

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES
TRANSKRIPTIONSFAKTORS
NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2- RELATED FACTOR
(NRF2)
IN DER FRÜHEN PHASE DER
PANKREATISCHEN KARZINOGENESE**

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

vorgelegt von
NORA GEESKE BRIGITTE GENRICH
aus Hildesheim

Kiel 2017

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Andreas Koch*

Tag der mündlichen Prüfung: *09.04.2018*

Zum Druck genehmigt, Kiel, den *(=zur Auslage frei)*

gez.: (=Prüfer)

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Teile dieser Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

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.* 52: 168. doi:10.1055/s-0034-1386190

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- β 1 mediated growth inhibition of pancreatic ductal epithelial cells -Nrf2 as determinant of pro-tumorigenic functions of TGF- β 1. *BMC Cancer.* 16: 155. doi: 10.1186/s12885-016-2191-7

Was ist der wahre Wert des Wissens?
Dass es unser Unwissen schärfer umreißt.

ANNE MICHAELS in FLUCHTSTÜCKE

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I Glossarium

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das pankreatische duktales Adenokarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie & Risikofaktoren.....	1
1.1.2	Symptomatik & diagnostisches Vorgehen.....	1
1.1.3	Prognose & Therapiemöglichkeiten.....	3
1.2	Pankreatische Tumorgenese.....	4
1.2.1	Histologie und genetische Alterationen des PDAC und seiner Vorläuferläsionen....	4
1.2.2	Risikofaktor chronische Pankreatitis.....	7
1.2.3	Makrophagen als Tumor-Stroma-Interakteure.....	8
1.2.4	Freie Radikale und die oxidative Stressantwort durch Nrf2.....	10
1.2.5	Tumorsuppressive und tumorfördernde Facetten von Nrf2.....	12
1.2.6	Tumorsuppressive und tumorfördernde Facetten von TGF- β	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2	Material	17
2.1	Geräte.....	17
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3	Chemikalien und Stimulanzien.....	18
2.4	Rezepturen.....	19
2.5	Kits und Plasmide.....	20
2.6	Antikörper.....	20
2.7	Zelllinien.....	21
2.8	Computerprogramme.....	22
3	Methoden	23
3.1	Methoden an humanem Pankreasgewebe.....	23
3.1.1	Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern ohne Pankreas-Anamnese	23
3.1.2	Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern mit CP.....	23
3.1.3	Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern mit PDAC.....	23
3.1.4	Immunhistochemische Färbungen.....	24
3.1.5	Scoring-System und statistische Analyse der immunhistochemischen in situ Färbungen.....	25
3.2	Zellkultur-Methoden.....	28
3.2.1	Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie HPDE6c7.....	28

3.2.2 In vitro-Generierung von Makrophagen.....	29
3.2.3 Kultivierung von Zelllinien.....	30
3.2.4 Cokultivierung von Zelllinien.....	30
3.2.5 Überexpression von Nrf2.....	32
3.3 Analyse-Methoden der in vitro Versuche.....	33
3.3.1 Zellzahl-Bestimmung.....	33
3.3.2 Ki67-Färbung an Deckgläschen und deren Quantifizierung.....	33
3.3.3 Proteinextraktion aus Zelllysaten.....	34
3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
3.3.5 SDS-PAGE.....	35
3.3.6 Membrantransfer.....	35
3.3.7 Immunchemischer Nachweis von Proteinen (Westernblot).....	35
3.3.8 Statistische Auswertung der in vitro Versuche.....	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Detektion von p-Nrf2 und Ki67 in gesundem pankreatischen Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen und ihre Assoziation mit der Makrophageninfiltration.....	37
4.1.1 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und von CP-betroffenen Individuen zeigen signifikant mehr aktiviertes Nrf2 als gesunde Gangepithelien.....	39
4.1.2 PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen signifikant mehr aktiviertes Nrf2 als PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen	40
4.1.3 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen eine signifikant höhere Ki67-Expression als gesunde Gangepithelien.....	42
4.1.4 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen eine ähnliche Ki67-Expression.....	43
4.1.5 In gesundem Gangepithel besteht zwischen dem Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 und Ki67 ein positiver Zusammenhang.....	44
4.1.6 In PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen als auch von CP-betroffenen Individuen geht eine hohe Nrf2-Aktivität mit einer hohen Ki67-Expression einher	45
4.1.7 Assoziation des p-Nrf2- und Ki67-Status von der Makrophageninfiltration in gesundem pankreatischen Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen.....	46
4.1.8 Zwischen der Makrophageninfiltration und dem Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 zeigt sich in gesundem Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen kein eindeutiger Zusammenhang.....	47
4.1.9 Zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67-Expression besteht in gesundem Gangepithel tendenziell ein negativer Zusammenhang.....	48
4.1.10 In PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen geht eine hohe Ki67-Expression mit geringem Aufkommen von CD163-positiven-Makrophagen einher.....	48
4.1.11 Zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67- Expression zeigt sich in PanIN von CP-betroffenen Individuen kein eindeutiger Zusammenhang.....	49

4.1.12 Auch PDAC-Karzinomzellen zeigen ein hohes Vorkommen von aktiviertem Nrf2 und eine hohe Expression von Ki67.....	49
4.2 Auswirkungen von Makrophagen auf Proliferation, Morphologie und Nrf2- Status von Pankreasgangepithelzellen in vitro.....	52
4.2.1 Mit Makrophagen cokultivierte Pankreasgangepithelzellen weisen höhere Zellzahlen auf.....	52
4.2.2 Pankreasgangepithelzellen zeigen in Anwesenheit von Makrophagen einen aufgelockerten Zellverband und morphologische Zeichen von Zellstress.....	53
4.2.3 Benigne und prämaligne Pankreasgangepithelzellen zeigen unter Makrophageneinfluss ein unverändertes p-Nrf2-Protein-Level.....	55
4.3 Einfluss von Nrf2 auf das Zellwachstum, die Proliferation und das MAPK- und Smad- Signaling von Pankreasgangepithelzellen im Zusammenwirken mit TGF-β1 in vitro.....	56
4.3.1 Nrf2 fördert das Zellwachstum von benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den wachstumsinhibierenden Effekt von TGF-β1.....	56
4.3.2 Nrf2 erhöht die Proliferation benigner und prämaligener Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF-β1.....	58
4.3.3 Nrf2 antagonisiert den wachstumsinhibierenden Effekt von TGF-β1 auf Pankreasgangepithelzellen über die Modulation des MAPK- und Smad-Signaling.....	60
5 Diskussion	63
6 Fazit	69
7 Zusammenfassung	70

IV Literaturverzeichnis

V Anhang

I Glossarium

5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ANOVA	Varianzen-Analyse (<i>Analysis of Variances</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARE	Gendomäne (<i>antioxidant responding elements</i>)
Bcl-2, Bcl-xL	Proteine der Bcl-2-Familie mit anti-apoptotischer Wirkung (<i>B-cell-lymphoma 2</i>)
BRCA2	Brustkrebsgen 2 (<i>Breast cancer 2</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA 19-9	Tumormarker CA 19-9 (Carbohydrate-Antigen 19-9)
CD	Oberflächenprotein (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>Complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CP	Chronische Pankreatitis
CRM	Zirkumferentieller Resektionsrand (<i>circumferential resection margin</i>)
CT	Computertomographie
DMEM	Medium, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
Erk	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
EtOH	Ethanol
FCS	Medium, Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
GAT; GGT	Nukleinbasentriplett Glyzin-Adenin-Thymidin; Glyzin-Glyzin-Thymidin
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTP, GTPase	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>Her2/neu</i>	Onkogen (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen-DR (<i>Human leucocyte antigen-DR</i>)
HO	Hydroxylradikal
HO-1	Hämoxygenase-1
HPDE	Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie, immortalisiert
HPDE-kras	mit der <i>kras</i> ^{G12V} -Mutation tragendem pBabe-puro-Vektor transduzierte HPDE-Zellen
HPDE-pBp	mit leerem pBabe-puro-Vektor transduzierte HPDE-Zellen
HRP	Merrettichperoxidase (<i>Horse radish peroxidase</i>)
HSP	Hitzeschock Protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Antikörperklasse G
IHC	Immunhistochemische Färbung
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPMN	Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie

IZC	Immunzytochemische Färbung
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k.A.	keine Angabe
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein-1</i>
Ki67	Proliferationsmarkerprotein Ki-(Kiel) 67
kras	<i>K-rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid(e)
µl	Mikroliter
M	molar [mol/l]
mA	Milliampere
MAP	Mitogen Aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
MDR	Transmembranprotein, Effluxpumpe (<i>Multidrug resistance-related protein</i>)
mg	Milligramm
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinaminadeninindinukleotidphosphat
n.b.	nicht bestimmbar
n.e.	nicht erhoben
nm	Nanometer
NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase 2/ NO-Synthase 2
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NQO1	NAD(P)H Quinon Dehydrogenase 1
Nrf2	Transkriptionsfaktor <i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor</i>
n.s.	nicht signifikant
O ₂ ⁻	Dioxid-Anion
O ₃	Ozon
OH	Hydroxylradikal
OP	Operation
p	P-Wert
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie(n)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphat buffer saline</i>)
pcDNA	Plasmid Cytomegalievirus promoter DNA-Vektor
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom (<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>)
PKC	Proteinkinase C
p-Nrf2	phosphoryliertes Nrf2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rF	relative Luftfeuchte
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	Medium, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-Natriumchlorid-Puffer pH 7,6

TBS-T	Tris-Natriumchlorid-Puffer pH 7,6 mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (<i>Units</i>)
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (<i>Union internationale contre le cancer</i>)
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V	Volt
VEGF	Gefäß-Endothel Wachstumsfaktor (<i>vascular endothel growth factor</i>)
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Westernblot
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight / volume</i>)
z.B.	zum Beispiel

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: HE-Färbung verschiedener PanIN-Läsionen im Vergleich zum gesunden Gang [aus: Hruban et al., 2008].....	5
Abb. 1.2: Modell der histologischen und genetischen Progression von der gesunden Epithelzelle (ganz links) über PanIN-Läsionen (mittig) zum invasiven Karzinom (ganz rechts) [aus: Hruban et al., 2008].....	6
Abb. 1.3: Ausschnitte dreier PDAC-Präparate mit ausgeprägten desmoplastischen Stromaanteilen.....	8
Abb. 1.4: Transkriptionsfaktor Nrf2 bei Redox-Homöostase und bei oxidativem Stress.....	11
Abb. 3.1: Beispiele der Scoring-Zuordnung der p-Nrf2-Färbung von vier ausgewählten Gangepithelanschnitten in PanIN-Läsionen (A-C) bzw. PDAC-Gewebe (D).....	27
Abb. 3.2: Schema der in vitro-Generierung von M1- und M2- Makrophagen aus primären Monozyten aus Blut humaner Spender.....	30
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Monokultur und indirekten Cokultivierung der HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen (je in Wells ausgesät) mit M1- bzw. M2- Makrophagen (je in Transwells ausgesät, die in die Wells eingehängt sind).....	32
Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Transfektion von HPDE-Zellen (mit Kontroll- plasmid pcDNA3.1 bzw. Nrf2-HA und mit/ ohne TGF- β 1-Applikation) und der folgenden Analysemethoden.	33
Abb. 4.1 Im Vergleich zum gesunden Gangepithel ist die Expression von aktiviertem Nrf2 in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) erhöht.....	40
Abb. 4.2: Nachweis von aktiviertem Nrf2 in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) und in PanIN von chronischer Pankreatitis-betroffenen Individuen (PanIN in CP).....	41
Abb. 4.3: Im Vergleich zu gesundem Gangepithel ist die Ki67-Expression in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) als auch in PanIN von chronischer Pankreatitis betroffenen Individuen (PanIN in CP) erhöht.....	44
Abb. 4.4: Gesunde Gangepithelien zeigen keine oder nur eine schwache Expression von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) als auch von Ki67.	45
Abb. 4.5: Die Aktivität von Nrf2 ist in PanINs erhöht und korreliert mit einer erhöhten Proliferationsaktivität (Ki67-Expression) von PanINs.....	46
Abb. 4.6: Ausgeprägte Positivität von aktiviertem Nrf2 in PDAC-Gewebe von 3 PDAC- Patienten.....	51
Abb. 4.7: Absolute Zellzahlen von HPDE-pBp- und HPDE-kras-Zellen nach 5-tägiger Monokultur bzw. Cokultivierung mit M1- oder M2-Makrophagen.....	54
Abb. 4.8: Benigne und prämaligne Pankreasgangepithelzellen zeigen nach Cokultivierung mit Makrophagen einen aufgelockerten Zellverband und morphologische Zeichen von Zellstress.....	55

Abb. 4.9: Proteinnachweis von p-Nrf2 aus Ganzzelllysat im Westernblot von HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen nach 5-tägiger Mono- bzw. Cokultur mit M1- bzw. M2-Makrophagen.....	56
Abb. 4.10: Nrf2 fördert das Zellwachstum von Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den wachstumshemmenden Effekt von TGF- β 1.....	58
Abb. 4.11: Nrf2 erhöht die Proliferation von benignen HPDE-pBp-Zellen und antagonisiert den proliferationshemmenden Effekt von TGF- β 1.....	60
Abb. 4.12: Nrf2 erhöht die Proliferation von prämaligen HPDE-kras-Zellen und antagonisiert den proliferationshemmenden Effekt von TGF- β 1.....	61
Abb. 4.13: Nrf2 moduliert das MAPK- und Smad-Signaling in benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen.....	62

III Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Scoring-Schema (oben) und Dichotomisierungs-Schema (unten) zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des Pankreasgangepithels.....	27
Tab. 4.1: Ergebnis der p-Nrf2- und Ki67-Färbung in gesundem Gangepithel, PanIN und PanIN in chronischer Pankreatitis (PanIN in CP).	39
Tab. 4.2: Detaillierter Vergleich der p-Nrf2-Ausprägung und der Ki67-Exprimierung von PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) und PanIN von chronischer Pankreatitis-betroffenen Individuen (PanIN in CP).....	42
Tab. 4.3: Ergebnisse der Detektion von Makrophagen um gesunde Gänge, PanINs in Pankreasleiden-freien (PanIN) und PanINs in CP-Präparaten (PanIN in CP) nach Dichotomisierung in schwach und stark ausgeprägte Infiltration [erhoben von: A. Broich (Gruppe 0,1), O. Helm (Gruppe 2)].....	47
Tab. 4.4: Ergebnisse der Spearman-Korrelationsberechnungen zwischen p-Nrf2 bzw. Ki67 und CD68, HLA-DR und CD163 innerhalb der Gruppen gesundes Gangepithel, PanIN und PanIN in CP.....	48

1 Einleitung

1.1 Das pankreatische duktale Adenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie & Risikofaktoren

Bauchspeicheldrüsenkrebs war 2012 eine neu gestellte Diagnose für über 16.700 Menschen in Deutschland. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen und erkranken im Mittel im Alter von 71 bzw. 75 Jahren. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8 % weisen bösartige Tumoren des Pankreas die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015). Sie zeugt davon, dass der Tumor häufig erst in fortgeschrittenen Stadien erkannt wird, die keine kurative chirurgische Therapie mehr gewähren (Hruban *et al.*, 2008). Mit über 95 % stellt das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) die häufigste maligne Tumorerkrankung der Bauchspeicheldrüse dar (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2013). Es geht wie die meisten bösartigen Tumoren des Pankreas von den exokrinen Anteilen der Drüse aus und zeigt in frühen Stadien oft keine oder nur unspezifische Symptome. Dem Papillenkarzinom und den seltenen, bösartigen endokrinen Tumoren der Inselzellen wird mit ihrer frühzeitigen Symptomatik eine deutlich bessere Prognose zuteil. Mit etwa 3,5 % geht neben den sporadischen Fällen nur ein geringerer Anteil der PDACs auf eine vererbte Prädisposition zurück (Bartsch *et al.*, 2004). Unter den acht bekannten Tumorprädispositionssyndromen macht das familiäre Pankreas-karzinom-Syndrom den Großteil aus (Bartsch *et al.*, 2012). Des Weiteren gehen die hereditäre Pankreatitis und das Peutz-Jeghers-Syndrom mit einem deutlich erhöhten, genetisch bedingten Erkrankungsrisiko einher. Zu den erworbenen Risikofaktoren des PDAC zählen Tabakkonsum und Adipositas; ferner haben Patienten mit langjähriger chronischer Pankreatitis (CP) oder Diabetes mellitus Typ 2 ein erhöhtes Risiko ein PDAC zu entwickeln (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015). Der Einfluss von Umweltfaktoren ist momentan nicht eindeutig geklärt (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015). Von lebensstilbezogenen Faktoren wie dem hohen Konsum von gegrillten oder geräucherten Fleischwaren und von Alkohol wird ein nachteiliger, risikosteigernder Effekt vermutet (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2013).

1.1.2 Symptomatik & diagnostisches Vorgehen

Oft führt ein sogenannter schmerzloser, d.h. nicht von Koliken begleiteter Ikterus zur Diagnose eines pankreatischen duktales Adenokarzinoms (Seufferlein *et al.*, 2014). Führendes Symptom

kann jedoch auch Appetitlosigkeit sein. Weitere mögliche Anzeichen sind allgemeine Schwäche, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö oder ein länger bestehendes Druckgefühl im Oberbauch (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Dabei sind sowohl dumpfe abdominale Schmerzen, die in den Rücken ausstrahlen als auch ein deutlicher Gewichtsverlust von über 10 % in sechs Monaten als Warnzeichen zu werten. Beschwerden treten besonders dann auf, wenn benachbarte Organe wie Magen, Zwölffingerdarm, Bauchfell oder Milz verdrängt oder infiltriert werden (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Kommt es durch Kompression des Gallengangs zu einer Galleabflussstörung (Cholestase mit mechanischem Ikterus), kann dies zu einer Entfärbung des Stuhls, einer Hyperbilirubinämie mit Skleren- oder Hautikterus, Juckreiz und einer Braunfärbung des Urins führen (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Infolge mangelnder Gallensäuren und Lipasen im Darmtrakt kann es ferner zu einer unzureichenden Fettverdauung mit Steatorrhö (Fettstühlen) kommen. Beeinträchtigungen der endokrinen Funktionen des Pankreas sind erst bei sehr fortgeschrittenen Bauchspeicheldrüsentumoren zu erwarten. Selten werden auch paraneoplastische Syndrome wie rezidivierende Thrombophlebitiden und Thrombosen beobachtet (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Insgesamt ähnelt der meist unspezifische Charakter der Symptome denen einer Pankreatitis. Oft hat das PDAC bereits in die Umgebung gestreut oder ein lokal fortgeschrittenes, inoperables Stadium erreicht, bevor erste Symptome auftreten (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014).

Bei Tumorverdacht umfasst das Standardverfahren der apparativen Diagnostik eine Abdomensonografie, eine MR-Angiografie und eine Oberbauch-MRT. Als Cholangiopankreatikografie (MRCP) durchgeführt gewährleistet letztere eine bessere Darstellung von Gallengang und Ausführungsgang der Bauchspeicheldrüse (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Wegweisender Befund und diagnosesichernd ist hierbei das Double-Duct-Sign, d.h. die Erweiterung beider o.g. Gangstrukturen. Als malignomverdächtig gelten erweiterte intrahepatische Gallengänge als auch irreguläre Stenosen im Ductus pancreaticus oder seiner Äste. Alternativ kommt die endoskopisch-retrograde Cholangio-Pankreatikografie (ERCP) zum Einsatz, die zwar invasiv ist, aber den Vorteil einer möglichen Stenteinlage zur Gallendrainage bietet. Mithilfe von Kontrastmittel ist ein Pankreaskarzinom im Spiral-CT meist als eine hypodense, unscharf begrenzte Raumforderung auszumachen. Das PDAC ist dabei häufiger im Pankreaskopf als im Pankreasschwanz lokalisiert (Böcker *et al.*, 2012). Dies gilt auch für die in 1.2.1 beschriebenen Vorläuferläsionen des PDAC, die bisher jedoch nicht mit bildgebenden Verfahren zu erfassen sind (Hruban *et al.*, 2008). Eine präoperative Gewebeentnahme wird bei kurativer Intention als entbehrlich angesehen, vor einer palliativen Therapie ist sie obligat (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2013). Die Biopsie sollte dabei

mittels explorativer Laparoskopie erfolgen, da bei einer Feinnadelbiopsie das Risiko einer iatrogenen Metastasierung des Stichkanals besteht. Laborchemisch kann bei Vorliegen einer Begleitpankreatitis die Lipase im Serum erhöht sein. Für den Tumormarker CA 19-9 wird für das PDAC eine Sensitivität von etwa 80 % angegeben. Er kann jedoch auch bei Magen-, Kolon- und hepatobiliären Karzinomen erhöht sein (Ballehaninna & Chamberlain, 2011). Seine Bestimmung aus Blutserum oder -plasma wird als Verlaufsparemeter genutzt, um das Ansprechen auf eine Therapie einschätzen zu können. Symptomatische Patienten mit niedrigen CA 19-9-Spiegeln zeigen ein längeres medianes Überleben (Ballehaninna & Chamberlain, 2011).

1.1.3 Prognose & Therapiemöglichkeiten

Die Prognose für PDAC-Patienten ist infaust. Trotz intensiver Forschungsbemühungen der letzten 30 Jahren hat sie sich bedauerlicherweise nicht wesentlich verbessert (Erkan *et al.*, 2012). Nach Diagnosestellung beträgt das mittlere Überleben lediglich sechs Monate (Korc, 2007).

Die zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten hängen maßgeblich vom Tumorstadium ab (Han & von Hoff, 2013). Dieses wird international einheitlich anhand des TNM-Klassifikationssystems bestimmt und umfasst die Ausbreitung des Tumors (T), die Anzahl befallener Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Darüber hinaus wird die Lymph- und Blutgefäßinvasion sowie die Perineuralscheideninfiltration beurteilt. Die Suche nach hämatogen und lymphogen gestreuten Metastasen erfolgt mittels Abdomensonografie und CT. Hauptmetastasierungsart des PDACs ist die Leber. Tumorabsiedlungen sind jedoch auch in Lunge oder Knochen möglich, so dass zum *Staging* eine Röntgenaufnahme des Thorax gehört (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Histologisch wird der Entdifferenzierungsgrad der Tumorzellen bestimmt (sog. Grading). Dabei entspricht laut UICC-Klassifikation Grad 1 bis Grad 4 gut, mäßig, schlecht oder nicht differenziertem malignem Gewebe. Der nach einer Resektion erhobene und prognostisch bedeutsame R-Status gibt Auskunft darüber, ob am Resektionsrand Tumorzellen noch makroskopisch (R2) bzw. mikroskopisch sichtbar sind (R1) oder nicht (R0). Ihm zufolge beträgt das mediane Überleben zwischen 8 und 22 (R1) oder 17 und 28 Monaten (R0). In einer R0-Situation liefert das Konzept des zirkumferentiellen Resektionsrands eine darüber hinausgehende prognostische Genauigkeit. Hierbei wird bestimmt, ob der Abstand der Tumorzellen vom Resektionsrand größer oder kleiner 1 mm ist (CRM-negativ oder -positiv) (CRM-Konzept von engl. *circumferential resection margin*) (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2013).

Die chirurgische R0-Resektion ist bis heute das einzige potenziell kurative Therapieverfahren des PDACs (Seufferlein *et al.*, 2014). Sie kommt durchschnittlich nur für jeden fünften Patienten

in Frage, wenn weder Metastasen noch eine schwere Begleiterkrankung vorliegen (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Bei einem PDAC im Pankreaskopf ohne Duodenuminfiltration ist die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (nach Traverso-Longmire) Methode der Wahl. Hierbei werden Pankreaskopf, ein Teil des Duodenums, Gallenblase, Gallengang und mindestens zehn Lymphknoten reseziert. Bei Infiltration des Bulbus duodeni hingegen ist die partielle Duodenopankreatektomie (nach Kausch-Whipple) indiziert, die für den Patienten funktionelle Nachteile mit sich bringt. Ist das Karzinom im Pankreaskörper oder -schwanz lokalisiert, wird die totale Pankreaslinksresektion inklusive Milzentfernung angewandt. In einer palliativen Situation wird bei Stenosierung eine Gastroenterostomie vorgenommen.

Obwohl das PDAC eine profunde Chemoresistenz aufweist, zeigen große repräsentative Studien, dass eine adjuvante Behandlung mit Gemcitabin, einem Pyrimidinantagonisten, das krankheitsfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit verlängern (Oettle *et al.*, 2013; Oettle *et al.*, 2007; Neoptolemos *et al.*, 2004). Bezüglich Lebensqualität und Überlebenszeit ist eine Chemotherapie auch in einer palliativen Situation der reinen Schmerztherapie überlegen und bis zu einem Fortschreiten des Tumors oder dem Auftreten inakzeptabler Toxizität angezeigt. (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Bei Nicht-Ansprechen von Gemcitabin kommt für einige Patienten eine Kombinationstherapie aus 5-Fluoruracil (5-FU) und dem Alkylanz Oxaliplatin infrage, die ferner um den Topoisomerase-I-Hemmstoff Irinotecan ergänzt werden kann (Conroy *et al.*, 2011). Patienten mit metastasiertem Tumor werden zusätzlich zu Gemcitabin mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib oder dem Mitosehemmstoff nab-Paclitaxel behandelt (Moore *et al.*, 2007; von Hoff *et al.*, 2013). Für jene Patienten, bei denen Gemcitabin nicht anspricht, ist die Kombination von 5-FU und Folsäure mit nanoliposomalem Irinotecan vorteilhaft, wie eine jüngere Studie zeigt (Wang-Gillam *et al.*, 2016). In der Gesamtheit können gegenwärtige Chemotherapeutika die durchschnittliche Überlebenszeit nur um wenige Monate verlängern (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2014). Supportiven Maßnahmen wie die Kontrolle von Übelkeit und Aszites, Schmerztherapie und die psychische Begleitung kommt damit besonderes Gewicht zu.

1.2 Pankreatische Tumorgenese

1.2.1 Histologie und genetische Alterationen des PDAC und seiner Vorläuferläsionen

Die Genese des PDAC wird als eine schrittweise Entwicklung vom gesunden Gangepithel über verschiedene Vorläuferläsionen hin zum invasiven Karzinom angesehen (Progressionsmodell

nach Hruban). Unter den nicht-invasiven Vorläuferläsionen werden pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), intraduktal papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) und muzinös-zystische Neoplasien (MCN) differenziert (Hruban *et al.*, 2004). IPMNs können u.a. im Hauptausführungsgang des Pankreas lokalisiert sein und lassen sich in diesem Fall als einzige Vorläuferläsion endosonografisch detektieren (Hruban *et al.*, 2008). PanINs jedoch sind bei weitem die häufigste Entität unter den nicht-invasiven Vorläuferläsionen und betreffen vor allem die intraduktalen Gänge unter 5 mm Durchmesser (Hruban *et al.*, 2008; Esposito *et al.*, 2012). Als eine Vorstufe von PanINs werden sogenannte atypische flache Läsionen angesehen, die als eine azinoduktale Metaplasie tubulärer Komplexe gewertet werden (Hruban *et al.*, 2008). Esposito *et al.* hingegen beschreiben atypische flache Läsionen als eigenständige Vorläuferentität des PDAC und schlagen ein duales Modell der Karzinogenese des PDAC vor (Esposito *et al.*, 2012).

Beispiele für die am besten charakterisierten PanIN-Läsionen (Esposito *et al.*, 2012) sind in Abb. 1.1 anhand der aktuell genutzten Klassifikation von Hruban dargestellt.

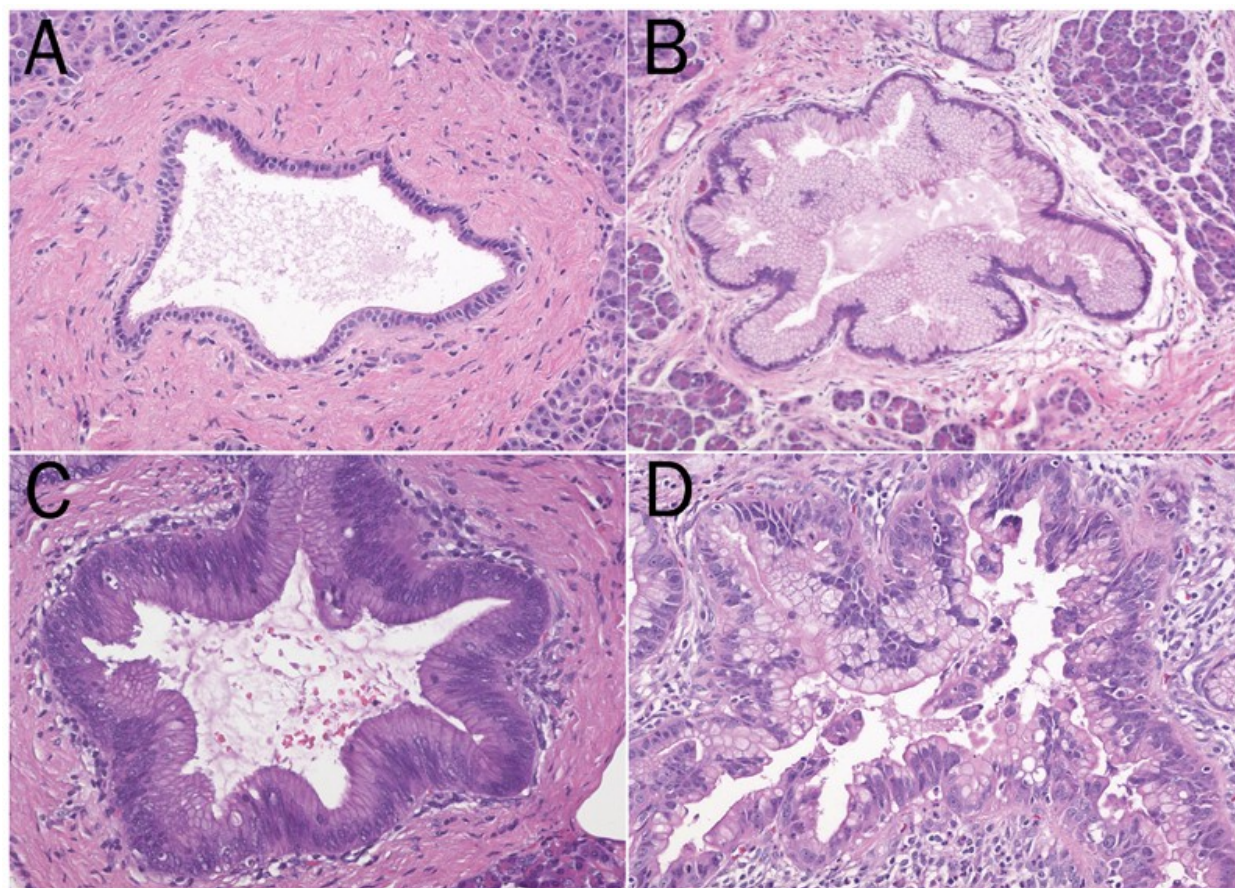


Abb. 1.1: HE-Färbung verschiedener PanIN-Läsionen im Vergleich zum gesunden Gang [aus: Hruban *et al.*, 2008].

Das histologische Färbeverfahren (HE-Färbung) stellt basophile Strukturen blau und azidophile Strukturen rot dar. A gesunder Gang, B PanIN-1-Läsion, C PanIN-2-Läsion, D PanIN-3-Läsion.

Gesunde Pankreasgänge weisen ein einheitliches, kuboidal bis niedrig-prismatisches Epithel auf, während PanIN-1A-Läsionen bereits hochprismatisches Epithel mit reichlich supranukleärem Muzin tragen. Ein neoplastischer Charakter ist für PanIN-1A-Läsionen nicht nachgewiesen. Wenn zusätzlich eine papilläre oder pseudogeschichtete Architektur vorliegt, handelt es sich um PanIN-1B-Läsionen. Solche niedriggradigen PanINs finden sich bei der Mehrheit der über 40-Jährigen (Sipos *et al.*, 2009). PanIN-2-Läsionen können flaches als auch papilläres Epithel aufweisen, obligat sind per definitionem moderate nukleäre Atypien. Hierzu zählen u.a. ein Verlust der Polarität, vergrößerte Zellkerne, ein nukleärer Engstand und Hyperchromatismus. PanIN-2-Läsionen zeigen ein noch geringes Aufkommen an umgebendem Stroma, wohingegen PanIN-3-Läsionen den Beginn einer verstärkten Stromaaktivierung darstellen (Sipos *et al.*, 2009). Das Gangepithel weist in den meisten Fällen ein papilläres Wachstumsmuster auf, bei dem sich Epithelzell-Cluster ins Lumen abknospen. Hier sind außerdem prominentere Kernatypien wie Makronukleoli, dystrophe Becherzellen und Nekrosen zu finden (Hruban *et al.*, 2004). Da die Basalmembran aller Vorläuferläsionen intakt ist, tragen sie noch keine Merkmale eines invasiven oder streuenden Verhaltens. Ursachen der veränderten Morphe und Proliferation sind nicht hinreichend bekannt. Jedoch wurden verschiedene genetische Veränderungen gefunden, die in einer gewissen Reihenfolge aufzutreten scheinen (Hruban *et al.*, 2004; vgl. auch Abb. 1.2).

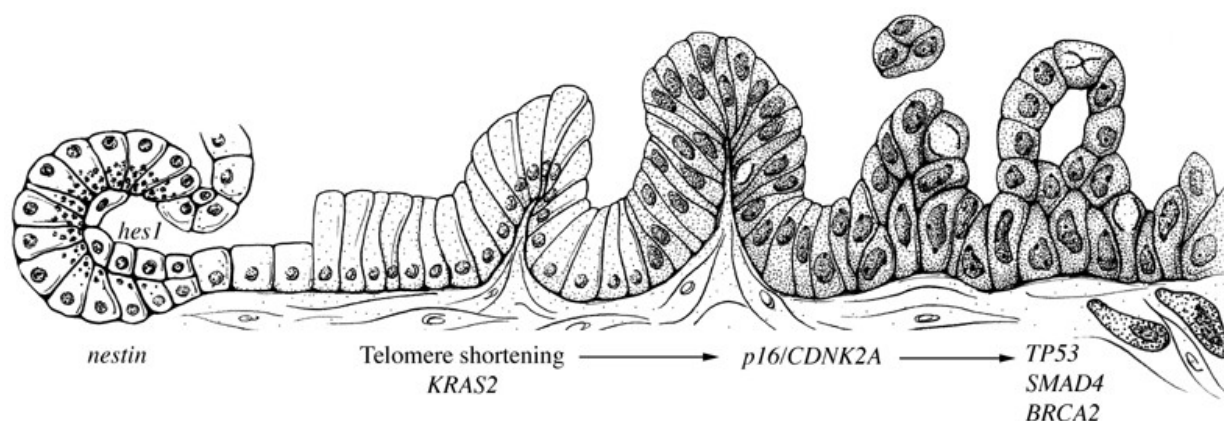


Abb. 1.2: Modell der histologischen und genetischen Progression von der gesunden Epithelzelle (ganz links) über PanIN-Läsionen (mittig) zum invasiven Karzinom (ganz rechts) [aus: Hruban *et al.*, 2008].

Als frühestes Ereignis und wesentlicher Antreiber der PDAC-Entwicklung wird eine Punktmutation im Onkogen *kras* auf Codon 12 angesehen (Hingorani *et al.*, 2003), die bereits in 99 % der PanIN-1-Läsionen nachweisbar ist (Kanda *et al.*, 2012). Bei dieser *kras*^{G12D}-Mutation ist durch die Aminosäuresubstitution GGT zu GAT die GTPase-Aktivität des translatierten G-Proteins nicht mehr gegeben, so dass aktives RAS in der Zelle akkumuliert. Folglich persistieren wachstumsstimulierende *downstream*-Signale wie die Aktivierung der RAF-MEK-Erk-Kaskade

dauerhaft (Barbacid, 1987). Der *kras*-Mutation wird zudem eine kritische Rolle bezüglich der wachstumshemmenden Wirksamkeit onkologischer Medikamente zugesprochen (Karapetis *et al.*, 2010). In PanIN-2-Läsionen ist zusätzlich das Tumorsuppressorgen *p16* inaktiviert (Moskaluk *et al.*, 1997), während charakteristisches Merkmal von PanIN-3-Läsionen der Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene *p53*, *Smad4* (Synonym: *DPC4*) als auch *BRCA2* ist (Lüttges *et al.*, 2001; Goggins *et al.*, 2000). Genprodukt von *p53* ist der Transkriptionsfaktor P53 (Synonym: TP53). Im intakten Zustand wird er durch DNA-Schädigung aktiviert und leitet in der Folge einen Zellzyklusarrest zur DNA-Reparatur oder Apoptose ein. Ohne diese Mechanismen können sich auch Zellen mit geschädigter DNA unkontrolliert teilen und zur Tumorbildung führen. Auch das *Smad4*-Protein hat Einfluss auf die Proliferation. Es ist Teil des *transforming growth factor-β*-(TGF-β)-Signalwegs, über den TGF-β seine anti-proliferative Wirkung entfalten kann.

Zusammenfassend zeigen höhergradige PanIN-Läsionen ein dem PDAC ähnliches genetisches Alterationsmuster. In über 90 % der PDACs ist *kras* mutiert (Almoguera *et al.*, 1988), in etwa 80 % ist *p16* inaktiviert und 50-75 % aller PDACs tragen ein inaktiviertes *p53* (Hruban *et al.*, 2008). Zudem sind in mehr als 80 % aller PDACs Veränderungen im TGF-β Signalweg beobachtet worden, insbesondere die Inaktivierung von *Smad4*, aber auch eine Überexpression der drei Isoformen von TGF-β (Goggins *et al.*, 1998). Histologisch ist die Progression zum invasiven Karzinom oft von einer deutlichen Stromazunahme begleitet und mit einem entzündlichen Infiltrat assoziiert (Korc, 2007; Näheres s. 1.2.2 und 1.2.3).

1.2.2 Risikofaktor chronische Pankreatitis

Nach ersten Vermutungen über einen Zusammenhang von Entzündung und Krebs vor über 140 Jahren (Balkwill & Mantovani, 2001) zählt die Entzündung heute zu den zehn wissenschaftlich etablierten Kennzeichen von Krebs (Hanahan & Weinberg, 2011). Es wird angenommen, dass etwa jede fünfte Tumorerkrankung auf dem Boden einer chronischen Entzündung entsteht. Auf genetischer Ebene kann sie von DNA-schädigenden freien Radikalen ausgehen, die in einer inflammatorischen Umgebung vermehrt anfallen (Stachel *et al.*, 2014). Eine Tumorentstehung kann zudem dadurch begünstigt werden, dass die stressexponierte Zelle selbst adaptive Signalwege einleitet (Clevers, 2004). Auch für das Pankreas gilt als gesichert, dass eine langjährige Entzündung das Risiko für die Entwicklung eines PDAC erhöht (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2015). Nach langem Krankheitsverlauf werden morphologische Gangveränderungen und ein bindegewebiger Ersatz von Drüsenparenchym beobachtet (Böcker *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass neben Myofibroblasten vor allem Makrophagen durch die Abgabe

von TGF- β zu dieser Fibrosierung beitragen, wenn sie in der chronischen Entzündung Nekrosen autodigestiv resorbieren (Böcker *et al.*, 2012). Verschiedene Makrophagenpopulationen machen einen wesentlichen Bestandteil des entzündlichen Infiltrats aus (Helm, 2014). Ihr Einfluss auf die Tumorentstehung ist nicht vollständig geklärt. Auch das pathobiologische Verhältnis von chronischer Pankreatitis und PanIN-Läsionen ist weitgehend unklar (Hruban *et al.*, 2008). Da PanINs in chronischen Pankreatitiden häufiger zu finden sind als in gesundem Gewebe (Hruban *et al.*, 2008), wird diskutiert, ob eine chronische Pankreatitis Folge von PanIN-Läsionen sein kann. Mehrere Arbeitsgruppen berichten von einer Assoziation zwischen PanIN-Läsionen und lobulo-zentrischen Atrophien (Brune *et al.*, 2006; Detlefsen *et al.*, 2005). Mangelnder azinärer Sekretabfluss löse hier eine lokalisierte Form der Pankreatitis aus, die wiederum zu einer Progression der PanINs führen könne. Canto *et al.* fanden in Screening-Untersuchungen, dass das endosonografische Bild einer chronischen Pankreatitis dem von multifokalen PanIN-Läsionen ähneln kann, sofern diese lobulozentrische Atrophien aufwiesen (Canto *et al.*, 2006). Dies wäre von klinischer Relevanz, da bereits vor der Entstehung des Karzinoms seine asymptomatischen Vorläuferläsionen detektiert werden könnten (Hruban *et al.*, 2008).

1.2.3 Makrophagen als Tumor-Stroma-Interakteure

Histopathologisch ist das PDAC durch seine ausgeprägte Desmoplasie gekennzeichnet. Diese Bindegewebsvermehrung geht von Myofibroblasten aus (Bachem *et al.*, 2005) und ist bereits in präkanzerösen Läsionen zu finden (Erkan *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014; vgl. Abb. 1.1). Im PDAC kann das Stroma bis zu 80 % der Tumormasse ausmachen (Erkan *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014; vgl. Abb. 1.3). Es umfasst insbesondere Kollagen-I, Kollagen-III und Fibronectin. Abb. 1.3 zeigt exemplarisch Ausschnitte dreier PDAC-Präparate mit deutlich sichtbaren desmoplastischen Stromaanteilen.

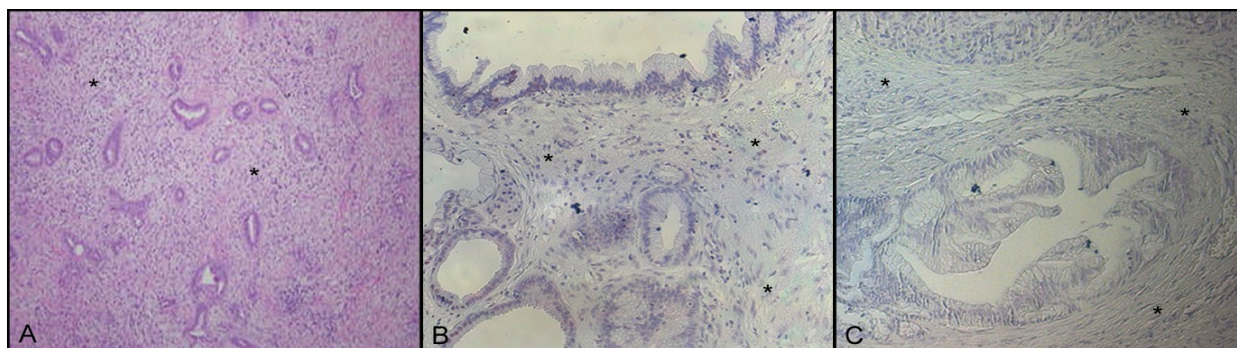


Abb. 1.3: Ausschnitte dreier PDAC-Präparate mit ausgeprägten desmoplastischen Stromaanteilen. Anteile des desmoplastischen Stromas sind in A-C exemplarisch mit * markiert. A: HE-Färbung, Mikrofotografie niedriger Vergrößerung [aus: Maitra & Hruban, 2008]; B,C: p-Nrf2-Färbung, Vergrößerung 400-fach.

Die zelluläre Komponente besteht neben Fibroblasten und Myofibroblasten aus einer Vielzahl inflammatorischer Zelltypen, insbesondere Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), Mastzellen, myeloiden Suppressorzellen, regulatorischen T-Zellen, T-Helferzellen und neutrophilen Granulozyten (Evans *et al.*; 2012; Kleeff *et al.*, 2007; Helm, 2014; Ino *et al.*, 2013; Protti & De Monte, 2013). Offenbar kommt den Interaktionen zwischen Krebszellen und umgebenden Stromazellen eine entscheidende Rolle zu. So zeigen Analysen über das PDAC, dass Patienten mit stromareichem Tumor eine schlechtere Prognose und kürzeres Überleben aufweisen (Kurahara *et al.*, 2011; Hiraoka *et al.*, 2006; Protti & De Monte, 2013). Zahlreiche Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren werden als Mediatoren von Stroma- und Tumorzellen sezerniert. Sie werden als mitverantwortlich für die Tumorentstehung und -progression angesehen (Korc, 2007; Evans *et al.*; 2012; Whiteside, 2008). So sind Tumorzellen in der Lage, die myeloiden Vorläuferzellen von Makrophagen ins Tumormilieu zu rekrutieren, wo diese zu noch teilungsfähigen Makrophagen differenzieren (Sica *et al.*, 2006). Über die Sekretion von TGF- β 1 tragen unter den Stromazellen insbesondere Makrophagen zur Aktivierung von Myofibroblasten bei (Bhowmick *et al.*, 2004).

Die physiologischen Aufgaben von Makrophagen liegen in der Chemoattraktion und Aktivierung weiterer Immunzellen, der Antigenpräsentation für T-Helferzellen und der Phagozytose von Bakterien und Zelltrümmern. Ferner können sie über die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren Heilungsprozesse einleiten (Lüllmann-Rauch, 2012). In der Literatur werden Makrophagen anhand ihrer Oberflächenmarker und ihres Zytokinprofils als M1- oder M2-Makrophagen klassifiziert, obgleich von einem Kontinuum zwischen beiden ausgegangen wird (Mantovani *et al.*, 2005). Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF von engl. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysaccharide (LPS) führen zur sogenannten klassischen Aktivierung hin zu einem proinflammatorischen Phänotyp (M1-Makrophagen). Er ist durch die Expression von Faktoren wie die Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) gekennzeichnet, die eine Typ-I-Immunantwort auslösen können. Die Antigenpräsentation erfolgt über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-II von engl. *major histocompatibility complex-II*) Humane Leukozyten Antigen-DR (HLA-DR von engl. *human leucocyte antigen d related*). Über die Sekretion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen entfalten M1-Makrophagen eine bakterizide Wirkung (Mantovani *et al.*, 2005). Im Leukozyteninfiltrat einer chronischen Entzündung ist vermehrt dieser Makrophagentyp zu finden (Mielgo & Schmid, 2013). M2-Makrophagen werden durch den Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF von engl. *macrophage colony-stimulating factor*), IL-4, IL-10 und IL-13, aber auch durch

Glucocorticoide, Prostaglandin E und Vitamin D3 alternativ aktiviert. Sie sind HLA-DR negativ und exprimieren den Oberflächenmarker CD163. Ihr Zytokinprofil umfasst IL-10 und IL-1ra, außerdem TGF- β 1, den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF von engl. *fibroblast growth factor*), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF von engl. *epidermal growth factor*) und *vascular endothel growth factor* (VEGF). Letzteres gilt als anti-inflammatorisch, wundheilend und wachstumsfördernd (Mantovani *et al.*, 2005). TAMs lassen sich am ehesten dem M2-Phänotypen zuordnen (Mantovani *et al.*, 2002). Ihre Anwesenheit ist in vielen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Kurahara *et al.*, 2011). Als eine Erklärung hierfür wird das von TAMs sezernierte VEGF-C herangezogen, das eine erhöhte Lymphgefäßdichte vermittelt. Diese geht im PDAC mit einer frühzeitigen Metastasierung und einem kürzerem Überleben einher (Kurahara *et al.*, 2011). Vom Brustkrebs ist ferner bekannt, dass Makrophagen auch die Angiogenese stimulieren. Indem sie VEGF-A sezernieren, tragen Makrophagen über eine erhöhte Blutgefäßdichte zur Ernährung des Tumors bei (Leek *et al.*, 2000). Darüber hinaus verleihen TAMs den Tumorzellen offenbar über die Sekretion von TGF- β ein erhöhtes Invasions- und Migrationsvermögen (Mantovani *et al.*, 2005). Aber auch Myofibroblasten und Tumorzellen selbst können TGF- β 1 sezernieren (Kleeff *et al.*, 2007; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008).

Für das PDAC konnte eine neuere Studie zeigen, dass eine stromale Zusammensetzung mit Dominanz von M1-Makrophagen mit längerem Überleben assoziiert ist (Ino *et al.*, 2013). Obgleich M1-Makrophagen mehrheitlich als tumorsuppressiv angesehen werden (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2012), wird an anderer Stelle auch über pro-tumorigene Eigenschaften berichtet: so induziert von ihnen sezerniertes IL-1 β die COX-2-Produktion, wodurch PDAC-Zellen vor Chemotherapie-induzierter Apoptose geschützt werden (Angst *et al.*, 2008).

1.2.4 Freie Radikale und die oxidative Stressantwort durch Nrf2

Freie Radikale, oft hinsichtlich ihrer toxischen und mutagenen Eigenschaften angeführt, werden im aeroben Metabolismus jeder Zelle intrinsisch generiert, z.B. als Nebenprodukt des mitochondrialen Elektronentransports (Sporn & Liby, 2012; Geismann *et al.*, 2014). Zu ihnen gehört die Klasse der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), z.B. Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3) oder Hydroxylradikal (OH^\cdot). Sie sind als Botenstoffe auf vielfältige Weise in intra- und interzelluläre Signalwege integriert und können Proteine direkt modifizieren. Die direkte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinase (MAPK von engl. *mitogen-activated protein kinase*) c-Jun N-terminale Kinase (JNK) ist ein Mechanismus, der von ROS induziert wird und Apoptose einleitet (Circu & Aw, 2010; Dhanasekaran & Reddy, 2008). Extrazellulär fallen ROS vermehrt durch Strahlung oder Hitze an

(Geismann *et al.*, 2014). Das Gros extrinsisch generierter ROS geht jedoch von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus, die sich mit ihrer Hilfe gegen benachbarte oder inkorporierte Mikroorganismen verteidigen (*oxidative burst*; Nathan, 2003).

Der zentrale Mechanismus der Zelle auf oxidativen, aber auch xenobiotischen und metabolischen Stress zu reagieren, ist den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2) zu aktivieren. Dessen molekulare Charakterisierung gelang in den späten 1990er Jahren (Kensler & Wakabayashi, 2010). Wie in Abb. 1.4 schematisch dargestellt, hält *Kelch-like ECH-associated protein1* (Keap1) als negativer physiologischer Repressor Nrf2 gebunden und leitet zusammen mit der Ubiquitin-Ligase CUL3 (Cullin3) im Falle der Redox-Homöostase den proteasomalen Abbau von Nrf2 ein. Unter basalen, d.h. homöostatischen Bedingungen wird die Aktivität von Nrf2 damit durch Retention und folglich Degradierung aktiv unterdrückt (Zhang *et al.*, 2012).

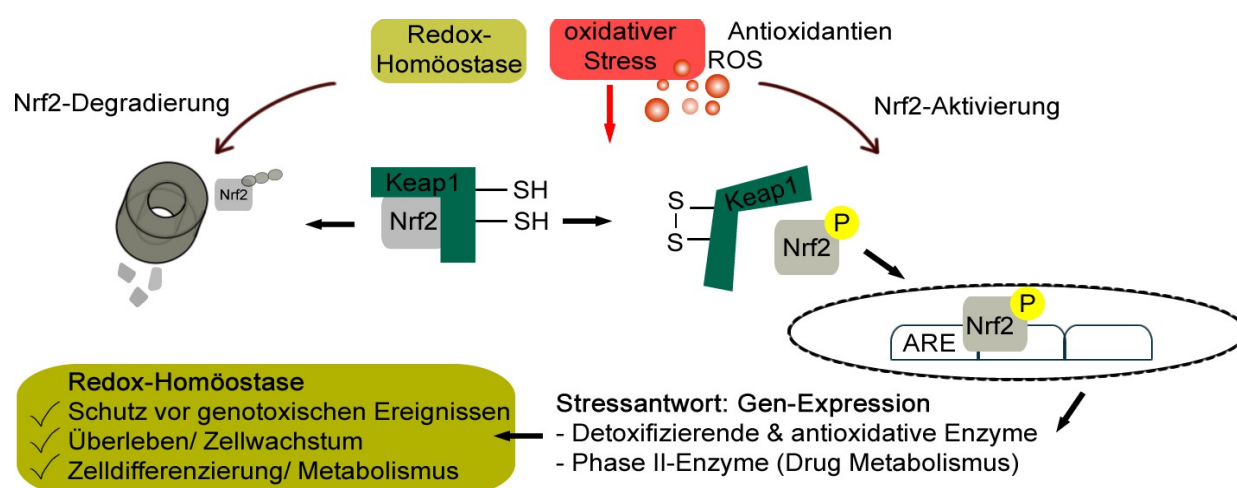


Abb. 1.4: Transkriptionsfaktor Nrf2 bei Redox-Homöostase und bei oxidativem Stress.

Schematische Darstellung. Unter basalen Bedingungen wird Nrf2 dem proteasomalen Abbau zugeführt (linke Bildhälfte). Bei oxidativem Stress hingegen (rechte Bildhälfte) wird Nrf2 von seinem Repressor Keap1 freigegeben und reguliert im Kern die Expression ARE-abhängiger Gene. ROS = reaktive Sauerstoffspezies; -SH = Sulfhydrylgruppe; S-S = Disulfidgruppe; P = Phosphatgruppe.

Keap1, Nrf2 und weitere beteiligte Proteine können auf vielfältige Weise reguliert werden oder pathologisch dereguliert sein (gezeigt im Review von Geismann *et al.*, 2014). Zentrale Bedeutung kommt den über 20 freien Thiolgruppen (Sulfhydryl) innerhalb der cysteinhaltigen Aminosäurestruktur von Keap1 zu. Sie fungieren als Redoxsensoren und können durch eine große Anzahl endogener und exogener Agens, Medikamente oder Strahlung beeinflusst werden (Jain & Jaiswal, 2006). Nur wenn mehrere von ihnen oxidiert werden, kommt es zu einer Konformationsänderung von Keap1, in deren Folge Nrf2 von Proteinkinase- δ (PKC- δ) an

Serin40 (S40) phosphoryliert und schließlich als phosphoryliertes Nrf2 (p-Nrf2) freigegeben wird (vgl. Abb. 1.4). Auf diese Weise stabilisiertes (aktiviertes) Nrf2 transloziert in den Kern und bindet an *antioxidant responding elements* (ARE)-Domänen im Promotor ARE-abhängiger Gene, was deren Transkription zur Folge hat. Über 100 zyto-protective Gene werden auf diese Weise von Nrf2 gesteuert, die zur Erhaltung der Redox- und Zellhomöostase beitragen (Sporn & Liby, 2012). Ohne diese kann es zu DNA-Strangbrüchen und schwerwiegenden Veränderungen an Lipiden und Matrix-Komponenten kommen (Sporn & Liby, 2012).

Nrf2-vermittelt wird das ROS-Level der Zelle über die Induktion der antioxidativen Enzyme NAD(P)H-Dehydrogenase 1 (NQO1) und Hämoxxygenase (HO-1) als auch über die Suppression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS, NOS2) gesenkt (Shelton & Jaiswal, 2013). Indem Nrf2 die Expression von Katalase induziert, wird H₂O₂ detoxifiziert. Der Schutz vor toxischen Xenobiotika gelingt durch die Nrf2-vermittelte Induktion des primären zellulären Radikalfängers Glutathion sowie durch die Induktion glukuronidierender Enzyme, die Xenobiotika für die Exkretion konjugieren (Phase-II-Enzyme). Der Transport von Medikamenten kann ferner auch durch Induktion der MDR-(*multiple drug resistance*)-assoziierten Genfamilie variiert werden. Von Nrf2 beeinflusste Proteine umfassen auch anti-apoptotische (wie Bcl-2) und metabolische Enzyme (Shelton & Jaiswal, 2013). Zusammengenommen dient das antioxidative Programm der Zelle dem Schutz vor ROS und sichert auf diese Weise ihr Überleben und Wachstum (Sporn & Liby, 2012). Die Modulation des Redoxstatus birgt damit gleichermaßen für Krebszellen einen potentiellen Überlebensvorteil (DeNicola *et al.*, 2011).

1.2.5 Tumorsuppressive und tumorfördernde Facetten von Nrf2

Nrf2-aktivierende Substanzen wie phenolische Antioxidantien und Dithiolionen zielen auf die zytoprotektiven Eigenschaften von Nrf2 ab. Seit über 40 Jahren werden sie tumorpräventiv eingesetzt (Wattenberg, 1972; Kensler & Wakabayashi, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass synthetisches Oleanan den Beginn der Tumorgenese durch Onkogene wie *kras*, *p53*, *BRC A2* und *HER2/neu* verzögert und damit eine Progression von Lungen-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs verhindert (Sporn & Liby, 2012). Dieser krebspräventive Effekt eines Nrf2-aktivierenden Medikaments war in Mäusen mit depletiertem Nrf2 aufgehoben. Sie zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung verschiedener Krebsentitäten wie Haut-, Magen-, Dickdarm- oder Blasenkrebs (Sporn & Liby, 2012). Wie dieser beruht der Großteil der Befunde, die Nrf2 als ein anti-tumorigenes Molekül herausstellen, auf Zellkulturversuchen oder Tiermodellen (Geismann *et al.*, 2014). Zahlreiche Substanzen wie Sulforaphan, Kurkumin, Dimethylfumarat und Resveratol sind bis heute in klinischer Erprobung (zusammengefasst in

Sporn & Liby, 2012). Während eine chemopräventive Wirksamkeit dieser Substanzen stellenweise nachgewiesen werden konnte (Kensler & Wakabayashi, 2010), mussten andere Phase-III-Studien wegen teils letaler Nebenwirkungen vorzeitig abgebrochen werden (Zoja *et al.*, 2014). Insgesamt steht die Bewertung Nrf2-aktivierender Substanzen anhand von größeren Populationen noch weitestgehend aus (Geismann *et al.*, 2014).

Nachweislich zeigen diverse Tumorentitäten wie Lungen-, Kopf- und Hals-, Brust-, Eierstock-, Dickdarm- und Pankreaskrebs eine konstitutiv hohe Expression als auch Aktivität von Nrf2 (Sporn & Liby, 2012; Geismann *et al.*, 2014; Lister *et al.*, 2011). Im PDAC ist diese klinisch mit einer schlechteren Prognose korreliert (Sporn & Liby, 2012). Es wurde gefunden, dass eine erhöhte Nrf2-Aktivität zu einer gesteigerten Zellmotilität (Shen *et al.*, 2014) und zu einer verstärkten Proliferation führt (Lister *et al.*, 2011; DeNicola *et al.*, 2011). Gleichfalls kann Nrf2 eine geringere Apoptoserate bewirken, indem es die proteosomale Aktivität erhöht oder die Expression anti-apoptotischer Proteine induziert (Sebens *et al.*, 2011; Niture & Jaiswal 2012, 2013). Auch wurde gezeigt, dass Nrf2 Chemo- und Strahlenresistenz vermitteln kann (Arlt *et al.*, 2013; Niture & Jaiswal, 2012, 2013; Kim *et al.*, 2012). Erstere wird über die Induktion von Phase-II-Enzymen realisiert, die anti-kanzerogene Medikamente verstärkt detoxifizieren (Sebens *et al.*, 2011). Ein bereits identifizierter Mechanismus der Krebszelle, der zur Tumorgenese und Tumorzellproliferation beiträgt, ist die Aktivierung des Onkogens *kras*. Sie sorgt für ein herabgesetztes Nrf2-*turnover* und hat eine induzierte Nrf2-Transkription zur Folge (DeNicola *et al.*, 2011). In einem endogenen Mausmodell des PDAC konnte gezeigt werden, dass Nrf2-defiziente Pankreata weniger PanINs aufwiesen und diese weniger proliferativ waren. Wurden Nrf2-kompetente, PanIN-aufweisende Mäuse mit Inhibitoren der Glutathion-Synthase (einem Zielgen von Nrf2) behandelt, führte dies zu einem deutlichen Abfall der PanIN-Proliferation (DeNicola *et al.*, 2011).

Zusammengenommen zeigt dies, dass Nrf2 in der Tumorgenese eine duale Rolle zukommt (Sporn & Liby, 2012; Shelton & Jaiswal; 2013). Unter welchen Bedingungen sich der funktionelle Wechsel von Nrf2 von einem tumorsuppressiven hin zu einem tumorfördernden Faktor vollzieht, ist nur partiell verstanden (Sporn & Liby; 2012; Geismann *et al.*, 2014; DeNicola *et al.*, 2011).

1.2.6 Tumorsuppressive und tumorfördernde Facetten von TGF- β

TGF- β ist ein pleiotroper Wachstumsfaktor, der Proliferation, Zellmigration und morphologische Plastizität wie die Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) steuert. TGF- β -Signale werden über zwei transmembranäre Rezeptoren (TBRII und I/ALK5) vermittelt, und können intrazellulär

Smad-abhängige (kanonische) als auch Smad-unabhängige Signalwege wie die MAPK p38 und Erk1/2 aktivieren. Letztere tragen dazu bei, dass Zellen auch bei Mutationen im Smad4-Gen, wie sie im PDAC häufig vorkommen (Goggins *et al.*, 1998), TGF- β -responsiv bleiben (Principe *et al.*, 2014). Dennoch zeigen viele Tumorentitäten z.B. durch die RAS-Aktivierung ein verändertes TGF- β 1-Signaling (Akhurst & Derynck, 2001) und sind gegenüber den wachstumsinhibierenden Signalen von TGF- β 1 resistent (Goggins *et al.*, 1998). In der Literatur gilt heute als anerkannt, dass TGF- β 1 durch seine anti-proliferativen Effekte gegenüber Epithelzellen in frühen Stadien der Tumorgenese als Tumorsuppressor fungiert (Ungefroren, Sebens, Groth *et al.*, 2011; Bhowmick *et al.*, 2004). So konnten Ijichi *et al.* in einem murinen PDAC-Xenograft zeigen, dass inaktivierende Mutationen von Smad4- oder T β RII-Genen zu einer Progression von PanINs zum PDAC führten (Ijichi *et al.*, 2006). Zugleich wird TGF- β 1 eine Rolle in der Tumorprogression zugesprochen. Da TGF- β Tumorzellen über den Verlust von Adhäsionsverbindungen mehr Motilität und Invasivität verleihen kann (Akhurst & Derynck, 2001; Flavell *et al.*, 2010; Ikushima & Miyazono, 2010), ermöglicht es EMT und Metastasierung. Zudem kann von Tumorzellen sezerniertes TGF- β die Stromabildung stimulieren und eine Immunevasion fördern (Flavell *et al.*, 2010; Ikushima & Miyazono, 2010). Auch Chemoresistenz und Angiogenese können durch TGF- β 1 vermittelt werden (Meulmeester & Ten Dijke, 2011; Bhowmick *et al.*, 2004; Schniewind *et al.*, 2007; Pickup *et al.*, 2013; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). Damit nimmt TGF- β 1 eine duale Rolle in der Tumorentwicklung epithelialer Tumoren ein (Principe *et al.*, 2014; Inman, 2011), die für das PDAC bestätigt ist (Rane *et al.*, 2006). Hier ist eine Überexpression aller TGF- β -Isoformen zu beobachten und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Ijichi *et al.*, 2006).

Der Wechsel von TGF- β 1 von einem Tumorsuppressor zu einem Tumorpromotor scheint wie bei Nrf2 kontextabhängig zu sein. Auch hier sind die zugrundeliegenden Mechanismen nur teilweise bekannt (Principe *et al.*, 2014; Inman, 2011). In der chronischen Entzündung wird sowohl die Expression von TGF- β 1 als auch von Nrf2 hochreguliert. Dies lässt eine wechselseitige Beeinflussung ihrer Signaltransduktion vermuten. Jüngere Studien zeigen eine gegenseitige Inhibition der beiden Faktoren. Einerseits supprimierte TGF- β im Rahmen der Leberfibrose die Nrf2-abhängige Expression des antioxidativen Enzyms Hämoxxygenase-1 (Okita *et al.*, 2013). Andererseits war Nrf2 in der Lage, die profibrotische Wirkung von TGF- β zu inhibieren, indem es die Smad3-Aktivierung unterdrückte (Choi *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2012). Möglicherweise bahnt jene gegenseitige Beeinflussung der Signalwege im Laufe der malignen Transformation den Wechsel von Nrf2 und TGF- β 1 von Tumorsuppressoren hin zu Tumorpromotoren.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Nrf2 ist ein durch oxidativen Stress induzierbarer Transkriptionsfaktor, der zytoprotektive Zellantworten vermittelt. In einer Entzündungssituation schützt Nrf2 hierdurch z.B. epitheliale Zellen vor einer oxidativen Zellschädigung und Mutagenese, was für eine anti-tumorigene Rolle von Nrf2 spricht. Doch die Tatsache, dass Nrf2 in vielen Tumorentitäten, so im PDAC, verstärkt aktiviert ist und mit Chemoresistenz und Wachstumsvorteilen in Verbindung steht, zeigt, dass Nrf2 offenbar auch pro-tumorigene Eigenschaften zukommen (Sporn & Liby, 2012; Niture & Jaiswal, 2012 & 2013; Geismann *et al.*, 2014). Die Daten zu den anti- und pro-tumorösen Effekten von Nrf2 im PDAC beruhen bislang zumeist auf Experimenten im murinen System, im rein humanen System sind Daten weiterhin rar. In dieser Arbeit sollte daher die duale Rolle von Nrf2 in der malignen Transformation des humanen Pankreasgangepithels aufgeklärt werden. Um zu verifizieren, ob ein Wechsel bereits in frühen Stadien der Entwicklung des PDAC auftreten kann, wurde besonderes Augenmerk auf die Untersuchung prämaligen Gewebes bzw. prämaligener Zellen gelegt.

Als Kollektiv standen dazu 22 Präparate von Individuen ohne pankreatische Erkrankung (im Folgenden auch als Pankreasleiden-freies Gewebe bezeichnet), 14 Präparate von Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) und 9 Präparate von Patienten mit einem diagnostizierten PDAC zur Verfügung. Mittels immunhistochemischer Analyse sollte zunächst detektiert werden, ob Nrf2 bereits in PanIN-Läsionen aktiviert ist und ob dies mit einer erhöhten Proliferation einhergeht. Um einen Einblick auch in spätere Phasen der Tumorgenese zu geben, sollte in kleinem Umfang auch der Nrf2- und Proliferationsstatus im PDAC erfasst werden.

Um ferner die Frage zu klären, ob eine Nrf2-Aktivierung vom entzündlichen Kontext der CP beeinflusst wird, sollte der Nrf2-Status von PanINs aus Pankreasleiden-freiem Gewebe mit jenen aus chronischer Pankreatitis verglichen werden. Denn neben der Akkumulation genetischer Mutationen wird auch der Mikroumgebung des Gangepithels eine Rolle in der malignen Transformation zugesprochen (Esposito *et al.*, 2012).

Um festzustellen, ob Makrophagen als wesentliche Stromakomponente in PanIN-Läsionen zur Aktivierung von Nrf2 beitragen, sollte einerseits *in situ* die Nrf2-Expression mit dem Ausmaß der Makrophageninfiltration korreliert werden. Andererseits sollte *in vitro* nach Hinweisen einer möglichen malignen Transformation von Vorläuferzellen nach Anwesenheit von inflammatorischen Zellen gesucht werden. Hierfür sollte nach Cokultivierung mit Makrophagen die Nrf2-Aktivität und das Wachstumsverhalten zweier Pankreasgangepithelzelllinien untersucht werden, die verschiedenen Stadien der frühen Karzinogenese des PDAC ähneln. Insbesondere

sollten die Zellzahl bestimmt und Proliferations-assoziierte Signalwege mittels Westernblot analysiert werden.

In einem dritten Teil der Experimente sollten die Nrf2-Effekte auf das Zellwachstum in ihrem Zusammenwirken mit dem Zytokin TGF- β 1 näher charakterisiert werden, für das eine ähnliche Dualität in der Tumorgenese beschrieben ist. Hierfür sollte Nrf2 in gesunden und in prämaligen Pankreasgangepithelzellen mittels Transfektion überexprimiert und ihr Wachstumsverhalten anhand Zellzahlbestimmung, Ki67-Färbung und *Signaling* mittels Westernblot in Abhängigkeit der TGF- β 1-Behandlung analysiert werden. Damit sollte geklärt werden, ob Nrf2 im PDAC protumorigen wird, indem es TGF- β 1-abhängige Zellantworten moduliert.

Insgesamt werden die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis davon beitragen, ob und wie ein Zusammenspiel beider Faktoren in vorneoplastische Veränderungen eingebunden ist und ob sich damit ein funktionaler Wechsel von Nrf2 und TGF- β 1 bereits in frühen Phasen der PDAC-Entwicklung ereignen kann.

2 Material

2.1 Geräte

Inkubationsgeräte	Firma
BBD 6220 CO ₂ -Incubator	Thermo Scientific, Schwerte, D
GyroTwister Schwänker	Labnet, Woodbridge, USA
MultiGourmet Dampfbad	Braun, Kronberg, D
QBA1 Tisch-Inkubator	Grant, Cambridge, UK
Stuart SRT9 Rollermixer	Bibby Scientific Ltd, Stone, UK
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
WTC ED-53 Inkubationsschrank	Binder, Tuttlingen, D
HERA Cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Schwerte, D
Messgeräte	Firma
Fusion SL Detektionssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
NanoDrop2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, Schwerte, D
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, D
Mikroskope	Firma
AE 2000	Motic, Wetzlar, D
Axiophot 2	Zeiss, Jena, D
BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, D
Evos _{xl} Core	AMG, Bothell, USA
Mischgeräte, Schneidegeräte, Andere	Firma
HM 430 Mikrotom	Microm, Walldorf, D
IKA Vortex Genius 3	IKA, Staufen, D
MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Kühlgeräte	Firma
HERAFreeze Basic Tiefkühler (-80°C)	Thermo Scientific, Schwerte, D
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
TES 99 Kühlplatte	Medite, Burgdorf, D
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Pipetten	Firma
Finnpipette 0,2-2µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 1-10µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 2-20µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 20-200µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 100-1000µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Pipetboy-acu	Integra-Biosciences, Fernwald, D
Ripette	Ritter, Schwabmünchen, D
Sterilbänke	Firma
HERA Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, D
Waagen	Firma
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB 120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

Westernblot-Analyse	Firma
CS-300V Powersupply	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
OmniPAGE VS10D Gelkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, München, D
SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
Sonicator Sonoplus	Bandelin, Berlin, D

Zentrifugen	Firma
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
JE-6B-Elutriator System	Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA
Sprout mini centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Deckgläser 22 x 50 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Eppendorfgefäße 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Nitril-Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, München, D
Objektträger 76 x 26 mm Superfrost	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm „M“	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen 20 µl / 200 µl / 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ritips 25 µl / 50 µl / 100 µl	Ritter, Schwabmünchen, D
Röhrchen 15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten 5 ml / 10 ml / 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Serumpipette 153 mm, lang	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
VueLife® FEP Zellkulturbeutel	Süd-Laborbedarf, Gauting, D
Whatman-3MM Filterpapier	FE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, D
6-/ 12-/ 24-/ 96- Well Flachbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
6-/ 12- Well Transwelleinsätze (Porengröße 0,4 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
18 mm Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, D
96-Well-Mikrotestplatten (farblos)	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Well-PCR-Platten (weiß)	Roche, Basel, CH
96-Well-Rundbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.3 Chemikalien und Stimulanzen

Chemikalien	Firma
AEC Substrat Chromogen Ready-to-Use	Dako Diagnostika, Hamburg, D
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Th. Geyer, Renningen, D
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg, D
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, München, D
DMEM Medium	PAA, Pasching, A
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
EnVision + System-HRP <i>anti goat</i>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
EnVision + System-HRP <i>anti mouse</i>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
EnVision + System-HRP <i>anti rabbit</i>	Dako Diagnostika, Hamburg, D
Essigsäure 10 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Glycerol 80 %	Sigma-Aldrich, München, D

Chemikalien	Firma
Kaiser's Glyceringelatine	Waldeck, Münster, D
Keratinocyten serumfreies Medium	Life Technologies, Darmstadt, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Mayer's Haemalaun	Applichem, Darmstadt, D
Methanol	Th. Geyer, Renningen, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
PBS	PAA, Pasching, A
Penicillin-Streptomycin	PAA, Pasching, A
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Life Technologies, Darmstadt, D
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe, D
RPMI Medium 1640	Biochrom, Berlin, D
SDS ultra-pure	Carl Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, D
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, A
Tween 20	Serva, Heidelberg, D
Xylol	Th. Geyer, Renningen, D
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, München, D

Stimulanzen	Firma
EGF, <i>human recombinant</i>	Life Technologies, Darmstadt, D
GM-CSF, <i>human recombinant</i>	BioLegend, Fell, D
M-CSF, <i>human recombinant</i>	BioLegend, Fell, D
TGF- β 1, <i>human recombinant</i>	BioLegend, Fell, D

2.4 Rezepturen

Lösung	Rezeptur
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 g Milchpulver 100 ml TBS-T (1x)
Citratpuffer (10x)	3,78 g Citratsäure 24,21 g Natriumcitrat-Dihydrat 1000 ml Aqua dest. pH 6,0
Lämmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol pH 7,6
TBE-Puffer (10x)	89 mM Tris-Base 2 mM EDTA 89 mM Borsäure pH 7,6

Lösung	Rezeptur
TBS (10x)	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	100 ml TBS (10x) 1000 µl Tween 20 ad 1000 ml Aqua dest.
Westernblot Farbpuffer	2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,005 % (w/v) Bromphenolblau In 2x Lämmli-Puffer
Westernblot Sammelgel	0,75 ml Aqua dest. 312,50 µl Tris-Puffer pH 6,8 162,50 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 2,0 ml Acrylamid 30 % (w/v) 22,0 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 4,4 µl TEMED

2.5 Kits und Plasmide

Kits	Firma
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, D
NucleoSpin® RNA/Protein	Macherey-Nagel, Düren, D
PageRuler	Fermentas, St.Leon
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen, Venlo, Niederlande

Plasmide	Firma
pcDNA™3.1 ⁽⁻⁾	Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA™3.1 ^(+ Nrf2-HA) generiert: H.Schäfer, Molekulare Gastroenterol., UKSH Kiel	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.6 Antikörper

Primärantikörper (Klon)	Spezies (Isotyp)	Konzentration (Bestand)	Verdünnung (Anwendung)	Solvens	Hersteller
anti-HA	Kaninchen (polyklonal)	560 µg/ml	1:2000 (WB)	Blotto	Sigma-Aldrich Taufkirchen, D
anti-HLADR (CR3/43)	Maus (IgG ₁)	25,6 µg/ml	1:25 (IHC)	1 % BSA In PBS	Zytomed Systems Berlin, D
anti-HSP90 α/β (H-114)	Kaninchen (polyklonal IgG)	200 µg/ml	1:2000 (WB)	Blotto	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg, D
anti-Ki67	Kaninchen (polyklonal)	700 µg/ml	1:250 (IHC)	5 % BSA In TBS-T	Fisher Scientific Schwerte, D
anti-Ki67 (B56)	Maus (IgG _{1,κ})	500 µg/ml	1:125 (IZC)	5 % BSA In TBS-T	BD Bioscience San Jose, USA
anti-phospho Nrf2 S40	Kaninchen (monoklonal)	499 µg/ml	1:1000 (WB)	Blotto	Abcam Cambridge, UK
anti-phospho Nrf2 S40	Kaninchen (monoklonal)	100 µg/ml	1:100 (IHC)	0,1 % BSA in 0,3 % PBS-T	Abcam Cambridge, UK
anti-total-p38 MAPK	Kaninchen (polyklonal)	27 µg/ml	1:1000 (WB)	5 % BSA In TBS-T	Cell Signalling Frankfurt a.M., D

Primärantikörper (Klon)	Spezies (Isotyp)	Konzentration (Bestand)	Verdünnung (Anwendung)	Solvens	Hersteller
anti-phospho-p38 MAPK (D3F9)	Maus (polyklonal)	78 µg/ml	1:1000 (WB)	5 % BSA In TBS-T	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-total-Erk1/2 MAPK	Kaninchen (polyklonal)	7,6 µg/ml	1:1000 (WB)	5 % BSA In TBS-T	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-phospho-Erk1/2 MAPK (T202/Y204)	Kaninchen (polyklonal)	150 µg/ml	1:1000 (WB)	5 % BSA In TBS-T	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-phospho-Smad3 c-terminus	Kaninchen (polyklonal)	100 µg/ml	1:500 (WB)	Blotto	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-total-Smad2/3 (E-20)	Ziege (polyklonal)	200 µg/ml	1:200 (WB)	Blotto	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg, D
anti-p21 (70/Cip1/WAF1)	Maus (IgG _{2A})	250 µg/ml	1:250 (WB)	Blotto	BD Bioscience San Jose, USA

Sekundärantikörper (Spezies, Isotyp)	Konjugat	Konzentration (Bestand)	Verdünnung (Anwendung)	Solvens (WB)	Hersteller
anti-Kaninchen (Ziege, IgG)	Biotin-SP	1000 µg/ml	1:200 (IHC)	-	Jackson Immuno- Research Suffolk, UK
anti-Kaninchen (Ziege, IgG)	HRP	250 µg/ml	1:2000 (WB)	Blotto	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-Maus (Pferd, IgG)	HRP	250 µg/ml	1:2000 (WB)	Blotto	Cell Signalling Frankfurt a.M., D
anti-Maus (Kaninchen, IgG)	Biotin-SP	1200 µg/ml	1:200 (IHC)	-	Jackson Immuno- Research Suffolk, UK
anti-Maus (Ziege, IgG)	Alexa Fluor 488	2000 µg/ml	1:500 (IZC)	-	Life Technologies Darmstadt, D
anti-Ziege (Esel, IgG)	HRP	100 µg/ml	1:2000 (WB)	Blotto	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg, D

2.7 Zelllinien

Zelllinie Organismus	Bezugsquelle	Medium	Mediumzusätze
HPDE6c7-pBp (kurz: HPDE-pBp) <i>Homo sapiens</i>	Prof. M.-S. Tsao Ontario Cancer Center Toronto, Kanada	HPDE-Medium: RPMI-1640 + Keratinocyten- Medium (1:1)	0,5 % (v/v) L-Glutamin 5 ng/ml EGF 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt
HPDE6c7-kras (kurz: HPDE-kras) <i>Homo sapiens</i>	(Zelllinie beschrieben in: Furukawa et al., 1996)		
Monozyten (Primärzellen) <i>Homo sapiens</i>	Prof. Dr. N. Reiling Forschungszentrum Borstel	RPMI-1640	10 % FCS 1 % L-Glutamin 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin
M1- Makrophagen <i>Homo sapiens</i>	Differenzierungskultur aus primären Monozyten	RPMI-1640	10 % FCS 1 % L-Glutamin 50 ng/ml GM-CSF
M2- Makrophagen <i>Homo sapiens</i>			10 % FCS 1 % L-Glutamin 50 ng/ml M-CSF

2.8 Computerprogramme

Computerprogramme	Firma
Adobe Fireworks CS4	Adobe Systems GmbH, München, C
AxioVision Rel 4.8	Zeiss, Jena, D
BZ-9000 Image Analysis Application	Keyence, Neu-Isenburg, D
Fusion CAPT Software 16.06	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nano Drop 2000/2000c Software	Thermo Scientific, Schwerte, D
SigmaPlot Software 12.5	Systat Software, Erkrath, D

3 Methoden

3.1 Methoden an humanem Pankreasgewebe

3.1.1 Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern ohne Pankreas-Anamnese

Für die Untersuchungen *in situ* wurde makroskopisch unauffälliges Pankreasgewebe von Individuen analysiert, die nachweislich nicht an einem Pankreasleiden verstarben. Es handelt sich um gerichtsmedizinisches Untersuchungsgut von 22 Personen unterschiedlichen Alters, die von Prof. Dr. Bence Sipos vom Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt wurden. Die Gewebeanalyse sowie die Verwendung klinischer Daten wurde von der Ethikkommission der Semmelweis-Universität Budapest (Ungarn) genehmigt (Ethikvotumnummer 140-1/1996).

Je Individuum wurden *post mortem* ein bis maximal acht Biopsien aus Pankreaskopf, Pankreaskörper oder Pankreasschwanz entnommen, deren Lokalisation mit 1-4, 5-6 oder 7-8 gekennzeichnet wurde (s. Tabellen im Anhang). Von den insgesamt 67 Proben wurden 3 µm-dicke serielle Schnitte angefertigt. Das Kollektiv wurde bereits von Lüttges *et al.* und von Detlefsen *et al.* ausführlich charakterisiert (Lüttges *et al.*, 1999; Detlefsen *et al.*, 2005). Alle Pankreata wiesen sowohl gesunde Gangepithelien als auch PanIN-Läsionen auf. Mikrodissektierte Areale waren im *Screening* zu 18,9 % positiv für die *kras*^{G12D}-Mutation (Lüttges *et al.*, 1999). Hinsichtlich der Makrophageninfiltration wurde es von A. Broich im Rahmen ihrer Masterarbeit untersucht (Broich, 2014).

3.1.2 Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern mit CP

Für die Untersuchungen an CPs wurden 14 in Paraffin gebettete 5 µm-dicke Gewebeschnitte seitens Prof. Dr. Bence Sipos zur Verfügung gestellt. Die Gewebeanalysen sowie die Verwendung klinischer Daten wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (Ethikvotumnummer E470/210BO1). Der Altersmedian der Spender/innen lag bei 52 Jahren (Altersspanne 40 – 69 Jahre). Hinsichtlich der Makrophageninfiltration wurde das Kollektiv bereits von Dr. Ole Helm untersucht, der es mit PDAC-Gewebe verglich (Helm, 2014).

3.1.3 Gewebeschnitte aus Pankreasresektaten von Spendern mit PDAC

Für die Untersuchungen an PDACs wurden 9 in Paraffin gebettete 5 µm-dicke Gewebeschnitte seitens Prof. Dr. Christoph Röcken vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums

Schleswig Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Die Gewebeanalysen sowie die Verwendung klinischer Daten wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein genehmigt (Ethikvotumnummer D400/14). Die Gewebeproben stammten von fünf männlichen und vier weiblichen Spender/innen. Von ihnen waren zum OP-Zeitpunkt fünf älter als 65 Jahre und vier jünger als 65 Jahre. Alle Präparate wiesen das am häufigsten operierte Stadium des PDACs T3N1M0 auf. Dieses zeichnet sich durch eine die Organgrenze überschreitende Tumorausdehnung aus, die die Invasion des *Truncus coeliacus* und der *Arteria mesenterica superior* ausspart (T3). Ferner liegt in diesem Stadium ein regionärer Lymphknotenbefall (N1) bei Fehlen von Fernmetastasen (M0) vor. Die untersuchten Fälle wiesen vornehmlich mäßig differenziertes malignes Gewebe auf (G2 in 5 Fällen). Drei Fälle zeigten ein Grading der Stufe G1 und ein Fall das der Stufe G3. Wie unter 3.1.2 erwähnt, wurde das Kollektiv bereits von Dr. Ole Helm hinsichtlich der Makrophageninfiltration im Vergleich mit CP-Gewebe untersucht (Helm, 2014).

3.1.4 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemische Färbung von p-Nrf2 wurden die Gewebeschnitte zunächst in Xylol entparaffiniert (zweimal 10 Minuten). Die anschließende Rehydrierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe in 100 % Ethanol für zweimal 10 Minuten und in 95 % Ethanol unter Zugabe von 0,3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 5 Minuten. Letzteres dient der Absättigung endogener Peroxidasen. Nach weiteren je 2 Minuten Inkubation in 70 % Ethanol, 50 % Ethanol und Aqua dest. wurden die Schnitte für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Für die Antigen-Demaskierung wurden die Präparate in Citratpuffer mit pH 6,0 für 20 Minuten unter Dampfhitze inkubiert und erneut für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1:100 in 0,1 % BSA in PBS mit Zugabe von 0,3 % Triton angesetzt. Pro Schnitt wurden 150 µl Antikörperlösung verwendet. Eine gleichmäßige Verteilung der Lösung auf dem Gewebeschnitt wurde durch Abdecken mit Parafilm gesichert. Ebenfalls in der Feuchtkammer, aber bei Raumtemperatur (RT) erfolgte nach dreimaligem Waschen à 5 Minuten in PBS die dreißigminütige Inkubation im Sekundärreagenz EnVision + System-HRP *anti rabbit*. Ihr schloss sich erneut dreimaliges Waschen à 5 Minuten mit PBS plus 0,3 % Triton an. Die Substratreaktion erfolgte mit AEC Substrat Chromogen für 30 Minuten bei RT in der Feuchtkammer. Es folgte neuerliches dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten. Die Kernfärbung wurde mit 1:1 Meyers Haemalaun und Aqua dest. für 10 Sekunden bei RT und anschließender Bläuung für 15 Minuten unter kaltem, fließendem Leitungswasser durchgeführt. Zuletzt wurden die Präparate

mit Glyceringelatine unter einem Deckgläschen versiegelt. Bei der Etablierung der Färbung von p-Nrf2 zeigte die Isotypenkontrolle keine oder eine leichte Anfärbung.

Die immunhistochemischen Färbungen von Ki67, CD68 und CD163 in allen 90 Präparaten (67 Pankreasleiden-freie Präparate, 14 CP-Präparate und 9 PDAC-Präparate) erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Dabei wurden automatisierte Standardmethoden angewandt. Die immunhistochemische Färbung von HLA-DR erfolgte für die 67 Pankreasleiden-freien Präparate durch A. Broich, die in den CP-Präparaten durch Dr. O. Helm (Näheres s. Broich, 2014; Helm, 2014). Für die immunhistochemische Färbung von phospho-Nrf2 (p-Nrf2) und Ki67 in allen 90 Präparaten (67 Pankreasleiden-freie Präparate, 14 CP-Präparate und 9 PDAC-Präparate) wurden jeweils benachbarte Schnitte aus der seriellen Schnittfolge genutzt.

3.1.5 Scoring-System und statistische Analyse der immunhistochemischen *in situ* Färbungen

In den Pankreasleiden-freien Präparaten wurden pro Schnitt fünf gesunde Gänge und wenn möglich fünf PanINs unter dem Lichtmikroskop analysiert (Vergrößerung bis 800-fach). In den CP-Präparaten wurden wenn möglich fünf Gänge, vorwiegend PanIN-Läsionen begutachtet. Es wurden jeweils intraduktal lokalisierte Ausführungsgänge untersucht, die von bindegewebigem Stroma umgeben waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Epithel sowohl vollständig erhalten, als auch frei von Färbeartefakten war. Die gesunden Gänge mussten dabei ein kubisches Epithel aufweisen, das so anhand der Morphologie als normal charakterisiert werden konnte (s. 1.2.1). Bei disputabler Zuordnung zu einem gesunden Gang oder einer PanIN-1-Läsion wurde zugunsten des gesunden Ganges entschieden. Innerhalb eines PanINs fanden sich des Öfteren Areale mit verschiedenem Läsionsgrad. Von einer Differenzierung wurde hier abgesehen.

Zur quantitativen Analyse wurde ein Scoring-System mit 5 Kategorien genutzt, welches am Institut für Pathologie des UKSH Campus Kiel Anwendung findet. Ermittelt wird dabei der prozentuale Anteil positiv gefärbter Epithelzellen an allen angeschnittenen Epithelzellen eines Gangsystems. Fünf möglichen Prozentbereichen wird je ein %-Score zugeordnet. %-Score 0 erhalten Gänge, bei denen keine Epithelzelle positiv gefärbt ist. %-Score 1 wird vergeben für Gänge mit mindestens einer einzelnen bis maximal 10 % angefärbten Epithelzellen. %-Score 2 umfasst den Prozentbereich von mehr als 10 % bis maximal 50 %, %-Score 3 jenen von über 50 % bis zu 90 % angefärbter Epithelanschnitte. Den höchsten %-Score 4 erhalten solche Gänge, die mehr als 90 % Positivität aufweisen (vgl. Tab. 3.1, oben).

Tab. 3.1: Scoring-Schema (oben) und Dichotomisierungs-Schema (unten) zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des Pankreasgangepithels.

Anteil positiv gefärbter Gangepithelzellen eines Gangs (in %)	% - Score
$x = 0$	0
$0 < x \leq 10$	1
$10 < x \leq 50$	2
$50 < x \leq 90$	3
$x > 90$	4
Gesamt-Score eines Individuums = Mittelwert aus allen % - Scores	
Bestimmung des Medians einer Gruppe aus allen Gesamt-Scores	
Gesamt-Score	(Dichotomisierungs-) Merkmal
< Median	1
\geq Median	2

In Abb. 3.1 sind ausgewählte PanIN-Läsionen mit entsprechender Scoring-Zuordnung beispielhaft gezeigt.

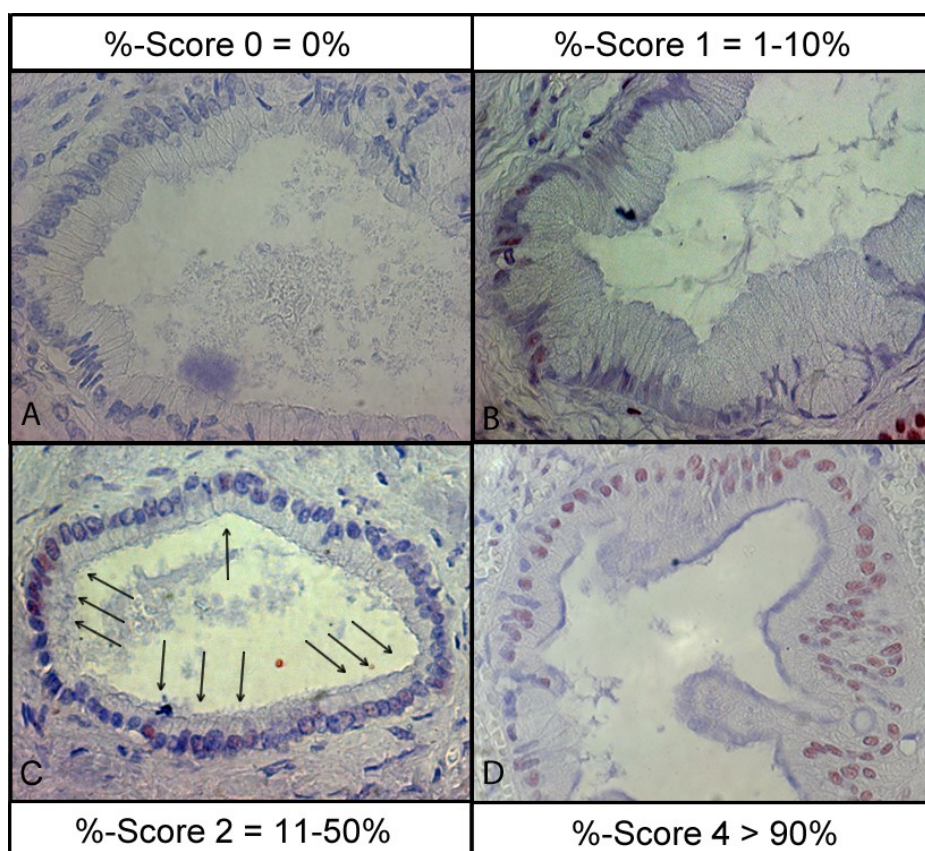


Abb. 3.1: Beispiele der Scoring-Zuordnung der p-Nrf2-Färbung von vier ausgewählten Gangepithelanschnitten in PanIN-Läsionen (A-C) bzw. PDAC-Gewebe (D). Die Pfeile in B zeigen auf positiv gefärbte Zellen. 800-fache Vergrößerung.

Diese Einteilung wurde zunächst gewählt, um subjektive Fehleinschätzungen zugunsten einer besseren Test-Reliabilität weitestgehend zu vermeiden. Sofern im Gesichtsfeld ein Gang mehrfach angeschnitten war, oder mehrere Gänge in einem Areal gruppiert vorlagen, wurden diese als ein Gang angesehen. Überragte ein Gangareal ein Gesichtsfeld, so wurden so viele Gesichtsfelder ausgewertet und die entsprechenden %-Scores gemittelt, bis das Areal vollständig abgedeckt war. Pro Präparat wurden die %-Scores der fünf gesunden Gänge als auch die der maximal fünf gefundenen PanIN-Läsionen gemittelt. Lagen pro Individuum mehrere Präparate vor (nicht im CP), so wurde der Mittelwert der %-Scores aller analysierten gesunden Gängen bzw. PanIN-Läsionen dieses Individuums gebildet. Entsprechend der Rundungsregeln wurde das Ergebnis der Mittelwert-Berechnung auf einen Gesamt-Score pro Individuum ab- oder aufgerundet (vgl. Tab. 3.1). Um dichotomisieren zu können, wurde anschließend für die drei Gruppen Gesundes Gangepithel (Gruppe "0") , PanIN (Gruppe "1") und PanIN in CP (Gruppe "2") der Median aller Gesamt-Scores bestimmt. Sofern der Gesamt-Score eines Individuums kleiner als der Median war, wurde dem Individuum das (Dichotomisierungs-)Merkmal 1 zugewiesen. Die untersuchten Gangepithelien dieses Individuums wiesen damit durchschnittlich keine oder eine nur marginale positive Färbung auf. Sofern der Gesamt-Score größer oder gleich dem Median war, so wurde dem Individuum das (Dichotomisierungs-)Merkmal 2 zugewiesen. Jene Individuen wiesen damit durchschnittlich eine ausgeprägte positive Färbung der untersuchten Gangepithelien auf (vgl. Tab. 3.1, unten). Die erhobenen Gesamt-Scores und Dichotomisierungsmerkmale aller Individuen sowie die Mediane sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

Die Erhebung der Makrophageninfiltration in den Pankreasleiden-freien Präparaten erfolgte durch A. Broich (Teile ihrer Masterarbeit). Jene im CP-Gewebe wurde durch Dr. O. Helm durchgeführt (Teile seiner Dissertation). Scoring und Dichotomisierung erfolgten in beiden Geweben wie oben beschrieben. Zunächst wurden jeweils die CD68-, CD163- und die HLA-DR-positiven Zellen gezählt. Um ihre Polarisierung unterscheiden zu können, wurde der Anteil der CD163-positiven und der HLA-DR-positiven Zellen an den CD68-positiven Zellen angegeben (Näheres s. Broich, 2014 und Helm, 2014).

Für die Vergleiche der Marker p-Nrf2, Ki67, CD68, HLA-DR bzw. CD163 zwischen den Gruppen „Gesundes Gangepithel“ versus „PanIN in CP“ ("0" vs. "2") bzw. „PanIN“ versus „PanIN in CP“ ("1" vs. "2") wurde als Chi-Quadrat-Test der Exakte 2-seitige Test nach Fisher verwendet. Er wurde je unter der Annahme durchgeführt, dass die Gruppen unabhängig voneinander sind.

Für den Vergleich der Marker p-Nrf2, Ki67, CD68, HLA-DR bzw. CD163 zwischen den

Gruppen „Gesundes Gangepithel“ versus „PanIN“ ("0" vs."1") wurde berücksichtigt, dass jene PanIN-Läsionen und die gesunden Gangepithelien aus den gleichen (Pankreasleiden-freien) Individuen stammten. Folglich musste auch von einem möglichen Einfluss des Individuums auf den Zusammenhang zwischen Gruppe und Merkmal ausgegangen werden. Für diese verbundene Stichprobe eignete sich der Chi-Quadrat-Test nach McNemar. Hierbei konnten nur diejenigen Individuen berücksichtigt werden, deren Pankreasgewebe zusätzlich zu gesunden Gängen mindestens eine PanIN-Läsion aufwies.

Zur Analyse potentieller Korrelationen zwischen den Markern p-Nrf2, Ki67, CD68, HLA-DR bzw. CD163 innerhalb des gesunden Gangepithels, der PanIN-Läsionen bzw. der PanIN-Läsionen in CP wurde als nicht-parametrischer Test die Spearman-Korrelation berechnet, da es sich um nicht-normalverteilte Daten handelte. Die statistische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sandra Freitag-Wolf vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik (UKSH, Campus Kiel) mit dem Programm SPSS Statistics (IBM, Armonk, USA).

3.2 Zellkultur-Methoden

3.2.1 Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie HPDE6c7

Als Modell für gesundes Pankreasgangepithel wurde die humane pankreatische duktales Epithelzelllinie HPDE6c7-pBp (im Folgenden kurz: HPDE-pBp) verwendet. Für diese Zelllinie wurden originär von Tsao *et al.* im Montreal General Hospital (Kanada) Pankreasgangepithelzellen aus dem Pankreasresektat einer 63-jährigen Frau isoliert (Furukama *et al.*, 1996). Für Forschungszwecke wurden die Zellen mittels retroviraler Transduktion von HPV16-E6E7 immortalisiert (Liu *et al.*, 1998). Durch das transduzierte E6E7-Onkoprotein ist die Aktivität von p53 und die des Rb-Onkoproteins kompromittiert.

HPDE-pBp-Zellen wurden zusätzlich mit dem leeren retroviralen pBabe-puro-Vektor transduziert. Die Zelllinie weist keinerlei mit der Entstehung eines PDAC assoziierte Genveränderungen wie *kras*, *p53*, *p16* oder *smad4/DPC4* auf. Inokuliert in immundefiziente Mäuse erweist sie sich über einen Zeitraum von 6 Monaten als nicht-tumorigen (Furukama *et al.*, 1996). Bezüglich Morphologie und Wachstum zeigt die Zelllinie über viele Passagen das Verhalten kultivierter Epithelzellen, die als polygonale Zellen adhärent in einem Zellverband wachsen und durch TGF- β 1 in ihrem Wachstum inhibierbar sind (Ouyang *et al.*, 2000).

Die humane pankreatische duktales Epithelzelllinie HPDE6c7-*kras* (im Folgenden kurz: HPDE-*kras*) wurde durch Transduktion mit dem retroviralen pBabe-*kras*-Vektor etabliert, so dass die Zellen mutiertes *kras*^{G12V} aufweisen. Somit exprimiert diese Zelllinie das *kras*-Gen als

Onkogen *kras*^{G12V} und wurde als Modell für prämaliges Pankreasgangepithel, wie es in PanINs zu finden ist, verwendet. Nach Inokulation in immundefiziente Mäuse zeigen HPDE-*kras*-Zellen einen inkompletten tumorigenen Phänotyp, der in 50 % der Tiere zur Tumorbildung führt (Qian *et al.*, 2005).

3.2.2 *In vitro*-Generierung von Makrophagen

Als Simulation eines monozytären Stromas wurden in den Cokultur-Experimenten pro- und anti-inflammatorische Makrophagen eingesetzt. Hierzu wurden zunächst primäre Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender gewonnen (vgl. Abb. 3.2). Dem durchführenden Forschungszentrum Borstel lag eine schriftliche Einwilligung aller Spender vor. Per Dichtegradientenzentrifugation wurde die mononukleäre Zellfraktion isoliert und mit einem JE-6B-Elutriator System durch Gegenstromzentrifugation weiter in Lymphozyten und Monozyten aufgetrennt. Die Monozyten wurden dann dem Labor der AG Inflammatorische Karzinogenese des Instituts für Experimentelle Tumorforschung (UKSH, Campus Kiel) zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Für die Differenzierungskulturen wurden nur Monozyten mit einer Reinheit von mindestens 90 % verwendet. Noch am selben Tag wurden sie zur Differenzierung zu M1- bzw. M2-Makrophagen nach einem etablierten Protokoll in Kultur genommen (Verreck *et al.*, 2004). Dazu wurden Monozyten zu je 15×10^6 Zellen in 27 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin in VueLife-FEP®-Beutel überführt. Für die Generierung von M1-Makrophagen wurde dem Medium 50 ng/ml GM-CSF, für die Generierung von M2-Makrophagen 50 ng/ml M-CSF supplementiert. Die luftblasenfrei befüllten Beutel wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 85 % rF inkubiert. Die Zugabe der Antibiotika wurde genutzt, um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen. Die FEP-Beschichtung und die Abwesenheit von Luft waren nötig, um andere Differenzierungsstimuli als die zugesetzten Wachstumsfaktoren möglichst gering zu halten.

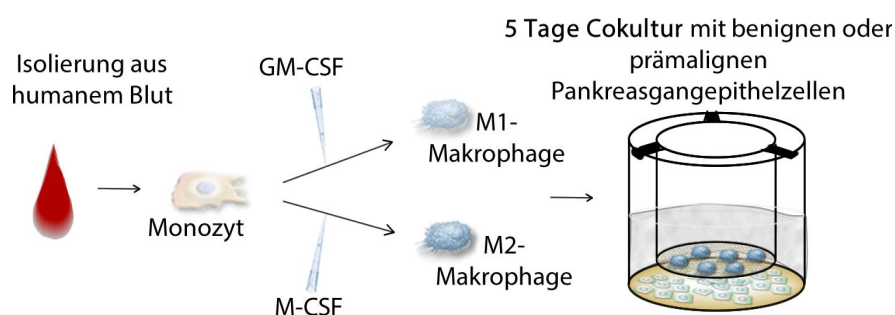


Abb. 3.2: Schema der *in vitro*-Generierung von M1- und M2- Makrophagen aus primären Monozyten aus Blut humaner Spender.

Nach 7 Tagen wurden die Beutel für eine Stunde auf Eis gekühlt und die Zellen anschließend

durch vorsichtiges Beklopfen der Beutel abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhren überführt, die Beutel mit 20 ml sterilem PBS nachgespült und die entstandene Suspension ebenfalls in das Röhren gegeben. Die Röhren wurden 10 Minuten bei 1400 U/Min und RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin resuspendiert. Die Pellets mehrerer Beutel derselben Zellpopulation wurden vereinigt. Um die Zellen für die Versuchsreihen zu verwenden, wurde die Zellzahl bestimmt. Die VueLife-FEP®-Beutel wurden 2 x mit 20 ml 70 % EtOH gespült, mit 20 ml 70 % EtOH befüllt und bis zur Wiederverwendung bei RT eingelagert.

3.2.3 Kultivierung von Zelllinien

Für die Kultivierung von Zellen wurde der in flüssigem Stickstoff bei -196°C langfristig konservierten HPDE-Stammkultur ein Kryo-Röhren entnommen, das die Zellen in 10 % DMSO in FCS enthielt. Diese wurden in 5 ml vorgewärmtem HPDE-Kulturmedium resuspendiert und in ein 50 ml Röhren gegeben. Um das zytotoxisch wirkende DMSO zu entfernen, wurde das Röhren für 5 Minuten bei 1200 U/Min und RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut in 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Schritte wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium in Polystyrol-Kulturflaschen überführt und bei 37°C Umgebungstemperatur, 5 % CO₂ und 86 % rF im Brutschrank inkubiert (s. 2.7). Die Kulturen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Das verbrauchte Kulturmedium wurde zu diesem Zweck mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, um anfallende Abbaustoffe der Zellen zu entfernen und es durch frisches Medium ersetzen zu können. Um inter- und extrazelluläre Bindungen zu lösen, wurde 5 ml der Proteaselösung Trypsin-EDTA in PBS auf die adhären Zellen gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Überführung in ein neues 50 ml-Röhren wurde die Reaktion des Trypsins durch Zugabe von 5 ml frischem Medium mit 10 % FCS gestoppt. Zum Auswaschen des Trypsins wurde die Zelllösung 5 Minuten bei 1200 U/Min und RT zentrifugiert und die Zellen anschließend in 20 ml frischen Kulturmediums resuspendiert und in zwei neue Kulturflaschen à 10 ml aufgeteilt. Eine Zellkultur wurde nach 15-maliger Passage verworfen und durch frisch aufgetaute Zellen ersetzt. Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank vorgenommen.

3.2.4 Cokultivierung von Zelllinien

Um den Einfluss von Makrophagen auf pankreatisches Gangepithel *in vitro* zu untersuchen,

wurden die Pankreasgangepithelzellen HPDE-pBp oder HPDE-kras alleine (Monokultur) oder in Cokultur mit M1- oder M2-Makrophagen in einem indirekten Transwellsystem kultiviert. Bei dieser Cokulturvariante haben die jeweiligen Zellpopulationen keinen direkten Zell-Zell-Kontakt, sondern stehen nur über lösliche Faktoren über das Kulturmedium in Kontakt. In Abb. 3.3 ist der Aufbau der Mono- und Cokultur-Ansätze schematisch dargestellt.

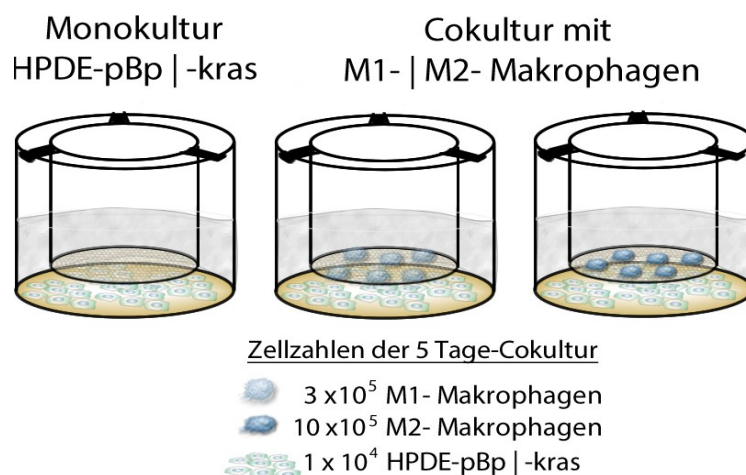


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Monokultur und indirekten Cokultivierung der HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen (je in Wells ausgesät) mit M1- bzw. M2-Makrophagen (je in Transwells ausgesät, die in die Wells eingehängt sind).

Da der größte Zellzahlabfall innerhalb des ersten Tages nach Aussaat zu beobachten ist, erfolgte diese zunächst als Monokultur im jeweiligen Kulturmedium für die Epithelzellen bzw. Makrophagen. Durch dieses Vorgehen kann ab dem Start der Cokultur von einer weitgehend stabilen Zellzahl ausgegangen werden. In die Vertiefungen einer 12-Wellplatte wurden pro Well 1×10^4 HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen ausgesät. Hiervon getrennt erfolgte die Aussaat der Makrophagen in Transwells, deren Böden Poren von $0,4 \mu\text{m}$ Durchmesser aufweisen und die in die Wellplatte eingehängt werden können. Da innerhalb der Makrophagenpopulation M2-Makrophagen ein schlechteres Adhäsionsverhalten als M1-Makrophagen zeigen, wurden, um ein optimales Adhärenz zu gewährleisten, pro Transwell 3×10^5 M1- aber 10×10^5 M2-Makrophagen ausgesät. Nach eintägiger Monokultivierung im Brutschrank wurden die Medien samt inadhärenter Zellen abgesaugt und mit 1 ml RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin versehen. Es erfolgte der Start der Cokultur durch Einhängen der Transwell-Einsätze in die Well-Platte.

Nach einer Versuchsdauer von 5 Tagen waren noch durchschnittlich 10×10^4 Zellen pro Well bzw. Transwell vital, so dass ein Verhältnis von HPDE-Zellen zu Makrophagen von annähernd 1:1 erreicht wurde. Als Kontrolle diente die Monokultur von HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen in 2 ml RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % Glutamin. Alle Ansätze wurden für

5 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.2.5 Überexpression von Nrf2

Den Versuchsablauf der Transfektion von HPDE-Zellen mit dem Nrf2-HA- bzw. Kontrollplasmid mit und ohne TGF- β 1-Stimulation zeigt Abb. 3.4 schematisch.

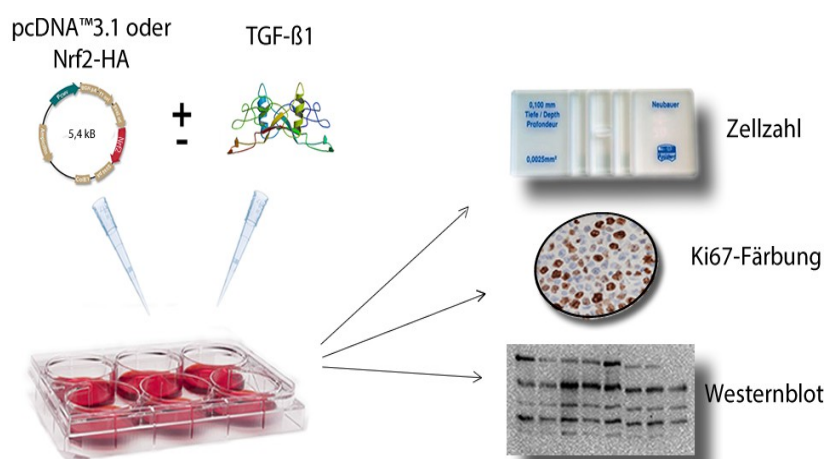


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Transfektion von HPDE-Zellen (mit Kontrollplasmid pcDNA3.1 bzw. Nrf2-HA und mit/ ohne TGF- β 1-Applikation) und der folgenden Analysemethoden.

Pro Well wurden 6×10^4 HPDE-pBp oder HPDE-kras-Zellen in eine 12-Wellplatte ausgesät. Nach eintägigem Anwachsen der Zellen wurde die Transfektion mit dem Transfektionskit Effectene Transfection Reagent[®] (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium aus den Wells abgesaugt und pro Well 800 μ l vorgewärmtes HPDE-Medium vorgelegt. Der Transfektionsansatz wurde in einem Eppendorf-Röhrchen wie folgt vorbereitet, wobei alle folgenden Angaben pro Well gelten: Zu Beginn wurden 50 μ l EC-Puffer sowie 0,2 μ g des Nrf2-HA-Plasmids bzw. des Kontrollplasmids pcDNA3.1 vorgelegt. Hinzu pipettiert und gemischt wurden sodann 1,6 μ l *Enhancer* (=8 μ l *Enhancer* pro μ g Plasmid) und diese Lösung für 5 Minuten bei RT ruhen gelassen. Anschließend wurden 4 μ l *Effekten* (=20 μ l *Effekten* pro μ g Plasmid) zugegeben, gemischt und nun für 10 Minuten bei RT inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz um 300 μ l HPDE-Medium ergänzt, erneut gemischt, um schließlich 350 μ l des Ansatzes tröpfchenweise in jedes Well zu pipettieren. Die Wellplatte wurde dabei vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Vermischung zu gewährleisten. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 18 Stunden. Pro Ansatz wurde die Zellen eines Wells zur Kontrolle ohne TGF- β 1-Stimulation belassen und die je eines anderen Wells mit 10 ng/ml TGF- β 1 für 48 Stunden stimuliert.

Für eine folgende Proliferationsanalyse mittels Ki67-Färbung wurden die Wellböden vor Aussaat mit Coverslips versehen, auf denen die Zellen anwachsen konnten.

3.3 Analyse-Methoden der *in vitro* Versuche

3.3.1 Zellzahl-Bestimmung

Für die Beurteilung der Zellviabilität der HPDE-Zellen nach Cokultivierung und nach Nrf2-Überexpression wurden die Zellzahlen bestimmt. Zunächst wurden die Zellen nach 5 Tagen (Mono- bzw. Cokultur) bzw. 4 Tagen (Transfektion) mittels 5 ml Trypsin vom Boden der Wells abgelöst und die Zellsuspension in Röhrchen überführt. Die Reaktion des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml frischem Medium nach 15 Minuten mit 10 % FCS gestoppt. Fünfminütiges Zentrifugieren bei 4000 U/Min und RT, Absaugen des Überstands und Resuspension des Pellets in 500 µl frischem Kulturmedium diente dem anschließenden Auswaschen des Trypsins. Um vitale von abgestorbenen Zellen unterscheiden zu können, wurde eine Färbung mit Trypanblau vorgenommen. Dieses penetriert nur die Zellmembran toter Zellen und färbt sie auf diese Weise bläulich an. Hierfür wurden je 90 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Alle ungefärbten Zellen aus vier Großquadranten wurden gezählt. Aus ihrer Summe wurde der Mittelwert gebildet und dieser mit dem Kammerfaktor (10^4) und der Verdünnung (10^1) multipliziert. Das Ergebnis entsprach der Zellzahl pro ml.

3.3.2 Ki67-Färbung an Deckgläschen und deren Quantifizierung

Für die Proliferationsanalyse per Ki67-Färbung wurden die Coverslips vorsichtig mit einer Pinzette aus der Wellplatte gehoben, in eine Coverslip-Halterung überführt und zunächst mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Coverslips anschließend in Aceton mit 0,3 % H_2O_2 für 10 Minuten inkubiert. Dabei wurde unter dem Abzug gearbeitet. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 5 Minuten auf einem Schüttelgerät folgte die Blockierung in 500 ml 4 % BSA in PBS in einer Feuchtkammer bei RT. Der Erstantikörper (Maus IgG1 *anti human*) Ki67 wurde im Anschluss auf den Coverslips für 45 Minuten bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Dabei wurden pro Coverslip 100 µl einer 1:250 Verdünnung in 1 % BSA in PBS verwendet. Es folgten drei Waschschrötte à 5 Minuten in PBS. Für die anschließende Inkubation im Sekundärreagenz EnVision *anti rabbit* wurde je ein Tropfen auf die Coverslips gegeben und für 30 Minuten bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrötte folgte die Entwicklung mit dem AEC-Substrat Chromogen über 15 Minuten bei RT in der Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 5 Minuten wurde die Kernfärbung für 5 Minuten in Mayers Haemalaun vorgenommen und anschließend unter fließendem Leitungswasser 15 Minuten gebläut. Auf einem Objektträger wurde der Coverslip durch Aufbringen flüssiger Glyceringelatine versiegelt. In der Isotypenkontrolle, die bei der Etablierung der Färbung von

Ki67 eingesetzt wurde, zeigte sich keine oder eine leichte Anfärbung.

Die Quantifizierung der Ki67-positiven Zellfraktion wurde mittels Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung vorgenommen. In fünf repräsentativen Gesichtsfeldern wurden unter Verwendung von Microsoft Powerpoint 2007 jeweils alle Ki67-positiven als auch Ki67-negativen Zellen entlang einer diagonalen Linie gezählt. Berührten weniger als zehn Zellen die Linie, so wurden alle Zellen dieses Gesichtsfelds gezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Ki67-positiven Zellen an allen gezählten Zellen bestimmt.

3.3.3 Proteinextraktion aus Zelllysaten

Zum Ablösen der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit vorgewärmten 500 µl Trypsin/ Well versetzt und für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zum Stopp der Trypsin-Reaktion wurde 500 µl frisches Kulturmedium mit 10 % FCS zugefügt und zum Ablösen der Zellen aus dem Well hiermit resuspendiert. Nach Überführen in ein Eppendorf-Röhrchen wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 4000 U/Min und RT zentrifugiert. Zum Auswaschen des Trypsins wurde das Pellet mit 500 µl PBS versetzt, erneut zentrifugiert und überschüssiges PBS abgesaugt. Für die anschließende Isolierung der Zellproteine wurden 350 µl RP1-Lysepuffer zugegeben. Dieser Schritt erlaubt auch eine anschließende Konservierung der Lysate bei -80°C. Dem Protokoll des NucleoSpin® RNA/Protein-Kit folgend wurde das Zellpellet zur Reinigung zunächst auf eine Filtrationsrate pipettiert und bei 11.000 x g 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit äquivalentem Volumen 70 % Ethanol versetzt, leicht gevortext und in einer neuen Filtrationsrate bei 11.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Das im Durchfluss befindliche Protein wurde mit 700 µl Präzipitationspuffer versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei RT für 5 Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Protein anschließend mit 500 µl 50 % Ethanol versetzt und weitere 5 Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen und das Protein im offenen Röhrchen für 1 Stunde bei RT unter dem Abzug getrocknet. In 100 µl 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen wurde das Pellet bei -20°C aufbewahrt oder die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.3.4).

Alternativ zur Isolierung mittels beschriebenem Kombinationskit wurde Protein allein isoliert. Hierzu wurde das Kulturmedium aus der Wellplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Pro Well wurden dann 100 µl 2 x Lämmli-Puffer hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Damit die Proben für die weitere Analyse ihre Viskosität verloren, wurden sie viermal für eine Sekunde einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt und anschließend auf Eis gelagert.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BioRad Dc Protein Assay-Kit nach Herstellerangaben. Bei dieser quantitativen Methode wird ein Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 680 nm photometrisch erfasst, dessen Intensität mit der Proteinkonzentration korreliert. Nach der Messung mit dem Photometer Tecan Sunrise erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe.

3.3.5 SDS-PAGE

Zur Detektion spezifischer Proteine in Ganzzelllysaten wurde zunächst die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt, die die Proteine der Größe nach auftrennte. Pro Geltasche wurden 5-15 µg Protein eingesetzt. Ein einheitliches Volumen von 20-40 µl pro Geltasche wurde erreicht, indem die Proben abhängig von der Proteinkonzentration mit 2 x Lämmli-puffer aufgefüllt wurden. Ergänzt wurde darüber hinaus im Verhältnis 4:1 der Farbpuffer, der im Verhältnis 1:10 aus β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau zusammengesetzt war. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine in ihre Sekundärstruktur zu überführen. Kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert wurde das Lysat nun in die Taschen des zuvor vorbereiteten 10 % Polyacrylamidgels geladen. Die Passage des Sammelgels erfolgte bei einer Spannung von 90 mV. Für den Durchlauf des Trenngels wurde eine Spannung von 140 mV eingestellt. Nach insgesamt 1,5-2 Stunden war die Proteinauftrennung soweit erfolgt, dass das Gel der Elektrophoresekammer entnommen und für den Membrantransfer vorbereitet werden konnte.

3.3.6 Membrantransfer

Für den Proteintransfer wurde ein Semidry-Blotverfahren angewandt. Auf die Anode wurden dafür 6 in Puffer A getränkte und 3 in Puffer B getränkte Whatmanpapiere gelegt, die das gleiche Format wie das Gel aufwiesen (6,5 x 9,0 cm). Es folgte die PVDF-Membran, die zuvor für je 1 Minute in Methanol und Aqua dest. gelegt wurde. In direktem Kontakt zur PVDF-Membran wurde das Gel positioniert, gefolgt von weiteren 6 in Puffer C getränkten Whatmanpapieren. Nach Anschluss der Kathode erfolgte der Transfer über 60 Minuten. Die einzustellende Stromstärke pro Gel ergab sich aus der Fläche des Gels entsprechend untenstehender Formel. Bei mehreren Gelen pro Transfer ist die Summe der benötigten Stromstärken pro Gel zu wählen.

$$\text{Stromstärke pro Gel [mA]} = \text{Gel-Länge [cm]} \times \text{Gel-Breite [cm]} \times 1,25 \text{ mA / cm}^2$$

3.3.7 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Westernblot)

Für den immunochemischen Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurde die

Membran zunächst für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und für 2 Stunden bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blotto (vgl. 2.4) blockiert. Der Primärantikörper wurde in einer Blockierlösung verdünnt (je nach Antikörper in 5 % BSA bzw. Magermilchpulver in PBS; vgl. 2.2 und 2.6) und in einem 50 ml-Röhrchen für 1 Stunde bei RT oder bei 4°C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert. Hiernach wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend der Sekundärantikörperinkubation zugeführt. Diese erfolgte in 1:2000 Verdünnung in Blockierlösung (Blotto, vgl. 2.6) bei RT für 1 Stunde auf einem Rollenmischer. Erneut wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. An den Sekundärantikörper gekoppelt war eine Peroxidase (HRP). Diese katalysierte eine Chemolumineszenz und machte das entsprechende Protein optisch detektierbar. Die Entwicklung erfolgte in Clarity Western ECL Substrat (BioRad). Für das Erstellen digitaler Bilder wurde die Fusion SL Chemielumineszenz-Geldokumentationsanlage und für die Auswertung die Fusion Capt Software 16.06 (je Peqlab) genutzt.

3.3.8 Statistische Auswertung der *in vitro* Versuche

Die statistische Auswertung der *in vitro* Versuche erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 12.5. Auf normalverteilte Daten wurde die Varianzanalyse ANOVA angewandt (Zellzahlen Cokulturversuche). Nicht-parametrische Daten wurden mittels einseitiger Kruskal-Wallis Varianzanalyse ANOVA analysiert (Zellzahlen Transfektionsversuche). p-Werte unter $p = 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen (in Abbildungen mit * versehen). Das statistische Verfahren der *in situ* Analyse ist unter 3.1.5 beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion von p-Nrf2 und Ki67 in gesundem pankreatischen Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen und ihre Assoziation mit der Makrophageninfiltration

Ein Zusammenhang zwischen aktivierter oxidativer Stressantwort (p-Nrf2-Aktivität) und Tumorphiliferation wurde bereits in einem endogenen Mausmodell des PDAC in der Literatur beschrieben (DeNicola *et al.*, 2011). Aufgrund fehlender Untersuchungen im humanen System wurden in dieser Arbeit der p-Nrf2- und der Proliferationsstatus im pankreatischen Gangepithel in humanen Pankreasresektaten erhoben. Im Folgenden wird von einer aktivierten oxidativen Stressantwort pankreatischer Gangepithelzellen gesprochen, wenn nukleär akkumuliertes p-Nrf2 detektiert wurde. Wie eingangs beschrieben transloziert Nrf2 in den Kern, wenn es vermittelt z.B. durch oxidativen Stress von seinem physiologischen Repressors Keap1 freigegeben und an Ser40 phosphoryliert wurde. Da auf diese Weise stabilisiertes Nrf2 zu einer erhöhten Expression von Nrf2-Zielgenen führt (Niture *et al.*, 2009), kann p-Nrf2 mit aktiviertem Nrf2 gleichgesetzt werden. Ferner wird im Folgenden von Proliferationsaktivität gesprochen, wenn in pankreatischen Gangepithelzellen nukleär Ki67 detektiert wurde, das nur sich teilende Zellen exprimieren.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gewebe stammte einerseits von Individuen ohne pankreatische Krankengeschichte und wies sowohl gesunde Gangepithelien als auch PanIN-Läsionen auf. Letztere werden im Folgenden als *PanIN in Pankreasleiden-freien Präparaten*, *PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen* oder kurz als *PanIN* bezeichnet. Andererseits wurden PanIN-Läsionen in Gewebe von 14 Patienten mit chronischer Pankreatitis analysiert, die einen wichtigen Risikofaktor in der Entstehung des PDAC darstellt. Diese werden im Folgenden als *PanIN in CP-Präparaten*, *PanIN von CP-betroffenen Individuen* oder kurz als *PanIN in CP* bezeichnet. Um Unterschiede oder Analogien innerhalb dieser drei Kontexte (Gesundes Gangepithel, PanIN, PanIN in CP) herauszuarbeiten, wurde der p-Nrf2- und Ki67-Status dieser Gewebe miteinander verglichen. Des Weiteren wurde für beide Marker eine Assoziation mit der M1- und M2-Makrophageninfiltration getestet, die eine wesentliche Stromakomponente und Quelle von oxidativem Stress darstellen (s. 4.1.7).

Die Gangepithelzellen von gesunden Gängen, PanINs in Pankreasleiden-freien Präparaten und PanINs in CP-Präparaten offenbarten Differenzen sowohl bezüglich ihres Status der oxidativen Stressantwort als auch hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens. Tab. 4.1 zeigt die absoluten und prozentualen Häufigkeiten stark positiv p-Nrf2- bzw. Ki67-gefärbter Gänge an allen

untersuchten Individuen als auch die Ergebnisse der Gruppenvergleiche von gesundem Gangepithel und PanIN bzw. von gesundem Gangepithel und PanIN in CP (Näheres zur Auswertung s. 3.1.5). Die Gegenüberstellung von PanIN und PanIN in CP ist gesondert in Tab. 4.2 dargestellt. Auf die einzelnen Befunde wird im Folgenden genauer eingegangen.

Tab. 4.1: Ergebnis der p-Nrf2- und Ki67-Färbung in gesundem Gangepithel, PanIN und PanIN in chronischer Pankreatitis (PanIN in CP).

Gezeigt sind die absoluten (oben) und prozentualen Häufigkeiten (Mitte oben) stark p-Nrf2-exprimierender bzw. Ki67-exprimierender Gangepithelzellen nach Dichotomisierung in fehlende (%-Score 0) bzw. starke (%-Score 1 oder größer) Positivität in der Gegenüberstellung gesundes Gangepithel versus PanIN und gesundes Gangepithel versus PanIN in CP. Ferner gezeigt sind ausgewählte p-Werte der Gruppenvergleiche für je einen Marker (Chi-Quadrat-Test nach McNemar bzw. Fisher's Exakt Test; Mitte unten) sowie ausgewählte p-Werte der Marker-Korrelation von p-Nrf2 und Ki67 innerhalb einer Gruppe (Spearman-Rho; unten). Für die Gruppe der gesunden Gänge ist in Klammern die Richtung des Zusammenhangs gezeigt (Korrelationskoeffizient + 0,420). Da die Ki67-Expression in allen untersuchten PanINs und PanINs in CP stark positiv war (%-Score 1 oder größer, nach Dichotomisierung eine Konstante), konnte in diesen Gruppen eine Spearman-Korrelation mit dem Marker p-Nrf2 nicht berechnet werden. n.m. = Berechnung nicht möglich, pos. = positiv.

Absolute Häufigkeit stark positiv gefärbten Gangepithels		
Gruppe Marker	p-Nrf2	Ki67
Gesund „0“	5 (21)	10 (22)
PanIN „1“	17 (20)	19 (19)
PanIN in CP „2“	11 (12)	12 (12)
Prozentuale Häufigkeit stark positiv gefärbten Gangepithels		
Gruppe Marker	p-Nrf2	Ki67
Gesund „0“	23,8 %	45,5 %
PanIN „1“	85,0 %	100,0 %
PanIN in CP „2“	91,7 %	100,0 %
Ergebnisse der Gruppenvergleiche (Chi-Quadrat-Tests)		
Gruppen Marker	p-Nrf2	Ki67
„0 vs. 1“	,002	,013
„0 vs. 2“	,000	,002
Ergebnisse der Marker-Korrelation (Spearman-Rho)		
Gruppe Marker	p-Nrf2 – Ki67	
Gesund „0“	,058 (pos.)	
PanIN „1“	n.m.	
PanIN in CP „2“	n.m.	

4.1.1 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und von CP-betroffenen Individuen zeigen signifikant mehr aktiviertes Nrf2 als gesunde Gangepithelien

Die Färbung von p-Nrf2 zeigte, dass in 85 % der PanIN-Läsionen der Pankreasleiden-freien Präparate p-Nrf2 nukleär zu detektieren war (17 von 20), während dies in gesunden Epithelien derselben Individuen lediglich in 23,8 % der Fall war (5 von 21). Dieser Unterschied zwischen gesundem Gangepithel und PanIN-Läsionen war signifikant ($p = 0,002$, $n = 20$, vgl. Tab. 4.1 und Abb. 4.1). In 65 % der Individuen war in gesunden Gangepithelien kein p-Nrf2 nachzuweisen, während PanIN-Läsionen derselben Gewebe stark p-Nrf2-positiv waren. In weiteren 20 % der Individuen waren sowohl das gesunde Epithel als auch die PanIN-Läsionen p-Nrf2-positiv (4 von 20). Nur in 15 % der Individuen war in PanIN-Läsionen kein aktiviertes Nrf2 zu detektieren (3 von 20). In diesen Geweben war p-Nrf2 meist auch im gesunden Epithel nicht detektierbar.

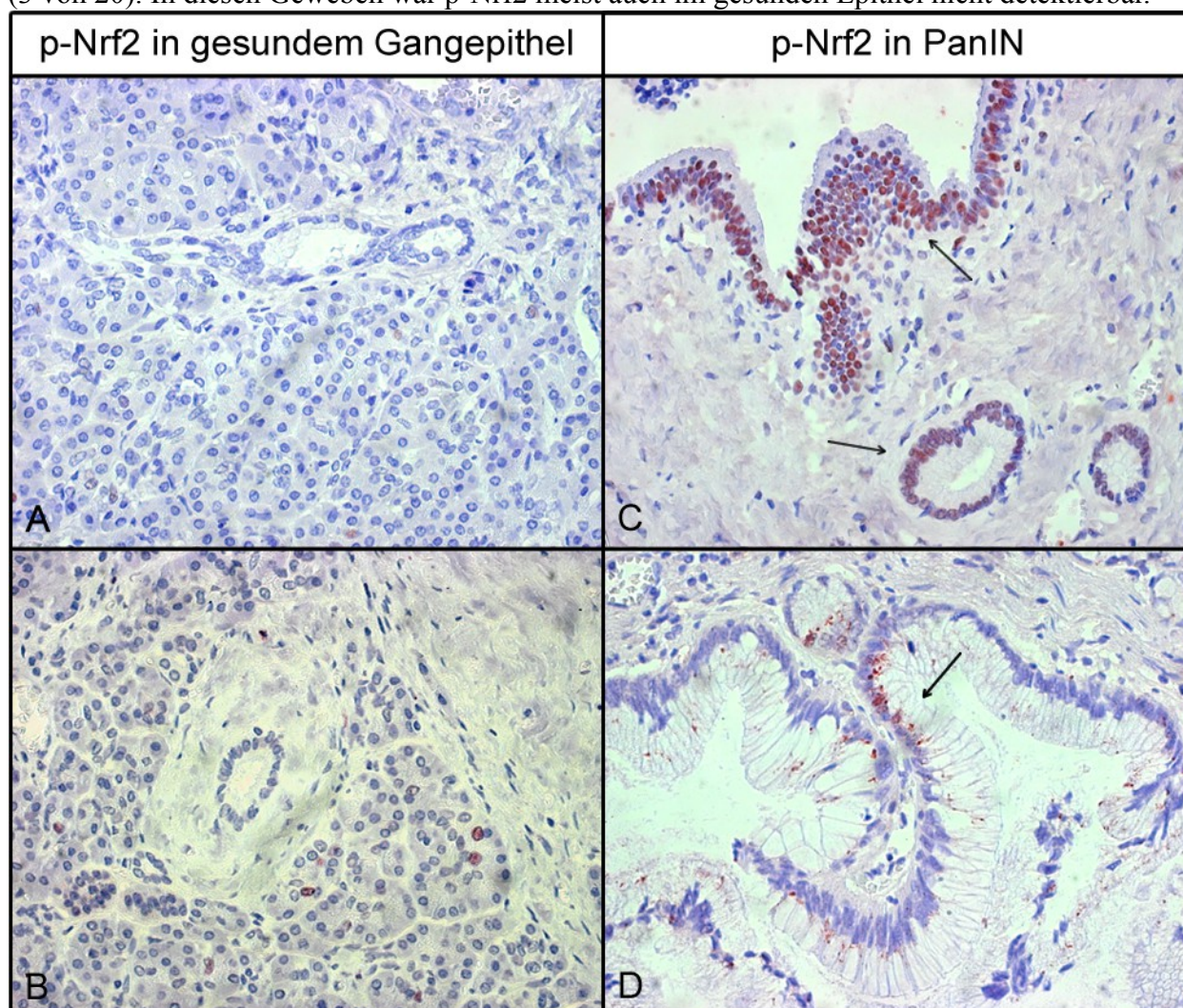


Abb. 4.1 Im Vergleich zum gesunden Gangepithel ist die Expression von aktiviertem Nrf2 in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) erhöht.

Gezeigt sind repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises von p-Nrf2 in gesundem Gangepithel (A,B) mit fehlender p-Nrf2-Detektion und in PanINs (C und D) mit ausgeprägter p-Nrf2-Anfärbung (vgl. Pfeile in C,D). 400-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass PanIN-Läsionen signifikant mehr aktiviertes Nrf2 aufweisen als gesunde Gangepithelien.

Auch PanIN-Läsionen in CP-Präparaten waren mit 91,7 % der Fälle fast ausnahmslos deutlich positiv für p-Nrf2 (11 von 12). Höchstsignifikant verschieden hiervon zeigten gesunde Gangepithelien nur in 5 von 21 Fällen (23,8 %) aktiviertes Nrf2 ($p = 0,000$, 2-seitige Signifikanz, $n = 32$; vgl. Tab. 4.1, Abb. 4.1, Abb. 4.2).

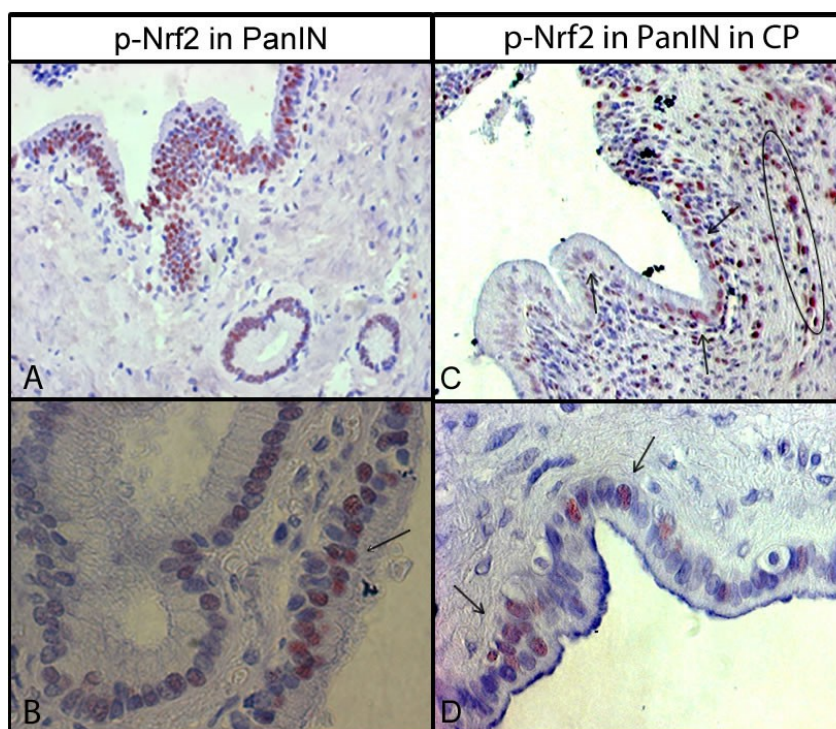


Abb. 4.2: Nachweis von aktiviertem Nrf2 in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) und in PanIN von chronischer Pankreatitis-betroffenen Individuen (PanIN in CP).

Gezeigt sind Bilder der immunhistochemischen Färbung von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) in PanIN (A,B) und in PanIN in CP (C,D) mit starker Positivität. Ausgewertet wurde jeweils die p-Nrf2-Positivität der Gangepithelzellen (Pfeile). In PanIN in CP ist auffällig, dass auch umgebende Stromazellen aktiviertes Nrf2 aufweisen (Ellipse in C). Vergrößerung 400-fach (A,C) bzw. 800-fach (B,D).

4.1.2 PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen signifikant mehr aktiviertes Nrf2 als PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen

Die immunhistochemische Färbung von p-Nrf2 zeigte, dass in nahezu allen untersuchten PanIN-Läsionen sowohl in Pankreasleiden-freien Präparaten als auch in CP-Präparaten p-Nrf2 zu detektieren war (17 von 20 bzw. 11 von 12 Fälle, vgl. Tab. 4.1). Zudem ergaben die angestellten Gruppenvergleiche, dass sich die p-Nrf2-Ausprägung der PanIN-Läsionen in beiden Kontexten signifikant von jener gesunder Gangepithelien unterscheidet. Dabei wurde ein %-Score von 1 oder größer in 23,8 % der gesunden Gangepithelien, in PanIN in Pankreasleiden-freien Präparaten hingegen in 85 % und in PanIN in CP-betroffenen Präparaten in 91,7 % der Fälle

detektiert (vgl. Tab. 4.1).

Tab. 4.2: Detaillierter Vergleich der p-Nrf2-Ausprägung und der Ki67-Exprimierung von PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) und PanIN von chronischer Pankreatitis-betroffenen Individuen (PanIN in CP).

Gezeigt sind die absoluten (oben) und prozentualen Häufigkeiten (Mitte) p-Nrf2-positiver bzw. Ki67-exprimierender Gängepithelzellen nach Dichotomisierung in geringer ausgeprägte (%-Score 1) bzw. verstärkt ausgeprägte (%-Score 2 oder größer) Positivität für den Gruppenvergleich PanIN versus PanIN in CP. Die p-Werte der Gruppenvergleiche (Fisher's Exakt Chi-Quadrat-Test) sind für beide Marker gezeigt (unten). n.s.= nicht signifikant.

		Absolute Häufigkeit positiv gefärbten Gängepithels			
Gruppe Marker		p-Nrf2		Ki67	
Ausmaß der Exprimierung		bis 10%	> 10% bis 100%	bis 10%	> 10% bis 100%
PanIN „1“		14 (18)	4 (18)	15 (19)	4 (19)
PanIN in CP „2“		3 (11)	8 (11)	11 (12)	1 (12)
		Prozentuale Häufigkeit positiv gefärbten Gängepithels			
Gruppe Marker		p-Nrf2		Ki67	
Ausmaß der Exprimierung		bis 10%	> 10% bis 100%	bis 10%	> 10% bis 100%
PanIN „1“		77,8 %	22,2 %	78,9 %	21,1 %
PanIN in CP „2“		27,3 %	72,7 %	91,7 %	8,3 %
		Ergebnisse des Gruppenvergleichs (Chi-Quadrat-Test)			
Gruppen Marker		p-Nrf2		Ki67	
„1 vs. 2“		,018		n.s.	

Um darüber hinaus das p-Nrf2-Vorkommen von PanIN in Pankreasleiden-freien Individuen jenem in CP-betroffenen Individuen im Detail gegenüberzustellen, wurde für diesen Gruppenvergleich ein %-Score von 1 als schwach-ausgeprägte und ein %-Score von 2 oder größer als verstärkt ausgeprägte p-Nrf2-Positivität definiert. In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse dargestellt. Während in PanINs in CP-Gewebe Gängepithelien mit über 90 % p-Nrf2-positiven Zellen detektiert wurden (%-Score 4), wurde in PanINs maximal ein Anteil von 50 % p-Nrf2-positiver Epithelzellen gefunden (%-Score 2). Insgesamt zeigten PanINs in CP-Gewebe einen deutlich größeren Anteil von Zellen mit aktiviertem Nrf2 als PanINs in Pankreasleiden-freiem Gewebe. So wiesen PanINs in CP-Präparaten in 72,7 % der Fälle mehr als 10 % bis 100 % p-Nrf2-positiver Gängepithelzellen auf (8 von 11), PanINs der Pankreasleiden-freien Präparate wiesen eine solche starke p-Nrf2-Positivität jedoch lediglich in 22,2 % der Fälle auf (4 von 18).

Die Ausprägung von p-Nrf2 von PanINs in CP-Gewebe und PanINs in Pankreasleiden-freiem Gewebe war damit signifikant verschieden ($p = 0,018$, $n = 29$). Zusammengenommen mit den in und dargestellten Ergebnissen zeigte sich somit, dass zwar im Großteil aller PanINs aktiviertes Nrf2 zu detektieren ist, dass jedoch der Anteil in PanIN-Epithelzellen im CP-Gewebe jenen von PanINs in Pankreasleiden-freiem Gewebe noch übersteigt. Zusammenfassend zeigen PanINs in chronischen Pankreatitiden damit ein signifikant höheres Vorkommen von aktiviertem Nrf2 als PanINs ohne den Kontext einer chronischen Entzündung.

In Abb. 4.2 sind Ausschnitte stark p-Nrf2-exprimierender PanINs als auch verstärkt p-Nrf2-exprimierende PanINs in CP-Geweben gezeigt. Während jeweils die p-Nrf2-Positivität der Gangepithelzellen ausgewertet wurde, war darüber hinaus in den CP-Geweben auffällig, dass neben den Epithelzellen auch in den umgebenden Stromazellen ein starkes p-Nrf2-Signal zu detektieren war (vgl. C in Abb. 4.2).

4.1.3 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen eine signifikant höhere Ki67-Expression als gesunde Gangepithelien

Die Ki67-Färbung zeigte in 45,5 % der gesunden Gangepithelien (10 von 22), aber in allen PanIN-Läsionen eine deutliche Ki67-Expression (19 von 19; vgl. Tab. 4.1). Obgleich damit gesundes Gangepithel Ki67 bereits deutlich exprimierte, stellte sich der Unterschied zu PanIN-Läsionen mit ihrer ausnahmslosen Ki67-Expression als signifikant heraus ($p = 0,013$, $n = 19$, vgl. Tab. 4.1). Die PanIN-Läsionen wiesen einen Anteil von bis zu 50 % Ki67-positive Epithelzellen auf (%-Score 1 oder 2), die gesunden Gangepithelien wiesen maximal einen Ki67-positiven Epithelzellanteil von 10 % auf (maximal %-Score 1). Zusammenfassend zeigen PanIN-Läsionen damit eine signifikant stärkere Ki67-Expression als gesunde Gangepithelien (s. Abb. 4.3). Dieses deutet darauf hin, dass PanINs eine höhere Proliferationstätigkeit aufweisen als gesunde Gangepithelien.

Der Vergleich zwischen gesundem Gangepithel und PanIN-Läsionen in CP-Präparaten offenbarte, dass das PanIN-Epithel in CPs deutlich ausgeprägter Ki67 exprimierte als gesunde Gangepithelien. Während 45,5 % der gesunden Epithelien Ki67-positiv waren, zeigten sich 100 % des Gangepithels der CP-Präparate als Ki67-positiv (12 von 12). Der Intergruppenvergleich belegte diesen Unterschied als hochsignifikant ($p = 0,002$, $n = 34$, 2-seitige Signifikanz, vgl. Tab. 4.1). Zusammenfassend zeigten PanINs in CP-Gewebe deutlich mehr Ki67-exprimierende Zellen als gesunde Gangepithelien (s. Abb. 4.3). Dies deutet darauf hin, dass auch PanINs in CP-Gewebe eine höhere Proliferationstätigkeit aufweisen als gesunde Gangepithelien.

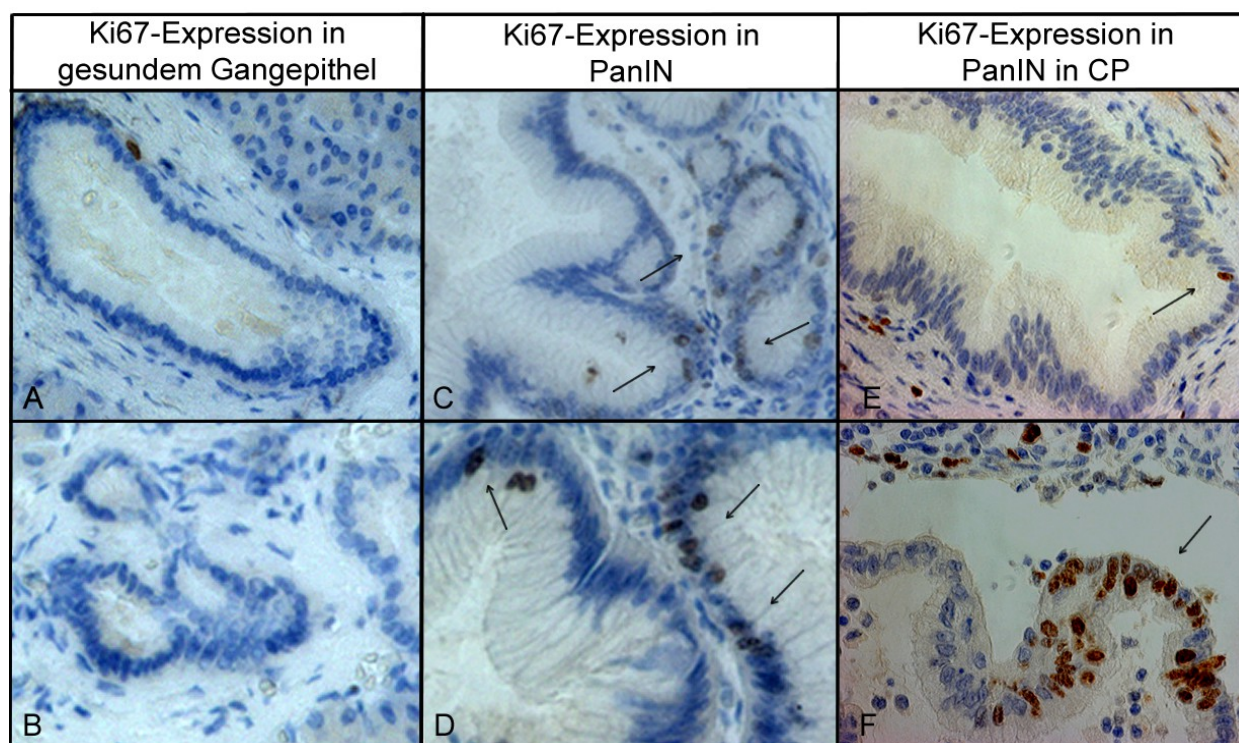


Abb. 4.3: Im Vergleich zu gesundem Gangepithel ist die Ki67-Expression in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen (PanIN) als auch in PanIN von chronischer Pankreatitis betroffenen Individuen (PanIN in CP) erhöht.

Gezeigt sind Bilder der immunhistochemischen Ki67-Färbung mit weniger stark ausgeprägter Expression in gesundem Gangepithel (A,B) und mit starker Expression in PanINs (Pfeile in C,D) als auch in PanINs in CP (Pfeile in E,F). Vergrößerung 600-fach (A,C,E) bzw. 800-fach (B,D,F).

Die Erhebung des Ki67-Status deutet in der Zusammenschau darauf hin, dass sowohl PanINs als auch PanINs in CP-Präparaten im Vergleich zu gesunden Gangepithelien eine deutlich stärkere Proliferationsaktivität aufweisen. Die nachgewiesene Proliferationsfähigkeit von PanINs und PanINs in CP -Gewebe erweist diese somit als hochproliferative Strukturen.

4.1.4 PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen und PanIN von CP-betroffenen Individuen zeigen eine ähnliche Ki67-Expression

Die angestellten Gruppenvergleiche zeigten, dass die Gangepithelien von PanINs sowie die der PanINs in den CP-Präparaten je deutlich häufiger positiv für Ki67 waren als gesunde Gangepithelien. Dabei wurde ein %-Score von 1 oder größer in gesunden Gangepithelien in 45,5 % der Fälle, in PanINs und in PanINs in CP-Gewebe hingegen in 100 % der Fälle detektiert. Um die Ki67-Färbung von PanINs und PanINs in CP-Gewebe detaillierter gegenüberzustellen, wurde die Grenze für diesen Gruppenvergleich bei %-Score 2 angesetzt, d.h. zwischen negativ-schwacher (%-Score 0 oder 1) bzw. verstärkter Ki67-Expression (%-Score 2 bis %-Score 4). Die Ergebnisse sind in Tab. 4.2 dargestellt. Zusammenfassend zeigten PanINs und PanINs in CP eine Ki67-Expression auf einem vergleichbar ausgeprägten Niveau. Einen %-Score von 2 oder größer wiesen PanINs in 21,1 % der Fälle (4 von 19) und PanINs in CP-

Präparaten in 8,3 % der Fälle (1 von 12) auf. Die Ki67-Expression von PanIN-Läsionen und PanIN-Läsionen in CP-Gewebe wies sich damit als nicht signifikant verschieden aus ($p = 0,624$, $n = 31$, vgl. Tab. 4.2). Abb. 4.3 zeigt dies exemplarisch.

4.1.5 In gesundem Gangepithel besteht zwischen dem Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 und Ki67 ein positiver Zusammenhang

Innerhalb der Gruppe der gesunden Gänge konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von aktiviertem Nrf2 und der Ki67-Expression nachgewiesen werden ($p = 0,058$, Korrelationskoeffizient $\text{roh} = +0,420$, vgl. Tab. 4.1). Bei starker Ki67-Expression war p-Nrf2 zwar entweder schwach oder stark positiv zu detektieren (55,6 % bzw. 44,4 %, 5 von 9, bzw. 4 von 9), bei negativer oder geringer Ki67-Expression hingegen war auch p-Nrf2 in 91,7 % der Fälle kaum oder nicht detektierbar (11 von 12). Ein repräsentativer gesunder Gang aus einem dieser Individuen ist in Abb. 4.4 gezeigt. Andersherum betrachtet war in 68,8 % der Fälle das schwache Vorkommen von p-Nrf2 in gesunden Gängen von einer schwach positiven oder keiner Ki67-Expression begleitet (11 von 16). Bei starker Anfärbbarkeit von p-Nrf2 war hingegen auch Ki67 in 80 % der Fälle (4 von 5) stark exprimiert. Obwohl keine Doppelfärbungen durchgeführt wurden, legen diese Ergebnisse der p-Nrf2- und Ki67-Einzelfärbungen in seriellen Schnitten den Verdacht nahe, dass zumindest ein Teil dieser Epithelien p-Nrf2/ Ki67-doppelpositiv ist. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bereits im gesunden Epithel ein Zusammenhang zwischen dem p-Nrf2-Vorkommen und der Ki67-Expression vorliegt ($p = 0,058$; vgl. Tab. 4.1).

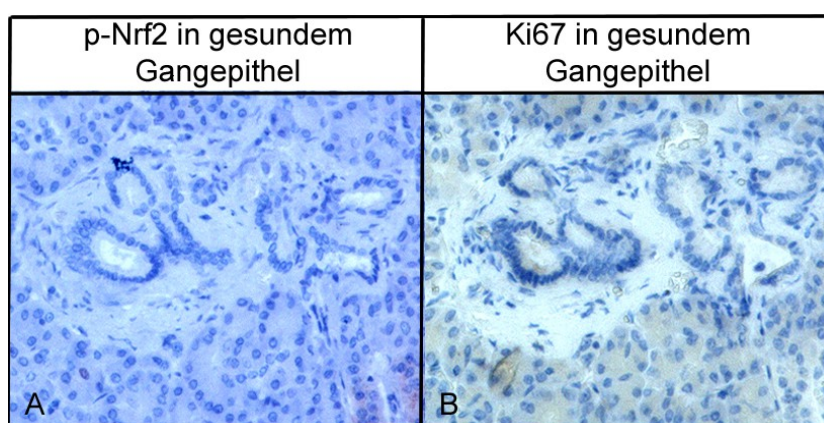


Abb. 4.4: Gesunde Gangepithelien zeigen keine oder nur eine schwache Expression von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) als auch von Ki67.

Gezeigt sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von aktiviertem Nrf2 und Ki67 in gesunden Gangepithelien, in denen im selben Areal beide Marker nicht zu detektieren waren Vergrößerung 400-fach.

4.1.6 In PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen als auch von CP-betroffenen Individuen geht eine hohe Nrf2-Aktivität mit einer hohen Ki67-Expression einher

Sowohl die PanIN-Läsionen von Pankreasleiden-freien Individuen als auch die von CP-betroffenen Individuen exprimierten Ki67 stark (je 100 %, 19 von 19 bzw. 12 von 12, vgl. Tab. 4.1). Dies ging in 89,5 % bzw. 91,7% der Fälle mit einem hohen Vorkommen von aktiviertem Nrf2 einher (17 von 19 bzw. 11 von 12). Ein Ausschnitt einer repräsentativen PanIN-Läsion von Pankreasleiden-freien Individuen ist in Abb. 4.5 gezeigt.

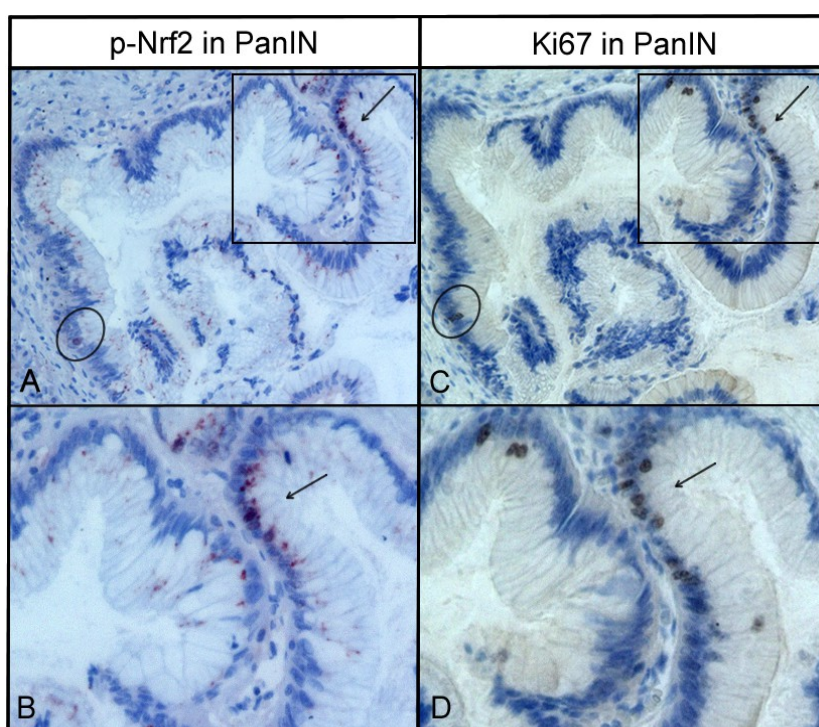


Abb. 4.5: Die Aktivität von Nrf2 ist in PanINs erhöht und korreliert mit einer erhöhten Proliferationsaktivität (Ki67-Expression) von PanINs.

Gezeigt sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) und Ki67 in einer PanIN-Läsion aus Pankreasleiden-freiem Gewebe mit starker p-Nrf2-Positivität (A,B) bei ebenfalls starker Ki67-Expression (C,D) im selben Areal (Pfeile bzw. Ellipsen). Die gerahmten Ausschnitte der oberen Aufnahmen in A bzw. C sind in B bzw. D detaillierter gezeigt. Die Ellipsen in A und C zeigen beispielhaft Zellen, von denen bei hier angewandter serieller Schnittführung anzunehmen ist, dass sie p-Nrf2- als auch Ki67-positiv sind. Vergrößerung 400-fach (A,C) bzw. 800-fach (B,D).

Obwohl keine Doppelfärbungen durchgeführt wurden, legen diese Ergebnisse der p-Nrf2- und Ki67- Einzelfärbungen in den gleichen Strukturen der seriellen Schnitte den Verdacht nahe, dass zumindest ein Teil dieser PanIN-Epithelien auch p-Nrf2/ Ki67-doppelpositiv ist. Diese Kopplung war damit sowohl in PanIN ohne pankreatische Anamnese als auch in PanIN mit CP ausgeprägter als in gesunden Epithelien, in denen 44,4 % bei starker p-Nrf2-Positivität auch Ki67-Expression stark exprimierten (4 von 9). Zusammenfassend wurde in PanIN-Läsionen beobachtet, dass ein hohes p-Nrf2-Vorkommen mit einer hohen Expression von Ki67 einhergeht.

Dies kann darauf hindeuten, dass eine aktivierte oxidative Stressantwort in PanIN-Läsionen mit der Proliferationsaktivität des PanIN-Epithels zusammenhängt. Da die Ki67-Expression der PanIN-Läsionen eine Konstante darstellte, war eine statistische Korrelationsberechnung nicht möglich.

4.1.7 Assoziation des p-Nrf2- und Ki67-Status von der Makrophageninfiltration in gesundem pankreatischen Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Präsenz von Makrophagen, die eine wesentliche Stromakomponente und Quelle von oxidativem Stress darstellen, und dem Status der oxidativen Stressantwort (Nrf2-Aktivität) sowie der Proliferationsaktivität pankreatischer Gangepithelzellen aufzudecken, wurden die Erhebungen der Makrophageninfiltration in gesunden Gängen und PanINs seitens A. Broich bzw. in PanINs in CP seitens Dr. O. Helm für die statistischen Analysen herangezogen (Näheres s. dort, Broich, 2014; Helm, 2014). Die Ergebnisse zu der Makrophagenverteilung sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Detektion von Makrophagen um gesunde Gänge, PanINs in Pankreasleiden-freien (PanIN) und PanINs in CP-Präparaten (PanIN in CP) nach Dichotomisierung in schwach und stark ausgeprägte Infiltration [erhoben von: A. Broich (Gruppe 0,1), O. Helm (Gruppe 2)].

		Absolute Häufigkeit starker Makrophageninfiltration		
Gruppe Marker		CD68	HLA-DR	CD163
Gesund	„0“	11 (20)	10 (20)	8 (19)
PanIN	„1“	7 (14)	7 (14)	5 (13)
PanIN in CP	„2“	10 (14)	12 (14)	10 (14)
		Prozentuale Häufigkeit starker Makrophageninfiltration		
Gruppe Marker		CD68	HLA-DR	CD163
Gesund	„0“	55,0 %	50,0 %	42,1 %
PanIN	„1“	50,0 %	50,0 %	38,5 %
PanIN in CP	„2“	71,4 %	85,7 %	71,4 %

Eine deutliche Infiltration von M2-Makrophagen (CD68-positiv, CD163-positiv, HLA-DR-negativ) wurden sowohl um gesunde Gänge (in 8 von 19 Fällen) als auch in der Nähe von PanINs (in 5 von 13 Fällen) detektiert. Viele M1-Makrophagen (CD68-positiv, CD163-negativ, HLA-DR-positiv) wurden in der Nähe von PanINs (in 7 von 14 Fällen) sowie in der Umgebung von gesunden Gängen (in 10 von 20 Fällen) detektiert. In der Nähe von PanINs in CP-Gewebe wurde sowohl eine deutliche Infiltration von M1-Makrophagen (HLA-DR-positiv in 12 von 14 Fällen) als auch von M2-Makrophagen (CD163-positiv in 10 von 14 Fällen) detektiert.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Markern zu detektieren, wurden die Gesamt-Scores der mikroskopischen Analyse dichotomisiert und die Spearman-Korrelation berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.4 gezeigt.

Tab. 4.4: Ergebnisse der Spearman-Korrelationsberechnungen zwischen p-Nrf2 bzw. Ki67 und CD68, HLA-DR und CD163 innerhalb der Gruppen gesundes Gangepithel, PanIN und PanIN in CP.

Gezeigt sind ausgewählte p-Werte und Richtung des Zusammenhangs (in Klammern). In der Gruppe der gesunden Gänge ergab sich zwischen Ki67 und CD68-positiven Makrophagen der Korrelationskoeffizient $\rho = -0,394$. Die Ergebnisse für CD68, HLA-DR und CD163 beruhen auf den Erhebungen von A. Broich für Gruppe 0 und 1 und O. Helm für Gruppe 2 (ebenso für Ki67). n.s. = nicht signifikant, neg. = negativ.

Gruppe		Marker	Ergebnisse der Spearman-Korrelation innerhalb einer Gruppe		
			CD68	HLA-DR	CD163
Gesund	„0“	p-Nrf2	n.s.	n.s.	n.s.
		Ki67	,086 (neg.)	n.s.	n.s.
PanIN	„1“	p-Nrf2	n.s.	n.s.	n.s.
		Ki67	n.s.	n.s.	n.s.
PanIN in CP	„2“	p-Nrf2	n.s.	n.s.	n.s.
		Ki67	n.s.	n.s.	n.s.

4.1.8 Zwischen der Makrophageninfiltration und dem Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 zeigt sich in gesundem Gangepithel und PanIN von Pankreasleiden-freien und CP-betroffenen Individuen kein eindeutiger Zusammenhang

Innerhalb der Gruppe der gesunden Gangepithelien konnte zwischen der Anwesenheit von Makrophagen und dem Vorkommen von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p = 0,808$; $0,628$; $0,737$ für CD68-; HLA-DR- bzw. CD163-positiv Makrophagen). Die absolute Zahl der Infiltration CD68-positiver Makrophagen um gesunde Gänge umfasste dabei den Bereich von 8-30 Zellen (Median 17).

Auch innerhalb der Gruppe der PanIN-Läsionen der Pankreasleiden-freien Präparate wurde zwischen dem Vorkommen von aktiviertem Nrf2 und der Anwesenheit von Makrophagen kein signifikanter Zusammenhang detektiert ($p = 0,147$; $0,147$; $0,742$ für CD68-; HLA-DR- bzw. CD163-positiv Makrophagen). Die absolute Anzahl der Infiltration CD68-positiver Makrophagen um PanIN-Läsionen umfasste hierbei den Bereich von 6-27 Zellen (Median 17).

Ebenso verhielt es sich in der Gruppe der CP, in der sich zwischen dem Vorkommen von aktiviertem Nrf2 und der Anwesenheit von Makrophagen kein signifikanter Zusammenhang ergab ($p = 1,000$; $0,297$; $1,000$ für CD68-; HLA-DR- bzw. CD163-positiv Makrophagen). Die absolute Anzahl der Infiltration CD68-positiver Makrophagen um PanIN in CP-Gewebe lag dabei im Median bei 8,5 Zellen.

Zusammengefasst konnte in keinem der drei untersuchten Kontexte (gesundes Gängepithel, PanIN, PanIN in CP) bei gegebenem Infiltrationsaufkommen an Makrophagen (absolut bis maximal 30 Zellen) ein eindeutiger Zusammenhang zum Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 in Gängepithelzellen nachgewiesen werden.

4.1.9 Zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67-Expression besteht in gesundem Gängepithel tendenziell ein negativer Zusammenhang

Die Testung einer potentiellen Abhängigkeit zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67-Expression gesunder pankreatischer Gängepithelzellen ergab einen tendenziell negativen Zusammenhang, der jedoch mit einem p-Wert von 0,086 nicht signifikant war (Korrelationskoeffizient - 0,394; vgl. Tab. 4.4). Waren viele CD68-positive Makrophagen in Epithelnähe anwesend, so zeigte das gesunde Gängepithel kaum oder keine Ki67-Expression (in 72,7 % = 8 von 11). Eine stärkere Ki67-Expression hingegen war zumeist nur bei einem niedrigen Aufkommen CD68-positiver Makrophagen zu detektieren (66,7 % = 6 von 9). Zusammenfassend konnte zwischen der Anwesenheit von CD68-positiver Makrophagen und der Ki67-Expression des gesunden Epithels ein tendenziell negativer Zusammenhang gefunden werden. Für die einzelnen Phänotypen (M1 oder M2) ergab sich dieser Zusammenhang jedoch nicht. Sie zeigten mit 50 % (HLA-DR-positive Makrophagen) bzw. 42,1 % (CD163-positive Makrophagen) ein vergleichbar hohes Aufkommen um gesunde Gänge (vgl. Tab. 4.3) und keinen signifikanten Zusammenhang mit der Ki67-Expression gesunder pankreatischer Gängepithelzellen ($p = 0,196$ bzw. 0,139; vgl. Tab. 4.1, Tab. 4.2 und Tab. 4.4).

4.1.10 In PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen geht eine hohe Ki67-Expression mit geringem Aufkommen von CD163-positiven-Makrophagen einher

Eine deutliche Ki67-Expression der PanIN-Läsionen ging in der Mehrheit der Fälle (61,5 %) mit einem geringen Aufkommen an CD163-positiven Makrophagen einher (8 von 13, vgl. Tab. 4.3). Dies kann, wie für die gesunden Gänge gezeigt, auf einen negativen Zusammenhang zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67-Expression hindeuten. Im Fall der PanIN-Läsionen von Pankreasleiden-freien Individuen liegt damit möglicherweise ein negativer Zusammenhang von Ki67-Expression und M2-Makrophagen vor. Da jedoch alle PanIN-Läsionen eine deutliche Ki67-Expression zeigten, ließ sich die Spearman-Korrelationsberechnung für diese Konstante nicht durchführen (vgl. Tab. 4.4).

CD68-positive und HLA-DR-positive Makrophagen hingegen zeigten je zur Hälfte entweder ein geringes oder ein starkes Aufkommen in der Nähe von PanIN-Läsionen (vgl. Tab. 4.3). Eine

Tendenz zwischen ihrem quantitativen Vorhandensein und der deutlich ausgeprägten Ki67-Expression des PanIN-Epithels zeichnete sich damit nicht ab (vgl. auch Tab. 4.1, Tab. 4.2 und Tab. 4.4).

4.1.11 Zwischen der Makrophageninfiltration und der Ki67- Expression zeigt sich in PanIN von CP-betroffenen Individuen kein eindeutiger Zusammenhang

Die M1-Makrophageninfiltration um PanIN in CP-Präparaten war signifikant ausgeprägter als jene um gesundes Gangepithel ($p = 0,066$, $n = 34$, 2-seitige Signifikanz; Daten nicht tabellarisch gezeigt). Während in der Umgebung des gesunden Gangepithels jeweils zur Hälfte wenig oder viele HLA-DR-positive Makrophagen detektiert wurden (je 10 von 20), zeigten 85,7 % der PanINs in CP-Gewebe eine starke Infiltration dieses Makrophagentyps (12 von 14). Die Ki67-Expression der PanIN-Läsionen in CP-Gewebe zeigte sich hiervon unabhängig. Ein signifikanter Zusammenhang zur Infiltration von Makrophagen konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,588$; $0,770$; $0,588$ für CD68; HLA-DR bzw. CD163; vgl. Tab. 4.4).

4.1.12 Auch PDAC-Karzinomzellen zeigen ein hohes Vorkommen von aktiviertem Nrf2 und eine hohe Expression von Ki67

Für die Untersuchungen *in situ* zur Rolle von Nrf2 in der frühen Phase der Karzinogenese des PDAC wurden wie dargestellt PDAC-Vorläuferläsionen in Pankreasleiden-freiem und in CP-Gewebe hinsichtlich ihres Status der oxidativen Stressantwort und ihrer Proliferationstätigkeit analysiert. Um einen Ausblick in fortgeschrittenere Stadien der PDAC-Entwicklung zu gewähren, wurde in kleinem Umfang zusätzlich PDAC-Gewebe immunhistochemisch auf p-Nrf2 und Ki67 gefärbt.

Wie in Abb. 4.6 exemplarisch gezeigt, ergab die p-Nrf2-Färbung, dass in 88,9 % der Fälle aktiviertes Nrf2 (p-Nrf2) vorhanden ist (8 von 9 mit %-Score 1 oder größer). Darunter wies die Hälfte hohe Anteile p-Nrf2-positiver Epithelzellen auf ($> 10\%$ bis $> 90\%$ Positivität, entsprechend %-Score 2 bis %-Score 4). In lediglich einem PDAC war p-Nrf2 nicht zu detektieren. Zusammenfassend ist damit festzuhalten, dass neben prämaligen PanIN-Läsionen in Pankreasleiden-freiem und in CP-Gewebe auch PDAC-Karzinomzellen eine ausgeprägte Nrf2-Aktivität aufweisen.

Die Erhebung des Ki67-Status des PDAC-Gewebes ergab, dass alle untersuchten PDACs Ki67-positiv waren (100 %, 8 von 8 mit %-Score 1 oder größer). Zu detektieren war dabei in 37,5 % der Fälle ein geringer Anteil Ki67-positiver Zellen (%-Score 1 bei 3 von 8) und mit 63,5 % im überwiegenden Teil der Fälle ein hoher Anteil Ki67-positiver Zellen (%-Score 2 bei 5

von 8). Zusammenfassend zeigte das Gangepithel von PDAC-Gewebe damit ein hohes Maß Ki67-exprimierender Zellen, was darauf hindeutet, dass PDAC-Zellen eine hohe Proliferationsfähigkeit aufweisen.

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wurde von statistischen Tests abgesehen. Die Erhebung deutet aber darauf hin, dass im PDAC maligne Gangepithelien durch eine hohe Expression von p-Nrf2 als auch Ki67 charakterisiert sind. Der Vermutung, dass dem Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 damit auch in späteren Phasen der Tumorgenese eine Rolle zukommt und sie womöglich mit der Proliferationsaktivität der Karzinomzellen assoziiert ist, muss anhand weiterführender Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv nachgegangen werden.

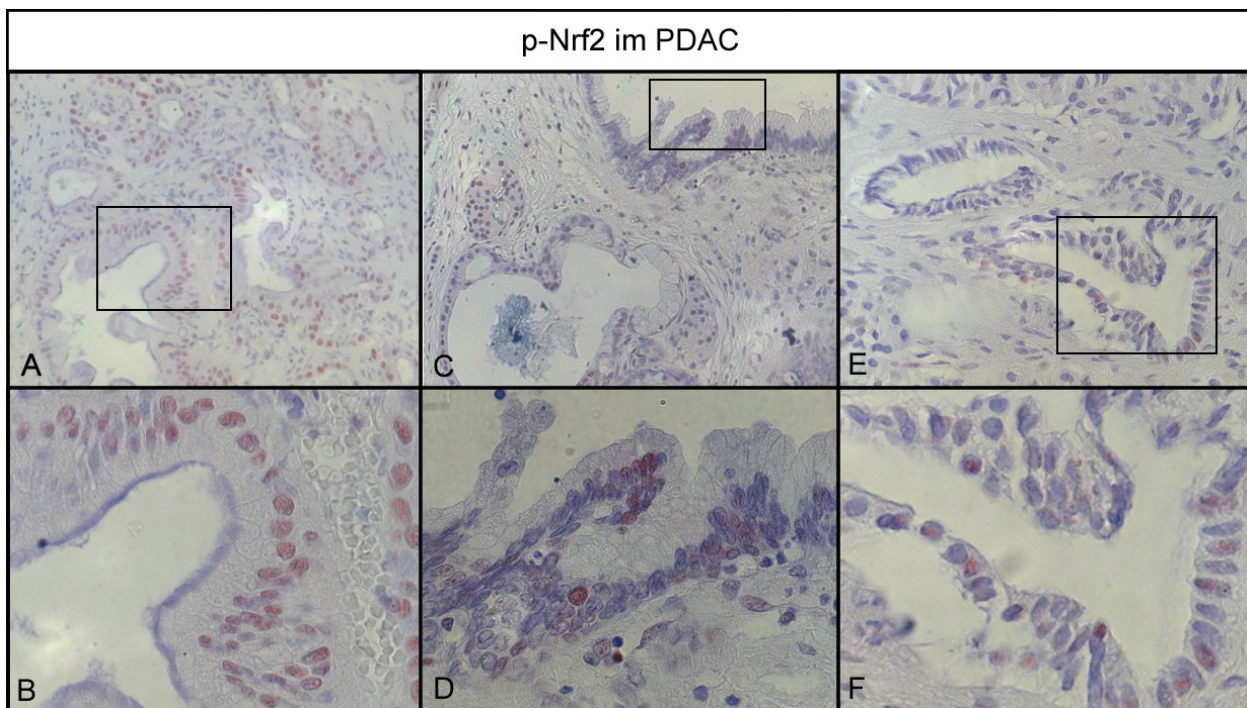


Abb. 4.6: Ausgeprägte Positivität von aktiviertem Nrf2 in PDAC-Gewebe von 3 PDAC-Patienten. Gezeigt sind repräsentative Bilder der immunohistochemischen Färbung von aktiviertem Nrf2 (p-Nrf2) in PDAC-Gewebe. Die gerahmten Ausschnitte der oberen Aufnahmen in A,C und E sind in B,D und F detaillierter gezeigt. Vergrößerung 400-fach (A,C,E) bzw. 800-fach (B,D,F).

In der Zusammenschau zeigen die Befunde *in situ* einerseits, dass PanIN-Läsionen sowohl von Pankreasleiden-freien Individuen als auch von CP-betroffenen Individuen eine wesentliche p-Nrf2-Expression aufweisen. Diese hebt sich deutlich von der gesunden Gangepithelien ab. Andererseits zeigte sich, dass das Vorhandensein von p-Nrf2 in gesundem Gangepithel als auch in PanIN-Läsionen von Pankreasleiden-freiem- und CP-Gewebe mit der Ki67-Expression positiv zusammenhängt. Für PanIN-Läsionen in beiden Kontexten (Gewebe ohne Pankreasleiden bzw. CP-Gewebe) legen die Ergebnisse nahe, dass eine aktivierte oxidative Stressantwort der Epithelzellen mit einer verstärkten Proliferationsaktivität gekoppelt ist.

Ein Zusammenhang des p-Nrf2-Status mit der gang-nahen Makrophageninfiltration konnte hingegen in keinem der untersuchten Kontexte nachgewiesen werden. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Proliferationsstatus der Gangepithelien und der Anwesenheit von Makrophagen konnte nicht für alle Gewebe eindeutig gezeigt werden.

Neben den Befunden aus prämaligmen und risikobehaftetem Gewebe lassen die zuletzt dargestellten Ergebnisse für PDAC-Zellen vermuten, dass das Vorhandensein von aktiviertem Nrf2 auch in maligne entarteten Zellen Bestandteil überlebensvorteiliger Programme ist.

4.2 Auswirkungen von Makrophagen auf Proliferation, Morphologie und Nrf2-Status von Pankreasgangepithelzellen *in vitro*

Die immunhistochemischen Befunde am Gewebe *in situ* legen einen Zusammenhang zwischen der Proliferation von benignen bzw. prämaligen Pankreasgangepithelzellen und dem Status ihrer oxidativen Stressantwort nahe. In dem untersuchten Kollektiv von 22 Pankreasleiden-freien und 14 von CP-betroffenen Individuen konnte zwar kein Zusammenhang zwischen der Makrophageninfiltration und der Nrf2-Aktivität von Pankreasgangepithel festgestellt werden, dennoch sollte *in vitro* untersucht werden, ob oxidativer Stress verursacht durch Stromazellen (speziell M1- bzw. M2-Makrophagen) zu einer Erhöhung der Nrf2-Aktivität in Pankreasgangepithelzellen führt. In der Literatur werden entzündungsaufrechterhaltende M1-Makrophagen vermehrt als tumorsuppressiv angesehen (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2012), gleichzeitig sind M2-polarisierte Makrophagen im Stroma des PDAC mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Kurahara *et al.*, 2011). Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden daher HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen entweder alleine oder in Gegenwart von M1- bzw. M2-Makrophagen über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert. Analysiert wurden anschließend die Pankreasgangepithelzellen hinsichtlich Zellzahl, Morphologie, Nrf2-Status und Proliferations-assoziierten Signalwegen.

4.2.1 Mit Makrophagen kokultivierte Pankreasgangepithelzellen weisen höhere Zellzahlen auf

Nach Kokultur mit Makrophagen ließ sich eine erhöhte Zellzahl der Pankreasgangepithelzellen im Vergleich zur HPDE-Monokultur beobachten. Die Zellzahl der HPDE-pBp-Zellen stieg nach M1-Makrophagen-Kokultur im Mittel um 22,5 % und nach Kokultur mit M2-Makrophagen um 11,3 % (s. Abb. 4.7). Bei der HPDE-kras-Zelllinie erhöhte die Anwesenheit von M1-Makrophagen die Zellzahl der Epithelzellen nur leicht. Es erfolgte ein mittlerer Anstieg der Zellzahl um 3,7 %. Im Unterschied zur HPDE-pBp-Zelllinie führte die Anwesenheit von M2-Makrophagen bei den HPDE-kras-Zellen zu einem Abfall der Zellzahl um 22,2 % (s. Abb. 4.7). Eine Signifikanz lag diesen Aussagen bei einer Versuchszahl von $n = 5$ nicht zugrunde. Zusammenfassend konnte anhand dieser Kokulturversuche gezeigt werden, dass die Anwesenheit von vor allem pro-inflammatorischen Makrophagen zu einer tendenziell erhöhten Zellzahl von Pankreasgangepithelzellen, insbesondere der HPDE-pBp-Zellen führt.

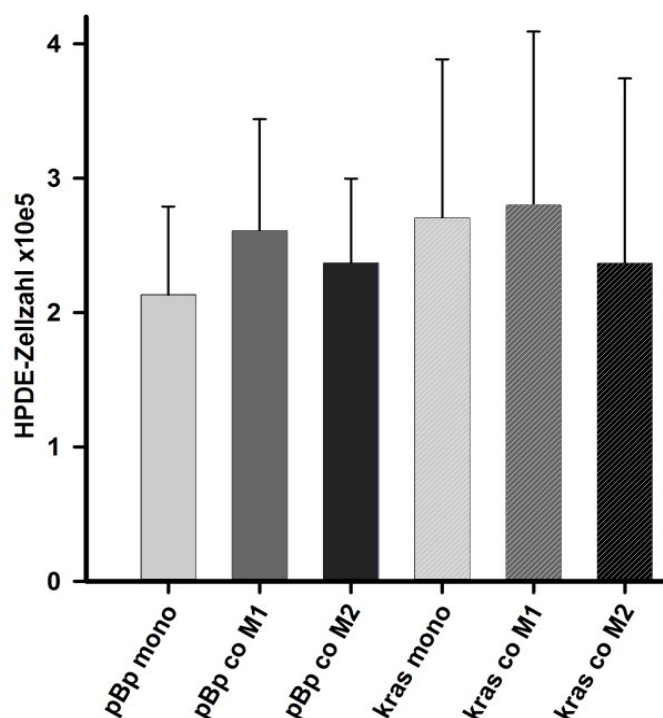


Abb. 4.7: Absolute Zellzahlen von HPDE-pBp- und HPDE-kras-Zellen nach 5-tägiger Monokultur bzw. Cokultivierung mit M1- oder M2-Makrophagen.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von fünf unabhängigen Versuchen. pBp = HPDE-pBp-Zellen; kras = HPDE-kras-Zellen; mono = Monokultur; co = cokultiviert mit; M1 = M1-Makrophagen; M2 = M2-Makrophagen.

4.2.2 Pankreasgangepithelzellen zeigen in Anwesenheit von Makrophagen einen aufgelockerten Zellverband und morphologische Zeichen von Zellstress

Neben dem Einfluss auf Zellwachstum sollte ferner untersucht werden, ob die Anwesenheit von Makrophagen zu Anzeichen einer oxidativen Stressantwort in Pankreasgangepithelzellen führt. Nach 5-tägiger Mono- und Cokultivierung mit M1- und M2-Makrophagen wurden benigne und prämaligene Pankreasgangepithelzellen dafür zunächst hinsichtlich ihrer Morphologie und dann bezüglich ihres Nrf2-Status angeschaut.

Monokultivierte HPDE-pBp-Zellen waren durch eine polygonale Zellform charakterisiert und wuchsen im dichten Zellverband. Nach Cokultivierung mit M1- und M2-Makrophagen erschien die Epithelzelldichte insgesamt leicht erhöht (vgl. Abb. 4.8). Die Morphologie cokultivierter Epithelzellen war ungleichmäßiger als nach Monokultur. Während die meisten Zellen nach Cokultivierung weiterhin eine polygonale Zellform aufwiesen, fielen auch vereinzelte, leicht langgestreckte Zellformen auf (vgl. Abb. 4.8). Zudem waren insbesondere nach Cokultivierung mit M2-Makrophagen mehrfach Zelleinschlüsse (Vakuolen) zu sehen, einem morphologischen Zeichen von Zellstress (vgl. Abb. 4.8). Die ebenfalls polygonalen HPDE-kras-Zellen wiesen in Abwesenheit von Makrophagen einen aufgelockerten Zellrasen auf, der einen Verlust von Zell-

Zell-Kontakten anzeigt. Nach Cokultivierung mit je einer der beiden Makrophagenpopulationen verstärkte sich dieser Befund. Der Zellverband beinhaltete große Zelloücken (Kreise in Abb. 4.8) und war im Vergleich zur Monokultur weniger zusammenhängend, insbesondere nach Cokultivierung mit M1-Makrophagen (vgl. Abb. 4.8). Analog zu den HPDE-pBp-Zellen fanden sich nach Cokultivierung mit beiden Makrophagenpopulationen vornehmlich polygonale Epithelzellen bei vereinzelter, spindelförmiger Morphologie. Im Gegensatz zu den HPDE-pBp-Zellen zeigten die HPDE-kras-Zellen nach Anwesenheit von M2-Makrophagen, aber auch nach Anwesenheit von M1-Makrophagen vielfach Zelleinschlüsse (Vakuolen) als deutliches Anzeichen von Zellstress (vgl. Abb. 4.8).

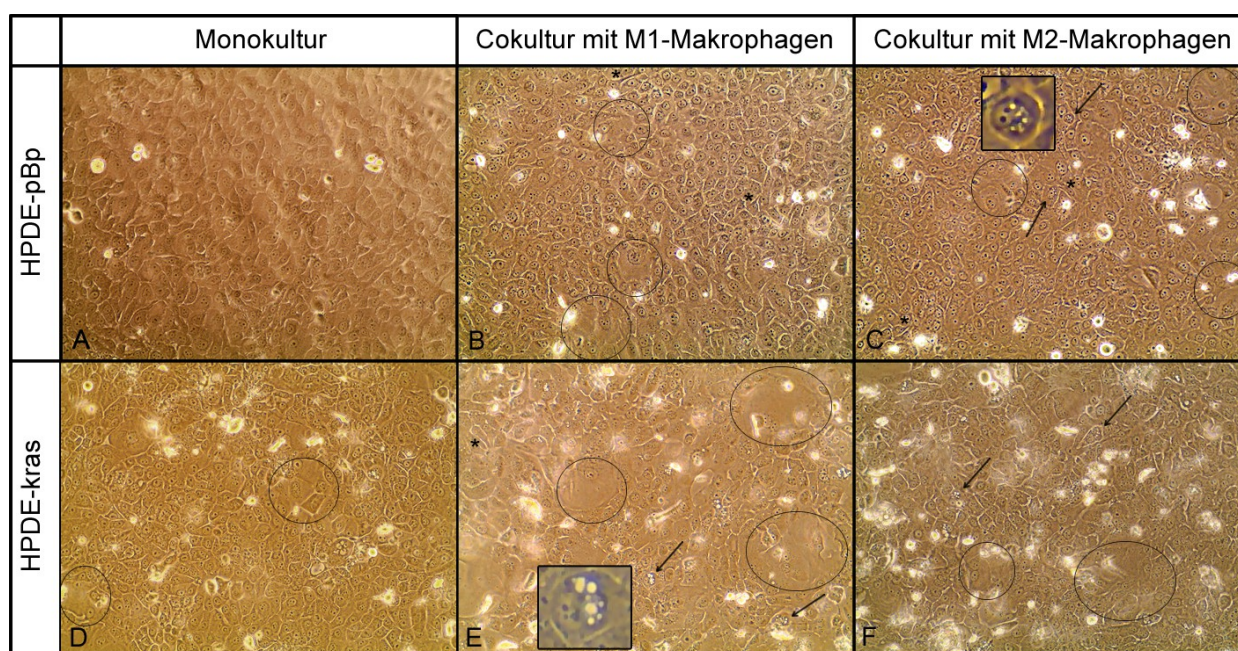


Abb. 4.8: Benigne und prä maligne Pankreasgangepithelzellen zeigen nach Cokultivierung mit Makrophagen einen aufgelockerten Zellverband und morphologische Zeichen von Zellstress.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der HPDE-pBp-Zellen (A-C) und HPDE-kras-Zellen (D-F) nach 5-tägiger Monokultivierung (A,D) bzw. Cokultivierung mit M1-Makrophagen (B,E) oder M2-Makrophagen (C,F) aus einem von $n = 4$ unabhängigen Versuchen. In B-F zeigen die Ellipsen Areale mit aufgelockertem Zellverband. Die Pfeile zeigen auf einzelne Zellen mit Vakuolen, einem Indiz für Zellstress (in C und E vergrößert gezeigt in kleinen Rechtecken). Vereinzelt Veränderungen der polygonalen Zellmorphologie der HPDE-Zellen in Monokultur hin zu leicht langgestreckten Zellformen nach Cokultur sind in B, C und E mittels * markiert. 280-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass M2-Makrophagen in der Lage sind, in beiden Epithelzellreihen morphologisch sichtbaren Zellstress zu erzeugen.

4.2.3 Benigne und prämaligne Pankreasgangepithelzellen zeigen unter Makrophageneinfluss ein unverändertes p-Nrf2-Protein-Level

Um zu überprüfen, ob sich der Nrf2-Status in den benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen in Anwesenheit der beiden unterschiedlichen Makrophagenpopulationen ändert, wurde aktiviertes Nrf2 (p-Nrf2) in Ganzzelllysaten von mono- und kokultivierten HPDE-pBp- und HPDE-kras-Zellen detektiert. Wie in Abb. 4.9 zu sehen ist, ließ sich mittels Westernblot weder in den HPDE-pBp- noch in den HPDE-kras-Zellen nach ihrer 5-tägigen Kokultivierung mit Makrophagen ein erhöhtes p-Nrf2-Level im Vergleich zur Monokultur detektieren. Zusammenfassend hat sich mittels Westernblot-Analyse gezeigt, dass die p-Nrf2-Protein-Level benigner und prämaligener Pankreasgangepithelzellen offenbar von beiden Makrophagenpopulationen unbeeinflusst bleiben.

Die Analyse der für Zellwachstum relevanten Signalwege anhand der Signalproteine MAPK totales und phosphoryliertes Erk (t-/p-Erk), totales und phosphoryliertes p38 (t/p-p38), sowie phosphoryliertes Smad3 (p-Smad3) und total-Smad2/3 (t-smad2/3) ergab keine eindeutigen Befunde (Daten nicht gezeigt).

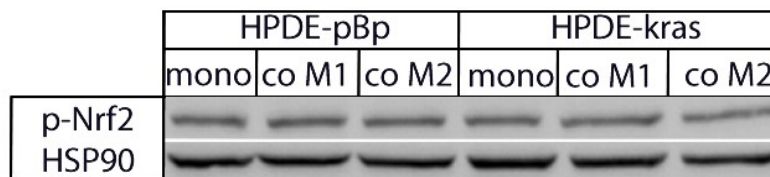


Abb. 4.9: Proteinnachweis von p-Nrf2 aus Ganzzelllysate im Westernblot von HPDE-pBp- bzw. HPDE-kras-Zellen nach 5-tägiger Mono- bzw. Kokultur mit M1- bzw. M2-Makrophagen.

Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot aus einem von n = 3 unabhängigen Versuchen. HSP90 wurde als Ladekontrolle detektiert.

4.3 Einfluss von Nrf2 auf das Zellwachstum, die Proliferation und das MAPK- und Smad- *Signaling* von Pankreasgangepithelzellen im Zusammenwirken mit TGF- β 1 *in vitro*

Sowohl *in situ* als auch *in vitro* konnte keine Korrelation von aktiviertem Nrf2 und der Präsenz von Makrophagen in pankreatischem Gewebe unterschiedlicher Genese festgestellt werden. Jedoch konnte *in situ* in humanen frühen pankreatischen Vorläuferläsionen einerseits verstärkt exprimiertes Nrf2 und andererseits eine Korrelation zwischen aktiviertem Nrf2 und dem Proliferationsstatus nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Studien, in denen eine erhöhte Onkogen-vermittelte Nrf2-Transkription zu einer erhöhten Proliferation und zur pankreatischen Tumorgenese führte (DeNicola *et al.*, 2011). Während jene Ergebnisse jedoch in Tierversuchen erzielt wurden, sollte hier mittels Nrf2-Überexpression gezielt der Einfluss von Nrf2 auf das Proliferationsverhalten humaner Pankreasgangepithelzellen untersucht werden. Hierfür wurden wiederum die benignen HPDE-pBp-Zellen, die keinerlei mit der Entwicklung des PDAC assoziierten Mutationen aufweisen und prämaligne HPDE-kras-Zellen, die die *kras*^{G12V}-Mutation tragen (Qian *et al.*, 2005) und damit einem PanIN-Stadium ähneln. Neben dieser genetischen Veränderung ist bereits in frühen Stadien der PDAC-Entwicklung die Expression des pleiotropen Zytokins TGF- β 1 eleviert, das tumorsuppressive aber auch tumorfördernde Wirkungen entfalten kann (Pickup *et al.*, 2013). Da die zugrundeliegenden Mechanismen eines möglichen Wechsels von TGF- β 1 zu einem Tumorpromotor kontextabhängig und kaum verstanden sind (Principe *et al.*, 2014; Inman, 2011), richteten sich die Untersuchungen insbesondere auch auf das Zusammenwirken von Nrf2 und TGF- β 1. Speziell wurden die Effekte von Nrf2 allein und in Kombination mit TGF- β 1 auf das Zellwachstum der Pankreasgangepithelzellen untersucht. Auf die drei Analyse-Methoden wird im Folgenden näher eingegangen: 1. Bestimmung der Vitalzellzahl, 2. Immunzytochemische Ki67-Färbung und 3. Nachweis wichtiger Proliferations-assoziiierter Signalmediatoren und TGF- β 1 mittels Westernblot.

4.3.1 Nrf2 fördert das Zellwachstum von benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den wachstumshemmenden Effekt von TGF- β 1

Um den Einfluss von Nrf2 auf das Zellwachstum der HPDE-Zellen einerseits und in Wechselwirkung mit TGF- β 1 andererseits zu untersuchen, wurden die vitalen Zellzahlen mit und ohne Nrf2-Überexpression sowie in An- und Abwesenheit von TGF- β 1 bestimmt. Die Transfektionseffizienz der Überexpression von Nrf2 wurde durch die Detektion des HA-Tags

mittels Westernblot überprüft. Hierfür wurde ein HA-spezifischer Antikörper verwendet, der für das rekombinante Nrf2 spezifisch ist (vgl. Abb. 4.13).

In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung als n-fache Zellzahl der unbehandelten Kontrollvektor (pcDNA3.1) transfizierten Probe jeder Zelllinie gezeigt. Die Überexpression von Nrf2 bewirkte sowohl in den HPDE-pBp- als auch in den HPDE-kras-Zellen jeweils nur einen leichten Anstieg der Zellzahl (Median = 1,725 bzw. 1,425), im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellen. Hingegen führte die TGF- β 1-Behandlung in den mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Zellzahlminderung von 29,4 % in den HPDE-pBp-Zellen (Median = 0,706) und zu einer signifikanten Zellzahlminderung von 24,2 % in den HPDE-kras-Zellen (Median = 0,758) im Vergleich zur unbehandelten Probe der jeweiligen Zelllinie. Jedoch war diese Wirkung von TGF- β 1 nach seiner Zugabe zu Zellen, in denen Nrf2 überexprimiert war, nicht mehr zu beobachten. Hier zeigte sich lediglich ein nicht signifikanter Zellzahlabfall von 7,2 % in den HPDE-pBp-Zellen (Reduktion von Median = 1,725 auf Median = 1,597) im Vergleich zum oben genannten Zellzahlabfall von 29,4 % (Reduktion von Median = 1 auf Median = 0,706) in den mit dem Kontrollvektor (pcDNA3.1) transfizierten TGF- β 1-behandelten Zellen.

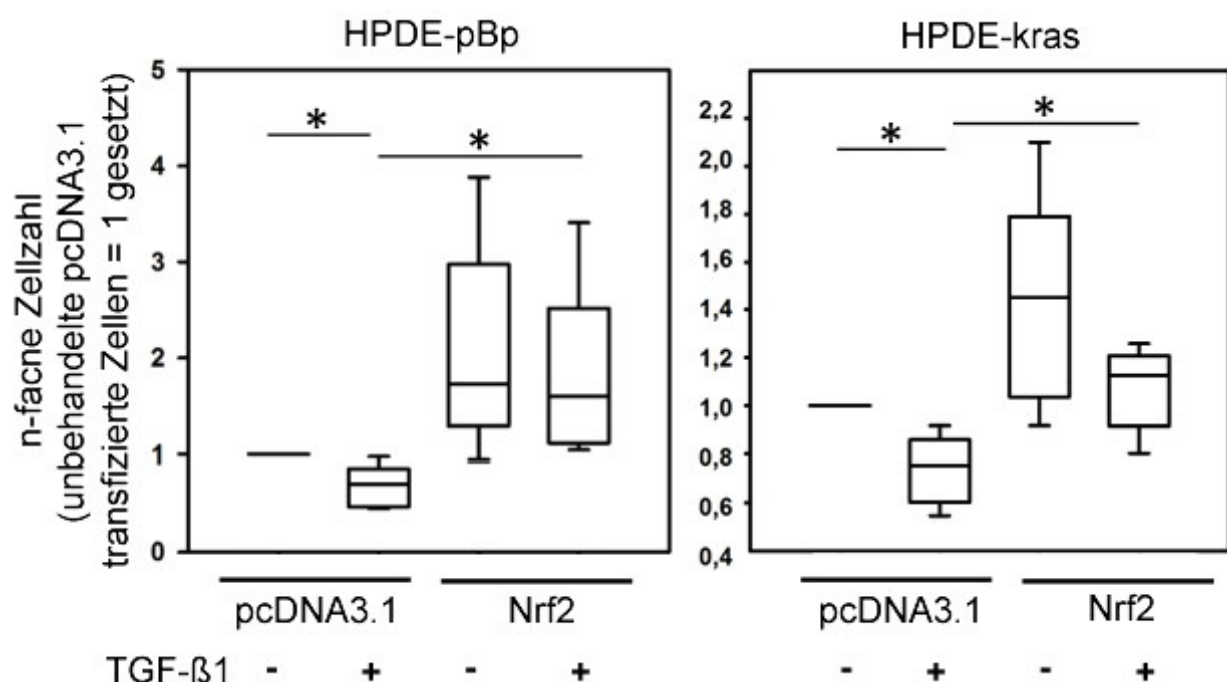


Abb. 4.10: Nrf2 fördert das Zellwachstum von Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den wachstumsinhibierenden Effekt von TGF- β 1.

Gezeigt ist die Vitalzellzahl von HPDE-pBp- und HPDE-kras-Zellen, die mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1) oder Nrf2-HA (Nrf2) transfiziert wurden und unbehandelt gelassen oder für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 behandelt wurden. Die Mediane mit Quartilen aus 5 unabhängigen Versuchen sind als n-fache Zellzahl von unbehandelten pcDNA3.1-transfizierten Zellen angegeben. * = $p < 0,05$.

Auch in den HPDE-kras-Zellen war der wachstumsinhibierende Effekt von TGF- β 1 in Anwesenheit von Nrf2 abgeschwächt. Bei ihnen zeigte sich ein ebenfalls nicht signifikanter Zellzahlabfall von 20,6 % (Reduktion von Median = 1,425 auf Median = 1,125) im Vergleich zum oben genannten Zellzahlabfall von 24,2 % (Reduktion von Median 1 auf Median = 0,758) in den mit dem Kontrollvektor (pcDNA3.1) transfizierten TGF- β 1-behandelten Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Nrf2 allein das basale Zellwachstum nur leicht positiv beeinflusst, während TGF- β 1 allein eine signifikante wachstumsinhibierende Wirkung ausübt. Die Gegenwart von Nrf2 schwächte hingegen den wachstumsinhibitorischen Effekt von TGF- β 1 in beiden Zelllinien deutlich ab. In der Zusammenschau deuten diese Daten darauf hin, dass Nrf2 die wachstumsinhibierende Funktion von TGF- β 1 in humanen Pankreasgangepithelzellen wirksam antagonisiert.

4.3.2 Nrf2 erhöht die Proliferation benigner und prämaligener Pankreasgangepithelzellen und antagonisiert den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF- β 1

Um zu überprüfen, ob die Nrf2-vermittelten Effekte auf das Zellwachstum durch eine Modulation der Zellproliferation zu erklären sind, wurde eine immunzytochemische Färbung von Ki67 durchgeführt. Sie macht die sich teilende Fraktion einer Zellpopulation kenntlich (Scholzen & Gerdes, 2000). Die Färbung der auf Coverslips gewachsenen HPDE-Zellen erfolgte nach Behandlung mit pcDNA3.1 als Kontrollplasmid bzw. mit Nrf2-HA-Plasmid sowie in An- und Abwesenheit von TGF- β 1 (Näheres s. 3.3.2). Die Quantifizierung der Ki67-positiven Zellfraktionen erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. Im Folgenden ist ihr Median als prozentualer Anteil Ki67-positiver Zellen an allen gezählten Zellen angegeben (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 4.11 gezeigt, sind sowohl die Kontrollzellen als auch die Nrf2-überexprimierenden HPDE-pBp-Zellen in Abwesenheit von TGF- β 1 stark positiv für Ki67 (vgl. C und A in Abb. 4.11). Die Dichte des Zellrasens ist bei Nrf2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den mit einem Kontrollvektor transfizierten HPDE-pBp-Zellen erhöht (vgl. C zu A in Abb. 4.11). Bei den mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1) transfizierten HPDE-pBp-Zellen führte die Behandlung mit TGF- β 1 zu einer deutlich reduzierten Zellzahl mit einem aufgelockerten Zellrasen (vgl. B zu A in Abb. 4.11). Der Anteil Ki67-positiver Zellen war nach TGF- β 1-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikant vermindert (Reduktion von Median = 88,5 auf Median = 60). Dieser Effekt von TGF- β 1 war nach Überexpression von Nrf2 deutlich abgeschwächt. Mit TGF- β -behandelte, Nrf2-überexprimierende HPDE-pBp-Zellen wiesen eine nur leicht verminderte Ki67-positive Zellfraktion auf (Reduktion von Median = 88,5 auf

Median = 81). Das Ansprechen der HPDE-pBp-Zellen auf TGF- β 1 (im Sinne einer Proliferationsinhibition) war nach Nrf2-Überexpression damit weniger stark ausgeprägt. Zudem war die Abnahme der Zelldichte nach Nrf2-Überexpression und TGF- β 1-Behandlung im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellen nur unwesentlich vermindert (vgl. D zu C mit B zu A in Abb. 4.11). Zusammenfassend schienen die Nrf2-überexprimierenden Pankreasgangepithelzellen damit weniger sensitiv für den anti-proliferativen Effekt von TGF- β 1 zu sein.

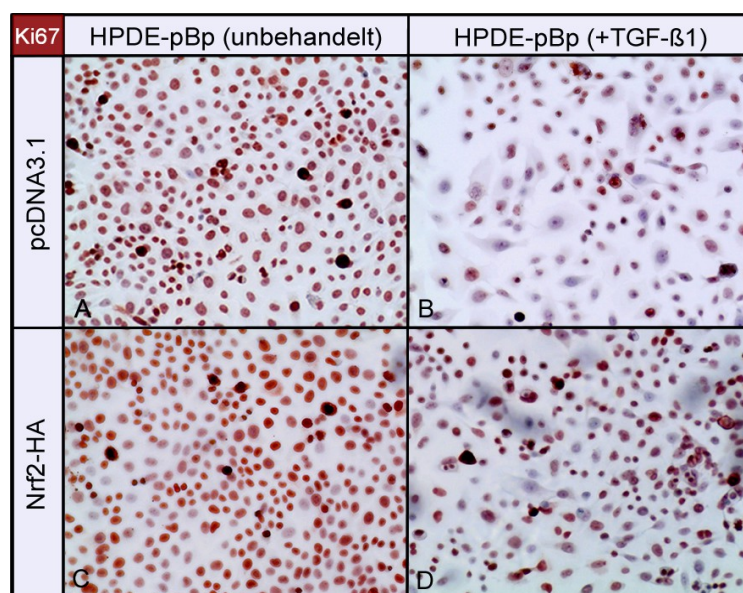


Abb. 4.11: Nrf2 erhöht die Proliferation von benignen HPDE-pBp-Zellen und antagonisiert den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF- β 1.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der immunzytochemischen Ki67-Färbung aus einem von $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit HPDE-pBp-Zellen, die mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1; A,B) oder Nrf2-HA (Nrf2; C,D) transfiziert wurden und unbehandelt gelassen (A,C) oder für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 behandelt wurden (B,D). 280-fache Vergrößerung.

Die alleinige Nrf2-Überexpression führte in unbehandelten HPDE-kras-Zellen zu einer höheren Zelldichte im Vergleich zu mit einem Kontrollplasmid transfizierten HPDE-kras-Zellen (vgl. C zu A in Abb. 4.12). Die alleinige TGF- β 1-Behandlung der mit einem Kontrollvektor transfizierten Zellen reduzierte wie in den HPDE-pBp-Zellen den Anteil Ki67-positiver Zellen signifikant (Reduktion von Median = 90 auf Median = 62,5). Dieser Effekt von TGF- β 1 wurde auch in dieser Zelllinie bei Nrf2-überexprimierenden Zellen deutlich abgeschwächt. Der Anteil Ki67-positiver, Nrf2-überexprimierender HPDE-kras-Zellen, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, war im Vergleich zur unbehandelten Probe nur unwesentlich reduziert (Reduktion von Median = 93 auf Median = 84). Diese Befunde legen damit wie bei den HPDE-pBp-Zellen nahe, dass die TGF- β 1-Sensitivität nach Nrf2-Überexpression im Vergleich zur Kontrollplasmid-Transfektion vermindert ist.

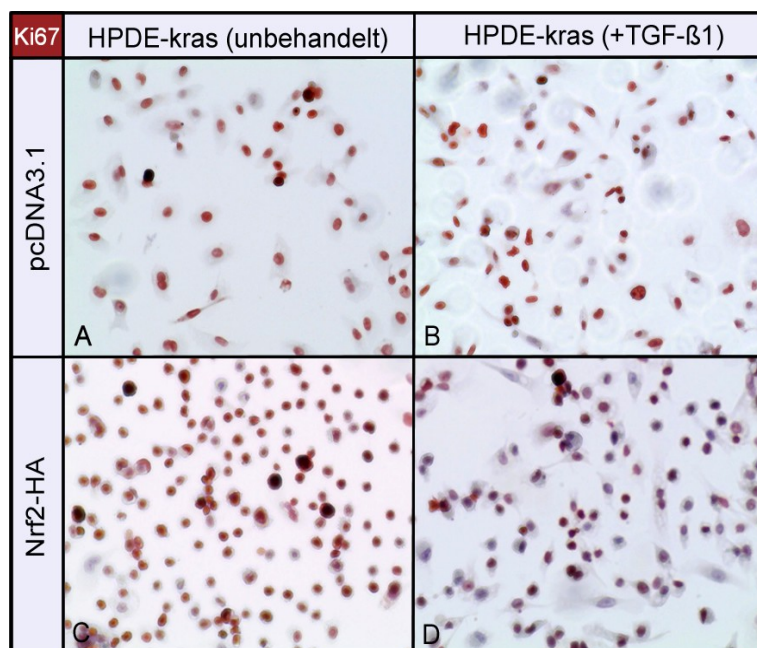


Abb. 4.12: Nrf2 erhöht die Proliferation von prämaligen HPDE-kras-Zellen und antagonisiert den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF-β1.

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der immunzytochemischen Ki67-Färbung aus einem von $n = 3$ unabhängigen Versuchen von HPDE-kras-Zellen, die mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1; A,B) oder Nrf2-HA (Nrf2; C,D) transfiziert wurden und unbehandelt gelassen (A,C) oder für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β1 behandelt wurden (B,D). 280-fache Vergrößerung.

Zusammenfassend konnte anhand dieser immunzytochemischen Ki67-Färbung gezeigt werden, dass die Überexpression von Nrf2 sowohl in HPDE-pBp- als auch in HPDE-kras-Zellen zu einer gesteigerten Proliferation führt, während TGF-β1 gegenteiliges bewirkte. Die Anwesenheit von vermehrtem Nrf2 führte zu einer Abschwächung des TGF-β1-vermittelten anti-proliferativen Effekts. Diese Daten unterstützen damit die Ansicht, dass Nrf2 die proliferative Aktivität der Pankreasgangepithelzellen durch eine Antagonisierung des wachstumsinhibierenden Effekts von TGF-β1 erhöht, indem es die antiproliferative Aktivität von TGF-β1 schwächt.

4.3.3 Nrf2 antagonisiert den wachstumsinhibierenden Effekt von TGF-β1 auf Pankreasgangepithelzellen über die Modulation des MAPK- und Smad-Signaling

Um dezidiert zu untersuchen, auf welche Weise Nrf2 die TGF-β1-vermittelte Wachstumsinhibition von benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen antagonisiert, wurden für Zellwachstum relevante Signalwege ohne und nach Überexpression von Nrf2 sowie in An- und Abwesenheit von TGF-β1 anhand der Signalproteine MAPK und Smad mittels Westernblot analysiert. Insbesondere wurden phosphoryliertes p38 (p-p38), die Gesamtmenge (total) an p38 (t-p38), phosphoryliertes Erk (p-Erk) und total-Erk (t-Erk), phosphoryliertes Smad3 (p-Smad3) und total-Smad2/3 (t-smad2/3) detektiert. Ferner wurde die Expression der Zellzyklus-

kontrollierenden Kinase p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) analysiert, deren Nachweis ein Hinweis darauf ist, dass der Zellzyklus arretiert wurde.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Bandenintensitäten aus $n = 3-4$ Versuchen densitometrisch anhand der HSP90-Expression normalisiert und gemittelt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden die Werte der phosphorylierten Proteine als Anteil am entsprechenden totalen Protein bestimmt. Zur Erfolgskontrolle der Nrf2-Transfektion wurde zunächst das rekombinante Nrf2 über die Detektion des HA-Tags nachgewiesen. Hierbei fiel anhand der Elevation von Nrf2-HA auf, dass die erfolgte Überexpression von Nrf2 in den HPDE-kras-Zellen weniger stark ausgeprägt war als in den HPDE-pBp-Zellen. Abb. 4.13 zeigt repräsentative Westernblots.

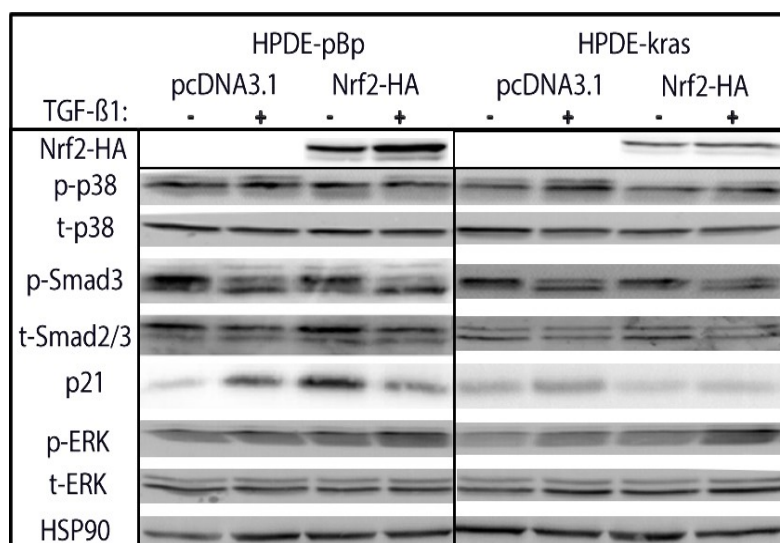


Abb. 4.13: Nrf2 moduliert das MAPK- und Smad-Signaling in benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen.

Gezeigt sind repräsentative Westernblots aus $n = 3 - 4$ unabhängigen Versuchen, in denen HPDE-pBp- und HPDE-kras-Zellen mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1) oder Nrf2-HA (Nrf2) transfiziert und unbehandelt gelassen oder für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF-β1 behandelt wurden. Zur Erfolgskontrolle der Nrf2-Überexpression wurde ein HA-spezifischer Antikörper verwendet. HSP90 diente als Ladekontrolle. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung der gemittelten Bandenintensitäten (Daten nicht gezeigt).

Die alleinige TGF-β1-Behandlung führte sowohl in den HPDE-pBp- als auch in den HPDE-kras-Zellen zu einer erhöhten Phosphorylierung des wachstumsinhibierenden Proteins p38 (vgl. .Abb. 4.13). Bei Überexpression von Nrf2 war dieser Effekt von TGF-β1 nicht zu beobachten. Hier reduzierte sich in beiden Zelllinien die basale als auch die TGF-β1-vermittelte p38-Phosphorylierung (vgl. .Abb. 4.13). Diese Befunde sprechen damit für eine leicht reduzierte Aktivität dieses wachstumsinhibierenden Signalwegs unter Nrf2-Überexpression. Außerdem zeigte sich in beiden Zelllinien nach TGF-β1-Applikation eine leicht reduzierte Phosphorylierung von Smad3, über deren nachgeschaltete Kaskade TGF-β1 seine wachstumsinhibierende Wirkung vermitteln kann.

Demgegenüber verstärkte die Nrf2-Überexpression die Phosphorylierung der Proliferations-assoziierten MAPK Erk sowohl in HPDE-pBp- als auch in HPDE-kras-Zellen. Interessanterweise war dieser Effekt bei zusätzlicher TGF- β 1-Behandlung verstärkt (vgl. Abb. 4.13). Zusammengenommen sprechen diese Befunde für ein durch Nrf2 moduliertes MAPK- und Smad-Signaling von TGF- β 1, das die wachstumsinhibierenden Effekte durch TGF- β 1 schwächt. Ferner waren die p21-Level bei Nrf2-Überexpression in HPDE-kras-Zellen mit und ohne TGF- β 1-Behandlung reduziert. In HPDE-pBp-Zellen hingegen war dies ausschließlich bei Anwesenheit von TGF- β 1 zu beobachten (vgl. Abb. 4.13). Diese Beobachtungen sind ein Anzeichen dafür, dass es unter Nrf2 und TGF- β 1 im Vergleich zu TGF- β 1 allein zu einer verminderten Wachstumsarretierung kommt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 in beiden untersuchten Zelllinien die Aktivierung wachstumsinhibitorischer Signalwege begünstigt. Zudem sprechen die Befunde insbesondere in prämaligen Pankreasgangepithelzellen für eine Nrf2-abhängige Aktivierung von Proliferations-assoziierten Signalwegen (MAPK Erk) bei Schwächung von wachstumsinhibierenden Signalwegen (MAPK p38 und p21). In der Zusammenschau unterstützen diese Daten die Ansicht, dass Nrf2 die TGF- β 1-vermittelte Wachstumsinhibition antagonisiert, indem es die wachstumsinhibierenden Signalwege (p38 und Smad3) abschwächt und gleichzeitig den wachstumsförderlichen Erk-Signalweg begünstigt.

5 Diskussion

Diese Arbeit widmete sich der Rolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der frühen Phase der pankreatischen Tumorgenese. Nrf2 als Marker oxidativen Stresses steht mit Chemoresistenz und Wachstumsvorteilen in Verbindung und ist in vielen Tumorentitäten, so im PDAC, verstärkt aktiviert (Lister *et al.*, 2011). In der Literatur konnten mehrere Arbeitsgruppen für das murine System zeigen, dass Nrf2 in Kernen von PanIN-Läsionen verstärkt exprimiert wird, während es im gesunden Gangepithel nicht zu detektieren war (DeNicola *et al.*, 2011; Al Saati *et al.*, 2013; Liou *et al.*, 2016). Untersuchungen im humanen System fehlen bislang.

Im ersten Teil der Arbeit sollte daher zunächst aufgeklärt werden, ob Nrf2 auch in humanen PanIN-Vorläuferläsionen aktiviert ist. Anhand immunhistochemischer Färbungen konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass aktiviertes Nrf2 (p-Nrf2) im Kontrast zum gesunden Pankreasgangepithel erhöht und verstärkt in Kernen frühester PanIN-Läsionen vorliegt. Eine Frage war zudem, ob diese Anzeichen einer oxidativen Stressantwort auch in einem Zusammenhang mit der Proliferation von Pankreasgangepithelzellen stehen. Interessanterweise zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen, dass in PanIN von Pankreasleiden-freien Individuen die erhöhte Nrf2-Aktivität mit einer erhöhten Proliferationsaktivität einhergeht. Zusammengenommen kann diese Arbeit damit die Befunde von DeNicola *et al.* am Tiermodell anhand von *in situ* Ergebnissen für das humane System untermauern. Einschränkend ist dabei zu bemerken, dass es sich um ein relativ kleines Kollektiv von maximal 22 Individuen handelte.

In vitro war bei dezidiertem Betrachtung der Nrf2-Effekte auf das Zellwachstum pankreatischer Gangepithelzellen der Effekt von Nrf2 allein gering. Nach Nrf2-Überexpression ließ sich nur eine leicht erhöhte Proliferation anhand einer Zunahme der Zellzahl und einer stärkeren Ki67-Färbung für benigne (HPDE-pBp-Zellen) und prämaligne (HPDE-kras-Zellen) Pankreasgangepithelzelllinien zeigen. Diese Ergebnisse der *in vitro* Versuche geben damit einen Hinweis, dass Nrf2 pro-proliferative Effekte ausüben kann. Bei Lister *et al.* waren diese Effekte deutlicher sichtbar (Lister *et al.*, 2011). Einen Erklärungsansatz dafür stellen die verschiedenen Kultivierungsperioden nach der Modulation der Nrf2-Expression dar. Zudem ist die Transfektion mittels Plasmid lediglich eine transiente Transfektion. So ist möglich, dass aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen im Vergleich zu den Untersuchungen von Lister *et al.* verschieden starke Ausprägungen der Überexpression von Nrf2 erreicht wurden. Zusammengenommen unterstützen die Befunde jedoch die Hypothese, dass Nrf2 bereits in prämaligen Pankreasgangepithelzellen proliferationsfördernde Effekte vermittelt und damit sehr

früh in der pankreatischen Tumorgenese pro-tumorigen wirken kann. Offenbar kann ein Wechsel von Nrf2 von einem tumorsuppressiven zu einem tumorfördernden Faktor bereits in frühen Stadien der Entwicklung des PDAC auftreten. Auch Frühformen anderer epithelialer Tumoren zeigen erhöhte p-Nrf2-Level und deren pro-tumorigene Wirkung, so zum Beispiel die aktinische Präkanzerose (Rolfs *et al.*, 2015). Rolfs *et al.* fanden, dass Nrf2 zwar nicht pro-proliferativ wirkt, es jedoch die frühe Tumorgenese vorantreibt, indem es prä-maligne Zellen vor stress-induzierter Apoptose schützt (Rolfs *et al.*, 2015).

Eine weiterführende Frage dieser Arbeit war, ob eine Nrf2-Aktivierung in Pankreasgang-epithelzellen vom entzündlichen Kontext der CP beeinflusst wird, die einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines PDAC darstellt. In diesem zweiten Teil der Arbeit zeigten die Untersuchungen, dass die Nrf2-Expression des Pankreasgangepithels von CP-Patienten signifikant höher war als die gesunder Gangepithelien. Der direkte Vergleich von PanIN-Läsionen mit bzw. ohne den Kontext der chronischen Entzündung ergab, dass die Nrf2-Aktivität von PanIN-Läsionen in chronisch entzündlichem Gewebe wesentlich ausgeprägter war als die Nrf2-Aktivität von PanIN-Läsionen von Pankreasleiden-freien Individuen. Dies lässt vermuten, dass der Einfluss des Stromas bei persistierender Entzündung und damit der oxidative Stress größer wird. Die Befunde legen ferner nahe, dass eine wachsende inflammatorische Mikro-umgebung zusammen mit der onkogenen *kras*-Aktivierung die Hochregulierung von Nrf2 in Gangepithelzellen zusätzlich steigert. Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigt eine aktuelle Studie um Choudhury *et al.* einen anders gerichteten Einfluss der entzündlichen Umgebung auf die Nrf2-Aktivität pankreatischer Zellen (Choudhury *et al.*, 2015). Durch Einbringen bakterieller Lipopolysaccharide wurde im murinen System der Status einer CP *in vitro* simuliert. Pankreatische Zellen, die diesem oxidativem Stress ausgesetzt waren, zeigten eine geringere Nrf2-Akkumulation im Kern und eine reduzierte antioxidative Enzymaktivität. Dies ging mit einer Induktion des SAPK/JNK-vermittelten Zelltods einher (Choudhury *et al.*, 2015). Dies steht im Kontrast zu den Befunden in der hier vorliegenden Arbeit, in der mit der erhöhten Nrf2-Aktivität in PanINs in CP-Geweben eine im Vergleich zu gesunden Gangepithelien signifikant höhere Proliferation einherging. Dies könnte durch den Einfluss des entzündlichen Kontextes oder durch die Akkumulation genetischer Mutationen der PanIN selbst verursacht sein. Die Proliferationsaktivität von PanINs von Pankreasleiden-freien Individuen unterschied sich jedoch nicht signifikant von der von CP-betroffenen Individuen. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass neben der Akkumulation genetischer Mutationen, wie sie in PanIN-Läsionen zu finden sind, auch der Mikroumgebung eine Rolle in der oxidativen Stressantwort und der Proliferation von PanIN-Läsionen zukommt.

Ein Merkmal des desmoplastischen Stromas im PDAC und ebenso das einer CP, einem Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC, ist u.a. der Reichtum an Makrophagen. Helm *et al.* konnten zeigen, dass sich diese Immunzellen in der CP eher gleichmäßig im Gewebe verteilen, während sie im PDAC zwar epithelnah lokalisiert sind, aber ebenso wenig in direktem Zell-Zell-Kontakt zum Epithel stehen (Helm, Mennrich *et al.*, 2014). Beiderlei Konstellationen sprechen folglich für einen etwaigen Einfluss der Makrophagen auf das Epithel über lösliche Faktoren (Helm, 2014). Interessanterweise beginnen sich Makrophagen bereits in der Umgebung früher PanIN-Läsionen anzuhäufen. In einem dritten Teil dieser Arbeit sollte daher einerseits näher beleuchtet werden, ob Makrophagen als wesentliche Stromakomponente in PanIN-Läsionen zur Aktivierung von Nrf2 beitragen und andererseits, ob sie Einfluss auf das Wachstumsverhalten von prämaligen Pankreasgangepithelzellen nehmen. Für die *in vitro* Versuche war ein indirektes Cokultursystem Methode der Wahl, da entsprechend obiger Ausführungen anzunehmen ist, dass die indirekte Cokultur den Bedingungen *in vivo* näher kommt als eine direkte Cokultur. Ferner ist bekannt, dass lösliche Faktoren eine wichtige Rolle in der Vermittlung von pro-tumorigenen Effekten spielen (Helm, 2014).

Die Untersuchungen ergaben, dass die Bedeutung von Makrophagen auf die Expression von aktiviertem Nrf2 von Pankreasgangepithelzellen gering ist. In den *in situ* Präparaten konnte sowohl im gesunden Epithel als auch in PanIN-Läsionen der Pankreasleiden-freien und CP-Präparate kein maßgeblicher Zusammenhang zwischen dem Level von aktiviertem Nrf2 und dem Makrophagenaufkommen festgestellt werden. Die Ergebnisse der Versuche *in vitro* (Cokultur) ließen nicht auf einen eindeutigen elevierenden Effekt von M1- oder M2-Makrophagen auf die p-Nrf2-Proteinmenge von benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen schließen. Dabei ist möglich, dass die Niveauunterschiede des p-Nrf2-Proteins so marginal waren, dass sie mit gewählter Methodik (Analyse innerhalb von Ganzzelllysaten) nicht detektierbar waren. Anhand von weiteren Untersuchungen mit Kernlysaten könnte dies überprüft werden.

Interessanterweise konnten Makrophagen *in vitro* das Wachstumsverhalten benigner Pankreasgangepithelzellen beeinflussen. Mit Makrophagen kokultivierte Pankreasgangepithelzellen (HPDE-pBp-Zellen) zeigten ein leicht erhöhtes Zellwachstum im Vergleich zur Monokultur. Dieses war verstärkt unter M1-Makrophagen-Einfluss zu beobachten und hier zudem in prämaligen HPDE-kras-Zellen zu verzeichnen. Dazu passend zeigten die *in situ* Befunde, dass alle PanIN-Läsionen eine ausnahmslose Proliferationsaktivität bei gleichzeitig hohem Aufkommen an Makrophagen aufwiesen. Die Proliferationsaktivität war in PanINs in CP-Gewebe als auch in PanINs in Pankreasleiden-freiem Gewebe vornehmlich in bis zu 10 % des Gangepithels zu finden (gezeigt anhand der Ki67-Expression). In Anbetracht des wesentlich

größeren Makrophagenaufkommens in der CP scheint die Proliferationsaktivität von diesem unbeeinflusst zu sein. Zudem war das nur mäßig proliferationsaktive gesunde Gangepithel ebenfalls von Makrophagen umgeben, die sich bezüglich Phänotyp und Ausmaß nicht wesentlich von PanIN-Läsionen derselben Gewebe unterschieden. Somit häuften M1-Makrophagen sich sowohl in der Nähe von PanINs als auch in der Umgebung von gesunden Gängen an (Broich, 2014). Ein tendenziell negativer Zusammenhang wurde in dieser Arbeit zwischen der Proliferationsaktivität gesunden Gangepithels und der Anwesenheit CD68-positiver Makrophagen gefunden. Dies lässt spekulieren, dass Makrophagen einen wachstums-kontrollierenden Einfluss auf benigne Epithelzellen nehmen. In der Gesamtheit konnte für keines der Gewebe ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem quantitativ höheren Makrophagenaufkommen und einer erhöhten Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. Vorausgesetzt Makrophagen haben einen Einfluss auf das ortständige Epithel, wie von Liou *et al.* hinsichtlich Metaplasie gezeigt (Liou *et al.*, 2016), so erscheint dabei weniger die hier für die Korrelation gewählte absolute Anzahl an M1- bzw. M2-Makrophagen von biologischer Bedeutung in der frühen Tumorgenese zu sein als vielmehr ihre genaue Lokalisation. Zu dieser Vermutung passte die Beobachtung *in situ*, dass einzelne PanIN-Läsionen unterschiedliche PanIN-Grade aufweisen können. Es ist ein Phänomen, das in der Literatur bereits beschrieben ist (Hruban *et al.*, 1999) und ein Hinweis sein könnte, dass die PanIN-Progression durch mikrolokale Ereignisse vorangetrieben wird. Diese Hypothese stützend zeigten Helm *et al.*, dass Makrophagen besonders in der Nähe des malignen Epithels akkumulieren, und diese tumornahe Verteilung von CD68- und CD163-positiven-Makrophagen tendenziell mit einem höherem Ent-differenzierungsgrad der Tumorzellen korreliert (Helm *et al.*, 2014). *In vitro* zeigten die in dieser Arbeit verwendeten Pankreasgangepithelzellen nach Cokultivierung mit Makrophagen ein leicht erhöhtes Zellwachstum bei Zeichen von Zellstress. Anhand von weiteren Untersuchungen *in situ* könnte überprüft werden, ob die Makrophagenlokalisierung um PanINs Einfluss auf deren Proliferationsaktivität und das Nrf2-Level nimmt.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit einen leicht proliferationsförderlichen Effekt von M1-Makrophagen auf Pankreasgangepithelzellen zeigen. Dieser lässt sich jedoch nicht sicher in Zusammenhang mit dem oxidativen Stressmarker Nrf2 bringen. In der Zusammenschau scheinen Makrophagen in dieser sehr frühen Phase der Karzinogenese, die diese Arbeit beleuchtete, damit als Stromakomponente eine eher geringe Bedeutung zuzukommen. Möglicherweise wird ihr Einfluss erst bei persistierender Entzündung oder bei einer stärkeren Anreicherung größer. Denkbar ist auch, dass ihr Einfluss erst im Zusammenspiel mit anderen Stromazellen zur Geltung kommt und sich nicht isoliert messen lässt. So wäre interessant, Pankreasgang-

epithelzellen zusätzlich mit anderen Stromazellen wie Myofibroblasten zu kokultivieren. In Anbetracht der Karzinogenese als ein sich chronisch entwickelnder Prozess, der für das PDAC von den ersten genetischen Veränderungen an auf über elf Jahre geschätzt wird (Han & von Hoff, 2013), stellt sich zudem die Frage der optimalen aber noch realisierbaren Dauer von Kokultivierung und Stimulationszeiten. Zudem muss bedacht werden, dass die Simulation eines so komplexen Prozesses wie die Tumorgenese stets eine hochgradige Vereinfachung bleibt.

Der vierte und letzte Teil der Arbeit sollte klären, ob der *in situ* identifizierte wachstumsförderliche Einfluss von Nrf2 möglicherweise auf einem Zusammenwirken mit dem Zytokin TGF- β 1 fußt. Insbesondere stellte sich die Frage, ob Nrf2 im Zuge der pankreatischen Karzinogenese pro-tumorigen wird, indem es TGF- β 1-abhängige Zellantworten moduliert. In vielen Tumorentitäten, so im PDAC werden erhöhte Spiegel dieses Zytokins gefunden (Kleef *et al.*, 2007).

Ein Zusammenwirken von Nrf2 und TGF- β 1 wird hinsichtlich verschiedener tumorfördernder Mechanismen beschrieben. Beispielsweise konnten Arfmann-Knübel *et al.* zeigen, dass Nrf2 und TGF- β 1 in additiver Weise zu einem invasiveren Phänotyp von Pankreasgangepithelzellen beitragen (Arfmann-Knübel *et al.*, 2015). In späteren Stadien der Tumorentwicklung wirkt TGF- β 1 folglich eher als ein Tumorpromotor, so auch im PDAC (Rane *et al.*, 2006), während es in frühen Stadien der Tumorgenese noch als wirksamer Zellwachstumsinhibitor gilt (Principe *et al.*, 2014; Inman, 2011; Massagué, 2008). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieses propagierten funktionalen Wechsels von TGF- β 1 sind nicht vollständig geklärt. Sie scheinen kontextabhängig und mit einer Umprogrammierung aktivierter Signalwege verbunden zu sein. Ein Mechanismus, der in der Literatur angeführt wird und der das TGF- β 1-Paradox erklären könnte, ist die unterschiedliche Aktivierung von MAPK wie Erk in benignen und malignen Epithelzellen (Principe *et al.*, 2014). Viele Tumoren zeigen eine konstitutiv hohe Erk-Aktivierung, die von einer Mutation im *ras* Onkogen hervorgerufen wird und zu anhaltender TGF- β 1-Synthese und dessen *Signaling* führt (Principe *et al.*, 2014).

Ein negativer Effekt des TGF- β -*Signaling* auf das Zellwachstum, wie 2003 von Shi & Massagué beschrieben (Shi & Massagué, 2003), konnte in dieser Arbeit für gesunde sowie prä maligne Pankreasgangepithelzellen *in vitro* bestätigt werden. Nach TGF- β 1-Applikation war eine verstärkte p38-Aktivierung bei verminderter Erk-Aktivierung zu beobachten, ferner war eine erhöhte p21-Expression und eine verminderte Proliferation zu verzeichnen. Die erniedrigte Zellzahl und geringere Ki67-Positivität in benignen und prä malignen Pankreasgangepithelzellen zeigte, dass TGF- β 1 in diesen Pankreasgangepithelzellen wachstumshemmende Effekte vermittelt.

Die Wirkungen von TGF- β 1 auf das Wachstumsverhalten pankreatischer Gangepithelzellen in Abhängigkeit von Nrf2 zeigten interessante Befunde. Es zeigte sich, dass der wachstumsförderliche Effekt von Nrf2 allein gering war, Nrf2 aber die wachstumshemmenden Effekte von TGF- β 1 maßgeblich schwächte. Für den Wachstumsvorteil der Pankreasgangepithelzellen ist damit offenbar weniger die Aktivität von Nrf2 allein, als vielmehr die Interaktion mit TGF- β 1 maßgeblich.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hohe Expression und Aktivität des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 wesentlich zu einer Deregulation des TGF- β 1-*Signaling* beiträgt. So ergab die Analyse der Signalwege, dass Nrf2 insbesondere die Erk-Aktivierung verstärkte, während die Smad3- und p38-Aktivierung reduziert wurde. Die unter alleiniger TGF- β 1-Applikation induzierte p21-Expression war bei gleichzeitiger Nrf2-Überexpression reduziert. In Einklang mit diesem Signaling lag eine erhöhte Proliferation bei den Pankreasgangepithelzellen vor. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Überleben pankreatischer Gangepithelzellen durch die von Nrf2 antagonisierten wachstumshemmenden Effekte von TGF- β 1 gefördert wird.

Damit kann geschlossen werden, dass der pro-proliferative Effekt von Nrf2 weniger als ein für sich stehender pro-tumorigener Mechanismus seitens Nrf2 zu verstehen ist, sondern dieser vielmehr über die Antagonisierung der TGF- β 1-Effekte vermittelt wird. Es kann somit festgestellt werden, dass sich im Zusammenspiel von TGF- β 1 und Nrf2 ein funktionaler Wechsel vollzieht, der das Überleben von transformierten Zellen begünstigt. Dass TGF- β in der Tumorgenese eine duale Rolle einnimmt, wie in der Literatur vielfach beschrieben (Principe *et al.*, 2014; Inman, 2011), kann diese Arbeit damit bestätigen. Interessanterweise wurden die Effekte gleichermaßen in benignen als auch in prämaligen Pankreasgangepithelzellen gefunden, was suggeriert, dass eine hohe Nrf2-Aktivität die Wachstumshemmung von TGF- β 1 nicht erst in fortgeschrittenen Stadien antagonisieren kann. Insgesamt lässt sich damit die Anschauung von Principe *et al.*, dass TGF- β die Tumorprogression in fortgeschrittenen Stadien vorantreibt, im Zusammenwirken mit Nrf2 auf eine sehr frühe Phase der Karzinogenese erweitern. Unter der Voraussetzung, dass beide Faktoren eleviert sind, ist denkbar, dass dieser Mechanismus einen initialen Schritt in der Karzinogenese darstellt, der den anfänglich prämaligen Zellen dereguliertes Wachstum ermöglicht.

Offensichtlich stellt eine erhöhte Nrf2-Expression einen zentralen Mechanismus der Karzinogenese dar. So wird Nrf2 neben der pro-proliferativen Funktion auch eine wirksame Schutzfunktion vor Apoptose zugesprochen, die in vielen Tumoren zudem Chemoresistenz verleihen kann (Arlt *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012). So wurde gezeigt, dass Nrf2 zu einer Hochregulation

anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL führen kann (Niture & Jaiswal, 2012 & 2013). Dazu passend erweisen sich Krebszellen, deren Nrf2-Aktivität inhibiert wurde, durch eine gesteigerte proteosomale Aktivität als sensibler gegenüber Apoptose (Arlt *et al.*, 2013). In Anlehnung an die Ergebnisse dieser Arbeit, konnten weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die höchste Nrf2-Expression/ Aktivität mit der niedrigsten Apoptoserate in malignen Pankreasgangepithelzellen (Colo357) korreliert ist und vice versa (Genrich *et al.*, 2016). Zudem konnten gezeigt werden, dass Nrf2 in der Lage ist, Pankreasgangepithelzellen vor der TGF- β 1-vermittelten Apoptoseinduktion zu bewahren (Genrich *et al.*, 2016). Nrf2 antagonisiert somit die wachstumshemmenden Effekte von TGF- β 1, indem es einerseits die Proliferation fördert, wie in dieser Arbeit gezeigt, und andererseits Schutz vor Apoptoseinduktion liefert (Genrich *et al.*, 2016). Zusammengenommen führt dies zu einem erhöhten Überleben pankreatischer Gangepithelzellen.

Um abschließend einen Einblick in spätere Phasen der Tumorgenese zu erhalten, wurde in dieser Arbeit auch der Nrf2- und Proliferationsstatus im PDAC erhoben. Die immunhistochemische Färbung eines kleinen Kollektivs an PDAC-Präparaten konnte bestätigen, dass auch PDAC-Karzinomzellen wie für viele andere Tumorentitäten in der Literatur beschrieben, ein hohes Vorkommen von aktiviertem Nrf2 aufweisen. Dies bestätigt die Befunde von Lister *et al.* (Lister *et al.*, 2011). Das hohe p-Nrf2-Vorkommen ging in unseren Untersuchungen ferner mit einer hohen Proliferationsfähigkeit (Positivität für Ki67) einher. Weitere Untersuchungen sind nötig, die analysieren, welche Überlebensvorteile Nrf2 der Zelle in diesem weit fortgeschrittenen Stadium des PDACs verschafft. Insbesondere sollte die Analyse von p-Nrf2 in PDAC-Geweben an einem größeren Kollektiv erfolgen.

6 Fazit

Nrf2 und TGF- β 1 sind zwei Faktoren, die anti-tumorigene Wirkungen ausüben können und unter physiologischen und akut inflammatorischen Bedingungen zur Zell- und Gewebemöostase beitragen. Eingebunden in präneoplastische Veränderungen können sie jedoch im Zusammenspiel das Überleben und das Zellwachstum transformierter, aber auch bereits prämaligener Zellen begünstigen. Die in dieser Arbeit identifizierte Deregulation aktivierter Signalwege durch die gleichzeitige und dauerhafte Erhöhung von Nrf2 und TGF- β 1 könnte einen fundamentalen Mechanismus repräsentieren, der ihrem funktionalen Wechsel zugrunde liegt. Dieser kann sich zusammengenommen mit den *in situ* Befunden bereits in frühen Stadien der PDAC-Entwicklung und offenbar unabhängig von Makrophagen manifestieren. Die Ergebnisse

dieser Studie tragen damit zu einem besseren Verständnis früher Stadien der PDAC-Entwicklung bei. Das Wechselspiel zwischen Nrf2 und TGF- β 1 könnte auch erklären, weshalb sich therapeutische Strategien, die lediglich einen der Faktoren zum Ziel haben, als weniger effektiv herausgestellt haben. Insbesondere erscheint bei Tumorzellen mit bereits konstitutiv erhöhter Nrf2-Aktivität nicht die Aktivierung sondern vielmehr die Nrf2-Inhibition therapeutisch sinnvoll (Sporn & Liby, 2012; Geismann *et al.*, 2014). Zukünftige Studien müssen untersuchen, ob die gleichzeitige Nutzung von Nrf2 und TGF- β als therapeutische Zielstrukturen in der Behandlung und Chemoprävention hochmaligner Tumoren wie dem PDAC effektiver sein wird.

7 Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8 % eine aggressive und nur schwer zu behandelnde Krankheit, deren Genese bis heute unzureichend verstanden ist. Als eine Ursache wird die dauerhafte Exposition des pankreatischen Gangepithels gegenüber oxidativem Stress diskutiert, wie sie im Rahmen einer chronischen Entzündung besteht. Oxidative Radikale und TGF- β -sezernierende Makrophagen stehen dabei u.a. als Stromakomponenten im Verdacht, an einer entzündungsassoziierten Karzinogenese beteiligt zu sein. Ein intrinsisches Programm der Zelle sichert unter akut inflammatorischen und physiologischen Bedingungen die Redox-Homöostase der Zelle, und kann über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2) das Risiko genotoxischer Ereignisse mindern. Doch in vielen Tumorentitäten, so im PDAC, ist Nrf2 konstitutiv aktiviert und wird mit dessen ausgeprägter Chemoresistenz in Verbindung gebracht. Ein Mechanismus, der zu einer dauerhaft erhöhten Nrf2-Aktivität und verstärkter Proliferationsaktivität pankreatischen Gangepithels führt, ist dabei die Aktivierung des Onkogens *kras*. Aufgrund fehlender Untersuchungen im humanen System, wurden in dieser Arbeit Resektate von Pankreasleiden-freien Individuen und von Patienten mit chronischer Pankreatitis, einem Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC, untersucht. Gesunde Gangepithelien und Vorläuferläsionen des PDAC, sogenannte PanINs, die zu großen Teilen die *kras*-Mutation tragen, wurden dabei immunhistochemisch auf den oxidativen Stressmarker Nrf2 und den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Dabei zeigte sich bereits in Kernen frühester PanIN-Läsionen eine erhöhte Expression von aktiviertem (phosphoryliertem) Nrf2, die mit einer erhöhten Proliferationsaktivität assoziiert war. Mittels eines indirekten Cokulturmodells wurde zudem der Einfluss von Makrophagen auf das Nrf2-Level und das Zellwachstum benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse deuteten wie *in situ* darauf hin,

dass Makrophagen als Stromakomponente in dieser sehr frühen Phase der Tumorgenese eine eher geringe Bedeutung für das Ausmaß der oxidativen Stressantwort (p-Nrf2-Aktivität) und das Wachstumsverhalten prämaligner Pankreasgangepithelzellen zukommt. Da die Nrf2-Expression *in situ* wesentlich ausgeprägter war, wenn es sich um PanIN-Läsionen in chronisch entzündlichem Gewebe handelte, ist zu vermuten, dass der Einfluss des Stromas erst bei persistierender Entzündung oder stärkerer Anreicherung von Makrophagen oder anderen Entzündungszellen größer wird. Folglich scheint die Hochregulierung von Nrf2 auch in humanen Pankreasgangepithelzellen von einer wachsenden inflammatorischen Mikroumgebung und der onkogenen *kras*-Aktivierung vorangetrieben zu werden. Die Wirkung von Nrf2 auf das Wachstumsverhalten pankreatischer Gangepithelzellen wurde darüber hinaus nach Überexpression *in vitro* anhand von Zellzählung, Ki67-Färbung und Westernblot dezidiert betrachtet. Dabei zeigte sich, dass der Effekt von Nrf2 allein gering war, Nrf2 aber die wachstumshemmenden Effekte von TGF- β 1 maßgeblich schwächte. In vielen Tumorentitäten, so im PDAC werden erhöhte Spiegel dieses Zytokins gefunden, das normalerweise ein potenter Wachstumsinhibitor ist, aber in späteren Stadien der Tumorentwicklung eher als ein Tumorpromotor fungiert. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die hohe Expression und Aktivität des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 zu einer Deregulation von TGF- β 1-Signalwegen beiträgt. Insbesondere verstärkte Nrf2 die Aktivierung von Erk und reduzierte die Smad3 und p38-Aktivierung als auch die TGF- β 1-induzierte p21-Expression, was mit einer erhöhten Proliferation von Pankreasgangepithelzellen assoziiert war. Die auf diese Weise von Nrf2 antagonisierte TGF- β 1-Wirkung in benignen und prämaligen Pankreasgangepithelzellen deuten auf einen funktionalen Wechsel von Nrf2 und TGF- β 1 bereits in frühen Phasen der Tumorgenese dar, der das Überleben von noch nicht voll transformierten Zellen begünstigt. Damit liefert diese Studie einen neuartigen Mechanismus, der erklären könnte, weshalb sich therapeutische Strategien, die lediglich einen dieser Faktoren zum Ziel haben, als weniger effektiv herausgestellt haben. Einerseits ist ein chemopräventiver Nutzen einer Nrf2-Aktivierung nur bei einer noch intakten Regulation von Nrf2 zu erwarten. Andererseits erscheint bei Tumorzellen mit bereits konstitutiv erhöhter Nrf2-Aktivität nicht die Aktivierung, sondern vielmehr die Nrf2-Inhibition therapeutisch sinnvoll. Zukünftige Studien müssen untersuchen, ob die gleichzeitige Nutzung von Nrf2 und TGF- β als therapeutische Zielstrukturen in der Behandlung und Chemoprävention hochmaligner Tumoren wie dem PDAC effektiver sein wird.

IV Literaturverzeichnis

- Akhurst, R.J., Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11: 44–51
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53(4): 549–554
- Al Saati, T., Clerc, P., Hanoun, N., Peugeot, S., Lulka, H., Gigoux, V., Capilla, F., Beluchon, B., Couvelard, A., Selves, J., Buscail, L., Carrier, A., Dusetti, N., Dufresne, M. (2013). Oxidative stress induced by inactivation of TP53INP1 cooperates with KrasG12D to initiate and promote pancreatic carcinogenesis in the murine pancreas. *Am J Pathol.* 182(6): 1996–2004. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.034
- Angst, E., Reber, H.A., Hines, O. J., Eibl, G. (2008). Mononuclear cell-derived interleukin-1 beta confers chemo-resistance in pancreatic cancer cells by up-regulation of cyclooxygenase-2. *Surgery*, 144(1): 57–65. doi:10.1016/j.surg.2008.03.024
- Arfmann-Knübel, S., Struck, B., Genrich, G., Helm, O., Sipos, B., Sebens, S., Schäfer, H. (2015). The crosstalk between Nrf2 and TGF- β 1 in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic duct epithelial cells. *PlosOne.* 10(7): e0132978. doi:10.1371/journal.pone.0132978
- Arlt, A., Sebens, S., Krebs, S., Geismann, C., Grossmann, M., Kruse, M.L., Schreiber, S., Schafer, H. (2013). Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene.* 32: 4825–4835. doi:10.1038/onc.2012.493
- Bachem, M.G., Schunemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology.* 128:907–921. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.036
- Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357(9255): 539-545

- Ballehaninna, U.K., Chamberlain, R.S. (2011). Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review. *Indian J Surg Oncol.* 2(2): 88–100. doi:10.1007/s13193-011-0042-1
- Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56, 779–827
- Bartsch, D.K., Kress, R., Sina-Frey, M., Grützmann, R., Gerdes, B., Pilarsky, C., Heise, J. W., Schulte, K.-M., Colombo-Benkmann, M., Schleicher, C., Witzigmann, H., Pridöhl, O., Ghadimi, M.B., Horstmann, O., von Bernstorff, W., Jochimsen, L., Schmidt, J., Eisold, S., Estévez-Schwarz, L., Hahn, S.A., Schulmann, K., Böck, W., Gress, T.M., Zügel, N., Breitschaft, K., Prenzel, K., Messmann, H., Endlicher, E., Schneider, M., Ziegler, A., Schmiegel, W., Schäfer, H., Rothmund, M., Rieder, H. (2004), Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int. J Cancer.* 110: 902–906. doi:10.1002/ijc.20210
- Bartsch D.K., Gress T.M., Langer P. (2012). Familial pancreatic cancer-current knowledge. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9(8):445-53. doi:10.1038/nrgastro.2012.111
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432(7015): 332–337. doi:10.1038/nature03096
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G., Kreipe, H (Hrsg.) (2012): *Pathologie.* München: Urban & Fischer
- Broich, A. (2014). Impact of the K-RAS^{G12V} oncogene on the mutual interplay of pancreatic ductal epithelial cells and monocytic stromal cells. Nicht veröffentlichte Masterarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel
- Brune, K., Abe, T., Canto, M., O'Malley, L., Klein, A. P., Maitra, A., Volkan Adsay, N., Fishman, E.K., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Goggins, M. Hruban, R. H. (2006). Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am J Surg Pathol.* 30(9): 1067–1076
- Canto, M.I., Goggins, M., Hruban, R.H., Fishman, E.K., Axilbund, J.E., Griffin, C.A., Ali, S.Z., Richman, J., Jagannath, S., Kantsevov, S.V., Petersen, G.M., Giardiello, F.M., Kalloo, A.N. (2006). Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4: 766–781
- Choi, H.K., Pokharel, Y.R., Lim, S.C., Han, H.K., Ryu, C.S., Kim, S.K., Kwak, M.K., Kang, K.W. (2009). Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor- β 1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 240(3): 377–384. doi:10.1016/j.taap.2009.07.030
- Choudhury, S., Ghosh, S., Gupta, P., Mukherjee, S., Chattopadhyay, S. (2015). Inflammation-

induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF- κ B and SAPK/JNK pathway. *Free Radic Res.* 49(11): 1371-83. doi: 10.3109/10715762.2015.1075016

Circu, M.L., Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48(6): 749–762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022

Clevers, H. (2004). At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell.* 118(6): 671-674

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. (2011) Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 364(19): 1817-25. doi:10.1056/NEJMoa1011923

DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., Scrimieri, F., Winter, J.M., Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S.E., Blair, I.A. Tuveson, D.A. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 475(7354): 106–109. doi:10.1038/nature10189

Detlefsen, S., Sipos, B., Feyerabend, B., Klöppel, G. (2005). Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia. *Virchows Arch.* 447(5): 800–805

Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (2013). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom Version 1.0. Verfügbar unter http://www.dgvs.de/fileadmin/user_upload/Leitlinien/Exokrines_Pankreaskarzinom/Neu/LL_Pankreas_OL_Langversion.pdf [07.04.2015]

Deutsches Krebsforschungszentrum (2014). Krebsinformationsdienst Bauchspeicheldrüsenkrebs. Verfügbar unter <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs2.php> [03.01.2015]

Dhanasekaran, D.N., Reddy, E.P. (2008). JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene*, 27(48): 6245–6251. doi:10.1038/onc.2008.301

Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C.W., Fingerle, A.A., Dobritz, M., Kleeff, J., Friess, H. (2012). The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9: 454–467

Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A.M., Klöppel, G. (2012). Neue Einblicke in die Entstehung des Pankreaskarzinoms. *Pathologe* 33(2): 189–193. doi:10.1007/s00292-012-1673-x

Evans, A., Costello, E. (2012). The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell

growth and invasion. *Front Physiol.* 3: 270. doi:10.3389/fphys.2012.00270

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat Rev Immunol.* 10(8): 554-567. doi:10.1038/nri2808

Geismann, C., Arlt, A., Sebens, S., Schäfer, H. (2014). Cytoprotection “gone astray”: Nrf2 and its role in cancer. *Onco Targets Ther.* 7: 1497–1518. doi:10.2147/OTT.S36624

Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Kern, S.E. (1998). Genetic alterations of the transforming growth factor β receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58: 5329-5332

Goggins, M., Hruban, R.H., Kern, S.E. (2000). *BRCA2* is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* 156(5): 1767–1771

Han, H., Von Hoff, D.D. (2013). Snapshot: pancreatic cancer. *Cancer Cell.* 23(3): 424–424.e1. doi:10.1016/j.ccr.2013.03.008

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.

Helm, O. (2014): Charakterisierung von Makrophagen im duktalem Pankreasadenokarzinom und ihr Einfluss auf prämaligene und maligne Pankreasgangepithelzellen. Diss., Kiel

Helm, O., Held-Feindt, J., Grage-Griebenow, E., Reiling, N., Ungefroren, H., Vogel, I., Krüger, U., Becker, T., Ebsen, M., Röcken, C., Kabelitz, D., Schäfer, H., Sebens, S. (2014). Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer.* 135(4): 843–861. doi:10.1002/ijc.28736

Helm, O., Mennrich, R., Petrick, D., Goebel, L., Freitag-Wolf, S., Röder, C., Kalthoff, H., Röcken, C., Sipos, B., Kabelitz, D., Schäfer, H., Oberg, H.H., Wesch, D., Sebens, S. (2014). Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE.* 9(5), e94357. doi:10.1371/journal.pone.0094357

Hernández-Muñoz, I., Skoudy, A., Real, F.X., Navarro, P. (2008). Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signaling pathways and stroma contribution. *Pancreatology.* 8(4-5): 462–469. doi:10.1159/000151537

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S.,

- Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 4 (6): 437-450
- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 12(18): 5423–5434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0369
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Klimstra, D., Klöppel, G., Longnecker, D., Lüttges, J., Offerhaus, G.J. (1999). Classification of Duct Lesions in the Pancreas. Verfügbar unter: <http://www.path.jhu.edu/pc/professionals/DuctLesions.php> [12.04.2015]
- Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Klöppel, G., Longnecker, D.S., Lüttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J., Shimizu, M., Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 28(8): 977–987
- Hruban, R.H., Maitra, A., Goggins, M. (2008). Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*. 1(4): 306–316
- Ijichi, H., Chytil, A., Gorska, A.E., Aakre, M.E., Fujitani, Y., Fujitani, S., Wright, C.V., Moses, H.L. (2006). Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression. *Gene Dev*. 20(22): 3147–3160. doi:10.1101/gad.1475506
- Ikushima, H., Miyazono, K. (2010). Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling. *Cancer Sci*. 101(2): 306–312. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01441.x
- Inman, G.J. (2011). Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Genet Dev*. 21(1): 93-99. doi:10.1016/j.gde.2010.12.004
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., Hiraoka, N. (2013). Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Brit J Cancer*. 108(4): 914–923. doi:10.1038/bjc.2013.32
- Jain, A.K., Jaiswal, A.K. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem*. 281: 12132–12142. doi:10.1074/jbc.M511198200

- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 142(4): 730–733.e9. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.042
- Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., Price, T.J., Shepherd, L., Au, H.J., Langer, C., Moore, M.J., Zalberg, J.R. (2010). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 359(17): 1757-1765. doi: 10.1056/NEJMoa0804385
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. (2010). Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 31(1): 90–99. doi:10.1093/carcin/bgp231
- Kim, W.D., Kim, Y.W., Cho, I.J., Lee, C.H., Kim, S.G. (2012). E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *J Cell Sci*. 125(Pt 5): 1284-95. doi:10.1242/jcs.095422
- Kleeff, J., Beckhove, P., Esposito, I., Herzig, S., Huber, P.E., Lohr, J.M., Friess, H. (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer*. 121: 699–705. doi:10.1002/ijc.22871
- Korc, M. (2007). Pancreatic cancer associated stroma production. *Am J Surg*. 194(4): 84–86. doi:10.1016/j.amjsurg.2007.05.004
- Kurahara, H., Shinchi, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., Sakoda, M., Ueno, S., Natsugoe, S., Takao, S. (2011). Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 167(2): 211–219. doi:10.1016/j.jss.2009.05.026
- Leek, R.D., Hunt, N.C., Landers, R.J., Lewis, C.E., Royds, J.A., Harris, A.L. (2000). Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol*. 190:(4) 430–436. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<430::AID-PATH538>3.0.CO;2-6
- Lister, A., Nedjadi, T., Kitteringham, N.R., Campbell, F., Costello, E., Lloyd, B., Copples, I.M., Williams, S., Owen, A., Neoptolemos, J.P., Goldring, C.E., Park, B.K. (2011). Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol Cancer*. 10: 37. doi:10.1186/1476-4598-10-37
- Liou, G.-Y., Döppler, H., DelGiorno, K. E., Zhang, L., Leitges, M., Crawford, H. C., Murphy, M. P., Storz, P. (2016). Mutant Kras-induced mitochondrial oxidative stress in acinar cells upregulates EGFR signaling to drive formation of pancreatic precancerous lesions. *Cell Reports*, 14(10), 2325–2336. doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.029

- Liu, N., Furukawa, T., Kobari, M., Tsao, M.-S. (1998). Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 153(1): 263–269. doi:10.1016/S0002-9440(10)65567-8
- Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie (4. Aufl.). Thieme, Stuttgart
- Lüttges, J., Reinecke-Lüthge, A., Möllmann, B., Menke, M.A., Clemens, A., Klimpfinger, M., Sipos, B., Klöppel, G. (1999). Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch.* 435(5): 461-468
- Lüttges, J., Galehdari, H., Bröcker, V., Schwarte-Waldhoff, I., Henne-Bruns, D., Klöppel, G., Schmiegel, W., Hahn, S.A. (2001). Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 158 (5): 1677-1683
- Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic Cancer. *Annu Rev Pathol.* 3 (157–188). <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305>
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23: 549–55
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23: 344–346. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001
- Massagué, J. (2008). TGF beta in cancer. *Cell* 134: 215–230
- Meulmeester, E., Ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol.* 223(2): 205-218. doi:10.1002/path.2785
- Mielgo, A., Schmid, M.C. (2013). Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep.* 46(3): 131–138. doi:10.5483/BMBRep.2013.46.3.036
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 25: 1960–1966
- Moskaluk, C.A., Hruban, R.H., Kern, S.E. (1997). p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 57: 2140–2143
- Nathan, C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest.* 111(6): 769–778. doi:10.1172/JCI200318174

- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., Falconi, M., Pederzoli, P., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D.J., Büchler, M.W. (2004). A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 350: 1200–1210
- Niture, S.K., Jain, A.K., Jaiswal, A.K. (2009). Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 122(24): 4452–4464. doi:10.1242/jcs.058537
- Niture, S.K., Jaiswal, A.K. (2012). Nrf2 Protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem.* 287(13): 9873–9886. doi:10.1074/jbc.M111.312694
- Niture, S.K., Jaiswal, A.K. (2013). Nrf2-induced anti-apoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radical Bio Med.* 57: 119–131. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.014
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J.T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke C., Fahlke, J., Arning, M.B., Sinn, M., Hinke, A., Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 310 (14): 1473 –1481
- Oh, C.J., Kim, J.-Y., Choi, Y.-K., Kim, H.-J., Jeong, J.-Y., Bae, K.-H., Park, K.G., Lee, I.-K. (2012). Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /smad signaling. *PLoS ONE.* 7(10): e45870. doi:10.1371/journal.pone.0045870
- Okita, Y., Kamoshida, A., Suzuki, H., Itoh, K., Motohashi, H., Igarashi, K., Yamamoto, M., Ogami, T., Koinuma, D., Kato, M. (2013). Transforming growth factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 288(28): 20658–20667. doi:10.1074/jbc.M113.450478
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Beury, D. W., Clements, V. K. (2012). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol.* 22(4): 275–281. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.011
- Ouyang, H., Mou, L., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J., Tsao, M.-S. (2000). Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol.* 157(5): 1623–1631. doi:10.1016/S0002-9440(10)64800-6

- Pickup, M., Novitskiy, S., Moses, H.L. (2013). The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 13(11): 788–799. doi:10.1038/nrc3603
- Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., Grippo, P.J. (2014). TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 106(2): djt369. doi:10.1093/jnci/djt369
- Protti, M. P., De Monte, L. (2013). Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. *Front Physiol*. 4: 210. doi:10.3389/fphys.2013.00210
- Qian, J., Niu, J., Li, M., Chiao, P.J., Tsao, M.S. (2005). *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*. 65:5045–5053. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3208
- Rane, S.G., Lee, J.H., Lin, H.M. (2006). Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth F R*. 17(1- 2): 107-119
- Rolfs, F., Huber, M., Kuehne, A., Kramer, S., Haertel, E., Muzumdar, S., Wagner, J., Tanner Y., Böhm, F., Smola, S., Zamboni, N., Levesque, M.P., Dummer, R., Beer, H.-D., Hohl D., Werner, S., Schäfer, M. (2015). Nrf2 activation promotes keratinocyte survival during early skin carcinogenesis via metabolic alterations. *Cancer Res*. 75(22): 4817-4829. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0614
- Schniewind, B., Groth, S., Sebens-Müerköster, S., Sipos, B., Schäfer, H., Kalthoff, H., Fändrich, F., Ungefroren, H. (2007). Dissecting the role of TGF- β type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function. *Oncogene*. 26: 4850–4862
- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182: 311–322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003) 182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- Sebens, S., Bauer, I., Geismann, C., Grage-Griebenow, E., Ehlers, S., Kruse, M.-L., Arlt, A., Schäfer, H. (2011). Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *J Biol Chem*. 286(47): 40911–40921. doi:10.1074/jbc.M111.274902
- Seufferlein, T., Porzner, M., Heinemann, V., Tannapfel, A., Stuschke, M., Uhl, W. (2014). Ductal pancreatic adenocarcinoma: surgery, pathology work-up, and neoadjuvant, adjuvant, and palliative treatments. *Deutsches Ärzteblatt International*. 111(22): 396–402. doi:10.3238/arztebl.2014.0396

- Shelton, P., Jaiswal, A.K. (2013). The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* 27(2): 414–423. doi:10.1096/fj.12-217257
- Shen, H., Yang, Y., Xia, S., Rao, B., Zhang, J., Wang, J. (2014). Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment. *Dis Esophagus.* 27: 685-92. doi:10.1111/dote.12124
- Shi, Y., Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113(6): 685–700
- Shi, C., Washington, M.K., Chaturvedi, R., Drosos, Y., Revetta, F.L., Weaver, C.J., Buzhardt, E., Yull, F.E., Blackwell, T.S., Sosa-Pineda, B., Whitehead, R.H., Beauchamp, R.D., Wilson, K.T., Means, A.L. (2014). Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction. *Lab Invest.* 94(4): 409–421. doi:10.1038/labinvest.2014.10
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 42: 717– 727. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.003
- Sipos, B., Frank, S., Gress, T., Hahn, S., Klöppel, G. (2009). Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 9 (1-2): 45-54. doi:10.1159/000178874
- Sporn, M.B., Liby, K T. (2012). Nrf2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 12(8). doi:10.1038/nrc3278
- Stachel, I., Geismann, C., Aden, K., Deisinger, F., Rosenstiel, P., Schreiber, S., Sebens, S., Arlt, A., Schäfer, H. (2014). Modulation of nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activation by the stress response gene immediate early response-3 (IER3) in colonic epithelial cells: a novel mechanism of cellular adaptation to inflammatory stress. *J Biol Chem.* 289(4): 1917–1929. doi:10.1074/jbc.M113.490920
- Ungefroren, H., Sebens, S., Groth, S., Gieseler, F., Fändrich, F. (2011). Differential roles of Src in transforming growth factor- β regulation of growth arrest, epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 38: 797–805. doi:10.3892/ijo.2011.897
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(13): 4560–4565. doi:10.1073/pnas.0400983101
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin,

- S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R.K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J., Renschler, M.F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 369: 1691-1703
- Wang-Gillam, A., Li, C.-P., Bodoky, G., Dean, A., Shan, Y.-S., Jameson, G., Macarulla, T., Lee, K.-H., Cunningham, D., Blanc, J.F., Hubner, R.A., Chiu, C.-F., Schwartzmann, G., Siveke, J.T., Braiteh, F., Moyo, V., Belanger, B., Dhindsa, N. Bayever, E., von Hoff, D. Chen, L.-T. (2016). Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 387: 545 - 557
- Wattenberg, L.W. (1972). Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin. *J Natl Cancer Inst.* 48: 1425–1430
- Whiteside, T. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 27(45): 5904–5912. doi:10.1038/onc.2008.271
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut und GEKID (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012, in Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Vol. 10. Verfügbar unter http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile [19.03.2016]
- Zhang, L., Wang, N., Zhou, S., Ye, W., Jing, G., Zhang, M. (2012). Propofol induces proliferation and invasion of gallbladder cancer cells through activation of Nrf2. *J Exp Clin Cancer Res.* 31(1): 66. doi:10.1186/1756-9966-31-66
- Zoja, C., Benigni, A., Remuzzi, G. (2014). The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 29 (Suppl 1): 19–24

V Anhang

Scoring-Ergebnisse der Färbungen der Pankreasleiden-freien Präparate											
(eigene Erhebung)											
	Marker	p-Nrf2					Ki67				
	Gangepithel	gesund		PanIN			gesund		PanIN		
Nr.	Lokalisation (im Pankreas)	%-Score (MW)	dichotomisiert	%-Score (MW)	dichotomisiert		%-Score (MW)	dichotomisiert	%-Score (MW)	dichotomisiert	
1	125	1	2	1	2	1	0	1	1	2	1
2	368	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1
3	14	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2
4	56	0	1	2	2	2	1	2	2	2	2
5	358	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
6	234	1	2	0	1	n.b.	1	2	2	2	2
7	467	0	1	2	2	2	1	2	2	2	2
8	12	0	1	2	2	2	1	2	1	2	1
9	5	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	1	2	n.e.	n.e.	n.e.
10	12345678	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
11	12345678	0	1	0	1	n.b.	0	1	n.e.	n.e.	n.e.
12	168	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
13	4	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
14	23	0	1	1	2	1	1	2	1	2	1
15	237	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
16	48	0	1	0	1	n.b.	0	1	1	2	1
17	12345678	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
18	567	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
19	678	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
20	8	0	1	n.e.	n.e.	n.e.	1	2	n.e.	n.e.	n.e.
21	2	0	1	1	2	1	0	1	1	2	1
22	24	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1
Anzahl Score 0	16 (21)	für Gruppenvergleich 0 vs. 1 0 vs. 2		3 (20)	für Gruppenvergleich 0 vs. 1	für Gruppenvergleich 1 vs. 2	12 (22)	für Gruppenvergleich 0 vs. 1 0 vs. 2	0 (19)	für Gruppenvergleich 0 vs. 1	für Gruppenvergleich 1 vs. 2
Anzahl Score 1	5 (21)			13 (20)			10 (22)		15 (19)		
Anzahl Score 2	0 (21)			4 (20)			0 (22)		4 (19)		
Anzahl Score 3	0 (21)			0 (20)			0 (22)		0 (19)		
Anzahl Score 4	0 (21)			0 (20)			0 (22)		0 (19)		
Zuordnung (Score → Merkmal)		0 → 1 1-4 → 2		0 → 1 1-4 → 2	1 → 1 2-4 → 2		0 → 1 1-4 → 2		0 → 1 1-4 → 2	1 → 1 2-4 → 2	
Anzahl Merkmal 1		16 (21)		3 (20)	14 (18)		12 (22)		0 (19)	15 (19)	
Anzahl Merkmal 2		5 (21)		17 (20)	4 (18)		10 (22)		19 (19)	4 (19)	

Scoring-Ergebnisse der Färbungen der Pankreasleiden-freien Präparate

(Erhebung durch A.Broich)

	Marker	CD68				HLA-DR				CD163			
	Gangepithel	gesund		PanIN		gesund		PanIN		gesund		PanIN	
Nr.	Lokalisation (im Pankreas)	Anzahl (abs.)	dichotomisiert	Anzahl (abs.)	dichotomisiert	Anzahl (% von CD68)	dichotomisiert	Anzahl (% von CD68)	dichotomisiert	Anzahl (% von CD68)	dichotomisiert	Anzahl (% von CD68)	dichotomisiert
1	1	30	2	n.e.	n.e.	43	2	n.e.	n.e.	94	1	n.e.	n.e.
2	3	14	1	22	2	28	1	16	1	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
3	1	17	2	17	2	33	1	19	1	89	1	76	1
4	5	11	1	8	1	0	1	13	1	97	2	63	1
5	5	11	1	5	1	41	1	31	1	82	1	100	2
6	2	18	2	17	2	96	2	92	2	95	2	92	1
7	2	13	1	15	1	60	2	47	2	93	1	97	2
8	1	18	2	n.e.	n.e.	23	1	n.e.	n.e.	100	2	n.e.	n.e.
9	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
10	8	17	2	n.e.	n.e.	66	2	n.e.	n.e.	96	2	n.e.	n.e.
11	6	17	2	n.e.	n.e.	85	2	n.e.	n.e.	100	2	n.e.	n.e.
12	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
13	4	24	2	22	2	34	1	77	2	84	1	73	1
14	3	14	1	20	2	37	1	54	2	100	2	100	2
15	2	17	2	10	1	46	2	10	1	100	1	100	2
16	4	20	2	27	2	91	2	86	2	84	1	97	2
17	2	20	2	n.e.	n.e.	93	2	n.e.	n.e.	100	1	n.e.	n.e.
18	5	15	1	19	2	54	2	21	1	68	1	74	1
19	7	8	1	7	1	3	1	5	1	96	2	69	1
20	8	15	1	n.e.	n.e.	66	2	n.e.	n.e.	78	1	n.e.	n.e.
21	2	21	2	16	1	15	1	53	2	75	1	88	1
22	4	16	1	6	1	9	1	90	2	97	2	93	1
Median		17		17		42		39		95		84	
Zuordnung (Anzahl → Merkmal)		0-16 → 1 ≥ 17 → 2		0-16 → 1 ≥ 17 → 2		0-41 → 1 ≥ 42 → 2		0-38 → 1 ≥ 39 → 2		0-94 → 1 ≥ 95 → 2		0-83 → 1 ≥ 84 → 2	
Anzahl Merkmal 1		10 (20)		7 (14)		10 (20)		7 (14)		11 (19)		8 (13)	
Anzahl Merkmal 2		10 (20)		7 (14)		10 (20)		7 (14)		8 (19)		5 (13)	

Scoring-Ergebnisse der Färbungen der CP-Präparate
(p-Nrf2: eigene Erhebung; Ki67, CD68, HLA-DR, CD163: Erhebung durch O.Helm)

Marker	p-Nrf2			Ki67			CD68	HLA-DR		CD163
	CP-Präparat-Nr.	%-Score (MW)	dichotomisiert	%-Score (MW)	dichotomisiert		%-Score vom Gesamtstroma	%-Score von CD68	dichotomisiert	%-Score von CD68
1	2	2	2	n.e.	n.e.	n.e.	1	1	2	1
2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2
3	3	2	2	1	2	1	1	1	2	1
4	3	2	2	1	2	1	2	1	2	2
5	3	2	2	1	2	1	2	2	2	2
6	3	2	2	1	2	1	1	1	2	1
7	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1
8	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	2	0	1	2
9	4	2	2	1	2	1	2	0	1	2
10	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2
11	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2
12	0	1	n.b.	1	2	1	2	1	2	2
13	3	2	2	2	2	2	2	1	2	2
14	n.e.	n.e.	n.e.	1	2	1	2	1	2	2
Anzahl Score 0	1 (12)	für Gruppenvergleich 0 vs. 2	für Gruppenvergleich 1 vs. 2	0 (12)	für Gruppenvergleich 0 vs. 2	für Gruppenvergleich 1 vs. 2	0 (14)	2 (14)	für Gruppenvergleich 0 vs. 2 und 1 vs. 2	0 (14)
Anzahl Score 1	3 (12)			11 (12)			4 (14)	10 (14)		4 (14)
Anzahl Score 2	2 (12)			1 (12)			10 (14)	2 (14)		10 (14)
Anzahl Score 3	5 (12)			0 (12)			0 (14)	0 (14)		0 (14)
Anzahl Score 4	1 (12)			0 (12)			0 (14)	0 (14)		0 (14)
Zuordnung (Score → Merkmal)		0 → 1 1-4 → 2	1 → 1 2-4 → 2		0 → 1 1-4 → 2	1 → 1 2-4 → 2	nicht erforderlich		0 → 1 1-4 → 2	nicht erforderlich
Anzahl Merkmal 1		1 (12)	4 (11)		0 (12)	11 (12)	4 (14)		2 (14)	4 (14)
Anzahl Merkmal 2		11 (12)	8 (11)		12 (12)	1 (12)	10 (14)		12 (14)	10 (14)

Danksagung

Frau Professor Susanne Sebens danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, insbesondere für das experimentelle Konzept, die fachliche Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse und den Leitfaden für die Zusammenstellung der Arbeit. Ich wertschätze es sehr, bei Frau Prof. Susanne Sebens Doktorandin gewesen sein zu können und bin dankbar für ihre immer zeitnahe Ansprechbarkeit, ihre unterstützenden und motivierenden Worte als auch für die gute Arbeitsatmosphäre und Geselligkeit innerhalb der Arbeitsgruppe.

Herrn Professor Andreas Koch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Kollegen Dagmar Leisner, Dr. Ole Helm, Lennart Lenk, Anna Broich, Maren Pein und Lisa Goebel danke ich herzlich für die Einarbeitung und Anleitung im Labor, für die persönliche Stütze bei Hindernissen und die positive Stimmung insgesamt. Mein besonderer Dank gilt Lennart Lenk für die Hilfe bei der Erstellung der Grafiken und die Korrekturvorschläge bei der Fertigstellung.

Dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der Eberhard Karls Universität Tübingen und Prof. Dr. Bence Sipos danke ich für die Bereitstellung der pankreatischen Gewebe.

Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel um Christoph Röcken und Sandra Krüger danke ich für die Bereitstellung der PDAC-Präparate und die immunhistochemischen Färbungen.

Erika Kaltenhäuser, Christina Trabant und Stefan Ehlers danke ich für die Isolation und Bereitstellung der Monozyten.

Dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik, insbesondere Frau Dr. Sandra Freitag-Wolf danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Herzlich danke ich auch Monika Gutte, Simon Grotelüschen und meiner Familie, die auf meinem langen Ausbildungsweg immer hinter mir standen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema "Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor (Nrf2) in der frühen Phase der pankreatischen Karzinogenese" eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuer in der AG Inflammatorische Karzinogenese, Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH 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.

Kiel, 20.01.2017

Nora Geeske Brigitte Genrich

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Nora Geeske Brigitte Genrich
Geburtsdatum/-ort 14.04.1985 in Hildesheim
Nationalität deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

08/ 1998 – 06/ 2004 Schulbesuch am Gymnasium Michelsenschule Hildesheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/ 2005 - 01/ 2010 Studium für das Lehramt an Gymnasien für Mathematik & Sport an der
Universität Rostock; Abschluss: Erstes Staatsexamen
Examensarbeit am Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Medizinischen
Fakultät, AG Vegetative Physiologie. Thema: *Experimentelle Untersuchungen
zur rhythmischen Spontanaktivität glatter Muskulatur*

10/ 2010 – 11/ 2016 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Praktisches Jahr: Asklepios Klinikum Harburg (Innere Medizin); Asklepios
Westklinikum Hamburg (Chirurgie); UKSH Kiel (Pädiatrie)
Abschluss: Ärztliche Prüfung

23.11.2016 Approbation als Ärztin

10/ 2013 – 02/ 2017 Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für
Experimentelle Tumorforschung, AG Inflammatorische Karzinogenese
Titel der Doktorarbeit: *Untersuchungen zur Rolle des Transkriptions
faktors Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor (Nrf2) in der frühen
Phase der pankreatischen Karzinogenese*

09.04.2018 Mündliche Promotionsprüfung

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten & Kongressbeiträge

- Noack, T., Genrich, G., Patejdl, R. (2009).. Transversal coordination of spontaneous activity in smooth muscle. *Acta physiol.* 2009; Volume 195, Supplement 669 :P383 (zitabler Kongressbeitrag)
- 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.* 52(168). doi:10.1055/s-0034-1386190 (Originalarbeit & zitabler Kongressbeitrag)
- Goebel, L., Grage-Griebenow, E., Gorys, A., Helm, O., Genrich, G., Lenk, L., Wesch, D., Ungefroren, H., Freitag-Wolf, S., Sipos, B., Röcken, C., Schäfer, H., Sebens, S. (2015). CD4+ T cells potently induce epithelial-mesenchymal-transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells – novel implications of CD4+ T cells in pancreatic cancer development. *Oncoimmunology.* 4(4): e1000083. doi:10.1080/2162402X.2014.1000083
- Arfmann-Knübel, S., Struck, B., Genrich, G., Helm, O., Sipos, B., Sebens, S., & Schäfer, H. (2015). The crosstalk between Nrf2 and TGF- β 1 in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic duct epithelial cells. *PlosOne.* 10(7): e0132978. doi:10.1371/journal.pone.0132978
- 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- β 1 mediated growth inhibition of pancreatic ductal epithelial cells -Nrf2 as determinant of pro-tumorigenic functions of TGF- β 1. *BMC Cancer.* 16: 155. doi: 10.1186/s12885-016-2191-7