

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Jakob R. Izbicki

Einfluss der Parakaspase MALT1 auf die nukleäre Translokation der NF- κ B-Untereinheit c-Rel bei Pankreaskarzinomzellen

Dissertation

Dissertation zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von Johanna Lüddeke
aus Bad Oldesloe

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 09.03.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jakob Izbicki

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Das Pankreas - Anatomie, Funktion und Histologie	3
2.2	Das Pankreaskarzinom	4
2.2.1	Epidemiologie	4
2.2.2	Risikofaktoren	5
2.2.3	Therapie.....	5
2.2.4	Tumorwachstum	6
2.2.5	Histologie	7
2.2.6	Klassifikation und Einteilung in Tumorgade	8
2.2.7	Diagnostik und Tumormarker.....	10
2.2.8	Pathogenese.....	10
2.3	Nuclear Factor- κ B.....	11
2.3.1	Mechanismen der NF- κ B Aktivierung.....	12
2.3.2	Die c-Rel Subfamilie	14
2.4	MALT1 und der CBM-Komplex.....	17
2.4.1	MALT1-Expression in Pankreaskarzinomzellen und in normalem Pankreasgewebe	19
2.4.2	Medikamente zur Inhibierung von MALT1	19
2.5	Laborchemische Methoden	20
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Geräte.....	22
3.1.2	Software.....	23
3.1.3	Gebrauchsmaterial.....	23
3.1.4	Zelllinien.....	24

3.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	24
3.1.6	Chemikalien	25
3.1.7	Antikörper.....	25
3.1.8	Medikamente	26
3.2	Puffer und Lösungen	26
3.3	Methoden	28
3.3.1	Zellkultur	28
3.3.2	Zellzählung.....	29
3.3.3	MALT1-Aktivitätsassay	29
3.3.4	Kern- und Zytoplasmafraktionierung	30
3.3.5	BCA-Proteinassay.....	31
3.3.6	SDS-PAGE	32
3.3.7	Immundetektion von Proteinen per Western Blot.....	32
3.3.8	Densitometrie.....	33
3.3.9	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Analyse der proteolytischen MALT1-Aktivität	34
4.1.1	MALT1-Aktivität nach zweistündiger Behandlungsdauer und nach 24-stündiger Behandlungsdauer in der Zelllinie Panc-1.....	35
4.1.2	MALT1-Aktivität nach zweistündiger Behandlungsdauer und nach 24-stündiger Behandlungsdauer in der Zelllinie L3.6pl Res.....	36
4.2	Nachweis von c-Rel im Nukleus	38
4.2.1	C-Rel Quantität in der Zelllinie Panc-1 nach 48, 24 und drei Stunden Behandlungsdauer.....	38
4.2.2	C-Rel Quantität nach 15 Minuten Behandlungsdauer der Zelllinie Panc-1	41
4.2.3	C-Rel Quantität nach 15 Minuten Behandlungsdauer der Zelllinie L3.6pl Res.....	42
5	Diskussion.....	43

5.1	Einfluss der NF- κ B-Subfamilie c-Rel auf die Apoptose von Tumorzellen	43
5.2	MALT1-c-Rel-Interaktion	44
5.2.1	MALT1 Aktivität.....	45
5.2.2	C-Rel Kerntranslokation.....	45
5.2.3	Kein nachweisbarer Effekt nach Behandlungszeiten von 48, 24 und drei Stunden.....	46
5.2.4	Positiver Effekt nach einer Behandlungsdauer von 15 Minuten	46
6	Zusammenfassung	48
7	Summary	51
8	Abkürzungsverzeichnis.....	54
9	Referenzen.....	56
10	Danksagung	62
11	Lebenslauf.....	63
12	Eidesstattliche Erklärung	64

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Tumorerkrankungen und die vierthäufigste Krebstodesursache in den westlichen Ländern. Wegen seiner hohen Letalität durch spätes Auftreten von Symptomen sind innovative und zielgerichtete Therapien notwendig. Hierbei könnte die Inhibierung der Parakaspase mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation Protein 1 (MALT1) und die daraus folgende verminderte Translokation des Protoonkogens c-Rel in den Zellkern eine Bedeutung haben. Nachweislich spielt c-Rel eine wichtige Rolle in der Proliferation und Antiapoptose von Zellen und somit auch für die Entstehung von lymphogenen und soliden Tumoren wie dem Pankreaskarzinom. In Studien mit B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die BCR-vermittelte Translokation von c-Rel in den Zellkern von MALT1 induziert wird.

Das Ziel dieser Arbeit ist es den Zusammenhang zwischen c-Rel und MALT1 auch im Umkehrschluss aufzuzeigen: Transloziert weniger c-Rel in den Zellkern, wenn MALT1 gehemmt ist?

Außerdem soll in dieser Arbeit die Wirksamkeit der MALT1-inhibierenden Medikamente Mepazin und Biperiden für das Pankreaskarzinom untersucht werden. Insbesondere vor dem Hintergrund der häufigen Resistenz der Pankreastumoren gegen Chemotherapeutika werden die Versuche zusätzlich an einer Gemcitabin resistenten Zelllinie durchgeführt.

Der vereinfachte c-Rel Signalweg und das experimentelle Konzept dieser Arbeit sind in Abbildung 1 dargestellt.

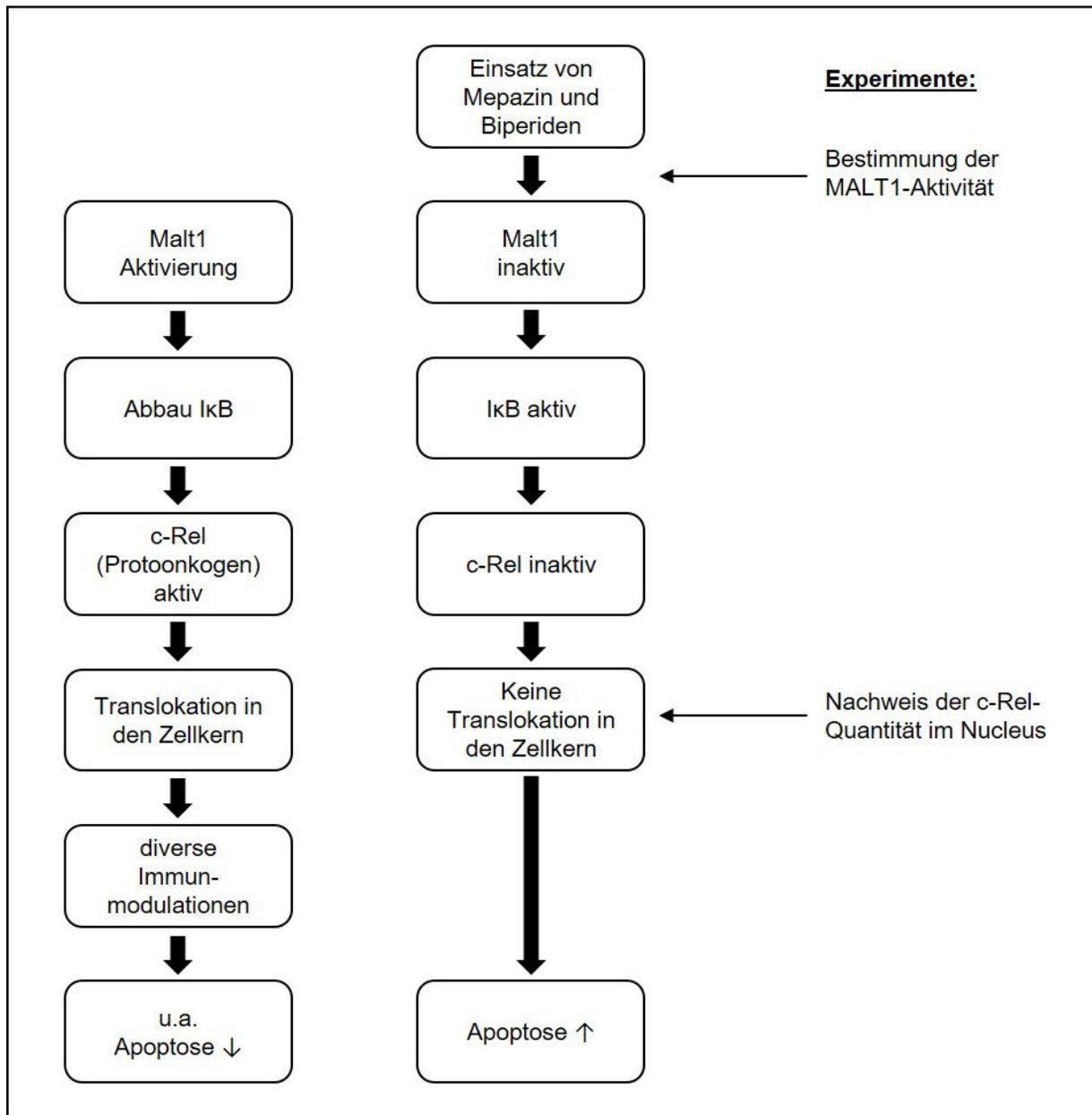


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des c-Rel Signalweges und experimentelles Konzept

2 Einleitung

2.1 Das Pankreas - Anatomie, Funktion und Histologie

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) wurde vermutlich erstmals beschrieben zwischen 335 und 280 vor Christus von dem griechischen Chirurgen und Anatom Herophilus, auch bezeichnet als „Vater der Anatomie“ (Howard u. Hess, 2012). Das Pankreas liegt sekundär retroperitoneal im mittleren Oberbauch zwischen dem Magen und den großen Bauchgefäßen auf der Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbels und besteht aus drei Teilen. Der Kopf (Caput pancreatis) liegt direkt am Pars descendens des Duodenums und geht in den Körper (Corpus pancreatis) über, der Schwanz (Cauda pancreatis) liegt vor der linken Niere und endet am Milzhilus (Lippert, 2011; Paulsen u. Waschke, 2010).

Es hat sowohl exokrine als auch endokrine Drüsenanteile, wobei der exokrine Teil mittels der acinären Drüsenendstücke Verdauungsenzyme produziert, die dann über den Ductus pancreaticus (D. Wirsungianus) zusammen mit dem Ductus choledochus im Bereich der Papilla Vateri in das Darmlumen abgegeben werden und dort Nahrungsbestandteile wie Kohlenhydrate, Lipide und Proteine aufspalten. Besonders im Schwanzteil des Pankreas befinden sich die sogenannten Langerhans-Inseln, diese bilden den endokrinen Anteil. Unter anderem werden die für die Regulierung des Blutzuckerspiegels essentiellen Hormone Glucagon und Insulin hier gebildet (Paulsen u. Waschke, 2010).

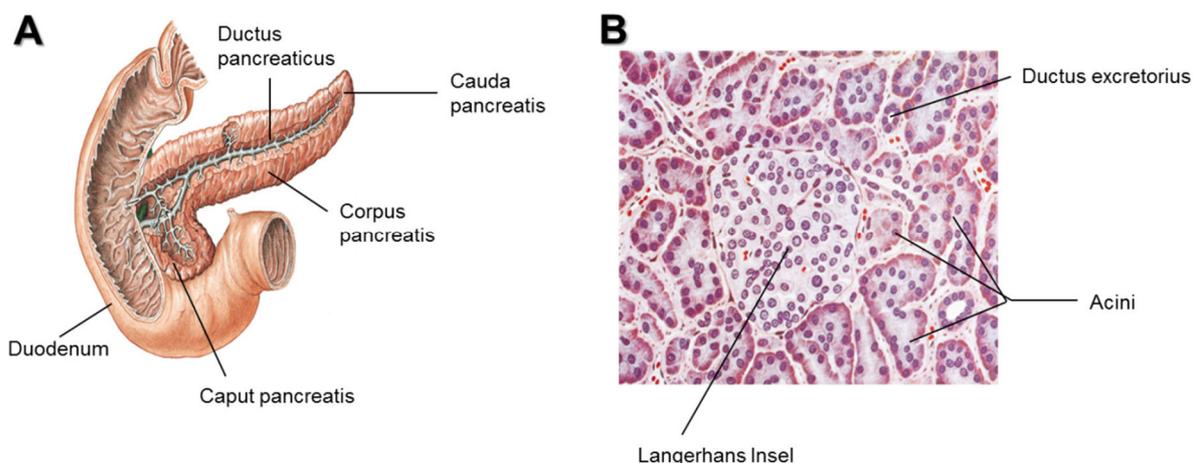


Abbildung 2: A) Darstellung des Pankreas und der umliegenden Strukturen B) Histologische Darstellung des Pankreas
Quelle: (Paulsen u. Waschke, 2010)

2.2 Das Pankreaskarzinom

2.2.1 Epidemiologie

Im Jahre 2012 verstarben 16.120 Menschen in Deutschland und ca. 330.000 Menschen weltweit an einem Pankreaskarzinom (Caspritz et al., 2015; Haberland et al., 2012). Patienten mit Pankreaskarzinom zeigen im frühen Stadium oft nur unspezifische, häufig aber auch gar keine Symptome, daher wird es meist erst in späten Stadien diagnostiziert und kann dann nur noch palliativ behandelt werden. Laut Robert Koch Institut ist es die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Auch das Verhältnis von Inzidenz zu Mortalität (im Jahr 2012 16.700 zu 16.120) dieser Tumorentität sprechen für seine hohe Letalität. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3 dargestellt. Die absolute fünf-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom lag in Deutschland 2012 für Männer bei 8 % und für Frauen bei 9 % (Caspritz et al., 2015). Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren. Es handelt sich also um eine Tumorerkrankung, die erst im fortgeschrittenen Alter auftritt. Caspritz et al. (2015) gehen davon aus, dass im Zuge der steigenden Lebenserwartung mit einem Anstieg von Inzidenz und Mortalität dieser Erkrankung zu rechnen ist.

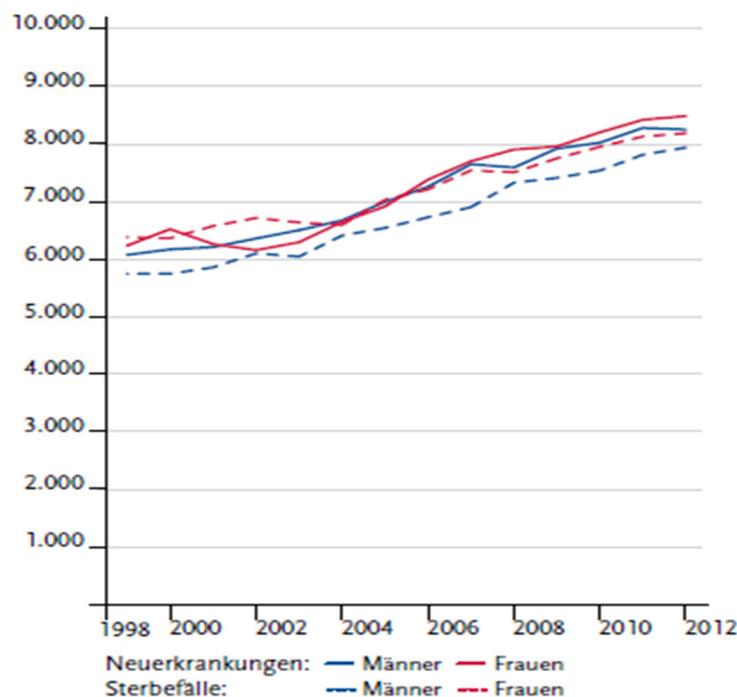


Abbildung 3: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht. Deutschland 1999-2012
Quelle: (Caspritz et al., 2015)

2.2.2 Risikofaktoren

Ein gesicherter Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist der Tabakkonsum. Laut Schulte (2013) verdoppelt sich hierdurch das Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, wobei bereits Passivrauchen die Tumorentstehung begünstigt. Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und chronische Pankreatitis sind ebenfalls als Risikofaktoren bekannt. Laut Schulte (2013) scheint das Risiko bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis sogar 70-fach erhöht, was einem Lebenszeitrisko von 40-55% entspricht.

Auch ein vermehrter Genuss von Alkohol erhöht das Erkrankungsrisiko um 22% (Schulte, 2013). Als weitere Risikofaktoren gelten der häufige Verzehr von verarbeiteten Fleischwaren sowie der von geräucherten oder gegrillten Speisen. Auch genetische Faktoren sind als prädisponierend anerkannt, das heißt, Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem Pankreaskarzinom haben ein erhöhtes Risiko ebenfalls zu erkranken, wobei hier noch unklar ist, ob gemeinsame Erbanlagen oder ein gemeinsamer Lebensstil dafür verantwortlich sind (Caspritz et al., 2015).

Weitere genetisch bedingte Erkrankungen, wie das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), das Louis-Bar-Syndrom (Ataxia teleangiectatica), das Peutz-Jeghers Syndrom und der familiäre Brustkrebs können die Entstehung des Pankreaskarzinoms begünstigen (Herold, 2013).

Möglicherweise spielt auch der Kontakt mit Pestiziden, Herbiziden und Fungiziden eine Rolle und auch die Exposition gegenüber chlorierten Kohlenwasserstoffen, Chrom und Chromverbindungen und Kraftstoffdämpfen kann das Erkrankungsrisiko erhöhen (Caspritz et al., 2015).

2.2.3 Therapie

Eine radikale Tumoresektion (R0) mit anschließender adjuvanter Chemotherapie, zum Beispiel mit Gemcitabin, bietet den Betroffenen nach aktueller Studienlage die beste Prognose. Allerdings ist sie aufgrund des meist fortgeschrittenen Tumorwachstums nur bei 15% der Patienten überhaupt möglich (Herold, 2013).

Für die primär nicht operablen Fälle wird eine neoadjuvante Radiochemotherapie empfohlen, um den Tumor zu verkleinern und so eine chirurgische Entfernung zu ermöglichen. Bei Inoperabilität oder Metastasierung ist nur noch eine palliative Therapie möglich (Herold, 2013).

Aber nicht nur die Tumorgroße stellt ein Problem in der Therapie des Pankreaskarzinoms dar, sondern auch die Tatsache, dass viele dieser Tumoren resistent gegenüber Gemcitabin sind (Akada et al., 2005; Fryer et al., 2011). Derzeit gibt es viele Studien, in denen versucht wird die therapeutische Wirksamkeit von Gemcitabin zu verbessern. In diesem Zusammenhang wurden bereits zahlreiche randomisierte Studien durchgeführt, wo die Wirksamkeit von Gemcitabin in der Kombination mit einem zweiten zytotoxisch wirkenden Medikament getestet wurde.

Die Kombinationspartner waren Platinanaloga, Flouropirimidin, Topoisomeraseblocker und Folsäureantagonisten. Während sich in manchen Studien durch die Kombinationstherapie eine Verbesserung in der objektiven Ansprechrates und in dem progressionsfreien Survival zeigte, blieben die meisten Studien in Bezug auf eine verlängerte Lebenszeit ohne statistische Signifikanz (Geismann et al., 2014; Heinemann et al., 2008).

Trotz des medizinischen Fortschritts liegt das fünf-Jahres-Überleben bei Patienten mit therapiertem Pankreaskarzinom weltweit bei ca. 5% (Hidalgo, 2010).

2.2.4 Tumorwachstum

Die meisten Pankreaskarzinome gehen vom Gewebe des exokrinen Pankreas aus und werden als pankreatische duktales Adenokarzinome (PDAC) bezeichnet (Herold, 2013). Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) sind die nichtinvasiven Vorstufen aus denen das PDAC entstehen kann. Es gibt drei PanIN-Grade, wobei PanIN I noch in A und B unterteilt wird. PanIN IA und IB sowie PanIN II haben kaum bzw. nur gering malignes Potential. Diese Art der Läsionen ist auch im pankreatischen Normalgewebe zu finden. Von PanIN III, welche in Abbildung 4A dargestellt ist, geht jedoch ein erhöhtes Entartungsrisiko aus (Biankin et al., 2003; Goepfert u. Bergmann, 2015; Hruban et al., 2004).

Das PDAC befindet sich bei 75% der Betroffenen am Pankreaskopf, bei 15-20% am Korpus und bei 5-10% am Pankreasschwanz (Sahora et al., 2008), die gesamte Bauchspeicheldrüse ist in 5-15% der Fälle betroffen.

Eine frühe lymphatische und hämatogene Metastasierung ist vermehrt in Leber, regionären Lymphknoten und Lunge zu finden (Herold, 2013; Löhr et al., 2003), bei 75% der resezierten PDAC zeigen sich Lymphknotenmetastasen (Goeppert u. Bergmann, 2015). Auch angrenzendes Fettgewebe, Duodenalwand, distale Gallengänge und Gefäße sind oft infiltriert (Goeppert u. Bergmann, 2015; Löhr et al., 2003). Es zeigt sich also ein organüberschreitendes Tumorwachstum (Esposito et al., 2008).

Makroskopisch erscheinen PDAC als derbe, unscharf begrenzte Tumoren mit weiß-gelblicher Schnittfläche, meist ohne ausgeprägte Nekrosen.

Weitere, seltenere Erscheinungsformen des Pankreaskarzinoms sind Azinuszellkarzinome und neuroendokrine Tumore (Seufferlein et al., 2012).

2.2.5 Histologie

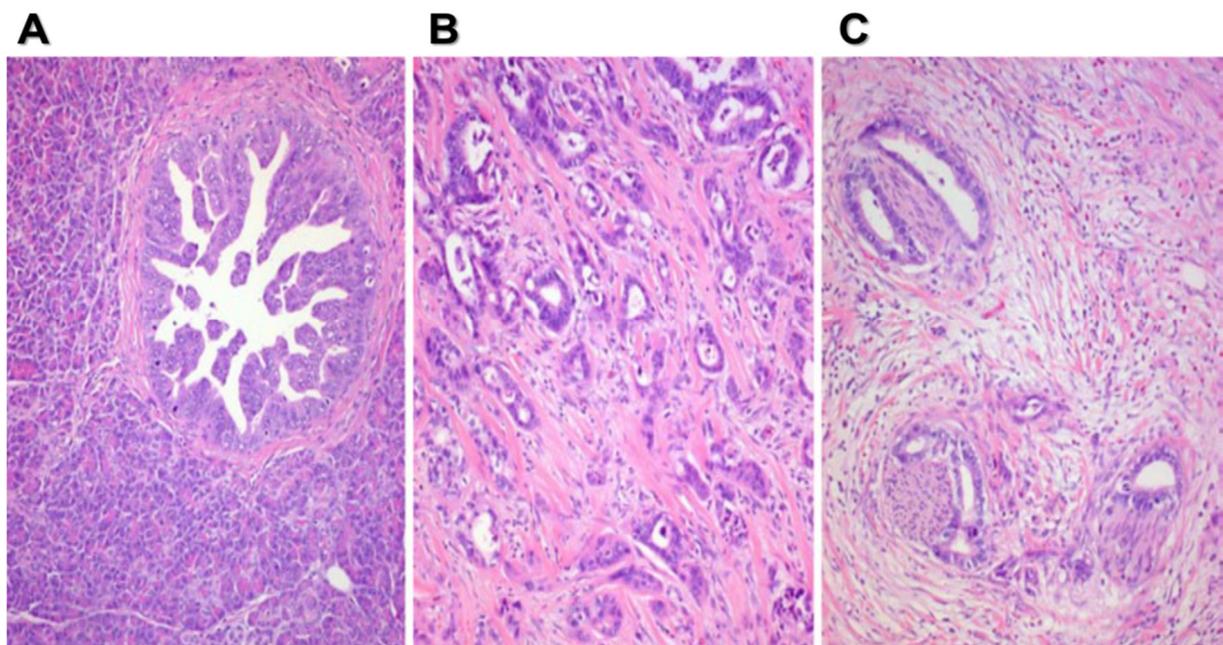


Abbildung 4: Histomorphologie von Pankreaskarzinomvorstufen und PDAC. A) PanIN III. B) PDAC mit unregelmäßig angeordneten atypischen Epithelien innerhalb desmoplastischen Stromas. C) Nervenscheideninfiltration eines PDAC.
Quelle: (Goeppert u. Bergmann, 2015)

Ein Großteil der pankreatischen duktaalen Adenokarzinome ist zunächst noch vergleichsweise gut bis mäßig differenziert. Diese Tumoren wachsen glandulär und produzieren viel Muzin.

Je weiter die Erkrankung fortgeschritten ist, desto mehr histologisch atypische, wenig differenzierte Drüsenstrukturen mit abnehmender Sekretbildung sind im Präparat zu finden. Auffällig bei dieser Tumorart ist vor allem auch eine starke desmoplastische Stromareaktion, die mit der Bildung von fibrotischem Gewebe einhergeht (Gilbert u. Mishra, 2006; Löhr et al., 2003).

Ebenfalls charakteristisch ist der mikroskopische Nachweis einer Nervenscheideninfiltration, die oft weit jenseits der eigentlichen Tumormasse einen wesentlichen Faktor der lokalen Tumorausbreitung darstellt. Die desmoplastische Stromareaktion und die Nervenscheideninfiltration sind in Abbildung 4B beziehungsweise Abbildung 4C gezeigt. Es finden sich außerdem häufig tumoröse Lymphspalten- oder Blutgefäßeinbrüche. (Goeppert u. Bergmann, 2015).

2.2.6 Klassifikation und Einteilung in Tumorgrade

Die Klassifikation der Tumorausdehnung erfolgt nach TNM-Stadien gemäß Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Grundlage dafür ist die Primärtumorausbreitung, der regionale Lymphknotenstatus und das Vorhandensein von Fernmetasten. Anhand dieser Klassifikation lässt sich der Tumor in verschiedene Stadien gruppieren (Tabelle 1 und Tabelle 2).

Zur Einteilung in drei festgelegte Tumorgrade wird die glanduläre Differenzierung, die Muzinproduktion, die Anzahl an Mitosen und die Kernveränderungen berücksichtigt (siehe Tabelle 3) (Lüttges et al., 2000).

Die Klassifikation und die Einteilung in Tumorgrade ermöglichen prognostische Aussagen und unterstützen Entscheidungen über weitere Behandlungsregimes.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Pankreaskarzinome (UICC, 2017)

Primärtumorausbreitung	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1a Tumor 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1b Tumor mehr als 0,5 cm aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
	T1c Tumor mehr als 1 cm aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm aber weniger als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, Arteria mesenterica superior und/oder A. hepatica communis
Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 2017)

UICC Stadium	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium III	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 3: Histopathologisches Grading des duktales Adenokarzinoms basierend auf dem WHO System.

Quelle: Frei übersetzt nach Lüttges et al. (2000)

Tumorgrad	Glanduläre-differenzierung	Muzin Produktion	Mitosen pro 10 HPF	Kern-veränderungen
1	gut differenziert	intensiv	<5	wenig Polymorphie, Zellpolarität erhalten
2	mäßig differenzierte gangähnliche Strukturen und tubuläre Drüsen	ungleichmäßig	6-10	mäßig Polymorphie
3	wenig differenzierte Drüsen, mukoeptidermoide und pleomorphe Strukturen	abortiv	>10	deutliche Polymorphie und Kernvergrößerung

2.2.7 Diagnostik und Tumormarker

Eine Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms ist aufgrund uncharakteristischer bzw. fehlender Symptombildung sowie einer hohen Unspezifität der zur Verfügung stehenden Tumormarker sehr schwierig.

Als Zufallsbefund oder im fortgeschrittenen Stadium können Pankreaskarzinome durch bildgebende Verfahren nachgewiesen werden. Geeignete Methoden zur Beurteilung der Tumorausbreitung und Bestimmung des Metastasierungsstatus sind Multidetektor-Computertomographie und Magnetresonanztomographie (Sahora et al., 2008).

Das Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) ist klinisch derzeit der geläufigste Tumormarker, allerdings ist er nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom, denn auch benigne Erkrankungen und andere Neoplasien des Gastrointestinaltraktes können zu erhöhten Werten führen. Außerdem bilden ca. 5% der Bevölkerung, aufgrund eines fehlenden Gens kein CA 19-9 (Löhr et al., 2003; Sahora et al., 2008; Seufferlein et al., 2012). Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs wird das CA 19-9 jedoch wiederholt bestimmt (Müller, 2014/15).

2.2.8 Pathogenese

Wie in 2.2.2 aufgeführt reagiert das Pankreas empfindlich auf Karzinogene und DNA-wirksame Substanzen, was zu Genmutationen führen kann, welche dann die Tumorentstehung begünstigen (Li et al., 2004).

In einigen Studien zur Tumorgenese des Pankreaskarzinoms konnte gezeigt werden, dass viele Mitglieder der Protoonkogen-Familie wie z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren im Pankreaskarzinom überexprimiert werden. Hierzu gehören zum Beispiel epidermale Wachstumsfaktoren (EGF), Endothel-Wachstumsfaktoren (VEGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) aber auch Zytokine, wie transformierende Wachstumsfaktoren (TGF), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrose-faktor- α (TNF- α) und Interleukin-8 (IL-8) (Korc, 1998; Li et al., 2004). Die Erhöhung der Anzahl an Wachstumsfaktoren und die Störung der tumorsuppressiv wirkenden Faktoren führt zu einer Umgehung der Apoptose und dadurch zu weiterem Wachstum, Angiogenese und Entstehung von Metastasen (Li et al., 2004).

Bei Untersuchungen zur Regulierung von VEGF konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie, welche häufig im Gewebe solider Tumoren besteht, die Expression dieses Wachstumsfaktors hochreguliert (Korc, 1998).

Shi et al. (2001) und Mukaida et al. (1994) haben nachgewiesen, dass der niedrige extrazelluläre pH-Wert in der Umgebung von Tumoren, insbesondere in nekrotischen Arealen, unter anderem zu einer Aktivierung von Aktivatorprotein-1 (AP-1) und nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-Zellen (NF- κ B) führt.

2.3 Nuclear Factor- κ B

Die NF- κ B-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und spielen eine Schlüsselrolle in der Organisation der schnell induzierbaren Genregulation (Messer u. Rupec, 2001). Sie sind besonders involviert in der adaptiven und angeborenen Immunantwort bei Infektionen und Entzündungsprozessen.

Außerdem beeinflussen sie die Steuerung der Zellproliferation und des programmierten Zelltodes (Hayden et al., 2006). Eine vermehrte Aktivität der NF- κ B-Proteine kann zu chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz und Karzinogenese führen (Ghosh u. Hayden, 2008).

NF- κ B besteht aus zwei Subfamilien, der Rel Subfamilie (c-Rel, RelB und RelA (p65)) und der NF- κ B-Subfamilie (p105 (NF- κ B1) und p100 (NF- κ B2), welche Vorstufen von p50 und p52 sind) (Gilmore, 2006). Aus den 5 Untereinheiten: p50, p52, RelA (p65), RelB und c-Rel können 12 unterschiedliche Homo- und Heterodimere gebildet werden. Am N-Terminus dieser Proteine befindet sich jeweils eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne, diese wird Rel-Homologie Domäne (RHD) genannt. Neben der DNA-Bindung ist die RHD für die Dimerisierung und nukleäre Lokalisierung verantwortlich. Die Rel Proteine besitzen an ihrem C-Terminus eine Transkriptionsaktivierungs-Domäne (TAD), welche die Aktivierung der Zielgenexpression vermittelt (Baeuerle u. Henkel, 1994; Chen u. Ghosh, 1999; Gilmore, 2006; Nagel, 2014).

2.3.1 Mechanismen der NF- κ B Aktivierung

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird durch inflammatorische Zytokine und nach Aktivierung von Antigenrezeptoren induziert (Ghosh u. Hayden, 2008; Nagel, 2014). Es gibt zwei Signalwege, den klassischen und den alternativen, welche die Ligandenvermittelte Stimulation membranständiger Rezeptoren im Rahmen von Immunreaktionen anstoßen (Bonizzi u. Karin, 2004; Hayden et al., 2006). Die jeweils an den Signalwegen beteiligten NF- κ B-Dimere setzen sich dabei aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammen. Beim klassischen Signalweg, welcher schematisch in Abbildung 5A dargestellt ist, befinden sich die NF- κ B-Dimere durch Bindung an inhibitorische Proteine der Inhibitor of NF- κ B (I κ B) -Familie in einem inaktiven Zustand (Nagel, 2014).

Wenn ein Ligand nun einen Oberflächenrezeptor (z.B. Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) oder Toll-ähnlicher Rezeptor (TLR)) aktiviert, werden Adapterproteine (z.B. B-CLL/Lymphom-10 (Bcl-10) und Kaspase-Rekrutierungs-Domäne 11 (CARD11)) an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors rekrutiert. Diese Proteine aktivieren den I κ B Kinase (IKK) -Komplex, welcher aus den katalytisch aktiven IKK α und - β Proteinen sowie dem regulatorischen IKK γ Protein, auch bezeichnet als NF- κ B essential modulator (NEMO), besteht.

Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B, dies hat eine Ubiquitylierung zur Folge, die die Proteine für die proteasomale Degradierung markiert. Die nun aktivierten NF- κ B-Untereinheiten translozieren anschließend in den Zellkern und binden dort an spezifische DNA-Bindungsstellen, sogenannte „ κ B-sites“ und aktivieren die Genexpression (siehe Abbildung 5A) (Gilmore et al., 2004).

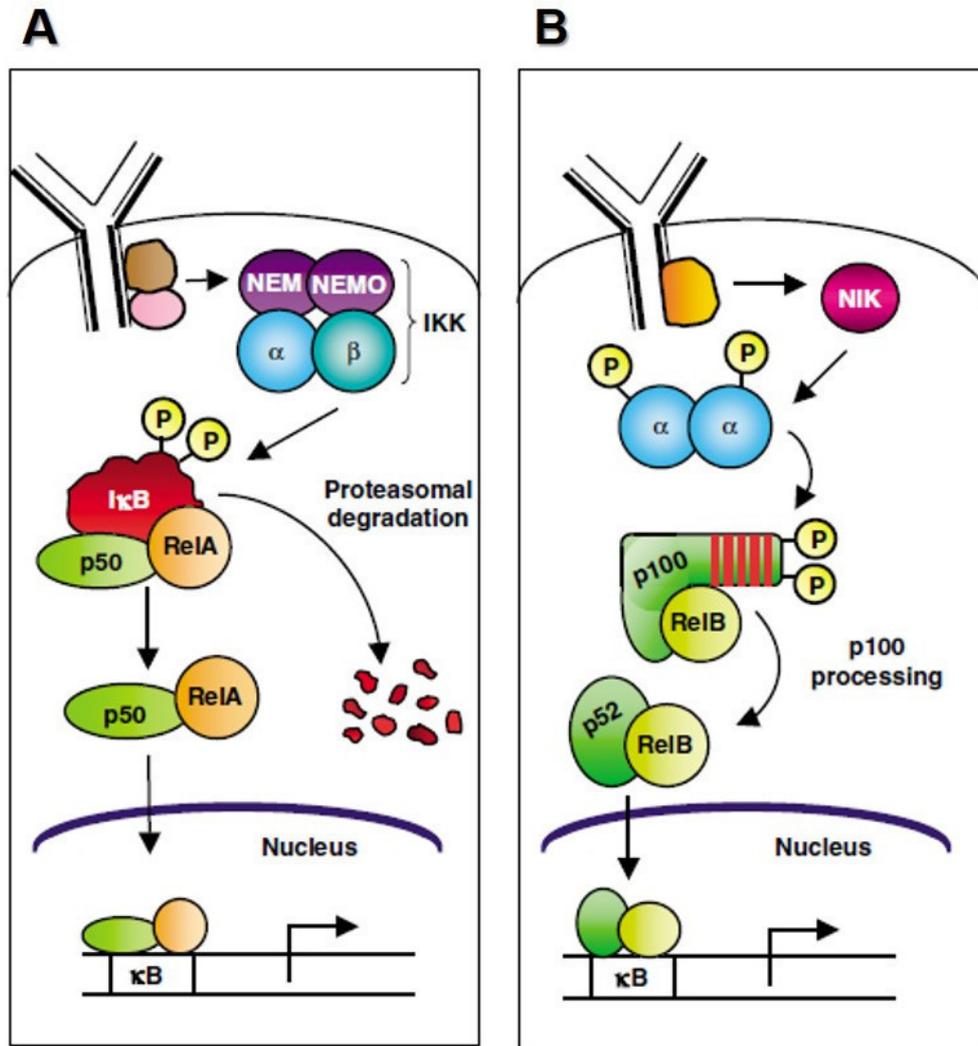


Abbildung 5: NF-κB Signalwege. A) Klassischer Signalweg. NEMO (IKK γ), Phosphorylierung (P), rote Fragmente: degradiertes IκB. B) Alternativer Signalweg. NF-κB-induzierende Kinase (NIK); Phosphorylierung (P)
 Quelle: Frei übersetzt nach Gilmore (2006)

Bei dem alternativen Signalweg, dargestellt in Abbildung 5B, führt die Rezeptoraktivierung ebenfalls zur Rekrutierung von Adapterproteinen an der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors. Dies führt zu einer Aktivierung der NF-κB-induzierenden Kinase (NIK), woraufhin der IKK-Komplex, welcher in diesem Fall aus zwei IKK α -Untereinheiten besteht, phosphoryliert und dadurch aktiviert wird.

Der IKK Komplex seinerseits phosphoryliert anschließend die C-terminale IκB-Domäne des p100 (NFκB2) und führt zu dessen partialen Proteolyse und damit zur aktiven Untereinheit p52. Nun kann der p52/RelB-Komplex in den Nucleus translozieren, an die κB-Sites binden und wie beim klassischen Signalweg ebenfalls die Genexpression aktivieren (Gilmore, 2006).

2.3.2 Die c-Rel Subfamilie

C-Rel wird codiert von dem REL Gen und liegt in den meisten Zellen entweder als Homo- oder als Heterodimer mit p50 vor, es kann aber auch dimäre Verbindungen mit p65 (RelA) und p100 (NFκB2) eingehen. Studien mit B Zellen zeigen, dass im klassischen Signalweg vor allem MALT1 die Translokation von c-Rel in den Zellkern induziert, indem es die IκB Moleküle abbaut, die c-Rel inhibieren (Ferch et al., 2007). Bei Immunreaktionen wie Entzündungen des Zentralen Nerven Systems (ZNS) oder bakteriellen Infektionen, bewirkt es die Differenzierung von CD4-T-Helfer (Th) -Zellen in Th1- und Th2-Zellen (Gerondakis et al., 2006; Gilmore u. Gerondakis, 2011). Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Proliferation von B- und T-Zellen. Außerdem ist c-Rel an der Entstehung von Immunkrankheiten, wie rheumatoide Arthritis (Eyre et al., 2010; Gilmore u. Gerondakis, 2011; Gregersen et al., 2009; Varadé et al., 2011), Zöliakie (Gilmore u. Gerondakis, 2011; Trynka et al., 2009), Psoriasis (Gilmore u. Gerondakis, 2011; Psoriasis u. Control, 2010), Colitis ulcerosa (Cho u. Brant, 2011; Gilmore u. Gerondakis, 2011) oder primär sklerosierende Cholangitis (PSC), beteiligt (Gilmore u. Gerondakis, 2011; Janse et al., 2011).

In B-Zellen hemmt c-Rel durch die direkte Induktion von Genen einen intrinsischen „death-pathway“, welcher normalerweise zum kontrollierten Zelltod führen würde, diese Hemmung jedoch sichert das Überleben der Zellen. Wenn c-Rel nicht vorhanden ist, zeigen aktivierte B-Zellen eine erhöhte Apoptose-aktivität. (Gerondakis et al., 2006; Gilmore u. Gerondakis, 2011; Grumont et al., 1999; Grumont et al., 1998).

Des Weiteren reguliert c-Rel die Expression von Zytokinen wie IL-2, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), Interferon-γ (IFN-γ), IL-3 und IL-21 in aktivierten T-Zellen (Banerjee et al., 2008; Gilmore u. Gerondakis, 2011). Es interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren, Zelltransportproteinen und Signalproteinen wie Proteinkinasen (z.B Proteinkinase A (PKA), NIK, IKKβ) (Gilmore u. Gerondakis, 2011).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass c-Rel wichtig ist für den Transport von bestimmten Proteinen in den Zellkern. Beispielsweise transportiert es eine alternative Form des Tumorsuppressorgens p53 in den Zellkern von Kopf- und Halstumorzellen und kontrolliert dadurch deren Proliferation (Gilmore u. Gerondakis, 2011; King et al., 2008).

Die Aktivierung der NF- κ B-Untereinheiten wird mit einer Reihe von Malignitäten in Verbindung gebracht, wobei nur c-Rel bei Zellen in Kultur permanent maligne Veränderungen hervorgerufen hat (Gilmore et al., 2004). C-Rel Zielgene ähneln denen der anderen NF- κ B-Untereinheiten aber manche Gene wie TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor-1 (TRAF1) und Prosurvivalfaktoren der B-CLL/Lymphom-2 (Bcl-2) -Familie wie Bcl-x_L und Bfl-1/A1, scheinen häufiger von c-Rel gebunden zu werden als andere. Diese Gene sind vor allem involviert in Zellwachstum und -proliferation (Gilmore et al., 2004).

Eine vereinfachte Darstellung des c-Rel Signalweges findet sich in Abbildung 6.

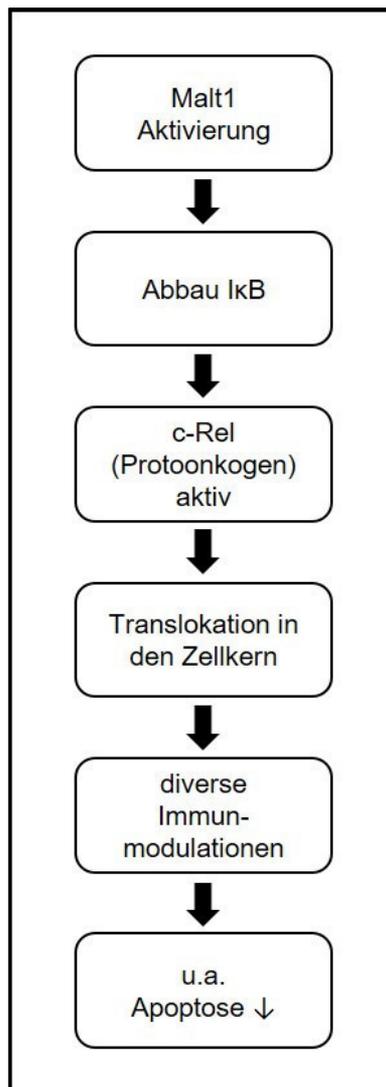


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des c-Rel Signalweges

In soliden Tumoren lässt sich eine Veränderung am REL Genlocus feststellen. So wurden Genamplifikationen in circa 10% der metastasierten Bronchialkarzinome gefunden (Boelens et al., 2009; Gilmore u. Gerondakis, 2011). In vitro Studien zeigen, dass sich durch die Inhibierung von c-Rel das Wachstum von Bronchialkarzinomen verlangsamt (Barbie et al., 2009; Gilmore u. Gerondakis, 2011).

Auch in den Stammzellen des Pankreaskarzinoms scheint c-Rel für die Unterbindung der Apoptose verantwortlich zu sein. Kallifatidis et al. haben 2011 in ihrer Studie das bekannte Chemotherapeutikum Gemcitabin mit Sulforaphan kombiniert und festgestellt, dass die Sensitivität der Zellen für die Tumornekrosefaktor-verwandte Apoptose-induzierende Liganden (TRAIL) induzierte Apoptose erhöht wurde woraus dann wieder ein erhöhter kontrollierter Zelltod folgte. Dies führten sie auf eine Downregulierung von c-Rel zurück (Kallifatidis et al., 2011) und schlossen daraus, dass eine herabgesetzte c-Rel Expression mit einem verminderten Pankreaskarzinom-zellwachstum einhergeht (Gerondakis et al., 2006; Gilmore u. Gerondakis, 2011; Grumont et al., 1999; Grumont et al., 1998; Kallifatidis et al., 2011). Geisman et al. haben sich in ihren Studien ebenfalls intensiv mit der Rolle von c-Rel bei der TRAIL-induzierten Apoptose beschäftigt und herausgefunden, dass c-Rel ein Mediator für einen antiapoptotischen Signalweg ist, der die Zellen des PDACs vor TRAIL-induzierter Apoptose schützt (Geismann et al., 2014).

2.4 MALT1 und der CBM-Komplex

Das mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation Protein 1 (MALT1) wurde erstmals 1999 von Dierlamm et al. in einer wiederkehrenden t(11;18)(q21;q21) Translokation in MALT Lymphomen beschrieben (Dierlamm et al., 1999). Es ist eine Parakaspase und essentiell für die Aktivierung von NF- κ B downstream von Zelloberflächenrezeptoren, die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten und deren Proliferation und für die Produktion von IL-2 (Ferch et al., 2007; Jabara et al., 2013; Ruefli-Brasse et al., 2003; Uren et al., 2000).

MALT1 bildet einen Komplex mit Bcl-10 und CARD11, dieser wird als CARMA1-Bcl-10-MALT1 (CBM) -Komplex bezeichnet. CARD11 beinhaltet das Gerüstprotein CARMA1 (CARD-containing MAGUK protein 1) und ist wie Bcl-10 ein Adapterprotein (Ferch et al., 2007; Fontan u. Melnick, 2013; Ruland et al., 2003; Thome, 2004). Die Aktivierung des Oberflächenrezeptors hat die Phosphorylierung von CARD11 durch die Protein Kinase C (PKC) - β zur Folge, was eine Konformationsänderung von CARMA1 bewirkt und zu einer Bildung von Lipid Raft assoziierten Signalosomen führt. Dies bewirkt eine schnelle Aufstellung des CBM-Komplexes an der Zellmembran.

Neueren Studien von Shin et al. zufolge ist Notch1 als weiteres Gerüstprotein maßgeblich an der Formierung des CBM-Komplexes beteiligt. Sie haben nachgewiesen, dass in Abwesenheit von Notch1, CARMA1 und Bcl-10 keine Verbindung eingehen und der CBM-Komplex so nicht zustande kommen kann (Shin et al., 2014). Durch die Formierung des CBM-Komplexes wird der IKK-Komplex aktiviert, der dann, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, die Translokation von NF- κ B in den Zellkern bewirkt (Ferch et al., 2007; Rawlings et al., 2006; Su et al., 2002; Thome, 2004). Eine bildliche Darstellung der Rolle des CBM-Komplexes findet sich in Abbildung 7.

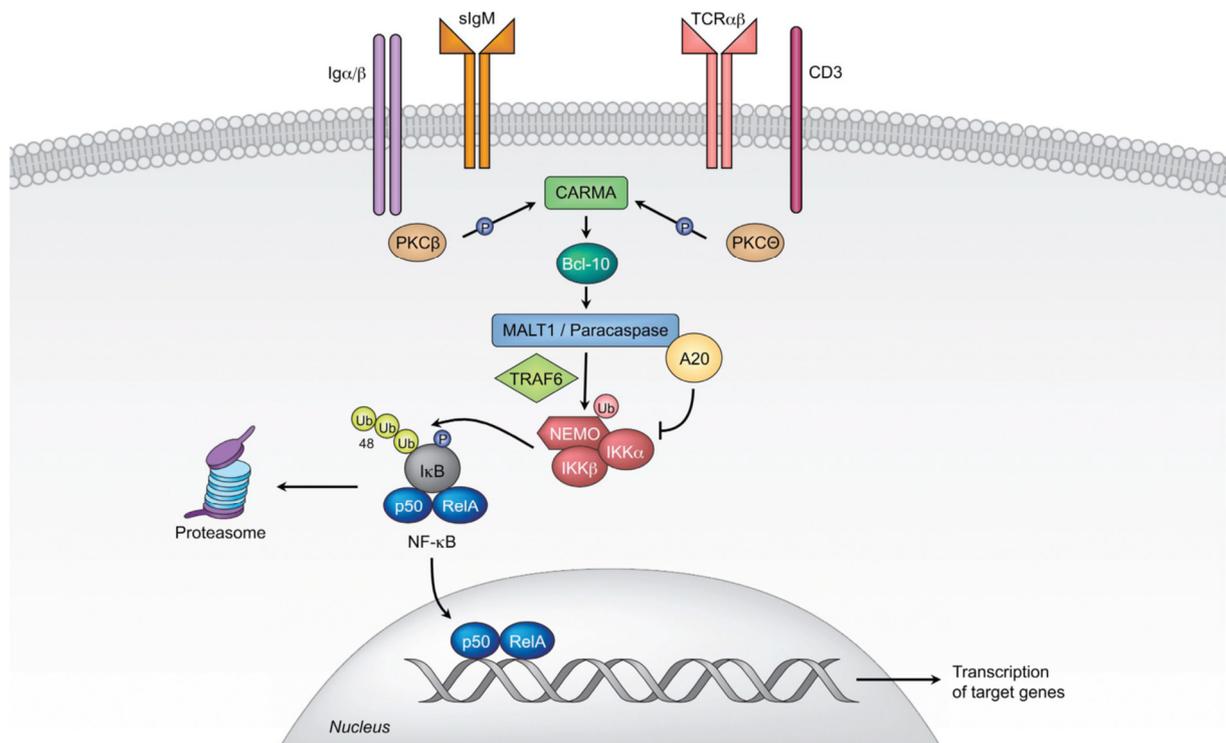


Abbildung 7: Die Rolle des CBM-Komplexes in der Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges. Die Aktivierung der Oberflächenrezeptoren, hat die Aktivierung der Proteinkinase C- β (PKC- β) zur Folge. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung und einer Konformationsänderung von CARMA1. Dies führt zu dem Zusammenschluss von CARMA1, Bcl-10 und MALT1 zum CBM-Komplex. Jetzt wird wie im Text beschrieben der klassische Signalweg von NF- κ B mit NEMO fortgesetzt.
Quelle: Frei übersetzt nach Vucic und Dixit (2009)

Genanalysen von Mäusen zeigten, dass PKC- β , CARMA1, Bcl-10 und MALT1 essentiell für die Differenzierung und Aktivierung von B-Zellen sind (Rawlings et al., 2006). Einzelne Gendefekte oben genannter Proteine beeinflussen die Entwicklung von peritonealen B1 B-Zellen und Marginalzonen B-Zellen.

Studien zufolge kann eine nicht regelhafte Aktivierung des klassischen Signalweges sogar die Entstehung von Lymphomen begünstigen (Alizadeh et al., 2000; Ferch et al., 2007; Jost u. Ruland, 2007; Ngo et al., 2006; Shipp et al., 2002), besonders häufig sind hier chromosomale Translokationen von BCL10 und MALT1 involviert (Ferch et al., 2007; Isaacson u. Du, 2004).

MALT1 ist zusammen mit Bcl-10 wesentlich für die Aktivierung von c-Rel und dem daraus resultierenden B-Zell-Survival verantwortlich. Durch Versuche mit MALT1^{-/-} Knockout Mäusen wurde gezeigt, dass nach B-Zell Rezeptor (BCR) Stimulierung nur im Wildtyp c-Rel-Komplexe induziert werden konnten. In den Zellen ohne MALT1 konnte diese Induktion nicht stattfinden (Ferch et al., 2007).

2.4.1 MALT1-Expression in Pankreaskarzinomzellen und in normalem Pankreasgewebe

Neuesten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal zufolge zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von MALT1 in den Zellen des PDAC im Vergleich zum exokrinen Normalgewebe, wo kein MALT1 nachgewiesen wurde. Interessant ist hierbei, dass nicht die Größe oder die Metastasenbildung der Tumore beim Vorkommen von MALT1 eine Rolle gespielt hat, wohl aber die Differenzierung der Zellen. In einem von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Assay stellte sich interessanterweise heraus, dass je geringer der Grad der Differenzierung war, desto mehr MALT1 wurde festgestellt (Paper eingereicht).

2.4.2 Medikamente zur Inhibierung von MALT1

Zur Inhibierung von MALT1 werden in dieser Arbeit zwei Medikamente verwendet. Das Phenothiazinderivat Mepazin ist ein bekannter Wirkstoff, der bereits in der Klinik als Antipsychotikum und Sedativum vor allem bei Patienten mit Schizophrenie eingesetzt wurde, jedoch wurde es aufgrund von mangelnder Wirksamkeit und der Entdeckung effektiverer Neuroleptika, in den sechziger Jahren wieder vom Markt genommen (Klein, 2007).

Mepazin wurde jedoch in mehreren neueren Studien es als potenter Inhibitor von MALT1 nachgewiesen (Nagel et al., 2012; Schlauderer et al., 2013).

Diese inhibierende Wirkung von Mepazin auf MALT1 konnten Nagel et al. anhand von in vivo und in vitro Studien mit aktivierten B Zellen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (ABC-DLBCL) nachweisen (Nagel et al., 2012). Phenotiazine wie Mepazin binden und antagonisieren Adreno- und Muskarinrezeptoren (Dahl et al., 1986).

Das zweite verwendete Medikament ist das Anticholinergikum Biperiden, welches als Medikament gegen Parkinson schon seit 1952 verwendet wird (Hass u. Klavehn, 1955). Dieses anticholinerge Medikament (Pehl et al., 1998) bindet genauso wie Mepazin an Muskarinrezeptoren (Bolden et al., 1992).

Auf den ersten Blick haben Mepazin und Biperiden keine strukturellen Ähnlichkeiten, allerdings zeigten crystallografische Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal, dass beide Medikamente ähnliche Affinitäten zur Substrat-Bindungs-tasche von MALT1 aufweisen.

Biperiden wurde von dieser Arbeitsgruppe zunächst als Antidot für Mepazin vermutet und zeigte dann jedoch einen ähnlichen apoptotischen Effekt auf die Zellen des Pankreaskarzinoms wie Mepazin. Dies zeigte sich im Vergleich beider Substanzen nach 24-stündiger Inkubation von Pankreaskarzinomzellen, es kam bei beiden Substanzen zur Ablösung der Zellen aus dem Zellverband und anschließend zur Apoptose (Paper eingereicht).

2.5 Laborchemische Methoden

Um die Wirkung der Medikamente auf die Aktivität von MALT1 zu zeigen wird zunächst ein in der Arbeitsgruppe etablierter MALT1-Aktivitätsassay durchgeführt. Mithilfe dieses Assays wird die proteolytische Aktivität von MALT1 gemessen. Um die Quantität der Proteine in Zytoplasma und Nukleus getrennt voneinander zu bestimmen wird eine Kern- und Zytoplasma Fraktionierung durchgeführt. Im Anschluss an die Fraktionierung wird mit Hilfe eines Bicinchoninsäure (BCA) -Tests eine photometrische Bestimmung der Gesamtproteinmenge vorgenommen.

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen in der Kern- und der Zytoplasmafraktion der Zelle. Dazu werden die Proteine zuerst mittels diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die hitzedenaturierten Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht getrennt, zur Abschätzung der Molekülgröße und dem Fortschreiten der Trennung wird ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Darauf folgt der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Trägermembran (Blot), spezifische Proteine können anschließend durch Immundetektion erfasst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 4: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Scope A1 Mikroskop	Zeiss
Axiocam MRc	Zeiss
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Zeiss
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Panasonic
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Inkubator Cell 240	Heraeus instruments
Pipetus accu-jet® pro	Brandt
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Rotina 35R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf
Mikrozentrifuge mini spin	Eppendorf
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Thermo Scientific
Vacuum-Pumpsystem	Vacuubrand
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences
ImageQuant LAS 3000	GE Healthcare Life Sciences
Thermoshaker (TS-100)	Peqlab
Rotamax 120	Heidolph
Schüttler MS 3 digital	IKA
Schüttler SSM5	Stuart
Waage TE153S	Sartorius
Waage LE225D	Sartorius
Zellzähler (Automated cell counter) TC20™	BioRad
Wasserbad	Störk Tronic
Blotting Kammer	BioRad
Power Pac Universal Electrophoresis	BioRad
ELISA Reader (FLUO Star Omega)	BMG Labtech
Inkubator 37°C	Thermo Scientific
Vortexer	IKA

3.1.2 Software

Tabelle 5: verwendete Medikamente

Software	Hersteller
AIDA (Automatic Imaging Data Analysis program)	Raytest
SPSS (Statistical Package for Social Sciences) (Version 22)	IBM
Image Quant TL	GE Healthcare Life Sciences

3.1.3 Gebrauchsmaterial

Tabelle 6: verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Falcon (15ml-50ml)	Greiner Bio-One
Filter Tips Pipettenspitzen (0,1-1000µl)	Sarstedt
Serologische Pipette (1-50ml)	Sarstedt
Mini Protean® TGX, 10% 10-well comb, 30µl	BioRad
Mini Protean® TGX, 4-20% 12-well comb, 20µl	BioRad
Whatman Paper™	Whatman
Nitrozellulose Blotting Membran	GE Healthcare Life Sciences
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	BioRad
Reagier Gefäße (1,5-2ml)	Sarstedt
24-Well Platte	Thermo scientific
Glas Pasteur Pipetten	VWR
Objekträger	Hirschmann
Deckgläser	Thermo Scientific
TC 75-Zellkulturflaschen	Sarstedt
TC 175-Zellkulturflaschen	Sarstedt
96-Well Zellkulturplatte, steril, F-Bottom, mit Deckel	Greiner Bio-One
Greiner 384-well non-binding Platte	Sigma Aldrich
Mr. Frosty-Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Kryovials	Greiner Bio-One

3.1.4 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche humane Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms untersucht. Hierbei handelte es sich um die kommerziell erwerbliche Linie Panc-1 (ATCC, Bestellnr.: CRL-1469), welche in Dulbecco's modifiziertem Adler Medium (DMEM), angereichert mit 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 10% Fetal Bovine Serum (FBS) kultiviert wurde. Die zweite untersuchte Zelllinie war L3.6pl wt, diese entstammte ursprünglich der Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 und besitzt ein hohes Potential, Lebermetastasen zu bilden (Bruns et al., 1999). Aus diesen Zellen wurde in den Laboren der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Eppendorf eine Gemcitabin resistente Subgruppe selektioniert, welche als L3.6pl Res aufgeführt ist (Gungor et al., 2011). Diese Zellen wachsen in RPMI 1640 Medium ebenfalls angereichert mit 1% P/S, 10% FBS, und außerdem mit 2µM Gemcitabin.

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 7: verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Sigma Aldrich
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Gibco
Dulbeccos Modifiziertes Adler Medium (DMEM)	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life technologies
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Trypanblau 4%	BioRad
Trypsin-EDTA (0,5%)	Gibco
Recovery cell culture Freezing medium	Gibco

3.1.6 Chemikalien

Tabelle 8: verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Blotting grade Blocker	BioRad
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Natriumlaurylsulfat (SDS)	PanReac AppliChem
Trizma® Base	Sigma
Glycin	Sigma
Methanol	J.T. Baker
Ethanol 70%	J.T. Baker
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Paraformaldehyd Pulver	Fisher
Aqua dest.	Sigma Aldrich
Albumin Standard	Thermo Scientific
Bicinchoninsäure	Sigma
Kupfer(II)Sulfat Lösung	Sigma
Precision Plus Protein Standard	BioRad
Ethanol 70%	Histolab
Diamidin Phenylindol (DAPI) Flouroschild	Sigma
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction	Thermo Fisher Scientific
CHAPS Hydrat	Sigma Aldrich
HEPES Dry Powder	Sigma Aldrich
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Ponceau S Lösung	Serva

3.1.7 Antikörper

Tabelle 9: verwendete Antikörper

Primär Antikörper	Hersteller	Verdünnung
c-Rel (C) (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnologies	1:200
Anti MALT1 HPA (Kaninchen)	Sigma	1:500
MALT1 (B-12) (Maus)	Santa Cruz Biotechnologies	1:500
Lamin B (M-20)	Santa Cruz Biotechnologies	1:200
Anti-beta Actin antibody	Abcam	1:5000
GAPDH (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnologies	1:700
Sekundär Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnologies	1:3000
Mouse anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnologies	1:3000

3.1.8 Medikamente

Tabelle 10: verwendete Medikamente

Wirkstoff	Hersteller
Mepazin hydrochlorid	Cabiochem
Biperiden 5mg/ml (WS:Biperidenlactat)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,5%	Sigma Aldrich
Gemcitabin (Gemzar)	Lilly

3.2 Puffer und Lösungen

Die meisten der verwendeten Puffer werden in 5x oder 10x Stocksolution hergestellt und für den Verbrauch verdünnt.

10x SDS-Laufpuffer (Western Blot)

- 30,3g Trizma® Base
- 144g Glycin
- 10g SDS
- ad 1l Aqua dest.

10x TBS-T (Western Blot)

- 60,57g Trizma® Base
- 87,66 1,5M NaCl
- 0,05% Tween® 20
- ad 1l Aqua dest.
- pH 7,4

10x Transferpuffer (Western Blot)

- 288g Glycin
- 60,4g Trizma® Base
- ad 2l Aqua dest.

1x Transferpuffer für den Gebrauch (Western Blot)

- 100ml 10 x Transferpuffer
- 200ml Methanol
- ad 1l Aqua dest.

5x Laemmli-Probenpuffer (Western Blot)

- 31,2ml Trizma® Base 0,5M (pH 6,8)
- 2,5g SDS (5%)
- 10ml Glycerin (20%)
- 2ml β -Mercaptoethanol (40%)
- Bromphenolblau
- ad 50ml Aqua dest.

Blockierlösung (Western Blot)

- 5g Blotting Grade Blocker
- ad 100 ml TBS-T (Tris-buffered saline with Tween)

Stripping-Lösung (Western Blot)

- 29,22g NaCl
- 29ml 100%ige Essigsäure
- ad 1l Aqua dest.

Cleavage-Puffer (MALT1-Aktivitätsassay)

- 0,486g MES (50mM)
- 0,439g NaCl (150mM)
- 5g Saccharose (10%)
- 0.05g CHAPS (0,1%)
- 14,7g Natriumcitrat (1M)
- 500 μ l DTT (10mM)
- Alles in 45ml Aqua dest. lösen
- pH 7

Zellysepuffer (MALT1-Aktivitätsassay)

- 2,5ml HEPES (1M)
- 5,9ml Glycerin (85%)
- 1ml Triton X-100 (1%)
- 0,05ml DTT (1M)
- 7,5ml NaCl (1M)
- 0,1ml MgCl₂ (1M)
- 50 μ l Protease Inhibitor
- Alles auf 50ml mit PBS auffüllen

3.3 Methoden

Bei den nachfolgenden Methoden handelt es sich um in den Laboren der Abteilung der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Eppendorf etablierte Methoden.

3.3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in einem Stickstofftank in dafür vorgesehenen Kryovials gelagert. Zur Vorbereitung der Zellkultur wurden die Vials auf Eis aufgetaut. 20ml Zellkulturmedium wurden im Wasserbad auf 37°C erhitzt und in einer Flasche mit 75cm² Querschnittsfläche vorgelegt, später benannt als T75. Mittels einer 1000er Pipette wurde nun der komplette Inhalt des Kryovials zu dem vorgelegten Medium hinzugefügt.

Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Hierbei wurde das alte Medium abgesaugt und 20ml neues Medium hinzugefügt. Um Zellen zu passagieren oder für weitere Versuche vorzubereiten, wurde das in der Flasche vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit 10ml DPBS gewaschen. Mittels 2ml Trypsin-EDTA wurden während einer Inkubationszeit von ca. 5-10 min bei 37°C die Zellverbände gelöst. Anschließend wurden 3ml Medium zu den Zellen und dem Trypsin in die T75 Flasche gegeben, diese Zellsuspension wurde dann in ein 15ml Falcon überführt. Jetzt konnten die Zellen wieder in gewünschter Verdünnung in neue T75 Flaschen ausgesät werden. Nach circa 1-3 Tagen befanden sich die Zellen wieder konfluent und adhärent am Flaschenboden und konnten nun für die angestrebten Versuche behandelt werden. Das Behandlungsschema war bei allen Versuchen gleich. Die eingesetzten Konzentrationen haben in Vorversuchen der Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal die größte Wirksamkeit gezeigt und wurden deswegen in den folgenden Versuchen angewendet. Für die Behandlung wurden zunächst die Medikamente Mepazin und Biperiden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Dann wurde das entsprechende Zellkulturmedium mit entweder 25µM Mepazinlösung, 29,6µg/ml Biperidenlösung, der Kombination aus 15µM Mepazin- und 3,6µg/ml Biperidenlösung oder der reinen Trägersubstanz DMSO angesetzt und auf die Zellen gegeben.

Dieses Medium verblieb dann in den jeweiligen Flaschen für einen vorher bestimmten Zeitraum. Die Ernte der behandelten Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Passagierung, nur wurden sie nachdem sie sich im Falcon befanden nicht wieder ausgesät, sondern für die die Versuche gezählt und in gewünschter Anzahl weiterverwendet.

3.3.2 Zellzählung

Um alle Versuche unter den gleichen Bedingungen durchzuführen, war es notwendig, die Zellzahl zu bestimmen. Zur Ermittlung der festgelegten Zellzahl wurden auf einer 96-well Platte 10µl der Zellsuspension mit 10µl des Zellvitalitätsfarbstoff Trypanblau versetzt, das Gemisch wurde anschließend auf eine Counting Slide gegeben und dann durch den Cell Counter gezählt. Da vitale Zellen Trypanblau nicht aufnehmen, wurden ausschließlich ungefärbte Zellen in die Berechnung einbezogen. Dieser Vorgang wurde für jede Probe dreimal wiederholt und es wurde ein Mittelwert aus den Ergebnissen gebildet.

3.3.3 MALT1-Aktivitätsassay

Für dieses proteolytische Spaltungsexperiment wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen benötigt. Die Zellen wurden im Behandlungsschema wie oben beschrieben für jeweils zwei und 24 Stunden inkubiert. Dann wurden sie geerntet und ausgezählt, in 1,5ml Reaktionsgefäße gegeben und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und 500µl Zellysepuffer auf das verbliebene Zellpellet gegeben und dann für 20 Minuten bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate für 10 Minuten bei 21.000 g und 4°C zentrifugiert. Die enzymhaltige Fraktion wurde über Nacht mit 3,5µl des MALT1 Antikörpers bei 4°C rotierend inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 30µl Protein A/G plus Agarose Beads, nachdem diese mit PBS gewaschen und im Verhältnis 1:2 verdünnt wurden, auf die Lysate gegeben. Die Lysate wurden mit den Beads auf dem Rotator-Mixer für 90 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 2 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wurde das Pellet mit den an die Beads gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen dreimal mit 200µl PBS gewaschen und jeweils nach jedem Durchgang bei 300 g und 4°C für jeweils 2 Minuten zentrifugiert.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS mit Hilfe einer Spritze abgenommen und 45µl des Cleavage-Puffer hinzugefügt. Die Beads wurden noch ein letztes Mal bei 300 g für eine Minute zentrifugiert. Auf die Greiner 384-well non-binding Platte wurden nun pro well 49µl der Suspension aus Beads und Cleavage Puffer und 5µl des Ac-Leu-Arg-Ser-Arg-7-Amino-4-methylcoumarin (Ac-LRSR-AMC), ein Fluoreszenzgekoppeltes MALT1 Substrat, gegeben. Die Platte wurde für 10 Sekunden auf dem Plate Schüttler geschüttelt und im Anschluss für 30 min bei 30°C inkubiert. Bei der Reaktion wurde das AMC Fluorophor durch MALT1 vom Ac-LRSR-AMC Substrat abgespalten. Im ELISA Reader wurde die so freigesetzte Fluoreszenz durch einen Detektor über 90 Minuten analysiert. Zur Bestimmung der MALT1 Aktivität wurde der Fluoreszenzanstieg der Reaktion über die gemessene Zeit berechnet und in relative fluorescent units (RFU) angegeben.

3.3.4 Kern- und Zytoplasmafraktionierung

Die Fraktionierung erfolgte unter Zuhilfenahme des NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit. 4×10^6 Zellen wurden wie oben beschrieben ausgezählt und in 2ml Reaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden 5 Minuten bei 4°C und 500 g in der Mikrozentrifuge zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das übriggebliebene Zellpellet in DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 500 g für zwei Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abpipettiert, sodass das Pellet so trocken wie möglich im Gefäß verblieb. 200µl eiskaltes Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I) wurden dem Pellet beigefügt um die Zellmembran aufzubrechen. Dann wurde das Gefäß auf höchster Stufe (3000rpm) auf dem Vortexschüttler gevortext und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um die restlichen Zytoplasmastrukturen zu zerstören und am Ende die Proteine extrahieren zu können wurden anschließend 11µl Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II) hinzugefügt. Das Gefäß wurde erneut für 5 Sekunden gevortext, anschließend 1 Minute auf Eis inkubiert und wiederum 5 Sekunden gevortext. Nun wurden die Zellen für 5 Minuten auf höchster Stufe (20.817 g) zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine der Zytoplasmafraktion beinhaltet, wurde in eiskalte 0,5ml Reaktionsgefäße gegeben und zunächst auf Eis aufbewahrt.

Das nach der Entfernung der Zytoplasmafraktion übriggebliebene Pellet beinhaltet nun nur noch Zellkerne. Um diese zu lysieren, wurde das Pellet in 100µl Nuclear Extraction Reagent (NER) resuspendiert und auf höchster Stufe 15 Sekunden gevortext. Die Proben wurden auf Eis gestellt und alle 10 Minuten für 15 Sekunden gevortext. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurden die Proben auf höchster Stufe für 10 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Kernproteine wurden in eisgekühlte 0,5ml Tubes überführt. Diese Proben wurden entweder zur weiteren Benutzung auf Eis gelagert oder bei -80°C im Gefrierschrank eingefroren.

3.3.5 BCA-Proteinassay

Der BCA-Test dient der quantitativen, photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentrationen in einer Lösung. Um die Probe am Ende auszuwerten, wurde auf zwei Reihen einer 96-Well Platte zunächst jeweils 5µl der entsprechenden Verdünnung der aufsteigenden Albumin-Standardreihe zur Doppelbestimmung pipettiert, da diese als Standardkurve in Excel verwendet wird. Auf die nächsten Reihen wurden die zu untersuchenden Proben im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und jeweils 5µl der Proben ebenfalls zur Doppelbestimmung auf die Platte gegeben. Dann wurde das BCA Working Reagent, bestehend aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis von 50:1 angesetzt und jeweils 200µl auf die befüllten Wells gegeben. Anschließend wurde die Platte kurz auf dem Schüttler platziert um die Substanzen zu mischen. Danach wurde die Platte für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluss erfolgte die Messung der Extinktion bei 520nm im enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Reader.

3.3.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE steht für Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und dient der Auftrennung von Proteinen. Hierbei wurden zunächst 20µg Proteinextrakt eingesetzt und das entsprechende Volumen mit Aqua dest. auf 20µl aufgefüllt und mit 5µL 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Dann wurde das Proteingemisch zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten im Thermoshaker bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Im Anschluss wurden 20µl der Proben sowie 10µl eines Markers auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, welches sich in einer Kammer mit SDS-Laufpuffer befand. Die Elektrophorese wurde bei 100V für 1,5 Stunden durchgeführt.

3.3.7 Immundetektion von Proteinen per Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen im Gesamtlisat oder einzelnen Fraktionen der Zelle. Dafür wurden die Proteine mit Transferpuffer für 60 Minuten bei 100V und 4°C aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen und die Banden sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Ponceau S Lösung gefärbt. Im Anschluss daran wurde sie zunächst mit Aqua dest. und dann mit TBS-T gewaschen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde mit 5% Milchpulverlösung inkubiert. Danach wurde sie über Nacht bei 4°C mit in 5% Milchpulverlösung angesetzten Primärantikörper inkubiert. Aufgrund der höheren Affinität des Antikörpers zum Antigen kann dieser das Milchpulver verdrängen und binden. Die applizierten Antikörper und deren Verdünnungen sind Tabelle 9 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 Minuten, wurde die Membran mit dem HRP (horseradish peroxidase) -gekoppelten Sekundärantikörper wieder in einer Milchpulverlösung eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde die Membran sechsmal für einen Zeitraum von mindestens 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Die markierten Proteine wurden detektiert, indem die Membran nach Herstellerangaben mit Pierce® ECL Western Blotting Substrate versetzt wurde. Neben dem HRP-Substrat enthält die ECL-Lösung die Chemilumineszenz verstärkende Chemikalien. Das HRP-Substrat wird durch das HRP des Sekundärantikörpers oxidiert. Diese Oxidationsreaktion erzeugt Licht. Diese Chemilumineszenz konnte mittels Image Reader (LAS-4000) digital erfasst werden.

3.3.8 Densitometrie

Um eine quantitative Auswertung der im Image Reader detektierten c-Rel und Lamin B Banden zu ermöglichen, wurde das Verfahren der Densitometrie angewendet. Mit der Software AIDA (Automatic Imaging Data Analysis Program) von der Firma Raytest wurde zunächst der Hintergrund der Banden subtrahiert und dann die Pixelintensität der Banden gemessen.

3.3.9 Statistische Auswertung

Von den oben erwähnten Verfahren wurden überwiegend mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 22) statt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Die im Ergebnisteil angegebenen Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben.

Der MALT1-Aktivitätsassay wurde mit einem gemischten Modell ausgewertet. Die additiven festen Effekte waren Zelllinie (ZL), Behandlungsart (Behdlg), Behandlungsdauer (Dauer), Messwiederholung (Platte) und Messintervall. Zur Analyse des Datensatzes wurde das Random Intercepts Modell für ZL*Dauer*Behdlg*Platte-Subjekte gefolgt von Post-hoc t-Tests zum paarweisen Vergleich der einzelnen Kategorien von Zelllinie, Behandlungsart und Intervall.

Zur Auswertung der Daten der Densitometrie wurde ein allgemeines lineares Modell mit den additiven und Wechselwirkungseffekten ("gesättigtes Modell") der Einflussgrößen Behandlungsart, Behandlungszeitraum, Anzahl an Wiederholungen und den unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt, wieder gefolgt von Post-hoc t-Tests zum paarweisen Vergleich von Behandlungsart und Behandlungszeitraum.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der proteolytischen MALT1-Aktivität

Um den proteolytischen Mechanismus von MALT1 darzustellen, wurde ein in der Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal modifiziertes Spaltungsexperiment zur Messung der enzymatischen MALT1 Aktivität verwendet. MALT1 spaltet ein Fluoreszenz gekoppeltes Substrat, die dadurch frei gewordene Fluoreszenz wurde im ELISA Reader in relative fluorescence units (RFU) gemessen (Nagel, 2014). Der Versuch diente dem Nachweis der Aktivitätsminderung von MALT1 in mit Mepazin bzw. Biperiden behandelten Pankreaskarzinomzellen. Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, wurden die Zellen mit Mepazin, Biperiden und der Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelt. Als Kontrollgruppe dienten Zellen auf die nur die Trägersubstanz DMSO gegeben wurde. Die Zellen verblieben für zwei beziehungsweise 24 Stunden in den behandelten Medien. Sie wurden anschließend ausgezählt und der MALT1-Aktivitätsassay durchgeführt.

Die Diagramme in Abbildung 8 und Abbildung 9 sind identisch aufgebaut, die unterschiedlichen Farben vertreten die verschiedenen Behandlungsarten. A und C repräsentieren die zweistündige Behandlungsdauer sowie B und D die 24-stündige Behandlungsdauer. Alle Grafiken zeigen die Mittelwerte aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in den Zelllinien Panc-1 und L3.6pl Res. In Abbildung 8A bzw. Abbildung 9A und Abbildung 8B bzw. Abbildung 9B ist der Verlauf der Aktivität von MALT1 mit Hilfe der Messung des Fluoreszenzanstieges über einen Zeitraum von 90 Minuten in zehn-Minuten-Intervallen dargestellt. Abbildung 8C/D zeigt den Fluoreszenzanstieg mit den Standardabweichungen nach 90 Minuten, desgleichen die Abbildung 9C/D nach 80 Minuten.

4.1.1 MALT1-Aktivität nach zweistündiger Behandlungsdauer und nach 24-stündiger Behandlungsdauer in der Zelllinie Panc-1

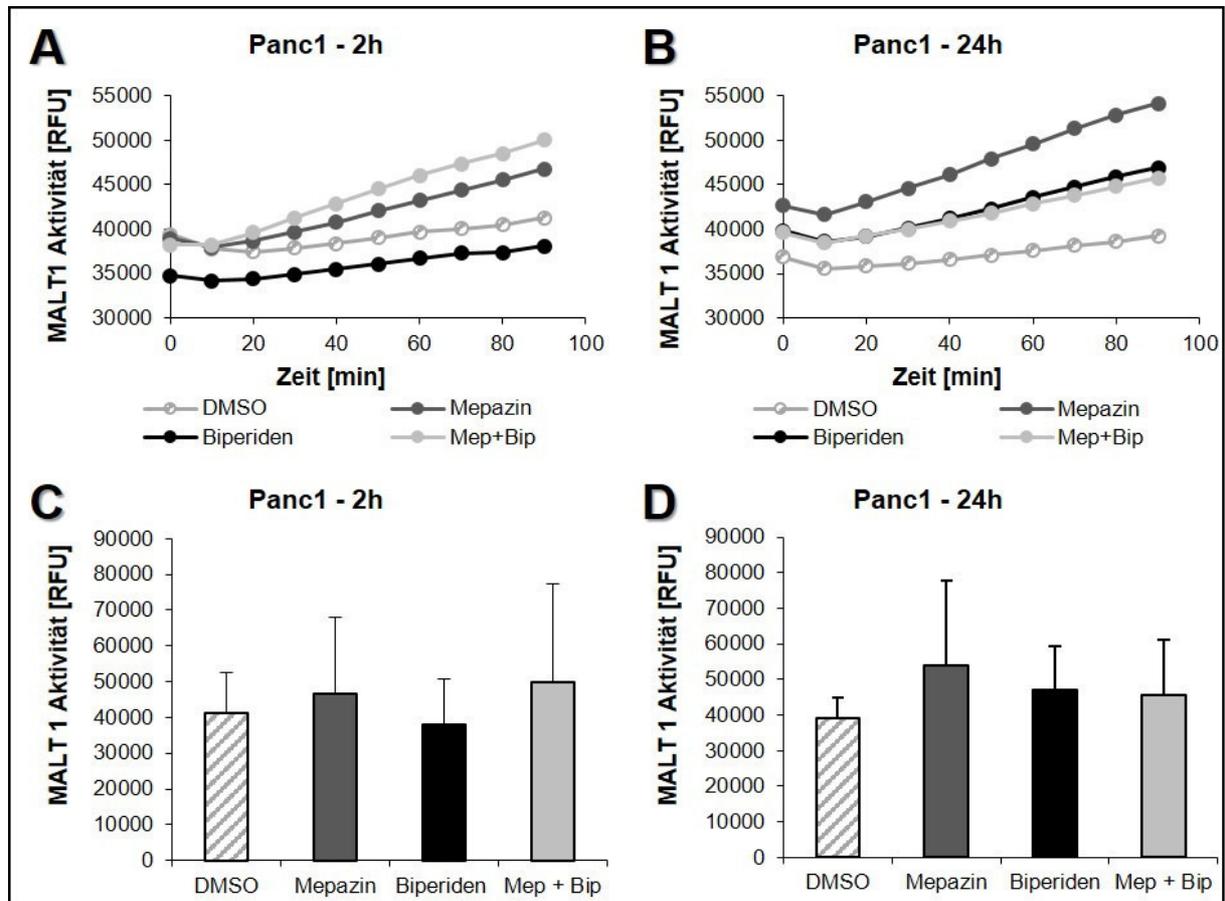


Abbildung 8: Analyse der zellulären MALT1 Aktivität in Panc-1 Zellen. A) 2 Stunden Behandlung und B) 24 Stunden Behandlung. Nach 90 Minuten zeigt sich der größte Unterschied im Fluoreszenzanstieg und wird in Grafik C) für 2 Stunden Behandlung und in Grafik D) für 24 Stunden Behandlung gezeigt.

In der Abbildung 8 wird die MALT1-Aktivität in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 analysiert. Aus Abbildung 8A und Abbildung 8B geht hervor, dass sich bei allen Behandlungen nach zehn Minuten eine Abnahme der Fluoreszenz von circa 1.000RFU zeigt, direkt danach steigt die Fluoreszenz wie in Abbildung 8A zu sehen, graduell um jeweils circa 250RFU und in Abbildung 8B um circa 500RFU pro Intervall an. Nach 90 Minuten liegt die Fluoreszenz in Abbildung 8A zwischen 38.000 und 50.000RFU und in Abbildung 8B zwischen 39.000 und 54.000RFU.

Es hat sich herausgestellt, dass nach keiner der Behandlungen eine signifikante Veränderung der MALT1-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Jedoch ließ sich bei allen Versuchen nach Behandlung mit der Kombination aus Mepazin und Biperiden sowie nur mit Mepazin eine Tendenz zu vermehrter MALT1-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe, erkennen. Dagegen war nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit Biperiden die Aktivität von MALT1 geringer als die der Kontrollgruppe.

4.1.2 MALT1-Aktivität nach zweistündiger Behandlungsdauer und nach 24-stündiger Behandlungsdauer in der Zelllinie L3.6pl Res

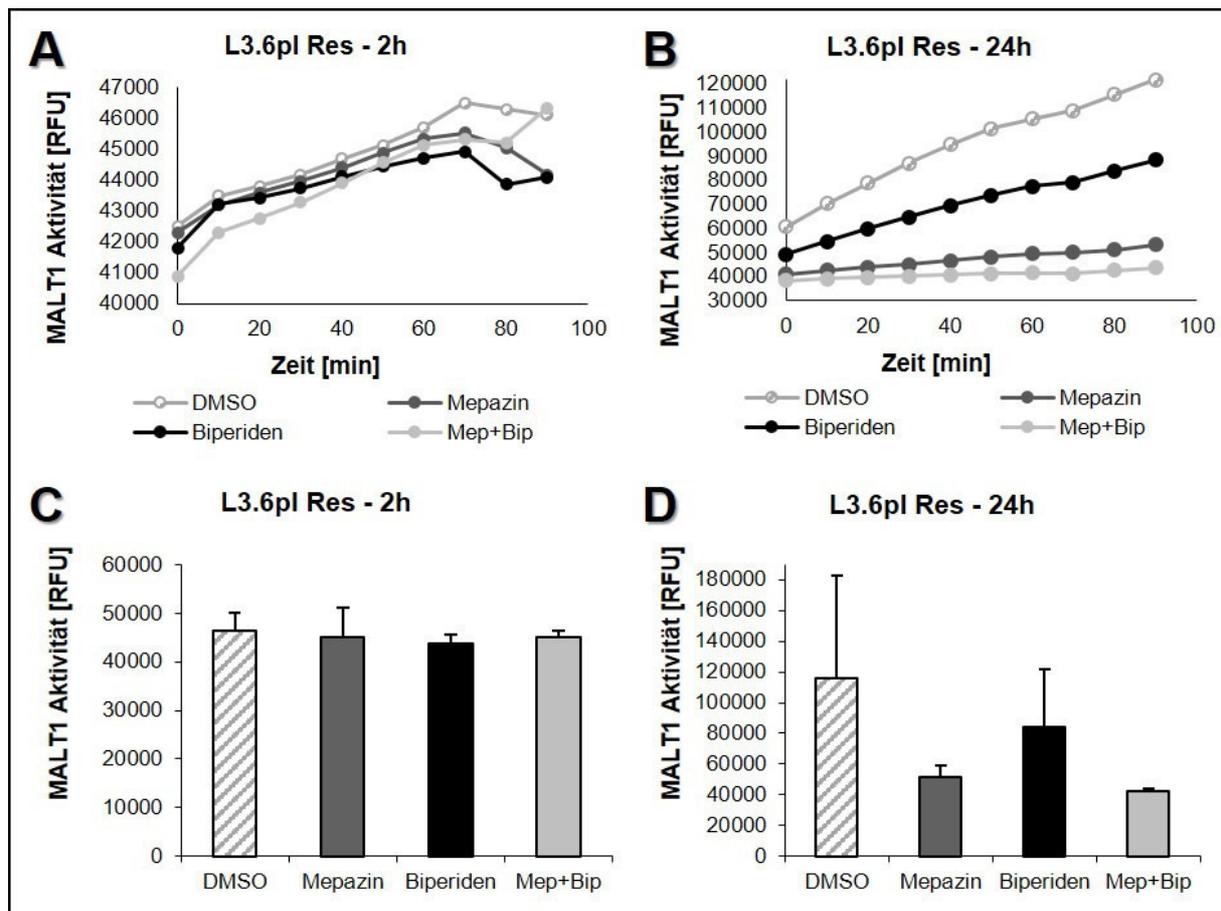


Abbildung 9: Analyse der zellulären MALT1 Aktivität in L3.6pl Res Zellen. Darstellung der Aktivität im 10 Minuten Intervall nach A) 2 Stunden Behandlung und B) 24 Stunden Behandlung. Hier zeigte sich der größte Unterschied im Fluoreszenzanstieg nach 80 Minuten und wird in Grafik C) für 2 Stunden Behandlung und in Grafik D) für 24 Stunden Behandlung gezeigt.

In Abbildung 9 wird die MALT1-Aktivität in der Gemcitabin resistenten Karzinomzelllinie L3.6pl Res analysiert. Auch hier war keines der Ergebnisse statistisch signifikant, aber es ließen sich wiederum Tendenzen über die MALT1-Aktivität nach den unterschiedlichen Behandlungen ausmachen. Die Aktivität von MALT1 schien im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO vermindert.

In Abbildung 9A und Abbildung 9B zeigt sich, anders als in Abbildung 8A und Abbildung 8B keine Abnahme der Fluoreszenz nach den ersten zehn Minuten. In Abbildung 9A stellt sich innerhalb der ersten 10 Minuten sogar ein deutlicher Fluoreszenzanstieg um circa 1.000RFU bei allen Behandlungen dar, danach verläuft der Anstieg etwas weniger drastisch um etwa 250RFU alle 10 Minuten. Zwischen der 70. und 80. Minute nimmt die Fluoreszenz bei allen Behandlungen wieder ab. Bei der Behandlung mit Biperiden und der Kombination aus Mepazin und Biperiden nimmt die Fluoreszenz im folgenden Intervall wieder zu. Interessanterweise fällt im selben Zeitintervall die Fluoreszenz und somit die Aktivität von MALT1 bei der Mepazin- und DMSO-Behandlung. Nach 90 Minuten zeigt sich dann also bei Mepazin und Biperiden fast die gleiche Fluoreszenzintensität von circa 46.000RFU. Auch die Behandlungen mit DMSO und der Kombination weisen nach 90 Minuten kaum einen Intensitätsunterschied auf, beide befinden sich bei circa 44.000RFU. Wie in Abbildung 9B dargestellt, verläuft der Fluoreszenzanstieg nach 24-stündiger Behandlung weniger wechselhaft. Die mit DMSO behandelten Zellen weisen die höchste MALT1-Aktivität und auch die größte Zunahme der Aktivität im Vergleich zu den anderen Behandlungen auf. Die Zellen, die mit der Kombination behandelt wurden, zeigen den geringsten Anstieg der Fluoreszenz während der gesamten 90-minütigen Messdauer.

4.2 Nachweis von c-Rel im Nukleus

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit Mepazin und Biperiden behandelt und so für die Versuche vorbereitet. Da zunächst arbeitsgruppenintern vermutet wurde, dass die Hemmung von MALT1 durch die Medikamente und die dadurch verminderte Translokation von c-Rel in den Zellkern erst nach einer längeren Behandlungsdauer erfolgen würde, wurden die Zellen der etablierten Zelllinie Panc-1 über einen Zeitraum von drei bis 48 Stunden behandelt. Die Quantität von c-Rel im Zellkern wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Verfahren erfasst.

Um die Ergebnisse des Western Blots beurteilen zu können, musste sichergestellt sein, dass sich in allen Kammern die gleiche Proteinmenge befindet. Dafür wurden neben den Banden von c-Rel auch die Banden des Kernproteins LaminB mit Hilfe von Antikörpern detektiert und anschließend densitometrisch ausgewertet. Lamin B ist ein Protein der Kernmembran und sollte in allen untersuchten Zellen gleichermaßen vorhanden und nicht durch die verschiedenen Behandlungen in der Quantität beeinflussbar sein und somit als Ladekontrolle dienen.

4.2.1 C-Rel Quantität in der Zelllinie Panc-1 nach 48, 24 und drei Stunden Behandlungsdauer

Um die optimale Behandlungsdauer herauszufinden, wurde zunächst ausschließlich mit der etablierten Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 gearbeitet. Die Zellen wurden für eine Dauer von 48 Stunden, 24 Stunden und drei Stunden mit Mepazin, Biperiden und der Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelt, als Kontrolle dienten die mit der Trägersubstanz DMSO behandelten Zellen. Bei den Versuchen mit einer Behandlungsdauer über 48 und 24 Stunden gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsdauern und -arten.

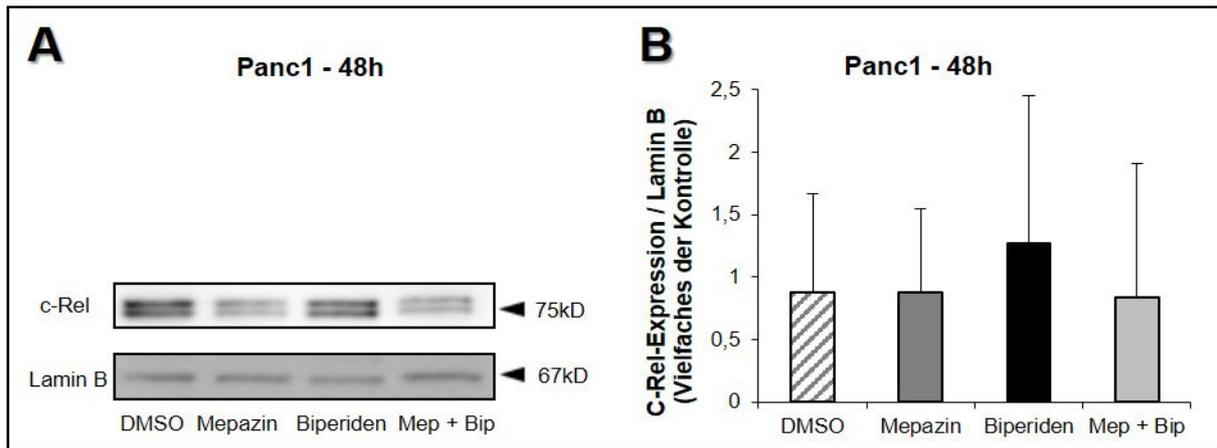


Abbildung 10: c-Rel Quantität nach 48 Stunden Behandlung mit DMSO, Mepazin und Biperiden und der Kombination aus Mepazin und Biperiden. In A) wird ein repräsentativer Blot nach 48 Stunden Behandlung dargestellt. B) zeigt die densitometrische Auswertung aller Western Blots nach 48 Stunden Behandlung.

In Abbildung 10A wird ein repräsentativer Western Blot dargestellt, Abbildung 10B zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrischen Auswertung aller Western Blots nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden.

Die Versuche ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse, jedoch schien es bei einer Behandlungsdauer von 48 Stunden keinen Unterschied in der Quantität von c-Rel im Nucleus unter der Behandlung mit Mepazin und der Kombination aus Mepazin und Biperiden im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zu geben. Bei der Behandlung mit Biperiden fand sich eher eine leichte Zunahme in der Quantität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

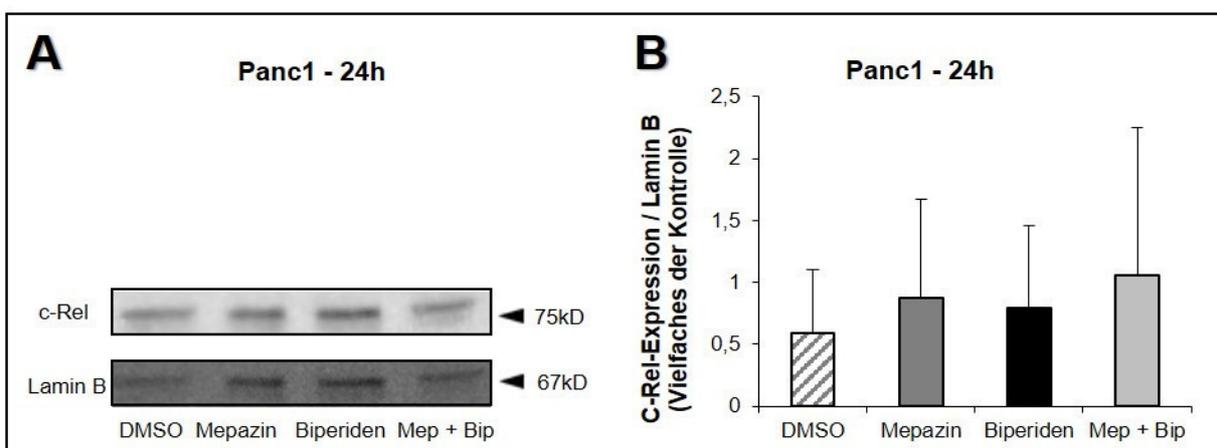


Abbildung 11: Quantität von c-Rel nach 24 Stunden Behandlung mit DMSO, Mepazin und Biperiden und der Kombination aus Mepazin und Biperiden. A) Im Western Blot zeigt sich eine Zunahme der c-Rel Quantität bei allen Behandlungen verglichen mit der DMSO-Gruppe. B) Die densitometrische Auswertung bestätigt die subjektive Wahrnehmung.

Auch in Abbildung 11A wird ein repräsentativer Western Blot dargestellt und Abbildung 11B zeigt ebenfalls die Mittelwerte mit Standardabweichungen, in diesem Falle werden aber die Werte nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden angezeigt. Auch hier konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse generiert werden. Die Resultate ließen aber die Vermutung zu, dass sowohl bei Biperiden als auch bei Mepazin eine höhere c-Rel Quantität im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegt. Auch bei der Kombination aus Mepazin und Biperiden nahm die Quantität von c-Rel im Zellkern im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zu.

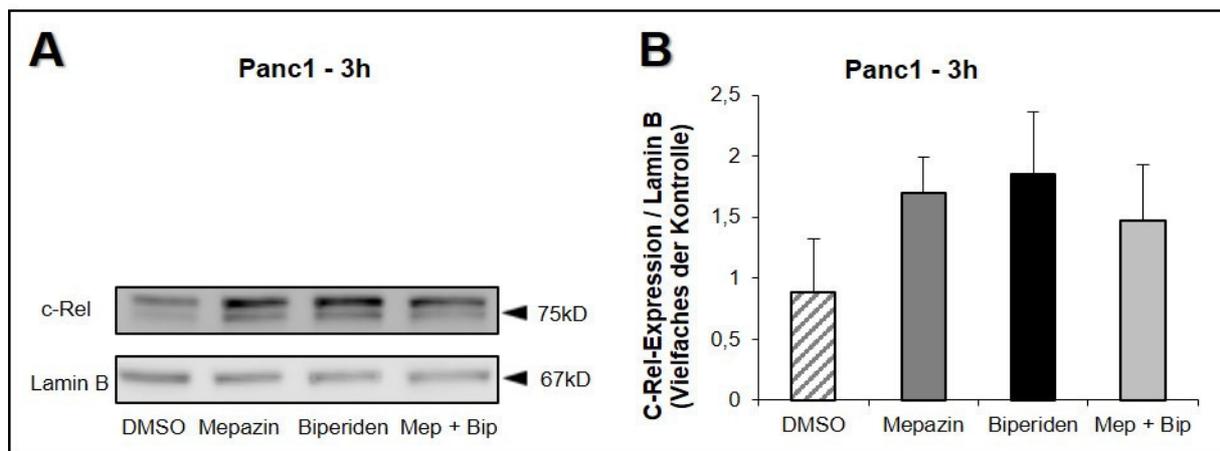


Abbildung 12: Quantität von c-Rel nach 3 Stunden Behandlung mit DMSO, Mepazin, Biperiden und der Kombination aus Mepazin und Biperiden. A) Im Western Blot zeigt sich eine Zunahme der c-Rel Quantität bei allen Behandlungen verglichen mit der DMSO-Kontrollgruppe. B) Die densitometrische Auswertung bestätigt die Aussage.

Abbildung 12 liegen die Werte zugrunde, die sich nach einer dreistündigen Behandlung zeigten. Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Behandlungen. Bei einer Behandlungsdauer von drei Stunden zeigten die Zellen, die mit Mepazin und Biperiden behandelt wurden, signifikant mehr c-Rel im Nukleus als jene, die mit DMSO behandelt wurden. Auch bei der Behandlung mit der Kombination aus Mepazin und Biperiden, fand sich eine größere Menge von c-Rel im Zellkern, diese Beobachtung erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant ($p = 0,127$).

4.2.2 C-Rel Quantität nach 15 Minuten Behandlungsdauer der Zelllinie Panc-1

In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse und unter Berücksichtigung zellphysiologischer Aspekte wurde nun noch eine deutlich kürzere Inkubationszeit gewählt.

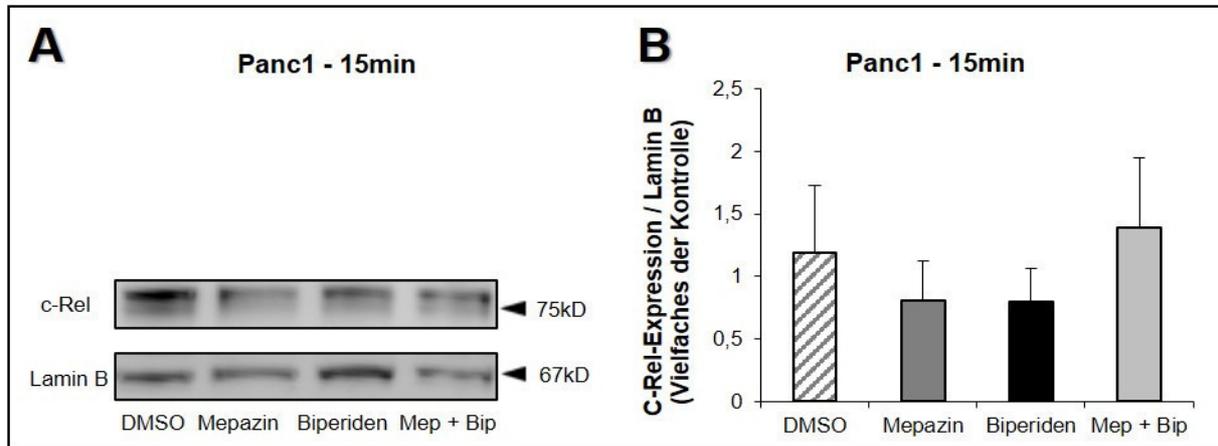


Abbildung 13: Quantität von c-Rel nach 15 Minuten Behandlung mit DMSO, Mepazin, Biperiden und der Kombination aus Mepazin und Biperiden. A) Im Western Blot zeigt sich eine Abnahme der c-Rel Quantität bei allen Behandlungen. B) Die densitometrische Auswertung bestätigt die subjektive Einschätzung in diesem Fall nicht.

Nach einer Behandlungsdauer von 15 Minuten nahm die Quantität von c-Rel bei den Behandlungen mit Mepazin und Biperiden im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich ab, wie der Abbildung 13 zu entnehmen ist. Bei den Zellen, die mit Biperiden oder Mepazin behandelt wurden ergab sich eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Abnahme von c-Rel im Zellkern.

Es zeichnete sich bei der Behandlungsdauer von 15 Minuten im Zellkultursetting eine Wirksamkeit von Mepazin und Biperiden hinsichtlich der Reduktion des nukleären c-Rel ab. Bei der Kombination aus beiden Medikamenten zeigte sich wieder eine leichte Zunahme der Quantität von c-Rel im Zellkern, diese ließ sich jedoch statistisch nicht belegen.

4.2.3 C-Rel Quantität nach 15 Minuten Behandlungsdauer der Zelllinie L3.6pl Res

Zum Vergleich wurde nun der gleiche Versuch mit der Zelllinie L3.6pl Res durchgeführt.

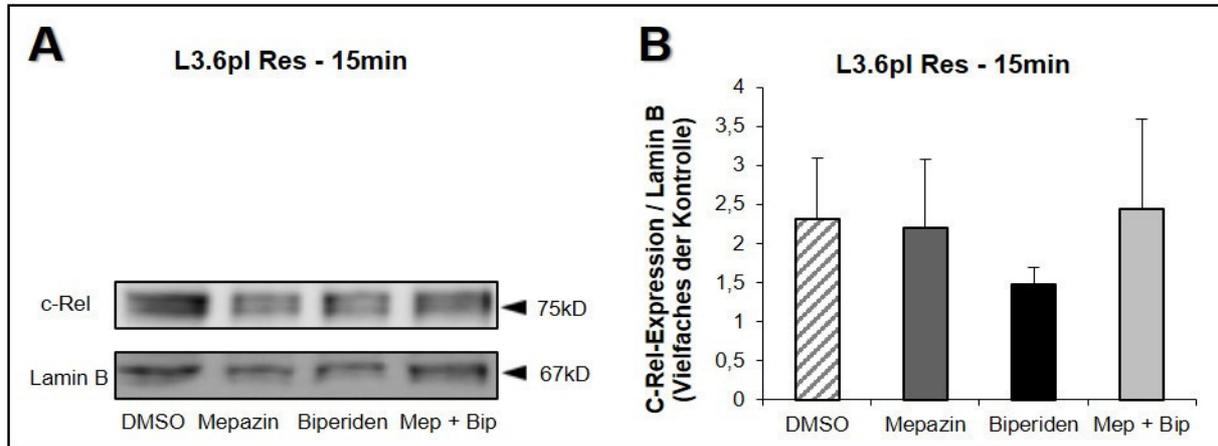


Abbildung 14: Quantität von c-Rel nach 15 Minuten Behandlung mit DMSO, Mepazin, Biperiden und der Kombination. A) Western Blot B) Bei der densitometrischen Auswertung, zeigt sich eine Abnahme der c-Rel Quantität unter der Behandlung mit Mepazin und Biperiden.

Nach der fünfzehnminütigen Behandlung der Zelllinie L3.6pl Res zeigte sich, wie aus Abbildung 14 ersichtlich, bei der Behandlung mit der Kombination aus Mepazin und Biperiden ebenfalls eine leichte Zunahme von c-Rel im Zellkern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter der Behandlung mit Biperiden und Mepazin zeigte sich ebenfalls die Tendenz, dass weniger c-Rel nach Hemmung von MALT1 in den Zellkern transloziert. Jedoch war auch dieses Ergebnis statistisch nicht belegbar und weniger eindeutig als bei der zuvor getesteten Zelllinie Panc-1.

5 Diskussion

Die Mitglieder der Rel/NF- κ B-Familie spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort, außerdem sind sie essentiell für das Überleben, Wachstum und die Proliferation von Zellen und scheinen darüber hinaus eine Rolle in der Genese von Tumoren, wie zum Beispiel des Pankreaskarzinoms, zu spielen (Bonizzi u. Karin, 2004; Kallifatidis et al., 2011; Zhang u. Ghosh, 2001).

Das Pankreaskarzinom ist eine der prognostisch ungünstigsten Tumorerkrankungen und die vierthäufigste Krebstodesursache in den westlichen Ländern, es zeichnet sich durch ein aggressives Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung und eine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie aus. Um eine spezifische Therapie zu entwickeln, die gezielt auf die Krebszellen wirkt, sind genaue Kenntnisse der molekularen Vorgänge in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms erforderlich (Lesina, 2013). In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob bei Inhibition von MALT1 in den Zellen des Pankreaskarzinoms die Translokation des Protoonkogens c-Rel in den Kern abnimmt.

5.1 Einfluss der NF- κ B-Subfamilie c-Rel auf die Apoptose von Tumorzellen

C-Rel spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Antiapoptose von Zellen und damit auch für die Entstehung von Tumoren (Geismann et al., 2014; Gilmore u. Gerondakis, 2011; Gilmore et al., 2004). C-Rel begünstigt das Überleben von B Zellen, indem es durch die direkte Induktion von Genen einen intrinsischen „death-pathway“, welcher zur Apoptose der Zellen führen würde, hemmt. Wenn c-Rel nicht vorhanden ist bzw. nicht an seinen Wirkort im Zellkern transloziert wird, zeigen aktivierte B-Zellen eine erhöhte Apoptoseaktivität (Gerondakis et al., 2006; Gilmore u. Gerondakis, 2011; Grumont et al., 1999; Grumont et al., 1998). C-Rel scheint auch in transformierten Pankreaszellen für die Unterbindung der Apoptose verantwortlich zu sein. Kallifatidis et al. haben in diesem Zusammenhang 2011 das bekannte Chemotherapeutikum Gemcitabin mit Sulforaphan kombiniert und festgestellt, dass die Sensitivität der Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose erhöht wurde und somit vermehrt Apoptose stattfinden konnte. Dies führten sie auf eine Herabregulierung von c-Rel zurück (Kallifatidis et al., 2011).

Geisman et al. haben sich in ihren Untersuchungen ebenfalls intensiv mit der Rolle von c-Rel bei der TRAIL-induzierten Apoptose beschäftigt und konnten bestätigen, dass c-Rel ein Mediator für einen antiapoptotischen Signalweg ist, der die Zellen des PDACs vor TRAIL-induzierter Apoptose schützt (Geismann et al., 2014). Die antiapoptotischen Eigenschaften von c-Rel erklären sich auch aus der Tatsache, dass Gene, wie TRAF1 und Prosurvivalfaktoren der Bcl-2 Familie, wie Bcl-x_L und Bfl-1/A1, von c-Rel gebunden werden. Diese Gene sind involviert in Zellwachstum und -proliferation (Gilmore et al., 2004). Eine spezifische Inhibition von c-Rel durch unterschiedliche Mechanismen ist anzustreben. Denkbar wäre eine Herabregulation der c-Rel Expression (z.B. durch siRNA) oder auch die direkte Unterbindung der Aktivität von c-Rel. Auch die Inhibition eines Proteins wie beispielsweise MALT1, welches notwendig ist für die Expression oder Aktivierung von c-Rel, ist als therapeutischer Ansatz vorstellbar (Gilmore u. Gerondakis, 2011).

5.2 MALT1-c-Rel-Interaktion

MALT1 als Bestandteil des CBM-Komplexes, induziert den IKK-Komplex, welcher das c-Rel inhibierende I κ B phosphoryliert und so zur proteasomalen Degradation vorbereitet. Wenn c-Rel nicht mehr durch I κ B inhibiert wird, kann es in den Zellkern translozieren (Gilmore et al., 2004; Nagel, 2014) und dort Gene induzieren, die in Zellwachstum und -proliferation involviert sind (Gilmore et al., 2004). Arbeiten von Ferch et al. mit B-Zellen belegen, dass weniger c-Rel in den Zellkern gelangt, wenn MALT1 nicht vorhanden ist. Daraus folgt, dass die von c-Rel induzierten antiapoptotischen Prozesse nicht mehr stattfinden können, so dass die Zellen wieder dem programmierten Zelltod unterliegen (Ferch et al., 2007). Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal konnten zeigen, dass MALT1 in den Zellen des PDAC exprimiert wird, nicht aber in den Zellen des gesunden exokrinen Pankreasgewebes (Paper eingereicht).

Da besonders für die Therapie des Pankreaskarzinoms Innovationen dringend erforderlich sind, war es interessant zu untersuchen, ob durch die Inhibition des Proteins MALT1 in Pankreaskarzinomzellen ebenfalls weniger c-Rel in den Zellkern transloziert. Daher beschäftigte sich diese Arbeit zum einen mit dem Einfluss der Medikamente Mepazin und Biperiden auf die Aktivität von MALT1 und zum anderen auf die Translokation von c-Rel in den Zellkern.

5.2.1 MALT1 Aktivität

Um zu zeigen, dass Mepazin in den Zellen des Pankreaskarzinoms die gleiche Wirkung auf die MALT1 Aktivität hat, wie schon in anderen Studien mit Lymphomzellen bewiesen (Nagel et al., 2012; Schlauderer et al., 2013), wurde ein Enzym-Aktivitätsassay durchgeführt. Bei den Versuchen der Arbeitsgruppe um Dr. Nagel (2014) nahm die MALT1-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Mepazin ab. Da die Arbeitsgruppe um Dr. A. T. El Gammal Biperiden eine ebenfalls MALT1-hemmende Wirkung zuschrieben, wurden die Versuche der Arbeitsgruppe auch mit diesem Medikament durchgeführt. Die Hemmung mit Mepazin ist reversibel und nicht kompetitiv (Nagel, 2014), das heißt, dass Prozesse in den Zellen nach einer gewissen Zeit wieder stattfinden können. Aus den Versuchen mit der Zelllinie Panc-1 ging hervor, dass anders als erwartet, die Aktivität von MALT1 bei allen Behandlungszeiten, die länger als zwei Stunden dauerten eher zunahm, lediglich nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit Biperiden ergab sich eine leichte Abnahme der MALT1-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Zelllinie L3.6pl Res zeigte sich die Tendenz, dass die Aktivität von MALT1 im Vergleich zur Kontrollgruppe abnimmt. Allerdings konnten diese Beobachtungen nicht statistisch belegt werden, woraus folgt, dass statistisch gesehen in dem Aktivitätsassay kein Unterschied in den vier Behandlungsformen in Bezug auf die Aktivität von MALT1 nachweisbar ist. Die darüber hinaus beobachteten interexperimentellen Ergebnisvarianzen könnten an grundsätzlichen technisch experimentellen Schwächen liegen.

5.2.2 C-Rel Kerntranslokation

In vorherigen Untersuchungen mit Lymphozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Deaktivierung von MALT1 eine verminderte c-Rel Kerntranslokation zur Folge hat (Ferch et al., 2009; Ferch et al., 2007). Diese verminderte Kerntranslokation sollte in dieser Arbeit nun auch für die Zellen des Pankreaskarzinoms gezeigt werden. Dabei sollte MALT1 aber nicht ausgeschaltet, sondern durch die Medikamente Mepazin und Biperiden inhibiert werden.

Obwohl die Wirksamkeit der Medikamente in den Versuchen zur MALT1-Aktivität in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde an der Hypothese festgehalten, dass sie MALT1 inhibieren und dadurch weniger c-Rel in den Zellkern von PDACs translozieren kann.

5.2.3 Kein nachweisbarer Effekt nach Behandlungszeiten von 48, 24 und drei Stunden

Nach einer Behandlungsdauer von 48 bzw. 24 Stunden ergaben sich große interexperimentelle Ergebnisunterschiede. Die Intensität der c-Rel Banden war trotz gleicher Versuchsanordnung, Dauer und Behandlungsart bei jeder Versuchsdurchführung verschieden. Beispielsweise ergab sich nach der Behandlung mit Mepazin einmal eine deutliche Zunahme der c-Rel Bandenintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe und ein andermal ergab sich eine erhebliche Abnahme der Intensität. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei allen anderen Behandlungen. Eine mögliche Erklärung für diese große Varianz könnte sein, dass die durch den Einfluss der Medikamente auf die Aktivität von MALT1 entstandenen Prozesse in den Zellen schon lange abgelaufen waren. Hierfür spricht, dass die Hemmung von MALT1 durch Mepazin reversibel und nicht kompetitiv ist (Nagel, 2014). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für Biperiden ähnliche Bedingungen gelten. Nach einer dreistündigen Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der c-Rel Quantität im Zellkern. Dieser Beobachtung könnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus zu Grunde liegen.

5.2.4 Positiver Effekt nach einer Behandlungsdauer von 15 Minuten

Die von uns postulierte Hypothese bestätigte sich erst nachdem die Zellen nur für einen Zeitraum von 15 Minuten behandelt wurden. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich nach der Behandlung mit Mepazin und Biperiden signifikant weniger c-Rel im Nukleus der Zellen der Zelllinie Panc-1 befand.

Die gleichen Experimente mit der anderen von uns verwendeten Zelllinie, L3.6pl Res lieferten ähnliche, jedoch weniger eindeutige und statistisch nicht signifikante Ergebnisse: Die mit Biperiden behandelten Zellen zeigten ebenfalls eine inhibierende Tendenz auf die Translokation von c-Rel in den Zellkern, ebenso auch die Zellen, die mit Mepazin behandelt wurden. Die Zellen die mit der Kombination beider Medikamente behandelt wurden zeigten eine leichte Erhöhung der c-Rel Quantität im Zellkern im Vergleich mit der DMSO-Kontrollgruppe. Diese verminderte Auswirkung der Medikamente auf die Zelllinie L3.6pl Res lässt sich durch den Effekt erklären, dass die MALT1-Inhibition auch in den MALT1-Aktivitätsassays nach Gabe von Biperiden und Mepazin deutlich schwächer bei L3.6pl Res ausfiel als bei den ebenfalls getesteten Panc-1 Zellen.

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Wirkstoffe in unterschiedlichen Zelllinien divergente Wirkprofile aufweisen. Dafür verantwortlich sein könnte ein im Zuge der Tumorgenese verändertes Expressionsmuster, was zum Beispiel die Aufnahme, Metabolisierung oder Ausschleusung eines Medikamentes beeinflusst.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich ebenfalls diskutieren, ob die quantitative Auswertung der Western Blots unter Zuhilfenahme der Densitometrie als bestmögliche Auswertungsmethode geeignet ist. Es gab Unterschiede in der Belichtungszeit, die die Intensität der densitometrisch ausgewerteten Banden beeinflusst, außerdem variierte von Western Blot zu Western Blot die Breite der Banden und somit ergaben sich teils falsch hohe oder falsch niedrige Werte für die Intensität. Auch die Korrektur des Hintergrundes der auszuwertenden Membranen ist nicht vollständig möglich, da es an jeder Stelle der Membran zu unterschiedlichen Intensitäten kommt und je nach dem für welche Stelle man sich entscheidet zu viel oder zu wenig Hintergrundintensität von der Bandenintensität abgezogen wird.

Dennoch erlauben die von mir gemachten Beobachtungen und die Tatsache, dass die Kerntranslokation von c-Rel mit der Antiapoptose in PDAC Zellen und mit der Proliferation von B- und T-Zellen in Verbindung gebracht wird (Geismann et al., 2014; Gilmore et al., 2004), die Vermutung, dass durch eine medikamentöse Behandlung mit Mepazin oder Biperiden die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen gestoppt wird und die Apoptose wieder stattfinden kann.

Diese für die Panc-1 und L3.6pl Res Zellen gezeigten Ergebnisse lassen auf die Entwicklung neuer Therapiekonzepte hoffen.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Tumorerkrankungen und zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung, eine schlechte Prognose und eine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie aus. Um alternative Therapiemöglichkeiten zu finden, werden zunehmend molekulare Vorgänge in der Zelle untersucht und das komplexe Netzwerk der Signalwege analysiert. Diese Arbeit möchte dazu einen Beitrag leisten indem es die Inhibierbarkeit von MALT1 und dessen Auswirkung auf die c-Rel Kerntranslokation untersucht.

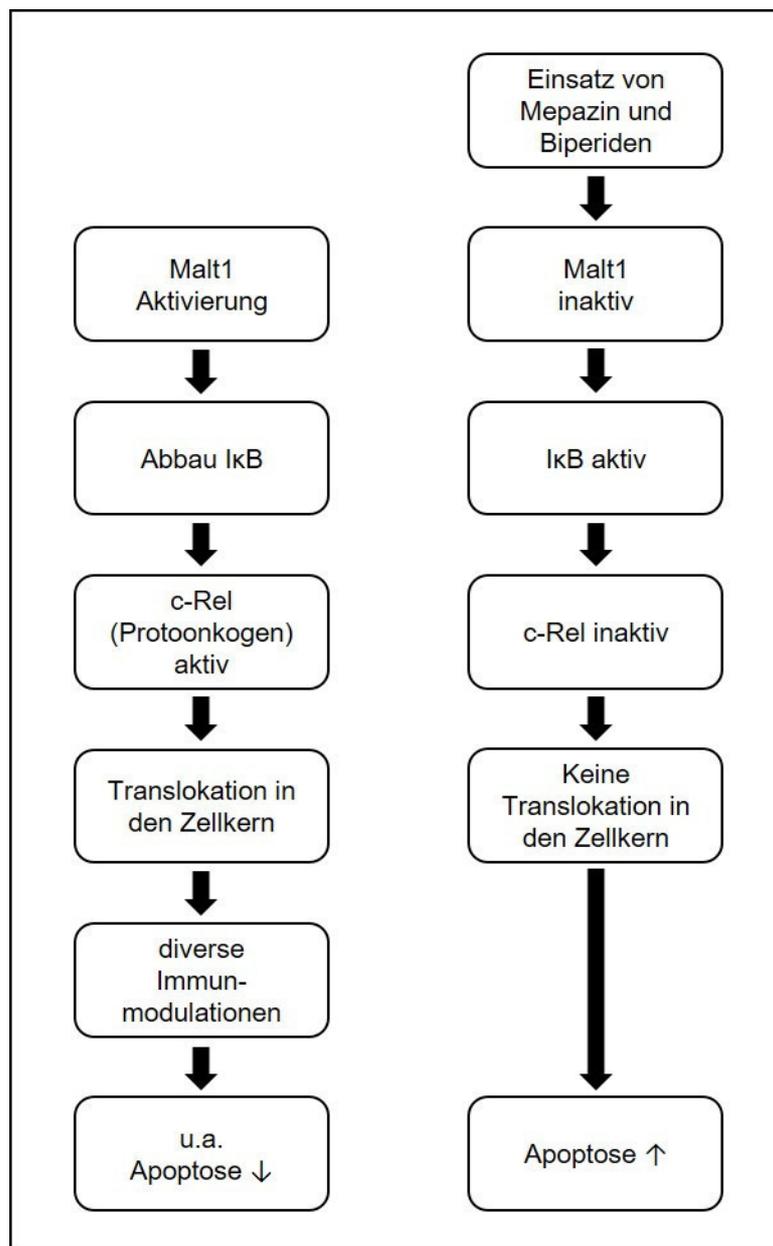


Abbildung 15: c-Rel Signalweg und vermutete Folgen der Inhibierung durch Mepazin und Biperiden

Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie sind von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort, bei Entzündungsvorgängen und bei der Entwicklung des Immunsystems aber auch für die Entstehung von Tumoren. Unter dem Namen NF- κ B werden die Proteine RelA, RelB und c-Rel, p105 (NF- κ B1), p100 (NF- κ B2), welche Vorstufen von p50 und p52 sind, zusammengefasst. Diese NF- κ B-Untereinheiten bilden Dimere und befinden sich im Zytoplasma, durch Bindung an I κ B-Proteine, in einem inaktiven Zustand. Durch die Parakaspase MALT1 zusammen mit Bcl10 und CARD11 wird der IKK-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ , aktiviert. Dieser Komplex phosphoryliert die I κ B-Proteine, die dann durch Ubiquitinylierung zum Abbau durch das Proteasom markiert werden. So werden NF- κ B-Dimere freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische responsive Elemente der DNA die Genexpression beeinflussen können. Eine vereinfachte Darstellung des c-Rel Signalweges und der vermuteten Folgen der Inhibierung von MALT1 auf diesen Signalweg sind in Abbildung 15 zu finden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Wirksamkeit der Medikamente Mepazin, Biperiden und der Kombination aus beiden Wirkstoffen auf die Parakaspase MALT1 in den Zellen des Pankreaskarzinoms nachzuweisen. Hierfür wurde ein MALT1-Aktivitätsassay durchgeführt, der die proteolytische Aktivität von MALT1 misst. Es wurde erwartet, dass die proteolytische Aktivität in den Zellen nach Mepazin- und Biperidenbehandlung geringer ausfällt als in den Zellen der DMSO-Kontrollgruppe.

Zur Untersuchung der Kerntranslokation wurden die Zellen unterschiedlich lange mit Mepazin, Biperiden und der Kombination beider Wirkstoffe behandelt. Anhand von Kernfraktionierung und anschließendem Western Blot wurde die Quantität von c-Rel im Zellkern bestimmt. Als Resultat zeigte sich, dass nach fünfzehnminütiger Behandlung mit Biperiden und auch mit Mepazin signifikant weniger c-Rel im Zellkern zu finden war. Hier bestätigte sich die Arbeitshypothese und legt die Vermutung nahe, dass durch Biperiden und Mepazin MALT1 gehemmt wird und dadurch weniger c-Rel in den Zellkern translozieren kann, wodurch die antiapoptotische Wirkung von c-Rel ausbleibt und die Pankreaskarzinomzellen vermehrt in Apoptose gehen.

Auch für die weitere von uns untersuchte Zelllinie L3.6pl Res zeigte sich nach der Behandlung mit Biperiden und Mepazin eine inhibierende Tendenz auf die c-Rel-Kerntranslokation. Wie sich schon bei den Panc-1 Zellen zeigt, erfolgt auch bei den L3.6pl Res Zellen bei der Behandlung mit der Kombination aus beiden Medikamenten eher eine Zunahme der Quantität von c-Rel im Zellkern.

Diese Ergebnisse könnten richtungsweisend sein und Ansatzpunkte für die Entwicklung therapeutischer Konzepte für das Pankreaskarzinom und andere maligne Erkrankungen liefern.

7 Summary

Pancreatic cancer is one of the most aggressive types of cancer and is particularly dangerous because of its quick growth and early metastases. Patients affected by pancreatic cancer have a poor prognosis due to the high resistance to chemo- and radiotherapy. Alternative treatment options are urgently needed and many intracellular molecular pathways are being studied to understand the complex cellular signaling pathways. This thesis tries to contribute to the understanding and treatment of this particular kind of cancer by investigating the susceptibility to inhibition of MALT1 and the impact of this inhibition on the nuclear translocation of the antiapoptotic transcription factor c-Rel.

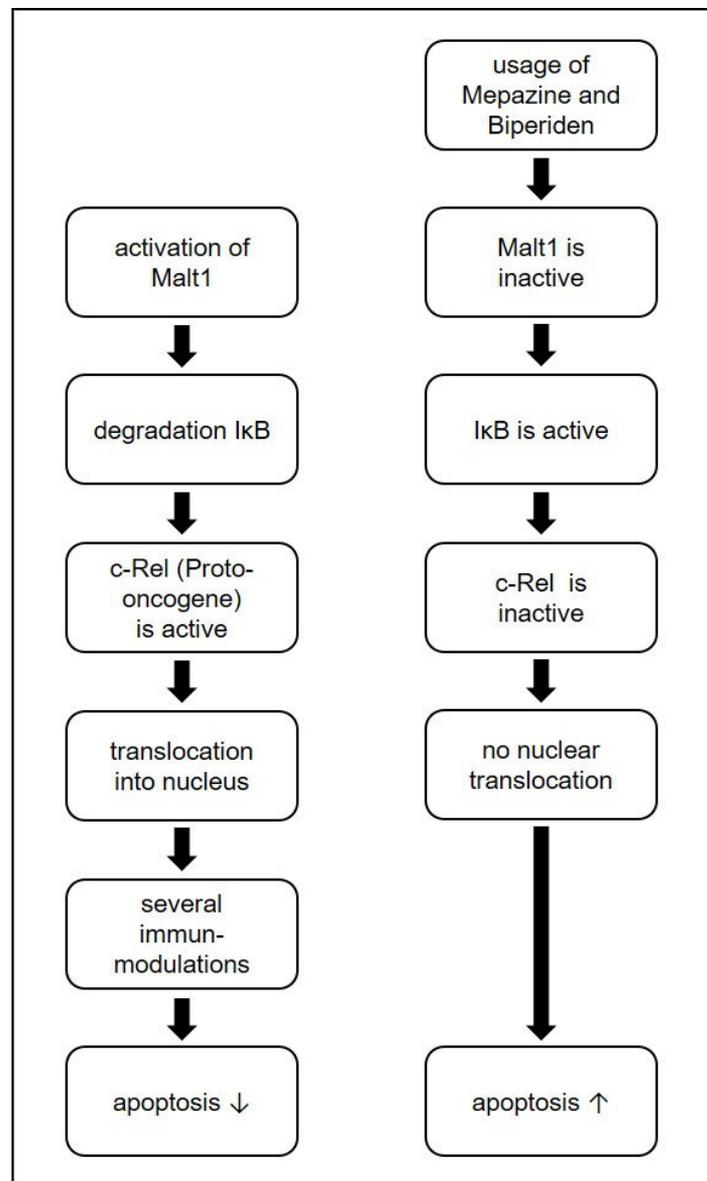


Abbildung 16: Signaling pathway of c-Rel and assumed results of inhibition of MALT1 by Mepazine and Biperiden

The transcription factors of the NF- κ B family are of central importance to the regulation of immune responses, to inflammatory processes, and to the development of the immune system. However, they also play a vital role in the development of tumors.

NF- κ B consists of many subunits such as RelA, RelB, c-Rel and p105 (NF- κ B1) and p100 (NF- κ B2) which are precursors of p50 and p52. These subunits form dimeric structures which are, bound to I κ B proteins, located inactively in the cytoplasm. The activation of these NF- κ B subunits occurs when paracaspase MALT1 forms the so called IKK-complex by uniting with Bcl10 and CARD11. This IKK-complex consists of three subunits IKK α , IKK β und IKK γ . It phosphorylates the inactivating I κ B proteins which in turn results in their ubiquitination to indicate the degradation of these I κ B proteins by the proteasome. Now, the NF- κ B subunits are no longer inactivated and are free to translocate to the nucleus regulating the gene expression by binding to specific responsive elements.

One aspiration of this thesis was to proof the inhibitory effects of the drugs Mepazine and Biperiden on paracaspase MALT1 in pancreatic cancer cell lines. In order to do so a MALT1 activity assay which measures the proteolytic activity of MALT1 was performed. It was expected to see a lower proteolytic activity in cells treated with the drugs Mepazine and Biperiden compared to the ones that were treated with the carrier substance DMSO.

To examine the nuclear translocation of c-Rel two different cell lines, Panc-1 and L3.6pl Res, were treated for different periods of time with the above mentioned drugs. By performing nuclear fractionation and subsequent western blotting the quantity of c-rel in the nucleus was measured.

As a result, the experiments showed that after the treatment with Biperiden and Mepazine for 15 minutes there was a significant smaller amount of c-Rel in the nuclear fraction than in the cells of the Panc-1 cell line which were treated with DMSO.

The working hypothesis was confirmed and it was assumed that by treating the cells with Mepazine and Biperiden MALT1 is inhibited and therefore less c-Rel is able to translocate to the nucleus. This entails in the absence of the antiapoptotic effect of c-Rel and thus pancreatic cancer cells will be able to undergo apoptosis again.

Also for the other examined cell line, L3.6pl Res, it was possible to show an inhibiting tendency to the nuclear translocation of c-rel after treating the cells with Mepazine and Biperiden individually. The result of these tests showed that the treatment with the combination of Biperiden and Mepazine causes for an increase of c-rel in the nucleus in both investigated cell lines. Figure 16 (Abbildung 16) shows a simplified version of the c-Rel signaling pathway and the assumed results of an inhibition of MALT1 in relation to this pathway.

The outcomes of this thesis could be pioneering and deliver starting points for the development of new treatment options for pancreatic cancer and other malignant diseases.

8 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivatorprotein-1
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-CLL/Lymphom-2
Bcl-10	B-CLL/Lymphom-10
B-CLL	B-zelluläre chronisch lymphatische Leukämie
BCR	B-Zell Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CARD11	Kaspase-Rekrutierungs-Domäne 11
CARMA1	CARD Containing MAGUK Protein 1
CBM	CARMA1/BCL10/MALT1
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DMEM	Dulbecco's Modified Adler (Eagle) Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAGUK	Membrane Associated Guanylate Kinase

MALT1	Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Gen 1
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
p16 (CDK-Inhibitor 2A)	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
p53	Phosphoprotein p53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
pH	$-\log (H^+)$
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
RFU	Relative Fluorescent Unit
RHD	Rel Homologie Domain
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween
TAD	Transkriptionsaktivierungs Domäne
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNM	Primary Tumor, Regional Lymph Nodes, Distant Metastases
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
Trizma®	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union International contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot

9 Referenzen

- Akada, M., Crnogorac-Jurcevic, T., Lattimore, S., Mahon, P., Lopes, R., Sunamura, M., Matsuno, S., Lemoine, N. R. 2005. Intrinsic Chemoresistance to Gemcitabine Is Associated with Decreased Expression of Bnip3 in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 3094-3101.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., Staudt, L. M. 2000. Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling. *Nature*, 403, 503-511.
- Baeuerle, P. A., Henkel, T. 1994. Function and Activation of Nf-Kappa B in the Immune System. *Annu Rev Immunol*, 12, 141-179.
- Banerjee, A., Grumont, R., Gugasyan, R., White, C., Strasser, A., Gerondakis, S. 2008. Nf-Kb1 and C-Rel Cooperate to Promote the Survival of Tlr4-Activated B Cells by Neutralizing Bim Via Distinct Mechanisms. *Blood*, 112, 5063-5073.
- Barbie, D. A., Tamayo, P., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Moody, S. E., Dunn, I. F., Schinzel, A. C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., Frohling, S., Chan, E. M., Sos, M. L., Michel, K., Mermel, C., Silver, S. J., Weir, B. A., Reiling, J. H., Sheng, Q., Gupta, P. B., Wadlow, R. C., Le, H., Hoersch, S., Wittner, B. S., Ramaswamy, S., Livingston, D. M., Sabatini, D. M., Meyerson, M., Thomas, R. K., Lander, E. S., Mesirov, J. P., Root, D. E., Gilliland, D. G., Jacks, T., Hahn, W. C. 2009. Systematic Rna Interference Reveals That Oncogenic Kras-Driven Cancers Require Tbk1. *Nature*, 462, 108-112.
- Biankin, A. V., Kench, J. G., Dijkman, F. P., Biankin, S. A., Henshall, S. M. 2003. Molecular Pathogenesis of Precursor Lesions of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pathology*, 35, 14-24.
- Boelens, M. C., Kok, K., van der Vlies, P., van der Vries, G., Sietsma, H., Timens, W., Postma, D. S., Groen, H. J., van den Berg, A. 2009. Genomic Aberrations in Squamous Cell Lung Carcinoma Related to Lymph Node or Distant Metastasis. *Lung Cancer*, 66, 372-378.
- Bolden, C., Cusack, B., Richelson, E. 1992. Antagonism by Antimuscarinic and Neuroleptic Compounds at the Five Cloned Human Muscarinic Cholinergic Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 260, 576-580.
- Bonizzi, G., Karin, M. 2004. The Two Nf-Kappab Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Trends Immunol*, 25, 280-288.
- Bruns, C. J., Harbison, M. T., Kuniyasu, H., Eue, I., Fidler, I. J. 1999. In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Neoplasia*, 1, 50-62.

- Caspritz, S., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U., Kaatsch, P., Spix, C. 2015. *Krebs in Deutschland 2011/2012*, Robert Koch-Institut. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. .
- Chen, F. E., Ghosh, G. 1999. Regulation of DNA Binding by Rel/Nf-Kappab Transcription Factors: Structural Views. *Oncogene*, 18, 6845-6852.
- Cho, J. H., Brant, S. R. 2011. Recent Insights into the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 140, 1704-1712.
- Dahl, S. G., Hough, E., Hals, P. A. 1986. Phenothiazine Drugs and Metabolites: Molecular Conformation and Dopaminergic, Alpha Adrenergic and Muscarinic Cholinergic Receptor Binding. *Biochem Pharmacol*, 35, 1263-1269.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., Marynen, P. 1999. The Apoptosis Inhibitor Gene Api2 and a Novel 18q Gene, Mlt, Are Recurrently Rearranged in the T(11;18)(Q21;Q21) Associated with Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas. *Blood*, 93, 3601-3609.
- Esposito, I., Kleeff, J., Bergmann, F., Reiser, C., Herpel, E., Friess, H., Schirmacher, P., Buchler, M. W. 2008. Most Pancreatic Cancer Resections Are R1 Resections. *Ann Surg Oncol*, 15, 1651-1660.
- Eyre, S., Hinks, A., Flynn, E., Martin, P., Wilson, A. G., Maxwell, J. R., Morgan, A. W., Emery, P., Steer, S., Hocking, L. J., Reid, D. M., Harrison, P., Wordsworth, P., Thomson, W., Worthington, J., Barton, A. 2010. Confirmation of Association of the Rel Locus with Rheumatoid Arthritis Susceptibility in the Uk Population. *Ann Rheum Dis*, 69, 1572-1573.
- Ferch, U., Kloo, B., Gewies, A., Pfander, V., Duwel, M., Peschel, C., Krappmann, D., Ruland, J. 2009. Inhibition of Malt1 Protease Activity Is Selectively Toxic for Activated B Cell-Like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *J Exp Med*, 206, 2313-2320.
- Ferch, U., zum Buschenfelde, C. M., Gewies, A., Wegener, E., Rauser, S., Peschel, C., Krappmann, D., Ruland, J. 2007. Malt1 Directs B Cell Receptor-Induced Canonical Nuclear Factor-Kappab Signaling Selectively to the C-Rel Subunit. *Nat Immunol*, 8, 984-991.
- Fontan, L., Melnick, A. 2013. Molecular Pathways: Targeting Malt1 Paracaspase Activity in Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 19, 6662-6668.
- Fryer, R. A., Barlett, B., Galustian, C., Dalgleish, A. G. 2011. Mechanisms Underlying Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer and Sensitisation by the ImidTM Lenalidomide. *Anticancer research*, 31, 3747-3756.
- Geismann, C., Grohmann, F., Sebens, S., Wirths, G., Dreher, A., Häslar, R., Rosenstiel, P., Hauser, C., Egberts, J., Trauzold, A. 2014. C-Rel Is a Critical Mediator of Nf-Kb-Dependent Trail Resistance of Pancreatic Cancer Cells. *Cell death & disease*, 5, e1455.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., Banerjee, A. 2006. Unravelling the Complexities of the Nf-Kb Signalling Pathway Using Mouse Knockout and Transgenic Models. *Oncogene*, 25, 6781-6799.
- Ghosh, S., Hayden, M. S. 2008. New Regulators of Nf-Kappab in Inflammation. *Nat Rev Immunol*, 8, 837-848.

- Gilbert, K., Mishra, G. 2006. Pancreatic Cancer: Epidemiology and Pathology. *Practical Gastroenterology*, 30, 22.
- Gilmore, T. D. 2006. Introduction to Nf-Kappab: Players, Pathways, Perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-6684.
- Gilmore, T. D., Gerondakis, S. 2011. The C-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer*, 2, 695-711.
- Gilmore, T. D., Kalaitzidis, D., Liang, M. C., Starczynowski, D. T. 2004. The C-Rel Transcription Factor and B-Cell Proliferation: A Deal with the Devil. *Oncogene*, 23, 2275-2286.
- Goeppert, B., Bergmann, F. 2015. Epidemiologie Und Pathogenese Der Pankreas-Und Cholangiokarzinome. *Der Onkologe*, 21, 1011-1018.
- Gregersen, P. K., Amos, C. I., Lee, A. T., Lu, Y., Remmers, E. F., Kastner, D. L., Seldin, M. F., Criswell, L. A., Plenge, R. M., Holers, V. M., Mikuls, T. R., Sokka, T., Moreland, L. W., Bridges, S. L., Jr., Xie, G., Begovich, A. B., Siminovitch, K. A. 2009. Rel, Encoding a Member of the Nf-Kappab Family of Transcription Factors, Is a Newly Defined Risk Locus for Rheumatoid Arthritis. *Nat Genet*, 41, 820-823.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J., Gerondakis, S. 1999. Rel-Dependent Induction of A1 Transcription Is Required to Protect B Cells from Antigen Receptor Ligation-Induced Apoptosis. *Genes Dev*, 13, 400-411.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., Gerondakis, S. 1998. B Lymphocytes Differentially Use the Rel and Nuclear Factor Kappab1 (Nf-Kappab1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-Activated Cells. *J Exp Med*, 187, 663-674.
- Gungor, C., Zander, H., Effenberger, K. E., Vashist, Y. K., Kalinina, T., Izbicki, J. R., Yekebas, E., Bockhorn, M. 2011. Notch Signaling Activated by Replication Stress-Induced Expression of Midkine Drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*, 71, 5009-5019.
- Haberland, J., Wolf, U., Barnes, B., Bertz, J., Dahm, S., Laudi, A., Kraywinkel, K. 2012. Kurzfristige Prognosen Der Krebsmortalität in Deutschland Bis 2015.
- Hass, H., Klavehn, W. 1955. Über 3-Piperidino-1-Phenyl-1-Bicycloheptenyl-Propanol-(1)(Akineton). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 226, 18-35.
- Hayden, M. S., West, A. P., Ghosh, S. 2006. Nf-Kappab and the Immune Response. *Oncogene*, 25, 6758-6780.
- Heinemann, V., Boeck, S., Hinke, A., Labianca, R., Louvet, C. 2008. Meta-Analysis of Randomized Trials: Evaluation of Benefit from Gemcitabine-Based Combination Chemotherapy Applied in Advanced Pancreatic Cancer. *BMC Cancer*, 8, 82.
- Herold, G. u. M. 2013. *Innere Medizin*, Köln, Herold.
- Hidalgo, M. 2010. Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*, 362, 1605-1617.
- Howard, J. M., Hess, W. 2012. *History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ*, Springer Science & Business Media.

- 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., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, 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, 977-987.
- Isaacson, P. G., Du, M. Q. 2004. Malt Lymphoma: From Morphology to Molecules. *Nat Rev Cancer*, 4, 644-653.
- Jabara, H. H., Ohsumi, T., Chou, J., Massaad, M. J., Benson, H., Megarbane, A., Chouery, E., Mikhael, R., Gorka, O., Gewies, A., Portales, P., Nakayama, T., Hosokawa, H., Revy, P., Herrod, H., Le Deist, F., Lefranc, G., Ruland, J., Geha, R. S. 2013. A Homozygous Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1 (Malt1) Mutation in a Family with Combined Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 151-158.
- Janse, M., Lamberts, L. E., Franke, L., Raychaudhuri, S., Ellinghaus, E., Muri Boberg, K., Melum, E., Folseraas, T., Schrupf, E., Bergquist, A., Bjornsson, E., Fu, J., Jan Westra, H., Groen, H. J., Fehrmann, R. S., Smolonska, J., van den Berg, L. H., Ophoff, R. A., Porte, R. J., Weismuller, T. J., Wedemeyer, J., Schramm, C., Sterneck, M., Gunther, R., Braun, F., Vermeire, S., Henckaerts, L., Wijmenga, C., Ponsioen, C. Y., Schreiber, S., Karlsen, T. H., Franke, A., Weersma, R. K. 2011. Three Ulcerative Colitis Susceptibility Loci Are Associated with Primary Sclerosing Cholangitis and Indicate a Role for IL2, REL, and CARD9. *Hepatology*, 53, 1977-1985.
- Jost, P. J., Ruland, J. 2007. Aberrant Nf-Kb Signaling in Lymphoma: Mechanisms, Consequences, and Therapeutic Implications. *Blood*, 109, 2700-2707.
- Kallifatidis, G., Labsch, S., Rausch, V., Mattern, J., Gladkikh, J., Moldenhauer, G., Buchler, M. W., Salnikov, A. V., Herr, I. 2011. Sulforaphane Increases Drug-Mediated Cytotoxicity toward Cancer Stem-Like Cells of Pancreas and Prostate. *Mol Ther*, 19, 188-195.
- King, K. E., Ponnampereuma, R. M., Allen, C., Lu, H., Duggal, P., Chen, Z., Van Waes, C., Weinberg, W. C. 2008. The P53 Homologue Δnp63α Interacts with the Nuclear Factor-Kb Pathway to Modulate Epithelial Cell Growth. *Cancer research*, 68, 5122-5131.
- Klein, D. F. 2007. Commentary by a Clinical Scientist in Psychopharmacological Research. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*, 17, 284-287.
- Korc, M. 1998. Role of Growth Factors in Pancreatic Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 7, 25-41.
- Lesina, M. 2013. *Charakterisierung Der Funktion Des Transkriptionsfaktors Rela/P65 Im Ela-Tgfa Transgenen Mausmodell Der Pankreatischen Karzinogenese*. Technische Universität München.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J. L. 2004. Pancreatic Cancer. *Lancet*, 363, 1049-1057.
- Lippert, H. 2011. *Lehrbuch Anatomie*, München, Urban & Fischer.
- Löhr, J.-M., Heinemann, V., Frieß, H. 2003. *Pankreaskarzinom: Aktuelle Diagnostik Und Therapie*, UNI-MED-Verlag.
- Lüttges, J., Schemm, S., Vogel, I., Hedderich, J., Kremer, B., Klöppel, G. 2000. The Grade of Pancreatic Ductal Carcinoma Is an Independent Prognostic Factor and Is Superior to the Immunohistochemical Assessment of Proliferation. *The Journal of pathology*, 191, 154-161.

- Messer, G., Rupec, R. 2001. Nuklearfaktor-Kappa-B (Nf-Kb) Teil 1: Funktion Und Regulation. *Der Hautarzt*, 52, 677-685.
- Mukaida, N., Okamoto, S.-i., Ishikawa, Y., Matsushima, K. 1994. Molecular Mechanism of Interleukin-8 Gene Expression. *Journal of leukocyte biology*, 56, 554-558.
- Müller, M. 2014/15. *Chirurgie Für Studium Und Praxis*, Breisach, Dr. Müller.
- Nagel, D. 2014. *Identifikation Und Charakterisierung Niedermolekularer Malt1 Inhibitoren Zur Therapie Von Abc-Dlbcl*. Imu.
- Nagel, D., Spranger, S., Vincendeau, M., Grau, M., Raffegerst, S., Kloo, B., Hlahla, D., Neuenschwander, M., Peter von Kries, J., Hadian, K., Dorken, B., Lenz, P., Lenz, G., Schendel, D. J., Krappmann, D. 2012. Pharmacologic Inhibition of Malt1 Protease by Phenothiazines as a Therapeutic Approach for the Treatment of Aggressive Abc-Dlbcl. *Cancer Cell*, 22, 825-837.
- Ngo, V. N., Davis, R. E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L. T., Dave, S., Yang, L., Powell, J. 2006. A Loss-of-Function Rna Interference Screen for Molecular Targets in Cancer. *Nature*, 441, 106-110.
- Paulsen, F., Waschke, J. 2010. *Sobotta Atlas Der Anatomie Des Menschen. Innere Organe*, München, ©Elsevir GmbH, Urban&Fischer.
- Pehl, C., Wendl, B., Kaess, H., Pfeiffer, A. 1998. Effects of Two Anticholinergic Drugs, Trosipium Chloride and Biperiden, on Motility and Evoked Potentials of the Oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*, 12, 979-984.
- Psoriasis, C. G. A. o., Control, C. W. T. C. 2010. A Genome-Wide Association Study Identifies New Psoriasis Susceptibility Loci and an Interaction between Hla-C and Erap1. *Nature genetics*, 42, 985-990.
- Rawlings, D. J., Sommer, K., Moreno-García, M. E. 2006. The Carma1 Signaling Links the Signalling Machinery of Adaptive and Innate Immunity in Lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 6, 799-812.
- Ruefli-Brasse, A. A., French, D. M., Dixit, V. M. 2003. Regulation of Nf-Kappab-Dependent Lymphocyte Activation and Development by Paracaspase. *Science*, 302, 1581-1584.
- Ruland, J., Duncan, G. S., Wakeham, A., Mak, T. W. 2003. Differential Requirement for Malt1 in T and B Cell Antigen Receptor Signaling. *Immunity*, 19, 749-758.
- Sahora, K., Trenkwitz, D., Akan, B., Kühner, I., Götzinger, P., Gnant, M. 2008. Moderne Tumorthherapie Des Pankreaskarzinoms. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 6, 17-24.
- Schlauderer, F., Lammens, K., Nagel, D., Vincendeau, M., Eitelhuber, A. C., Verhelst, S. H. L., Kling, D., Chrusciel, A., Ruland, J., Krappmann, D., Hopfner, K.-P. 2013. Strukturelle Analyse Von Phenothiazin-Derivaten Als Allosterische Inhibitoren Der Malt1-Paracaspase. *Angewandte Chemie*, 125, 10575-10579.
- Schulte, N. 2013. *Erkrankungen Des Pankreas*, Berlin Heidelberg, Springer Verlag.
- Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E., Rougier, P. 2012. Pancreatic Adenocarcinoma: Esmo–Esdo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology*.
- Shi, Q., Le, X., Wang, B., Abbruzzese, J. L., Xiong, Q., He, Y., Xie, K. 2001. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Acidosis in Human Cancer Cells. *Oncogene*, 20, 3751-3756.
- Shin, H. M., Tilahun, M. E., Cho, O. H., Chandiran, K., Kuksin, C. A., Keerthivasan, S., Fauq, A. H., Golde, T. E., Miele, L., Thome, M. 2014. Notch1 Can Initiate Nf-Kb Activation Via Cytosolic Interactions with Components of The Cell Signalingosome. *Frontiers in immunology*, 5.

- Shipp, M. A., Ross, K. N., Tamayo, P., Weng, A. P., Kutok, J. L., Aguiar, R. C., Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, G. S. 2002. Diffuse Large B-Cell Lymphoma Outcome Prediction by Gene-Expression Profiling and Supervised Machine Learning. *Nature medicine*, 8, 68-74.
- Su, T. T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L. A., Kato, R. M., Kang, S., Patrone, L., Wall, R. 2002. Pkc-B Controls Ikb Kinase Lipid Raft Recruitment and Activation in Response to Bcr Signaling. *Nature immunology*, 3, 780-786.
- Thome, M. 2004. Carma1, Bcl-10 and Malt1 in Lymphocyte Development and Activation. *Nat Rev Immunol*, 4, 348-359.
- Trynka, G., Zhernakova, A., Romanos, J., Franke, L., Hunt, K., Turner, G., Bruinenberg, M., Heap, G., Platteel, M., Ryan, A. 2009. Coeliac Disease-Associated Risk Variants in Tnfaip3 and Rel Implicate Altered Nf-Kb Signalling. *Gut*, 58, 1078-1083.
- UICC 2017. *Tnm - Klasifikasjon Maligner Tumoren*, Wiley-VHC, Weinheim, Germany, Wittekind, Christian.
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V., Dixit, V. M. 2000. Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-Like Proteins, One of Which Plays a Key Role in Malt Lymphoma. *Molecular cell*, 6, 961-967.
- Varadé, J., Palomino-Morales, R., Ortego-Centeno, N., Díaz-Rubio, M., Fernández-Gutiérrez, B., González-Gay, M. Á., Pascual-Salcedo, D., Balsa, A., Iglesias, A., Gómez-García, M. 2011. Analysis of the Rel Polymorphism Rs13031237 in Autoimmune Diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, 70, 711-712.
- Vucic, D., Dixit, V. M. 2009. Masking Malt1: The Paracaspase's Potential for Cancer Therapy. *The Journal of experimental medicine* 206, 2309-2312.
- Zhang, G., Ghosh, S. 2001. Toll-Like Receptor-Mediated Nf-Kb Activation: A Phylogenetically Conserved Paradigm in Innate Immunity. *The Journal of clinical investigation*, 107, 13-19.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Allgemein-, Viszeral und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Eppendorf in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Dr. A. T. El Gammal durchgeführt.

Dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Jakob R. Izbicki danke ich sehr für die Überlassung des Themas. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Jakob R. Izbicki sowie dem Leiter des Labors, Herrn Dr. rer. nat. C. Güngör an dieser Stelle für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und die labor-technische Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. A. T. El Gammal. Er hat mir den Einstieg in das experimentelle Arbeiten ermöglicht und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors bedanken, ihr habt mich immer unterstützt und geholfen wo ihr konntet.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Hans O. Pinnschmidt für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Gerrit Wolters und Dr. Beate Warncke bedanken, ohne eure Gesprächsbereitschaft und qualifizierte Ratschläge und Hinweise wäre diese Arbeit niemals fertig geworden.

Besonders am Herzen liegt mir der Dank an meine Familie, ihr wart immer an meiner Seite, habt mich mental unterstützt, mich stets motiviert weiter zu machen und seid deswegen maßgeblich für das Zustandekommen dieser Arbeit verantwortlich.

11 Lebenslauf (entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 