Reduktion spaltet. Darüber hinaus bin-

det Natriumlaurylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) an hydrophobe Regionen der Proteine und vermittelt dem Komplex dadurch eine stark negative Ladung. Nachdem die Lysate anschließend für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt wurden, konnten sie in die Taschen eines 10-%igen Polyacrylamidgels pipettiert werden, welches zuvor in eine Elektrophoresekammer gegossen und fixiert wurde. Im Feld einer elektrischen Spannung von 100 V wanderten die Proteine in einem Zeitraum von ca. 2 Stunden in Richtung der Kathode. Nachdem sie sich im pH-neutralen großporigen Sammelgel aufkonzentrierten, wurden sie im basischen kleinporigen Trenngel entsprechend ihrer Größe von 250 bis 5 kDa aufgetrennt. Da die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülgröße ist, kommen die großen Proteine früh (im oberen Bereich des Gels), die kleinen hingegen erst spät (im unteren Bereich des Gels) zum Erliegen. Ein Proteingrößenstandard mit vorgefärbten Proteinbanden definierter Molekülgröße wurde zur Größenorientierung mit aufgetragen.

### 3.3.5 Westernblot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine zur Detektion auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Bei der dafür verwendeten *semi-dry*-Methode geschah dies innerhalb eines mit verschiedenen Puffern getränkten Filterpapierstapels, in dem das Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran eingebettet wurden. Die Schichtung war wie folgt:

- Anode
- sechs in Blot-Puffer A getränkte Blätter Whatman Papier
- drei in Blot-Puffer B getränkte Blätter Whatman Papier
- PVDF-Membran
- Polyacrylamidgel aus der Gelelektrophorese
- sechs in Blot-Puffer C getränkte Blätter Whatman Papier
- Kathode

Im Vorfeld wurde die PVDF-Membran für 1 Minute in Methanol eingelegt und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Die angelegte elektrische Spannung von 70 mA<sup>1</sup> über 1

---

<sup>1</sup> Formel zur Errechnung der anzulegenden Stromstärke:  $I [mA] = (Länge [cm] \times Breite [cm] \times 1,25 mA) / cm^2$

Stunde bei einer Gelgröße von 6,5 x 9 cm führte zum Transfer der Proteinbanden auf die Membran. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für mindestens 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 10 ml 5-%igem Blotto in einer Waschschale blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen im Folgenden zu minimieren.

Nun konnte die Membran für 1 Stunde im Primärantikörper und im Anschluss für 1 Stunde im Sekundärantikörper bei RT auf einem Kipp-/Rollmischer inkubiert werden. Die Antikörper wurden hierfür in dem vom Hersteller vorgegebenen Verdünnungsverhältnis in 8 ml Blotto oder 5 % BSA in TBS-Tween in 50 ml-Röhrchen angesetzt (siehe 2.7). Nach jeder Inkubationsperiode wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Die an den Sekundärantikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase konnte während der 5-minütigen Inkubation der Membran in Substratlösung, bestehend aus Peroxid und Luminol im Verhältnis 1:1, mit dieser reagieren. Die im Rahmen dieser Reaktion emittierte Chemilumineszenz wurde mithilfe einer Chemilumineszenz-Geldokumentationsanlage detektiert und gab Aufschluss über die Menge des untersuchten Proteins. Die Intensität des gemessenen Signals ist proportional zur Menge des untersuchten Proteins im Lysat. Das *Housekeeping*-Gen Hitzeschock Protein 90 (HSP90) wurde zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung der Taschen immer mitentwickelt.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA und die anschließende Echtzeitpolymerasekettenreaktion (*Realtime* PCR) dienten der Quantifizierung der Transkriptionsaktivität verschiedener Gene. Nach Aussaat, Kultivierung, Stimulation und/oder Transfektion (siehe 3.1.2 und 3.2) der Zellen wurde das Medium im *Well* abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) mithilfe des Peqlab peqGOLD Total RNA Kits gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet und isoliert. Die RNA-Konzentration der gewonnenen Probe wurde nachfolgend bei einer Wellenlänge von 260/280 nm mit einem Nanodrop Photometer 2000c (Peqlab) photometrisch gemessen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.4.2 Herstellung von cDNA

Vor dem Einsatz in der *Realtime* PCR musste die mRNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Dies wurde nach dem Prinzip der reversen Transkription mit Fermentas-Reagenzien der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dafür wurden 0,5 µg RNA der zuvor isolierten Probe mit nukleasefreiem Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Oligo (dT) Primer versetzt. Letzterer bindet während einer 5-minütigen Inkubation bei 65 °C selektiv an die Poly-A-Schwänze der mRNA und markiert somit den Startpunkt der Transkription. Nachdem diese Reaktion durch Abkühlen auf Eis abgestoppt wurde, wurde die Probe mit dem wie folgt zusammengesetztem *Master Mix* auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt:

- 4 µl            Reaction Buffer
- 0,5 µl        RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 2 µl            10 mM dNTP Mix
- 1 µl            RevertAid M-MLV Reverse Transcriptase

Bei 42 °C konnten sich nun mithilfe der reversen Transkriptase an der mRNA-Vorlage komplementäre DNA-Stränge bilden, bevor die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 70 °C beendet wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.4.3 *Realtime* PCR

Die *Realtime* PCR unterscheidet sich von der herkömmlichen PCR dadurch, dass während der PCR-Produktsynthese ein Lichtsignal emittiert und detektiert wird, dessen Intensität proportional zur Menge des gebildeten Genprodukts ist. Das Lichtsignal stammt beispielsweise vom SYBR-Green I-Farbstoff, dessen Eigenfluoreszenz durch Interkalation mit doppelsträngiger DNA ca. 100-fach verstärkt wird. Je mehr DNA während der PCR gebildet wird, desto früher kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden (Ct-Wert), wodurch eine quantitative Aussage getroffen werden kann. Indem der Ct-Wert eines bestimmten Gens mit dem Ct-Wert eines Referenzgens, welches keiner Regulation unterliegt (z.B. *TATA-binding protein*, TBP), verglichen wird, ist die Bestimmung der relativen Transkriptmenge möglich.

Bevor die cDNA für die *Realtime* PCR verwendet werden konnte, musste sie im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Es wurden je 2,5 µl/Well in Doppelwerten in einer 96-Well-PCR-Platte vorgelegt. Hierzu wurden je 7,5 µl eines *Master Mixes*, bestehend aus

- 5 µl                    Light Cycler® 480 SYBR Green 1-Master
- 0,0375 µl            *Forward-Primer* (0,1 nmol/µl)
- 0,0375 µl            *Reverse-Primer* (0,1 nmol/µl)
- 2,425 µl             Wasser

pipettiert. Die 96-Well-PCR-Platte wurde mit einer selbstklebenden PCR-Folie verschlossen und bei 1200 U/Minute für 2 Minuten zentrifugiert. Die *Realtime* PCR wurde mit dem Light Cycler® 480 System (Roche, Basel, CH) durchgeführt. Jeder PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, um die Spezifität des PCR-Produkts zu überprüfen.

### 3.5 Apoptoseassay

Das Apoptoseverhalten wurde anhand eines Caspaseassays untersucht. Das Caspase Glo® 3/7-Assay (Promega) misst dabei die Aktivität der Caspasen 3 und 7, welche erst am Ende der Apoptosekaskade aktiv sind und somit als ein zuverlässiger Indikator für die Apoptoseaktivität einer Zellpopulation gewertet werden kann. Caspasen sind Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen und werden durch enzymatische Spaltung während des programmierten Zelltodes aktiviert. Im Rahmen des Caspaseassays kommt es beim Vorhandensein aktiver Caspasen zur Spaltung des hinzugegebenen Substrats. Das freiwerdende Luciferin setzt Luciferase-abhängig Licht frei, welches im Luminometer gemessen wird und proportional zur Caspaseaktivität ist.

Nach 48-stündiger Stimulation (siehe 3.1.2) und/oder Transfektion (siehe 3.2) der Zellen in einer 12-Well-Platte ( $1 \times 10^5$  Zellen pro Well) wurde der Überstand mit den bereits apoptotischen, nicht mehr adhären Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und die noch adhären Zellen mit Trypsin abgelöst. Die trypsinierten Zellen wurden zum Überstand gegeben und für 5 Minuten bei 4000 U/Minute zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert, je 25 µl in Doppelwerten in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert und mit je 25

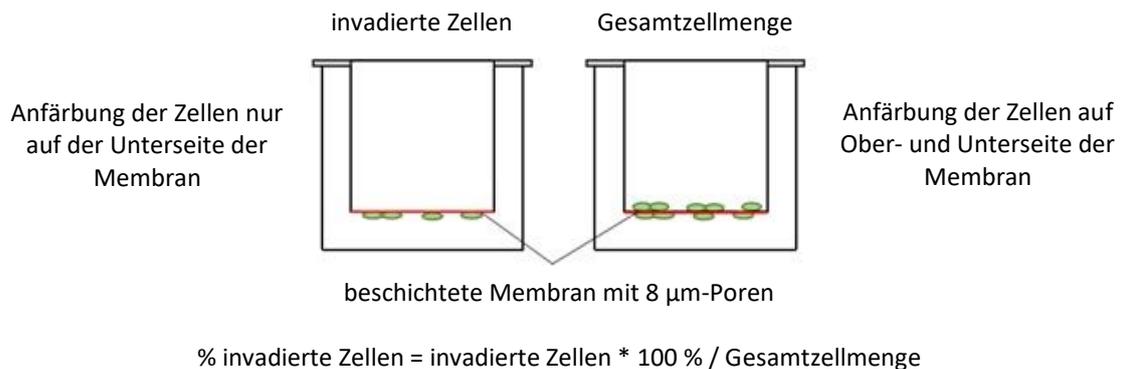
$\mu\text{l}$  Caspase Glo-Reagenz versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Lumineszenz im Mikroplattenluminometer gemessen.

Die verbliebenen Zellen wurden als Ganzellysate aufgearbeitet (siehe 3.3.1) und der Proteingehalt gemessen (siehe 3.3.2). Um die durch die Apoptoseinduktion bedingten unterschiedlichen Zellzahlen zu berücksichtigen, wurden die gemessenen Caspase 3/7-Aktivitäten durch den Proteingehalt geteilt und auf diese Weise normalisiert.

### 3.6 Invasionsassay mit modifizierter Boyden-Kammer

Ein entscheidendes Merkmal von Zellen, die die EMT durchlaufen haben, ist die Erlangung der Migrations- und Invasionsfähigkeit. In dieser Arbeit wurde diese Eigenschaft mithilfe eines Invasionsassays in einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht.

Für diesen Test wurde RPMI-Medium mit 1 % L-Glutamin und 1 % FKS ohne Zusatz von Pyruvat verwendet (im Folgenden „RPMI-Medium“ genannt), um die Proliferation der Zellen im Versuchszeitraum möglichst gering zu halten. Dazu wurden Transwelleinsätze (Porengröße 8  $\mu\text{m}$ ), die vorher mit 50  $\mu\text{l}$  Kollagen beschichtet wurden (1 ml Kollagen Typ I [0,1 % in 0,1 M Essigsäure] in 1,5 ml PBS), in eine 24-Well-Platte eingesetzt (**Abbildung 5**). In das untere Kompartiment des Wells wurden 500  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium vorgelegt, sodass die *Transwell*-Membran von unten mit Medium umspült war. Von den im Vorfeld kultivierten, stimulierten und ggf. transfizierten Zellen (siehe 3.1.2 und 3.2) wurden nach 48-stündiger Inkubation jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium im Doppelansatz von oben in die *Transwells* pipettiert. Die *Transwell*-Membran war nun von beiden Seiten mit Medium umspült, während sich die Zellen nur auf der Oberseite der Membran befanden.



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung des Invasionsassays sowie Berechnungsformel zur Bestimmung der Invasionsrate. Zur Ermittlung der invadierten Zellen wurden in einem Ansatz nur die Zellen, die sich auf der Unterseite des *Transwells* befanden, angefärbt. Im zweiten Ansatz wurden alle Zellen gefärbt (ober- und unterhalb der Membran). Der prozentuale Anteil an invadierten Zellen wurde entsprechend der dargestellten Formel berechnet. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Ole Helm aus „Charakterisierung von Makrophagen im duktalem Pankreasadenokarzinom und ihr Einfluss auf prä-maligne und maligne Pankreasgangepithelzellen“, 2014.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit, in der die Zellen durch die Kollagenmatrix auf die Unterseite des *Transwells* invadieren konnten, erfolgte die Aufarbeitung. Dazu wurde das Medium im *Transwell* und *Well* abgesaugt, die *Transwells* in eine neue 24-*Well*-Platte umgesetzt und je ein *Transwell* eines Doppelansatzes von oben mit einem Wattestäbchen gereinigt. Auf diese Weise verblieben nur die invadierten Zellen auf der Unterseite der Membran, wohingegen im zweiten *Transwell*ansatz alle Zellen (Gesamtzellmenge) belassen wurden (**Abbildung 5**). Im Folgenden wurden die Zellen für 30 Minuten bei RT mit Kristallviolett angefärbt (100 µl in das *Transwell*, 400 µl in das *Well*). Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit destilliertem Wasser wurden die Zellen für eine Stunde mit 500 µl 10-%iger Essigsäure entfärbt. Von jedem Ansatz wurden 100 µl der entstandenen, gefärbten Lösung in Doppelwerten in eine 96-*Well*-Platte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 580 nm photometrisch bestimmt. Die Invasionsfähigkeit der Zellen wird durch Berechnung des prozentualen Anteils der invadierten Zellen an der Gesamtzellmenge ausgedrückt.

### 3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Bei einem zweiseitigen Students-t-Test wurde ein  $p < 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.

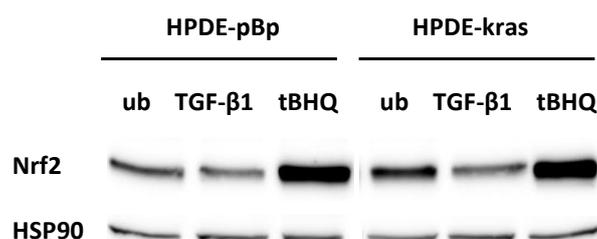
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Einfluss von Nrf2 auf Wachstum, Proliferation und Apoptoseverhalten von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

#### 4.1.1 tBHQ führt in HPDE Zellen zu einem verminderten Zellwachstum

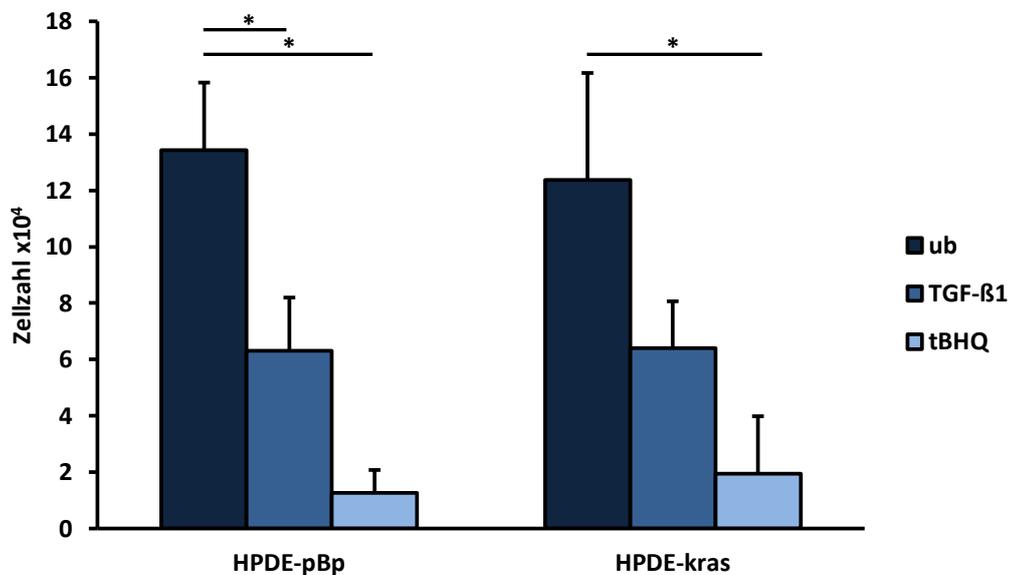
Sowohl in einem endogenen PDAC-Mausmodell als auch in humanen pankreatischen Adenokarzinomzelllinien konnten Nrf2 bereits tumorwachstumsfördernde, proliferationssteigernde Eigenschaften nachgewiesen werden, welche durch Mutationen im *K-ras*-Gen induziert werden können [21, 66, 69]. Zur Evaluation des Einflusses von Nrf2 und von mutiertem *K-ras* auf das Wachstum von humanen prämaligen Pankreasgangepithelzellen wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zunächst mit 50  $\mu$ M des etablierten Nrf2-Aktivators tBHQ (siehe 1.3.2) stimuliert. Anschließend wurden das Zellwachstum mittels Bestimmung der Lebendzellzahl (**Abbildung 7**) und MTS-Assays (**Abbildung 8**) sowie das Apoptoseverhalten mittels Caspase 3/7-Assay (**Abbildung 9**) nach unterschiedlichen Zeitpunkten (24 - 144 Stunden) untersucht. Im Vergleich dazu wurden beide Zelllinien mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt, welchem eine Schlüsselrolle in der EMT und der Tumorgenese des PDAC zukommt (siehe 1.2.4) [40, 56, 85]. Repräsentative Daten werden im Folgenden gezeigt.

Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse überprüft, ob die Behandlung mit tBHQ zu einer Erhöhung der Nrf2-Expression im Kern beider Zelllinien führt. Wie in **Abbildung 6** zu sehen, konnte in Kernextrakten von HPDE-kras Zellen, verglichen mit HPDE-pBp Zellen, basal bereits eine leicht höhere Nrf2-Expression beobachtet werden. Die Behandlung mit tBHQ führte in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Erhöhung der Nrf2 Expression, wohingegen die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 eher in einer leichten Verminderung resultierte.



**Abbildung 6.** Western Blot Analyse von Nrf2 in Kernextrakten von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbeladenen (ub) Zellen. HSP90 wurde als Ladekontrolle detektiert. Ein repräsentativer Blot wird hier gezeigt.

Die repräsentative Bestimmung der Lebendzellzahl nach 144 Stunden Stimulationszeit ergab, dass sowohl die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 als auch mit tBHQ zu einer deutlichen Abnahme des Anteils vitaler Zellen in beiden Zelllinien führten (**Abbildung 7**). TGF- $\beta$ 1 halbierte etwa sowohl bei HPDE-pBp als auch bei HPDE-kras Zellen die Vitalzellzahl im Vergleich zu unstimulierten Zellen, wohingegen unter tBHQ-Stimulation zu diesem Messzeitpunkt kaum noch lebendige Zellen beider Zelllinien vorhanden waren (ca. 10 % bei HPDE-pBp, ca. 16 % bei HPDE-kras). Die Potenz von tBHQ bezüglich der Wachstumssuppression ist somit noch deutlich höher als die von TGF- $\beta$ 1. Die genannten Effekte von TGF- $\beta$ 1 und tBHQ ließen sich sowohl bei HPDE-pBp als auch bei HPDE-kras Zellen gleichermaßen beobachten, so dass ein Einfluss der *K-ras* Mutation hierbei unwahrscheinlich ist.



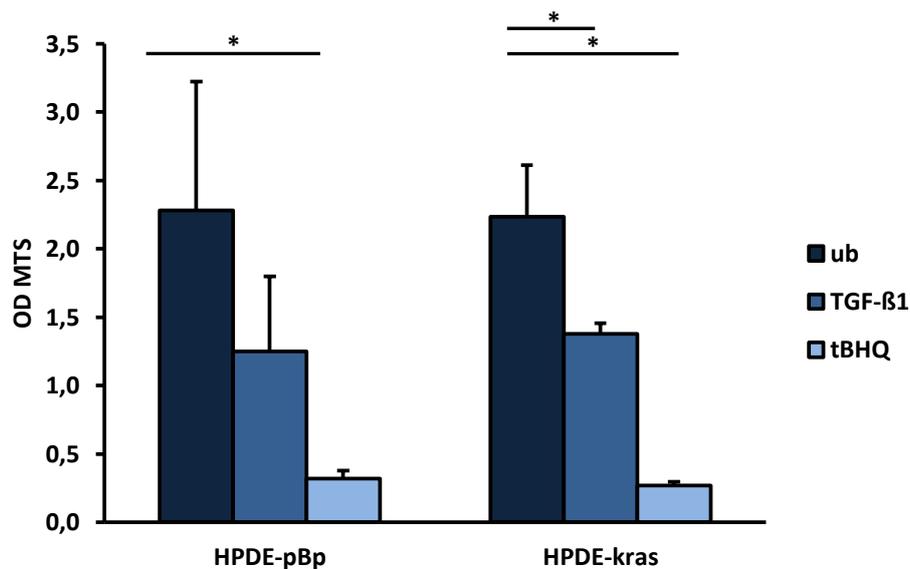
**Abbildung 7.** Bestimmung der Lebendzellzahl von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 144-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 tBHQ führt zu einer verminderten Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

Als nächstes sollte mit einem weiteren Testverfahren bestimmt werden, ob tBHQ ähnlich wie TGF- $\beta$ 1 die Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen vermindert. Hierfür wurde das MTS-Assay gewählt, welches mittels der photometrischen Messung eines Farbstoffumschlags eine Aussage über die Glykolyserate und damit über die metabolische Aktivität der Zellen erlaubt (siehe 3.1.5). Dafür wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu  $3 \times 10^3$  Zellen

pro *Well* in Triplikaten in eine 96-*Well*-Platte ausgesät, nach 24 Stunden unbehandelt belasten oder für 144 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder 50  $\mu$ M tBHQ stimuliert.

Wie in **Abbildung 8** zu sehen ist, konnten mit diesem Testverfahren die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen bestätigt werden. In beiden Zelllinien führte die Behandlung sowohl mit TGF- $\beta$ 1 als auch mit tBHQ zu einer deutlich verminderten Zellviabilität, wobei auch hier die Effekte durch tBHQ ausgeprägter waren als die von TGF- $\beta$ 1. So führte die Stimulation mit dem Antioxidans zu einer Reduktion der Zellviabilität um ca. 86 % in beiden Zelllinien, während die TGF- $\beta$ 1-Stimulation die Zellviabilität um ca. 45 % in HPDE-pBp bzw. um ca. 38 % in HPDE-kras im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduzierte.



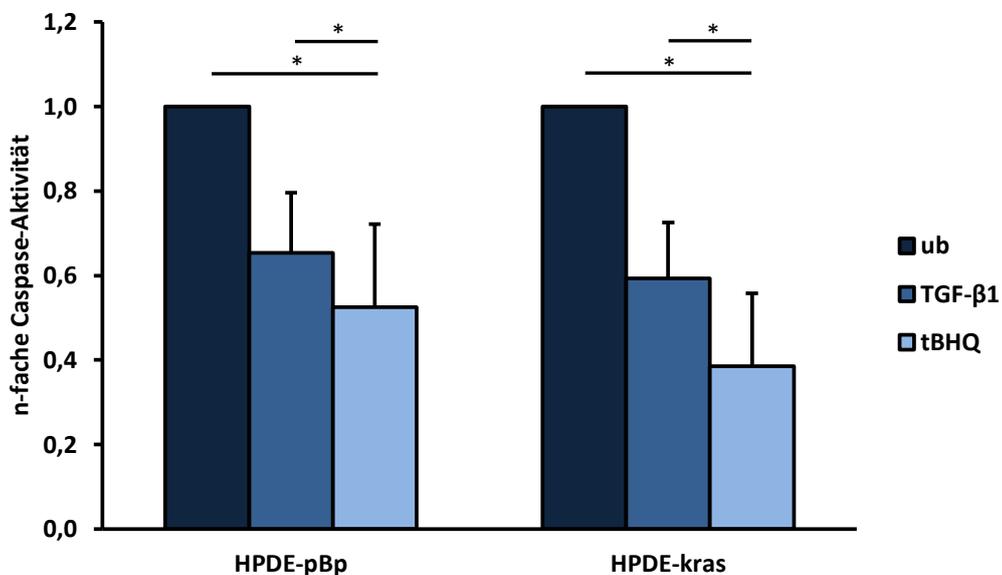
**Abbildung 8.** Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 144-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen. Dargestellt sind die im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessenen Extinktionen (OD MTS = optische Dichte im MTS-Assay) gemessenen Mittelwerten mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3 tBHQ führt zu einer verminderten Apoptoserate in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die durch tBHQ und TGF- $\beta$ 1 verminderte Lebendzellzahl bzw. Zellviabilität in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen auf eine erhöhte Induktion der Apoptose unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Dafür wurden beide Zelllinien mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ behandelt und die Caspase-3/7-Aktivität nach 48 Stunden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, bestimmt. Eine erhöhte Aktivität dieser beiden Effektorcaspasen kann als Maß für die Apoptoseinduktion gesehen werden (siehe 3.5).

Wie in **Abbildung 9** zu sehen ist, war sowohl in HPDE-pBp als auch in HPDE-kras Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bzw. tBHQ die Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zur jeweiligen un- behandelten Kontrolle vermindert (Reduktion um ca. 35 % in HPDE-pBp und 41 % in HPDE- kras durch TGF- $\beta$ 1). Die Effekte durch tBHQ waren dabei deutlich ausgeprägter und führten zu einer Reduktion der Caspase-Aktivität um 47 % in HPDE-pBp und 61 % in HPDE-kras Zel- len.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die durch TGF- $\beta$ 1 bzw. tBHQ verminderte Lebendzellzahl und Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen vornehmlich auf einer Inhibition der Zellteilung, jedoch nicht auf einer erhöhten Apoptoseinduktion beruht. Die Tatsache, dass die HPDE-kras Zellen ähnlich reagierten wie die Zellen ohne K-*ras*-Mutation, deutet auf einen vernachlässigbaren Einfluss der Mutation auf die beobachteten Effekte hin.



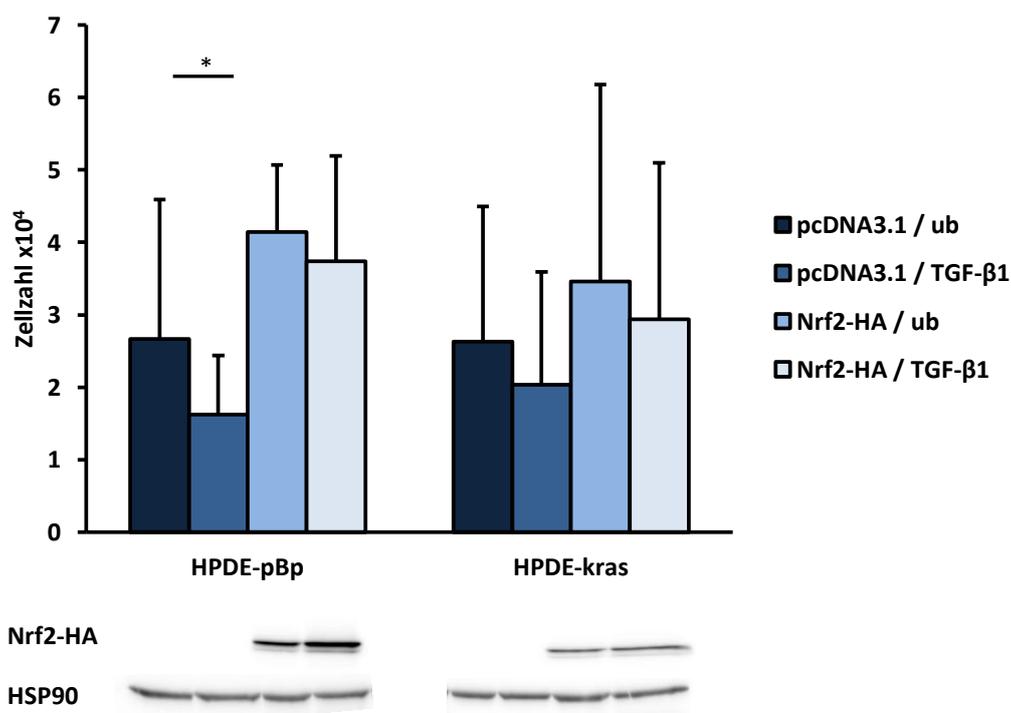
**Abbildung 9.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ub) mittels Caspase-3/7-Assay. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der n-fachen Caspase-3/7-Aktivität von behandelten Zellen bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde zuvor auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Nrf2 führt in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu einem erhöhten Zellwachstum und antagonisiert den wachstumshemmenden Effekt von TGF- $\beta$ 1

Da tBHQ wie oben erwähnt ein Nrf2-Aktivator ist, liegt der Verdacht nahe, dass erhöhte Nrf2-Spiegel bzw. eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors Ursachen der verminderten Teilungsrate sein könnten [50, 61, 86]. Ziel dieses Versuchs war es daher, diese Hypothe-

se zu überprüfen, indem HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mit einem Nrf2-HA-Plasmid bzw. einem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transfiziert wurden. So konnte das Zellwachstum in spezifischer Abhängigkeit von der Nrf2-Überexpression bestimmt werden. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Detektion von HA im Western Blot überprüft. Zur Überprüfung, ob durch Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 ähnliche Effekte vermittelt werden (worauf die unter 4.1.1 aufgeführten Daten hindeuten) und wie beide Faktoren zusammen wirken, wurden die transfizierten Zellen jeweils unbehandelt belassen oder für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Die gezählten Mittelwerte aus sechs Versuchen zeigt **Abbildung 10**.

In Einklang mit den vorherigen Versuchen führte die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 in beiden pcDNA3.1-transfizierten Zelllinien zu einer Verminderung der Lebendzellzahl. Entgegen der Stimulation mit dem Nrf2-Induktor tBHQ erhöhte die Überexpression von Nrf2 tendenziell die Anzahl an vitalen Zellen (Zunahme um ca. 55 % in HPDE-pBp und um ca. 32 % in HPDE-kras). Ferner wurde der wachstumshemmende Effekt von TGF- $\beta$ 1 in Anwesenheit von Nrf2 abgeschwächt.



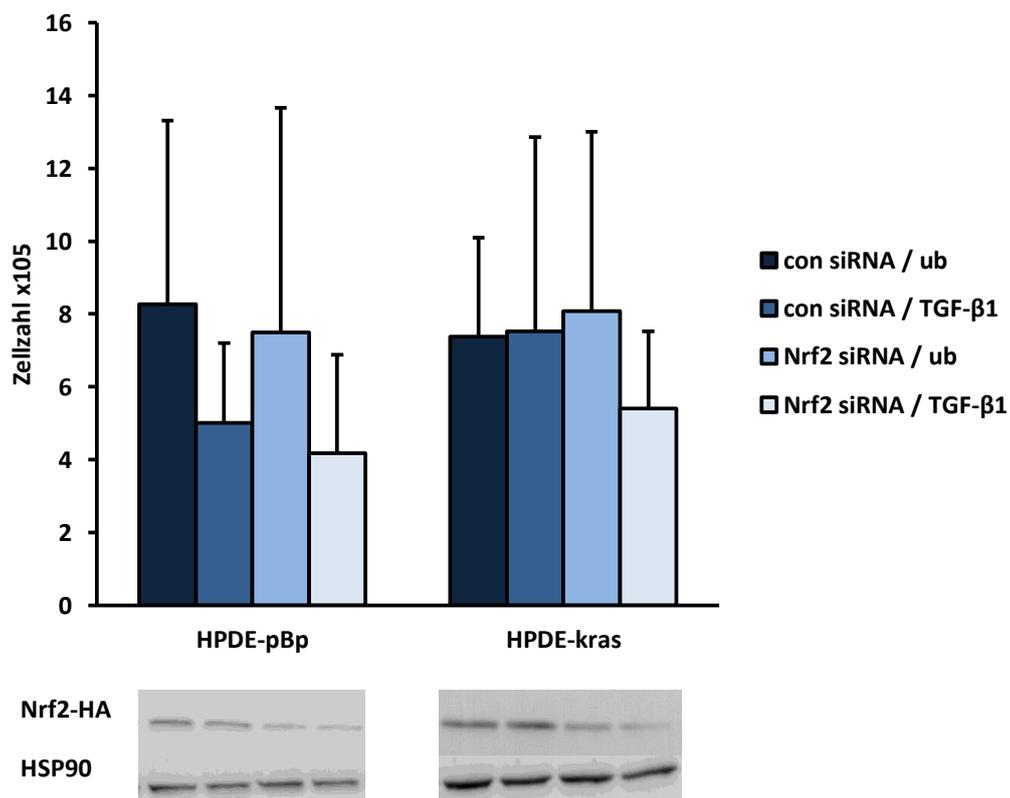
**Abbildung 10.** Bestimmung der Lebendzellzahl von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulationszeit mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von sechs unabhängigen Versuchen. \* = p < 0,05.

Da in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen eine gewisse basale Nrf2-Expression im Kern nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 6** in 4.1.1), sollte diese mittels siRNA-vermitteltem *Knockdown* in beiden Zelllinien vermindert werden und dessen Auswirkung auf das Zellwachstum in An- und Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 analysiert werden. Hierfür wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen ausgesät, nach 24 Stunden entweder mit *control* siRNA oder mit einer Nrf2-spezifischen siRNA transfiziert und nach weiteren 24 Stunden entweder für 48 Stunden mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Nrf2-Suppression wurde mittels Nrf2-Detektion im Western Blot nachgewiesen. Wie in

Nrf2-HA

HSP90

Abbildung 11 zu sehen, reduzierte die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 in kontrolltransfizierten HPDE-pBp Zellen die Anzahl der lebenden Zellen. In HPDE-kras Zellen war dieser Effekt nicht zu beobachten. In Einklang mit den Befunden nach Nrf2-Überexpression konnten nach Suppression der Nrf2-Expression leicht verminderte Lebendzellzahlen sowohl von HPDE-pBp als auch von HPDE-kras Zellen detektiert werden. Die geringste Anzahl an vitalen Zellen konnte nach Nrf2-*Knockdown* in Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 beobachtet werden.



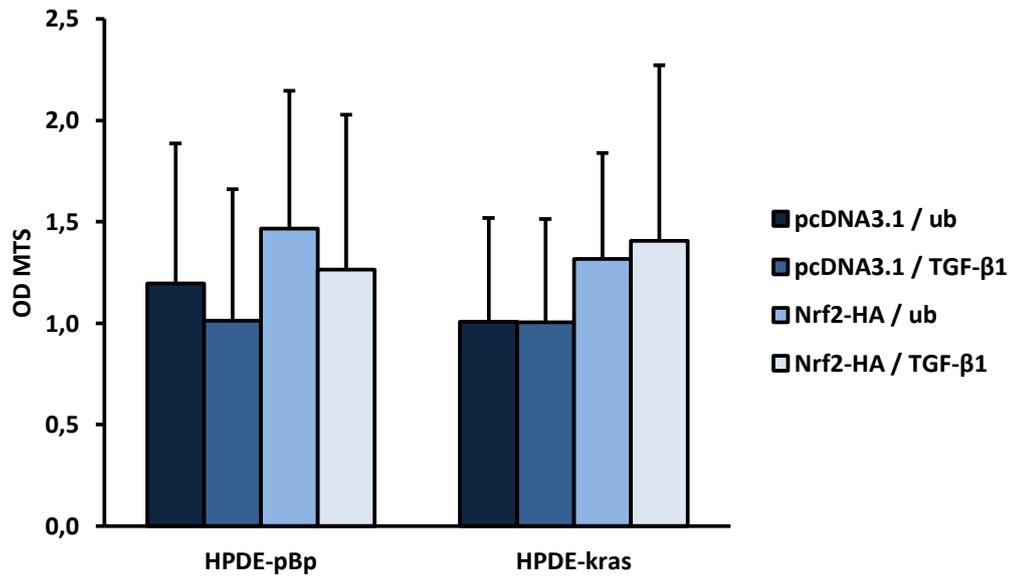
**Abbildung 11.** Bestimmung der Lebendzellzahl von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontroll-transfizierten (con siRNA) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Nrf2 auf HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen eine zellwachstumsfördernde Wirkung zu haben scheint. Dieser Effekt scheint unabhängig von mutiertem *K-ras* zu sein. Die unter tBHQ-Einfluss beobachtete Wachstumsinhibition scheint folglich nicht auf die tBHQ-vermittelte Nrf2-Induktion zurückzuführen zu sein, sondern vermutlich auf andere Signalwege, welche durch dieses Stimulans gegebenenfalls simultan aktiviert werden. Ferner deuten die Befunde darauf hin, dass Nrf2 in der Lage ist, dem wachstumsinhibitorischen Effekt von TGF- $\beta$ 1 entgegenzuwirken.

#### 4.1.5 Nrf2 erhöht die Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

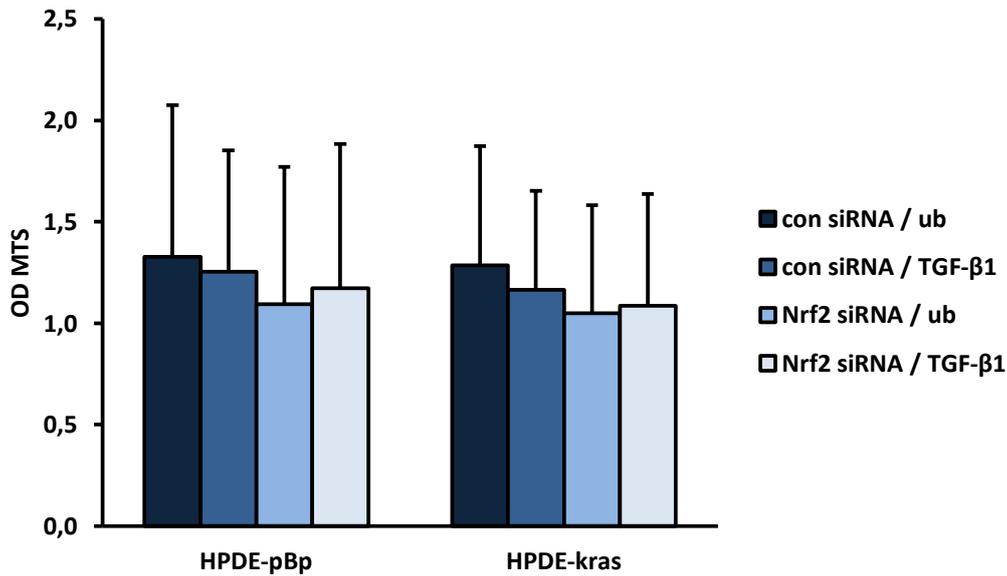
Ergänzend zur Zellzahlbestimmung nach Nrf2-Überexpression bzw. Nrf2-Suppression wurde die Zellviabilität der HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels MTS-Assay unter denselben Bedingungen (siehe 4.1.4) durchgeführt, um die beobachteten Phänomene mit einer weiteren Methode zu validieren.

Wie in **Abbildung 12** dargestellt, konnte mit dieser Methode der wachstumsfördernde Effekt von Nrf2 in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen bestätigt werden. Im Gegensatz zur Bestimmung der Lebendzellzahlbestimmung war hier jedoch die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Suppression der Zellviabilität in den pcDNA3.1-transfizierten Zellen sehr schwach (HPDE-pBp) bzw. nicht zu beobachten (HPDE-kras) und wurde durch die Nrf2-Überexpression weiter abgeschwächt.



**Abbildung 12.** Bestimmung der Zellviabilität von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels MTS-Assay nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessenen Extinktionen (OD MTS = optische Dichte im MTS-Assay) mit Standardabweichungen von fünf unabhängigen Versuchen.

Ähnlich schwach zeigte sich der Effekt von TGF-β1 (10 ng/ml, 48 Stunden Stimulation) auf *control* siRNA-transfizierter HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen im MTS-Assay (**Abbildung 13**). Genau entgegengesetzt zur vorangegangenen Nrf2-Überexpression äußerte sich der Nrf2-*Knockdown* in einer verminderten Zellviabilität beider Zelllinien verglichen mit kontrolltransfizierten Zellen. Diese steht im Einklang mit den zuvor bestimmten Lebendzellzahlen unter Nrf2-*Knockdown*. Entgegen den Befunden der Lebendzellzahlbestimmung konnte jedoch keine Verstärkung des inhibitorischen Effektes von TGF-β1 durch die Suppression von Nrf2 beobachtet werden (siehe 4.1.4).



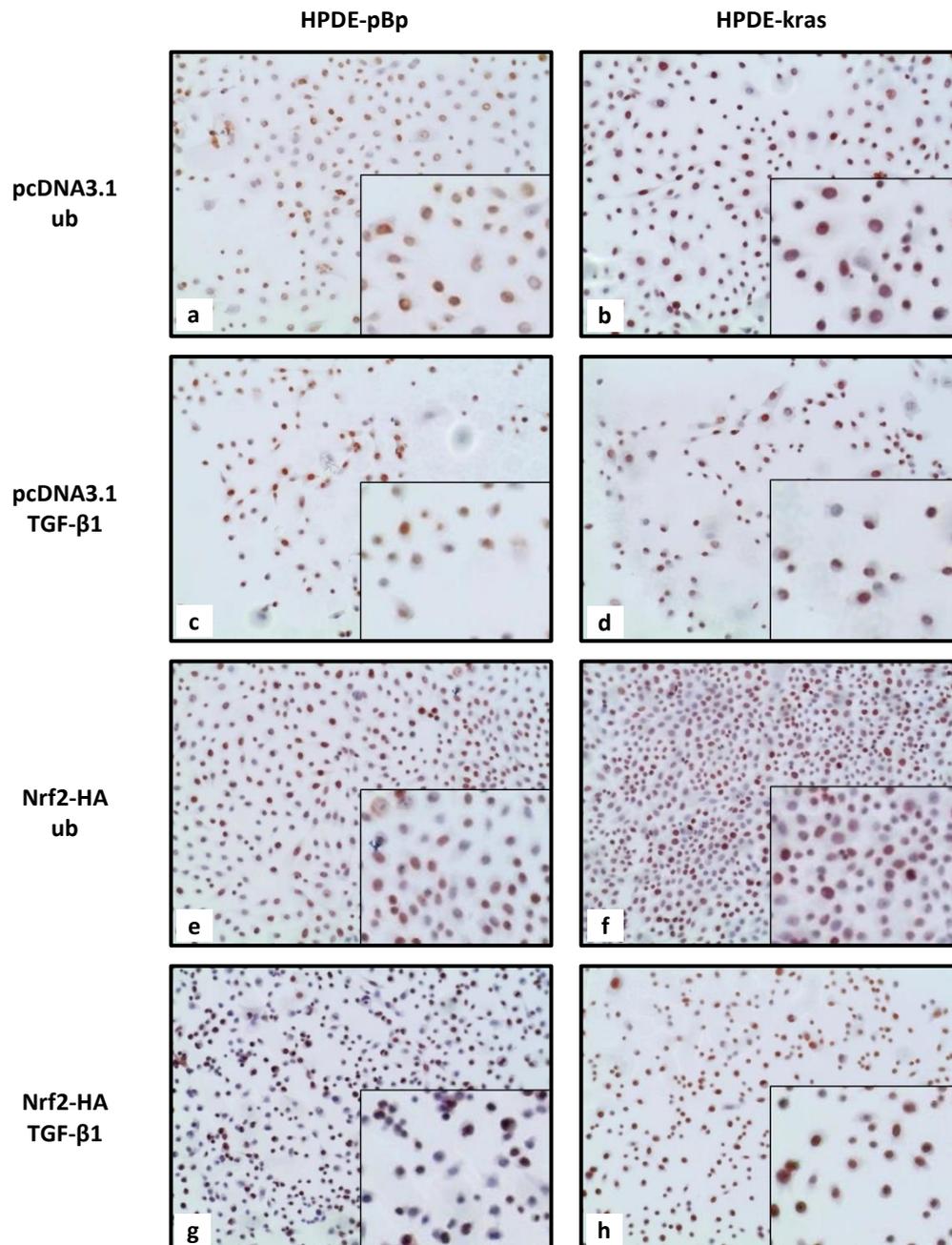
**Abbildung 13.** Bestimmung der Zellviabilität von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels MTS-Assay nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessenen Extinktionen (OD MTS = optische Dichte im MTS-Assay) mit Standardabweichungen von sieben unabhängigen Versuchen.

#### 4.1.6 Nrf2 steigert die Zellproliferation von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Zellzahl und Zellviabilität unter Nrf2-Einfluss (siehe 4.1.4 und 4.1.5) wäre eine erhöhte Proliferationstätigkeit der HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen. Nachweisen lässt sich dies durch Anfärbung des Proteins Ki-67, welches ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus vorhanden ist und damit die Unterscheidung zu ruhenden, sich in der G<sub>0</sub>-Phase befindlichen Zellen möglich macht (siehe 3.1.6) [84]. Die auf Deckgläschen ausgesäten HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen wurden zunächst mit pcDNA3.1 bzw. Nrf2-HA Plasmid oder mit *control* bzw. Nrf2 siRNA transfiziert. Danach wurden sie für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert oder unbehandelt belassen. Die **Abbildung 14** und **15** zeigen repräsentative Aufnahmen der mikroskopischen Analyse der Ki-67-Färbungen.

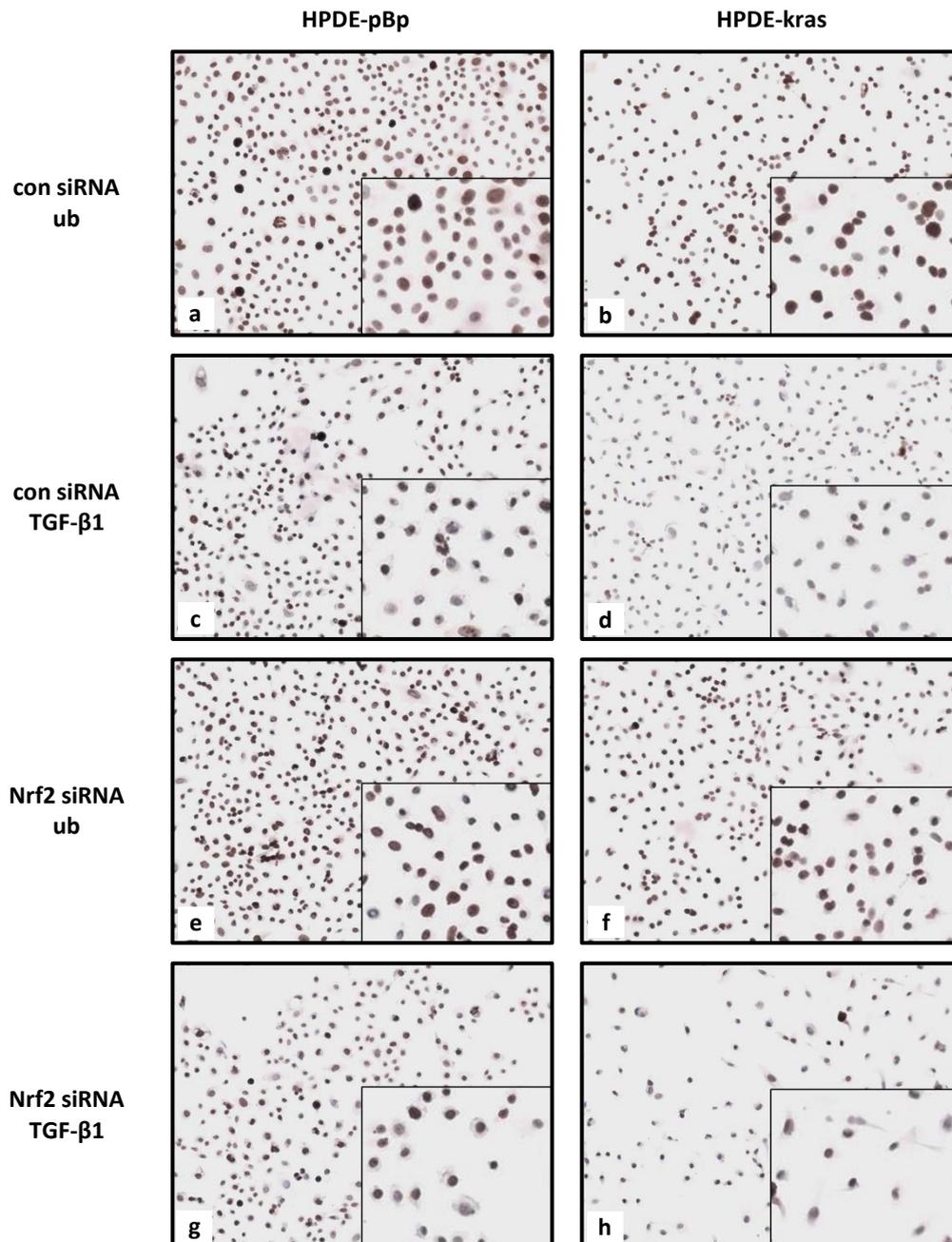
Im Vergleich zu den kontrolltransfizierten, unbehandelten Zellen (**Abbildung 14 a** und **b**) ist unter Stimulation mit TGF-β1 in beiden pcDNA3.1-transfizierten Zelllinien eine deutliche Verminderung der Zelldichte sowie der Ki-67-positiven Zellen zu verzeichnen (**Abbildung 14 c** und **d**). Ferner ist deutlich zu sehen, dass nach Transfektion mit dem Nrf2-HA-Plasmid sowohl HPDE-pBp als auch HPDE-kras Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (**Abbildung 14 a** und **b**) eine höhere Zelldichte sowie einen höheren Anteil Ki-67-positiver Zellen (**Abbildung 14 e** und **f**) aufweisen. Dies steht in Einklang mit der zuvor beobachteten

Nrf2-vermittelten gesteigerten Zellviabilität (siehe 4.1.4 und 4.1.5). Ebenfalls in Einklang mit den vorherigen Befunden waren bei den Nrf2-überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine höhere Zelldichte sowie ein höherer Anteil Ki-67-positiver Zellen zu detektieren als in den kontrolltransfizierten Zellen (**Abbildung 14 g und h**).



**Abbildung 14.** Ki-67-Färbungen von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Ki-67 positive Zellen erscheinen braun. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen bei 280-facher und bei 560-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt repräsentative Bilder der HPDE-pBp Zellen, die rechte Spalte repräsentative Bilder der HPDE-kras Zellen, (a und b) pcDNA3.1 und unbehandelt, (c und d) pcDNA3.1 und TGF- $\beta$ 1, (e und f) Nrf2-HA und unbehandelt, (g und h) Nrf2-HA und TGF- $\beta$ 1.

Wie in **Abbildung 15** zu sehen ist, hatte die siRNA-vermittelte Unterdrückung des Nrf2-Spiegels keinen Einfluss auf den Anteil Ki-67-positiver Zellen und damit auf die Proliferationsaktivität unbehandelter HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen. Unter Nrf2-Knockdown und gleichzeitiger TGF- $\beta$ 1 Stimulation hingegen war der Zellrasen sowohl in HPDE-pBp als auch in HPDE-kras Zellen deutlich aufgelockerter als in TGF- $\beta$ 1-stimulierten kontrolltransfizierten Zellen und es waren weniger Ki-67-exprimierende Zellen zu verzeichnen.



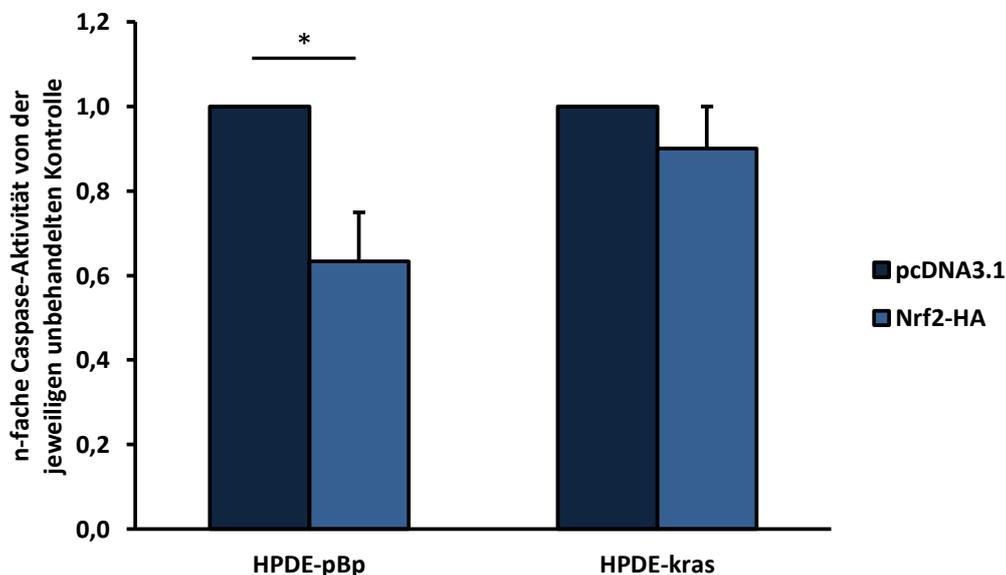
**Abbildung 15.** Ki-67-Färbungen von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Ki-67-positive Zellen erscheinen braun. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen bei 280-facher und bei 560-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt repräsentative Bilder der HPDE-pBp Zellen, die rechte Spalte repräsentative Bilder der HPDE-kras Zellen, (a + b) *control* siRNA und unbehandelt, (c + d) *control* siRNA und TGF- $\beta$ 1, (e + f) Nrf2 siRNA und unbehandelt, (g + h) Nrf2 siRNA und TGF- $\beta$ 1.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass Nrf2 das Zellwachstum und die Zellviabilität von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen, auch in Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1, durch eine verstärkte Zellproliferation erhöht.

#### 4.1.7 Nrf2 vermindert den Anteil apoptotischer HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

Zur Überprüfung, ob die Steigerung der Lebendzellzahl unter erhöhtem Nrf2-Level allein auf der Steigerung der Proliferationsaktivität oder aber auch gleichzeitig auf der Verminderung der Apoptoserate von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen beruht, wurde die Caspase-3/7-Aktivität von beiden Zelllinien nach Transfektion mit pcDNA3.1 bzw. Nrf2-HA Plasmid und nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. ohne eine weitere Behandlung bestimmt (**Abbildung 16** und **17**).

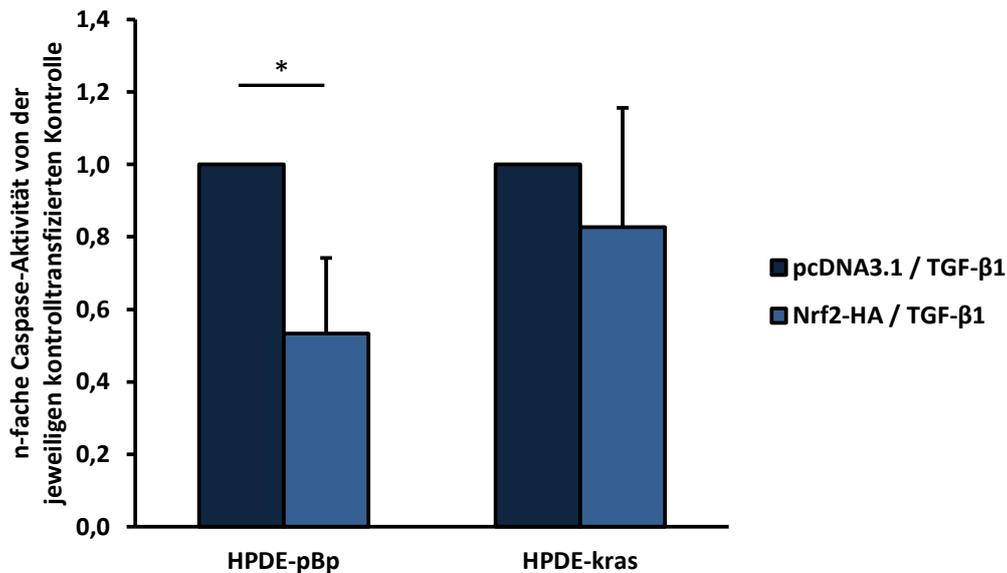
Wie in **Abbildung 16** zu sehen, führte die Überexpression von Nrf2 in beiden Zelllinien zu einer Senkung der Caspase-3/7-Aktivität, was mit einer Verminderung der Apoptoserate durch die Nrf2-Überexpression gleichzusetzen ist. In HPDE-pBp Zellen war der Nrf2-vermittelte negative Effekt auf die Caspaseaktivität dabei deutlicher ausgeprägter als in HPDE-kras Zellen.



**Abbildung 16.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der n-fachen Caspase-3/7-Aktivität von behandelten Zellen bezogen auf die jeweilige Kontrolle aus vier unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde zuvor auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert. \* =  $p < 0,05$ .

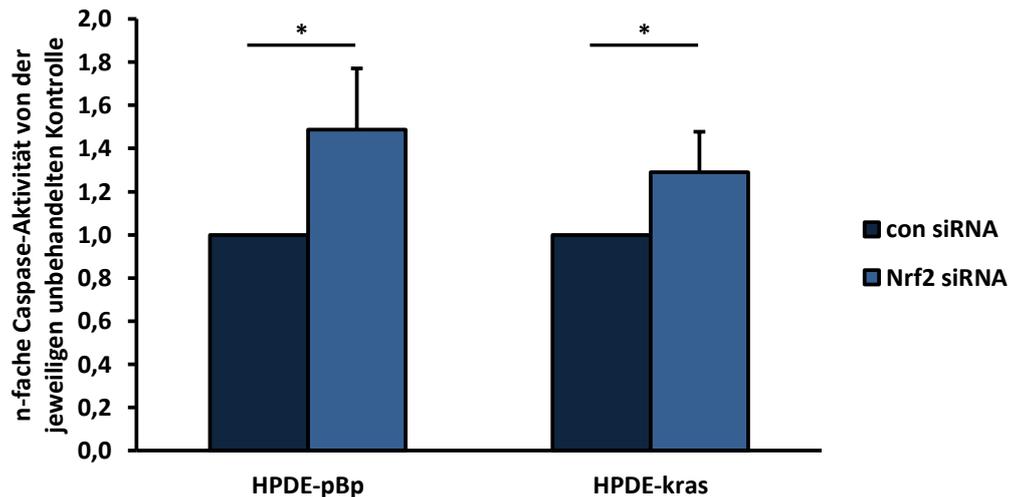
Unter TGF- $\beta$ 1-Einfluss bewirkte die gleichzeitige Transfektion mit dem Nrf2-HA Plasmid eine Verminderung der Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen in beiden Zelllinien (**Abbildung 17**). Der TGF- $\beta$ 1-vermittelte negative Effekt auf die Caspaseakti-

vität wurde also durch die Nrf2-Überexpression weiter verstärkt. Dieser Effekt war bei HPDE-pBp Zellen deutlicher als bei HPDE-kras Zellen.



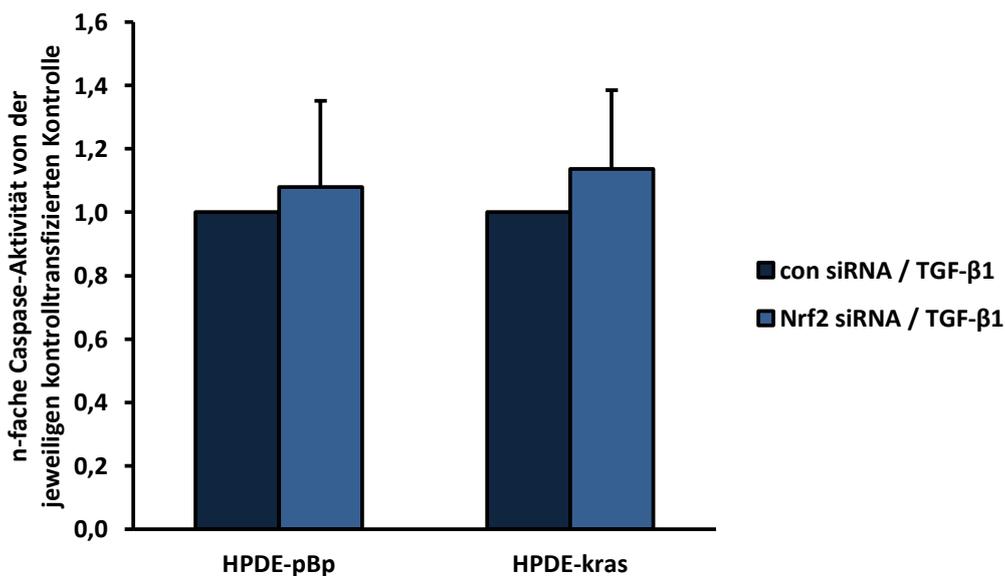
**Abbildung 17.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der n-fachen Caspase-3/7-Aktivität von Nrf2-HA-transfizierten Zellen bezogen auf die jeweiligen TGF-β1-behandelten, kontrolltransfizierten Zellen aus vier unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde zuvor auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert. \* =  $p < 0,05$ .

In Einklang mit den vorherigen Befunden unter Nrf2-Überexpression (**Abbildung 17**) führte die siRNA-vermittelte Unterdrückung von Nrf2 zu einer Erhöhung der Apoptoserate in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen (**Abbildung 18**). Wiederum fiel die Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität in HPDE-pBp Zellen höher aus als in HPDE-kras Zellen.



**Abbildung 18.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der n-fachen Caspase-3/7-Aktivität von behandelten Zellen bezogen auf die jeweilige Kontrolle aus vier unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde zuvor auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert. \* =  $p < 0,05$ .

Unter TGF- $\beta$ 1-Einfluss bewirkte die gleichzeitige Transfektion mit Nrf2 siRNA eine leichte Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen beider Zelllinien (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der n-fachen Caspase-3/7-Aktivität von Nrf2 siRNA-transfizierten Zellen bezogen auf die jeweiligen TGF- $\beta$ 1-behandelten, kontrolltransfizierten Zellen aus vier unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde zuvor auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen bei vermehrter Anwesenheit von Nrf2 eine leichte Verminderung der Apoptoserate sowie eine erhöhte Teilungsaktivität erfahren. Diese Effekte waren jedoch ausgeprägter im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$ 1. Die Tatsache, dass HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen in ähnlicher Weise reagierten, weist darauf hin, dass mutiertem K-*ras* eine untergeordnete Rolle zukommt.

## 4.2 Einfluss von Nrf2 auf EMT-assoziierte Veränderungen und Invasionsvermögen von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

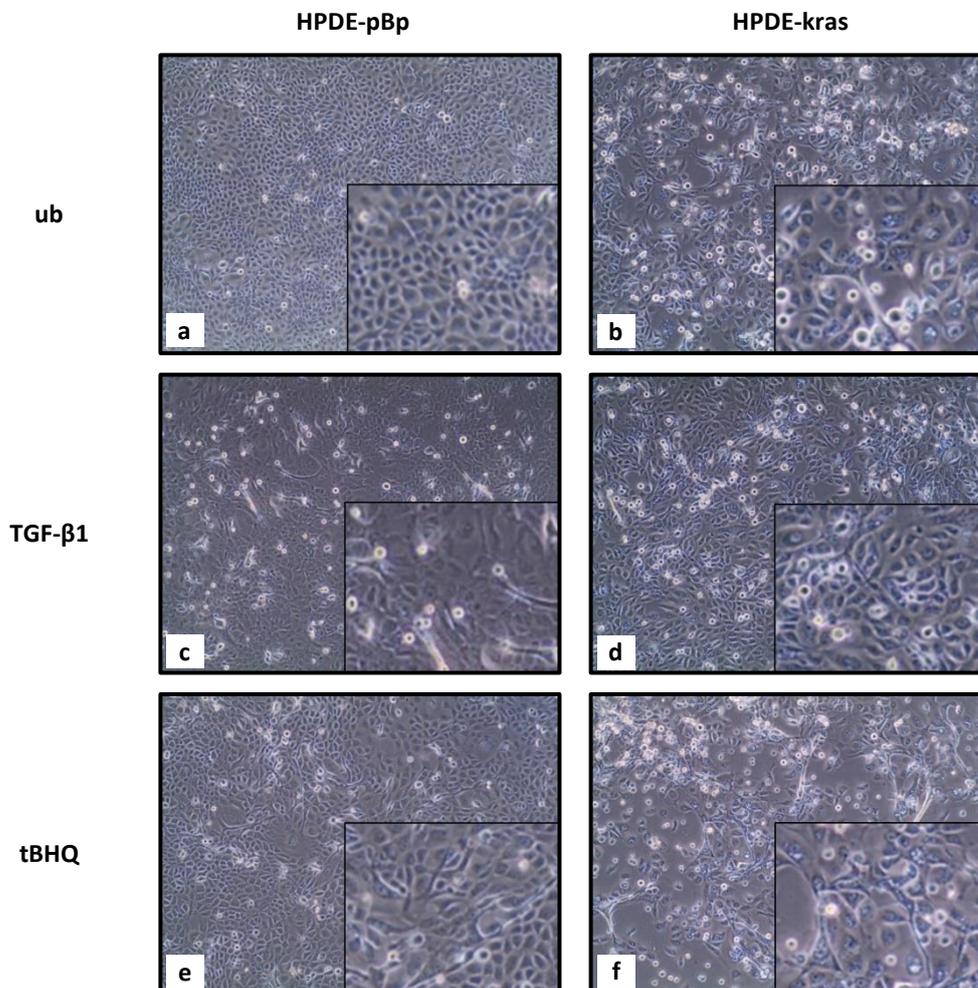
### 4.2.1 TGF- $\beta$ 1- und tBHQ-Stimulation führen in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu einem aufgelockerten Zellrasen mit spindelförmigen Zellen

TGF- $\beta$ 1 gilt als der am besten charakterisierte Induktor der EMT, einem Vorgang, bei dem Zellen ihre epithelialen Charakteristika zugunsten mesenchymaler Eigenschaften, wie Invasivität, Motilität und Apoptoseresistenz, verlieren (siehe 1.2) [40, 87]. In den vorherigen Versuchen zeigte sich, dass Nrf2 die anti-proliferative Wirkung von TGF- $\beta$ 1 antagonisieren und darüber ggf. zu dessen pro-tumorigener Wirkung beitragen kann. Als nächstes sollte daher untersucht werden, welche Effekte Nrf2, allein und im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$ 1, auf EMT-assoziierte Prozesse in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen ausübt. Dafür wurden beide Zelllinien zunächst mit 50  $\mu$ M tBHQ bzw. 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 für 72 Stunden stimuliert und deren Zellmorphologie mikroskopisch untersucht. **Abbildung 20** zeigt repräsentative Aufnahmen der Analyse.

Im Vergleich der unstimulierten Zelllinien untereinander zeigten sich die HPDE-pBp Zellen in einem für Epithelzellen typischen, dichten und homogenen Zellrasen aus runden bis polygonalen Zellen (**Abbildung 20 a**). Die Zelllinie HPDE-kras hingegen wies ein deutlich mesenchymaleres Erscheinungsbild auf (**Abbildung 20 b**). Der Zellrasen war deutlich aufgelockert und mit spindelförmigen Zellen durchsetzt. Die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bewirkte erwartungsgemäß in beiden Zelllinien eine Mesenchymalisierung des Phänotyps mit Auflockerung des Zellrasens und Zunahme des Zell-Zell-Abstandes (**Abbildung 20 c und d**). Vor allem die HPDE-kras Zellen zeigten sich gleichmäßig verteilt, gleichbedeutend mit einer Zunahme des Zell-Zell-Abstandes, und wiesen eine gestrecktere Morphologie auf.

Einen noch dünneren Zellrasen und die ausgeprägtesten Spindelformen bildeten die Zellen unter Stimulation mit tBHQ aus (**Abbildung 20 e und f**). Diese Merkmale waren wiederum

bei den HPDE-kras Zellen deutlich stärker ausgebildet. Sie bildeten sehr langgezogene, spindelförmige Zellen, welche in losen Zellkolonien wuchsen. Auch der Anteil toter Zellen, das heißt nicht adhärenter Zellen, nahm in beiden Zelllinien durch die Stimulation deutlich zu. Diese Resultate passen zu den Ergebnissen zur Zellviabilität unter denselben Bedingungen, welche zuvor untersucht wurde (siehe 4.1.1 und 4.1.2).



**Abbildung 20.** Morphologie von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ub) bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt repräsentative Bilder der HPDE-pBp Zellen, die rechte Spalte repräsentative Bilder der HPDE-kras Zellen, (a und b) unbehandelt, (c und d) stimuliert mit TGF- $\beta$ 1, (e und f) stimuliert mit tBHQ.

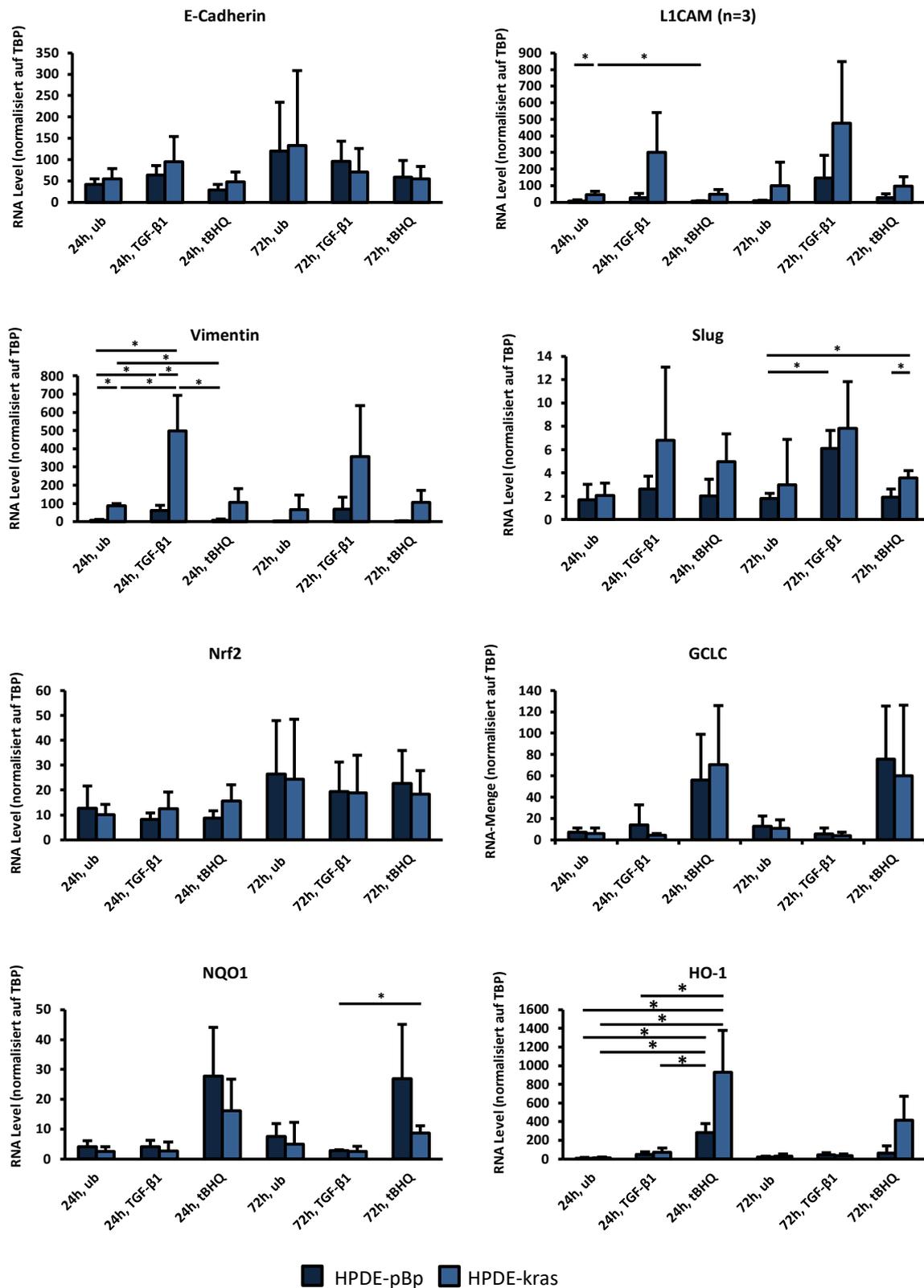
#### 4.2.2 TGF- $\beta$ 1 moduliert die Expression von EMT-Markern in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mehr als tBHQ

HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen wiesen nicht nur in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1, sondern auch nach Stimulation mit tBHQ deutliche morphologische Veränderungen auf, welche mit dem Durchlaufen der EMT assoziiert sein könnten. Daher sollte im Folgenden untersucht werden,

ob der Erwerb einer für mesenchymale Zellen typischen Zellmorphologie mit einem Expressionsverlust epithelialer Marker zugunsten der Expression mesenchymaler Markergene einhergeht. Dafür wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen für 24 bzw. 72 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ stimuliert, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mittels *Realtime* PCR wurden typische EMT-Marker (E-Cadherin, Vimentin, L1CAM, Slug), Nrf2 sowie Nrf2-Zielgene (GCLC, NQO1, HO-1) analysiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 21** dargestellt.

Nach 72-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 waren in beiden Zelllinien eine verminderte E-Cadherinexpression und eine deutliche Hochregulation von Vimentin, L1CAM und Slug zu verzeichnen. Dies entspricht einem mesenchymalen Expressionsprofil dieser EMT-Marker, welches im Einklang mit den phänotypischen Beobachtungen steht (siehe 4.2.1). Dabei zeigten sich die Effekte in den HPDE-kras Zellen ausgeprägter als in den HPDE-pBp Zellen. Außer einer Reduktion der E-Cadherinexpression konnten, im Gegensatz zu TGF- $\beta$ 1, in tBHQ-stimulierten Zellen keine wesentlichen mesenchymalen Änderungen beobachtet werden. Die Expression von Nrf2 war in beiden Zelllinien vergleichbar und allein durch die Kultivierungsdauer von 72 Stunden erhöht, blieb aber sowohl nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 als auch mit tBHQ unverändert. Hinsichtlich der Nrf2-Zielgene antworteten die Zellen auf den tBHQ-Stimulus mit einer deutlichen Induktion von GCLC, NQO1 und HO-1, die bereits nach 24 Stunden, aber auch noch nach 72 Stunden zu verzeichnen war. Durch die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 blieb die Expression dieser Gene hingegen unverändert. Diese Nrf2-Zielgene stehen demzufolge vermutlich nicht in Zusammenhang mit der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Modulation der EMT-Marker E-Cadherin, Vimentin, L1CAM und Slug.

Zusammenfassend bestätigten diese Befunde TGF- $\beta$ 1 als potenten Induktor der EMT in benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen. Die augenscheinliche morphologische EMT-Induktion durch tBHQ zeigte auf transkriptioneller Ebene der EMT-Marker jedoch kein eindeutiges Äquivalent. Nrf2 scheint weder durch TGF- $\beta$ 1 noch durch tBHQ transkriptionell reguliert zu werden. Ferner scheinen die Nrf2-Zielgene GCLC, NQO1 und HO-1 auf transkriptioneller Ebene zwar durch tBHQ, nicht aber durch TGF- $\beta$ 1 reguliert zu werden.

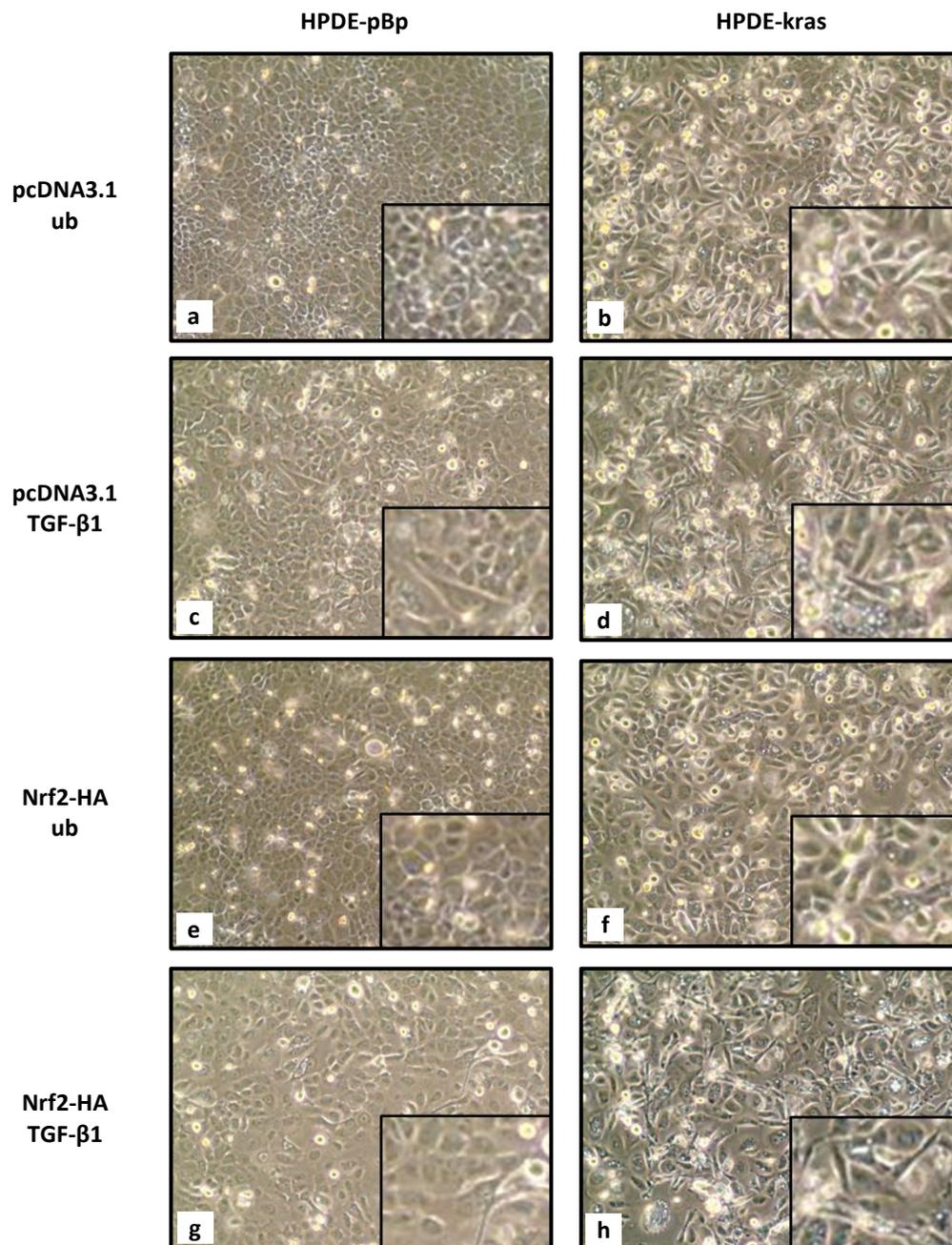


**Abbildung 21.** RT-Realtime Analyse verschiedener Zielgene in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 24- bzw. 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. mit 50 μM tbHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen. HPDE-pBp sind dunkelblau dargestellt, HPDE-kras blau. Alle Ergebnisse wurden auf TBP normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. \* p < 0,05.

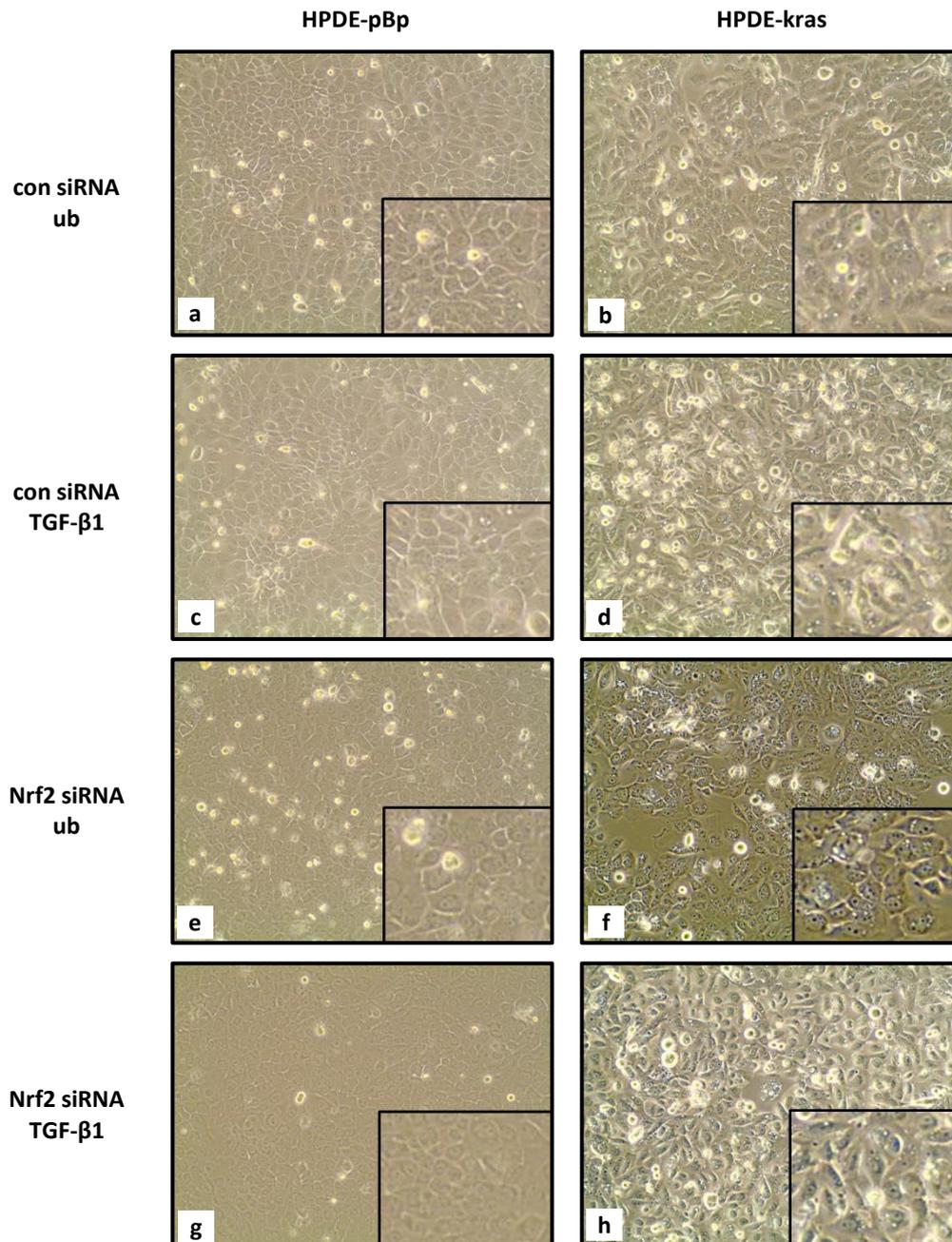
### 4.2.3 Nrf2 hat keinen Einfluss auf die Morphologie von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen

Um gezielt den Einfluss der Nrf2-Expression auf EMT-assoziierte Veränderungen zu untersuchen, wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zum einen mit Nrf2-HA bzw. Kontrollplasmid (pcDNA3.1) und zum anderen mit Nrf2-spezifischer bzw. *control* siRNA transfiziert und für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde überprüft, ob Nrf2 zu ähnlichen morphologischen Veränderungen beider Zelllinien führt wie die Stimulation mit tBHQ.

Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt, konnte die TGF- $\beta$ 1-vermittelte morphologische EMT-Induktion in den kontrolltransfizierten Zelllinien bestätigt werden (**Abbildung 22** und **23**), wobei der Effekt in den HPDE-kras Zellen wiederum ausgeprägter war. Im Gegensatz zur Behandlung mit tBHQ wurden diese Effekte weder durch Überexpression (**Abbildung 22**) noch durch Suppression von Nrf2 (**Abbildung 23**) verändert. Die transkriptionelle Veränderung des Nrf2-Levels hatte morphologisch also keinerlei Auswirkungen.



**Abbildung 22.** Morphologie Nrf2-überexprimierender (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt repräsentative Bilder der HPDE-pBp Zellen, die rechte Spalte repräsentative Bilder der HPDE-kras Zellen, (a und b) pcDNA3.1-Transfektion, unbehandelt, (c und d) pcDNA3.1-Transfektion, TGF-β1-Stimulation, (e und f) Nrf2-HA-Transfektion, unbehandelt, (g und h) Nrf2-HA-Transfektion, TGF-β1-Stimulation.

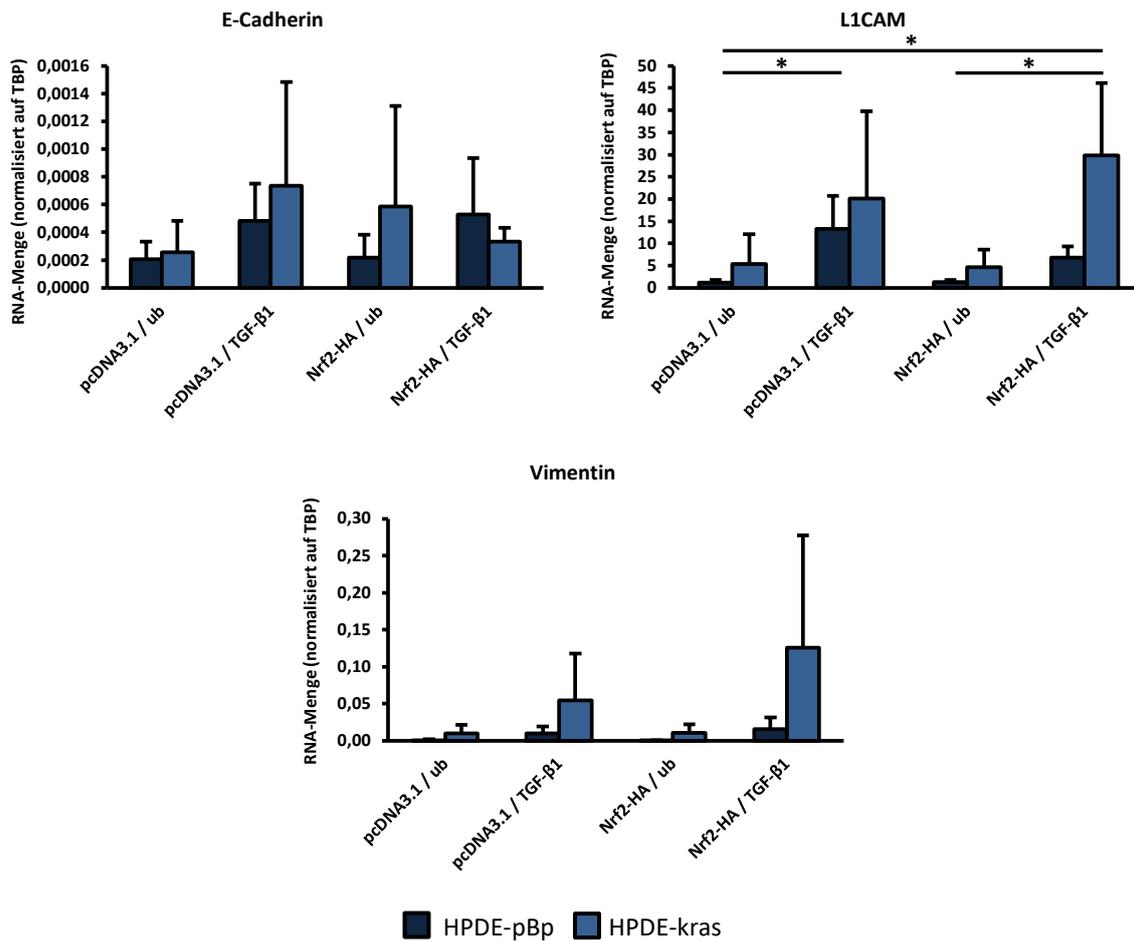


**Abbildung 23.** Morphologie Nrf2-supprimierter (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung. Die linke Spalte zeigt repräsentative Bilder der HPDE-pBp Zellen, die rechte Spalte repräsentative Bilder der HPDE-kras Zellen, (a und b) con siRNA-Transfektion, unbehandelt, (c und d) con siRNA-Transfektion, TGF-β1-Stimulation, (e und f) Nrf2 siRNA-Transfektion, unbehandelt, (g und h) Nrf2 siRNA-Transfektion, TGF-β1-Stimulation.

#### 4.2.4 Nrf2 beeinflusst die Expression von EMT-Markern auf transkriptioneller Ebene nur gering

Wenngleich Nrf2 keinen Einfluss auf die Morphologie bzw. auf die TGF- $\beta$ 1 vermittelte Mesenchymalisierung der Zellen hatte, sollte als nächstes untersucht werden, welche Effekte die Nrf2-Expression allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von EMT-Markern hat. Dazu wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zum einen mit Nrf2-HA bzw. Kontrollplasmid (pcDNA3.1) und zum anderen mit Nrf2-spezifischer bzw. *control* siRNA transfiziert und für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte eine Expressionsanalyse der EMT-Marker E-Cadherin, Vimentin und L1CAM mittels *Realtime PCR*. Die Ergebnisse der *Realtime PCR*-Analyse der Nrf2-überexprimierenden HPDE Zellen sind in **Abbildung 24** dargestellt.

Die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 führte in den Kontrollgruppen beider Zelllinien zu einem Anstieg des Expressionslevels von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin. Durch die Überexpression von Nrf2 wurde die Expression dieser drei Gene kaum verändert. In Kombination mit TGF- $\beta$ 1 waren leichte Veränderungen zu beobachten. So war die Expression von E-Cadherin leicht vermindert, wohingegen die Expression von Vimentin und L1CAM im Vergleich zu pcDNA3.1-transfizierten und TGF- $\beta$ 1 stimulierten Zellen tendenziell erhöht war. Diese Tendenz konnte bei HPDE-kras Zellen stärker beobachtet werden als bei HPDE-pBp Zellen.

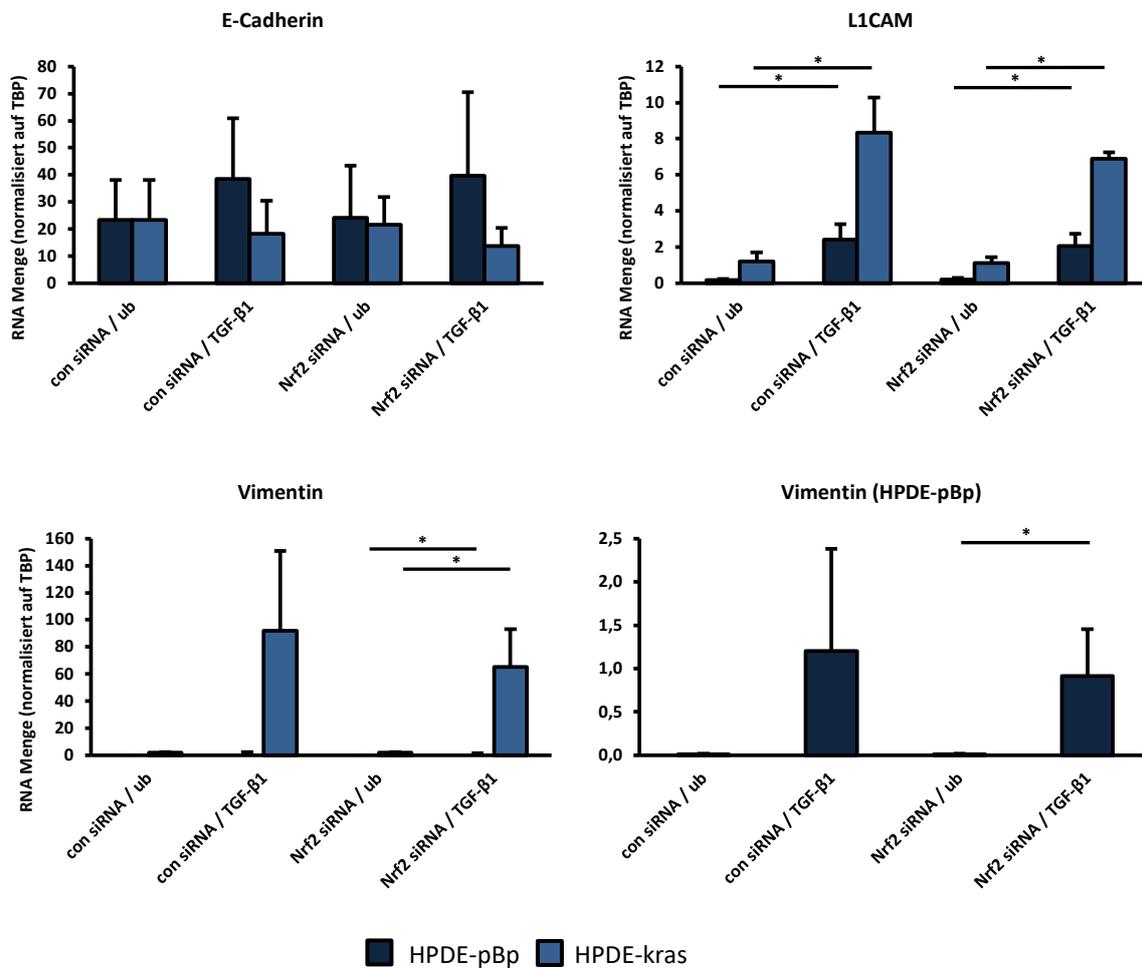


**Abbildung 24.** RT-Realtime Analyse verschiedener EMT-assoziiierter Gene in Nrf2-überexprimierenden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. HPDE-pBp sind dunkelblau dargestellt, HPDE-kras blau. Alle Ergebnisse wurden auf TBP normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. \*  $p < 0,05$ .

Zur Verminderung der Nrf2-Level wurden beide Zelllinien mit Nrf2 bzw. *control* siRNA zur Kontrolle transfiziert. Anschließend blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert.

Auch hier führte die Stimulation mit TGF-β1 in *control* siRNA-transfizierten HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu einem Anstieg der mesenchymalen Marker Vimentin und L1CAM, wobei die Effekte in HPDE-kras Zellen wiederum stärker ausgeprägt waren als in den HPDE-pBp Zellen. Hinsichtlich der E-Cadherinexpression war in den HPDE-pBp Zellen eine leichte Induktion, in HPDE-kras Zellen hingegen eine leichte Verminderung zu detektieren. Die siRNA-vermittelte Verminderung der Nrf2-Expression änderte weder in unbehandelten noch in TGF-β1-behandelten Zellen beider Zelllinien die Expression von E-Cadherin. Hinsichtlich der mesenchymalen Marker Vimentin und L1CAM war hingegen eine leicht verminderte TGF-β1-

vermittelte Induktion nach *Nrf2-Knockdown* zu beobachten, was mit den Ergebnissen von *Nrf2*-überexprimierenden Zellen in Einklang steht.



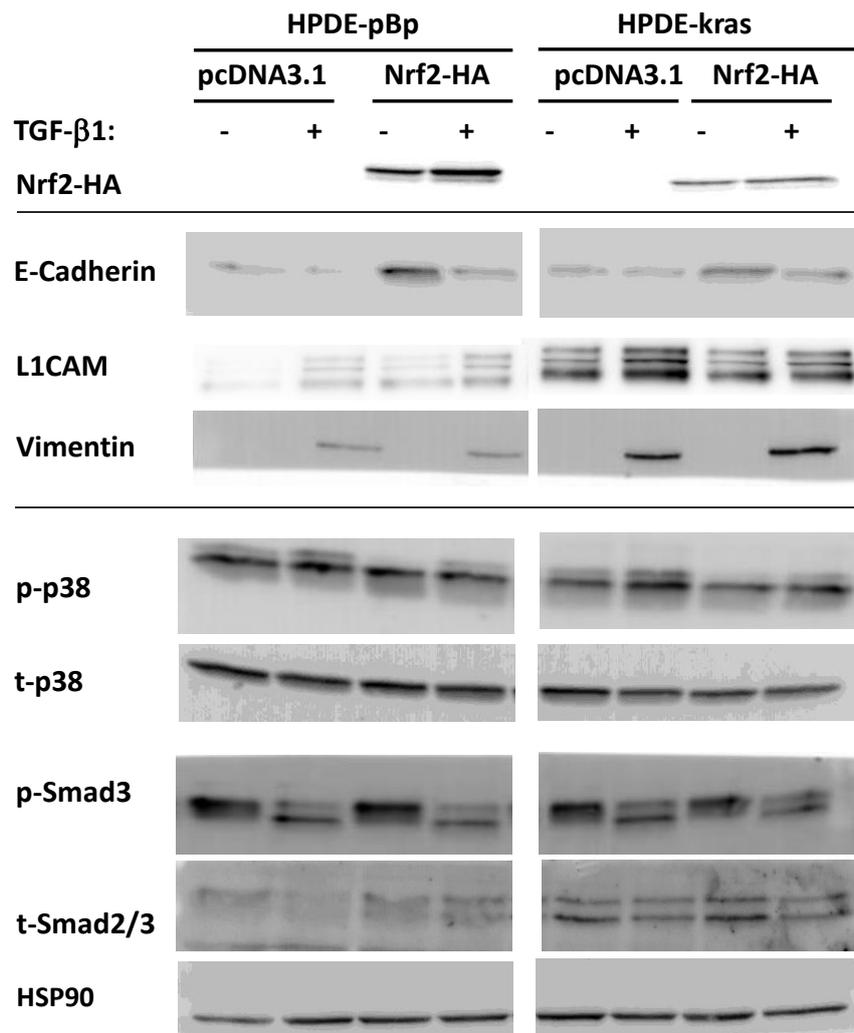
**Abbildung 25.** RT-Realtime-Analyse verschiedener EMT-assoziiierter Gene in *Nrf2*-supprimierten (*Nrf2* siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. HPDE-pBp sind dunkelblau dargestellt, HPDE-kras blau. Alle Ergebnisse wurden auf TBP normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. \*  $p < 0,05$ . Aus Gründen der besseren Darstellung wurden die Transkriptionslevel von Vimentin in HPDE-pBp Zellen zusätzlich separat dargestellt.

Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass *Nrf2* keinen bzw. nur einen geringfügigen Einfluss auf die Expression der hier untersuchten EMT-Marker in benignen und prä-malignen Pankreasgangepithelzellen hat. Auch die TGF-β1-vermittelten Effekte auf diese Marker werden dadurch nur geringfügig modifiziert. Darüber hinaus ist das mesenchymalere Transkriptionsprofil der HPDE-kras Zellen, sowohl basal als auch TGF-β1-vermittelt, kongruent zu deren mesenchymalen Phänotyp unter diesen Bedingungen.

#### 4.2.5 Der Effekt von Nrf2 auf die EMT-Markereexpression ist auch auf Proteinebene gering

Ergänzend zu den Analysen auf RNA-Ebene (siehe 4.2.2 und 4.2.4) sollte die Expression EMT-assoziiierter Gene in Abhängigkeit von Nrf2 auch auf Proteinebene mithilfe von Western Blots verifiziert werden. Ferner sollte mit der Detektion der phosphorylierten Formen von Smad3 und p38 MAPK zwei Signalwege untersucht werden, durch die TGF- $\beta$ 1 seine Wirkung auf Zellwachstum und EMT-assoziierte Veränderungen in Epithelzellen vermittelt (siehe 1.2.4). Dafür wurden Ganzzelllysate aus HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen generiert, die entweder mit Nrf2-HA bzw. Kontrollplasmid (pcDNA3.1) oder mit Nrf2-spezifischer bzw. *control* siRNA transfiziert und danach für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Repräsentative Western Blots sind in **Abbildung 26** und **27** zu sehen. Die Effektivität der Plasmidtransfektion wurde mittels eines HA-spezifischen Antikörpers überprüft, der an den HA-Tag des durch das Plasmid kodierten Nrf2 bindet.

Die TGF- $\beta$ 1-Stimulation führte in kontrolltransfizierten Zellen zur Repression von E-Cadherin und zur Induktion von L1CAM und Vimentin. Unter Überexpression von Nrf2 waren eine höhere Expression von E-Cadherin und eine leichte Repression von L1CAM und Vimentin zu verzeichnen. Ferner konnte in beiden Zelllinien unter Überexpression von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1-Stimulation geringere Level an phosphoryliertem p38 und Smad3 detektiert werden. Diese Unterdrückung TGF- $\beta$ 1-induzierter Signalwege steht in Einklang mit der höheren Proliferationsfähigkeit unter diesen Bedingungen (siehe in 4.1.4).

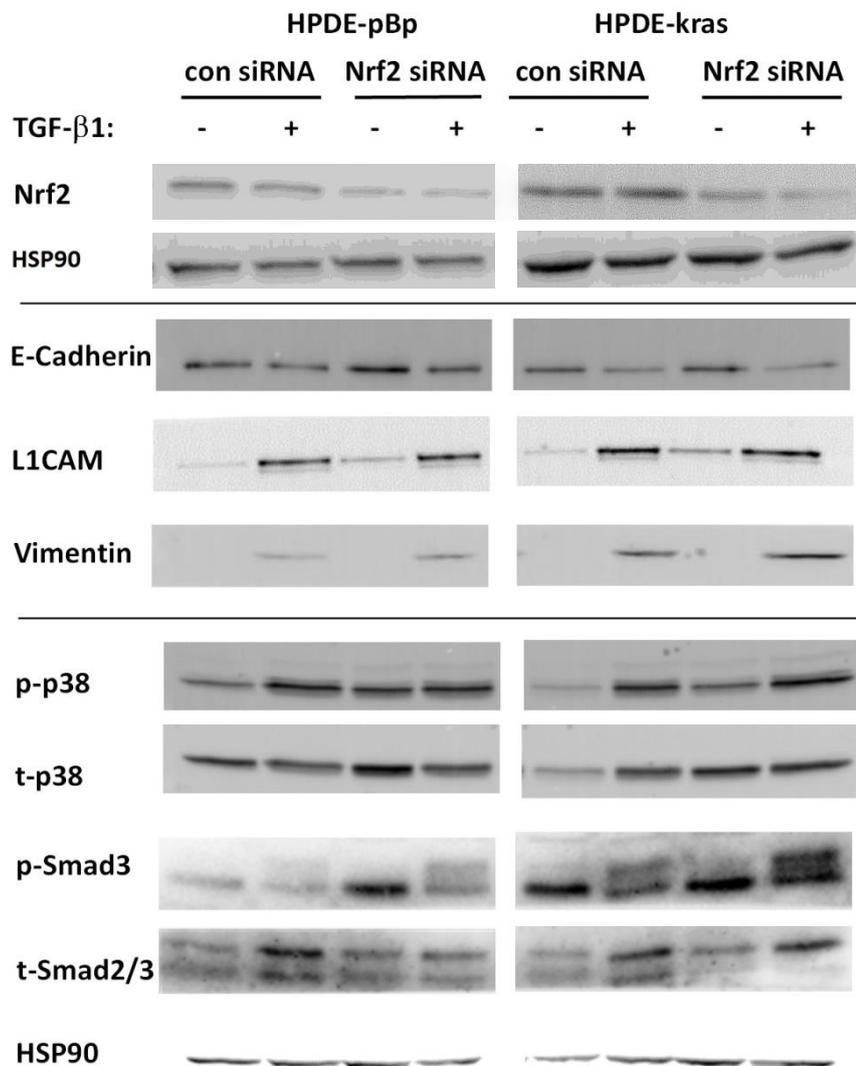


**Abbildung 26.** Westernblot-Analyse von Ganzzelllysaten Nrf2-überexprimierender (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Zur Überprüfung des Proteinauftrags wurde HSP90 detektiert. Ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Als nächstes sollte überprüft werden, wie sich die Suppression der Nrf2-Spiegel auf die Expression der EMT-Marker und die beiden TGF- $\beta$ 1-abhängigen Signalwege auswirkt. Die Effektivität des Nrf2-*Knockdowns* wurde durch Detektion von Nrf2 in Ganzzelllysaten von transfizierten HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen überprüft (**Abbildung 27**).

Im Gegensatz zu den Befunden nach Nrf2-Überexpression, hatte die Verminderung von Nrf2 in beiden Zelllinien weder einen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression noch auf die Expression der mesenchymalen Marker L1CAM und Vimentin. Auch die TGF- $\beta$ 1-abhängigen Effekte auf die EMT-Marker blieben durch den Nrf2-*Knockdown* unverändert. Jedoch konnte, in Einklang mit den Effekten der Nrf2-Überexpression, unter Nrf2-Suppression sowohl eine ver-

stärkte Phosphorylierung von p38 als auch von Smad3 in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen verzeichnet werden.



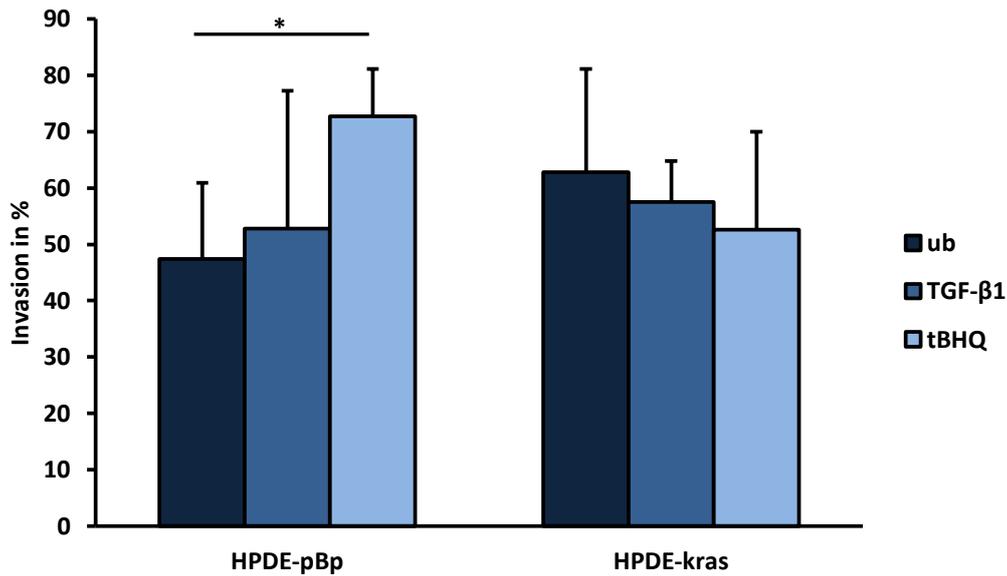
**Abbildung 27.** Westernblot-Analyse von Ganzzelllysaten Nrf2-supprimierter (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Zur Überprüfung des Proteinauftrags wurde HSP90 detektiert. Ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die Expression der EMT-Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin sowie deren TGF-β1-vermittelte Änderungen in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nicht maßgeblich durch Nrf2 moduliert werden. Jedoch geben die Ergebnisse zur unterschiedlichen Phosphorylierung von p38 und Smad3 Hinweise auf Interaktionen von Nrf2 mit TGF-β1-Signalwegen.

#### 4.2.6 TGF- $\beta$ 1 und tBHQ steigern nur in HPDE-pBp Zellen, nicht aber in HPDE-kras Zellen die Invasionsfähigkeit

Die Gewebeinvasion und die verstärkte Migrationsfähigkeit gehören zu den entscheidenden Merkmalen von Tumorzellen und sind auch für die Pathogenese des PDAC essentiell [52]. Auch wenn es bisher nur wenige Studien über den Beitrag von Nrf2 zu diesem Prozess gibt, konnte ihm bereits eine Bedeutung in der Metastasenbildung des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen werden [67]. Es wird zudem die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Invasion und Metastasierung initiieren, vermutet. Dies geschieht offenbar vor allem unter hypoxischen Bedingungen der Tumorumgebung [79]. Zur Überprüfung des Einflusses von Nrf2 allein bzw. in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 auf das Invasionsverhalten benigner und prämaligener Pankreasgangepithelzellen, wurden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zunächst über einen Zeitraum von 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 oder 50  $\mu$ M tBHQ stimuliert. Dann wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer die Zellinvasion durch eine Kollagen I-Matrix untersucht (siehe 3.6). Die Ergebnisse der Analyse zeigt **Abbildung 28**.

HPDE-kras Zellen wiesen, analog zu dem zuvor identifizierten mesenchymaleren Phänotyp (siehe 4.2.1 und 4.2.3), eine höhere Invasionsfähigkeit als die HPDE-pBp Zellen auf. Interessanterweise konnte in HPDE-pBp Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, aber vor allem mit tBHQ ein deutlich erhöhter Anteil invadierter Zellen detektiert werden. In HPDE-kras Zellen vermochten beide Stimulanzen die Invasionsfähigkeit hingegen nicht zu erhöhen. Vielmehr war der Anteil invadierter Zellen nicht geringer als bei unstimulierten HPDE-kras Zellen.

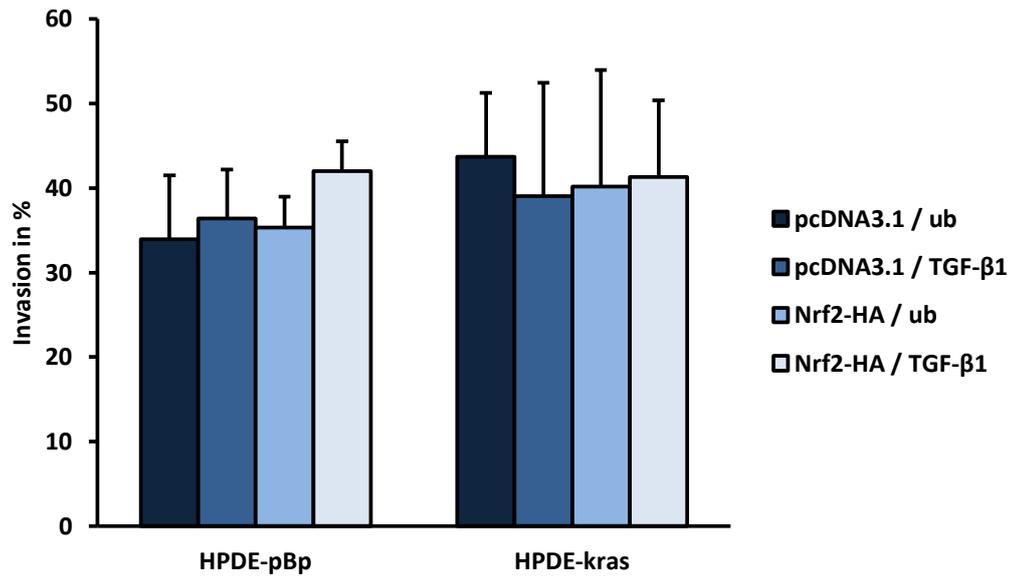


**Abbildung 28.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen. Die Daten zeigen den Prozentsatz invadierter Zellen und sind anhand von Mittelwerten mit Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen dargestellt. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.2.7 Die Zellinvasion von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen erfolgt Nrf2-unabhängig

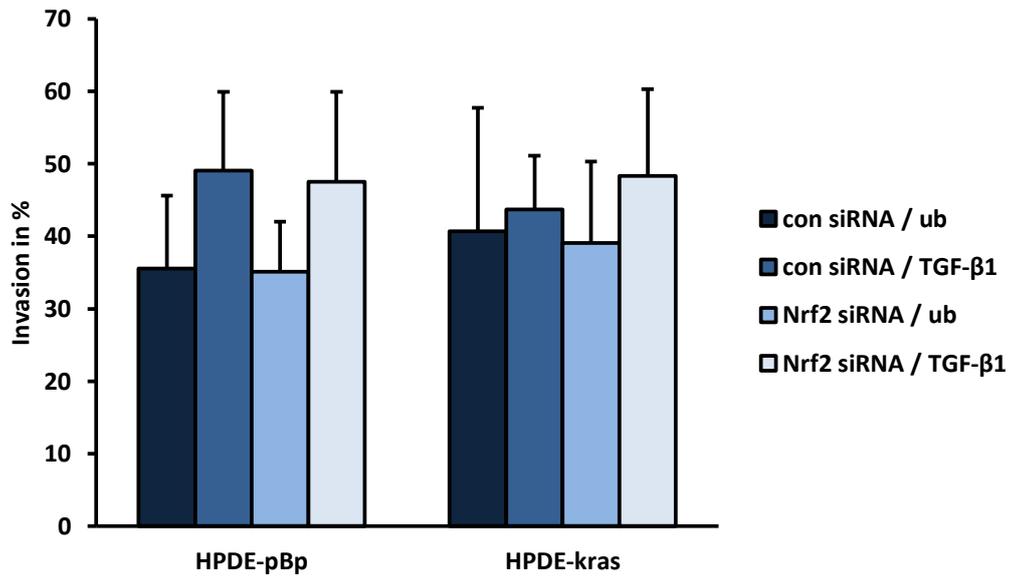
Um den Einfluss von Nrf2 allein und im Zusammenspiel mit TGF-β1 auf die Invasionsfähigkeit von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen zu untersuchen, wurden beide Zelllinien zum einen mit Nrf2-HA bzw. Kontrollplasmid (pcDNA3.1) und zum anderen mit Nrf2-spezifischer bzw. *control* siRNA transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert oder unbehandelt belassen, um anschließend das Invasionsvermögen durch eine Kollagen I-Matrix in einer modifizierten Boyden-Kammer zu analysieren. Die Ergebnisse des Invasionsassays sind in **Abbildung 29** und **30** zu sehen.

Erneut fiel die stärkere basale Invasionsfähigkeit der HPDE-kras Zellen im Vergleich zu HPDE-pBp Zellen auf. Diese wurde jedoch weder durch die Stimulation mit TGF-β1 noch durch den erhöhten Spiegel von Nrf2 wesentlich verändert. Es war sogar eher ein leichter Rückgang der Invasionsfähigkeit zu beobachten. Während die Überexpression von Nrf2 allein keinen Effekt auf die basale Invasionsfähigkeit von HPDE-pBp Zellen hatte, wurde die TGF-β1-induzierte Invasion dieser Zellen leicht verstärkt.



**Abbildung 29.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen. Die Daten zeigen den Prozentsatz invadierter Zellen und sind anhand von Mittelwerten mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Invasionsassays von *control* siRNA-transfizierten HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen bestätigten den stärkeren invasionssteigernden Effekt von TGF-β1 in HPDE-pBp im Vergleich zu den HPDE-kras Zellen. Die siRNA-vermittelte Verminderung der Nrf2-Expression in beiden Zelllinien beeinflusste weder deren basale Zellinvasion noch deren Invasionsverhalten nach TGF-β1 Stimulation.



**Abbildung 30.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen. Die Daten zeigen den Prozentsatz invadierter Zellen und sind anhand von Mittelwerten mit Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen dargestellt.

Zusammenfassend deuten die Befunde der Invasionsassays darauf hin, dass *K-ras*-mutierte HPDE Zellen basal invasiver sind als *K-ras*-Wildtyp-HPDE Zellen, in Letzteren jedoch die Invasionsfähigkeit durch TGF-β1 stärker erhöht werden kann. Da keine bzw. nur schwache Effekte durch Modulation der Nrf2-Spiegel auf die basale sowie TGF-β1-induzierte Zellinvasion in beiden Zelllinien verzeichnet werden konnte, scheint die Zellinvasion benignere und prä-maligner Pankreasgangepithelzellen – auch im Kontext von TGF-β1 – eher unabhängig von Nrf2 zu erfolgen.

## 5 DISKUSSION

Für die Entwicklung und die zelluläre Homöostase von Epithelien repräsentiert TGF- $\beta$ 1, u.a. durch seine stark anti-proliferative, zytoprotektive, apoptoseregulierende und tumorsuppressive Wirkungen, einen zentralen Regulator. Maligne Zellen unterliegen diesen regulierenden Eigenschaften nicht mehr, sondern sind durch autonomes Proliferations- und Migrationsverhalten gekennzeichnet. Paradoxe Weise wird TGF- $\beta$ 1 auch mit diesen Phänomenen in Zusammenhang gebracht. So konnte gezeigt werden, dass pathologische TGF- $\beta$ 1-Signalwege maligne Eigenschaften, wie das ungehemmte Tumorwachstum, die Zellmigration und die Chemoresistenz fördern [88, 89]. Der ubiquitär produzierte Botenstoff birgt also ein hohes onkogenes Potential, ist darüber hinaus der am besten charakterisierte Induktor der EMT und leistet einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung des PDAC (siehe 1.2.4) [51, 52, 90]. Die Ursachen dieser paradoxen Wirkungen sind bisher nur ansatzweise erforscht. So scheinen beispielsweise Mutationen im *K-ras*-Onkogen oder der vermehrte Einfluss inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6 oder TNF- $\alpha$ , in benignen und malignen Epithelzellen zur Aktivierung von MAP-Kinasen wie ERK zu führen. Dies resultiert in der gesteigerten TGF- $\beta$ 1-Synthese und einem mesenchymalen, invasiven Phänotyp [88, 91, 92].

Die Ergebnisse unserer vorliegenden Arbeit weisen auf weitere mögliche Ursachen der beschriebenen Wirkungsumkehr von TGF- $\beta$ 1 im Zusammenhang mit dem anti-oxidativen Transkriptionsfaktor Nrf2 hin, welcher mit der inflammatorischen, pankreatischen Karzinogenese ebenfalls in engem Zusammenhang steht. Schützt er im gesunden Gewebe die Zellen durch Induktion einer Vielzahl zytoprotektiver Enzyme und Gene vor oxidativem und elektrophilem Stress, so ist er gleichzeitig ein Protoonkogen, welches kontextabhängig den malignen Entartungsprozess begünstigen kann [57, 60, 69, 93]. Nrf2 kommt also eine dem TGF- $\beta$ 1 ähnliche, duale Rolle im Entartungsprozess zu (siehe 1.3). Inwiefern sich potentielle Interaktionen beider Signalwege in Abhängigkeit von mutiertem *K-ras* bereits auf die sehr frühe pankreatische Karzinogenese auswirken, war Gegenstand dieser Arbeit und soll im Folgenden diskutiert werden.

## 5.1 Wechselwirkung von TGF- $\beta$ 1, Nrf2 und K-ras und dessen Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Apoptoserate in HPDE Zellen

Gegenstand der ersten Versuche war zu untersuchen, inwiefern TGF- $\beta$ 1, Nrf2 und das mutierte Onkogen *K-ras* Einfluss auf Eigenschaften wie Proliferation, Zellviabilität und Apoptoserate nehmen. In dieser Intention wurden Zellzahlbestimmungen (siehe 4.1.1), MTS-Assays (siehe 4.1.2) und Caspase 3/7-Assays (siehe 4.1.3) unter Variation der TGF- $\beta$ 1- und Nrf2-Level an HPDE-pBp und HPDE-*kras* Zellen durchgeführt. Wie zu erwarten waren in beiden Zelllinien sowohl die Zellzahl als auch die Zellviabilität nach Stimulation mit dem antiproliferativ wirkenden TGF- $\beta$ 1 deutlich reduziert. Dies deutet auf die physiologische, Hyperproliferation vermeidende Wirkung des Zytokins hin, welche sich hier *K-ras*-unabhängig präsentierte [51, 89]. Zudem kam es unter dem Einfluss des Nrf2-Aktivators tBHQ zu einer noch stärker ausgeprägten Reduktion der Zellzahl und der Zellviabilität. Dies steht zwar im Gegensatz zu den bisher postulierten Wirkungen des Nrf2-Aktivators, denen zufolge der auch als Konservierungsmittel eingesetzte Stoff auf Lymphozyten eher als proliferationssteigernd gilt [94], suggeriert jedoch an diesem Punkt eine von Nrf2 ausgehende Proliferationsinhibition auf die hier untersuchten HPDE Zellen. Die anschließend durchgeführten Apoptoseassays zur Evaluation der Ursache der Zellzahlminderungen zeigten, dass HPDE Zellen weder durch TGF- $\beta$ 1 noch durch tBHQ einen umfassenden Apoptosestimulus erhalten. Vielmehr waren in den entsprechend stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich geringere Caspase 3/7-Aktivitäten nachweisbar. Somit scheint der Grund der durch die Stimulanzien verminderten Zellzahlen nicht die Induktion des programmierten Zelltodes, sondern lediglich eine Verminderung der Zellteilung zu sein.

Zur Validierung, ob sich die beobachteten, tBHQ-vermittelten Phänomene tatsächlich auf Nrf2 zurückführen lassen, wurden die gleichen Versuche unter Nrf2-Überexpression bzw. -*Knockdown* wiederholt (siehe 4.1.4 und 4.1.5). Zudem wurden Ki-67-Färbungen unter denselben Bedingungen angefertigt, um den Anteil der sich tatsächlich in der aktiven Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen darzustellen (siehe 4.1.6). Nach Analyse der entsprechenden Messungen kann Nrf2, entgegen den von tBHQ vermeintlich abgeleiteten Eigenschaften, eine leicht proliferationsinduzierende Wirkung auf HPDE-pBp und HPDE-*kras* Zellen zugesprochen werden. So zeigten sich in Nrf2-überexprimierenden Zellen beider Zelllinien, sowohl in der Zellzahlbestimmung als auch in der Viabilitätsmessung im MTS-Assay, mehr vitale Zellen und ein größerer Anteil sich im aktiven Zellzyklus befindlicher Zellen in der Ki-67-

Färbung. Nach Transfektion mit Nrf2 siRNA zeigte sich ein entsprechend entgegengesetztes Bild, was den pro-proliferativen Effekt von Nrf2 unterstützt.

Neben dieser Funktion gilt Nrf2 als Vermittler eines umfassenden Apoptoseschutzes [61]. Damit einher geht seine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Chemoresistenz vieler Tumoren, wie auch dem PDAC [74]. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Hochregulation anti-apoptotischer Proteine durch Nrf2 in Pankreaskarzinomzellen, wie z.B. bcl-2 oder bcl-xL, oder proteasomaler Proteine, wie z.B. s5a/psmd4 oder  $\alpha$ 5/psma5 [75, 76, 95]. In Einklang damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit, gemäß derer die höchste Nrf2-Expression mit der niedrigsten Apoptoserate einhergeht und *vice versa*. Die Messungen kongruieren mit bereits gemachten Beobachtungen, denen zufolge Nrf2 maßgeblich am gesteigerten Tumorwachstum und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika von humanen Pankreaskarzinomzellen beteiligt ist [69, 74].

Offen bleibt dennoch die Frage, wie es zu den konträren Ergebnissen nach tBHQ-Stimulation und Modulation des Nrf2-Levels auf transkriptioneller Ebene kam. Zwar führte die Anwesenheit des Nrf2-Aktivators tBHQ erwartungsgemäß in beiden Zelllinien zu einem deutlich stärkeren Nrf2-Signal im Western Blot (siehe 4.1.1), auf RNA-Ebene konnte allerdings keine Nrf2-Induktion durch tBHQ verzeichnet werden. Daher beruht die tBHQ-Wirkung möglicherweise an einer singulären Dissoziation des Nrf2 von seinem Inhibitor KEAP1 (siehe 1.3.2) [63, 64]. Die plausibelste Erklärung für die zuvor erwähnten widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass tBHQ nicht allein zu einer Erhöhung von zellulär verfügbarem, aktivem Nrf2 führt, sondern möglicherweise darüber hinaus simultan andere Signalwege aktiviert, welche dominieren und das Zellwachstum vermindern. Denkbar wäre auch, dass die von uns eingesetzte tBHQ-Dosis zu hoch gewählt wurde und die Beobachtungen auf toxische Nebenwirkungen zurückzuführen sind.

Auffällig war zudem, dass die proliferationsinhibierende Komponente des TGF- $\beta$ 1 durch Nrf2 teilweise antagonisiert wurde. So fiel die TGF- $\beta$ 1-induzierte Reduktion der Zellzahl, der Zellviabilität im MTS-Assay und des Anteils Ki-67-positiver Zellen in Nrf2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen geringer aus. Nach Nrf2-Knockdown war die Reduktion der genannten Parameter durch TGF- $\beta$ 1 dafür umso stärker. Diese Befunde untermauern die Hypothese, dass hohe Nrf2-Level in gewissem Maße die zellzyklusregulierenden Wirkungen des TGF- $\beta$ 1 in Epithel- bzw. Tumorzellen entkoppeln und ein rasches Zell- bzw. Tumorwachstum begünstigen. Ferner wurde der TGF- $\beta$ 1-vermittelte Apoptoseschutz

durch das anti-oxidative Regulatorprotein noch weiter verstärkt, was darauf hindeutet, dass am Anfang der Entartung stehende Drüsenepithelzellen der Bauchspeicheldrüse durch das Zusammenspiel von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 einen gewissen Überlebensvorteil erlangen. Auch wenn hier nur geringe Effekte zu verzeichnen waren, geben die Ergebnisse Hinweise auf die bereits in der sehr frühen Karzinogenese des PDAC stattfindende Umkehr der beiden Mediatoren von Tumorsuppressoren zu Tumorpromotoren. Darüber hinaus deuten die Apoptosedaten darauf hin, dass die gesteigerte Zellzahl Nrf2-überexprimierender Zellen primär auf die Antagonisierung der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Proliferationsinhibition und eher sekundär auf die Verleihung eines Apoptoseschutzes durch Nrf2 zurückzuführen ist.

In der Western Blot-Analyse von HPDE Zellen, deren Nrf2-Expression durch Transfektion variiert wurde (siehe 4.2.5), ergaben sich Hinweise auf bestehende Wechselwirkungen beider Signalwege, welche darüber hinaus potentielle Erklärungen für die zuvor beobachteten zellphysiologischen Phänomene liefern. Hier steht die geringere Präsenz der phosphorylierten Formen der beiden TGF- $\beta$ 1-Effektoren Smad3 und p38 in Nrf2-überexprimierenden HPDE Zellen stellvertretend für die Unterdrückung TGF- $\beta$ 1-assoziierter Signalkaskaden durch Nrf2. Entsprechend kam es in Nrf2-supprimierten Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung dieser Proteine. Die Nrf2-abhängige Unterdrückung dieser beiden TGF- $\beta$ 1-Effektoren könnte das molekulare Spiegelbild für die Nrf2-vermittelte Inhibition TGF- $\beta$ 1-induzierter Prozesse, wie beispielsweise die von uns beobachtete Nrf2-bedingte Antagonisierung der Proliferationsinhibition des TGF- $\beta$ 1, sein [52].

Interessanterweise geben bereits die anfangs angefertigten Western Blots zur Evaluierung der basalen und stimulationsbedingten Nrf2-Expression (siehe 4.1.1) Hinweise auf die gegenseitige Beeinflussung der Signalwege von TGF- $\beta$ 1 und Nrf2. So fiel im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beider Zelllinien eine direkte Nrf2-Repression in TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen auf. Sowohl in Brustepithelzellen der Maus als auch in humanen Nierenepithelzellen konnte die TGF- $\beta$ 1-abhängige Unterdrückung der Nrf2-vermittelten antioxidativen Stressantwort bereits beobachtet werden [50, 96]. Als Ursache gilt die Aktivierung des Smad-Signalweges durch TGF- $\beta$ 1, infolgedessen es ebenso zu einer Repression des Nrf2 und seiner Zielgene, wie beispielsweise HO-1, kommt. In dieser Arbeit konnte hingegen dieser Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Nrf2-Effektoren in HPDE Zellen nicht beobachtet werden. Die Expression der Nrf2-Zielgene GCLC, NQO1 und HO-1 zeigte sich von der TGF- $\beta$ 1-Stimulation in der *Realtime* PCR unabhängig [50, 96]. Festzuhalten bleibt dennoch, dass die

anti-oxidative Zellantwort, repräsentiert durch Nrf2, durch TGF- $\beta$ 1 und dessen Signalkaskaden unterdrückt werden kann, was wiederum ein weiterer Mechanismus der frühen Krebsentstehung sein könnte.

Wird die basale Nrf2-Expression beider unbehandelten Zelllinien verglichen, fällt Folgendes auf: Allein das mutierte Protoonkogen *K-ras* scheint die Menge von aktivem Nrf2 in HPDE Zellen zu erhöhen. So fällt die Detektion eines leicht erhöhten, basalen Nrf2-Signals in unbehandelten, *K-ras*-mutierten HPDE Zellen im Vergleich zu den HPDE Zellen mit der Wildtypform des Onkogens auf. Gemäß den bereits am endogenen Mausmodell gemachten Beobachtungen gehört die Mutation im *K-ras*-Gen zu den Schlüsselmechanismen der Nrf2-Aktivierung in der pankreatischen Tumorgenese [66]. Diese Kausalität lässt sich aufgrund unserer Beobachtungen zumindest teilweise auf humane Pankreasgangepithelzellen übertragen. Die Aktivierung des Onkogens *K-ras* und die Einflüsse der inflammatorischen Mikroumgebung im Rahmen einer chronischen Entzündung gelten als die beiden Hauptauslöser eines permanent erhöhten Nrf2-Levels in prämaligen Zellen, wodurch die pankreatische Tumorgenese beschleunigt wird. Dies wird unter anderem auch daran deutlich, dass Nrf2-defiziente Mäuse seltener PanINs entwickeln [21, 66]. Entgegen den zuvor diskutierten Phänomenen konnte allerdings durch die Präsenz von mutiertem *K-ras* und der damit verbundenen Nrf2-Aktivierung keine Augmentation der Nrf2-assoziierten Veränderungen festgestellt werden. HPDE-*kras* Zellen erfuhren also durch ihr mutiertes Onkogen keinen profunderen Schutz von den proliferationsinhibierenden Eigenschaften des TGF- $\beta$ 1. Möglicherweise ist die *K-ras*-vermittelte Nrf2-Aktivierung in benignen Pankreasgangepithelzellen noch zu schwach, als dass sich dieser Zusammenhang auf die Proliferationseigenschaften auswirken könnte oder es fehlt ein weiteres Signal, welches *in vivo* durch die Zellen der Mikroumgebung vermittelt wird.

Mit der Hyperproliferationsdesinhibition und der Verstärkung des Apoptoseschutzes scheint Nrf2 einen entscheidenden Beitrag zur Wirkungsumkehr des TGF- $\beta$ 1 in der frühen Karzinogenese des PDACs zu leisten. Darüber könnte Nrf2 an der Initiierung der protumorigenen Wirkung des TGF- $\beta$ 1 im Kontext der inflammationsassoziierten PDAC-Entstehung beteiligt sein.

## 5.2 Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte EMT in HPDE Zellen wird durch Nrf2 nicht beeinflusst

Inwiefern Nrf2 und die zuvor diskutierten Ergebnisse (siehe 5.1) Einfluss auf die EMT nehmen, einem weiteren, eng mit der Karzinogenese verbundenen Prozess, bei welchem Epithelien ihre differenzierten Charakteristika zugunsten eines mesenchymalen Phänotyps mitsamt den damit verbundenen Eigenschaften aufgeben (siehe 1.2), soll anhand der weiteren Ergebnisse diskutiert werden. An renalen Tubuluszellen der Maus und des Menschen wurde bezüglich dieser durch TGF- $\beta$ 1 maßgeblich regulierten Transdifferenzierungsvorgänge bereits eine hemmende, den epithelialen Phänotyp stabilisierende Wirkung durch Nrf2 beobachtet [96, 97]. Vor diesem Hintergrund führten wir Versuche durch, bei denen die Abhängigkeit EMT-assoziiierter Prozesse (z.B. morphologische Veränderungen, Änderungen in der Expression von EMT-Markern und Invasionsverhalten) von TGF- $\beta$ 1, Nrf2 und mutiertem *K-ras* im Fokus stand.

Zuerst wurden mikroskopische Analysen von HPDE-pBp und HPDE-*kras* Zellen angefertigt (siehe 4.2.1 und 4.2.3). Erwartungsgemäß präsentierte sich TGF- $\beta$ 1 als EMT-Induktor in beiden Zelllinien, was sich daran bemessen ließ, dass unter seinem Einfluss stehende Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen einen mesenchymaleren Phänotyp aufwiesen. Hierzu gehören ein aufgelockerter Zellrasen mit der Zunahme des Zell-Zell-Abstandes und eine spindelförmige, weniger differenzierte Zellmorphologie. Analog zu den morphologischen Veränderungen unter TGF- $\beta$ 1-Einfluss zeichneten sich sowohl in der *Realtime* PCR (siehe 4.2.2) als auch im Western Blot (siehe 4.2.5) EMT-typische Veränderungen im Expressionsprofil typischer EMT-Marker in HPDE Zellen ab. So waren eine Repression des epithelialen E-Cadherins und die Induktion der mesenchymalen Marker Vimentin, L1CAM und Slug zu beobachten. Auch die Quantifizierung der Invasionsfähigkeit mittels modifizierter Boyden-Kammer bestätigte TGF- $\beta$ 1 als EMT-Induktor – unter seinem Einfluss stehende Zellen zeigten einen größeren Anteil invasiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe [40, 51, 52].

Auffallend war, dass allein durch das Vorhandensein der *K-ras*-Mutation die HPDE Zellen, sowohl unbehandelt als auch TGF- $\beta$ 1-stimuliert, eine mesenchymale Zellmorphologie ausbildeten, wohingegen *K-ras*-Wildtyp HPDE Zellen einen dichten, homogenen Zellrasen polygonaler Zellen ausbildeten (siehe 4.2.1). Diese Mesenchymalisierung ließ sich ferner sowohl auf transkriptioneller Ebene (siehe 4.2.2) als auch im Invasionsvermögen der Zellen (siehe 4.2.7) nachvollziehen. So bewirkte mutiertes *K-ras*, im Vergleich zum Wildtypstatus, einen Zuge-

winn der mesenchymalen Marker Vimentin, L1CAM und Slug in der *Realtime* PCR-Analyse und ein basal invasiveres Verhalten im Invasionsassay. Offensichtlich werden durch das mutierte Onkogen Prozesse aktiviert, welche die EMT weiter vorantreiben. Ob dies durch die Interaktion mit TGF- $\beta$ 1-Signalwegen, wie beispielsweise Slug, geschieht, bleibt zu prüfen.

Entgegen unserer Vermutung, diese Phänomene könnten auf die bereits beobachtete *K-ras*-vermittelte Nrf2-Induktion zurückzuführen sein (siehe 5.1) [21, 66], führte jedoch die Variation der Nrf2-Expression mittels Überexpression bzw. Suppression zu keinen eindeutigen EMT-typischen Veränderungen. So konnten keine Nrf2-abhängigen Veränderungen der Morphologie (siehe 4.2.3), des Expressionsprofils bestimmter EMT-Marker (siehe 4.2.4 und 4.2.5) oder der Invasionsfähigkeit (siehe 4.2.7) festgestellt werden. Lediglich das Zusammenspiel von TGF- $\beta$ 1 und Nrf2 bewirkte vor allem in HPDE-*kras* Zellen eine leichte Mesenchymalisierung des EMT-Markerprofils, was als dezenter Synergismus gedeutet werden kann. Darüber hinaus konnte die TGF- $\beta$ 1-abhängige Invasionsfähigkeit von HPDE-pBp Zellen durch die Anwesenheit von Nrf2 etwas gesteigert werden. Allerdings waren diese Veränderungen allesamt zu gering ausgeprägt, als dass eine eindeutige Abhängigkeit von Nrf2 geschlussfolgert werden kann (siehe 5.1). Als Erklärung für die oben erwähnte *K-ras*-abhängige EMT kommen möglicherweise andere, bereits in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesene Signalwege, wie beispielsweise die *K-ras*-vermittelte Induktion der mit der EMT in Zusammenhang stehenden Onkogene CDK8 und PDGF-D, in Betracht [98, 99].

Die Beobachtung, dass tBHQ-stimulierte Zellen beider HPDE Zelllinien die ausgeprägteste mesenchymalen Morphologie zeigten (siehe 4.2.1) und die EMT in beiden Zelllinien Nrf2-unabhängig zu sein scheint, untermauert, dass die Nrf2-Aktivierung nicht die einzige hier relevante tBHQ-Wirkung zu sein scheint. Da die tBHQ-Stimulation zudem keine oder nur geringe EMT-äquivalente Expressionsveränderungen bewirkte (siehe 4.2.2), scheint die Ursache dieser Phänomene zudem nicht das Durchlaufen der EMT zu sein. Unter tBHQ-Einfluss stehende HPDE Zellen zeigten zwar ein stärkeres Nrf2-Signal im Western Blot, jedoch keine verstärkte Nrf2-Transkription in der *Realtime* PCR. Dies bestätigt, dass die tBHQ-vermittelte Nrf2-Aktivierung auf der Dissoziation dessen von seinem Inhibitor KEAP1 beruht und nicht auf einer Induktion auf Transkriptionsebene (siehe 1.3.2) [63]. Wie bereits in Absatz 5.1 vermutet führt tBHQ möglicherweise nicht allein zur Nrf2-Aktivierung, sondern aktiviert eventuell simultan andere Signalwege, welche für die beobachteten Veränderungen verantwortlich sein könnten.

In verschiedenen Epithel- und Karzinomzelllinien wurden bereits eindeutige Effekte von Nrf2 auf die EMT beobachtet, denen zufolge das anti-oxidative Regulatorprotein die TGF- $\beta$ 1-vermittelten Effekte antagonisiert und somit ein epithelialer Phänotyp stabilisiert wird [96, 97, 100]. In anderen HPDE Zellen sowie in malignen PDAC-Zellen der Zelllinie Colo 357 wurden gegenseitige Interaktionen von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 bezüglich EMT-assoziiierter Veränderungen beobachtet, welche in den malignen Zellen eindeutiger ausfielen und als Synergismus beider Signalwege gedeutet wurden. So konnte vor allem die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Invasionsfähigkeit der malignen Zellen Nrf2-abhängig deutlich gesteigert werden. Darüber hinaus zeigten Colo357 Zellen, ähnlich wie die von uns untersuchten HPDE-k<sub>ras</sub> Zellen, eine basal erhöhte Nrf2-Expression, welche, anders als in HPDE-k<sub>ras</sub> Zellen, durch TGF- $\beta$ 1-Stimulation weiter gesteigert werden konnte [101]. Auf Basis der hier erhobenen Ergebnisse kann jedoch keine solch eindeutige Aussage bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten HPDE Zellen getroffen werden. Zusammenfassend scheinen EMT-assoziierte Veränderungen benigner und prämaligener (*K-ras*-mutierter) Pankreasgangepithelzellen weitgehend unabhängig von dem anti-oxidativen Regulatorprotein Nrf2 zu sein.

In der Zusammenschau zeichnet sich eine gegenseitige pro-tumorigene Wirkung von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1 im Sinne einer Invasionssteigerung bereits benignen HPDE-pBp Zellen ab. Demzufolge nimmt diese gegenseitige Interaktion wahrscheinlich bereits in der sehr frühen pankreatischen Karzinogese ihren Ursprung.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das stark erhöhte Risiko für Patienten mit CP im Verlauf ihrer Krankheit an einem PDAC zu erkranken fordert die Erforschung der molekularen Grundlagen der Entartung von Pankreasgangepithelien im inflammatorischen Kontext. Eine interessante Zielstruktur stellt dabei Nrf2 als zentrales Regulatorprotein der anti-oxidativen Zellantwort einerseits und als Protoonkogen andererseits dar. So geht seine häufig erhöhte Präsenz in der Regel mit einer schlechten Prognose der Krebserkrankung einher.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Rolle von Nrf2 im funktionellen Wechsel von TGF- $\beta$ 1 vom Tumorsuppressor zum Tumorpromoter, welcher anscheinend bereits früh in der pankreatischen Karzinogenese seinen Ursprung nimmt. Während beide Faktoren allein unter physiologischen und akut entzündlichen Bedingungen die Zellhomöostase maßgeblich regulieren, führt ihre gleichzeitige und dauerhaft erhöhte Präsenz zur gegenseitigen Initiierung pro-tumorigener Zelleigenschaften. So konnten im Rahmen dieser Arbeit Hinweise erarbeitet werden, die auf bestehende Wechselwirkungen beider Signalwege hindeuten, welche sich zellphysiologisch in einer Steigerung des Zellwachstums und -überlebens von benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen äußerten. Dies steht stellvertretend für die Entkopplung von den zellzyklusregulierenden Eigenschaften des TGF- $\beta$ 1 sowie die Verstärkung der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Apoptoseresistenz durch Nrf2. Diese Interaktion spiegelt sich auf Signaltransduktionsebene in einer verminderten TGF- $\beta$ 1-vermittelten Aktivierung von Smad3 sowie der MAPK p38 wider. Das mutierte Onkogen *K-ras* erhöht zwar die Aktivität von Nrf2 in HPDE Zellen, eine Steigerung der zuvor beschriebenen Nrf2-abhängigen Effekte machte sich dadurch jedoch nicht bemerkbar. Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte EMT benigner Pankreasgangepithelzellen zeigte sich weitgehend unabhängig von Nrf2.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit einen neuen Mechanismus zur Erklärung der funktionellen Wirkungsumkehr von Nrf2 und TGF- $\beta$ 1. Beide Faktoren tragen unter physiologischen und akut inflammatorischen Umständen entscheidend zur Zellhomöostase bei, wohingegen sie ebenso die Tumorentwicklung vorantreiben können. Die gleichzeitige und permanente Erhöhung beider Faktoren führt zur Deregulation assoziierter Signalwege, wodurch das Überleben und Wachstum von transformierten Zellen und deren Invasion begünstigt werden. Möglicherweise ist dies der Grund, warum das therapeutische Ansteuern nur eines der beiden Faktoren sich bisher als nicht erfolgsversprechend erwiesen hat. Aus diesem Grund gilt es, in weiterführenden Studien zu erforschen, ob das simultane therapeutische Eingrei-

fen in das TGF- $\beta$ 1- und Nrf2-*Signalling* eine effiziente Behandlungsstrategie in der Therapie des PDAC darstellen könnte.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluoruracil
A	<i>Austria</i> , Österreich
AFL	atypisch flache Läsion
AG	Aktiengesellschaft
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
ARE	<i>antioxidant response element</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	<i>albumin bovine fraction V</i> , Bovines Serumalbumin
bZIP	<i>Cap'n Collar basic region leucine zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	<i>California</i> , Kalifornien
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK8	<i>cyclin-dependent kinase 8</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH	<i>Confoederatio Helvetica</i> , Schweiz
c-Jun	<i>cellular Jun</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
c-Myc	zelluläres Regulatorgen, abgeleitet von <i>myelocytomatosis viral oncogene (v-Myc)</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	chronische Pankreatitis
D	Deutschland
DKFZ	deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribnucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure

dNTP	<i>deoxyribose nucleoside triphosphates</i> , Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERE	<i>electrophile response element</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
et. al.	<i>et alia</i> , und andere
evtl.	eventuell
FKS	fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Chemotherapieschema, bestehend aus Folinsäure, Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin
ggf.	gegebenenfalls
GCLC	<i>glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HO-1	Hämoxygenase-1
HPDE	<i>human pancreatic duct epithelial cell line</i> , humane pankreatische duktale Epithelzelllinie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP90	Hitzeschock Protein 90
IL-6	Interleuin-6
IPMN	intraduktal-papillär-muzinöse Neoplasie
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KEAP1	<i>kelch like-ECH-associated protein 1</i>
kg	Kilogramm
Ki-67	Kiel-67
K-ras	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L1CAM	<i>neural cell adhesion molecule L1</i>

m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MA	Massachusetts
MAP-Kinase-Weg	<i>mitogen-activated protein-Kinase-Weg</i>
MAF	<i>musculo-aponeurotic-fibrosarcoma</i>
MEK	<i>mitogen/extracellular signal-related kinase</i> bzw. <i>Mitogen-activated protein kinase (MAPK)</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
microRNA	<i>micro ribonucleic acid, micro</i> Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid, messenger</i> Ribonukleinsäure
MZN	muzinös-zystische Neoplasie
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
N-Cadherin	neuronales Cadherin
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NQO1	NADPH-Quinon Oxidoreduktase 1
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphatgepufferte</i> Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion</i>
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma, duktales</i> Pankreasadenokarzinom
PDGF-D	<i>platelet derived growth factor-D</i>

pH	<i>potentia hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Protonen (H <sup>+</sup> ) in wässriger Lösung
PMF	pankreatische Myofibroblasten
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RBX 1	<i>RING-box protein 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S3-Leitlinie	Leitlinie mit allen Elementen einer systematischen Entwicklung (Logik-, Entscheidungs- und „Outcome“-Analyse)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SIP1	<i>Smad interacting protein 1</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Slug	<i>Snail family zinc finger 2</i>
Smad	Kofferwort aus „ <i>sma</i> “ für <i>small body size</i> und „ <i>MAD</i> “ für <i>mothers against decapentaplegic</i>
Snail	<i>snail family zinc finger 1</i>
sog.	sogenannt
tBHQ	tertiäres Butylhydroquinon
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-Natriumchlorid-Puffer, pH 7,6
TBS-T	<i>tris buffered saline</i> , Tris-Natriumchlorid-Puffer, pH 7,6 mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	<i>transforming growth factor beta1</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Twist	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
u.a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	<i>United States of America</i>

V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZEB2	<i>zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>
%	Prozent

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der histopathologischen Veränderungen auf dem Weg der Karzinogenese des PDAC ..... 3

**Abbildung 2.** Beitrag der K-ras<sup>G12D</sup>-Mutation zur pankreatischen Karzinogenese ..... 4

**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen während der EMT ..... 7

**Abbildung 4.** Schematische Darstellung der Regulation von Nrf2 durch KEAP1 ..... 11

**Abbildung 5.** Schematische Darstellung des Invasionsassays sowie Berechnungsformel zur Bestimmung der Invasionsrate ..... 36

**Abbildung 6.** Western Blot Analyse von Nrf2 in Kernextrakten von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 oder 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen ..... 37

**Abbildung 7.** Bestimmung der Lebendzellzahl von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 144-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen ..... 38

**Abbildung 8.** Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 144-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen ..... 39

**Abbildung 9.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ub) mittels Caspase-3/7-Assay ..... 40

**Abbildung 10.** Bestimmung der Lebendzellzahl von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulationszeit mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 41

**Abbildung 11.** Bestimmung der Lebendzellzahl von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 42

**Abbildung 12.** Bestimmung der Zellviabilität von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels MTS-Assay nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen .. 44

**Abbildung 13.** Bestimmung der Zellviabilität von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels MTS-Assay nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 45

**Abbildung 14.** Ki-67-Färbungen von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen..... 46

**Abbildung 15.** Ki-67-Färbungen von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen..... 48

**Abbildung 16.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 49

**Abbildung 17.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 50

**Abbildung 18.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 51

**Abbildung 19.** Bestimmung des Apoptoseverhaltens von Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 mittels Caspase-3/7-Assay im Vergleich zu kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 51

**Abbildung 20.** Morphologie von HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ub) bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung..... 53

**Abbildung 21.** RT-Realtime Analyse verschiedener Zielgene in HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 24- bzw. 72-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 bzw. mit 50 μM tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen ..... 55

**Abbildung 22.** Morphologie Nrf2-überexprimierender (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung ..... 57

**Abbildung 23.** Morphologie Nrf2-supprimierter (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen bei 140-facher und bei 280-facher Vergrößerung . 58

**Abbildung 24.** RT-Realtime Analyse verschiedener EMT-assoziiertes Gene in Nrf2-überexprimierenden HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 60

**Abbildung 25.** RT-Realtime-Analyse verschiedener EMT-assoziiertes Gene in Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF-β1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 61

**Abbildung 26.** Westernblot-Analyse von Ganzzelllysaten Nrf2-überexprimierender (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 63

**Abbildung 27.** Westernblot-Analyse von Ganzzelllysaten Nrf2-supprimierter (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen ..... 64

**Abbildung 28.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 bzw. 50  $\mu$ M tBHQ im Vergleich zu unbehandelten (ub) Zellen ..... 66

**Abbildung 29.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit Nrf2-überexprimierenden (Nrf2-HA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (pcDNA3.1) Zellen ..... 67

**Abbildung 30.** Invasionsassay in einer modifizierten Boyden-Kammer mit Nrf2-supprimierten (Nrf2 siRNA) HPDE-pBp und HPDE-kras Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu unbehandelten (ub) und kontrolltransfizierten (con siRNA) Zellen .. 68

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Han, H. and D.D. Von Hoff, *SnapShot: pancreatic cancer*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(3): p. 424-424 e1.
2. Schneider, G., et al., *Pancreatic cancer: basic and clinical aspects*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(6): p. 1606-25.
3. Bundes-Gesundheitsberichterstattung, *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013. **9**: p. 150.
4. Sternheim, E.T., et al., *Das Pankreaskarzinom*. *Der Internist*, 2000. **41**(9): p. 848-859.
5. Herold, D.m.G., *Innere Medizin*. 2012: p. 930.
6. Manfred Dietel, N.S., Martin Zeitz, *Harrisons Innere Medizin*. 2005. **16**.
7. Farrow, B. and B.M. Evers, *Inflammation and the development of pancreatic cancer*. *Surg Oncol*, 2002. **10**(4): p. 153-69.
8. Schreyer, A.G., et al., *S3 Guideline for Chronic Pancreatitis - Diagnosis, Classification and Therapy for the Radiologist*. *Rofo*, 2014.
9. Ben, Q., et al., *Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(13): p. 1928-37.
10. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. *Lancet*, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
11. Seufferlein, T., et al., *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0*. *Z Gastroenterol*, 2013. **51**(12): p. 1395-440.
12. Wagner, M., et al., *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. *Br J Surg*, 2004. **91**(5): p. 586-94.
13. Mahadevan, D. and D.D. Von Hoff, *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(4): p. 1186-97.
14. Muerkoster, S., et al., *Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(4): p. 1316-24.
15. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(18): p. 1691-703.
16. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(19): p. 1817-25.

17. Sipos, B., et al., *Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated*. Pancreatology, 2009. **9**(1-2): p. 45-54.
18. Aichler, M., et al., *Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues*. J Pathol, 2012. **226**(5): p. 723-34.
19. Chang, D.K., N.D. Merrett, and A.V. Biankin, *Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem?* J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(7 Pt 1): p. 1036-45.
20. Ji, B., et al., *Ras activity levels control the development of pancreatic diseases*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 1072-82, 1082 e1-6.
21. Kong, B., et al., *Overview on how oncogenic Kras promotes pancreatic carcinogenesis by inducing low intracellular ROS levels*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 246.
22. Shen, R., et al., *The biological features of PanIN initiated from oncogenic Kras mutation in genetically engineered mouse models*. Cancer Lett, 2013. **339**(1): p. 135-43.
23. Collins, M.A., et al., *Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 639-53.
24. Collins, M.A., et al., *Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e49707.
25. Singh, A., et al., *A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival*. Cancer Cell, 2009. **15**(6): p. 489-500.
26. Eser, S., et al., *Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2014. **111**(5): p. 817-822.
27. Vinay Kumar, A.K.A., Nelson Fausto, Richard N. Mitchell, *Robbins Basic Pathology*. 2007. **8**: p. 946.
28. Wang, W., et al., *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(1): p. 119-27.
29. Korc, M., *Pancreatic cancer-associated stroma production*. Am J Surg, 2007. **194**(4 Suppl): p. S84-6.

30. Muerkoster, S.S., et al., *Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma--epigenetic downregulation of caspases*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(8): p. 1751-60.
31. Erkan, M., et al., *The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. **9**(8): p. 454-67.
32. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
33. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 375-412.
34. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. *Dev Dyn*, 2005. **233**(3): p. 706-20.
35. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. Georg Thieme Verlag, 2009. **3**: p. 644.
36. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. *J Cell Biol*, 1982. **95**(1): p. 333-9.
37. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
38. Nawshad, A., et al., *Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis*. *Cells Tissues Organs*, 2005. **179**(1-2): p. 11-23.
39. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 131-42.
40. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 265-73.
41. Baum, B., J. Settleman, and M.P. Quinlan, *Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. **19**(3): p. 294-308.
42. Zoltan-Jones, A., et al., *Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45801-10.

43. Natalwala, A., R. Spychal, and C. Tselepis, *Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(24): p. 3792-7.
44. Giannoni, E., M. Parri, and P. Chiarugi, *EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(11): p. 1248-63.
45. Geismann, C., et al., *Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4517-26.
46. Schafer, H., et al., *Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent*. Carcinogenesis, 2012. **33**(1): p. 84-93.
47. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression*. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1512-20.
48. Bergmann, F., et al., *Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncol Rep, 2010. **24**(4): p. 909-15.
49. Van den Broeck, A., et al., *Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 68.
50. Okita, Y., et al., *Transforming growth factor-beta induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20658-67.
51. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
52. Tian, M., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer*. Cell Signal, 2011. **23**(6): p. 951-62.
53. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
54. Akhurst, R.J. and R. Derynck, *TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. S44-51.
55. Kretzschmar, M., et al., *A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 804-16.

56. Neuzillet, C., et al., *Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas*. *Oncotarget*, 2014. **5**(1): p. 78-94.
57. Geismann, C., et al., *Cytoprotection "gone astray": Nrf2 and its role in Cancer*. *Oncol Target Ther.*, 2014: p. 1497-1518.
58. Nguyen, T., P. Nioi, and C.B. Pickett, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(20): p. 13291-5.
59. Yao, J.W., et al., *Induction of activation of the antioxidant response element and stabilization of Nrf2 by 3-(3-pyridylmethylidene)-2-indolinone (PMID) confers protection against oxidative stress-induced cell death*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012. **259**(2): p. 227-35.
60. Sporn, M.B. and K.T. Liby, *NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(8): p. 564-71.
61. Sebens, S., et al., *Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(47): p. 40911-21.
62. Nguyen, T., et al., *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): p. 32485-92.
63. Liebler, D.C. and F.P. Guengerich, *Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(5): p. 410-20.
64. Li, W. and A.N. Kong, *Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response*. *Mol Carcinog*, 2009. **48**(2): p. 91-104.
65. Kwak, M.K. and T.W. Kensler, *Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **244**(1): p. 66-76.
66. DeNicola, G.M., et al., *Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis*. *Nature*, 2011. **475**(7354): p. 106-9.
67. Shen, H., et al., *Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment*. *Dis Esophagus*, 2013.
68. Soini, Y., et al., *Nuclear Nrf2 expression is related to a poor survival in pancreatic adenocarcinoma*. *Pathol Res Pract*, 2014. **210**(1): p. 35-9.
69. Lister, A., et al., *Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 37.

70. Ganan-Gomez, I., et al., *Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 750-64.
71. Hast, B.E., et al., *Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination*. Cancer Res, 2014. **74**(3): p. 808-17.
72. Zhang, P., et al., *Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(2): p. 336-46.
73. Duong, H.Q., et al., *Inhibition of NRF2 by PIK-75 augments sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine*. Int J Oncol, 2014. **44**(3): p. 959-69.
74. Arlt, A., et al., *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**(40): p. 4825-35.
75. Niture, S.K. and A.K. Jaiswal, *Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance*. Free Radic Biol Med, 2013. **57**: p. 119-31.
76. Niture, S.K. and A.K. Jaiswal, *Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis*. J Biol Chem, 2012. **287**(13): p. 9873-86.
77. Chen, W., et al., *Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death?* Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(12): p. 1670-5.
78. Choi, H.K., et al., *Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: Role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor-beta1 expression*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **240**(3): p. 377-84.
79. Shen, H., S. Zhou, and J. Wang, *The paradoxical role of Nrf2 in tumor biology*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2013. **23**(1): p. 37-47.
80. Boettler, U., et al., *Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(5): p. 426-40.
81. Furukawa, T., et al., *Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16*. Am J Pathol, 1996. **148**(6): p. 1763-70.
82. Ouyang, H., et al., *Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1623-31.

83. Qian, J., et al., *In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 5045-53.
84. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
85. Jakowlew, S.B., *Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 435-57.
86. Rockwell, C.E., et al., *Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4(+) T cells*. *J Immunol*, 2012. **188**(4): p. 1630-7.
87. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. *Development*, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
88. Principe, D.R., et al., *TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(2): p. djt369.
89. Inman, G.J., *Switching TGFbeta from a tumor suppressor to a tumor promoter*. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. **21**(1): p. 93-9.
90. Rane, S.G., J.H. Lee, and H.M. Lin, *Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(1-2): p. 107-19.
91. Gotzmann, J., et al., *Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 6): p. 1189-202.
92. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update*. *Physiological Reviews*, 2012. **92**(2): p. 689-737.
93. Shelton, P. and A.K. Jaiswal, *The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene?* *FASEB J*, 2013. **27**(2): p. 414-23.
94. Schilderman, P.A., et al., *Induction of oxidative DNA damages and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(3): p. 507-12.
95. Kim, W.D., et al., *E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 5): p. 1284-95.

96. Ryoo, I.G., H. Ha, and M.K. Kwak, *Inhibitory role of the KEAP1-NRF2 pathway in TGFbeta1-stimulated renal epithelial transition to fibroblastic cells: a modulatory effect on SMAD signaling*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93265.
97. Ryoo, I.G., et al., *Involvement of Nrf2-GSH signaling in TGFbeta1-stimulated epithelial-to-mesenchymal transition changes in rat renal tubular cells*. Arch Pharm Res, 2014.
98. Xu, W., et al., *Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Cancer Lett, 2015. **356**(2 Pt B): p. 613-27.
99. Wang, Z., et al., *Activated K-Ras and INK4a/Arf deficiency promote aggressiveness of pancreatic cancer by induction of EMT consistent with cancer stem cell phenotype*. J Cell Physiol, 2013. **228**(3): p. 556-62.
100. Rachakonda, G., et al., *Increased cell migration and plasticity in Nrf2-deficient cancer cell lines*. Oncogene, 2010. **29**(25): p. 3703-14.
101. Arfmann-Knubel, S., et al., *The Crosstalk between Nrf2 and TGF-beta1 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Duct Epithelial Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132978.

**ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) mit TGF- $\beta$ 1 sowie deren Einfluss auf malignitätsassoziierte Eigenschaften in Pankreasgangepithelzellen“ eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuer in der AG Inflammatorische Karzinogenese, Institut für Experimentelle Medizin bzw. Institut für Experimentelle Tumorforschung (ab 10/2015), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- und Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch wurde sie zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Ort, Datum, Unterschrift

**DANKSAGUNG**

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanne Sebens für die Bereitstellung des Themas, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, den wissenschaftlichen Austausch und die exzellente Betreuung zu jeder Zeit. All dies hat maßgeblich zur Entstehung und zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen und ist insbesondere für die studienbegleitende Erstellung einer Doktorarbeit Gold wert. Vielen Dank dafür!

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern der AG Inflammatorische Karzinogenese Dagmar Leisner, Dr. Ole Helm und Lennart Lenk für die Einführung in die Laborarbeit, den regen wissenschaftlichen Austausch und für die stete, freundliche Begleitung während meiner Zeit im Labor.

Der AG Molekulare Gastroenterologie um Prof. Dr. Heiner Schäfer danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Bereitstellung ihrer Geräte.

Für die moralische und freundschaftliche Unterstützung während der letzten Jahre bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Freunden, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben. Insbesondere möchte ich mich bei Isabelle Riedemann für ihre konstruktive Korrektur meiner schriftlichen Arbeit bedanken.

Meiner Familie – Gabriele, Klaus und Carolin Kruppa – und meiner Freundin Carina Röber gilt mein besonderer Dank für jede Art der Unterstützung in den vergangenen Jahren. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben, meinen Weg zu wählen und mich jederzeit bedingungslos unterstützt. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

**LEBENS LAUF****Persönliche Daten**

Name	Marcus Kruppa
Geburtsdatum/-ort	23.04.1989 in Hannover
Nationalität	deutsch

**Ausbildung**

06/2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2015 - 2016	Praktisches Jahr an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Innere Medizin: UK-SH, Campus Kiel Gynäkologie und Geburtshilfe: Friederikenstift, Hannover Chirurgie: GZO Spital Wetzikon, ZH, Schweiz
04/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2013 - 2016	Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Institut für Experimentelle Medizin bzw. Institut für Experimentelle Tumorforschung (ab 10/2015) AG Inflammatorische Karzinogenese, Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens <i>„Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) mit TGF-<math>\beta</math>1 sowie deren Einfluss auf malignitätsassoziierte Eigenschaften in Pankreasgangepithelzellen“</i>
2013 - 2014	Auslandssemester an der Cerrahpaşa Medizinischen Fakultät der Universität Istanbul, Türkei
2011-2016	Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2009 - 2011	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2006 - 2008	Gymnasium Goetheschule Hannover, Abitur
2001 - 2006	Gymnasium Mellendorf
1999 - 2001	Orientierungsstufe Bissendorf
1995 - 1999	Grundschule Resse

