

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Dr. h. c.

Jakob R. Izbicki

FACS FRCS ed. hon.

Hemmung der Zellproliferation und Apoptoseinduktion in humanen duktalem Pankreasadenokarzinomzellen mittels MALT1-Inaktivierung durch Biperiden und Mepazin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von

Leonie Konczalla

aus Mettingen

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.09.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Jakob R. Izbicki

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Alexander Stein

In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen
nicht irre machen lässt und die Probleme zu ehren weiß.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. ARBEITSHYPOTHESE	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Das Pankreaskarzinom	2
2.1.1. Epidemiologie	2
2.1.2. Ätiologie und Genetik	4
2.1.3. Anatomie der Pankreas	5
2.1.3.1. Embryonalentwicklung	6
2.1.3.2. Makroskopie	6
2.1.3.3. Mikroskopie	8
2.1.4. Pathologie des Pankreaskarzinoms	11
2.1.5. Symptome und klinische Diagnostik	14
2.1.5.1. Symptome	14
2.1.5.2. Klinische Diagnostik	15
2.1.5.3. Klinische Chemie	15
2.1.5.4. Bildgebende Verfahren	16
2.1.5.5. Staging	17
2.1.6. Therapie	19
2.2. Transkriptionsfaktor NF-κB	21
2.3. MALT1	22
2.4. CYLD	24
2.5. c-Rel	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. Material	26
3.1.1. Chemikalien	26
3.1.2. Puffer und Lösungen	28
3.1.3. Geräte	31
3.1.4. Kits	32
3.1.5. Gebrauchsmaterial	32
3.1.6. Software und Internetdatenbanken	33
3.1.7. Oligonukleotide	33
3.1.8. Antikörper	35
3.1.9. Zelllinien	36
3.1.10. Medien	37
3.2. Methoden	38
3.2.1. Zellbiologische Methoden	38
3.2.1.1. Kultivierung humaner Zellen	38
3.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl	38
3.2.1.3. Herstellung von Zellysaten	39
3.2.1.4. In vitro Inhibition	39
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	41
3.2.2.1. Isolation von RNA	41
3.2.2.2. Reverse Transkription - Synthese komplementärer DNA	42

3.2.2.3. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	43
3.2.3. Biochemische Methoden	45
3.2.3.1. Bicinchoninsäure (BCA) –Proteinbestimmung	45
3.2.3.2. SDS-Page (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)	45
3.2.3.3. Western Blot und Immunodetektion	46
3.2.3.4. Immunpräzipitation	38
3.2.3.5. MALT1-Aktivitätsassay	39
3.2.3.6. MTT-Test	40
3.2.3.7. Immunzytochemie	40
3.2.3.8. Apoptose Assay	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1. CYLD Expression im humanen Pankreaskarzinom	43
4.2. MALT1 Expression im humanen Pankreaskarzinom	47
4.3. MALT1 Inhibition	50
4.3.1. Zellkultur	50
4.3.2. Proliferation und Viabilität	55
4.3.3. Apoptose Assay	58
4.4. MALT1 Aktivitätsassay	60
4.5. Immunpräzipitation	63
4.5.1. MALT1 IP	63
4.5.1. TRAF6 IP	63
5. DISKUSSION	64
6. ZUSAMMENFASSUNG	72
7. ENGLISH ABSTRACT	73
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
10. OFFENLEGUNGSSCHRIFT DES PATENTS 'NEUER WIRKSTOFF ZUR BEHANDLUNG VON KREBS'	78
11. LITERATURVERZEICHNIS	98
12. DANKSAGUNG	107
13. LEBENSLAUF	108
14. ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS	109

1. Arbeitshypothese

Das Pankreaskarzinom gilt als einer der aggressivsten Tumorarten und ist die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Auch bei einer R0-Resektion des Tumors sind die Heilungschancen sehr gering. Trotz intensiver Forschungsarbeiten fehlt es bislang an einer potenten Chemotherapie, sodass rund drei Viertel der Patienten in kürzester Zeit einen Krankheitsprogress erleiden. Dies zeigt den großen Bedarf für weitere zytoreduktive Ansätze in diesem Gebiet. Ziel aktueller Forschungen ist es, neue Prozesse und Strukturen zur Hemmung des Tumorwachstums zu identifizieren und so die Heilungschancen zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit werden zur Identifizierung von geeigneten Zielstrukturen intrazelluläre Proteine der Karzinogenese untersucht.

Im Rahmen dessen zeigte sich eine bisher nicht bekannte Prozessierung des Tumorsuppressors CYLD, sodass dieses Protein in den Tumorzellen größtenteils in zerteilter und damit inaktiver Form vorliegt. Die daraus folgende Hypothese ist, dass diese Proteinzerteilung zu einer Reduktion der tumorhemmenden Wirkung von CYLD führt. Dies würde wiederum eine Unterstützung der Tumorentstehung bedeuten. In diesem Zusammenhang konnte MALT1, bekannt als eine Paracaspase lymphatischer Zellen, erstmals in den Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen und als ‚schneidendes‘ Enzym von CYLD identifiziert werden. Es ist bereits bekannt, dass die MALT1 Paracaspasefunktion zu den spezifischen CYLD-Spaltprodukten führt. Bemerkenswert ist, dass MALT1 im gesunden exokrinen Pankreasgewebe hingegen nicht exprimiert ist. Hieraus ergibt sich die weitere Fragestellung, ob MALT1 eine geeignete Zielstruktur für eine zytostatische / zytotoxische Therapie des Pankreaskarzinoms darstellt.

Ziel der Arbeit ist es, den Effekt einer MALT1 Inhibition auf die Krebszellen und das Normalgewebe zu untersuchen. Hierfür sollen insbesondere die Zellviabilität, Proliferation und Apoptose näher untersucht werden. Zudem stellt sich die Frage einer potenten und nebenwirkungsarmen Inhibition der Krebszellen. Dazu wird der Effekt von Mepazin, ein Phenothiazin, mit MALT1 inhibitorischer Wirkung untersucht. Als weiterer neuer Inhibitor soll die Wirkung von Biperiden geprüft werden. Dies ist eine anticholinerge Substanz mit relativ geringen Nebenwirkungen, die zu Mepazin Strukturähnlichkeiten aufweist.

2. Einleitung

2.1. Das Pankreaskarzinom

2.1.1. Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom fordert weltweit pro Jahr über 250.000 Tote (Feig et al. 2012).

Allein in Deutschland wurden laut dem Robert-Koch-Institut im Jahr 2014 ca. 17.100 Pankreaskarzinomfälle diagnostiziert, womit die Krankheit zu den zehn häufigsten Krebsarten gehört (Robert Koch Institut 2015).

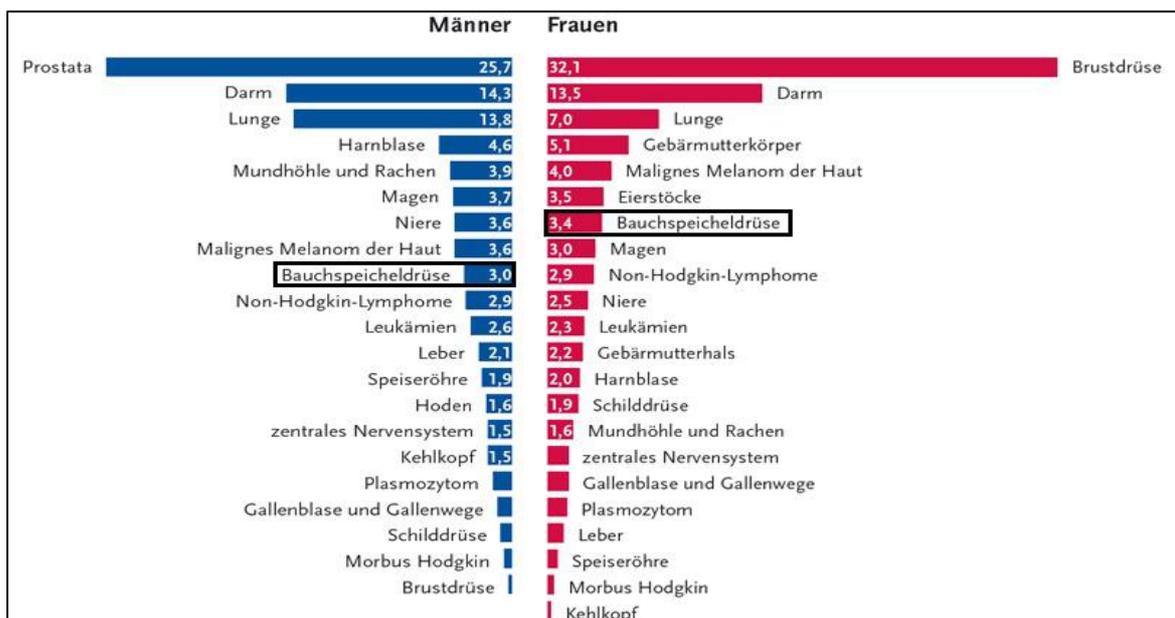


Abb. 1: Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2013/14 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs) - Angaben in Prozent (Zentrum für Krebsregisterdaten – RKI) (Robert Koch Institut 2015).

Zusätzlich entspricht das Pankreaskarzinom der vierthäufigsten Krebstodesursache weltweit, welches sich auch in Deutschland bestätigt. Ein Anteil von ca. 6,8 % bei Männern bzw. 8,2 % bei Frauen aller Krebstodesfälle waren 2008 in Deutschland auf Krebserkrankungen der Bauchspeicheldrüse zurück zu führen. Prognostisch wird vermutet, dass in der Zukunft die Inzidenz und damit verbundene Mortalität weiterhin leicht ansteigen wird. Nach einer Schätzung des Robert Koch Instituts soll die Inzidenz in 2018 auf ca. 19.000 Pankreaskarzinomneuerkrankungen weiter

steigen. Gleichzeitig wird in Schätzungen eine Abnahme der Mortalitätsraten anderer Krebsarten prognostiziert, wodurch im Vergleich die Bedeutung des Bauchspeicheldrüsenkrebses immer größer wird. Somit könnte die Krankheit bald die dritthäufigste Krebstodesursache (Robert Koch Institut 2015).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei einem Lebenszeitrisko von 1,5% bei den männlichen Patienten bei 70 Jahren, bei den weiblichen bei 76 Jahren. Diese Zahlen liegen knapp über dem Erkrankungsalter in dem im Mittel die meisten Karzinome auftreten: Es liegt bei Männern sowie Frauen bei 69 Jahren. Im Jahr 2014 wurde in Deutschland bei 8.550 Männern und 8.580 Frauen die Diagnose eines Pankreaskarzinoms gestellt. Im selben Jahr starben in Deutschland 8.231 Männer und 8.384 Frauen an den Folgen eines Pankreaskarzinoms. Die geringe Diskrepanz zwischen Inzidenz und Mortalität zeigt, dass das Pankreaskarzinom mit einer sehr schlechten Prognose verbunden ist. Sie entspricht in Deutschland einer 5-Jahres-Überlebensrate von 9% bei Männern und 10% bei Frauen, welches die geringsten 5-Jahres-Überlebensraten aller Krebsarten in Deutschland und der Welt sind (Robert Koch Institut 2015).

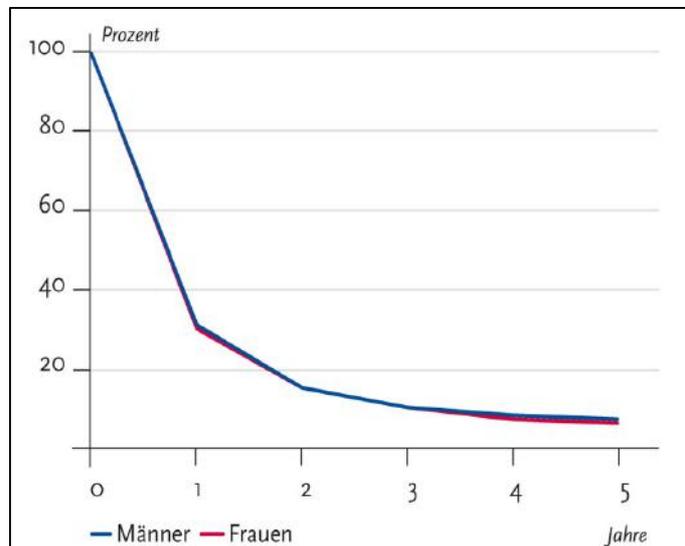
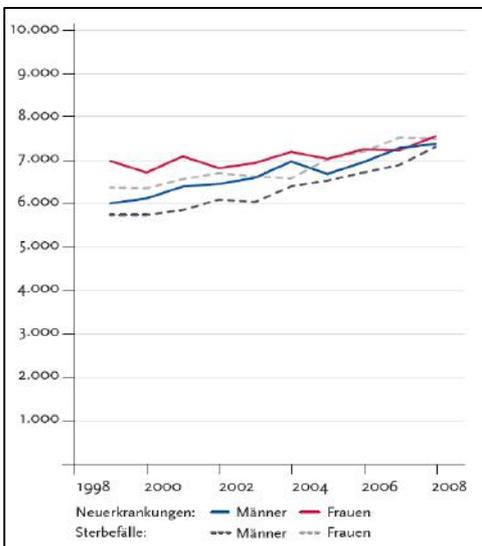


Abb. 2: Links: Absolute Anzahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle in Bezug auf das Pankreaskarzinom (Robert Koch Institut 2015).

Abb. 3: Rechts: Absolute Überlebensraten bis 5 Jahre nach Diagnosestellung, Deutschland (Robert Koch Institut 2015).

2.1.2. Ätiologie und Genetik

Die genaue Ursache des Bauchspeicheldrüsenkrebses ist gegenwärtig noch ungeklärt. Einzig die genetische Prädisposition und die folgenden Risikofaktoren Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum und eine chronische Pankreatitis gelten als gesicherte Faktoren (Adler et al. 2013).

Neben den sporadisch auftretenden Pankreaskarzinomen können auch familiär gehäufte Fälle von Bauchspeicheldrüsenkrebs beobachtet werden. Ihr Fallanteil beträgt zwischen 2-10 % aller diagnostizierten Karzinome (Rieder und Bartsch 2004).

Das Lebenszeitrisiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken beträgt für Menschen aus entwickelten Ländern 1 %, bei einem erkrankten Verwandten ersten Grades steigt das persönliche Lebenszeitrisiko bereits um das sechsfache an. Bei zwei bzw. drei diagnostizierten Fällen im engen Familienkreis erhöht es sich entsprechend auf das 18- bzw. 57- fache (Tersmette et al. 2001).

Bei dem Großteil der familiär erhöhten Karzinomprävalenzen (circa 80 % aller familiären Pankreaskarzinome) konnte bislang keine Korrelation zu spezifischen Veränderungen des Genoms festgestellt werden. Nur bei einer Minderheit von circa 20 % ist die spezifische Genmutation bereits identifiziert (Eberle et al. 2002). Hierzu sind in der Literatur fünf prädisponierende Syndrome beschrieben, dessen assoziierte Genomveränderungen zum Bauchspeicheldrüsenkrebs führen können. Diese autosomal dominant vererbten Syndrome führen bereits ab dem 40. Lebensjahr zur erhöhten Inzidenz von Bauchspeicheldrüsenkrebs. Es handelt sich um das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das Peutz-Jeghers Syndrom, das familiäre atypische multiple Muttermal und Melanom Syndrom (FAMMM), das hereditäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom (HBOC) und die hereditäre Pankreatitis (Bergman et al. 1990, Ozcelik et al. 1997, Thompson et al. 2002, Rieder und Bartsch 2004). Zusätzlich konnte bei einer noch unbekanntem Genmutation auf Chromosom 4q ein stark erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko beobachtet werden (Eberle et al. 2002).

Unter diesen Syndromen spielt das HBOC mit einer Mutation im *Breast Cancer 2* (BRCA2) -Gen eine besondere Rolle: mit einem Anteil von 17 % hat es die größte

Pankreaskarzinomprävalenz unter den hereditären Syndromen (Goggins et al. 1996).

Ein Überblick über die hereditären Syndrome mit den beschriebenen Genmutationen gibt die Tabelle 1.

Tab. 1: Hereditäre Syndrome, welche mit einer Prädisposition für das familiäre Pankreaskarzinom einhergehen (Hansel et al. 2003).

Syndrom	Lebenszeitrisiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln	Gen	Genlokalisierung
HNPCC	1 – 5 %	MSH2 MLH1 Rare PMS1 PMS2 MSH6	2p15 – 16 3p21 2q31 7p22 2p15 – 16
HBOC	5 – 10 %	BRCA2	13q12.3
FAMMM	15 %	CDKN2A/p16	19p13.3
Peutz-Jeghers Syndrom	30 %	STK11/LKB1 Kinase	19p13.3
Hereditäre Pankreatitis	40 %	PRSS1	7q35 5q32
	80 %	SPINK1	14q32 – 34

2.1.3. Anatomie der Pankreas

Im ersten Jahrhundert n. Chr. prägte der griechische Anatom Ruphos von Ephesus den Namen „pan kreas“ welches in der Übersetzung so viel bedeutet, wie „alles Fleisch“. Er wählte diesen Namen auf Grund des fehlenden Stützskeletts aus Kochen oder Knorpel (Tando et al. 2010).

2.1.3.1. Embryonalentwicklung

Die Pankreas zählt zu den Drüsen des Verdauungsapparates und verfügt über einen exokrinen, sowie einen endokrinen Gewebeanteil. Beide entwickeln sich während der Embryonalphase aus dem Epithel des Entoderms. Um den 30. Tag sprossen eine ventrale, sowie eine dorsale Anlage aus dem hepatopankreatischen Ring des Darmrohres, wobei die ventrale zweizipflige Anlage dem Ductus choledochus angegliedert ist (Sadler 2003). Während der Embryogenese kommt es im Zuge der Magendrehung und der Rechtsverlagerung des Duodenum zu einer dorsal gerichteten Bewegung der ventralen Pankreasanlage, sodass sich ventrale und dorsale Pankreasanlage dorsal der Peritonealhöhle vereinen und schließlich sekundär retroperitoneal zum Liegen kommen. Die ehemals dorsale Anlage entwickelt sich zum Pankreasschwanz und zum oberen Anteil des Pankreaskopfes, die ursprünglich ventrale Anlage bildet aus dem rechten Zipfel den unteren Pankreaskopf mit dem Processus uncinatus. Ihre linke Hälfte degeneriert. Bleibt diese Rückentwicklung aus, kann es zu einer Ringbildung der Pankreas um das Duodenum kommen. Ein so genanntes Pankreas annulare mit folgender Duodenalstenose entsteht (Aumüller et al. 2007).

Im gleichen Schritt fusionieren die vorerst getrennten Anlagen des Pankreasganges, sodass ein gemeinsamer Ductus pancreaticus (Pankreasgang oder Wirsung-Gang) entsteht. Er hat einen Durchmesser von ca. 2 mm und ist für die Drainage des Pankreassekretes zuständig. Auch bei diesem Schritt kann es zu Missbildungen der Bauchspeicheldrüse kommen: Unterbleibt die Verschmelzung der Gänge komplett, entsteht ein Pancreas divisum mit einer getrennten Organdrainage durch den Ductus pancreaticus major und den Ductus pancreaticus minor. Sie leiten das Sekret getrennt über zwei Papillen in das Duodenum. Bei einer inkompletten Verschmelzung entsteht zusätzlich ein kleinerer Ductus pancreaticus accessorius, er zweigt aus dem Ductus pancreaticus ab und drainiert über eine zweite Papille in das Duodenum. Diese Organmalformationen sind mit einer erhöhten Pankreatitisinzidenz assoziiert (Takuma et al. 2012).

2.1.3.2. Makroskopie

Die Pankreas ist ein 13–18 cm großes und bis zu 80 g schweres Organ, welches sekundär retroperitoneal im Epigastrium liegt. Mit seinem Peritoneum parietale

überzogenen ventralen Seite bildet es auf Höhe von LWK I-II die dorsale Wand der Bursa omentalis und erstreckt sich vom Duodenum bis in die Milzloge (Aumüller et al. 2007).

Die Bauchspeicheldrüse lässt sich grob in drei Teile untergliedern:

1. Das Caput pancreatis (Pankreaskopf), welches dem Duodenalbogen anliegt. Hier treffen Ductus choledochus (extrahepatischer Gallengang) und Ductus pancreaticus aufeinander, vereinen sich zur Ampulla hepatopancreatica und treten durch die Papilla duodeni major (Vateri-Papille) in die Pars descendens duodeni aus. Der kaudal gelegene Processus uncinatus pancreatis umschließt die A. und V. mesenterici superiores, welche für die Blutversorgung des Dün- und Dickdarmes essentiell sind.
2. Das Corpus pancreatis (Pankreaskörper) als Mittelstück, welches sich ventral der Aorta abdominalis und V. cava inferior befindet.
3. Die Cauda pancreatis (Pankreasschwanz), welche als schmaler Ausläufer in Richtung Milz zieht (Aumüller et al. 2007).

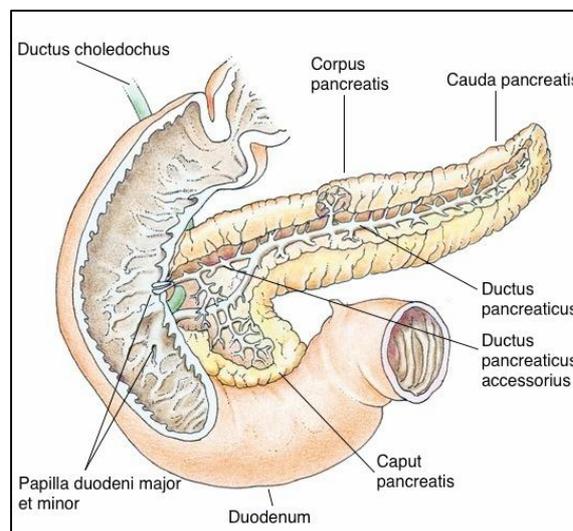


Abb. 4: Schematische Zeichnung des Pankreas und des Duodenums –modifiziert nach D. Haldemann

Auch die Gefäßversorgung der Pankreas besteht aus mehreren Anteilen. Die arterielle Gefäßarkade wird von kranial durch die A. gastroduodenalis gespeißt und

von kaudal durch die A. mesenterica superior. Zusammen versorgen sie das Caput pancreatis mit zwei Gefäßschlingen aus den Aa. pancreaticoduodenales superiores et inferiores. Diese anastomosieren schließlich mit Abgängen der A. splenica, welche vor allem die Cauda und Corpus pancreatis mit sauerstoffreichem Blut versorgen. Hierzu zählen neben den kleineren Rami pancreatici auch die größere A. pancreatica dorsalis und die A. pancreatica magna (Aumüller et al. 2007).

Der venöse Abfluss wird zum einen über die Vv. pancreaticae in die V. splenica und zum anderen über die Vv. pancreaticoduodenales in die V. mesenterica superior gewährleistet. Die beiden größeren Venen münden in die Pfortader, sodass die sezernierten Hormone des endokrinen Pankreas auf schnellem Wege in der Leber verstoffwechselt werden können (Schünke et al. 2009).

Die Lymphe wird aus der Pankreas zu drei verschiedenen regionären Lymphknotenstationen transportiert: ausgehend von Korpus und Kauda gelangt die Lymphe zu den Nodi lymphoidei coeliaci. Die gesammelte Lymphe des Kaput wird zu den Nodi lymphoidei hepatici und Nodi lymphoidei mesenterici superiores befördert. Alle drei Sammelstationen drainieren über den Truncus intestinalis in den venösen Kreislauf (Aumüller et al. 2007).

2.1.3.3. Mikroskopie

Mikroskopisch lassen sich in der Bauchspeicheldrüse exokrine und endokrine Zellen voneinander unterscheiden, wobei der weitaus größere Anteil des Parenchyms zu den exokrin sezernierenden Zellen gehört.

Die exokrine Pankreas wird durch bindegewebige Septen in viele kleinere Drüsenläppchen unterteilt. Innerhalb dieser Läppchen finden sich viele beerenförmige, seröse Azini (Drüsenendstücke), welche für die Produktion sekretorischer Granula zuständig sind. In den Granula ist eine große Anzahl an Zymogenen (inaktive Enzymvorstufen) enthalten, welche für die Verdauung aufgenommener Speisen essentiell sind. Einige Beispiele der aktiven Enzyme sind Trypsin + Chymotrypsin aus der Gruppe der Proteasen, α -Amylase (eine Glykosidase) und Nukleasen, sowie aus der Lipasegruppe beispielsweise Lipase und Cholesterolesterase.

Nach der apikalen Sekretion aus den Azinuszellen werden die Granula über Schaltstücke, sowie größere Sammelstücke in den Ductus pancreaticus geleitet. Das platte Epithel der Schaltstücke ragt direkt in das von Azinuszellen gebildete Lumen hinein und sorgt so für das histologische Bild der „zentroazinären Zellen“, ein spezifisches Bild der Pankreas. In den folgenden intralobulären Ausführungsgängen wird durch zusätzliche Sekretion von Bicarbonat der pH-Wert des Sekretes alkalisch. Das Bicarbonat soll im Dünndarm einen optimalen pH-Bereich für die Aktivität der Verdauungsenzyme gewährleisten (Aumüller et al. 2007).

Die endokrinen Zellen liegen als so genannte Langerhans'sche Inselzellen zwischen dem exokrinen Drüsensystem, zusammengefasst werden sie als Inselorgan bezeichnet. Die Langerhanszellen regulieren mit ihren endokrin sezernierten Hormonen den Glukosestoffwechsel vor, während und nach jeder Mahlzeit.

Um die siebte Woche der Embryonalphase wachsen die Zellen aus dem embryonalen Gangepithel aus und bilden vor allem in der Cauda pancreatis kleine Zellaggregate, welche sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung durch die eosinophile Farbe abheben. Durch weitere immunhistochemische Bestimmung können in den Langerhansinseln vier Zelltypen unterschieden werden: die B-, A-, D- und PP-Zellen.

- B-Zellen (β -Zellen): machen ca. 70 % jeder Langerhans-Insel aus und sind durch die Freisetzung von Insulin für die Förderung der Glukoseaufnahme in das Körpergewebe für die Blutzuckersenkung verantwortlich.
- A-Zellen (α -Zellen): entsprechen ca. 20 % der Zellen jeder Insel. Sie befinden sich vor allem in der Inselperipherie und fungieren als Gegenspieler der B-Zellen. Durch Freisetzung von Glukagon tritt gespeicherte Glukose in die Blutbahn über, die Glukoneogenese wird gefördert und der Blutzuckerspiegel steigt an.
- D-Zellen: sind ebenfalls im Randgebiet der Inseln zu finden und sezernieren Somatostatin. Obwohl die D-Zellen mit $\leq 5\%$ einen vergleichsweise geringen Anteil des Inselorgans ausmachen, können sie die Ausschüttung von Glukagon, sowie Insulin hemmen.
- PP-Zellen: entsprechen ebenfalls $\leq 5\%$ der Zellen und befinden sich in den gesamten Langerhans-Inseln und sezernieren das pankreatische Polypeptid. Dies wirkt hemmend auf die Darmmotilität und die exokrine Pankreassekretion (Aumüller et al. 2007).

Die Sekretionsleistung der synthetisierten Hormone und auch des exokrinen Pankreas wird durch die vegetative Innervation reguliert. Dazu laufen sympathische Fasern aus dem Ganglion coeliaci und parasympathische Fasern aus dem Truncus vagalis posterior gefäßbegleitend zu den sekretorischen Zellen (Schünke et al. 2009).

In der interdigestiven Phase kommt es sympathikusvermittelt zu einer Regression der Insulinsekretion aus B-Zellen, sowie Hemmung der exokrinen Sekretion von Verdauungsenzymen und Bicarbonat. Postprandial werden zur Aufnahme von Glukose und Nahrungsdigestion die Insulinsekretion und exokrine Sekretion durch Acetylcholinausschüttung der vagalen Zellen gesteigert (Aumüller et al. 2007).

2.1.4. Pathologie des Pankreaskarzinoms

Der Bauchspeicheldrüsenkrebs entsteht im exokrinen Pankreas und gehört zu der Gruppe der epithelialen Tumoren, wovon zwei Untergruppen unterschieden werden. Zum einen die Gruppe der cystischen Neoplasien, zum anderen das duktales Adenokarzinom. Es bildet mit 85-90 % der Fälle die absolute Mehrheit (Bassi et al. 2000).

In der Untergruppe der cystischen Neoplasien ist die häufigste Diagnose die muzinöse cystische Neoplasie (MCN) mit 2-5 %, gefolgt von der intraduktalen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN) mit 1-3 % aller exokrinen Pankreastumore (Bassi et al. 2000).

In der folgenden Arbeit wird ausschließlich das duktales Adenokarzinom untersucht, auf die cystischen Neoplasien soll nicht weiter eingegangen werden.

Für das duktales Adenokarzinom sind spezifische intraduktale Präcursorstadien beschrieben. Sie sind durch eine fortschreitende Veränderung des Pankreasepithels charakterisiert und werden als nicht-invasive intraepitheliale Neoplasien (PanIN) bezeichnet. Die PanIN-Stadien reichen von flachen Epithelläsionen (PanIN-1A) bis hin zum Carcinoma in situ (PanIN-3) mit papillären Strukturen, Zellatypien und luminalen Nekrosen (Winter et al. 2006).

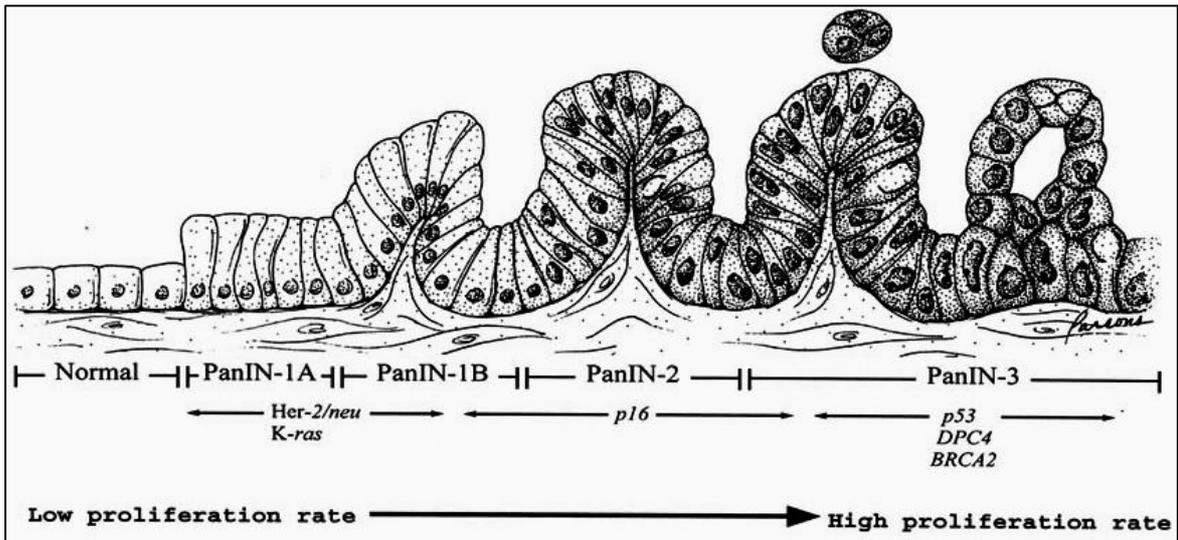


Abb. 5: Verlauf der intraepithelialen Neoplasie des Pankreas: PanIN-1A (flache Läsion); PanIN-1B (papilläre Struktur); PanIN-2 (papilläre Struktur mit Kernatypien); PanIN-3 (erhöhte Mitoserate, Zellatypien, luminale Nekrosen) (Klein et al. 2002).

Kommt es ausgehend vom Stadium PanIN-3 zur Invasion der Karzinomzellen über die duktaale Basalmembran, muss von einem Karzinom gesprochen werden. Dieses kann zu einem makroskopisch sichtbaren weiß-gelblichen, derben Tumor weiterwachsen.

Die häufigste Lokalisation ist mit 60% der Fälle der Pankreaskopf, nur 15% der Tumore bilden einen Primarius im Pankreaskörper oder –Schwanz. Bei 20% der Patienten kann kein einzelner Primarius in der Bauchspeicheldrüse benannt werden, stattdessen fällt eine diffuse Infiltration des Drüsengewebes auf (Wilentz und Hruban 1998).

Mikroskopisch zeichnen sich die duktaalen Adenokarzinome des Pankreas durch eine meist sehr gute Differenzierung mit gangartigen Strukturen und neoplastischen Drüsenkörpern aus. Die neu gebildeten tubulär oder kribriform wachsenden Drüsenstrukturen sind teilweise zur Muzinproduktion befähigt. Einzelne Residuen nicht-neoplastischer Gänge und Azini sind dadurch schwer im desmoplastischen Tumorgewebe abgrenzbar. Erst bei weniger gut differenzierten Tumoren kommt es zur Bildung unvollständiger Drüsenkörper, sowie einem Anstieg der Mitoserate (Luttges und Kloppel 2000).

Die seltenen Karzinomformen wie das adenosquamöse Karzinom, das muzinöse nicht-cystische Karzinom, das anaplastische Karzinom und das Siegelringzellkarzinom werden ebenfalls zur Gruppe des duktales Adenokarzinoms gezählt. Diese Karzinome weisen einzelne Foci mit neoplastischen, oft geringgradig differenzierten Pankreasgängen auf, welche der Histologie des duktales Adenokarzinoms gleichen (Luttges und Kloppel 2000).

Ausgehend vom adenomatösen Primarius zeigt das Pankreaskarzinom eine frühe Tendenz zur lymphogenen Metastasierung in die regionären Lymphknotenstationen, sowie haematogen in praktisch alle weiteren Organe des Körpers. Dadurch kann bereits bei kleinen Primärbefunden eine umfassende Metastasierung stattgefunden haben. Mao, Domenico et al. zeigten, dass bereits Karzinome mit einem Durchmesser < 2 cm als metastasenverdächtig anzusehen sind (Mao et al. 1995).

Insgesamt ist eine Metastasierung in die regionären Lymphknotenstationen bei ca. 80 % der Patienten zu verzeichnen. Die hämatogene Metastasierung erfolgt meist über die V. porta, sodass in 80 % der Fälle die Leber als erstes Organ betroffen ist. Als andere häufige Lokalisationen sind das Peritoneum (60%), die Lunge ggf. mit der Pleura (50-70%), die Nebennieren (25%) und die Knochen zu nennen (Wilentz und Hruban 1998) (Mao et al. 1995).

Zusätzlich spielen Micrometastasen eine große Rolle bei der Prognose des Pankreaskarzinoms. Diese sind für den Operateur makroskopisch nicht sichtbar und stellen auch für den befundenen Pathologen bei der Untersuchung der Resektionsränder ein großes Problem dar. Durch die in situ bleibenden malignen Zellen kommt es nach der chirurgischen Primariusresektion bei 73 % der Patienten zu lokalen Rezidiven und in 75 % kommt es zum Auftreten von Metastasen (Iacobuzio-Donahue et al. 2009).

2.1.5. Symptome und klinische Diagnostik

Oft wird die Diagnose „Pankreaskarzinom“ erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der Krankheit gestellt. Dies ist zum einen durch das Fehlen von anfänglichen Symptomen sowie durch den Mangel an spezifischen und sensitiven Markern zu erklären. Dadurch ist der Tumor bei Diagnosestellung meistens weit entwickelt und ein kurativer Ansatz zusätzlich erschwert.

2.1.5.1. Symptome

Bei klinischer Manifestation äußert sich das Pankreaskarzinom durch Oberbauchschmerzen und unklare Verdauungsstörungen. Hierbei zeigen viele Patienten ein Symptomkomplex, der dem einer chronischen Pankreatitis gleicht. Die auftretenden Oberbauchschmerzen sind diffus und können sich gürtelförmig vom Oberbauch zum Rücken ausbreiten. Damit einhergehend sind unspezifische Symptome wie Übelkeit, Appetitverlust und Gewichtsreduktion typisch. Somit ist die chronische Pankreatitis schwer von einem Pankreaskarzinom abzugrenzen, beide Krankheiten können auch zusammen auftreten. In diesem Fall spricht man von der so genannten Begleitpankreatitis. Bei jungen Patienten muss zusätzlich an eine autoimmunvermittelte Pankreatitis gedacht werden (Herold 2017).

Im fortgeschrittenen Stadium entwickeln 90 % der Patienten einen posthepatischen, schmerzlosen Ikterus, welcher durch den erhöhten Anfall von Bilirubin im Blut zur Gelbfärbung von Haut, Schleimhaut, Skleren, inneren Organen und Körperflüssigkeiten führen kann. Nur in 25 % der Fälle tritt ein Ikterus als Frühsymptom auf. Dies ist typischerweise bei einer Tumorlokalisierung im Pankreaskopf der Fall, da es dort bereits im Anfangsstadium zu einer Stenose des Ductus choledochus mit extrahepatischer Cholestase führen kann. Im Unterschied dazu kann sich der Ikterus beim Papillenkarzinom intermittierend äußern. Ein positives Courvoisier-Zeichen kann die Diagnosestellung bestärken. Dabei handelt es sich um das gemeinsame Auftreten eines Ikterus und einer prallelastisch tastbaren, schmerzlosen Gallenblase. Es gilt als Indiz für einen (tumorbedingten) Verschluss des Ductus choledochus (Herold 2017).

Eine amerikanische Arbeitsgruppe beschreibt das vermehrte Auftreten eines Diabetes mellitus bei Pankreaskarzinomen. Fast 40 % der untersuchten Fälle mit

exokrinem Pankreaskarzinom litten an der Glukoseintoleranz, welches einer Diabetes mellitus-Prävalenz von 19 % in der Kontrollgruppe entgegensteht. Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass der Großteil der Patienten an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten und somit nicht die verminderte Aktivität des exokrinen Pankreasgewebes allein als Ursache für die Zuckerkrankheit angesehen werden kann. Insgesamt kommt somit statistisch bei einer von 125 Diabetes mellitus-Neuerkrankungen ein Pankreaskarzinom als Ursache in Frage (Chari et al. 2008).

Zu den selteneren Symptomen des Pankreaskarzinoms zählen eine idiopathische Thromboseneigung und die Thrombophlebitis migrans. Beim Auftreten dieser Erkrankungen muss neben einem Pankreastumor vor allem an Tumorleiden des Magens, der Lunge und der Prostata gedacht werden. Sie sind keinesfalls spezifisch für das Pankreaskarzinom anzusehen (Herold 2017).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass folgende Symptome in absteigender Reihenfolge zu der frühesten Diagnosestellung eines Pankreastumors führen:

neu aufgetretene Oberbauchschmerzen, schmerzloser Ikterus und Gewichtsverlust.

Bei einer vergleichsweise frühen Diagnosestellung ist die entsprechende Prognose der Patienten mit diesen Symptomen etwas besser (Gobbi et al. 2013).

2.1.5.2. Klinische Diagnostik

Da es kein sicheres diagnostisches Verfahren oder spezifischen Marker zur (Früh)Erkennung des Pankreaskarzinoms gibt, ist bei einem Karzinomverdacht das Zusammenspiel mehrerer Verfahren zielführend. Neben der geschilderten Symptomatik spielen vor allem invasive und nicht-invasive bildgebende Verfahren eine wichtige Rolle, aber auch laborchemische Parameter werden für die Diagnosestellung genutzt.

2.1.5.3. Klinische Chemie

Anhand von Blutuntersuchungen lassen sich nur Hinweise auf eine Tumorerkrankung finden. Dazu gehören beispielsweise eine erhöhte

Blutsenkungsgeschwindigkeit oder der Nachweis einer so genannten Tumoranämie mit Eisenverwertungsstörung. Ein spezifischer Marker für die Pankreas fehlt. Erst nach dem Nachweis einer Raumforderung in der Pankreas durch bildgebende Verfahren wird der Tumormarker *Carbohydrate Antigen 19-9* (CA 19-9) bestimmt. Durch die unspezifische Verbreitung gibt er keine Auskunft über die Primärlokalisation. Er eignet sich lediglich als Verlaufsparemeter zum Monitoring des Krankheitsprozesses (Adler et al. 2013). Eine spanische Arbeitsgruppe postuliert, dass die gemessenen CA 19-9-Werte bei Pankreaskarzinompatienten zum einen die höchste Konzentration bei einer malignen Erkrankung aufweist und sie zum anderen mit der Tumorlokalisierung in der Pankreas korrelieren. Die höchsten CA 19-9-Konzentrationen fallen bei Tumoren im Bereich des Pankreaskorpus an. Bestehen bereits Veränderungen im biliodigestiven System mit erhöhtem Bilirubinnachweis im peripheren Blut steigen die Messwerte von CA 19-9 zusätzlich an. In diesem Fall muss die CA 19-9 Erhöhung von einer nicht-tumorbedingten Cholestase abgegrenzt werden. Insgesamt kann CA 19-9 mit einer Sensitivität von 60-90 % und einer Spezifität von 70 % nicht als Marker für die Erstdiagnostik eines Pankreaskarzinoms genutzt werden und ist genau wie das *Carcinoembryonale Antigen* (CEA) ein Paremeter zur Verlaufskontrolle (Molina et al. 2012).

2.1.5.4. Bildgebende Verfahren

Zur Darstellung einer verdächtigen Pankreas wird als erstes Verfahren die Sonographie empfohlen. Ein erfahrener Untersucher kann so mit hoher Sensitivität den Verdacht einer Raumforderung bestätigen und ggf. eine Metastasendiagnostik direkt anschließen. Bei einer akuten Pankreatitis bzw. dem ersten Schub einer chronischen Pankreatitis unklarer Ätiologie sollte zusätzlich eine endosonographische Untersuchung stattfinden, da sie in der Beurteilung von Ausdehnung und Lymphknotenstatus überlegen scheint (Adler et al. 2013). Die Endosonographie ist das einzige Verfahren mit dem Raumforderungen mit einem Durchmesser unter 1 cm nachgewiesen werden können (Herold 2017).

Für die weiterführende Diagnostik sollte die *Multidetektor-Computertomographie* (MD-CT) mit Beurteilung der Pankreasparenchymphase sowie der portalvenösen Phase oder die *Magnetresonanztomographie* (MRT) in Kombination mit einer

Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) angestrebt werden. Diese Methoden können weitere Informationen zu Veränderungen des Ductus choledochus und des Ductus pancreaticus, sowie möglicher Gefäßinvasion und Metastasen in Lymphknoten oder Fremdorganen bringen. Die Durchführung aller drei Verfahren bietet die größte Sensitivität ein bestehendes Pankreaskarzinom zu entdecken (Ducreux et al. 2015).

Erfolgversprechend ist auch die Kombination aus MRT, MRCP und MR-Angiographie. Hierbei wird in der Literatur eine Sensitivität von 90% angegeben (Herold 2017).

Das Alternativverfahren zu der MRCP, die Endoskopisch retrograde *Cholangiopankreatikographie* (ERCP) sollte nur für eine bestimmte Patientengruppe eingesetzt werden. Diagnostisch kann mit dieser Methode nur eine Gangveränderung des Ductus choledochus und der Ampulla hepatopancreatica dargestellt werden. Zusätzlich besteht die Gefahr der post-ERCP Pankreatitis. Der Vorteil der Untersuchung ist, dass bei inoperablen Patienten eine mögliche Gallengangsstenose direkt durch Einbringen eines Stents verbessert werden kann. Dieser sollte nur verwendet werden, falls die Patienten gar nicht oder nicht in absehbarer Zeit operiert werden. Bei präoperativer Stenteinlage konnte ein signifikanter Anstieg von postoperativen Komplikationen gezeigt werden (van der Gaag et al. 2010).

2.1.5.5. Staging

Das Staging des Pankreaskarzinoms ist entscheidend für den folgenden Behandlungsplan des Patienten. In Deutschland wird die Multidetektor-CT-Untersuchung oder ein MRT mit einer MRCP zur Untersuchung der Tumorausdehnung im Pankreas und den umliegenden Strukturen empfohlen. Zur Beurteilung der lokalen Ausbreitung in Gefäße und Lymphknoten können die Untersuchungen durch die Endosonographie komplettiert werden (Ducreux et al. 2015). Diese kann gleichzeitig für eine Biopsie des Pankreasgewebes genutzt werden, sie sollte aber den Tumoren unklarer Dignität vorbehalten bleiben (Ducreux et al. 2015).

Um eine systemische Ausbreitung der Karzinomzellen auszuschließen oder ggf. zu klassifizieren, sollte eine röntgenologische Untersuchung des Thoraxes zur

Beurteilung der Lunge, sowie ein Abdomen-CT zur Darstellung der anliegenden Organe, des Peritoneums und der regionären Lymphknoten durchgeführt werden. Nur bei Vorliegen spezifischer Symptome wird zusätzlich eine Knochenszintigraphie empfohlen (Adler et al. 2013).

Bei Pankreaskorpus- und Pankreasschwanztumoren, unklarer Aszites oder einem sehr hohen CA 19-9 Werten kann eine explorative Laparoskopie in Erwägung gezogen werden. Diese kann bei der Detektion kleiner Metastasen in der Leber oder dem Peritoneum helfen und führt so bei $\leq 15\%$ der Patienten zu einer Änderung des ursprünglichen Therapieplanes. Dennoch kann letztendlich das gesamte Ausmaß des Tumorwachstums erst während der Tumorresektion beurteilt werden (Ducreux et al. 2015).

Zusammenfassend werden die gesammelten Daten anhand der TNM Klassifikation eingeteilt und die Patienten die Stadien I – IV eingeteilt.

Tab. 2: TNM Klassifikation des Pankreaskarzinoms
- nach Wittekind (Wittekind 2017).

TNM	Ausdehnung
T1	Tumorgröße $\leq 2\text{cm}$ auf Pankreas begrenzt
T2	Tumorgröße $> 2\text{cm}$ auf Pankreas begrenzt
T3	Infiltration von umliegendem Gewebe
T4	Infiltration von Truncus coeliacs oder A. mesenterica superior
N1	Befall regionärer Lymphknoten
M1	Nachweis von Fernmetastasen

2.1.6. Therapie

Mit Chemotherapie und Operation stehen mehrere Modalitäten zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zur Verfügung. Allerdings gilt nur die operative Resektion als kurativ (Adler et al. 2013).

Ist eine R0 Resektion möglich, sollte somit immer die Resektion und adjuvante Chemotherapie angestrebt werden.

Bei Karzinomen im Pankreaskopfbereich ist die Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire die Methode der Wahl. Hier erfolgt nach Resektion von Pankreaskopf, Duodenumsegment, Gallenblase und Ductus choledochus die Rekonstruktion mittels Pankreatikojejunostomie, Duodenojejunostomie und biliodigestiver Anastomose zwischen Gallengang und Jejunum. Bei Infiltration des Bulbus duodeni ist die Erweiterung um eine komplette Duodenumresektion und distale Magenresektion im Sinne einer „Whipple-Operation“ indiziert. Hier erfolgt die Rekonstruktion mittels Y-Roux-Schlinge bzw. Omegaschlinge und Braunscher Fußpunktanastomose, sowie einer biliodigestiven Anastomose (Bachmann et al. 2006).

Bei Karzinomen im Pankreaskorpus oder –schwanz ist dementsprechend die Pankreaslinksresektion bzw. die totale Pankreatektomie mit Splenektomie indiziert. Die Lymphadenektomie entlang dem Ligamentum hepatoduodenale und der A. hepatica propria bis zum Truncus coeliacus gehört zum Standard aller Operationstechniken (Bachmann et al. 2006).

Bei kurativem Ansatz sollte nach aktueller Leitlinie anschließend eine adjuvante Chemotherapie mit dem Pyrimidinantagonisten Gemcitabin oder 5-Fluoruracil/Folinsäure durchgeführt werden, solange keine Kontraindikationen bestehen (Adler et al. 2013).

Ist eine Resektion im Gesunden nicht möglich, ist im Sinne einer palliativen Chemotherapie die Monotherapie mit Gemcitabin oder in Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib lediglich eine Verlangsamung des Tumorprogresses möglich.

Bei tumorbedingter Passagestörung im Bereich des Gastrointestinaltraktes oder der Gallenwege sind entsprechende invasive Verfahren, wie das endoskopische Einbringen von Gallengangstents oder operative Gastrostomien indiziert.

2.2. Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-Komplex reguliert im Körper Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod und ist somit maßgeblich an Inflammations- und Karzinogeneseprozessen beteiligt (Melisi und Chiao 2007). Auch an der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen spielt NF- κ B eine bedeutende Rolle (Wang et al. 1996, Baldwin 2001).

Im Menschen setzt sich der Komplex aus fünf unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren zusammen, die bei Aktivierung an regulatorische DNA Domänen binden und die Transkription spezifischer Gene einleiten.

Hierbei handelt es sich um NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB und c-rel (Hayden und Ghosh 2004).

Im Zytosol liegen sie gebunden an die regulatorischen Untereinheiten I κ B α und I κ B1 β inaktiv vor. Erst bei Aktivierung des vorgeschalteten *I κ B α -Kinase-Komplexes* (IKK) werden sie freigesetzt und setzen sich je nach aktiviertem Signaltransduktionsweg zu verschiedensten Heterodimeren zusammen. Diese werden in den Nukleus transportiert und führen zur Genablesung (Fan und Maniatis 1991, Palombella et al. 1994).

IKK und NF- κ B können über zwei verschiedene Signalwege aktiviert werden: die kanonische und die alternative Signalkaskade.

Die kanonische Signaltransduktion verläuft sehr schnell und wird durch proinflammatorische Cytokine, Pathogen-assoziierte Molekülmuster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) oder Antigenrezeptoren ausgelöst. Durch diesen Signalweg werden hauptsächlich Zellen des Immunsystems aktiviert und Entzündungsreaktionen ausgelöst. Es kommt zur Transkriptionssteigerung von Cytokinen und Akute-Phase-Proteinen (Senftleben et al. 2001, Scheidereit 2006).

Die alternative Kaskade hat hingegen eine langsamere Kinetik und steuert nach Aktivierung von Rezeptoren der TNF Familie über einen *NF- κ B inducing kinase* (NIK) vermittelten Signalweg Prozesse der Zellapoptose und des Zellwachstums. Hierbei werden Apoptoseregulatoren wie *B-cell lymphoma 2* (BCL2), Cycline und

Wachstumsfaktoren gebildet (Pahl 1999, Senftleben et al. 2001, Xiao et al. 2001, Bonizzi und Karin 2004).

2.3. MALT1

Das *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1* (MALT1) gehört zu der Gruppe der Paracaspasen (Uren et al. 2000, Feig et al. 2012). Es ist ein intrazelluläres Protein der Signaltransduktion und vor allem im Zusammenhang der antigenvermittelten Aktivierung von B- und T-Zellen bekannt. Zusätzlich wird MALT1 in monoklonalen Zellen des Blutes, Thrombozyten, Brust- und Lungengewebe exprimiert und hat im Wesentlichen zwei Wirkmechanismen:

Zum einen dient es in der intrazellulären Signaltransduktion als Adapterprotein, zum anderen hat es eine proteolytische Aktivität. Insgesamt dienen die verschiedenen Mechanismen der Aktivierung von NF- κ B (Ruefli-Brasse et al. 2003, Che et al. 2004, Thome 2004, Ferch et al. 2007, Oeckinghaus et al. 2007).

MALT1 ist Teil des klassischen Signalwegs der NF- κ B Aktivierung. Dabei bildet MALT1 zusammen mit dem *caspase recruitment domain containing MAGUK protein 1* (CARMA1) (bzw. CARMA3 in nicht haematopoetischen Zellen) und *B-cell lymphoma 10* (BCL10) den CBM-Komplex. Dieser führt über eine TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) Aktivierung zur Phosphorylierung und Aktivierung des *I κ B α -Kinase-Komplexes* (IKK) und zur NF- κ B Translokation in den Nukleus (Ruland et al. 2001, Egawa et al. 2003, Wu et al. 2006, Bloor et al. 2008).

Der alternative Signalweg kann durch MALT1 mittels Degradation von TRAF2, einem NIK (*NF- κ B inducing kinase*) - Hemmer, sowie der Stabilisierung von NIK aktiviert werden.

Zusätzlich beeinflusst MALT1 die Wirkung von Caspase 8. Durch die MALT1-vermittelte und Paracaspase-unabhängige Aktivierung von Caspase 8 kommt es zur verstärkten Zellproliferation und Hemmung der Apoptose (Kawadler et al. 2008).

Für die proteolytische MALT1 Aktivität ist eine Caspase-ähnliche Struktur verantwortlich, die zur Arginin-abhängigen Substratspaltung führt (Uren et al. 2000,

Vercammen et al. 2007). Auf Grund der Strukturähnlichkeit wird MALT1 als ‚Paracaspase‘ bezeichnet. Bislang wurden nur einige wenige Paracaspasen im menschlichen Körper nachgewiesen (Hulpiau et al. 2016). Somit ist vorerst von einem sehr spezifischen Angriffspunkt neuer Therapiestrategien auszugehen. Bislang sind fünf Substrate dieser proteolytischen Aktivität bekannt. Es handelt sich um

- A20 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3),
- BCL10,
- NIK,
- RelB (eine NF- κ B Untereinheit) und
- Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (CYLD)

(Hailfinger et al. 2011, Rosebeck et al. 2011, Staal et al. 2011a).

Die MALT1-abhängige Proteolyse dieser Proteine führt insgesamt zu einer verlängerten und stärkeren Funktion von NF- κ B (Abb. 6).

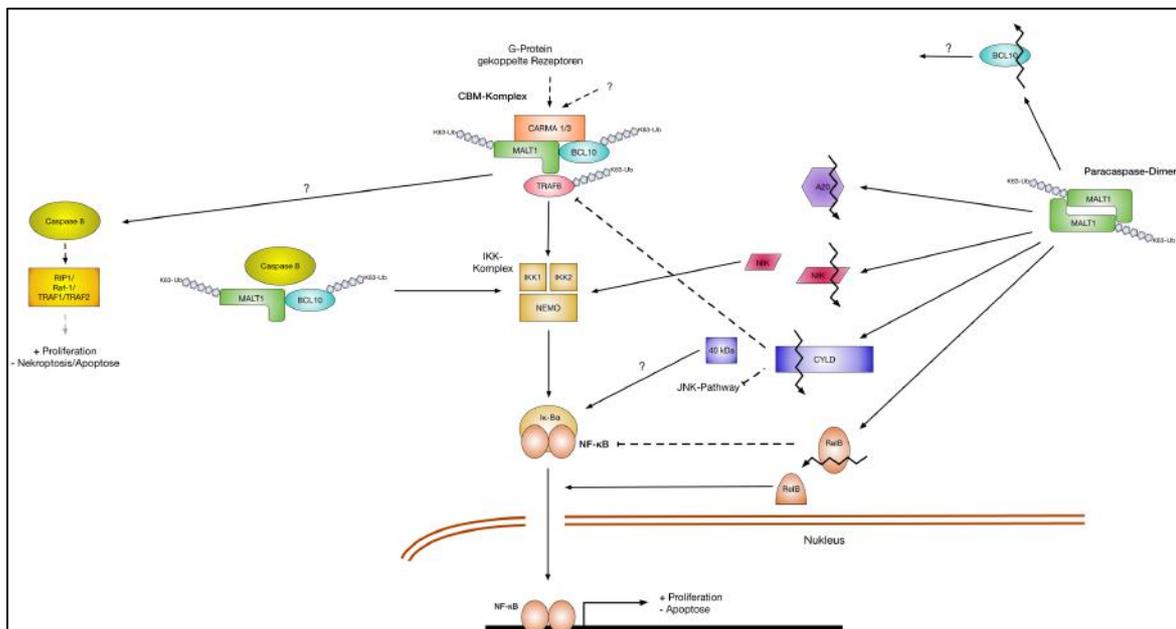


Abb. 6: MALT1 in der intrazellulären Signaltransduktion epithelialer Zellen. Funktion als Adapterprotein im CBM-Komplex und mit Caspase 8, sowie in dimerer Struktur mit Paracaspasefunktion und dessen Substraten.

In Lymphozyten gehört die MALT1-Paracaspase zu der adaptiven Immunantwort und sorgt für die NF- κ B-abhängige Aktivierung und Proliferation (Ruefli-Brasse et al. 2003, Coornaert et al. 2008).

Wiesmann et al. (2012) und Yu et al. (2011) konnten die MALT1 Konformation und dessen proteolytische Aktivität und Struktur im katalytischen Zentrum aufzeigen. Sie zeigten weiter, dass aktives MALT1 als Dimer vorliegen muss und die Proteolyse durch spezifische Bindungen an sauren Seitenketten im aktiven Zentrum von MALT1 abhängig ist. Dies ist bei Caspasen oder Metacaspasen nicht der Fall, was die Spezifität der MALT1 Funktion weiter untermauert (Uren et al. 2000).

Durch die spezifische Schneidefunktion von MALT1 kommt es zu dem spezifischen cleavage Produkten, wie zum Beispiel von CYLD in einen 70 kDa und einen 40 kDa großen Anteil (Staal et al. 2011b).

Das Vorkommen von MALT1 ist bislang in B- und T-Zellen, sowie Thrombozyten und Lungengewebe bekannt. und kann dort durch verschiedene Translokationen zur Bildung von MALT-Lymphomen führen.

Das Substrat CYLD sowie zwei Inhibitoren von MALT1, Mepazine und Biperiden, sollen in der vorliegenden Dissertation besonders betrachtet werden.

2.4. CYLD

Die *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* (CYLD) ist ein Tumorsuppressorgen mit Deubiquitinaseaktivität. Hiermit reguliert es die zelluläre NF- κ B-Aktivierung und wirkt auf die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zellen (Brummelkamp et al. 2003, Kovalenko et al. 2003, Trompouki et al. 2003). Zusätzlich scheint CYLD in Pankreaskarzinomzellen einen Effekt auf die Chemoresistenz der Zellen zu haben (Takiuchi et al. 2013).

Bekannt wurde das Protein erstmals durch seine Rolle in der Entstehung (benigner) Hauttumore, wie zum Beispiel die Cyndromatosis oder das Brooke-Spiegler Syndrome. Inzwischen ist die bedeutende Rolle von CYLD in der Karzinogenese vieler weiterer Tumore bekannt (Trompouki et al. 2003).

Das Protein hat eine Größe von 107 kDa. Auf dieser Länge trägt es drei Cytoskeleton-associated Protein Glycine-rich Domains (CAP-Gly-Bindungsstellen),

mit denen CYLD an das Zytoskelett der Zelle binden kann. Am C-terminalen Ende des Proteins ist der Ort der Deubiquitinierungsaktivität (DUB), sowie auch eine Bindungsstelle für den NF- κ B essential modulator (NEMO) und weitere NF- κ B Regulatorproteine (Brummelkamp et al. 2003).

CYLD gilt mit seiner Deubiquitinierungsaktivität als potenter Inhibitor des klassischen NF- κ B Signalweges. Durch die Inaktivierung der Proteine der TRAF-Familie werden Zellproliferation, die Apoptoseresistenz und Inflammation gehemmt. Des Weiteren hindert CYLD die nukleäre Translokation von BCL-3, was zu einer weiteren Hemmung der NF- κ B Aktivität führt (Ikeda und Dikic 2006, Massoumi et al. 2006).

2.5. c-Rel

c-Rel ist ein Protoonkogen der NF- κ B-Familie. Die klassische Aktivierung von NF- κ B führt zu einer Translokation von c-Rel in den Kern der Zelle und nachfolgendem Abbau von NF- κ B-Inhibitoren (I κ Bs) (Ferch et al. 2007). Dadurch werden in den Zellen die intrinsische Apoptose gehemmt und die Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie *Interleukin-2* (IL-2), IL-3, *Interferon γ* (IFN- γ) und der *Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor* (GM-CSF) reduziert. Zusätzlich interagiert c-Rel mit Molekülen der MALT1-Signalkaskade, wie beispielsweise der *Proteinkinase A* (PKA), NIK und IKK2 (Gilmore und Gerondakis 2011, Perkins 2012).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,25% Trypsin EDTA (1x)	Life technologies™ / GIBCO®
0,5 M Tris pH 6,8	Bio-Rad
1,5 M Tris pH 8,8	Bio-Rad
100%ige Essigsäure	Merck
30 % Acrylamid (19:1)	Bio-Rad
32% HCl	Roth
85% Glycerin	Fluka
Ac-Leu-Arg-Ser-Arg-MCA	PEPTIDES INTERNATIONAL
APS	Bio-Rad
Aqua bidest.	SIGMA-ALDRICH®
Aquatex®	Merck
Biperiden hydrochloride	SIGMA-ALDRICH®
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA-ALDRICH®
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH®
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology®
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
CHAPS hydrate	SIGMA-ALDRICH®
Chloroform	Merck
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako
DMEM	SIGMA-ALDRICH®
DMSO	SIGMA-ALDRICH®
DPBS (1x)	Life technologies™ / GIBCO®

Chemikalie	Hersteller
DTT	biomol
EGF	Pepro Tech
Entwicklerlösung	Tetenal
Ethanol	Walter CMP
FCS	Life technologies™ / GIBCO®
FGF	Pepro Tech
Fixierlösung	Tetenal
Fluoroshield™ with DAPI	SIGMA-ALDRICH®
Gemzar® (Gemcitabin)	Eli Lilly
Glycin	SIGMA-ALDRICH®
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
HEPES Buffer 1M	Biological Industries
InSolution™ MG-132	Calbiochem®
Insulin	SIGMA-ALDRICH®
Isopropanol	Roth
KCl	Merck
Keratinocyten-SFM	Life technologies™ / GIBCO®
KH ₂ PO ₄	Merck
Kristallviolett	Merck
MALT1 Inhibitor I, MI-2	Calbiochem®
MALT1 Inhibitor II, Mepazine hydrochloride	Calbiochem®
Mayer's Hemalum Solution	Merck
Methanol	J. T. Baker®
MES hydrate	SIGMA-ALDRICH®
MgCl ₂	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Roth
Nitrozellulosemembran	Thermo Scientific
Paraformaldehyd	Serva

Chemikalie	Hersteller
Penicillin-Streptomycin	Life technologies™ / GIBCO®
peqGOLD TriFAST™	Peqlab
PMA	Calbiochem®
Ponceau S Solution for electrophoresis	Serva
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Protease™ Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent	Santa Cruz Biotechnology®
Protein Block Serum-Free	Dako
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Life technologies™ / GIBCO®
RIPA-Puffer (R0278)	SIGMA-ALDRICH®
RPMI-1640	SIGMA-ALDRICH®
Saccharose	Merck
SDS	SIGMA-ALDRICH®
Sodium Citrate dihydrate	Merck
Rh TRANCE (sRANKL)	R & D Systems®
TEMED	Bio-Rad
Transferrin	SIGMA-ALDRICH®
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH®
Trypanblau	Life technologies™ / GIBCO®
Tween® 20	Serva
Xylol	CHEMSOLUTE®
β-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH®

3.1.2. Puffer und Lösungen

PBS, PBS-T, TBS-T, der Transfer- und SDS-Laufpuffer wurden einfach-konzentriert eingesetzt.

Tab. 4: Benutzte Puffer und Lösungen

<p>Blockierlösung (Immunzytochemie) 1% BSA in PBS-T</p>	<p>Blockierlösung (Western Blot) 5% <i>Blotting Grade Blocker</i> in TBS-T</p>
<p>10%ige BSA Stammlösung (Immunzytochemie) 1 g BSA 10 mL PBS</p>	<p>Lysepuffer (MALT1-Aktivitätsassay) 50 mM HEPES pH 7.5 10% Glycerin 0.1% Triton X-100 1 mM DTT 150 mM NaCl 2 mM MgCl₂</p>
<p>Neutralisierungspuffer (Western Blot) 1 M Tris pH 8</p>	<p>Lysepuffer 990 µL <i>RIPA</i>-Puffer 10 µL <i>ProteaseTM Inhibitor Cocktail</i></p>
<p>4%ige PFA-Lösung (Immunzytochemie) 10,8 mL Paraformaldehyd (37%) 89,2 mL PBS</p>	<p>5x Laemmli-Probenpuffer (Western Blot) 31,2 mL Tris 0,5 M (pH 6,8) 2,5 g SDS 10 mL Glycerin 2 mL β-Mercaptoethanol Bromphenolblau ad 50 mL H₂O</p>
<p>10 x PBS-T (Immunzytochemie) 80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na₂HPO₄ 2,4 g KH₂PO₄ 1 mL Triton X-100 ad 1L Aqua dest. pH 7,4</p>	<p>10 x PBS (Immunzytochemie) 80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na₂HPO₄ 2,4 g KH₂PO₄ ad 1L Aqua dest. pH 7,4</p>

<p>1 x Transferpuffer (Western Blot) 100 mL 10 x Transferpuffer 200 mL Methanol ad 1 L Aqua dest.</p>	<p>10 x Transferpuffer (Western Blot) 288 g Glycin 60,4 g <i>Trizma</i>[®] Base ad 2 L Aqua dest.</p>
<p>10 x TBS-T (Western Blot) 60,57 g <i>Trizma</i>[®] Base 87,66 1,5 M NaCl 0,05% <i>Tween</i>[®] 20 ad 1 L Aqua dest. pH 7,4</p>	<p>10 x SDS-Laufpuffer (Western Blot) 30,3 g <i>Trizma</i>[®] Base 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 L Aqua dest.</p>
<p>Stripping-Lösung (Western Blot) 29,22 g NaCl 29 mL 100%ige Essigsäure ad 1 L Aqua dest.</p>	<p>Cleavage-Puffer (MALT1-Aktivitätsassay) 50 mM MES pH 7.0 150 mM NaCl 10% (w/v) Saccharose 0.1% (w/v) CHAPS 1 M Sodium citrate 10 mM DTT</p>

3.1.3. Geräte

Geräte des allgemeinen Laborbedarfs werden nicht aufgelistet.

Tab. 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Axio Scope.A1	Zeiss
AxioCam MRc	Zeiss
BD FACSAria™ Illu	Becton Dickinson Biosciences
Centrifuge 5417R	Eppendorf
CURIX 60	Agfa
FLUOstar Omega	BMG LABTECH
Heraeus™ Multifuge™ X3R Centrifuge	Thermo Scientific
LAS-3000	Fujifilm
LightCycler 480	Roche
NanoDrop™ ND-1000	Peqlab
Olympus BH-2	Olympus
Olympus Camedia C-5050	Olympus
Rotina 35 R	Hettich Zenrifugen

3.1.4. Kits

Tab. 6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Maxima [®] SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific
PathScan [®] Cleaved Caspase-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit	Cell Signaling Technology [®]
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	Thermo Scientific
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche

3.1.5. Gebrauchsmaterial

Gebrauchsmaterialien des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

Tab. 7: Verwendete Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
384-well non-binding plates, black	Greiner Bio-one
Cell Scraper	Sarstedt
LightCycler [®] 480 Multiwell Plate 96	Roche
Reaktionsgefäße, DNA-, DNase-, RNase-frei	Sarstedt
Zellkulturgefäße	Thermo Scientific

3.1.6. Software und Internetdatenbanken

Die folgenden Softwares und Datenbanken wurden zur Erstellung dieser Arbeit benutzt.

Tab. 8: Verwendete Software und Internetdatenbanken

Software oder Internetdatenbank	Hersteller
Adobe V.10.1.9	Adobe Reader X
Adobe® Photoshop® CS3 Extended V.10.0	Adobe Systems
Aida Image Analyzer V.3.44	Raytest
AxioVisionLE Rel. 4.7.1	Zeiss
LightCycler 480 Software V.1.5	Roche
ELM (<i>Eukaryotic Linear Motif</i>)	http://elm.eu.org/
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corporation
Omega MARS V.2.41	BMG LABTECH
OmniGraffle 7.3	The Omni Group
PASW Statistics 18, SPSS®	IBM®
Primer 3 V.0.4.0	http://frodo.wi.mit.edu
PrimerBank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/

3.1.7. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder mit Hilfe des Programms *Primer 3* entworfen oder der *PrimerBank* entnommen. Die CYLD-Primersequenz wurde der Literatur entnommen (Jono et al. 2004). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG. Alle Oligonukleotide wurden bei -20 °C in einer Konzentration von 100 pmol/ µL gelagert.

Tab. 9: In der qPCR verwendete Oligonukleotidpaar mit Angabe von Sequenz, Schmelztemperatur (T_m) und zu erwartende Größe des Produkts.

Zusammengestellte Oligonukleotid-Primer		
Name	Sequenz [5'-3']	T_m [°C]
GAPDH FW	CAGAACATCATCCCTGCCTCT	59,8
GAPDH REV	GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG	60,3
CYLD FW	ACGCCACAATCTTCATCACACT	58,4
CYLD REV	AGGTCGTGGTCAAGGTTTCACT	60,3
MALT1 FW	AGAGAAGTGTTGATGGCGCT	57,9
MALT1 REV	GTAGTGAGGAATAGGGCTTCCA	60,3
PTCRA FW	AGCCCCATCTGGTTCTCAG	58,8
PTCRA REV	AGGGCCATAGGTGAAGGCAT	59,4

3.1.8. Antikörper

Die Antikörper wurden in der Arbeit bei verschiedenen Methoden angewandt. Sie kamen bei zytologischen Färbungen, beim Western Blot, sowie bei Immunpräzipitationen und dem MALT1-Aktivitätsassay zum Einsatz. Hierbei wurde die Antikörperverdünnung jeweils angepasst.

Tab. 10.1: Verwendete Antikörper mit Angabe von Verdünnung, Katalognummer und Hersteller.

Zielantigen	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Western Blot			
Bcl 10 (331.3)	1:500	sc-5273	Santa Cruz Biotechnology®
CARD 10 (B-4)	1:250	sc-271849	Santa Cruz Biotechnology®
CYLD	1:1000	ab 137524	abcam®
GAPDH	1:2500	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology®
HSC70 (B-6)	1:2500	sc-7298	Santa Cruz Biotechnology®
IKK beta (Y466)	1:1000	ab 32135	abcam®
IKK beta (phospho Y199)	1:500	ab 59195	abcam®
TRAF6 (H-274)	1:1000	sc-7221	Santa Cruz Biotechnology®
MALT1	1:500	HPA00386 5	Sigma® Prestige Antibodies®
MALT1 (B-12)	1:1000	sc-46677	Santa Cruz Biotechnology®
Phospho-CYLD (Ser418)	1:1000	#4500	Cell Signaling Technology®
RelB (C1E4)	1:1000	#4922	Cell Signaling Technology®
Ubiquitin (P4D1)	1:1000	#3936	Cell Signaling Technology®
goat-anti mouse IgG _{2a}	1:2500	sc-2055	Santa Cruz Biotechnology®
goat-anti rabbit IgG	1:2500	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology®

Tab. 10.2: Verwendete Antikörper mit Angabe von Verdünnung, Katalognummer und Hersteller.

Zielantigen	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Immunpräzipitation			
Bcl 10 (331.3)	1:500	sc-5273	Santa Cruz Biotechnology®
CARD 10 (B-4)	1:250	sc-271849	Santa Cruz Biotechnology®
MALT1 (B-12)	-	sc-46677	Santa Cruz Biotechnology®
TRAF6 (H-274)	-	sc-7221	Santa Cruz Biotechnology®
Ubiquitin (P4D1)	1:1000	#3936	Cell Signaling Technology®
anti mouse Ig	-	Z0259	Dako
anti rabbit Ig	-	X0936	Dako
goat-anti mouse IgG _{2a}	1:2500	sc-2055	Santa Cruz Biotechnology®
goat-anti rabbit IgG	1:2500	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology®
MALT1-Aktivitätsassay			
MALT1 (B-12)	-	sc-46677	Santa Cruz Biotechnology®
Immunzytochemie			
MALT1	1:1000	HPA00386 5	Sigma® Prestige Antibodies®
anti-rabbit® Alexa Fluor 488	1:1000	A11008	Invitrogen®

3.1.9. Zelllinien

Im Rahmen der Arbeit wurden mehrere humane Zelllinien von Adenokarzinomen der Pankreas untersucht. Dabei handelt es sich um die kommerziell erwerblichen Linien Panc-1 (CRL-1469), Panc-2 (CRL-2553) und BxPC3 (CRL-1687).

Die verwendete Zelllinie L3.6pl entstammt ursprünglich der Pankreaskarzinom Zelllinie COLO 357 und besitzt ein hohes Potential Lebermetastasen zu bilden (Dixon et al. 1999). Aus diesen Zellen wurde in unserem Labor eine gemcitabinresistente Subgruppe selektioniert, welche als L3.6pl Res aufgeführt ist (Gungor et al. 2011). Die ursprüngliche Zelllinie wird hier als L3.6pl wt betitelt.

Zusätzlich wurden die primären Zelllinien 5061, 5072, 5156, 5328 in die Fragestellung mit aufgenommen. Sie stammen aus Adenokarzinompatienten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Als Referenz wurden HPDE Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um immortalisierte humane Zellen, welche aus duktalem Pankreasepithel gewonnen wurden. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise vom Uniklinikum Kiel von der Arbeitsgruppe S. Sebens zur Verfügung gestellt.

Als weitere Kontrollzelllinie wurden Jurkat Zellen (TIB-152) verwendet. Hierbei handelt es sich um T-Lymphozyten, welche aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie etabliert wurden.

3.1.10. Medien

Folgende Medien wurden verwendet.

Tab. 11: Zelllinien mit entsprechendem Medium

Medium	Zelllinie
Keratinocyten-SFM + 10% FCS + 1% P/S (P = 10.000 U/mL; S = 10.000 µg/mL) + 1% eGF (1 µg/mL)	HPDE
RPMI-1640 + 10% FCS + 1% P/S (P=10.000 U/mL; S = 10.000 µg/mL)	L3.6pl wt, Jurkat
RPMI-1640 + 10% FCS + 1% P/S (P = 10.000 U/mL; S = 10.000 µg/mL) + 2 µM Gemzar®	L3.6pl Res
DMEM + 10% FCS + 1% P/S (P = 10.000 U/mL; S = 10.000 µg/mL)	Panc-1, Panc-2, BxPC3
RPMI-1640 + 10% FCS + 1% P/S + 0,5% Transferrin (10 µmol/mL) + 1% Insulin (1 µg/mL) + 1% FGF (1 µg/1mL) + eGF (1 µg/1mL)	5061, 5072, 5156, 5328

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Kultivierung humaner Zellen

Die Zelllinien wurden unter aeroben Bedingungen (37°C mit 5% CO₂,) im Brutschrank kultiviert. Hierzu wurden je nach Zelllinie die in Tabelle 10 aufgelisteten Medien verwendet. Im Mittel erfolgte alle drei Tage eine Zellpassage. Für die Passage wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) durch 2ml Trypsin-EDTA pro 75 cm² Zellkulturflasche gelöst. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 37 °C katalysiert und anschließend durch FBS-haltiges Medium gestoppt. Die gelösten Zellen wurden in frisches Medium überführt.

Bei Bedarf wurden hierbei Zellen zu Expansionszwecken subpassagiert.

Zur Untersuchung der Proteinexpression in serumfreier Umgebung wurde das FCS-haltige Kulturmedium entfernt, die adhärenen Zellen ausgiebig mit DPBS gespült und anschließend mit dem spezifischen Medium ohne Zusatz von FCS über Nacht bei normalen Bedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Spülvorgang zur Entfernung sezernierter Serumbestandteile wiederholt und die Zellkultur mit frischem FCS-freiem Medium bestückt. Dieser Zeitpunkt wurde als t_0 der serumfreien Inkubation gesetzt.

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die gelösten Zellen pelletiert. Hierzu wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 1000 g für fünf Minuten zentrifugiert.

Die Resuspension des Pellets erfolgte in 1 ml Einfriermedium (Recovery Cell Culture Freezing Medium, Life technologies™/ GIBCO®). Die Zellsuspension wurde in Isopropanolbehältern langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Die anschließende Verwahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der lebenden Zellen in einer gegebenen Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²) bestimmt. Für die Unterscheidung toter Zellen wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen mit

Trypanblau (Life technologies™) versetzt. Dies ist ein Farbstoff, der durch die perforierte Zellmembran toter Zellen eindringen kann. Es erfolgte somit eine Blau-Markierung abgestorbener Zellen. So wurden ausschließlich vitale Zellen in die Berechnung einbezogen. Insgesamt wurden 10 µL in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und vier der benetzten Großquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte mit der angegebenen Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl in ausgezählten Großquadraten}}{\text{ausgezählte Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

3.2.1.3. Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten zur Western Blot Analyse wurden gewonnene Zellpellets vorerst durch einen Waschschrift mit DPBS von übrigen Serumbestandteilen befreit. Hierzu erfolgte zuerst eine Resuspension in DPBS und erneute Zentrifugation (5 min bei 4 °C und 1000 g). Anschließend wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 20-200 µl RIPA-Puffer und Halt™ Protease Inhibitor Cocktail gelöst. Es folgte ein 10 minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Weiterführend kam es zur Auftrennung der genomischen DNA von den Zellproteinen und Membranbestandteilen mittels Zentrifugation (bei 4 °C mit 10.000 g für 15 min). Die Konzentration des entstandenen Proteinüberstandes wurde mittels BCA-Test (siehe Kapitel 3.2.3.1.) ermittelt. Die Proben wurden bei -20 °C verwahrt.

Im Apoptose Assay verwendete Lysate wurden nach ausreichender Spülung mit DPBS durch Zugabe von 500 µl 1x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology®) in 10 cm-Schalen lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 10min auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Cell Scrapers (Sarstedt) gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Danach wurde mit den Zelllysaten wie oben beschrieben verfahren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.4. In vitro Inhibition

Mepazine hydrochloride (Calbiochem®) ist ein Dopaminantagonist, der ursprünglich als Phenothiazine als Neuroleptika eingesetzt wurde. In einer Studie von Nagel et

al. wurde durch Multiarrayversuche die MALT1 – aktive Wirkung von Phenothiazinen in B-Zell Lymphomen gezeigt (Nagel et al. 2012).

Biperiden (Sigma aldrich) ist ein Anticholinergikum, das im klinischen Alltag zur Behandlung Extrapiramidaler Motorischer Störungen (EPMS) eingesetzt wird (Jackisch et al. 1994, Domino und Ni 2008, Klinkenberg et al. 2012).

Bei MI-2 (Calbiochem[®]) handelt es sich um einen synthetisch hergestellten niedermolekularen MALT1-Inhibitor ohne klinische Anwendungsgebiete.

Für Mepazin Hydrochloride (Calbiochem[®]) und Biperiden Hydrochloride (Sigma aldrich) wurde eine Dosis verwendet, die der klinischen (oralen) Dosis und ihrer resultierenden pharmakodynamisch wirksamen Konzentration im Gewebe entspricht (Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz 2014).

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien und die Normalzelllinie HPDE mit Malt1-Inhibitoren behandelt. Dazu wurden die Zellen in sterilen 6-Well-Schalen 24 h anwachsen gelassen und bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt. Die gelösten Substanzen wurden in Zellkulturmedium auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und in diesen auf die zu behandelnden Zellrasen pipettiert. Als Kontrolle wurde je ein Well ohne Inhibitor mit Nährmedium und ein Well mit der äquivalenten Menge Lösungsmittel mitgeführt. Dabei wurde die höchste Konzentration als Orientierung genutzt. Als Lösungsmittel diente Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma aldrich).

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte eine 24-stündige Inkubationszeit. Anschließend wurden Medium und Inhibitor abgenommen und Zelllysate gewonnen.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Tab. 12: Verwendete MALT1 Inhibitoren und ihre eingesetzten Konzentrationen.

Mepazin Hydrochloride (Calbiochem®)	MI-2 (Calbiochem®)	Biperiden Hydrochloride (Sigma aldrich)
5 µM	5 µM	2mg p.o. ≅ 3,7 µg/µl
10 µM	10 µM	6mg p.o. ≅ 11,1 µg/µl
15 µM	15 µM	16mg p.o. ≅ 29,6 µg/µl
25 µM	25 µM	

Die Inhibition der proteasomalen Proteindegradation in einer Zelle kann durch Einsatz des Proteasomeninhibitors MG-132 (Calbiochem®) erreicht werden. Die Behandlung der Zellen mit diesem Pharmakon wurde mit dem Ziel durchgeführt den Proteasomen-unabhängigen Abbau der untersuchten Proteine zu zeigen.

Der Proteasomeninhibitor MG-132 (Calbiochem®) wurde unter gleichen Voraussetzungen wie oben beschrieben mit folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Tab. 13: Proteasomeninhibitor MG-132 und dessen verwendete Konzentrationen.

MG-132 (Calbiochem®)
1 µM
2 µM
4 µM
8 µM

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Isolation von RNA

Zelluläre RNA kann mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab) aus Zellen gewonnen werden. Es bewirkt die Freisetzung und Lösung der RNA, sowie die Inhibition schädlicher RNAsen. Die in 1ml peqGold TriFast resuspendierten Zellpellets wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform vermischt, welches zur Trennung der Suspensionsbestandteile je nach ihrer Löslichkeit führt. Es folgte eine zweite Inkubation (10 min bei Raumtemperatur).

Nach der darauffolgenden Zentrifugation (15 min bei 12.000 g und 4 °C) war eine deutliche Phasenbildung in Protein-, DNA- und RNA-Schicht sichtbar. Die obere wässrige Schicht enthält die RNA, während sich in der unteren, organischen Schicht Proteine wiederfinden. Die DNA bildet die Interphase. Daher wurde die wässrige Schicht mit der RNA abgenommen und mit der äquivalenten Menge 70 %igem Ethanol zur Ausfällung versetzt.

Die Proben wurden mit dem RNeasy mini Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Hierbei wird das Prinzip einer Anionenaustauschersäule genutzt. Die präparierten Proben werden durch eine in den RNeasy-Säulen enthaltene positiv geladene Membran bei 8.000 g / 4 °C für 15 sec zentrifugiert. Dies führt zu einer Trennung der stark negativen Nukleinsäuren von weniger stark negativ geladenen Proteinen. Die enthaltene RNA und DNA haften an der Membran. Zur Trennung von DNA und RNA wurde in den folgenden Waschschrritten nach Herstellerangaben der pH und die Ionenstärke des Puffers so eingestellt, dass durch die unterschiedliche negative Ladung in diesem Fall die Bindungsstärke der DNA zur Membran abnimmt und diese abgewaschen wird. Anschließend kommt es durch Anwendung eines Puffers höherer Ionenstärke zur Eluierung der RNA von der Membran. Die gewonnene RNA wurde in einem 1,5ml Eppendorf Gefäß aufgefangen und in 30µl RNase freiem H₂O gelöst. Die Konzentration und Qualität wurde durch photometrische Messung mittels NanoDrop™ ND-1000 (Pepqlab) bestimmt. Anschließend wurde die RNA für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.2. Reverse Transkription - Synthese komplementärer DNA

Für die Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) verwendet. Dabei wurde je 1µg der isolierten RNA eingesetzt und mit Hilfe der Transcriptor Reverse Transcriptase und anchored-oligo (dT)₁₈ Primern, welche an die Poly(A)-Schwänze eukaryotischer prä-mRNA binden, transkribiert. Die so entstandenen komplementären DNA-Stränge entsprechen der mRNA der Zellen. Die synthetisierte cDNA wurde mit 80 µl H₂O auf 10ng/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.2.3. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) stellt ein besonderes Verfahren zur Vervielfältigung zellulärer Oligonukleotide dar. Zum einen bezieht sich die Analyse auf mRNA, zum anderen ist durch das besondere Detektionsverfahren eine Quantifizierung der PCR-Produkte möglich.

Dies ist ein großer Unterschied zu der normalen Polymerase-Kettenreaktion nach Kleppe et al. Hier kommt es klassischerweise zu einer Amplifikation der DNA durch zyklische Wiederholungen der Replikation. Eine genaue Aussage über die eingesetzte und vervielfältigte DNA-Menge kann nicht getroffen werden (Kleppe et al. 1971).

Bei der quantitativen real-time PCR kommt es zur Amplifikation von cDNA, welche zuvor aus zellulärer mRNA synthetisiert wurde. Während der anschließenden exponentiellen Replikationsphase werden die PCR-Produkte durch Interkalation des fluoreszenzgekoppelten SYBR-Greens detektiert und eine Quantifizierung der Produkte kann vorgenommen werden.

Durch die Analyse der zellulären mRNA kann auf die aktuelle Genexpression in einer Zelle geschlossen werden.

Für die mRNA Analysen der vorliegenden Arbeit wurden für jedes untersuchte Zielgen drei qRT-PCRs in Triplikaten Primer durchgeführt.

Hierfür wurde vorerst ein MasterMix aus 12,5 µl SYBR Green (Thermo Scientific), 9,5 µl H₂O und 1 µl Primergemisch (1:1 Gemisch aus Forward und Reverse Primer (20 pmol)) pro Probe in eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden je 2 µl der hergestellten cDNA verschiedener Zelllinien bzw. H₂O als Leerwertkontrolle hinzugegeben. Der gesamte Vorgang erfolgte zum Schutz des SYBR-Greens auf Eis. Als Referenz wurde jeweils cDNA von HPDE-Zellen als duktales Epithelzelle, sowie GAPDH als konstant exprimiertes Housekeeping-Gen mitgeführt. Die PCR wurde am *LightCycler*[®] 480 (Roche) durchgeführt.

Nach einführender Hitze-Aktivierung der Polymerase folgten 45 äquivalente Zyklen (Tab. 14). Hierbei kommt es durch wiederholte Replikation und Denaturierung zur Amplifikation spezifischer Genabschnitte, welches durch spezifische verifizierte

Primer gewährleistet sein soll. Die Spezifität wurde zusätzlich durch die Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Zur Auswertung der qPCR wurde der *Cycle of Threshold* (Ct) herangezogen, welcher in der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmt wird. Der Ct-Wert entspricht dem Zyklus, in dem die detektierte Fluoreszenz des SYBR-Greens in den DNA-Doppelsträngen der Probe die Hintergrundfluoreszenz des Ansatzes signifikant übersteigt. Eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals gilt erst dann als signifikant, wenn ein bestimmter Schwellenwert, der sogenannte *Threshold*, überschritten wird. Bei 35 Zyklen wurde ein Cut-Off gesetzt, Ct-Werte >35 werden somit als fehlende Expression interpretiert und nicht bei der anschließenden Berechnung berücksichtigt.

Tab. 14: Reaktionsschritte der qRT-PCR.

Zyklen	Temperatur	Dauer	PCR-Abschnitt
1	95 °C	10 min	Aktivierung der Polymerase
45	95 °C	15 sek	Denaturierung der dsDNA, Primer-Hybridisierung und Replikation
	60 °C	1 min	

Die anschließende Datenanalyse erfolgte nach dem $\Delta\Delta C_t$ Prinzip (Livak und Schmittgen 2001). Dabei wurde als endogene Kontrolle das Houskeeping-Gen GAPDH angenommen, zusätzlich wurden die Normalzelllinie HPDE als Expressionsreferenz verwendet. Durch die folgende Berechnung können Aussagen über die relative Expression des untersuchten Proteins x in Krebszellen zu dem nicht-pathologisch regulierten Protein GAPDH in Karzinomzellen sowie in Normalzelllinien getroffen werden.

Die Ratio R der Expression des untersuchten Proteins X wurde für jede Probe wie folgt berechnet:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad | \quad \Delta Ct = GAPDH - X \quad \text{resp.} \quad \Delta Ct = GAPDH - X \\ | \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_X - \Delta Ct_{HPDE} \quad \text{resp.} \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_X - \Delta Ct_{HPDE}$$

Der Mittelwert aller Ratios wurde als relative Genexpression ermittelt.

3.2.3. Biochemische Methoden

3.2.3.1. Bicinchoninsäure (BCA) –Proteinbestimmung

In der Biochemie werden die Komplexbildungs- und Farbeigenschaften von Bicinchoninsäure (BCA) zur quantitativen Proteinbestimmung (0,5 µg/mL – 1,5 mg/mL) mittels photometrischer Messung benutzt. Durch eine quantitative Komplexbildung von Cu²⁺ Ionen und Peptidbindungen und anschließender Reduktion der Kupferionen zu Cu⁺ erfolgt ein Farbumschlag, welcher proportional mit der Proteinmenge zunimmt. (Smith et al. 1985)

Mittels des *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible* (Thermo Scientific) wurde in der vorliegenden Arbeit der Proteingehalt der Zelllysate nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden die Zelllysate 1:5 mit H₂O verdünnt, die photometrische Auswertung erfolgte bei 562 nm mit dem *FLUOstar Omega* und der Software *Omega* (beide BMG LABTECH). Anschließend erfolgte die Konzentrationsermittlung anhand einer BSA (Bovines Serumalbumin)-Verdünnungsreihe. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen.

3.2.3.2. SDS-Page (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)

Ziel der Gelelektrophorese ist die Auftrennung von Proteingemischen. Durch Anlage eines elektrischen Feldes werden Proteine nach ihrer molaren Masse, der Nettoladung und ihrer Konformation aufgetrennt (Tiselius 1937). Für die Analyse der Zelllysate wurde in der vorliegenden Arbeit die SDS-PAGE verwendet, dabei wird bei der Gelelektrophorese das Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) zugefügt, Die Detergenzanlagerung führt zur Aufhebung der nativen Proteinkonformation und Neutralisierung der Nettoladung. Somit kann die

Auftrennung des Proteingemisches rein nach der molaren Masse erfolgen. (Weber und Osborn 1969)

Die verwendeten SDS-Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel wurden in folgender Zusammensetzung hergestellt und bei 4 °C feucht gelagert.

4% Sammelgel (4 Gele)

2,5 mL 1,5 M Tris pH 8,8

1,34 mL Acrylamid (19:1)

100 µL 10% SDS

50 µL 10% APS

40 µL TEMED

10% Trenngel (4 Gele)

6,6 mL Acrylamid (19:1)

5,0 mL 1,5 M Tris pH 8,8

200 µL 10% SDS

200 µL 10% APS

40 µL TEMED

8 mL Aqua dest.

Für die Untersuchung der Zelllysate wurden je Probe, falls nicht anders deklariert, 20 µg Protein eingesetzt. Diese wurden mit Aqua dest. auf ein Probenvolumen von 20µl aufgefüllt und anschließend mit 5 µl 5x Laemmli-Puffer versetzt. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Größenbestimmung der detektierten Proteine wurden jeweils ein Protein-Marker (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, Bio-Rad) mit aufgetragen. Die elektrische Auftrennung der Proben wurde bei 15 mA / 30 min, gefolgt von 30 mA /45 min in der Elektrophoresekammer (Bio-Rad) unter Laufpuffer (siehe Tab. 4) durchgeführt.

3.2.3.3. Western Blot und Immunodetektion

Anschließend an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Gele mittels Western Blot weiterführend analysiert.

Der Western Blot stellt ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran dar. Dies ist die Grundlage für die weitere Detektion einzelner Proteine (Renart et al. 1979, Burnette 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Western Blot als Tank-Blot-Methode unter Transferpuffer in einer speziellen Kammer (Bio-Rad) durchgeführt. Für die Übertragung der Proteine wurde dafür ein elektrisches Feld senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegt, sodass die Proteine unter Beibehaltung ihres

Trennungsmusters in Richtung der Anode auf eine Nitrozellulosemembran (Thermo Scientific) transportiert werden.

Zum Schutz der Proteinstrukturen wurde der Transfer in einer Umgebungstemperatur von 4 °C und zusätzlicher Eiskühlung in der Transferkammer durchgeführt. Durch reversible Bindung des Azofarbstoffes Ponceau S an Proteine wurde die Güte und Vollständigkeit des Transfers kontrolliert. Die gefärbte Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit Aqua dest. gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 5 %iger Milchpulverlösung blockiert, sodass der eingesetzte Primärantikörper nur an seine spezifischen Epitope bindet. Dieser wird in seiner spezifischen Verdünnung in einer 5%Milchpulverhaltigen PBS-Lösung über Nacht bei 4°C mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Membranen (5 min mit TBS-T bei RT) wurden die Membranen mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2500 in 5 %iger Milchpulverlösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper ist gegen die Fc-Teile des Erzeugerspezies-Antikörper gerichtet, zusätzlich ist er mit horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt. Dieses ist für die spätere Immunodetektion wichtig. Vorher erfolgte eine gründliche Spülung mit TBS-T (6 x 10 min bei RT) um Antikörperüberschüsse zu entfernen. Zur anschließenden Detektion wurde *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) folglich der Herstellerangaben verwendet. Das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat wird durch das HRP unter Lichtabgabe oxidiert. Die Chemilumineszenz wurde mit dem *LAS-3000* (Fujifilm) digital gemessen.

Zum Vergleich der Zelllinien miteinander und um Unterschiede in ihrer Expression zu analysieren, wurden die Membranen mittels der *Aida Image Analyzer* (Raytest) Software densitometrisch gemessen. Bei diesem Verfahren wird die Farbdichte der Proteinbanden quantitativ bestimmt. Durch Ermittlung der Ratio R können Rückschlüsse auf die relative Proteinmenge gezogen werden.

$$\text{Ratio } R = \frac{\text{Zielgen}}{\text{Housekeeping} - \text{Gen}}$$

Um sicher zu stellen, dass immer die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde, wurde jede detektierte Membran anschließend mit einem Housekeeping-Protein inkubiert. Dafür wurde der verwendete Zielgen-Antikörper entfernt. Dies erfolgte durch 15 min Inkubation (bei RT) in Stripping Lösung, einmaliges Waschen mit Aqua dest. und erneuter Inkubation für 5 min bei RT mit 1M Tris-HCl (pH=8). Anschließend erfolgte die Behandlung der Membranen nach dem Protokoll der Immunodetektion. Es wurde darauf geachtet, dass der Primärantikörper aus einer anderen Spezies entstammt wie der bereits verwendete Primärantikörper und das Molekulargewicht des Housekeeping-Gens, bspw. HSC70, GAPDH, nicht mit dem des gesuchten Proteins kollidiert.

3.2.3.4. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) stellt ein Pulldown-Assay zur Isolation eines spezifischen Antigens aus Gesamtzelllysaten mittels Antikörper und einer festen Phase aus Agarose Beads dar. Durch weitergehende Analyse können Proteinmodifikation wie Ubiquitinierung oder Phosphorylierung genauer betrachtet werden. Aber auch Proteinkomplexe und Protein-Protein Interaktionen können untersucht werden.

Ein Antikörper dient dabei als Bindestück zwischen dem spezifischen Protein, welches durch die Fab-Teile gebunden wird und den Protein A/G beschichteten Beads, welche die Fc-Teile des Antikörpers binden. Die Beads dienen bei dem Verfahren als stationäre bzw. feste Phase. Durch ihre Dichte können sie mittels Zentrifugation vom restlichen eingesetzten Zelllysate getrennt werden. Es erfolgt eine selektive Trennung der Antikörpergebundenen Proteine vom Gesamtzelllysate (Bjorck und Kronvall 1984).

Es wurden im ersten Schritt 500 µg Gesamtzelllysate gelöst in RIPA-Puffer (SIGMA-ALDRICH®) über Nacht mit 40 µl Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent (Santa Cruz Biotechnology®) rotierend bei 4 °C inkubiert. Dieses Preclearing dient der Minimierung unspezifischer Bindungen. Anschließend erfolgte unter gleichen Bedingungen die Inkubation mit dem IP-fähigen Antikörper für 90 min. Hier wurden jeweils 10 µg von TRAF6 (H-274) bzw. MALT1 (B12) (beide Santa Cruz Biotechnology®) eingesetzt. Durch dreimaliges Waschen mit PBS und anschließender Zentrifugation (5 min / 300g / 4 °C) wurden anschließend die Beads

von dem überschüssigen Zelllysats getrennt. Der Zusatz von 30 µl 5x Laemmli-Puffer und Erwärmung der Proben für 5 min auf 95 °C führt zu der Denaturierung der Proteine und somit die Trennung der Protein A/G PLUS-Agarose Beads und ihren gebundenen Proteinen. Nach anschließender Zentrifugation (5 min / 300g / 4 °C) wird der Proteinüberstand mittels SDS-Page und Western Blot Verfahren weiter analysiert.

Die Immunodetektion mit verschiedenen Antikörpern dient der Begutachtung von Proteinmodifikationen an den isolierten Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf die Proteinubiquitinierung gelegt. Es erfolgte die Inkubation mit dem poly- und monoubiquitin detektierenden Antikörper Ubiquitin (P4D1) (Cell Signaling Technology®).

Im Sinne einer Co-Immunopräzipitation ist eine Detektion weiterer Proteine möglich. Liegen diese in einem Komplex mit dem selektierten Protein, z. Bsp. MALT1, vor, fallen sie ebenfalls mit MALT1 aus und sind auf der Membran durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachweisbar. Im Rahmen der MALT1-IP wurden hierfür die Antikörper Bcl 10 (331.3) (1:500 / Santa Cruz Biotechnology®) und CARD 10 (B-4) (1:250 / Santa Cruz Biotechnology®) verwendet.

Zusätzlich wurden für jedes eingesetzte Zelllysats zwei Kontrollen mitgeführt. Eine Input-Kontrolle mit 1/10 des eingesetzten Gesamtzelllysats und eine Isotypkontrolle. Hierbei wurden für die IPs 10 µg Ig Antikörper des jeweiligen Erzeugertiers eingesetzt (anti mouse Ig / anti rabbit Ig / Dako).

3.2.3.5. MALT1-Aktivitätsassay

Ziel des MALT1-Aktivitätsassays ist es die Paracaspaseaktivität von MALT1 Proteinen zu bestimmen. Der Versuch erfolgte nach dem Protokoll Measurement of Endogenous MALT1 Activity von D. Nagel und D. Krappmann (Nagel und Krappmann 2013). Abweichend wurde als Antikörper MALT1 (B12) (Santa Cruz Biotechnology®) verwendet, sowie die Stimulation mit Mepazine hydrochloride (Calbiochem®) und Biperiden (Sigma aldrich) jeweils wie im Kapitel in vitro-Inhibition beschrieben für 24h durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen.

3.2.3.6. MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Bestimmung der Zellviabilität. Diese wird im MTT-Test mit dem zelleigenen Reduktionsvermögen von NADP und NADPH gleichgesetzt. Nach Zugabe des namensgebenden Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) kommt es abhängig von den Reduktionsäquivalenten zur Bildung des blauvioletten Formazans, welches durch photometrische Bestimmung der Absorption quantifiziert werden kann (Mosmann 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von ausgewählten pharmakologischen Wirkstoffen auf die Zellviabilität untersucht. Dabei wurden Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 72h beobachtet. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erreichen wurden nach der Ermittlung der Zellzahl in der Neubauerzählkammer je 4000 Zellen in einem Volumen von 200 µl in die Wells von 96-Well-Platten pipettiert. Zum Schutz vor Kondensationsverlusten füllte DPBS (GIBCO®) die äußersten Wells der Platten. Für jeden Zeitpunkt der Messung wurde eine eigene Platte vorbereitet. Nach einer Adhärenzzeit von 24h erfolgte die pharmakologische Inhibition, sowie die Messung des Ausgangspunktes. Die Testung der verschiedenen Konzentrationen erfolgte als Triplikat. Die Pharmaka wurden wie in dem Kapitel 3.2.1.4. beschrieben verwendet. Nach 24h erfolgte jeweils eine Auffrischung des Mediums. Als Kontrolle wurden pro Zelllinie ein Triplikat mit Medium, sowie ein Triplikat mit dem entsprechenden Lösungsmittel mitgeführt.

Für die photometrische Messung der Zellviabilität wurden die Wells einmalig mit DPBS gespült und anschließend mit 100 µl Medium + 40 µl MT-Substrat (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay/Promega) bestückt. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach einer sowie zwei Stunden im ELISA Reader FLUOstar Omega (BMG LABTECH) bei 490 nm ausgelesen.

3.2.3.7. Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie erfolgt eine Antigendetektion nach dem Prinzip der Immunhistologie auf der Ebene von einzelnen Zellen. Dabei wird erst ein spezifisch bindender Primärantikörper verwendet, der das gesuchte Antigen bindet. In einem zweiten Schritt wird dieser an seinem Fc-Teil durch einen fluoreszenzmarkierten

Sekundärantikörper erkannt. Diese Antikörper können durch bestimmte Wellenlängen zur Emission sichtbaren Lichtes angeregt werden. Zur Darstellung der Zellkerne wird bei der Fixierung der Proben eine DAPI-Lösung verwendet. DAPI, 4,6-Diamidin-2-phenylindol lagert sich an DNA-Stränge an und emittiert blaue Lichtwellen. Diese Zellkernmarkierung ist im Fluoreszenzmikroskop sichtbar und dient als Orientierung bei der Lokalisation der Antigen-signalen.

Zur Färbung der einzelnen Zellen wurde vorerst eine 24-Well-Mikrotiterplatte mit Deckgläschen bestückt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Zellsuspension und entsprechendem Nährmedium. Nach mindestens 24 h oder einer Konfluenz von 60 % wurden die Zelllinien mit 25 µM Mepazine (Kapitel 3.2.1.4.) für 24h stimuliert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen für die Behandlung mit DMSO und 25 µM Mepazine durchgeführt. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen mit DMSO und 25 µM Mepazine vorgenommen.

Nach 24 h wurde das Medium durch Fixierlösung ersetzt (10 min / 4 °C) und anschließend ausreichend mit DPBS gespült. Darauf folgend wurde pro Well 300 µL Blockierlösung auf die Zellen gegeben (1h / Raumtemperatur). Diese dient der Deckung unspezifischer Bindungen, sowie der Permeabilisierung der Zellmembranen zur Erleichterung der Antikörperbindung. Als Primärantikörper wurde MALT1 (Sigma® Prestige Antibodies®) in einer 0,1 % BSA Lösung gelöst und mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Deckgläser wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit der Lösung inkubiert. Bei den entsprechenden Isotypkontrollen erfolgte keine Zugabe des Primärantikörpers.

Nach ausgiebiger Spülung mit DPBS erfolgte die Inkubation (1h, bei RT im Dunkeln) aller Deckgläser mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit® Alexa Fluor 488 (Invitrogen®) welcher 1:1000 in 1 % iger BSA Lösung angesetzt wurde. Überschüssige Antikörperlösung wurde nachfolgend durch reichliche Spülvorgänge mit DPBS entfernt und die Proben wurden mit Hilfe des Eindeckmediums Fluoroshield™ with DAPI (SIGMA-ALDRICH®) auf Objektträgern (SuperFrost/Plus, 75 x 25 mm, Assistent®) fixiert.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die verwendeten Lösungen sind unter Kap. 3.1.2. Tab. 4 aufgelistet. Die Auswertung erfolgte mittels Konfokalmikroskop Leica TCS SPS Tandem und der Software LAS AF (Leica).

3.2.3.8. Apoptose Assay

Mit dem Apoptose Assay kann der Ablauf des programmierten Zelltodes in kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein ELISA Verfahren mit cleaved Caspase 3 Antikörpern und anschließender photometrischen Messung. Durch diese kann neben dem Nachweis der Apoptose auch eine quantitative Aussage zwischen den Proben erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Behandlungseffekt von Pankreaskarzinomzellen mit verschiedenen Pharmaka untersucht. Als Referenz wurden Behandlungskontrollen mit dem verwendeten Lösungsmittel DMSO (Sigma aldrich) mitgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach oben (Kapitel 3.2.1.4.) aufgeführtem Schema für verschiedene Zeitpunkte (6h, 12h, 24h, 48h und 72h) nach Behandlungsbeginn:

Die Lysate wurden mit dem Cell Lysis Buffer (10x) (Cell Signaling TECHNOLOGY®) nach Herstellerangaben gewonnen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 3.2.3.1.) in gleichen Mengen eingesetzt.

Der anschließende Assay wurde nach Herstellerangaben mit dem PathScan® Cleaved Caspase-3 (Asp175) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling TECHNOLOGY®) durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von MALT1 in PDAC Zellen erstmals beschrieben werden.

In diesem Rahmen wurde der Effekt einer spezifischen MALT1 Hemmung mit zum Teil neuen Inhibitoren genauer untersucht.

Des Weiteren wurden interagierende Partner des Zellstoffwechsels in Pankreaskarzinomzellen näher erforscht.

4.1. CYLD Expression im humanen Pankreaskarzinom

CYLD (cylindromatosis (turban tumor syndrome)) ist ein Protein-codierendes Gen, welches als Regulator des NF- κ B Pathways eine entscheidene Rolle in der Karzinogenese und dem angeborenen Immunsystem fungiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde CYLD in den Pankreaskarzinomzellen mit seiner physiologischen Gesamtgröße von 107 kDa nachgewiesen. Zusätzlich zeigten sich zwei MALT1-abhängige Spaltprodukte mit einer Größe von 70 kDa und 40 kDa. Im Western Blot ist die Akkumulation des N-terminalen Produktes als 40 kDa Bande und das C-terminale Produkt als 70 kDa Bande zu sehen (Abb. 7).

Die N-terminale Domäne trägt noch zwei anstatt drei *Cytoskeleton-associated Protein Glycine-rich Domains* (CAP-Gly-Bindungsstellen). Das C-terminale Ende ist Ort der *Deubiquitinierungsaktivität* (DUB) und Bindungsstelle für den *NF- κ B essential modulator* (NEMO) sowie weitere NF- κ B Regulatorproteine.

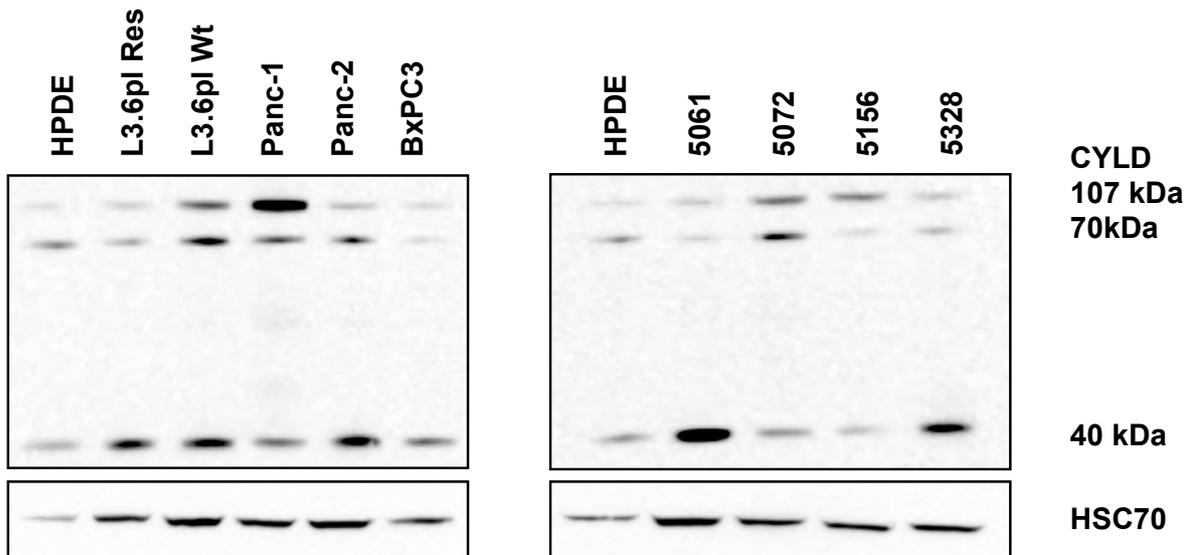


Abb. 7: Western Blot. CYLD Expression in PDAC und HPDE. Gesamtes Protein 107 kDa, Spaltprodukte 70 kDa C-Terminus und 40 kDa N-Terminus. Ladekontrolle mit HSC70. Belichtungszeit 30ms.

Mittels *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) wurde die *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) Expression von CYLD bestimmt (Abb. 8).

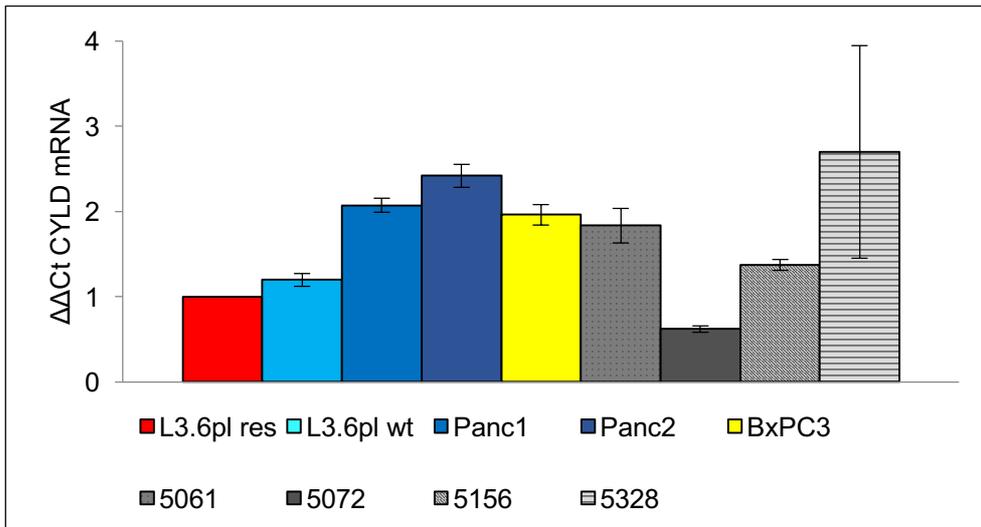


Abb. 8: qRT-PCR. mRNA Quantifizierung von CYLD in Pankreaskarzinomzellen. Bei den Zelllinien 5061, 5072, 5156 und 5328 handelt es sich um primäre Adenokarzinomzellen, die in unserem Labor isoliert wurden. Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls.

Eine 24 stündige serumfreie Kultivierung der Zellen ergab keine Änderung des Expressionsmusters.

Invers zu den qRT-PCR Ergebnissen zeigte sich auf Proteinebene in den Karzinomzellen eine stärkere Expression von CYLD als in der Vergleichslinie HPDE.

Die 24 stündige Inkubation mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 (Calbiochem®) wurde durchgeführt, um eine stabile Akkumulation der CYLD-Anteile nachzuweisen. Diese sind auch bei steigender Konzentration des MG-132 in den Pankreaskarzinomzelllinien konstant nachzuweisen (Abb. 9).

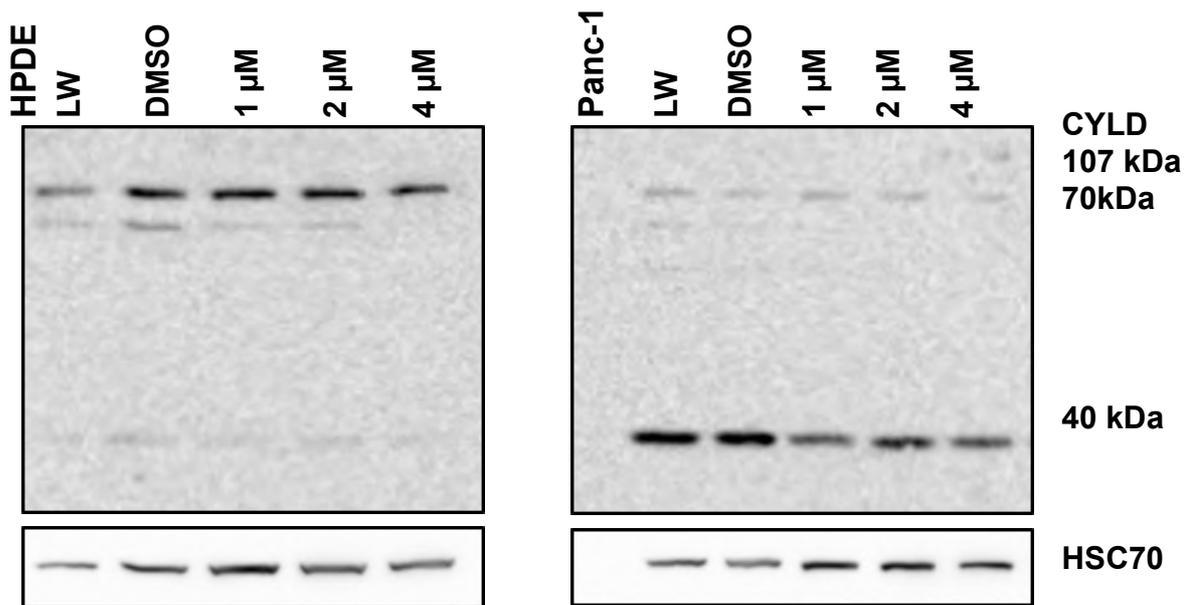


Abb. 9: HPDE und Panc-1 nach 24 stündiger Inkubation mit 1 μM, 2 μM, 4 μM und 8 μM MG-132 (Calbiochem®) Behandlung. Die höchste Dosis mit 8 μM MG-132 erwies sich als letal. Lösungsmittel DMSO als Kontrolle. Als Detektionsantikörper diente anti-CYLD (abcam® / ab 137524 / 1:1000).

Zu sehen ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der 40 kDa Bande bei der Karzinomzelllinie Panc1, welche hier stellvertretend gezeigt ist. Die Ladekontrolle wurde mit HSC70 (Santa Cruz Biotechnology® / sc-7298 / 1:2500) erscheint bei 70 kDa. Belichtungszeit: 40 sec.

4.2. MALT1 Expression im humanen Pankreaskarzinom

Das MALT1 Protein, welches durch das Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Gene 1 codiert wird, ist in lymphatischem Gewebe vertreten. Im normalen Pankreasgewebe ist die Expression von MALT1 nicht beschrieben. Dies bestätigte sich im Rahmen der angefertigten Arbeit.

Im Gegensatz dazu konnte MALT1 in Pankreaskarzinomgewebe (Daten nicht gezeigt) und Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von MALT1 und dessen biologische Aktivität war vorher nicht in Zellen solider Tumore beschrieben.

Die spezifische Paracaspaseaktivität von MALT1 prozessiert unter anderem CYLD als eins seiner Substrate. Durch dieses spezifische Cleavage können mittels MALT1 aus einem CYLD Protein (107 kDa) zwei Spaltprodukte von je 70 kDa und 40 kDa entstehen (Dinkel et al. 2014).

Die MALT1 Expression auf mRNA- und Proteinebene war in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar. Die kommerziell erworbenen Zelllinien (Panc-1, Panc-2, BxPC3), die primär kultivierte Zellen (5061, 5072, 5156, 5328), sowie auch die Lebermetastasenzellen (L3.6pl wt, L3.6pl res) präsentierten in der qRT-PCR MALT1 – mRNA Mengen im Rahmen des Cut-offs (Abb. 10).

Im Western Blot zeigte sich je eine charakteristische Bande bei 92 kDa mit unterschiedlich starker Ausprägung. Die Stärke der MALT1 Banden wurden mit der Intensität des stabil exprimierten Chaperon HSC70 verglichen (Abb. 11).

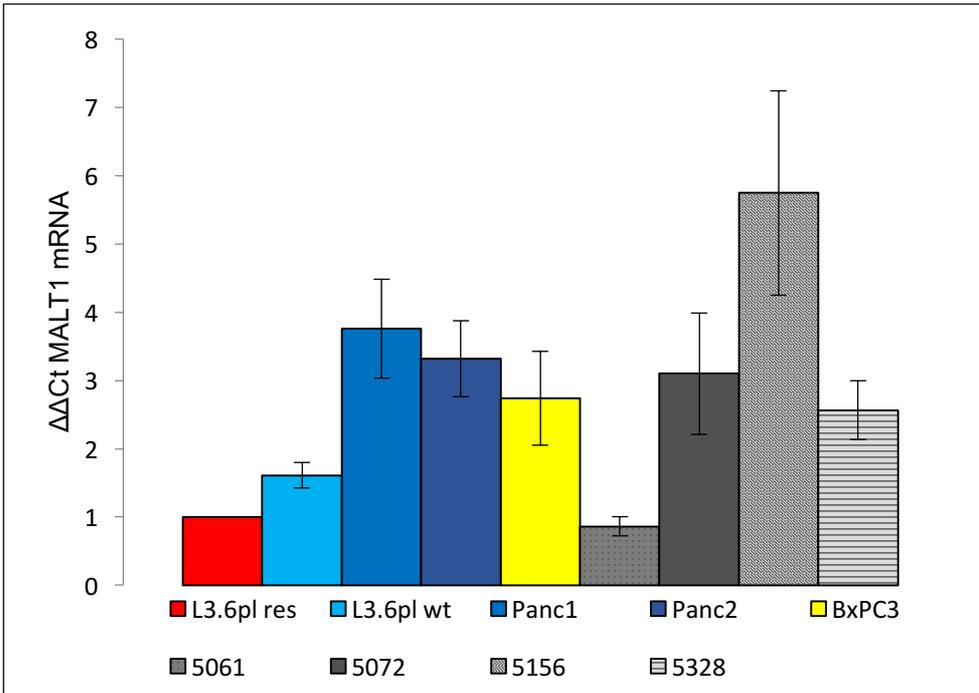


Abb. 10: Expression der MALT1 mRNA in Pankreaskarzinomzellen. Für jeden Datensatz wurde die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

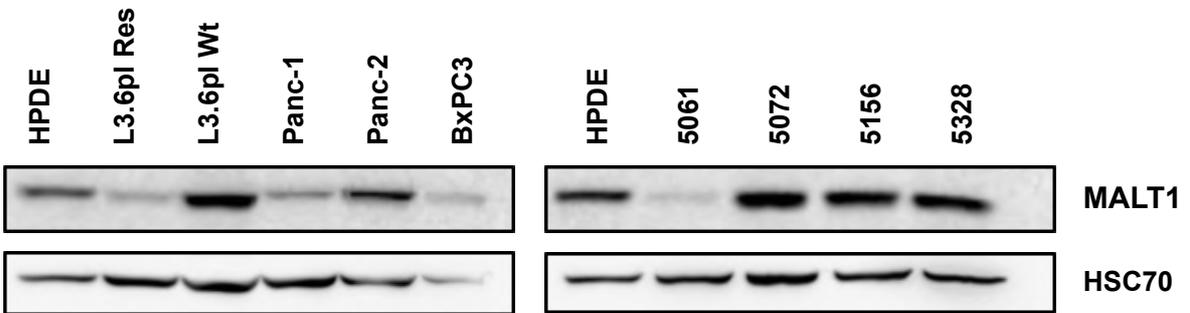


Abb. 11: MALT1 Expression in Pankreaskarzinomzellen und HPDE. Immunodetektion des Proteins bei einer Laufhöhe von 92 kDa unter Verwendung von anti-MALT1 (Sigma®Prestige Antibodies® / HPA003865 / 1:500 / Belichtungszeit 200 sec). Ladekontrolle mittels HSC70 (Santa Cruz Biotechnology® / sc-7298 / 1:2500 / Belichtungszeit 40 sec).

Unter serumfreien Bedingungen zeigte sich keine Veränderung der MALT1 – Proteinexpression, weder in den kommerziell erwerblichen Zelllinien noch in der Referenzzelllinie HPDE.

Die 24 stündige Inkubation mit dem Proteasomeninhibitor MG – 132 (Calbiochem®) zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die MALT1-Proteinexpression (Daten nicht gezeigt).

4.3. MALT1 Inhibition

Mit Hilfe molekularbiologisch wirksamer Substanzen wurde die Aktivität des MALT1 Proteins in verschiedenen Versuchsaufbauten gehemmt und der Einfluss auf die CYLD-Expression, sowie die Zellviabilität untersucht.

Zu den verwendeten Inhibitoren gehörten das Phenothiazin Mepazine hydrochloride (MALT1 Inhibitor II / Calbiochem[®]), der niedermolekulare Hemmstoff MI-2 (MALT1 Inhibitor I / Calbiochem[®]), sowie das Anticholinergikum Biperiden hydrochloride (Sigma aldrich[®]).

Zusätzlich zu der Einzeldosierung wurde der Effekt der Kombinationstherapie aus Mepazine hydrochloride und Biperiden hydrochloride getestet.

Mepazine hydrochloride ist ein Dopaminantagonist, der ursprünglich als Phenothiazine als Neuroleptika eingesetzt wurde. In einer Studie von Nagel et al. wurde durch Multiarrayversuche die MALT1 – aktive Wirkung von Phenothiazinen in B-Zell Lymphomen gezeigt (Nagel et al. 2012).

Biperiden ist ein Anticholinergikum, das im klinischen Alltag zur Behandlung Extrapyramidaler Motorischer Störungen (EPMS) eingesetzt wird (Jackisch et al. 1994, Domino und Ni 2008, Klinkenberg et al. 2012). Auf Grund der ähnlichen chemischen Struktur und durchgeführter *in silico* Bindungsstudien wurde das Medikament ebenfalls als potentieller MALT1-Inhibitor eingestuft. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr. Betzel erhoben und werden hier nicht gezeigt

4.3.1. Zellkultur

Erste Behandlungsversuche der PDAC Zellen mit Mepazin und Biperiden erfolgten in der Zellkultur. Dafür wurden die kommerziell erhältlichen PDAC-Zelllinien Panc-1, Panc-2, BxPC3 benutzt. Zusätzlich erfolgten die Versuche mit der Zelllinie L3.6pl wt, welche sich durch eine hohe Metastasierungsneigung auszeichnet (Bruns et al. 1999) und die chemotherapieresistente Linie L3.6pl Res, welche im Labor der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie selektioniert wurde (Kalinina et al. 2010). Die Zellen wurden je für 24h mit den Pharmaka inkubiert. Als Kontrolle diente die

Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Line (HPDE). Da es sich um eine immortalisierte Zelllinie handelt, wurde sie bei wachstums- und zellzyklusabhängigen Versuchen nicht mehr benutzt (Ouyang et al. 2000).

Durch die Inkubation zeigte sich zelllinienübergreifend eine Lösung der Karzinomzellen aus dem Zellverband, sowie eine ubiquitäre Ausbildung von Apoptosefiguren und Zelllysen. Eine erneute Kultivierung der Zellen misslang. Einzig HPDE, als nicht karzinomatöse Zelle, reagierte kaum auf die Behandlung mit Mepazin oder Biperiden (Abb. 12).

Die Inhibition mit dem niedermolekularen MI-2 führte bereits nach kurzer Zeit (Minuten bis Stunden) zum Zelltod der Karzinomzellen. Dies zeigte sich auch anteilig in den HPDE-Zellen, sodass MI-2 in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt wurde.

In der Fluoreszenzzytochemie ist MALT1 in Zytosol und Zellkern zu sehen. Durch die Inkubation mit 25 μ M Mepazin für 24h kommt es, wie in der Zellkultur sichtbar, zu morphologischen Veränderungen der Karzinomzellen. Hingegen scheint die zelluläre Lokalisation von MALT1 selber oder dessen Konzentration in den Zellen unverändert (Abb. 13).

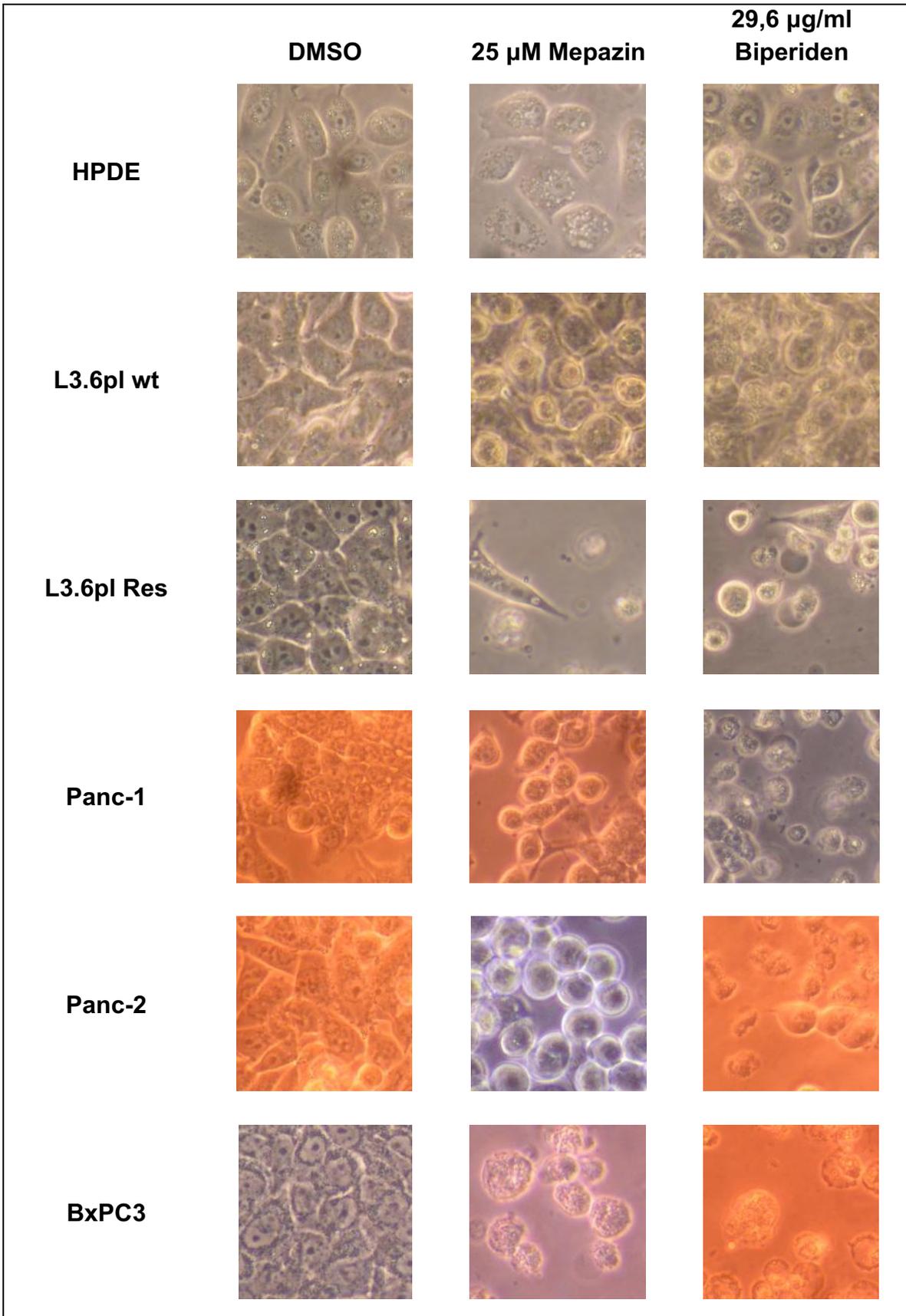


Abb. 12: HPDE und PDAC-Linien in der Zellkultur. Lysierte und apoptotische Zellen nach Pharmakainkubation. Inkubation für 24h mit je 25 μ M Mepazin und 29,6 μ g/ml Biperiden. DMSO-Lösungsmittel als Kontrolle. Lichtmikroskopische Bilder in 400-facher Vergrößerung.

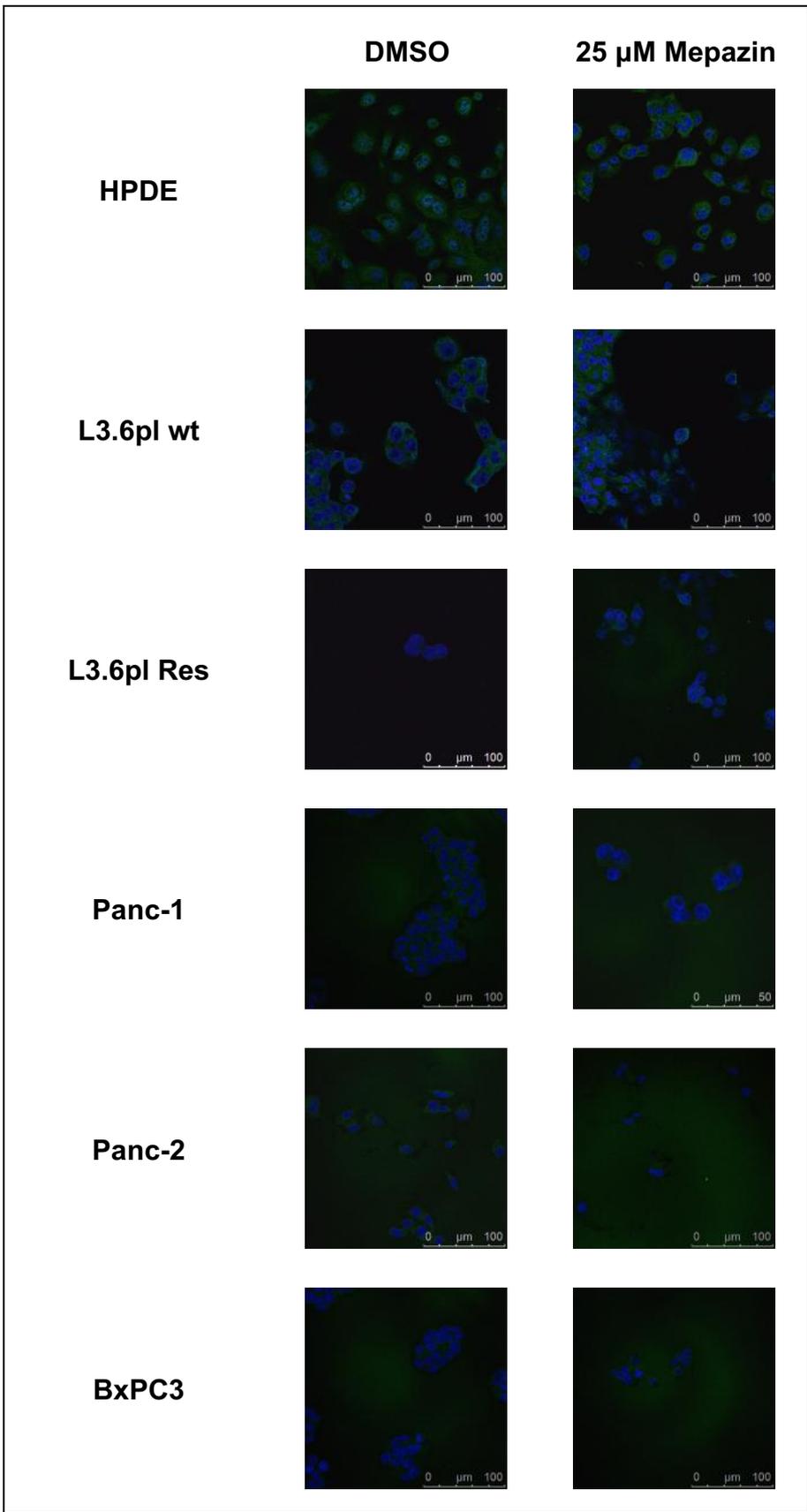


Abb. 13: MALT1-Fluoreszenzzytochemie von HPDE und PDAC-Linien. Inkubation für 24h mit 25 μ M Mepazin. DMSO-Lösungsmittel als Kontrolle. Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskop.

Der Einfluss der MALT1 Inhibition auf die Proteinexpression von CYLD und die dargestellten Spaltprodukte wurden mit dem Western Blot Verfahren untersucht. Hierfür wurden die Karzinomzelllinien nach 24 stündiger Inkubation lysiert, geblottet und mit anti-CYLD (abcam[®]) detektiert. Es folgte die densitometrische Auswertung von je drei Inhibitionen und folgenden Western Blots pro verwendeter Zelllinie.

Es zeigt sich durch die MALT1 Inhibition eine konzentrationsabhängige Reduktion der 107 kDa Bande von CYLD. Die 40 kDa Bande zeigt sich im Vergleich zum DMSO-Leerwert = 1 vermindert, aber nicht als konzentrationsabhängig (Abb. 14). Unter Berücksichtigung des 95% - Konfidenzintervalls zeigte sich im t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der Bandendichte nach Mepazininkubation oder DMSO-Inkubation.

Die densitometrische Messung der 70 kDa Bande war auf Grund der geringen Ausprägung nicht zuverlässig möglich.

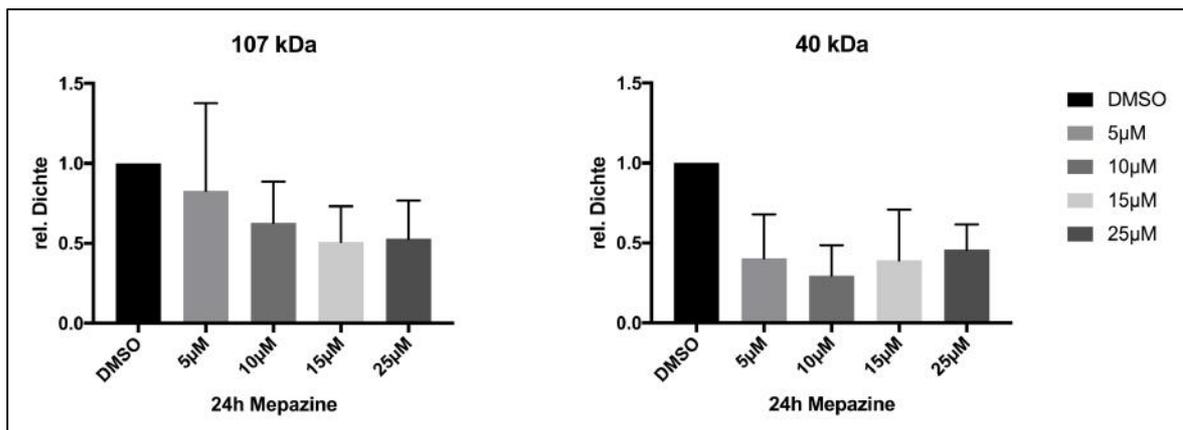


Abb. 14: Densitometrische Quantifizierung der CYLD Banden 107 kDa und 40 kDa nach Inhibition durch Mepazine. Darstellung Dichteabnahme in Relation zum Leerwert DMSO =1. Normierung der Proteinmenge an HSC70.

4.3.2. Proliferation und Viabilität

Weiter erfolgte die Messung des Lebendzellanteils, der Zellviabilität, mittels (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid Reduktions Test (MTT) über einen Zeitraum von 72h. Hier zeigt sich für Mepazin und Biperiden eine Abnahme des Zellumsatzes und der Proliferation in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Konzentrationshöhe (Abb. 15.1 und 15.2).

Schon nach 24h ist ein proliferationshemmender Effekt durch Mepazin und Biperiden in allen Zelllinien nachweisbar. Allerdings zeigen dabei die höheren Konzentrationen an Mepazin (25 μ M) und Biperiden (29,6 μ g/ml) einen deutlicheren Hemmeffekt auf die Zellproliferation. Ausgehend von einer Anfangsaktivität von 100% ist beispielsweise bei der PDAC Zelllinie Panc-1 nach 48h Inkubation mit 25 μ M Mepazin noch eine Viabilität von 17,21% nachweisbar. Unter Behandlung mit 29,6 μ g/ml Biperiden sinkt sie auf 31,12%. Die DMSO behandelte Kontrollgruppe hingegen proliferiert und verdreifacht ihre Viabilität auf über 300% nach 48h. Die Unterschiede sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$) (Abb. 15.1.). Auch bei den Gemcitabin resistenten Zellen L3.6pl Res ist ein signifikanter Unterschied zu messen. Während die Kontrollgruppe nach 72h auf 554,9% ansteigt, wird die Viabilität unter 29,6 μ g/ml Biperiden gehemmt (Viabilität 144,72%; $p = 0,02$), bzw. kommt es durch 25 μ M Mepazin zum Tod aller Karzinomzellen (Viabilität 0%; $p < 0,001$) (Abb.15.1.).

Insgesamt ist der proliferationshemmende Trend bei allen Zelllinien durch ausreichend hohe Dosen Mepazin und Biperiden sichtbar. In der Zelllinie BxPC3 ist der Unterschied mit $p = 0,004$ als sehr signifikant anzugeben. Die BxPC3-Behandlung mit Biperiden führt zu keinem signifikanten Unterschied. Die Zelllinien L3.6pl Res und Panc-2 hingegen sprechen signifikant auf Biperiden an ($p = 0,02$). Im Falle der Zelllinien L3.6pl wt und Panc-1 ist der Unterschied mit $p < 0,001$ als hoch signifikant einzustufen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Behandlung mit Mepazin oder Biperiden in allen Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität führt.

Zusätzlich zu der Inhibition mit einem Pharmakon wurde auch die Kombination von Mepazin und Biperiden getestet. Der negative Effekt auf Zellviabilität und Proliferation war *in vitro* geringgradig stärker. Dies konnte *in vivo* nicht bestätigt werden, sodass die Daten hier nicht weiter aufgeführt werden.

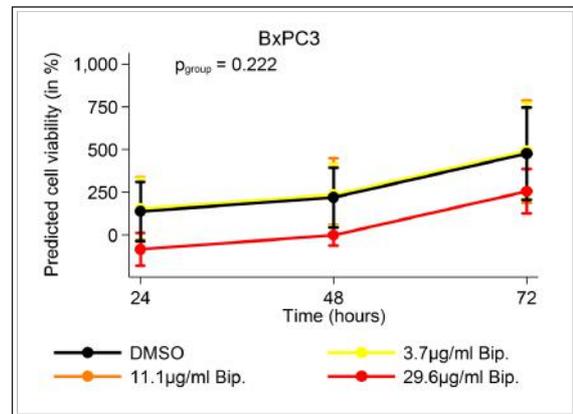
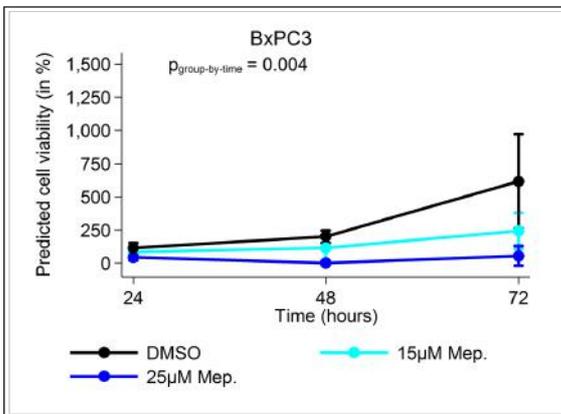
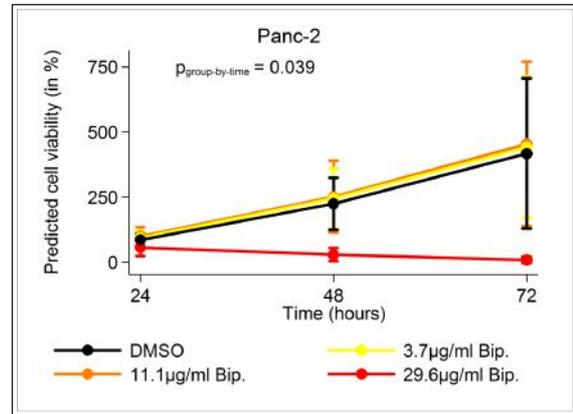
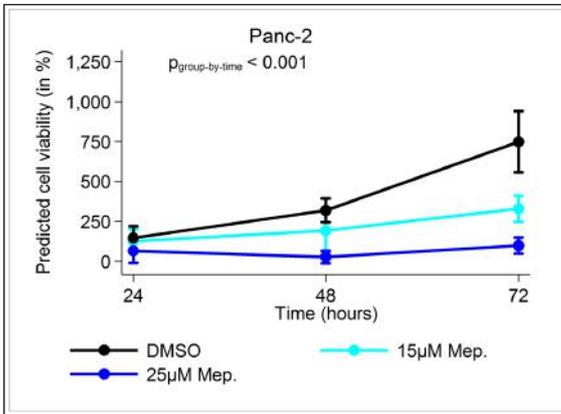
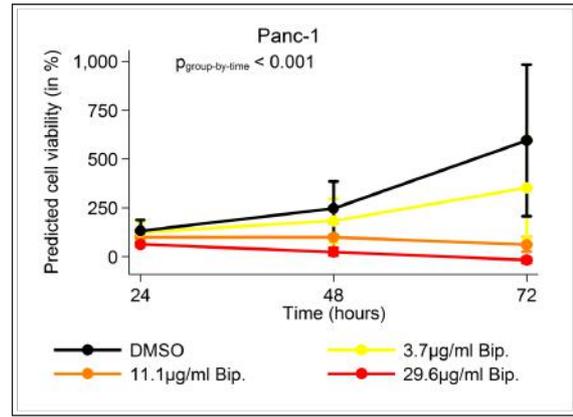
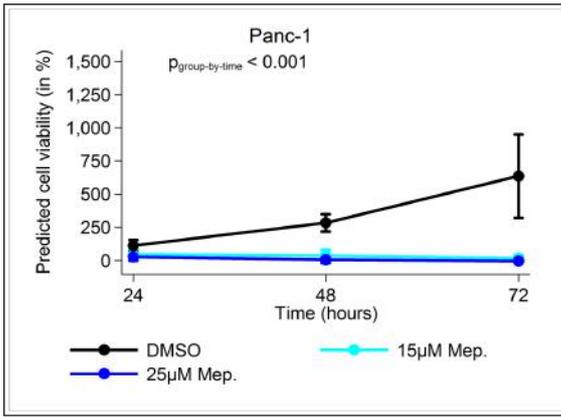


Abb. 15.1: MTT Assay.

Zellviabilität humaner PDAC-Linien (je n=6) Panc-1, Panc-2 und BxPC3 nach 72h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Mepazin (links) oder Biperiden (rechts). Kontrolle mit Lösungsmittel DMSO. Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls und der p-Werte zu den Messzeitpunkten.

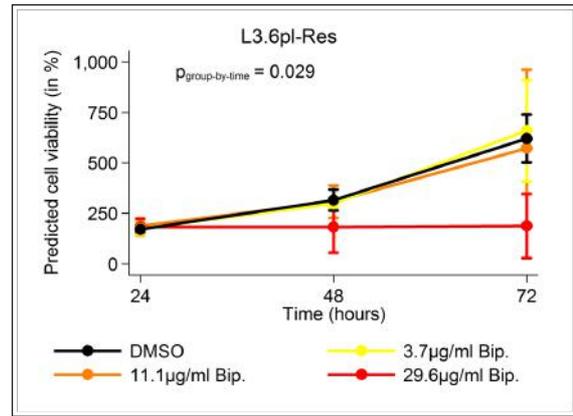
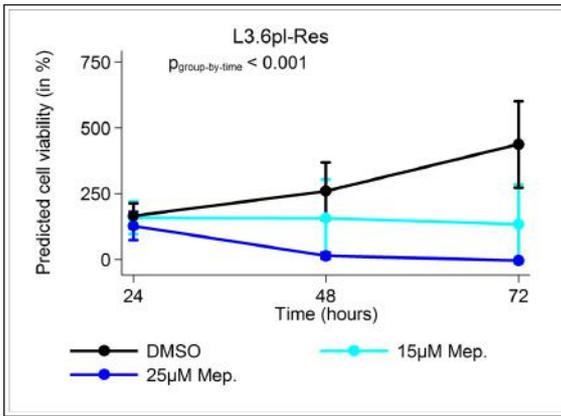
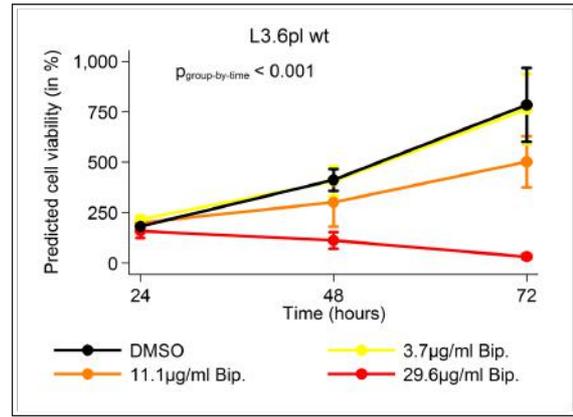
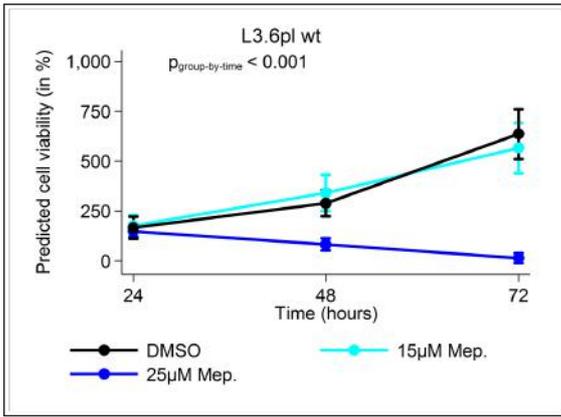


Abb. 15.2: MTT Assay.

Zellviabilität humaner PDAC-Linien (je n=6). L3.6pl wt und L3.6pl-Res nach 72h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Mepazine (links) oder Biperiden (rechts). Kontrolle mit Lösungsmittel DMSO. Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls und dem p-Wert zu den Messzeitpunkten.

4.3.3. Apoptose Assay

Zur quantitativen Bewertung des beobachteten Apoptoseverhaltens wurde nach Inkubation mit den beiden Pharmaka cleaved-Caspase 3 bestimmt. Die proteolytisch aktivierte Caspase 3 gilt als Initiator der Zellapoptose (Nicholson et al. 1995). In Abb. 16 ist der Verlauf der Caspase 3 Aktivität zu den Messzeitpunkten 24, 48 und 72h Inkubation mit je 25 μ M Mepazin und 29,6 μ g/ml Biperiden, sowie DMSO als Kontrolle aufgeführt.

Durch die Behandlung mit Biperiden zeigt sich in allen Karzinomzelllinien eine im Gegensatz zur Kontrolle höhere Apoptoseinduktion. Diese konnte bereits nach 24h detektiert werden und blieb im weiteren Messverlauf nahezu konstant hoch. Bei L3.6pl wt, L3.6pl Res und BxPC3 zeigt sich eine mit $p \leq 0,001$ statistisch hoch signifikante Apoptoseinduktion. Ebenso wurde bei Panc-1 und Panc-2 ein signifikanter Unterschied der Apoptose zwischen Kontrollgruppe und Biperideninhibition gemessen ($p \leq 0,01$).

Die Ergebnisse der Mepazingruppe hingegen deuten auf eine geringere Induktion der Caspase 3 hin. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

Zusätzlich zu der Inhibition mit einem Pharmakon wurde auch die Kombination von Mepazin und Biperiden getestet. Hier zeigte sich keine weitere Steigerung der Apoptoserate, sodass die Daten hier nicht weiter aufgeführt werden.

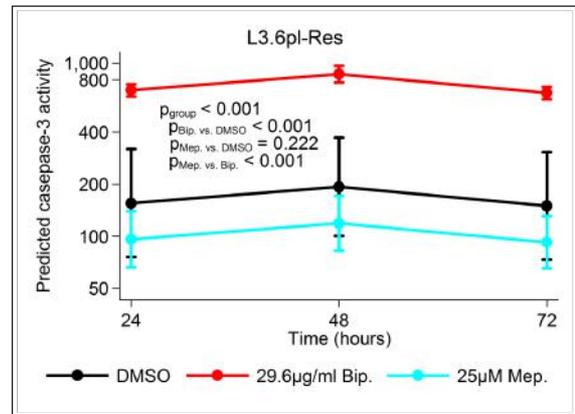
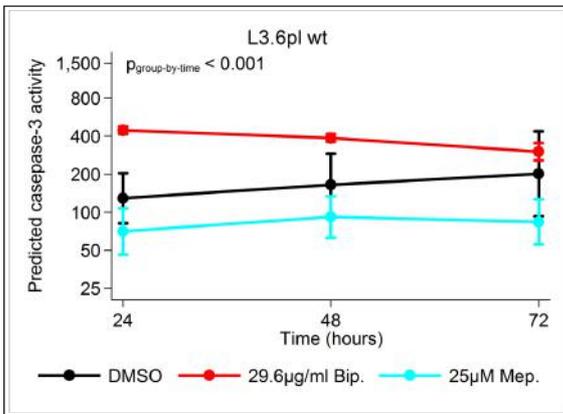
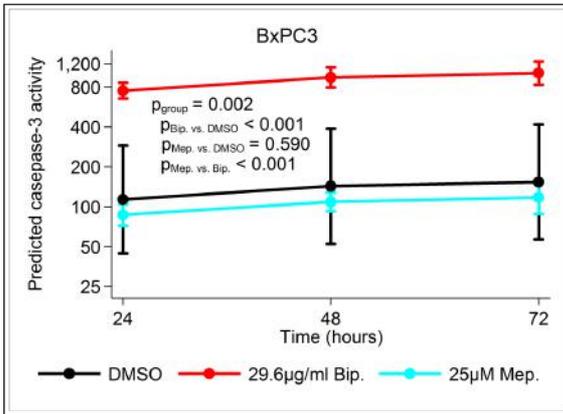
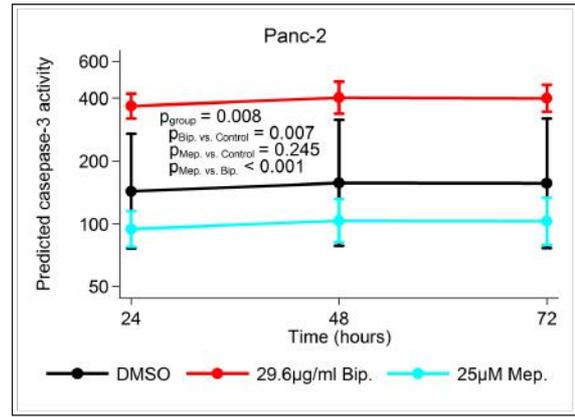
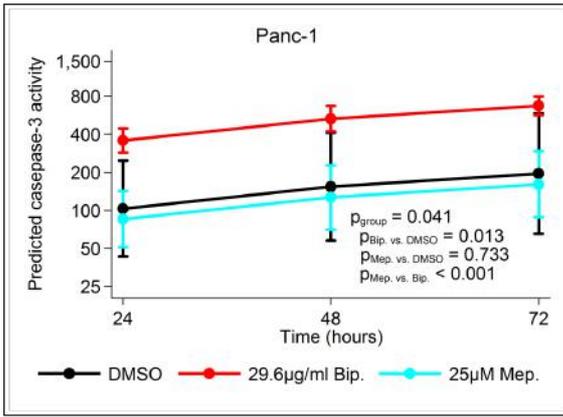


Abb. 16: Apoptose Assay aller PDAC-Linien (je n=7). Caspase 3 Aktivität nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72h mit Mepazin bzw. Biperiden. DMSO als Kontrolle. Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls und den p-Werten.

4.4. MALT1 Aktivitätsassay

Die Messung der MALT1 Grundaktivität in Pankreaskarzinomzellen erfolgte nach dem Protokoll von Nagel et al. (2012). Die Ergebnisse zeigten eine konstitutiv erhöhte MALT1-Aktivität. Diese lag bei allen Pankreaskarzinomzellen oberhalb der MALT1-Paracaspaseaktivität in PMA/Ionomycin aktivierten T-Lymphozyten (Jurkat). Als Leerwert wurde die Aktivität der Agenzien ohne Zellen gemessen (Control) (Abb. 17).

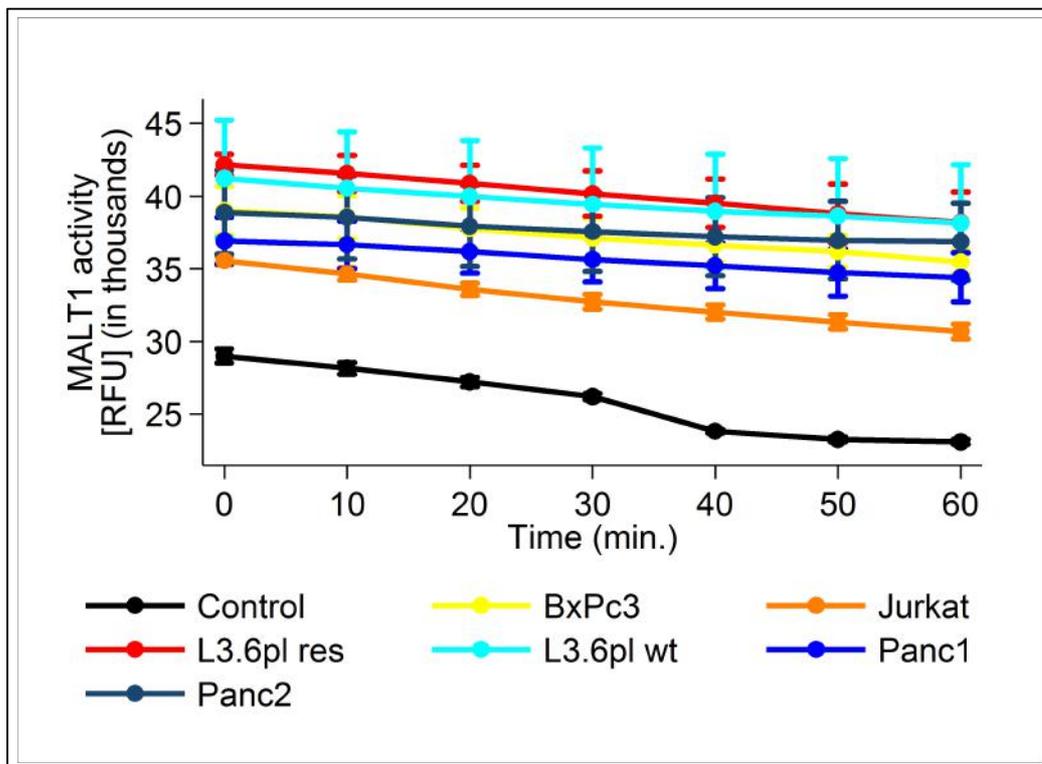


Abb. 17: Konstitutive MALT1 Aktivität in Pankreaskarzinomzellen. Mittlere Aktivität unter Angabe des 95% Konfidenzintervalls. PMA/Ionomycin aktivierte Jurkat-Zellen dienen als Referenz. Kontrollmessung mit Reagenzien.

Nach 24h Inkubation mit 25 μ M Mepazin bzw. 29,6 μ g/ml Biperiden wurde die Paracaspaseaktivität in den PDAC-Zellen erneut bestimmt (Abb. 18).

Durch die Behandlung mit Mepazin oder Biperiden zeigte sich eine Abnahme der MALT1 Paracaspaseaktivität in den einzelnen Zellreihen. Beispielsweise zeigte

Panc-1 zum Messpunkt 60 min eine konstitutive MALT1 Aktivität von 42915 RFU. Nach 24 stündiger Inkubation war noch eine Aktivität von 37472 RFU bei Einsatz von 25 µM Mepazin bzw. 33795 RFU unter Verwendung von 29,6 µg/ml Biperiden messbar. Diese Aktivitätsreduktion um fast 15% zeigt sich mit $p < 0,001$ statistisch sehr signifikant.

Insgesamt zeigte die Mepazinbehandlung eine etwas stärkere Einschränkung der MALT1 Paracaspaseaktivität als Biperiden im Vergleich zur DMSO Kontrolle.

Beide Inhibitoren führen in allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zu einer Reduktion der MALT1-Paracaspaseaktivität (Abb. 18).

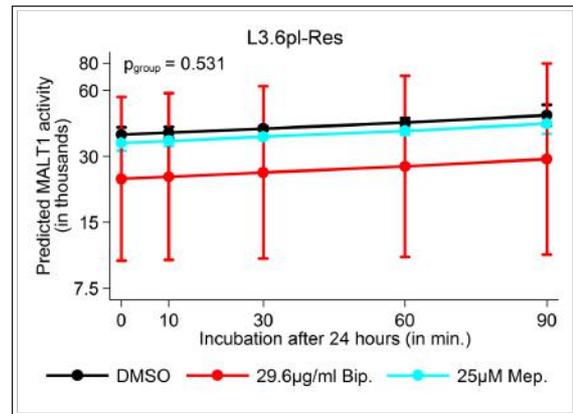
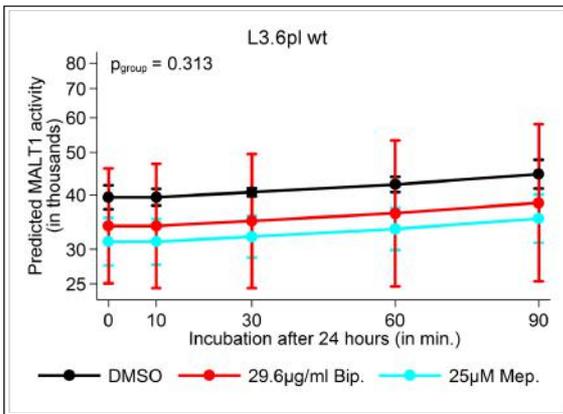
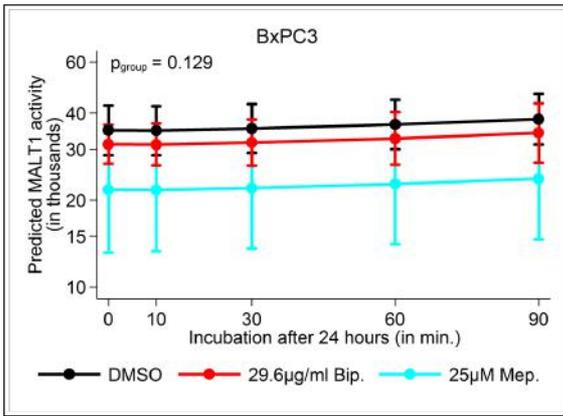
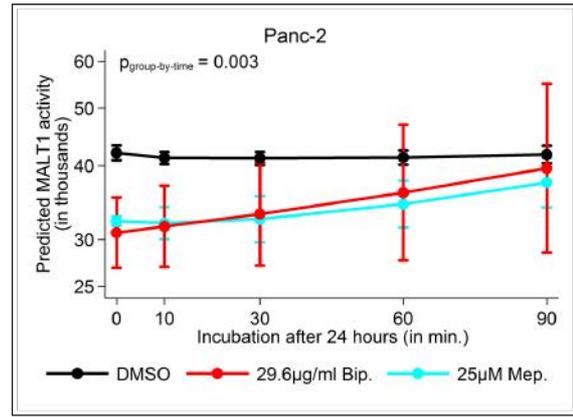
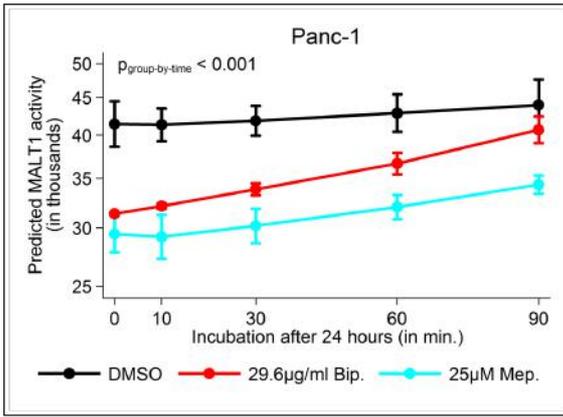


Abb. 18: MALT1-Aktivität in den humanen PDAC-Linien (je n=6) nach 24h Inkubation mit Mepazin bzw. Biperiden. DMSO als Kontrolle. Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls und dem p-Wert.

4.5. Immunpräzipitation

4.5.1. MALT1 IP

Die Immunpräzipitation von MALT1 wurde mit den Linien der stärksten MALT1 Expression, Panc-2 und 5027, durchgeführt. Es wurden jeweils Zelllysate nach 24 stündiger Inkubation mit 25 µM Mepazin und 29,6 µg/ml Biperiden bzw. DMSO als Kontrolle verwendet. Anschließend erfolgte die Detektion von Ubiquitinmonomeren und –polymeren mittels Western Blot Technik. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellproben (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden im Sinne einer Co-Immunpräzipitation die an MALT1 gebundenen Proteine des CBM-Komplexes, BCL10 und CARMA3 (äquivalent zu CARD10) detektiert. Hier konnte ebenfalls kein eindeutiger Unterschied im Bezug auf die alleinige Expression und die Quantität des CBM-Komplexes durch eine MALT1-inhibitorische Behandlung belegt werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.1. TRAF6 IP

Die Immunpräzipitation von TRAF6 wurde äquivalent zur MALT1 IP durchgeführt. Es wurden die Linien mit der stärksten TRAF6 Expression, BxPC-3 und 5061, verwendet und jeweils Zelllysate nach 24 stündiger Inkubation mit 25 µM Mepazin und 29,6 µg/ml Biperiden bzw. DMSO als Kontrolle, analysiert. Anschließend erfolgte die Detektion von Ubiquitinmonomeren und –polymeren mittels Western Blot Technik. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellproben (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

Die Identifizierung eines spezifischen Zielproteins zur Inhibition des Tumorzellstoffwechsels ist die erste zu beantwortende Fragestellung der vorliegenden Arbeit. MALT1, ein positiver NF- κ B-Regulator, besitzt eine im menschlichen Körper einzigartige Paracaspasefunktion. Zudem konnte MALT1 in 75% der untersuchten Pankreaskarzinome nachgewiesen werden, während das exokrine Pankreasgewebe kein MALT1 exprimiert (hierbei handelt es sich um noch nicht publizierte Ergebnisse eines Tumor Micro Arrays, die in unserer Arbeitsgruppe erhoben wurden). Damit unterscheidet sich die Expression des Proteins zwischen Tumor- und Normalgewebe, was die Möglichkeit des spezifischen Angriffs der Tumorzellen ohne Beeinträchtigung des gesunden Gewebes mit sich bringt.

Die MALT1 Expression auf Protein- und mRNA Ebene konnte in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt werden. Durch die spezielle Funktion und gewebespezifische Lokalisation zeichnet sich MALT1 als eine wirkungsvolle Zielstruktur zur Krebstherapie aus.

Weiterführend sollte untersucht werden, inwiefern eine Inhibition des genannten Zielproteins auf die Zellen wirkt und dessen Wachstum und Überleben bremsen bzw. behindern kann.

Es konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Hemmung von MALT1 zur Abnahme der Proliferation und gleichzeitiger Apoptosezunahme der Karzinomzellen führt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies *in vitro* in der Zellkultur beobachtet (Abb. 12), sowie durch Proliferations- und Apoptoseassays (Abb. 15.1; 15.2; 16) belegt. Insgesamt zeigt sich dadurch ein zytotoxischer Effekt mit einer signifikanten Verminderung der Karzinomzellen.

Die gewonnenen Daten weisen auf eine effiziente Hemmung der MALT1 Paracaspase durch das Phenothiazin Mepazin sowie durch das Anticholinergikum Biperiden hin. Beide Substanzen sind bereits im klinischen Gebrauch erprobt. Mepazin wurde auf Grund seiner als gering eingestuften antipsychotischen Wirkung ab den sechziger Jahren nicht mehr verwendet (Lomas 1957, Sarwer-Foner und Koranyi 1957, Casey et al. 1960, Klein 2007). Biperiden wird nach wie vor zur EPMS-Behandlung erfolgreich eingesetzt. Beide Substanzen zeigen im Vergleich

zu konventionellen Chemotherapeutika geringe Nebenwirkungen (Hui und Reitz 1997).

Nagel et al. (2012) haben bereits die spezifische Hemmung der MALT1 Paracaspaseaktivität durch Phenothiazine, insbesondere Mepazin, beschrieben. Weiter wiesen sie die zytotoxische Wirkung auf B-Lymphomzellen nach und stuften Mepazin als wirkungsvolle Therapiemaßnahme ein.

Gleiches konnte in der vorliegenden Arbeit für Pankreaskarzinomzellen bestätigt werden: Alleine die makroskopische Beobachtung des Effekts von Mepazin und Biperiden auf Pankreaskarzinomzellen in der Zellkultur stützt die These der toxischen Wirkung auf Karzinomzellen (Abb. 12). Der negative Ausgang des durchgeführten Wiederaussäherungsversuchs unterstreicht zusätzlich den andauernden Effekt auf die Zellen. Des Weiteren ist im MTT eine signifikante Abnahme des Zellwachstums durch die Behandlung mit Mepazin, sowie Biperiden messbar (Abb. 15.1 und 15.2). Zusätzlich untermauert die signifikante Zunahme der Apoptose durch die Zellinkubation mit Biperiden (Abb. 16) die Hypothese, dass die spezifische Hemmung von MALT1 eine negative Wirkung auf den Karzinomzellstoffwechsel hat.

Die nicht nachweisbare Apoptosesteigerung durch Mepazin im Cleaved-Caspase 3 Assay kann mehrere Gründe haben: Zum einen ist ein experimenteller Fehler nicht auszuschließen, zum anderen kann eine intrazelluläre Verschiebung in der NF- κ B-Signaltransduktionskette ein Grund sein. Durch die starke MALT1-Hemmung mittels Mepazin (Abb. 18) wird in den Karzinomzellen der NF- κ B Weg beeinflusst. Einerseits kann dies zur Apoptose führen, andererseits kann es in den Zellen auch zur Inflammationsinduktion und Zellschädigung führen. Bei zu umfangreichen Schäden kommt es zur Kernpyknose und nachfolgend zur Nekrose (Shimizu et al. 1996, Li und Beg 2000). Dies würde das Absterben der Zellen ohne den Nachweis einer Apoptosezunahme erklären.

Auch eine Steigerung der CYLD Aktivität kann zu einer gesteigerten Nekroptosis und Zelluntergang führen (Moquin et al. 2013). Im Falle von Nekrose und Nekroptose ist kein Anstieg der Cleaved Caspase 3 zu messen. Da durch die MALT1 Hemmung CYLD nicht mehr gespalten wird, ist eine Aktivitätssteigerung von CYLD anzunehmen. Dies würde auch bedeuten, dass die tumorsuppressive Aktivität von CYLD wieder zum Tragen kommen kann.

Zusätzlich kann Biperiden MALT1 unabhängig zur Zellapoptose führen: Biperiden kann an muskarinerge Rezeptoren binden, die von epithelialen Tumorzellen vermehrt exprimiert werden (Shah et al. 2009). Durch Rezeptoraktivierung kommt es zur vermehrten Zellproliferation und Tumorprogress, bei einer Anatonisierung durch Biperiden hingegen werden proapoptotische Faktoren wie Bax und Caspase-3 hochreguliert und somit die Zellapoptose unterstützt (Yu et al. 2017).

Insgesamt qualifizieren sich sowohl Mepazin, wie auch Biperiden als potentielle Zytostatika in der Pankreaskrebstherapie.

Unterstreichend konnte die Aktivitätsminderung der MALT1-Paracaspase nach Inkubation mit Mepazin oder Biperiden nachgewiesen werden (Abb. 18). Dies erhärtet weiter die mögliche Rolle von MALT1 als Zielprotein in der Krebstherapie und die potente Wirkung von Mepazin und Biperiden an MALT1.

Auf Grund einer *in silico* durchgeführten Bindungsstudie ist der gezeigte Effekt durch eine hydrophobe Bindung der Agenzien an das aktive Zentrum von MALT1 zu erklären. Die Studie zeigt die allosterische Interaktion von Mepazin und Biperiden am Paracaspasezentrum. Des Weiteren wird deutlich, dass Biperiden an der gleichen Bindungsstelle mit MALT1 interagiert, aber darüber hinaus durch seine Struktur weitere hydrophobe Wechselwirkungen mit MALT1 ausbilden kann. Somit entsteht eine festere und energetisch günstigere Interaktion mit dem katalytischen Zentrum von MALT1.

Bei dieser Bindungsstudie handelt es sich um Daten aus unserer Arbeitsgruppe, die noch unveröffentlicht sind.

Weiter wurde gezeigt, dass das Protein MALT1 in den Pankreaskrebszellen konstitutiv aktiv ist (Abb. 17). Dies führt zu einer dauerhaften Stimulierung von NF- κ B und deutet auf die essentielle Rolle von MALT1 für den Stoffwechsel der Krebszellen hin. Durch die pharmakologische Hemmung durch Mepazin / Biperiden zeigt sich eine signifikante Abnahme der Paracaspaseaktivität in allen Zelllinien. Der Nachweis konnte durch die MALT1-Aktivitätsassay nach der Inkubation mit den Agenzien erbracht werden (Abb. 18).

Zwar konnte folglich die Aktivitätsminderung gezeigt werden, der genaue Ablauf der intrazellulären Prozesse bleibt dennoch größtenteils ungewiss.

Ye (2001) beschreibt für nicht-hämatopoetische Zellen G-Protein-gekoppelte NF- κ B-Signalwege, die durch verschiedene Transmitter aktiviert werden. Darunter fallen auch MALT1-abhängige Signaltransduktionen, die maßgeblich zur Kanzerogenese beitragen (Jiang et al. 2011); beispielsweise wird durch Stimulation mit Interleukin-8 (IL-8) (Martin et al. 2009), Angiotensin II (McAllister-Lucas et al. 2007) und Lysophosphatidsäure (Klemm et al. 2007) in den Zellen die CBM-Bildung initiiert und mit IKK ein aktivierender Komplex geformt. Somit kommt es zur Translokation von NF- κ B-Untereinheiten in den Nukleus und Transkription entsprechender Gene (Sun et al. 2004, Shinohara et al. 2005, Oeckinghaus et al. 2007).

Auch für PDAC Zellen ist die Expression des CARMA3/BCL10/MALT1-Komplexes beschrieben (Du et al. 2014). MALT1 dient bei der Komplexbildung zum einen als Adapterprotein, ob zum anderen auch die Paracaspaseaktivität von MALT1 notwendig ist, bleibt noch unklar und bedarf weiterer Forschung (McAllister-Lucas et al. 2011). In der durchgeführten Immunpräzipitation waren auch nach der MALT1 Inhibition die CBM-Komplexkomponenten in den Zellen nachweisbar, ihre biologische Aktivität ist dadurch aber nicht zu bewerten. Ein Abbau der Proteine oder ihre Ubiquitinmarkierung zur Degradation scheint nicht vor zu liegen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass Mepazin und Biperiden durch ihre allosterische Bindung an MALT1 die Interaktion von MALT1, CARMA3 und BCL10 verhindern oder auflösen. Dies würde zu einer Einschränkung der biologischen Aktivität des Komplexes führen. Letztlich würde somit durch die fehlende Aktivität des CBM-Komplexes den Karzinomzellen ein Stimulus der weiteren NF- κ B-Aktivierung fehlen.

Es muss jedoch bedacht werden, dass dies ist allerdings nur einer von vielen intrazellulären Signalwegen ist und somit nicht die gesamte Komplexität abgebildet und betrachtet wird. Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Reaktion der Zellen auf die benutzten Pharmaka jedoch sehr stark ist, sodass man von weiteren ablaufenden intrazellulären Mechanismen ausgehen kann. Eine Identifizierung eben dieser bedarf es weiterer zukünftiger Untersuchungen.

Neben der Funktion im CBM-Komplex ist MALT1 an der Prozessierung mehrerer tumorsuppressiv wirkender intrazellulärer Proteine beteiligt (Abb. 6). In der vorliegenden Arbeit wird besonders die Proteolyse von CYLD thematisiert. Diese ist für solide Tumoren in der Literatur nicht beschrieben und erscheint in den Pankreaskarzinomzellen sehr ausgeprägt.

Die MALT1 abhängige Proteolyse findet an Arg 324 statt und führt zur Entstehung einer 70 kDa (C-terminal) und einer 40 kDa (N-terminal) großen Proteindomäne. Besonders die 40 kDa Domäne scheint in den Karzinomzellen zu verbleiben, ihre Expression ist deutlich höher als die der 70 kDa Domäne bzw. die Expression des gesamten CYLD Proteins (107 kDa) (Abb. 7).

Der CYLD N-Terminus (40 kDa Produkt) trägt zwei CAP-Gly-Bindungsstellen, die der Mikrotubulistabilisierung und dem Vesikeltransport dienen. Durch das gestärkte Mikrotubulinetzwerk wird die NF- κ B Translokation in den Nukleus verstärkt und der Zellzyklus beschleunigt (Mackenzie et al. 2006, Gao et al. 2008, Wickstrom et al. 2010, Thuille et al. 2013). Es ist durch diesen Mechanismus also von einer proliferationssteigernden und Apoptoseresistenz-fördernden Wirkung der 40 kDa Bande auszugehen.

Des Weiteren fehlen unter anderem die Bindungsstellen für NEMO, TRAF2 und BCL3, sowie die Deubiquitinaseaktivität (DUB). Diese befinden sich knapp proximal der Schnittstelle (Arg 324) und liegen somit auf dem C-terminalen Teil von CYLD (70 kDa). Wie im Western Blot (Abb. 7) zu sehen, ist der C-terminalen Teil von CYLD (70 kDa) in den Zellen aber kaum angereichert.

Durch Deubiquitinierung von NEMO, TRAF2, RIP1 (Receptor interacting protein), sowie weiteren Proteinen wirkt CYLD als Hemmer des klassischen NF- κ B Signalwegs (Chen 2005). Die DUB entfernt K63-gebundene Ubiquitinketten von spezifischen Proteinen und inaktiviert sie somit. Eine Hemmung des alternativen Signalweges wird von CYLD über die BCL3 Inaktivierung erreicht (Massoumi et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass es durch MALT1 abhängige Proteolyse von CYLD und den nachfolgenden Abbau des C-terminalen Teils, sowie der Anreicherung des N-terminalen Teils zu einer Verschiebung der NF- κ B Regulation kommt:

Die tumorsuppressive Wirkung sinkt, während die NF- κ B Aktivität und die Apoptoseresistenz der Zellen steigen. Insgesamt werden Karzinogenese und Karzinomwachstum gefördert. Gleiches konnte auch bei CYLD knock out

Versuchen gezeigt werden. Zellen mit erfolgreichem CYLD knock out wiesen eine gesteigerte Aktivität von NF- κ B und erhöhte Apoptoseresistenz auf (Brummelkamp et al. 2003).

Die These des MALT1-abhängigen cleavage von CYLD in den Pankreaskarzinomzellen ist neben den spezifischen Spaltproduktgrößen durch zwei weitere Punkte zu unterstützen: durch die Behandlung mit dem Proteosomeninhibitor MG-132 ohne Nachweis einer Spaltproduktänderung kann eine proteosomale Degradation als Ursache der Spaltprodukte ausgeschlossen werden (Abb. 8). Zusätzlich zeigt sich in der densitometrischen Quantifizierung der 40 kDa Bande nach 24h Inkubation mit Mepazin eine Verminderung der Bande im Vergleich zum Lösungsmittel DMSO. Diese Abnahme ist zwar statistisch nicht signifikant, zeigt aber eine deutliche Tendenz. Insbesondere, da bei der 40 kDa Bande von einer längerfristigen Anreicherung in den Zellen aus zu gehen ist und eine 24 stündige Inhibition die bereits vorher entstandenen Spaltprodukte nicht verändert oder abbaut (Abb. 14).

Mechanistisch liegt ferner eine Reduktion des hemmenden Effekts auf den c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Pathway vor. Dadurch wird dieser in den Zellen wieder stärker aktiv und es kommt über die mitogen-activated protein (MAP)-Kinase-Kaskade zur Apoptoseinduktion (Staal et al. 2011b).

Als weitere Auswirkung der CYLD-Hemmung in Pankreaskarzinomzellen zeigt eine 2013 publizierte Studie die Steigerung der NF- κ B-Aktivität und nachfolgend eine erhöhte Gemcitabinresistenz der Zellen (Takiuchi et al. 2013). Ein Wiedererlangen der CYLD Aktivität durch Hemmung von MALT1 könnte somit zum erneuten chemosensiblen Ansprechen der Zellen führen. Dies ist mit Sicherheit ein für die Patientenversorgung wichtiger Punkt, den es weiter zu erforschen gilt.

Zusätzlich scheint MALT1, bzw. die Stabilisierung des Mikrotubulinnetzwerkes durch die 40 kDa Bande von CYLD auch an der Translokation von c-Rel, einer NF- κ B Untereinheit, beteiligt zu sein.

In unserer Arbeitsgruppe konnte durch die Inhibition von MALT1 eine Reduktion von c-Rel im Nukleus beobachtet werden. Durch die Fraktionierung von Kern und

Zytoplasma behandelter Panc-1 und L3.6pl Res Karzinomzellen konnte bereits nach einer Inkubation von 15 min mit 25 μ M Mepazin bzw. 29,6 μ g/ml Biperiden eine signifikante Reduktion der Translokation von c-Rel in den Nukleus nachgewiesen werden. Dies führt zu einer geringeren Aktivität des NF- κ B-Signalweges. Die NF- κ B Hemmung kann den gezeigten Effekt auf Proliferation und Apoptose erklären. Hierbei handelt es sich um unveröffentlichte Daten.

Nach Geismann et al. (2014) ist für PDAC Zellen ein Zusammenhang zwischen Apoptoseresistenz und der nukleären c-Rel Translokation dokumentiert, was den Zusammenhang zwischen der beobachteten Zellapoptose und der reduzierten c-Rel Konzentration unterstreicht. Außerdem scheint der Nachweis von c-Rel negativ mit dem Überleben der Krebspatienten zu korrelieren (Li et al. 2015).

Unterstützend zeigten Gilmore et al. (2004) eine c-Rel abhängige Proliferationszunahme von T-Zellen. Neben den Zellen des Immunsystems werden beispielsweise auch Myofibroblasten durch c-Rel angesprochen. Dadurch kommt es zum einen zur fortschreitenden Organfibrose, zum anderen steigt die Sekretion proinflammatorischer Interleukine und Matrixmetalloproteinasen. Insgesamt führt eine hohe Aktivität des Transkriptionsfaktors c-Rel so zu einem gesteigerten Wachstum von Tumorzellen und Metastasierung (Elsharkawy und Mann 2007, Coulouarn und Clement 2014). Diese Vorgänge würden durch die reduzierte Translokation nach Mepazin / Biperiden - Behandlung unterbunden werden.

Eine Hemmung der c-Rel Translokation mittels MALT1-Deaktivierung konnte in Lymphozyten bereits gezeigt werden (Ferch et al. 2007, Ferch et al. 2009, Fontan et al. 2012).

Dies scheint auch in den Pankreaskarzinomzellen durch eine Behandlung mit Mepazin bzw. Biperiden der Fall zu sein. Die Behandlung mit Mepazin bzw. Biperiden führte in den Zelllinien Panc-1 und L3.6pl Res zu einer Reduktion der c-Rel Translokation in den Nukleus. Weiter ist anzunehmen, dass die c-Rel Aktivität im Nukleus der Karzinomzellen durch das MALT1-abhängige cleavage von RelB verlängert ist (Hailfinger et al. 2011). Durch das Blockieren der Paracaspase scheint die c-Rel-Wirkung und der Transport nach intranukleär zu sinken. Des Weiteren ist der intranukleäre Verbleib von c-Rel kürzer. Somit kommt es zu einer Verminderung der Proliferation und Verminderung der Apoptoseresistenz.

Auch Kallifatidis et al. (2011) beobachteten in Pankreaskarzinomzellen die Zunahme der TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) -induzierten Apoptose, sowie die Hemmung des Tumorwachstums durch Reduktion der c-Rel-Expression in den Zellen. Nach Geismann et al. (2014) führt eine hohe nukleäre Aktivität an c-Rel zur Hemmung der TRAIL-vermittelten Apoptose. Weiter kann angenommen werden, dass durch die c-Rel-Reduktion die onkogene Wirkung auf das Organstroma gemindert wird.

Insgesamt erklärt die verminderte CYLD Proteolyse und ihr Effekt auf onkogene Stoffwechselwege, sowie die reduzierte c-Rel Translokation die verminderte NF- κ B Aktivität nach Inkubation mit Mepazin / Biperiden. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass zusätzliche Mechanismen und MALT1 – Substrate weiter zu den dargestellten Ergebnissen beitragen.

Diese *in vitro* Daten werden durch noch unveröffentlichte *in vivo* Daten untermauert. Der Behandlungseffekt wurde in einem Xenograft Mausmodell gemessen. Nachdem die Mäuse mit Mepazin oder Biperiden behandelt wurden, konnte ein gesteigerter Zellzerfall und eine Tumorreduktion beobachtet werden. Die Reduktion der Tumormasse belief sich auf 95% durch Mepazin bzw. 83% durch Biperiden. Die beobachteten Nebenwirkungen waren sehr gering und im Vergleich zu den Auswirkungen gängiger Chemotherapiekonzepte vertretbar.

Damit zeigt diese Arbeit mit MALT1 eine potente Struktur zur Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges in Pankreaskarzinomen auf. Der hemmende Effekt auf Zellproliferation und Viabilität, sowie die Steigerung der Apoptose konnte statistisch signifikant gezeigt werden.

Was den genauen Mechanismus der Effekte angeht, wurden einige Ansatzpunkte aufgezeigt. Hier bedarf es aber noch weitreichender Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Eine Verbesserung der Pankreaskrebstherapie ist dringend notwendig. Aktuell beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 8% und spiegelt damit die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms wieder. Mit dem Nachweis des lymphatischen Proteins MALT1 im Pankreaskarzinomgewebe wurde hier eine neue Zielstruktur für die onkologische Therapie aufgezeigt. MALT1 ist bereits für seine zentrale Rolle in B-Lymphomen und dessen Therapie bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei potente MALT1-Inhibitoren verwendet: der bekannte MALT1 Inhibitor Mepazin, ein Phenothiazin und das Anticholinergikum Biperiden. Biperiden wurde im Rahmen der Arbeit als neuer MALT1-Inhibitor identifiziert. MALT1 konnte in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden, während bemerkenswerterweise gesundes exokrines Pankreasgewebe kein MALT1 exprimiert. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die MALT1-Aktivität in Karzinomzellen im Vergleich zu lymphatischen Zellen erhöht ist. Beide untersuchten MALT1-Inhibitoren, Mepazin und Biperiden, führten zu einer signifikant reduzierten MALT1-Aktivität. Diese Arbeit zeigte, dass *in vitro* eine spezifische MALT1-Hemmung mit beiden Pharmaka zu einer signifikant verringerten Proliferation der Krebszellen führte, sowie die Apoptose der Zellen erhöhte. Darüber hinaus reduzierte die Behandlung mit Mepazin und Biperiden auch die Tumormasse *in vivo*. Diese Daten unterstreichen die Rolle von MALT1 für Pankreaskrebszellen. Weiterführend bietet diese Arbeit eine Grundlage, die durch MALT1 vermittelten Tumor-regressiven Mechanismen zu verstehen: der erste Mechanismus beruht auf der Paracaspasefunktion von MALT1, die mehrere Tumorsuppressorproteine durch Spaltung inaktiviert. Zudem können die verbleibenden Spaltprodukte tumorprogressive Funktion bekommen. Der zweite Mechanismus wird durch die Gerüstfunktion von MALT1 vermittelt. Beide Signaltransduktionswege erhöhen den onkogenen Stoffwechsel der Krebszellen. Aufbauend auf den vorliegenden Daten wird die genauere Erforschung der MALT1-Funktionen in den Krebszellen, sowie die weitere klinische Effektverifizierung neue therapeutische Möglichkeiten für das Pankreaskarzinom eröffnen. Hierbei kann das MALT1-Protein als einzigartige Zielstruktur genutzt werden. Dadurch könnte die onkologische Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs präzisiert und verbessert werden.

7. english abstract

Improvement in pancreatic cancer therapy is urgently needed, as the current prognosis of 5-year survival rate of 8% is relatively low. By detecting the lymphoid protein, MALT1 in pancreatic carcinoma, this thesis reveals new targets for oncological therapy. MALT1 was previously known to play a crucial role in B-Lymphomas. This thesis uses two potent MALT1 inhibitors: the known phenothiazine, mepazine and the anticholinergic, biperiden. Biperiden was newly identified to inhibit MALT1. MALT1 was detected in pancreatic carcinoma cells. Remarkably, healthy exocrine pancreatic tissue did not express any MALT1. Furthermore, MALT1 activity was found to be elevated in carcinoma cells in comparison to lymphoid cells. This thesis shows that specific pharmacological MALT1 inhibition leads to significantly reduced cancer cell proliferation and increases cell apoptosis *in vitro*. Both of the MALT1 inhibitors under investigation, mepazine and biperiden, led to significantly reduced MALT1 activity. After applying these agents, we showed a significant inhibition of proliferation and an increase in apoptosis of cancer cells *in vitro*. Moreover, mepazine and biperiden treatment also reduced tumor mass *in vivo*. These data highlight the role of MALT1 for cancer cells. Moreover, this thesis provides a basis to understand the two tumor regressive mechanisms revealed. The first mechanism is performed by the protein as a paracaspase and can deactivate several tumorsuppressor proteins using cleavage. The second is performed by MALT1 as a scaffold protein forming the CBM complex. Both of these increase the protumorigenic metabolism of the cancer cells. Addressing further details of MALT1-function and clinically proving the effect of inhibition will reveal new therapeutic options for pancreatic cancer taking advantage of the MALT1 protein as a unique target structure. Thereby, oncological treatment of pancreatic cancer could be made more precise and advanced.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Tumorlokalisationen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland
Abbildung 2	Anzahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle beim Pankreaskarzinom
Abbildung 3	Fünf-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom
Abbildung 4	Anatomie von Pankreas und Duodenum
Abbildung 5	Pankreas PanIN-Verlauf
Abbildung 6	MALT1 in der intrazellulären Signaltransduktion von Karzinomzellen
Abbildung 7	CYLD Proteinexpression duktaler Pankreasadenokarzinomzellen
Abbildung 8	mRNA Expression CYLD duktaler Pankreasadenokarzinomzellen
Abbildung 9	HPDE und Panc-1 nach Proteasomeninhibition – CYLD Western Blot
Abbildung 10	mRNA Expression von MALT1 in dukталen Pankreasadenokarzinomzellen
Abbildung 11	MALT1 Proteinexpression duktaler Pankreasadenokarzinomzellen
Abbildung 12	PDAC- Behandlung in der Zellkultur
Abbildung 13	MALT1-Zytochemie der PDAC-Linien
Abbildung 14	CYLD Densitometrie nach Mepazinbehandlung
Abbildung 15.1	MTT-Assay mit PDAC-Linien nach Behandlung mit
Abbildung 15.2	Mepazin bzw. Biperiden
Abbildung 16	Apoptose Assay mit PDAC-Linien nach Behandlung mit Mepazin bzw. Biperiden
Abbildung 17	konstitutive MALT1-Aktivität in PDAC-Linien
Abbildung 18	MALT1-Aktivitätsassay mit PDAC-Linien nach Behandlung mit Mepazin bzw. Biperiden

9. Abkürzungsverzeichnis

A20	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
Arg 324	Proteinschnittstelle hinter Arginin an Aminosäurenposition 324
BCL2/3/10	B-cell lymphoma 2/3/10
BRCA2	Breast Cancer 2
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CAP-Gly- Bindungsstellen	cytoskeleton-associated Protein Glycine-rich Domains
CARMA1/3	caspase recruitment domain containing MAGUK protein 1
CBM Komplex	CARMA3/BCL10/MALT1-Komplex
CEA	Carcinoembryonales Antigen
c-Rel	eine NF- κ B Untereinheit
CYLD	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUB	Deubiquitinierungsaktivität
EPMS	extrapyramidalmotorische Störungen
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FAMMM	familiäres atypisches multiple Muttermal und Melanom Syndrom
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HBOC	hereditäres Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HPDE	human pancreatic duct epithelial cell line
IFN-γ	Interferon γ
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IL-2/3/8	Interleukin-2/3/8

IPMN	Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K63	aktivierenden Ubiquitinierung an Lysin 63
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylat-Kinase
MALT1	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein1
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-Kinase
MCN	muzinöse cystische Neoplasie
MD-CT	Multi Detektor Computertomographie
MTT Assay	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid Reduktions Test
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	NF- κ B inducing kinase
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PanIn	nicht-invasive intraepitheliale Neoplasie
PDAC	duktales Adenokarzinom der Pankreas
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA/Ionomycin	phorbol12-myristate13-acetate/Ionomycin
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma-1
RelB	eine NF- κ B Untereinheit
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RIP1	receptor interacting protein
TNF	tumor-necrosis-factor
TNM	Tumor/Nodus/Metastasen Klassifikation
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRAF2/6

TNF receptor associated factor 2/6

10. Offenlegungsschrift des Patents 'Neuer Wirkstoff zur Behandlung von Krebs'

(19)  Deutsches
Patent- und Markenamt



(10) **DE 10 2015 210 224 A1** 2016.12.08

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2015 210 224.6**
 (22) Anmeldetag: **02.06.2015**
 (43) Offenlegungstag: **08.12.2016**

(51) Int Cl.: **A61K 31/4453** (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(71) Anmelder:
**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 20251
 Hamburg, DE**

(72) Erfinder:
**EI Gammal, Alexander, 20148 Hamburg, DE;
 Izbicki, Jakob R., 20149 Hamburg, DE; Konczalla,
 Leonie, 20251 Hamburg, DE; Perez, Daniel, 20253
 Hamburg, DE**

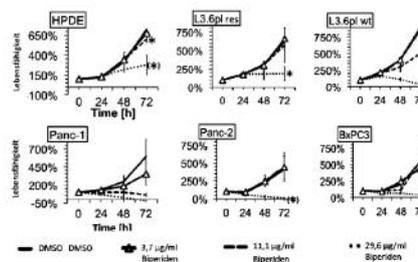
(74) Vertreter:
**Uexküll & Stolberg Partnerschaft von Patent- und
 Rechtsanwälten mbB, 22607 Hamburg, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **NEUER WIRKSTOFF ZUR BEHANDLUNG VON KREBS**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der Verbindung Biperiden als MALT1-Inhibitor bei der Behandlung einer Krebserkrankung. Die Erfindung betrifft insbesondere eine Kombination von Biperiden und einem Phenothiazin zur Verwendung bei der Behandlung einer Krebserkrankung. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung einer Krebserkrankung, die Biperiden als MALT1-Inhibitor umfasst. Es wird ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung offenbart, die Biperiden und mindestens ein Phenothiazin umfasst. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von Biperiden bei der Behandlung einer Krebserkrankung. Die Erfindung stellt ferner einen Kit bereit, der ein Behältnis umfasst, das Biperiden enthält und mindestens ein Behältnis, das eine Phenothiazin-Verbindung enthält.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der Verbindung Biperiden als MALT1(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1)-Inhibitor bei der Behandlung einer Krebserkrankung. Die Erfindung betrifft insbesondere eine Kombination von Biperiden und einem Phenothiazin zur Verwendung bei der Behandlung einer Krebserkrankung. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung einer Krebserkrankung, die Biperiden als MALT1-Inhibitor umfasst. Es wird ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung offenbart, die Biperiden und mindestens ein Phenothiazin umfasst. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von Biperiden bei der Behandlung einer Krebserkrankung. Die Erfindung stellt ferner einen Kit bereit, der ein Behältnis umfasst, das Biperiden enthält und mindestens ein Behältnis, das eine Phenothiazin-Verbindung enthält.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Neoplastische Erkrankungen zeichnen sich durch ein unkontrolliertes Wachstum anormaler Zellen aus, wobei sich diese Zellen unkontrolliert vermehren und unter bestimmten Bedingungen Metastasen in anderen Organen bilden können. In den Industriestaaten lassen sich etwa 20% aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückführen. Die gegenwärtig verwendeten Therapiekonzepte beruhen entweder auf einer chirurgischen Entfernung des neoplastischen Gewebes, Bestrahlung oder Chemotherapie. Chemotherapeutisch wirksame Substanzen, die sich für die Behandlung bestimmter neoplastischer Erkrankungen eignen, sind im Stand der Technik in großer Zahl beschrieben worden. Einen Überblick bietet die Literaturstelle [1].

[0003] Allerdings sprechen etwa die Hälfte aller neoplastischen Gewebe nicht mehr oder nur unzureichend auf eine Behandlung mit gegenwärtig verfügbaren Chemotherapeutika an. Dies gilt insbesondere für Tumore, die sich von Lunge, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse, Leber oder Niere ableiten. Diese Tumore sind oftmals gegen die derzeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika unempfindlich, da sie über Mechanismen verfügen, die eine Resistenz gegen diese Substanzen bewirken. Darüber hinaus verlieren viele Tumore, die zunächst empfindlich gegenüber den eingesetzten chemotherapeutischen Mitteln sind, während der Behandlung mit einem bestimmten Wirkstoff die Empfindlichkeit gegenüber diesem Wirkstoff und werden resistent. Dies kann zur Folge haben, dass ein Wirkstoff nach mehreren Behandlungszyklen den betreffenden Tumor hinsichtlich seines Wachstums nicht mehr hemmen kann. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, neue therapeutische Wirkstoffe zu identifizieren, die insbesondere auch für die Behandlung von solchen Tumoren eingesetzt werden können.

[0004] Die Hemmung der Apoptose stellt einen besonders gut erforschten Mechanismus dar, durch den Tumorzellen ihr Absterben verhindern und die unkontrollierte Proliferation auslösen können. Es wird vermutet, dass die meisten Zellen, deren Zellzyklus durch onkogene Mutationen gestört ist, normalerweise durch Apoptose entfernt werden. Bei der Apoptose kommt den Caspasen und Paracaspasen eine zentrale Bedeutung zu. Mehrere dieser proteolytischen Enzyme interagieren miteinander in komplexen Signaltransduktionswegen, um ein Absterben der Zellen in Reaktion auf äußere oder innere Signale zu vermitteln. So wurde z.B. gezeigt, dass durch Hemmung bestimmter Caspasen die Apoptose in Tumorzellen ausgelöst werden kann.

[0005] Vor diesem Hintergrund liegt der vorliegenden Erfindung somit die Aufgabe zugrunde, neue pharmazeutisch wirksame Verbindungen und Zusammensetzungen bereitzustellen, mit deren Hilfe eine effektive Behandlung verschiedener Krebserkrankungen ermöglicht wird. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Verbindungen und pharmazeutischen Zusammensetzungen nach den anliegenden Ansprüchen gelöst.

[0006] Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass der Wirkstoff Biperiden in bestimmten Tumoren, wie z.B. beim Pankreaskarzinom, die Zellproliferation hemmen und darüber hinaus die Apoptose auslösen kann und die Zellen eines Tumors dem Zelltod zuführen kann. Biperiden wird seit mehreren Jahrzehnten als Antiparkinsonmittel eingesetzt. Darüber hinaus wird Biperiden auch in der Antipsychotika-Therapie zur Verringerung medikamentös bedingter extrapyramidaler Nebenwirkungen, wie beispielsweise Körpersteifheit und Blickstarre, verwendet. Eine Verwendung von Biperiden in der Krebstherapie wurde im Stand der Technik bislang nicht vorgeschlagen.

[0007] Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass die kombinierte Verabreichung von Biperiden mit einem Phenothiazin, wie z.B. Mepazin, zu einer verbesserten therapeutischen Wirkung führt, die sich nicht durch additive Effekte erklären lässt.

1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, oder 1:10 umfasst. Ein Verhältnis von (-)-Biperiden zu (+)-Biperiden von etwa 1:1 ist besonders bevorzugt.

[0014] Die vorliegend vorgeschlagene Biperiden-Verbindung, d.h. (-)-Biperiden, (+)-Biperiden, ein Racemat der beiden Enantiomere, oder Salze, Solvate oder Derivate davon, können erfindungsgemäß im Rahmen der Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen eingesetzt werden. Krebserkrankungen, die wirksam durch eine wie vorliegend vorgeschlagene Biperiden-Verbindung behandelt werden können, umfassen Bronchialkarzinome, wie das kleinzellige oder das großzellige Bronchialkarzinom, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Prostatakrebs, Leberkrebs, Pankreaskrebs, Blasenkrebs, Hautkrebs, Eierstockkrebs, hämatologische Krebserkrankungen, Krebsarten des Urogenitaltraktes beim Mann und der Frau, Nebennierenrindendkrebs (Phäochromozytom), Krebserkrankungen des Gehirns, Magenkrebs, Nierenkrebs, Uteruskrebs, Knochenkrebs, Ösophaguskrebs, Kaposi-Sarkom, oropharyngale Krebserkrankungen, Hodenkrebs, Schilddrüsenkrebs, Lymphome, adenokortikale Krebserkrankungen, Gallenblasenkrebs, multiples Myelom, Dünndarmkrebs, Analkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Burkitt-Lymphom, Gallengangkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Gebärmutterkörperkrebs, Harnröhrenkrebs, Kehlkopfkrebs, Knochenkrebs, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom, Wilms-Tumor, Plasmocytom oder Retinoblastom.

[0015] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die zu behandelnde Krebserkrankung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Bronchialkarzinom und/oder Ösophaguskarzinom. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die zu behandelnde Krebserkrankung eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Pankreaskarzinome stellen eine der aggressivsten Krebsarten dar, bei denen nur wenige Patienten einen Zeitraum von 5 Jahren nach Diagnosestellung überleben [2–3]. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Pankreaskarzinom um ein Pankreasadenokarzinom, wie z.B. ein duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) oder um einen neuroendokrinen Tumor.

[0016] Vorzugsweise handelt es sich bei der Krebserkrankung um eine MALT1-abhängige Erkrankung, d.h. um eine Krebserkrankung, bei der die Tumorzellen die Protease MALT1 exprimieren. Vorzugsweise handelt es sich bei der Krebserkrankung um eine solche, bei der die Tumorzellen MALT1 stärker exprimieren als die entsprechenden nicht-karzinogenen Zellen des entsprechenden Gewebes. Die MALT1-Expression in den Tumorzellen wird in der Regel mindestens 50% stärker sein als in den nicht-karzinogenen Zellen, vorzugsweise mindestens 100% stärker, 200% stärker, 300% stärker, 400% stärker oder 500% stärker. In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der Krebserkrankung um eine solche, bei der in den Tumorzellen MALT1 kontinuierlich oder durch einen Signaltransduktionsweg aktiviert ist, während eine solche Aktivierung in den entsprechenden nicht-karzinogenen Zellen nicht vorliegt. Die Verbindung nach Formel (Ia) und/oder die Verbindung nach Formel (Ib) wird vorzugsweise in einer Konzentration verabreicht, die ausreicht, um eine Inhibition der MALT1-Protease in den Tumorzellen zu bewirken.

[0017] Die vorliegend vorgeschlagene Biperiden-Verbindung und entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Biperiden-Verbindung enthalten, können mit bekannten chemotherapeutischen Mitteln kombiniert werden, um eine verbesserte Wirksamkeit zu erzielen. Die Biperiden-Verbindung kann beispielsweise mit alkylierenden Mitteln; Alkylsulfonaten; Aziridinen, wie z.B. Thiotepa; Ethylenimine; Anti-Metaboliten; Folsäure-Analoga, wie z.B. Methotrexat (Famitrexat[®], Lantarel[®], METEX[®], MTX Hexal[®]); Purin-Analoga, wie z.B. Azathioprin (Azaiprin[®], AZAMEDAC[®], Imurek[®], Zytim[®]), Cladribin (Leustatin[®]), Fludarabinphosphat (Fludara[®]), Mercaptopurin (MERCAP[®], Puri-Nethol[®]), Pentostatin (Nipent[®]), Thioguanin (Thioguanin-Wellcome[®]) oder Fludarabin; Pyrimidin-Analoga, wie z.B. Cytarabin (Alexan[®], ARA-cell[®], Udicil[®]), Fluorouracil, 5-FU (Efudix[®], Fluoroblastin[®], Ribofluor[®]), Gemcitabin (Gemzar[®]), Doxifluridin, Azacitidin, Carmofur, 6-Azuridin, Floxuridin; Stickstoff-Lost-Derivaten, wie z.B. Chlorambucil (Leukeran[®]), Melphalan (Alkeran[®]), Chlornaphazin, Estramustin, Mechlorethamin; Oxazaphosphorinen, wie z.B. Cyclophosphamid (CYCLO-cell[®], Cyclostin[®], Endoxan[®]), Ifosfamid (Holoxan[®], IFO-cell[®]) oder Trofosfamid (Ixoten[®]); Nitrosoharnstoffen, wie z.B. Bendamustin (Ribomustin[®]), Carmustin (Carmubris[®]), Fotemustin (Muphoran[®]), Lomustin (Cecenu[®], Lomeblastin[®]), Carmustin, Chlorozotocin, Ranimustin oder Nimustin (ACNU[®]); Hydroxyharnstoffen (Litalir[®]); Vincaalkaloiden und Taxenen, wie z.B. Vinblastin (Velbe[®]), Vindesin (Eldisine[®]), Vinorelbin (Navelbine[®]), Docetaxel (Taxotere[®]), oder Paclitaxel (Taxol[®]); Platin-Verbindungen, wie z.B. Cisplatin (Platiblastin[®], Platinex[®]) oder Carboplatin (Carboplat[®], Ribocarbo[®]); Sulfonsäureestern, wie z.B. Busulfan (Myleran[®]), Piposulfan oder Treosulfan (Ovostat[®]); Anthrazyklinen, wie z.B. Doxorubicin (Adriblastin[®], DOXO-cell[®]), Daunorubicin (Daunoblastin[®]), Epirubicin (Farmorubicin[®]), Idarubicin (Zavedos[®]), Amsacrin (Amsidyl[®]) oder Mitoxantron (Novantron[®]); sowie mit Derivaten, Tautomeren und pharmazeutisch aktiven Salzen der oben genannten Verbindungen verabreicht werden. Auch eine Kombination der Biperiden-Verbindung mit anti-angiogenen Mitteln, z.B. mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]), Denosumab (Prolia[®], XGEVA[®]), oder mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

ren, wie z.B. Sorafenib (Nexavar[®]) oder Sunitinib (Sutent[®]), ist möglich. Auch Kombinationen der Biperiden-Verbindung mit therapeutischen Antikörpern, wie z.B. Trastuzumab (Herceptin[®]), Gemtuzumab (Mylotarg[®]), Panitumumab (Vectibix[®]) oder Edrecolomab (Panorex[®]), sind erfindungsgemäß umfasst.

[0018] Die vorliegend vorgeschlagene Biperiden-Verbindung und entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen, die Biperiden-Verbindung enthalten, können darüber hinaus mit einer herkömmlichen Bestrahlungstherapie kombiniert werden. Die Bestrahlung kann dabei vor oder nach Verabreichung des erfindungsgemäßen Kombinationspräparats nach im Stand der Technik bekannten Verfahren durchgeführt werden. Die Bestrahlung kann Gammastrahlen, Röntgenstrahlen sowie die von Radioisotopen ausgesandte Strahlung umfassen. Die Bestrahlungstherapie kann des weiteren Teilchenstrahlung (Elektronen, Protonen, Neutronen) umfassen. Entsprechende Strahlungsdosen, die bei der Behandlung von Tumoren eingesetzt werden, sind dem auf dem Gebiet der Strahlentherapie tätigen Fachmann bekannt. Je nach Art des Tumors können z.B. Gesamtdosen von 20 bis 80 Gray zum Einsatz kommen.

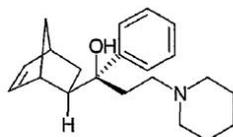
[0019] Besonders vorteilhafte Wirkungen ergeben sich bei Kombination der Biperiden-Verbindung mit einer die MALT1-Protease hemmenden Phenothiazin-Verbindung. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass die Kombination von Biperiden mit einer solchen Phenothiazin-Verbindung eine erheblich stärkere inhibierende Wirkung auf die Proliferation von Krebszellen ausübt, als dies hätte erwartet werden können. Es ist im Stand der Technik bekannt, dass Phenothiazine wie z.B. Mepazin, Promazin und Thioridazin durch Hemmung der MALT1-Protease die Proliferation von Krebszellen hemmen können. Wie in den nachstehenden Beispielen gezeigt wird, ist der durch Kombination von Biperiden und Phenothiazin erzielte antiproliferative Effekt deutlich stärker als durch Addition der einzelnen Wirkungen zu erwarten war. Vielmehr beruht die durch die Kombination erzielte Wirkung auf einem synergistischen Zusammenwirken der einzelnen Wirkstoffe. Wie vorliegend verwendet ist unter einer synergistischen Wirkung eine Wirkung zu verstehen, die stärker ist als durch einfache Addition der bei alleiniger Gabe der Komponenten beobachteten Effekte zu erwarten gewesen wäre. Eine synergistische Wirkung erlaubt die Verabreichung von geringeren Mengen Biperiden bzw. Phenothiazin, so dass die Verträglichkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung für den Patienten in der Regel verbessert wird. So können die einzelnen Komponenten der Kombination, d.h. die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung, unter bestimmten Umständen sogar in subtherapeutischen Dosen verabreicht werden, die bei alleiniger Gabe keine Wirkung auf den Verlauf der zu behandelnden Krebserkrankung zeigen würden.

[0020] Somit umfasst das Behandlungsverfahren in einem Aspekt der Erfindung neben der Verabreichung der Biperiden-Verbindung auch die zeitlich vorgelagerte, gleichzeitige oder zeitlich nachgelagerte Verabreichung einer die MALT1-Protease hemmenden Phenothiazin-Verbindung. Vorzugsweise handelt es sich bei der die MALT1-Protease hemmenden Phenothiazin-Verbindung um eine solche, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mepazin, Thioridazin, Promazin und pharmazeutisch geeigneten Salzen, Derivaten oder Solvaten davon. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Mepazin oder Salzen, Derivaten oder Solvaten davon in Kombination mit Biperiden.

[0021] Vorzugsweise werden die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung, wie z.B. Mepazin, in einer einheitlichen pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegen. Es ist allerdings für die Ausführung der vorliegenden Erfindung nicht zwingend notwendig, dass die beiden Wirkstoffe in einer einheitlichen pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegen. Vielmehr können die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung auch in getrennten Formulierungen vorliegen, die gleichzeitig oder zeitlich versetzt an den zu behandelnden Patienten verabreicht werden.

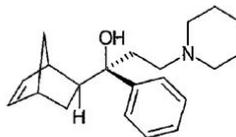
[0022] Somit betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:

a) eine Verbindung der Formel



(1a)

oder



(1b)

oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz oder Solvat davon, und
b) mindestens eine Phenothiazin-Verbindung.

[0023] Eine solche Zusammensetzung enthält neben der Biperiden-Verbindung demgemäß mindestens eine Phenothiazin-Verbindung, wie z.B. Mepazin oder ein Salz oder Solvat davon, als einheitliche Formulierung, d.h. als einheitliche pharmazeutische Zusammensetzung. Die Wirkstoffe der Kombination können beispielsweise *in vitro*, d.h. vor der Verabreichung an den Patienten, miteinander zu einer einheitlichen Darreichungsform kombiniert werden, solange keiner der beiden Bestandteile durch das Vermischen mit dem jeweils anderen Bestandteil der Kombination einen Verlust bezüglich seiner MALT1-hemmenden Aktivität erleidet. So lassen sich beispielsweise Biperiden und Mepazin, die in einer lyophilisierten Mischung vorliegen, durch Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels zu einer Infusionslösung oder einer Injektionslösung rekonstituieren, die beide Wirkstoffe umfasst. Darüber hinaus kann die pharmazeutische Zusammensetzung direkt als einheitliche Dosierungsform bereitgestellt werden, z.B. in Form einer Tablette für die orale Verabreichung.

[0024] Alternativ dazu können die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung in getrennten Formulierungen vorliegen, die zum selben Zeitpunkt oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten an den Patienten verabreicht werden. So können beispielsweise die Biperiden-Verbindung und die Biperiden-Verbindung an verschiedenen Tagen eines Behandlungszyklus verabreicht werden. Die Biperiden-Verbindung kann beispielsweise in einem sich wiederholenden, einwöchigen Behandlungszyklus täglich verabreicht werden, während die Phenothiazin-Verbindung, wie z.B. Mepazin oder ein Salz oder Solvat davon, lediglich an einem bestimmten Tag dieses Zyklus verabreicht wird. Sofern die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung zeitlich getrennt voneinander verabreicht werden sollen, ist es zweckmäßig, die Wirkstoffe in getrennten Verpackungseinheiten (z.B. in mehreren Ampullen) bereitzustellen. Dabei können die Biperiden-Verbindung und die Phenothiazin-Verbindung in gleichartigen oder unterschiedlichen Darreichungsformen vorliegen, die nachstehend genauer beschrieben werden.

[0025] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Biperiden-Verbindung vor Verabreichung des Phenothiazins an den Patienten verabreicht. Vorzugsweise wird die Verabreichung der Biperiden-Verbindung 1–24 h vor Verabreichung der Phenothiazin-Verbindung durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Verabreichung der Biperiden-Verbindung 12–16 h vor Verabreichung der Phenothiazin-Verbindung durchgeführt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Phenothiazin-Verbindung vor Verabreichung der Biperiden-Verbindung an den Patienten verabreicht. Vorzugsweise wird die Verabreichung der Phenothiazin-Verbindung 1–24 h vor Verabreichung der Biperiden-Verbindung durchgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Verabreichung der Phenothiazin-Verbindung 12–16 h vor Verabreichung der Biperiden-Verbindung durchgeführt.

[0026] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine wie oben definierte Biperiden-Verbindung und Mepazin oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz, Derivat oder Solvat desselben. In einer alternativen Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine wie oben definierte Biperiden-Verbindung und Thioridazin oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz, Derivat oder Solvat desselben. In einer noch weiteren alternativen Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine wie oben definierte Biperiden-Verbindung und Promazin oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz, Derivat oder Solvat desselben.

[0027] Die erfindungsgemäßen, eine Biperiden-Verbindung enthaltenden Zusammensetzungen können in jeder im Stand der Technik bekannten, geeigneten Darreichungsform verabreicht werden. Derartige Verfahren sowie geeignete Hilfsstoffe und Träger werden beispielsweise in "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 21. Auflage (2005) beschrieben. Solche Formulierungen umfassen beispielsweise Zusammensetzungen für eine orale, rektale, nasale oder parenterale (einschließlich subkuta-

ner, intramuskulärer, intravenöser und intradermaler) Verabreichung. Die Zusammensetzungen können dabei in Form von Granulaten, Pulvern, Tabletten, Kapseln, Sirup, Suppositorien, Injektionslösungen, Emulsionen oder Suspensionen vorliegen.

[0028] Gewöhnlich umfassen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen neben der Biperiden-Verbindung und der Phenothiazin-Verbindung einen oder mehrere pharmazeutisch akzeptable Träger, die mit den übrigen Inhaltsstoffen der Zusammensetzungen physiologisch kompatibel sind. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen oder Präparate können neben den eigentlichen Wirkstoffen auch weitere Hilfsstoffe, Bindemittel, Verdünnungsmittel oder ähnliche Substanzen umfassen.

[0029] Für die orale, bukkale und sublinguale Verabreichung werden in der Regel feste Formulierungen wie, z.B. Pulver, Suspensionen, Granulate, Tabletten, Pillen, Kapseln und Gelcaps verwendet. Diese können beispielsweise hergestellt werden, indem man die Wirkstoffe oder deren Salze mit mindestens einem Additiv oder mit mindestens einem Hilfsstoff vermischt. Derartige Hilfsstoffe und Träger werden beispielsweise in "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 21. Auflage (2005) beschrieben. Als Additive oder Hilfsstoffe können beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Casein, Albumin, Mannit, Dextran, Saccharose, Lactose, Sorbitol, Stärke, Agar, Alginate, Pectine, Kollagen, Glyceride oder Gelatine verwendet werden. Ferner können orale Dosisformen Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, Tocopherol oder Cystein), Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat), Konservierungsmittel (z.B. Paraben oder Sorbinsäure), Sprengmittel, Bindemittel, Verdicker, Geschmacksverbesserer, Farbstoffe und ähnliche Substanzen umfassen.

[0030] Flüssige Formulierungen, die sich für die orale Verabreichung eignen, können beispielsweise als Emulsionen, Sirups, Suspensionen oder Lösungen vorliegen. Diese Formulierungen können unter Verwendung einer sterilen Flüssigkeit als pharmazeutischer Träger (z.B. Öl, Wasser, Alkohol oder Kombinationen derselben) in Form von flüssigen Suspensionen oder Lösungen hergestellt werden. Für die orale oder parenterale Verabreichung können pharmazeutisch geeignete Tenside, Suspensionsmittel, Öle oder Emulgatoren zugefügt werden. Für den Gebrauch in flüssigen Dosisformen geeignete Öle umfassen beispielsweise Olivenöl, Sesamöl, Erdnussöl, Rapsöl und Maisöl. Geeignete Alkohole umfassen Ethanol, Isopropylalkohol, Hexadecylalkohol, Glycerin und Propylenglykol. Suspensionen können ferner Fettsäureester, wie Ethyloleat, Isopropylmyristat, Fettsäureglyceride und acetylierte Fettsäureglyceride umfassen. Ferner werden Suspensionen häufig auch mit Substanzen wie Mineralöl oder Petrolatum versetzt.

[0031] Für die Injektion geeignete Formulierungen umfassen im Allgemeinen wässrige Suspensionen oder Ölsuspensionen, die unter Verwendung eines geeigneten Dispersionsmittels und eines Suspensionsmittels hergestellt werden können. Injizierbare Formen können in Lösungsphase oder in Form einer Suspension vorliegen, die mit einem Lösungsmittel oder Verdünnungsmittel hergestellt wird. Als pharmazeutischer Träger kommen u.a. sterilisiertes Wasser, Ringer-Lösung oder eine isotonische wässrige Kochsalzlösung in Betracht. Alternativ dazu kann man als Träger sterile Öle einsetzen, die vorzugsweise nicht flüchtig sind. Für die Injektion geeignete Dosisformen umfassen ferner Pulver, die in einem Lösungsmittel rekonstituiert werden können. Beispiele hierfür sind u.a. gefriergetrocknete oder sprühgetrocknete Pulver. Für die Injektion können diese Formulierungen gegebenenfalls mit Stabilisierungsmitteln oder Tensiden versetzt werden. Die Formulierungen können durch Injektion, wie durch Bolus-Injektion oder durch kontinuierliche Infusion verabreicht werden.

[0032] Die am besten für die jeweilige Therapie geeigneten Verabreichungsarten und die zu verabreichenden Mengen der Biperiden-Verbindung (und ggf. der Phenothiazin-Verbindung) können vom Fachmann mittels Routineverfahren ermittelt werden. Faktoren, die die jeweilige Menge der Wirkstoffe in der zu verabreichenden pharmazeutischen Zusammensetzung beeinflussen, umfassen die Art und Schwere der Krebserkrankung, das Alter, Körpergewicht, Geschlecht und den allgemeinen Gesundheitszustand des zu behandelnden Patienten, die gleichzeitige Verabreichung anderer therapeutischer Mittel sowie andere Faktoren.

[0033] Geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen zur humanen Verabreichung werden in der Regel 0,01 mg bis 80 mg der Biperiden-Verbindung pro kg Körpergewicht des Patienten umfassen. Vorzugsweise liegt die Menge der Biperiden-Verbindung im Bereich von 1 mg bis 20 mg pro kg Körpergewicht des Patienten und noch stärker bevorzugt im Bereich von 5 mg bis 15 mg pro kg Körpergewicht des Patienten. 10 mg der Biperiden-Verbindung pro kg Körpergewicht sind besonders bevorzugt. Sofern die pharmazeutische Zusammensetzung neben der Biperiden-Verbindung auch eine Phenothiazin-Verbindung enthält, wird die Menge der Phenothiazin-Verbindung in den pharmazeutischen Zusammensetzungen üblicherweise von 0,01 mg bis 150 mg pro kg Körpergewicht des Patienten betragen. Vorzugsweise wird die Menge der Phenothiazin-Verbindung in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen oder Präparaten im Bereich von 1 mg bis 50 mg pro kg Kör-

pergewicht des Patienten und noch stärker bevorzugt im Bereich von 5 mg bis 25 mg pro kg Körpergewicht des Patienten liegen. 15–20 mg Phenothiazin pro kg Körpergewicht sind besonders bevorzugt.

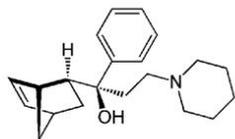
[0034] Die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen und Präparate kann anhand von im Stand der Technik bekannten Parametern bewertet werden. Diese Parameter umfassen u.a. die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung bei der Beseitigung von Tumoren, die Ansprechrate, die Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung und die Überlebensrate der behandelten Patienten. Eine gegen einen Tumor gerichtete Wirkung kann sich durch eine Inhibierung des Tumorwachstums, eine Verzögerung des Tumorwachstums, eine Verkleinerung des Tumors, eine Verringerung der Anzahl der Tumorzellen, eine Verlängerung der Zeitspanne bis zum Einsetzen eines erneuten Tumorwachstums sowie eine Verzögerung im Fortschreiten der Erkrankung darstellen.

[0035] Vorzugsweise führen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Präparate zu einem vollständigen Ansprechen beim Patienten. Mit vollständigem Ansprechen ist vorliegend die Beseitigung sämtlicher klinisch nachweisbarer Erkrankungssymptome sowie die Wiederherstellung von normalen Befunden im Blutbild, bei Röntgenuntersuchungen, CT-Aufnahmen und ähnlichem gemeint. Ein solches Ansprechen dauert vorzugsweise mindestens einen Monat nach Absetzen der Behandlung an. Die antiproliferativ wirksamen Zusammensetzungen und Präparate der vorliegenden Erfindung können auch zu einem partiellen Ansprechen beim Patienten führen. Bei einem partiellen Ansprechen kommt es zu einer Verringerung der messbaren Tumorbelastung im Patienten. Dies bedeutet insbesondere, dass die Anzahl der im Patienten vorhandenen Tumorzellen abnimmt und keine neuen Läsionen zu beobachten sind. Gleichzeitig kommt es zu einer Verbesserung eines oder mehrerer durch die Krankheit verursachter Symptome (z.B. Fieber, Gewichtsverlust, Erbrechen).

[0036] In einem noch weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer Verbindung der Formel (Ia) oder (Ib) oder eines pharmazeutisch geeigneten Salzes oder Solvats davon als MALT1-Inhibitor bei Behandlung einer Krebserkrankung. Vorzugsweise wird die Verbindung dabei, wie oben beschrieben, bei Behandlung eines Pankreaskarzinoms, Lungenkarzinoms, Bronchialkarzinoms und/oder Ösophaguskarzinoms verwendet. Die Verwendung bei der Behandlung eines Pankreaskarzinoms ist besonders bevorzugt. Die Verwendung der Verbindung der Formel (Ia) oder (Ib) oder eines pharmazeutisch geeigneten Salzes oder Solvats davon als MALT1-Inhibitor kann ferner auch die Verabreichung einer Phenothiazin-Verbindung umfassen. Vorzugsweise ist die Phenothiazin-Verbindung dabei ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mepazin, Thioridazin, Promazin und pharmazeutisch geeigneten Salzen, Derivaten oder Solvaten davon.

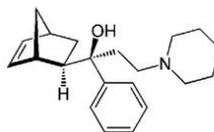
[0037] Schließlich betrifft die Erfindung ein Kit, das die folgenden Bestandteile umfasst:

a) ein Behältnis, das eine Verbindung der Formel



(Ia)

oder



(Ib)

oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz oder Solvat davon umfasst, und
b) mindestens ein Behältnis, das eine Phenothiazin-Verbindung umfasst.

[0038] Das Kit kann darüber hinaus auch Anweisungen für die kombinierte Verwendung der Biperiden-Verbindung und der Phenothiazin-Verbindung bei der Behandlung eines Patienten mit einer Krebserkrankung enthalten. Die Anweisungen können beispielsweise spezifische Mengen und Behandlungspläne umfassen, und sie können Informationen bezüglich der Verabreichungsdauer einschließen. Das Kit kann darüber hinaus andere Bestandteile umfassen, die zur Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, beispielsweise Lösungsmittel, Hilfsstoffe, Bindemittel, Verdünnungsmittel oder ähnliche Substanzen. Ferner kann das Kit auch Injektionsspritzen, Kanülen, Katheter und andere Hilfsmittel, die für die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen nützlich sind, umfassen.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0039] Fig. 1 zeigt die Ergebnisse von in vitro-Assays zur Bestimmung der Proliferation von Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Biperiden behandelt wurden.

[0040] Fig. 2 zeigt die Ergebnisse von in vitro-Assays zur Bestimmung der Proliferation von Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Mepazin behandelt wurden.

[0041] Die Fig. 3 und Fig. 4 zeigen die Ergebnisse von in vitro-Assays zur Bestimmung der Proliferation von Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Biperiden und Mepazin behandelt wurden.

[0042] Fig. 5 zeigt die Bestimmung der Apoptoserate in den Pankreaskrebs-Zelllinien L3.6pl res, L3.6pl wt, Panc-1, Panc-2, BxPC3 sowie in der Referenzzelllinie HPDE bei Behandlung der Zellen mit 29,6 µg/ml Biperiden oder 25 µM Mepazin oder einer Kombination aus 15 µM Mepazin und 3,7 µg/ml Biperiden. (*) bezeichnet einen Trend ($p < 0,1$), * bezeichnet eine statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$), ** bezeichnet eine hohe statistische Signifikanz ($p < 0,001$).

BEISPIELE

[0043] Die vorliegende Erfindung wird nunmehr anhand von bevorzugten Ausführungsformen beschrieben, welche die Erfindung veranschaulichen aber in keiner Weise beschränken sollen.

BEISPIEL 1: MTT-Proliferations-Assays

[0044] Die für die Proliferations-Assays verwendeten Zelllinien wurden in verschiedenen Medien kultiviert. Die Zelllinien Panc-1, Panc-2 und BxPC3, welche sich vom humanen duktalem Pankreas-Adenokarzinom (PDAC) ableiten, wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) (Sigma) kultiviert, das mit 1% Penicillin/Streptomycin (Life technologies/GIBCO 15140-122) und 10% fötalem Rinderserum (Life technologies/GIBCO 100500-064) supplementiert war. Die Zelllinie L3.6pl wurde in RPMI 1640 Medium (Life technologies/GIBCO 72400-21) kultiviert, das mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Rinderserum supplementiert war. Ein gegen Gemcitabin resistenter Subklon der Zelllinie L3.6pl, der als L3.6pl res bezeichnet wurde, wurde ebenfalls in RPMI 1640 Medium (Life technologies/GIBCO 72400-21) kultiviert, das mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fötalem Rinderserum, und 2 µM Gemcitabin (GEMZAR, Lily) supplementiert war. Die humane, immortalisierte, nicht-maligne Zelllinie des duktalem Pankreas-Epithels (HPDE) wurde in Keratinozyten-SFM (Life technologies/GIBCO) kultiviert, das mit 10% fötalem Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin, und 1% Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) supplementiert war.

[0045] Die Proliferationsraten der Zelllinien wurden nach Stimulation mit (i) Biperiden, (ii) Mepazin, und (iii) nach Stimulation mit beiden Wirkstoffen bestimmt. Dazu wurden in Platten mit 96 Vertiefungen jeweils 5000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zwei Stunden nach Zugabe von 100 µl Medium und 20 µl MTT-Substrat (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) die Nullwerte in einem ELISA-Lesegerät (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) bei 490 nm bestimmt. Biperiden wurde in Form von Lösungen aus Biperiden-Hydrochlorid (B5311 SIGMA-Aldrich, USA) und DMSO mit steigenden Konzentrationen an Biperiden zugegeben (3,71 µg/ml, 11,1 µg/ml und 29,6 µg/ml). Mepazin wurde in Form von Lösungen von Mepazin-Hydrochlorid (MALT1 Inhibitor II, Calbiochem Merck, Millipore Billerica, USA) mit steigenden Konzentrationen an Mepazin (15 µM and 25 µM) zugegeben. Kombinationen der beiden Wirkstoffe Mepazin und Biperiden wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben: 15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden; 25 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden. Die Exstinktion wurde alle 24 Stunden während eines Zeitraums von 72 Stunden bestimmt.

[0046] Die Normalverteilung der Ergebnisse wurde durch Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test analysiert. Nicht-parametrische Variablen wurden unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Wenn die Gruppe kleiner als $n = 5$ war, wurde der Fisher-Exakt-Test durchgeführt. Normal verteilte Variablen wurden mit dem Student-T-Test untersucht. Die Überlebensanalyse wurde durch Log-Rank-Test und Kaplan-Meier-Abschätzungen durchgeführt. Der Spearman-Rho-Test wurde verwendet, um die statistische Abhängigkeit zwischen zwei Variablen zu messen. Die Werte sind als Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Alle statistischen Tests wurden mit SPSS (Version 21, IBM) durchgeführt.

[0047] Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Fig. 1–Fig. 4 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Mepazin und Biperiden starke inhibierende Effekte auf die Proliferation von Pankreaskrebszellen ausüben. In der

Zelllinie HPDE, die mit 11,1 µg/ml Biperiden behandelt wurde, verringerte sich die Proliferation geringfügig. HPDE zeigte jedoch keine statistisch signifikante Reaktion auf Mepazin, andere Dosen von Biperiden oder einer Kombination von Mepazin und Biperiden.

[0048] Im Gegensatz dazu zeigten alle Pankreas-Krebszelllinien massive Verringerungen der Proliferationsrate in Gegenwart von Biperiden, Mepazin oder der Kombination beider Mittel (siehe **Fig. 1–Fig. 4**). L3.6pl res verringerte die Proliferationsraten um 71,6% in Gegenwart von 29,6 µg/ml Biperiden ($p = 0,022$); um 69,4% in Gegenwart von 15 µM Mepazin ($p = 0,031$), und die Proliferation kam bei einer Dosis von 25 µM Mepazin ($p = 0,002$) vollständig zum Erliegen. L3.6pl res zeigte ferner einen Trend für eine um etwa 98% verringerte Proliferationsrate bei Kombinationen aus 15 µM Mepazin und 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,06$) und um 99,5% bei 25 µM Mepazin und 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,058$).

[0049] L3.6pl wt zeigte eine Verringerung der Proliferationsrate um 96,4% in Gegenwart von 29,7 µg/ml Biperiden ($p = 0,02$), eine Verringerung um 97,9% bei 25 µM Mepazin ($p = 0,004$), eine Verringerung um 96,4% bei 15 mM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,032$), und ein vollständiges Erliegen der Proliferation in Gegenwart von 25 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,03$).

[0050] Panc-1 eine statistisch signifikante Verringerung um 97,7% in Gegenwart von 15 µM Mepazin ($p = 0,005$) und ein vollständiges Erliegen der Proliferation in Gegenwart von 25 µM Mepazin ($p = 0,004$), 15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,023$), und 25 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,022$).

[0051] Panc-2 zeigte einen Trend für eine verringerte Proliferationsrate um 98,2% bei 29,6 µg/ml Biperiden ($p = 0,077$), eine statistisch signifikante Verringerung um 56,1% in Gegenwart 15 µM Mepazin ($p = 0,008$), eine Verringerung von 86,9% bei 25 µM Mepazin ($p = 0,001$), eine Verringerung von 82,2% bei 15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,031$) und eine Verringerung von 89,5% in Gegenwart von 25 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden ($p = 0,006$).

[0052] BxPC3 verringerte die Proliferationsraten sichtbar, wobei sich die Verringerung jedoch nicht im statistisch signifikanten Bereich bewegte.

BEISPIEL 2: Bestimmung der Apoptose

[0053] Um die Wirkung von Biperiden, Mepazin und Kombinationen der beiden Wirkstoffe auf die Apoptose in Zelllinien zu bestimmen, wurde ein "Cleaved Caspase 3"-Sandwich-ELISA durchgeführt. Die Pankreas-Krebszelllinien L3.6pl res, L3.6pl wt, Panc-1, Panc-2 sowie die Referenzzelllinie HPDE wurden mit 29,6 µg/ml Biperiden oder 25 µM Mepazin oder 15 µM Mepazin + 3,7 µg/ml Biperiden oder lediglich mit Vehikel (DMSO) behandelt. Die gespaltene Caspase-3 wurde 24, 48 und 72 h nach der Inkubation gemessen. Die Apoptose in den Zellen wurde unter Verwendung eines PathScan "Cleaved-Caspase-3"-Sandwich-ELISA (Cell Signaling, #7190C) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Jedes Experiment wurde in Doppelansätzen mindestens drei Mal durchgeführt.

[0054] Die Ergebnisse sind in **Fig. 5** aufgeführt. In keiner der getesteten Zelllinien war die Apoptose nach Behandlung mit 25 µM Mepazin oder 15 µM Mepazin + 3,7 µg/ml Biperiden erhöht. Hingegen war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden in allen Zelllinien eine erhöhte Apoptose zu verzeichnen. Die Apoptoserate in der Zelllinie HPDE war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Vehikel behandelt wurden, nach 48 Stunden um 132% erhöht ($265,3 \pm 27,8$ RLU vs. $114,3 \pm 40,8$ RLU; $p = 0,037$, t-Test), und nach 72 Stunden um 283,9% ($368,4 \pm 33,5$ RLU vs. $96,0 \pm 28,9$ RLU; $p = 0,002$, t-Test). Die Apoptoserate in der Zelllinie L3.6pl res war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden nach 24 Stunden um 274% erhöht ($770,0 \pm 72,5$ RLU vs. $205,9 \pm 97,8$ RLU; $p = 0,008$, t-Test), nach 48 Stunden um 273,8% ($848,1 \pm 45,7$ RLU vs. $226,9 \pm 91,1$ RLU; $p = 0,003$, t-Test), und nach 72 Stunden um 204,0% ($633,3 \pm 55,7$ RLU vs. $208,3 \pm 101,1$; $p = 0,021$, t-Test). Die Apoptoserate in der Zelllinie L3.6pl wt war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden nach 24 Stunden um 210,4% erhöht ($443,4 \pm 18,1$ RLU vs. $139,7 \pm 29,0$ RLU; $p < 0,001$, t-Test), und nach 48 Stunden um 83,5% ($386,2 \pm 15,9$ RLU vs. $210,4 \pm 53,7$ RLU; $p = 0,028$, t-Test). Die Apoptoserate in der Zelllinie Panc-1 war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden nach 24 Stunden um 125,3% erhöht ($325,1 \pm 48,3$ RLU vs. $144,2 \pm 48,2$ RLU; $p = 0,049$). Die Apoptoserate in der Zelllinie Panc-2 war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden nach 24 Stunden um 109,1% erhöht ($360,0 \pm 11,0$ RLU vs. $172,1 \pm 49,2$ RLU; $p = 0,029$), und nach 48 Stunden um 65,3% ($306,0 \pm 74,8$ RLU vs. $185,2 \pm 81,5$ RLU; $p = 0,047$, t-Test). Die Apoptoserate in der Zelllinie BxPC3 war bei Behandlung mit 29,6 µg/ml Biperiden nach 24 Stunden um 369,8% erhöht ($813,1 \pm 37,7$ RLU vs. $173,1 \pm 83,7$ RLU; $p = 0,002$, t-Test), und nach 48 Stunden um 357,

5% ($1046,1 \pm 34,7$ RLU vs. $228,7 \pm 136,1$ RLU; $p = 0,004$, t-Test), und nach 72 Stunden um 230,9% ($862,8 \pm 85,2$ RLU vs. $260,8 \pm 161,6$ RLU; $p = 0,032$).

BEISPIEL 3: Bestimmung der MALT1-Aktivität in Tumorzellen

[0055] Die MALT1-Aktivität wurde in den Pankreas-Krebszellen Panc-1, Panc-2 und in der Referenzzelllinie HPDE sowie in PMA-stimulierten und nicht-stimulierten Jurkat-Zellen gemessen. Um zu untersuchen, ob Mepazin, Biperiden und eine Kombination beider Wirkstoffe die MALT1-Aktivität in Pankreas-Krebszellen beeinflussen, wurde ein Assay durchgeführt, wie er in Nagel et al. [4] beschrieben wurde. Zu diesem Zweck wurden die Pankreas-Krebszelllinien und die Referenzzelllinie 24 Stunden mit Biperiden (29,6 µg/ml), Mepazin (25 µM), einer Kombination beider Wirkstoffe (15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden) oder lediglich mit DMSO behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und wie zuvor von Gungor et al. beschrieben [5] mit Maus-anti-MALT1-Antikörper (SC-76677, Santa Cruise, CA, USA) präzipitiert. Wie in dem Protokoll beschrieben, wurde das fluorogene Substrat AC-LRSR-AMC, welches von der C-terminalen BCL10-Spaltstelle abgeleitet war, als Substrat von MALT1 verwendet. Die Spaltungsaktivität von MALT1 wurde anschließend als relative Fluoreszenzeinheiten durch ein Mikroplatten-Lesegerät bestimmt (FLUOstar, Omega, BMG Labtech).

[0056] Die Ergebnisse wurden nach 24-stündiger Inkubation mit Mepazin, Biperiden oder einer Kombination beider Wirkstoffe bestimmt. Es zeigte sich, dass die Pankreas-Krebszelllinien sowie die nicht-maligne, immortalisierte HPDE-Zelllinie eine konstitutive MALT1-Aktivität aufwiesen, wenn auch im unterschiedlichen Ausmaß. Als Referenz wurde eine nicht-stimulierte sowie eine mit PMA aktivierte Jurkat-Zelllinie untersucht. Überraschenderweise zeigten die Pankreas-Krebszellen im Vergleich zu Jurkat-Zellen eine höhere konstitutive MALT1-Aktivität.

[0057] In der Referenzzelllinie HPDE beeinflusste die Inkubation mit 25 µM Mepazin die MALT1-Aktivität nicht. Im Gegensatz dazu verringerte die Zugabe von 29,7 µg/ml Biperiden die MALT1-Aktivität 10, 30 und 60 Minuten nach Inkubation mit dem MALT1-Substrat signifikant ($p = 0,002$; $p = 0,005$; $p = 0,012$; T-Test).

[0058] In der Zelllinie Panc-1, die mit 25 µM Mepazin behandelt worden war, verringerte sich die MALT1-Aktivität unmittelbar nach Zugabe des MALT1-Substrats ($p = 0,004$; T-Test) und auch 10, 30, 60 und 90 Minuten danach signifikant ($p = 0,004$; $p = 0,002$; $p = 0,001$; $p = 0,003$; $p = 0,011$; T-Test). Die gleiche Wirkung wurde bei Behandlung mit einer Kombination beider Wirkstoffe beobachtet, wenn 15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden zu den Zellen gegeben wurden ($p = 0,006$; $p = 0,004$; $p = 0,003$; $p = 0,004$; $p = 0,010$; T-Test). Die Behandlung der Zellen mit 29,7 µg/ml Biperiden verringerte die MALT1-Aktivität sichtbar, jedoch war diese Wirkung statistisch nicht signifikant.

[0059] In der Zelllinie Panc-2 verringerte sich die MALT1-Aktivität bei Behandlung mit 29,7 µg/ml Biperiden unmittelbar nach Zugabe des MALT1-Substrats und auch 10 Minuten nach Zugabe des MALT1-Substrats in einem statistisch signifikanten Ausmaß ($p = 0,011$; $p = 0,031$; T-Test). 25 µM Mepazin und die Kombination der beiden Wirkstoffe, 15 µM Mepazin + 3,71 µg/ml Biperiden verringerten die MALT1-Aktivität, wobei diese Reduktion jedoch statistisch nicht signifikant war.

BEISPIEL 4: Xenograft-Maus-Modell

[0060] Für das Xenograft-Modell wurden *pfp-/-rag2-/-*-Doppel-Knockout-Mäuse verwendet. Dieses Maus-Modell zeigt aufgrund eines inaktivierten *pfp*-Gens eine schwere Störung der NK-Zellfunktion. Durch Inaktivierung des *rag2*-Gens fehlen der Maus reife T- oder B-Lymphozyten [6-7]. Das Maus-Modell wurde vom Taconic-Institut (Quality Laboratory Animals and Services for Research, DK8680 Ry, Taconic Europe, Dänemark) durch Kreuzung des PFPN12-Maus-Modells mit dem RAGN12-Maus-Modell entwickelt. Dieses Modell wurde über 12 Generationen (N12) mit C57BL/6NTac rückgekreuzt, und die Kolonie wurde durch homozygote Paarungen beibehalten.

[0061] Das Maus-Modell wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung mit PDAC-Zellen der Zelllinie Panc-1 verwendet, die subkutan verabreicht wurden. 12 Tage nach der subkutanen Injektion von 10^6 humanen Panc-1-Tumorzellen wurden die Mäuse täglich entweder mit 16 mg/kg Mepazin i.p. ($n = 10$), 10 mg/kg Biperiden ($n = 10$) i.p. oder mit einer Kombination beider Wirkstoffe, d.h. mit 16 mg/kg Mepazin und 10 mg/kg Biperiden ($n = 10$) i.p. behandelt. Die Kontrollgruppe ($n = 10$) wurde nicht behandelt.

[0062] Die tägliche Behandlung wurde unter identischen, standardisierten Bedingungen durchgeführt. Es wurde der gleiche 3-tägige Zyklus über die gesamte Zeit der Studie verwendet: Tag 1 umfasste die Injektion der

Medikation und die Bestimmung des Körpergewichts durch Wiegen. Tag 2 umfasste die Injektion der Medikation und die Messung des subkutanen Tumorwachstums mit einem Kaliper. Tag 3 umfasste die Injektion der Medikation und ein Neuroscoring. Die Mäuse zeigten eine gute Verträglichkeit hinsichtlich der Biperiden-Gabe. Insgesamt erschienen die Biperiden-behandelten Mäuse sowie die Mäuse, die die Kombination aus beiden Präparaten erhielten, motorisch aktiver zu sein als die Mäuse, die Mepazin bzw. keine Medikation (Kontrolle) erhielten.

[0063] Sobald die Tumore in der Kontrollgruppe einen Durchmesser von etwa 10 mm erreichten, wurden die Mäuse der mit Biperiden, Mepazin bzw. Biperiden + Mepazin behandelten Gruppen getötet und untersucht.

[0064] Den Mäusen wurde nach der Einschläferung der subkutane Tumor entfernt. Vor dem Eingriff wurde der Körper der Maus mit Ethanol desinfiziert. Die Haut oberhalb des Tumors wurde vorsichtig eingeschnitten, und der Tumor wurde chirurgisch aus dem umliegenden Gewebe entfernt. Nach der Entfernung wurde der Tumor gewogen und gemessen.

[0065] Zur Auswertung wurden lediglich Mäuse verwendet die einen Tumor ausgebildet hatten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Größe des subkutanen Tumors in Mäusen, die mit Mepazin und Biperiden behandelt wurden, signifikant verringert ist. Die Volumina der subkutanen Tumoren wurde nach der Entfernung mit einem Kaliper gemessen und durch die Formel Länge \times Breite² berechnet, wie es in [8] beschrieben ist. Die Tumorgößen der mit Biperiden, Mepazin bzw. Mepazin + Biperiden behandelten Gruppen waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe sichtbar kleiner. Die durchschnittliche Tumorgöße der Kontrollgruppe betrug $729,33 \text{ mm}^3 \pm 186,25 \text{ mm}^3$ gegenüber $130,43 \text{ mm}^3 \pm 63,96 \text{ mm}^3$ in der mit Mepazin behandelten Gruppe ($p = 0,002$; einseitiger Fisher-Exact-Test) und $235,89 \text{ mm}^3 \pm 124,91 \text{ mm}^3$ in der mit Biperiden behandelten Gruppe ($p = 0,027$; einseitiger Fisher-Exact-Test). Bei der Behandlung mit beiden Wirkstoffen betrug die Tumorgöße $164,50 \text{ mm}^3 \pm 45,25 \text{ mm}^3$ gegenüber $1000,33 \text{ mm}^3 \pm 816,86 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe (nicht signifikant).

LITERATURSTELLEN

- [1] De Vita, Hellman & Rosenberg, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 7. Auflage 2004, Lipincott, Williams & Wilkins.
- [2] Ferrone et al. (2008), J Gastrointest Surg, 12(4): 701–6.
- [3] Valle et al. (2014), J Clin Oncol, 32(6): 504–12.
- [4] Nagel & Krappmann (2013) Measurement of Endogenous MALT1 Activity. 3. Quelle: <http://www.bioprotocol.org/e821>.
- [5] Gungor et al. (2011), Cancer Res, 71(14): 5009–19.
- [6] Shinkai et al. (1992), Cell, 68(5): 855–67.
- [7] Walsh et al (1994), Proc Natl Acad Sci USA, 91(23): 10854–8.
- [8] Tomayko et al (1989), Cancer Chemother Pharmacol, 24(3): 148–54.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

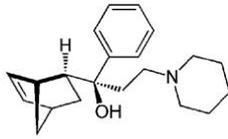
Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 21. Auflage (2005) [0027]
- "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 21. Auflage (2005) [0029]
- Nagel et al. [0055]
- Gungor et al. [0055]

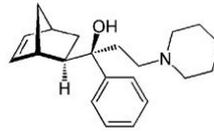
Patentansprüche

1. Verbindung der Formel



(Ia)

oder



(Ib)

oder pharmazeutisch geeignetes Salz oder Solvat davon zur Verwendung als MALT1-Inhibitor in einem Verfahren zur Behandlung einer Krebserkrankung.

2. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren die Verabreichung sowohl der Verbindung nach Formel (Ia) als auch der Verbindung nach Formel (Ib) umfasst.

3. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Krebserkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Bronchialkarzinom und/oder Ösophaguskarzinom.

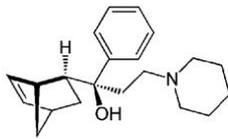
4. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Krebserkrankung ein Pankreaskarzinom ist.

5. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, bei dem das Verfahren ferner die Verabreichung einer Phenothiazin-Verbindung umfasst.

6. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Phenothiazin-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mepazin, Thioridazin, Promazin und pharmazeutisch geeigneten Salzen, Derivaten oder Solvaten davon.

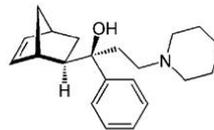
7. Verbindung zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1–6, bei dem die Verbindung nach Formel (Ia) und/oder Verbindung nach Formel (Ib) in einer Konzentration verabreicht wird/werden, die ausreicht, um eine Inhibierung der MALT1-Protease in den Tumorzellen zu bewirken.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
a) eine Verbindung der Formel



(Ia)

oder



(Ib)

oder pharmazeutisch geeignetes Salz oder Solvat davon, und
b) mindestens eine Phenothiazin-Verbindung.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, die ferner einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder einen pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoff umfasst.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8–9, bei der die Phenothiazin-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mepazin, Thioridazin, Promazin und pharmazeutisch geeigneten Salzen, Derivaten oder Solvaten davon.

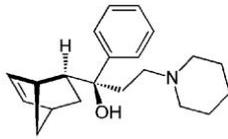
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8–10, die sowohl eine Verbindung nach Formel (Ia) als auch eine Verbindung nach Formel (Ib) umfasst.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer Krebserkrankung.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 12, bei dem die Krebserkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Bronchialkarzinom und/oder Ösophaguskarzinom.

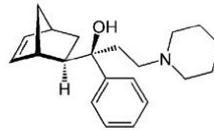
14. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 13, bei dem die Krebserkrankung ein Pankreaskarzinom ist.

15. Verwendung einer Verbindung der Formel



(Ia)

oder



(Ib)

oder eines pharmazeutisch geeigneten Salzes oder Solvats davon als MALT1-Inhibitor bei der Behandlung einer Krebserkrankung.

16. Verwendung nach Anspruch 15, bei der die Krebserkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Bronchialkarzinom und/oder Ösophaguskarzinom.

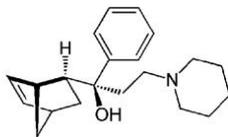
17. Verwendung nach Anspruch 16, bei der die Krebserkrankung ein Pankreaskarzinom ist.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15–17, bei dem die Behandlung ferner die Verabreichung einer Phenothiazin-Verbindung umfasst.

19. Verwendung nach Anspruch 18, bei der die Phenothiazin-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mepazin, Thioridazin, Promazin und pharmazeutisch geeigneten Salzen, Derivaten oder Solvaten davon.

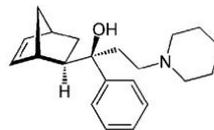
20. Kit, umfassend

a) ein Behältnis, das eine Verbindung der Formel



(Ia)

oder



(Ib)

oder pharmazeutisch geeignetes Salz oder Solvat davon umfasst, und
b) mindestens ein Behältnis, das eine Phenothiazin-Verbindung umfasst.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

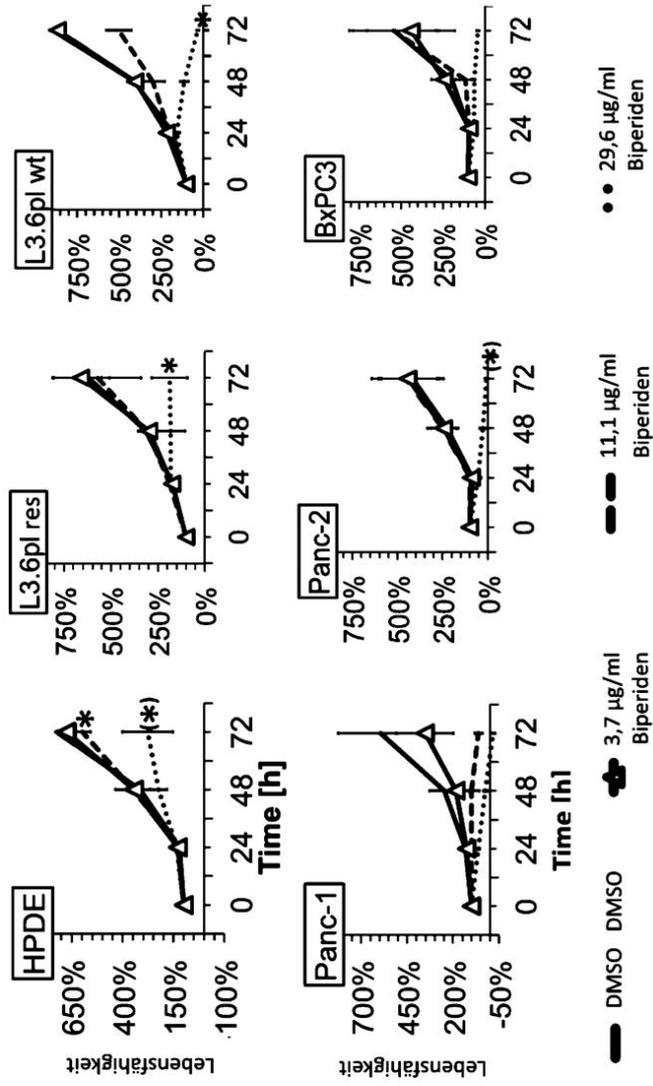


Fig. 1

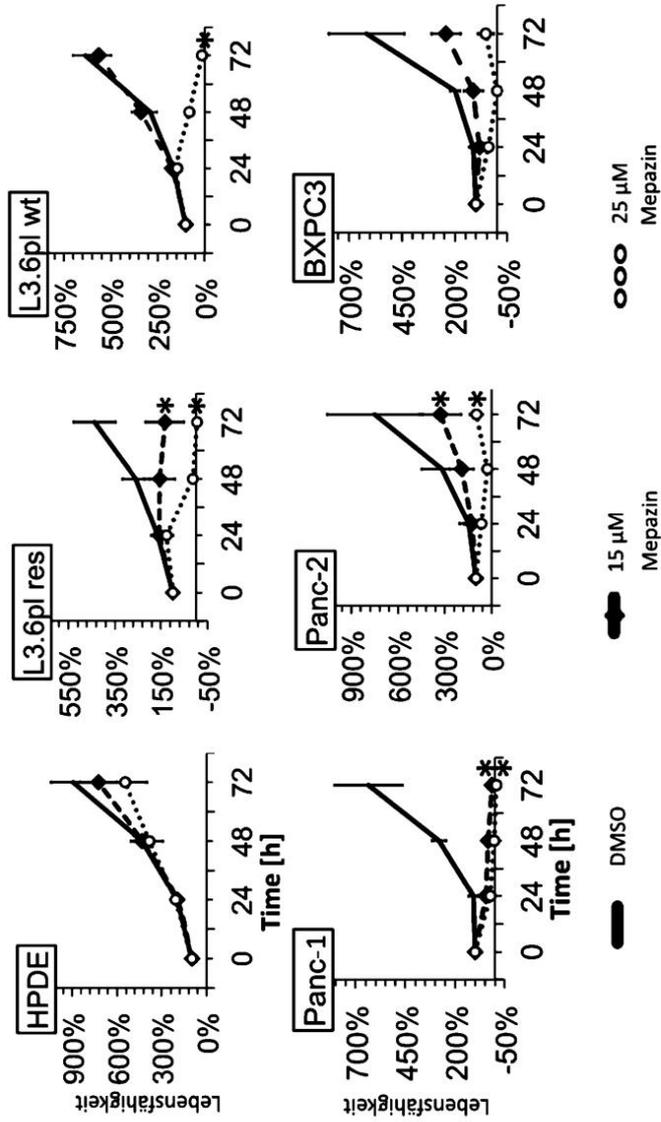


Fig. 2

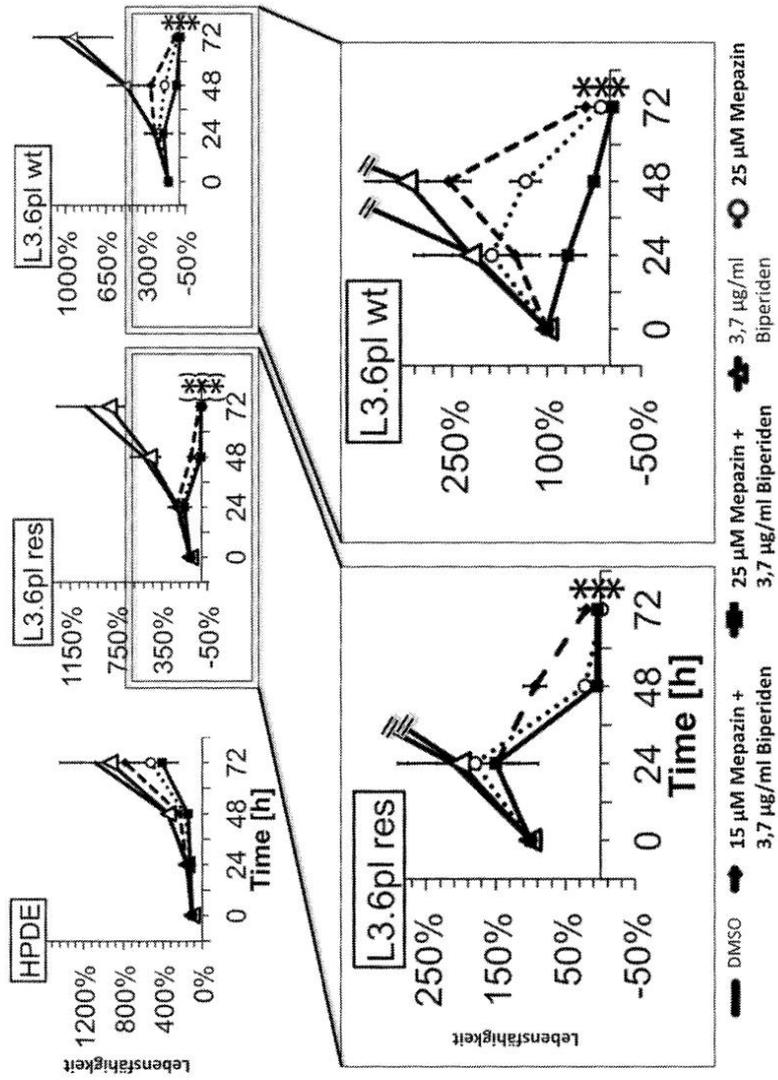


Fig. 3

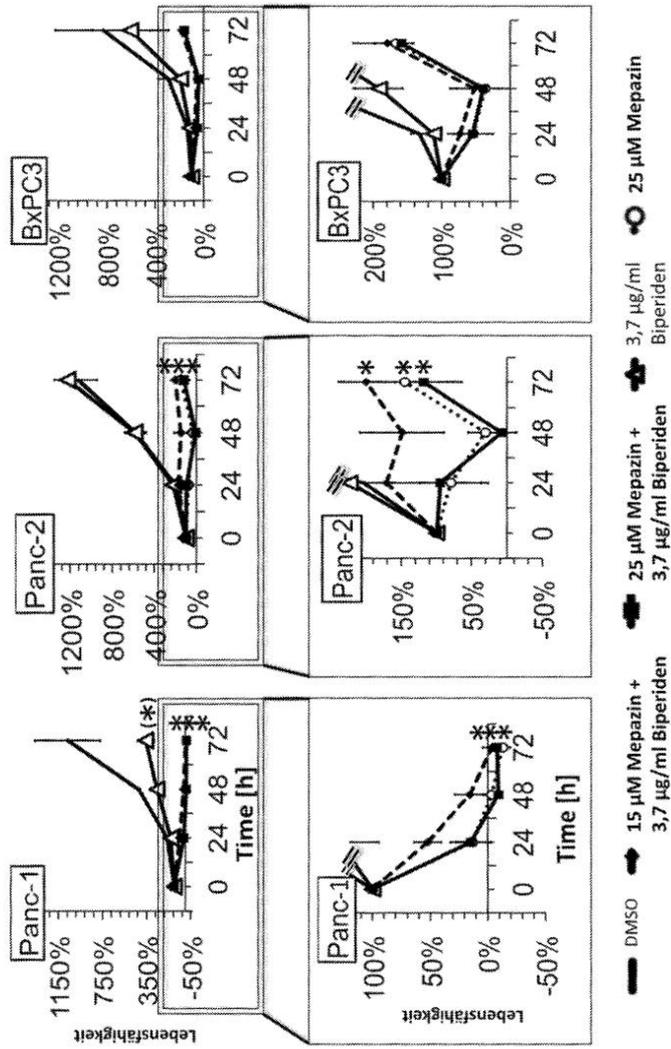


Fig. 4

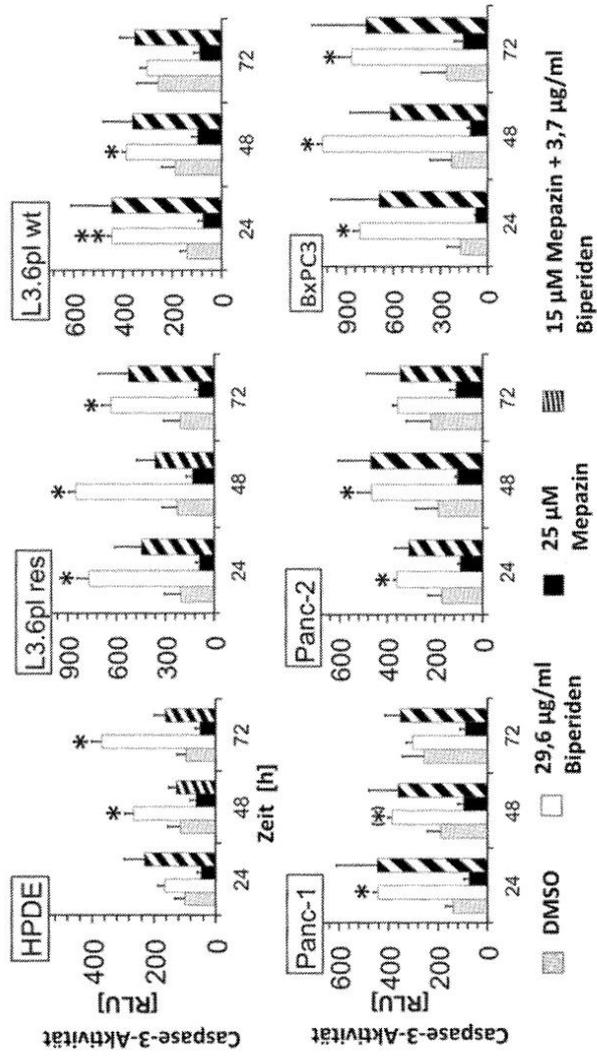


Fig. 5

11. Literaturverzeichnis

- Adler, G., T. Seufferlein, S. C. Bischoff, H.-J. Brambs, S. Feuerbach, G. Grabenbauer, S. Hahn, V. Heinemann, W. Hohenberger, J. M. Langrehr, M. P. Lutz, O. Micke, H. Neuhaus, P. Neuhaus, H. Oettle, P. M. Schlag, R. Schmid, W. Schmiegel, K. Schlottmann, J. Werner, B. Wiedenmann and I. Kopp (2013). S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“. DGVS-Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.
- Aumüller, G., G. Aus, J. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spaniel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzingler and H.-G. Zilch (2007). *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Bachmann, J., C. W. Michalski, M. E. Martignoni, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "Pancreatic resection for pancreatic cancer." *HPB (Oxford)* 8(5): 346-351.
- Baldwin, A. S. (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB." *J Clin Invest* 107(3): 241-246.
- Bassi, C., C. Procacci, G. Zamboni, A. Scarpa, G. Cavallini and P. Pederzoli (2000). "Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. Verona University Pancreatic Team." *Int J Pancreatol* 27(3): 181-193.
- Bergman, W., P. Watson, J. de Jong, H. T. Lynch and R. M. Fusaro (1990). "Systemic cancer and the FAMMM syndrome." *Br J Cancer* 61(6): 932-936.
- Bjorck, L. and G. Kronvall (1984). "Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent." *J Immunol* 133(2): 969-974.
- Bloor, S., G. Ryzhakov, S. Wagner, P. J. Butler, D. L. Smith, R. Krumbach, I. Dikic and F. Randow (2008). "Signal processing by its coil zipper domain activates IKK gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1279-1284.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* 25(6): 280-288.
- Brummelkamp, T. R., S. M. Nijman, A. M. Dirac and R. Bernards (2003). "Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB." *Nature* 424(6950): 797-801.
- Bruns, C. J., M. T. Harbison, H. Kuniyasu, I. Eue and I. J. Fidler (1999). "In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice." *Neoplasia* 1(1): 50-62.
- Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and

radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.

Chari, S. T., C. L. Leibson, K. G. Rabe, L. J. Timmons, J. Ransom, M. de Andrade and G. M. Petersen (2008). "Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer." *Gastroenterology* 134(1): 95-101.

Che, T., Y. You, D. Wang, M. J. Tanner, V. M. Dixit and X. Lin (2004). "MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation." *J Biol Chem* 279(16): 15870-15876.

Coornaert, B., M. Baens, K. Heyninck, T. Bekaert, M. Haegman, J. Staal, L. Sun, Z. J. Chen, P. Marynen and R. Beyaert (2008). "T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20." *Nat Immunol* 9(3): 263-271.

Dinkel, H., K. Van Roey, S. Michael, N. E. Davey, R. J. Weatheritt, D. Born, T. Speck, D. Kruger, G. Grebnev, M. Kuban, M. Strumillo, B. Uyar, A. Budd, B. Altenberg, M. Seiler, L. B. Chemes, J. Glavina, I. E. Sanchez, F. Diella and T. J. Gibson (2014). "The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting." *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D259-266.

Dixon, R. J., K. Young and N. J. Brunskill (1999). "Lysophosphatidic acid-induced calcium mobilization and proliferation in kidney proximal tubular cells." *Am J Physiol* 276(2 Pt 2): F191-198.

Domino, E. F. and L. Ni (2008). "Biperiden enhances L-DOPA methyl ester and dopamine D(1) receptor agonist SKF-82958 but antagonizes D(2)/D(3) receptor agonist rotigotine antihemiparkinsonian actions." *Eur J Pharmacol* 599(1-3): 81-85.

Ducieux, M., A. S. Cuhna, C. Caramella, A. Hollebecque, P. Burtin, D. Goere, T. Seufferlein, K. Haustermans, J. L. Van Laethem, T. Conroy, D. Arnold and E. G. Committee (2015). "Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* 26 Suppl 5: v56-68.

Eberle, M. A., R. Pfitzer, K. L. Pogue-Geile, M. P. Bronner, D. Crispin, M. B. Kimmey, R. H. Duerr, L. Kruglyak, D. C. Whitcomb and T. A. Brentnall (2002). "A new susceptibility locus for autosomal dominant pancreatic cancer maps to chromosome 4q32-34." *Am J Hum Genet* 70(4): 1044-1048.

Egawa, T., B. Albrecht, B. Favier, M. J. Sunshine, K. Mirchandani, W. O'Brien, M. Thome and D. R. Littman (2003). "Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation." *Curr Biol* 13(14): 1252-1258.

Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, D. H. (2014). Akineton/-retard. DESMA HEALTHCARE.

Fan, C. M. and T. Maniatis (1991). "Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway." *Nature* 354(6352): 395-398.

Feig, C., A. Gopinathan, A. Neesse, D. S. Chan, N. Cook and D. A. Tuveson (2012). "The pancreas cancer microenvironment." *Clin Cancer Res* 18(16): 4266-4276.

Ferch, U., C. M. zum Buschenfelde, A. Gewies, E. Wegener, S. Rauser, C. Peschel, D. Krappmann and J. Ruland (2007). "MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit." *Nat Immunol* 8(9): 984-991.

Gilmore, T. D. and S. Gerondakis (2011). "The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease." *Genes Cancer* 2(7): 695-711.

Gobbi, P. G., M. Bergonzi, M. Comelli, L. Villano, D. Pozzoli, A. Vanoli and P. Dionigi (2013). "The prognostic role of time to diagnosis and presenting symptoms in patients with pancreatic cancer." *Cancer Epidemiol* 37(2): 186-190.

Goggins, M., M. Schutte, J. Lu, C. A. Moskaluk, C. L. Weinstein, G. M. Petersen, C. J. Yeo, C. E. Jackson, H. T. Lynch, R. H. Hruban and S. E. Kern (1996). "Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas." *Cancer Res* 56(23): 5360-5364.

Gungor, C., H. Zander, K. E. Effenberger, Y. K. Vashist, T. Kalinina, J. R. Izbicki, E. Yekebas and M. Bockhorn (2011). "Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer." *Cancer Res* 71(14): 5009-5019.

Hailfinger, S., H. Nogai, C. Pelzer, M. Jaworski, K. Cabalzar, J. E. Charton, M. Guzzardi, C. Decaillet, M. Grau, B. Dorken, P. Lenz, G. Lenz and M. Thome (2011). "Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(35): 14596-14601.

Hansel, D. E., S. E. Kern and R. H. Hruban (2003). "Molecular pathogenesis of pancreatic cancer." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4: 237-256.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." *Genes Dev* 18(18): 2195-2224.

Herold, G. (2017). *Innere Medizin*. Köln, Herold.

Hulpiau, P., Y. Driège, J. Staal and R. Beyaert (2016). "MALT1 is not alone after all: identification of novel paracaspases." *Cell Mol Life Sci* 73(5): 1103-1116.

Iacobuzio-Donahue, C. A., B. Fu, S. Yachida, M. Luo, H. Abe, C. M. Henderson, F. Vilardell, Z. Wang, J. W. Keller, P. Banerjee, J. M. Herman, J. L. Cameron, C. J. Yeo, M. K. Halushka, J. R. Eshleman, M. Raben, A. P. Klein, R. H. Hruban, M. Hidalgo and D. Laheru (2009). "DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer." *J Clin Oncol* 27(11): 1806-1813.

Ikeda, F. and I. Dikic (2006). "CYLD in ubiquitin signaling and tumor pathogenesis." *Cell* 125(4): 643-645.

Jackisch, R., A. Kruchen, W. Sauermann, G. Hertting and T. J. Feuerstein (1994). "The antiparkinsonian drugs budipine and biperiden are use-dependent (uncompetitive) NMDA receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* 264(2): 207-211.

Jono, H., J. H. Lim, L. F. Chen, H. Xu, E. Trompouki, Z. K. Pan, G. Mosialos and J. D. Li (2004). "NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway." *J Biol Chem* 279(35): 36171-36174.

Kalinina, T., C. Gungor, S. Thieltges, M. Moller-Krull, E. M. Penas, D. Wicklein, T. Streichert, U. Schumacher, V. Kalinin, R. Simon, B. Otto, J. Dierlamm, H. Schwarzenbach, K. E. Effenberger, M. Bockhorn, J. R. Izbicki and E. F. Yekebas (2010). "Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung." *BMC Cancer* 10: 295.

Kawadler, H., M. A. Gantz, J. L. Riley and X. Yang (2008). "The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation." *Mol Cell* 31(3): 415-421.

Klein, W. M., R. H. Hruban, A. J. Klein-Szanto and R. E. Wilentz (2002). "Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression." *Mod Pathol* 15(4): 441-447.

Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux and H. G. Khorana (1971). "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." *J Mol Biol* 56(2): 341-361.

Klinkenberg, I., A. Blokland, W. Riedel and A. Sambeth (2012). "Human electrophysiological correlates of learned irrelevance: effects of the muscarinic M1 antagonist biperiden." *Int J Neuropsychopharmacol* 15(10): 1375-1385.

Kovalenko, A., C. Chable-Bessia, G. Cantarella, A. Israel, D. Wallach and G. Courtois (2003). "The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination." *Nature* 424(6950): 801-805.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.

Luttges, J. and G. Kloppel (2000). "Precancerous conditions of pancreatic carcinoma." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7(6): 568-574.

Mao, C., D. R. Domenico, K. Kim, D. J. Hanson and J. M. Howard (1995). "Observations on the developmental patterns and the consequences of pancreatic exocrine adenocarcinoma. Findings of 154 autopsies." *Arch Surg* 130(2): 125-134.

Massoumi, R., K. Chmielarska, K. Hennecke, A. Pfeifer and R. Fassler (2006). "Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling." *Cell* 125(4): 665-677.

Melisi, D. and P. J. Chiao (2007). "NF-kappa B as a target for cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* 11(2): 133-144.

Molina, V., L. Visa, C. Conill, S. Navarro, J. M. Escudero, J. M. Auge, X. Filella, M. A. Lopez-Boado, J. Ferrer, L. Fernandez-Cruz and R. Molina (2012). "CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer." *Tumour Biol* 33(3): 799-807.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

Nagel, D. and D. Krappmann (2013). "Measurement of Endogenous MALT1 Activity." *Bio-protocol* 3 (14): e821.

Nagel, D., S. Spranger, M. Vincendeau, M. Grau, S. Raffegerst, B. Kloo, D. Hlahla, M. Neuenschwander, J. Peter von Kries, K. Hadian, B. Dorken, P. Lenz, G. Lenz, D. J. Schendel and D. Krappmann (2012). "Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL." *Cancer Cell* 22(6): 825-837.

Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik and et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* 376(6535): 37-43.

Oeckinghaus, A., E. Wegener, V. Welteke, U. Ferch, S. C. Arslan, J. Ruland, C. Scheiderei and D. Krappmann (2007). "Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation." *EMBO J* 26(22): 4634-4645.

Ouyang, H., L. Mou, C. Luk, N. Liu, J. Karaskova, J. Squire and M. S. Tsao (2000). "Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype." *Am J Pathol* 157(5): 1623-1631.

Ozcelik, H., B. Schmocker, N. Di Nicola, X. H. Shi, B. Langer, M. Moore, B. R. Taylor, S. A. Narod, G. Darlington, I. L. Andrulis, S. Gallinger and M. Redston (1997). "Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients." *Nat Genet* 16(1): 17-18.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* 18(49): 6853-6866.

Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg and T. Maniatis (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." *Cell* 78(5): 773-785.

Perkins, N. D. (2012). "The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer." *Nat Rev Cancer* 12(2): 121-132.

Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3116-3120.

Rieder, H. and D. K. Bartsch (2004). "Familial pancreatic cancer." *Fam Cancer* 3(1): 69-74.

Robert Koch Institut (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 10. Ausgabe.

Rosebeck, S., L. Madden, X. Jin, S. Gu, I. J. Apel, A. Appert, R. A. Hamoudi, H. Noels, X. Sagaert, P. Van Loo, M. Baens, M. Q. Du, P. C. Lucas and L. M. McAllister-Lucas (2011). "Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation." *Science* 331(6016): 468-472.

Ruefli-Brasse, A. A., D. M. French and V. M. Dixit (2003). "Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase." *Science* 302(5650): 1581-1584.

Ruland, J., G. S. Duncan, A. Elia, I. del Barco Barrantes, L. Nguyen, S. Plyte, D. G. Millar, D. Bouchard, A. Wakeham, P. S. Ohashi and T. W. Mak (2001). "Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure." *Cell* 104(1): 33-42.

Sadler, T. W. (2003). *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Scheidereit, C. (2006). "IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription." *Oncogene* 25(51): 6685-6705.

- Schünke, M., E. Schulte and U. Schumacher (2009). *Prometheus: Lernatlas der Anatomie-Innere Organe*. Stuttgart, Georg Thieme Verlage.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun and M. Karin (2001). "Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway." *Science* 293(5534): 1495-1499.
- Shah, N., S. Khurana, K. Cheng and J. P. Raufman (2009). "Muscarinic receptors and ligands in cancer." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(2): C221-232.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Staal, J., T. Bekaert and R. Beyaert (2011a). "Regulation of NF-kappaB signaling by caspases and MALT1 paracaspase." *Cell Res* 21(1): 40-54.
- Staal, J., Y. Driège, T. Bekaert, A. Demeyer, D. Muylleert, P. Van Damme, K. Gevaert and R. Beyaert (2011b). "T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1." *EMBO J* 30(9): 1742-1752.
- Takiuchi, D., H. Eguchi, H. Nagano, Y. Iwagami, Y. Tomimaru, H. Wada, K. Kawamoto, S. Kobayashi, S. Marubashi, M. Tanemura, M. Mori and Y. Doki (2013). "Involvement of microRNA-181b in the gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells." *Pancreatology* 13(5): 517-523.
- Takuma, K., T. Kamisawa, S. Hara, T. Tabata, S. Kuruma, K. Chiba, G. Kuwata, T. Fujiwara, H. Egashira, K. Koizumi, J. Fujiwara, T. Arakawa, K. Momma and Y. Igarashi (2012). "Etiology of recurrent acute pancreatitis, with special emphasis on pancreaticobiliary malformation." *Adv Med Sci* 57(2): 244-250.
- Tando, Y., M. Yanagimachi, Y. Matsushashi, T. Nakamura and T. Kamisawa (2010). "A brief outline of the history of the pancreatic anatomy." *Dig Surg* 27(2): 84-86.
- Tersmette, A. C., G. M. Petersen, G. J. Offerhaus, F. C. Falatko, K. A. Brune, M. Goggins, E. Rozenblum, R. E. Wilentz, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern and R. H. Hruban (2001). "Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* 7(3): 738-744.
- Thome, M. (2004). "CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation." *Nat Rev Immunol* 4(5): 348-359.
- Thompson, D., D. F. Easton and C. Breast Cancer Linkage (2002). "Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers." *J Natl Cancer Inst* 94(18): 1358-1365.

Tiselius, A. (1937). "Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera." *Biochem J* 31(9): 1464-1477.

Trompouki, E., E. Hatzivassiliou, T. Tsihritzis, H. Farmer, A. Ashworth and G. Mosialos (2003). "CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members." *Nature* 424(6950): 793-796.

Uren, A. G., K. O'Rourke, L. A. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." *Mol Cell* 6(4): 961-967.

van der Gaag, N. A., E. A. Rauws, C. H. van Eijck, M. J. Bruno, E. van der Harst, F. J. Kubben, J. J. Gerritsen, J. W. Greve, M. F. Gerhards, I. H. de Hingh, J. H. Klinkenbijn, C. Y. Nio, S. M. de Castro, O. R. Busch, T. M. van Gulik, P. M. Bossuyt and D. J. Gouma (2010). "Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas." *N Engl J Med* 362(2): 129-137.

Vercammen, D., W. Declercq, P. Vandenabeele and F. Van Breusegem (2007). "Are metacaspases caspases?" *J Cell Biol* 179(3): 375-380.

Wang, C. Y., M. W. Mayo and A. S. Baldwin, Jr. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." *Science* 274(5288): 784-787.

Weber, K. and M. Osborn (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 244(16): 4406-4412.

Wiesmann, C., L. Leder, J. Blank, A. Bernardi, S. Melkko, A. Decock, A. D'Arcy, F. Villard, P. Erbel, N. Hughes, F. Freuler, R. Nikolay, J. Alves, F. Bornancin and M. Ratus (2012). "Structural determinants of MALT1 protease activity." *J Mol Biol* 419(1-2): 4-21.

Wilentz, R. E. and R. H. Hruban (1998). *Pathology of cancer of the pancreas*.

Winter, J. M., A. Maitra and C. J. Yeo (2006). "Genetics and pathology of pancreatic cancer." *HPB (Oxford)* 8(5): 324-336.

Wittekind, C. (2017). *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Weinheim, Christian Wittekind.

Wu, C. J., D. B. Conze, T. Li, S. M. Srinivasula and J. D. Ashwell (2006). "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." *Nat Cell Biol* 8(4): 398-406.

Xiao, G., E. W. Harhaj and S. C. Sun (2001). "NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100." *Mol Cell* 7(2): 401-409.

Yu, H., H. Xia, Q. Tang, H. Xu, G. Wei, Y. Chen, X. Dai, Q. Gong and F. Bi (2017). "Acetylcholine acts through M3 muscarinic receptor to activate the EGFR signaling and promotes gastric cancer cell proliferation." *Sci Rep* 7: 40802.

Yu, J. W., P. D. Jeffrey, J. Y. Ha, X. Yang and Y. Shi (2011). "Crystal structure of the mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1 (MALT1) paracaspase region." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(52): 21004-21009.

12. Danksagung

Nach mehreren Jahren intensiver Arbeit ist die Dissertation nun abgeschlossen. Damit liegt eine Zeit voller Höhen und Tiefen, gespannter Freude und Zweifel hinter mir und es ist an der Zeit den Menschen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich hier meinen Betreuer Herrn PD Dr. med. Daniel Perez und Dr. med. Alexander T. El - Gammal nennen. Sie haben mein Wirken und Forschen im Labor der Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie initiiert und somit das Verfassen einer eigenbestimmten Dissertation ermöglicht.

Darüber hinaus möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. h. c. Jakob R. Izbicki und Dr. rer. nat. Cenap Güngör als wissenschaftlicher Leiter des Labors danken.

Während diesem Prozess standen mir vor allem Herr Dr. rer. nat. Gerrit Wolters - Eisfeld und Frau Dr. rer. nat. Astrid Drenckhan mit Rat und Tat zur Seite und haben mich mit ihren Anregungen konstruktiv unterstützt. Ohne diese zwei Menschen wäre das Erstellen der vorliegenden Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich Henrike Friedenberger als stetige Diskussionspartnerin danken. Ihre bereichernden Tipps und anregende Diskussionspunkte haben meine Arbeit wiederholt in spannende Bahnen gelenkt und neue Fragestellungen aufgeworfen. Nicht unerwähnt darf die Hilfe und technische Assistenz durch Antje Heinecke und Petra Merkert bleiben, die bei Fragen zur experimentellen Durchführung immer mit einer helfenden Hand zur Stelle waren.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die mich in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank.

Dennoch liegt mit dem Abschließen der Dissertation eine spannende Zeit hinter mir, die die ich nur partiell als abgeschlossen ansehen. Weiterhin sind noch viele interessante und wichtige Fragestellungen unbeantwortet, die es zu untersuchen gilt.

13. Lebenslauf

entfällt aus Datenschutzgründen

14. Erklärung des Eigenanteils

Im Rahmen der Dissertation umfasste mein Eigenanteil zum einen die Aufstellung der Arbeitshypothese, Literaturrecherche und Versuchsplanungen, wie auch die Etablierung, Durchführung und Interpretation folgender experimenteller Arbeiten: Zytologische und molekularbiologische Versuche und Datenerhebung auf Gen- und Proteinebene mittels qRT-PCR, Western Blot, Immunpräzipitation und Fluoreszenzzytochemie. Die dafür erforderliche Isolierung von Proteinen und RNA erfolgte ebenfalls durch mich. Weiter wurden MTT - Proliferationsassays, Apoptose Assays und MALT1-Aktivitätsassay mit Pankreaskarzinomzellen von mir durchgeführt und bewertet.

Die Etablierung des MALT1-Aktivitätsassays in unserem Labor erfolgte dabei durch mich. Abschließend war ich an der Ausarbeitung und Verschriftlichung des zugehörigen papers maßgeblich beteiligt.

Die folgenden, zu Diskussionszwecken einbezogenen Daten wurden durch Dritte erhoben: TMA-Färbung und –Auswertung, Proteinbindungsstudie, c-Rel Translokation, in vivo - Mausversuche, sowie die statistische Auswertung.

15. Eidesstattliche Versicherung

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.

Hamburg 2018