

Identifikation und Charakterisierung niedermolekularer MALT1 Inhibitoren zur Therapie von ABC-DLBCL

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Daniel Nagel

München, 11.04.2013

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Molekulare Toxikologie und Pharmakologie
Abteilung Zelluläre Signalintegration

- 1. Gutachter: PD Dr. Daniel Krappmann**
 - 2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Boshart**
- Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2014**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das adaptive Immunsystem.....	1
1.1.1 Antigen-vermittelte Lymphozytenaktivierung im Zuge der adaptiven Immunantwort	1
1.1.1.1 T-Zell Aktivierung.....	2
1.1.1.1.1 Der T-Zell Rezeptor (TCR).....	2
1.1.1.1.2 Die Korezeptoren CD4 und CD8.....	2
1.1.1.1.3 Kostimulatorische Signale der T-Zell Aktivierung	2
1.1.1.1.4 Proximale Signale der T-Zell Aktivierung	3
1.1.1.2 Aktivierung des B-Zell Rezeptors (BCR).....	4
1.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB.....	5
1.2.1 Die NF-κB und IKK Proteinfamilie.....	5
1.2.2 Mechanismen der NF-κB Aktivierung und NF-κB Zielgene	6
1.2.2.1 Aktivierung von NF-κB über den klassischen Signalweg	7
1.2.2.2 Aktivierung von NF-κB über den alternativen Signalweg	7
1.2.2.3 Integration des CBM-Komplexes in den Antigen-induzierten klassischen NF-κB Signalweg.....	8
1.2.2.3.1 Aufbau des CBM-Komplexes.....	8
1.2.2.3.2 Modell der CBM-vermittelten IKK-Aktivierung	10
1.3 Die proteolytische Aktivität von MALT1	12
1.3.1 MALT1 Proteinstruktur.....	12
1.3.2 Einfluss der MALT1 Protease auf die Lymphozytenaktivierung.....	14
1.3.2.1 MALT1 Proteinsubstrate	15
1.3.2.1 Einfluss von MALT1 auf die Caspase 8-vermittelte Lymphozytenaktivierung	17
1.3.3 Funktion von MALT1 in weiteren Signalprozessen	18
1.4 Deregulierte Funktion des CBM-Komplexes in B-Zell Lymphomen	20
1.4.1 DLBCL.....	21
1.4.1.1 Klassifizierung von DLBCL durch Genexpressionsanalysen	21
1.4.1.2 Pathogenese und molekulare Ursachen von ABC-DLBCL.....	22
1.4.2 MALT Lymphome	25
1.4.3 Funktion der MALT1 Paracaspase für die Pathogenese von ABC-DLBCL und MALT Lymphomen	27
1.5 Zielsetzung	30

2 Material und Methoden.....	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Geräte und Zubehör	31
2.1.2 Chemikalien.....	32
2.1.3 Pharmakologische Inhibitoren und Peptide.....	34
2.1.4 Enzyme und Kits	34
2.1.5 Puffer und Lösungen	35
2.1.6 Zellkulturmedien und -zusätze.....	37
2.1.7 Escherichia coli Stämme	37
2.1.8 Eukaryotische Zelllinien.....	37
2.1.8.1 B-Zelllinien.....	37
2.1.8.1.1 ABC-DLBCL (activated b-cell like diffuse large b-cell lymphoma)	37
2.1.8.1.2 GCB-DLBCL (germinal center b-cell like diffuse large b-cell lymphoma).....	37
2.1.8.2 T-Zelllinien.....	38
2.1.9 Plasmide	38
2.1.10 Oligonukleotide.....	38
2.1.10.1 Primer der quantitativen Real-time RT-PCR	38
2.1.10.2 siRNA	38
2.1.10.3 EMSA Sonde	38
2.1.11 Antikörper.....	39
2.1.11.1 Primärantikörper	39
2.1.11.2 Sekundärantikörper	39
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Zellbiologische Methoden	39
2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	39
2.2.1.2 Aufreinigung und Kultivierung von primären humanen und murinen Zellen.....	40
2.2.1.3 Transfektion, Stimulation und Inkubation mit Inhibitoren	41
2.2.1.4 Lentivirale Transduktion von ABC-DLBCL Zellen.....	41
2.2.1.5 Analyse der Zellvitalität und Apoptose	42
2.2.1.6 Praktisches ABC-DLBCL Tumormodell	42
2.2.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden	43
2.2.2.1 SDS-PAGE	43
2.2.2.2 Immundetektion von Proteinen per Western Blot	43
2.2.2.3 Koimmunpräzipitation (CoIP)	44
2.2.2.4 ELISA	44
2.2.2.5 EMSA	45

2.2.2.6 Rekombinantes und endogenes Spaltungsexperiment	46
2.2.2.7 Hochdurchsatz Wirkstoffscreening.....	47
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	48
2.2.3.1 DNA-Klonierung.....	48
2.2.3.1.1 Amplifikation und Mutagenese von DNA über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
2.2.3.1.2 Restriktionsverdau, Aufreinigung und Ligation von DNA.....	49
2.2.3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> und Plasmidpräparation.....	49
2.2.3.2 Quantitative real-time RT-PCR	49
2.2.3.3 Genexpressionsanalyse	50
2.2.3.4 RNA Interferenz in Jurkat T-Zellen.....	51
3 Ergebnisse	52
3.1 Analyse der proteolytischen MALT1 Aktivität	52
3.1.1 Messung der zellulären MALT1 Aktivität.....	52
3.1.1.1 Induzierbare MALT1 Aktivität in T-Zellen	52
3.1.1.2 Konstitutive MALT1 Aktivität in ABC-DLBCL Zellen	54
3.1.2 Aktivitätsanalyse von MALT1 nach Überexpression in Jurkat T-Zellen	55
3.1.2.1 Die Ig3 Domäne ist kritisch für die Paracaspase Aktivität	55
3.1.2.2 MALT1 Ubiquitinierung beeinflusst die Paracaspase Aktivität.....	58
3.1.2.3 Dimerisierung der MALT1 Paracaspase Domäne ist entscheidend für die proteolytische Aktivität.....	59
3.1.3 Messung der proteolytischen Aktivität von rekombinantem MALT1	60
3.1.3.1 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von MALT1	62
3.2 Identifikation von niedermolekularen MALT1 Hemmstoffen.....	64
3.2.1 Identifikation von Phenothiazin Derivaten (PD) als MALT1 Hemmstoffe durch Screening einer Wirkstoffbibliothek	64
3.2.2 Wirkprofil und -mechanismus der identifizierten Phenothiazin Derivate (PD)	68
3.3 Untersuchung der Auswirkung von PD auf die T-Zell Aktivierung.....	70
3.3.1 PD Behandlung von Jurkat T-Zellen führte zur Erniedrigung der zellulären MALT1 Aktivität	71
3.3.2 Verminderte T-Zell Aktivierung durch Mepazin und Thioridazin	73
3.4 Untersuchung der Auswirkung von PD auf ABC-DLBCL Tumorzellen	77
3.4.1 Konstitutive MALT1 Aktivität von ABC-DLBCL Zellen wird durch Mepazin, Thioridazin und Promazin inhibiert	77
3.4.2 Hemmung der NF-κB Aktivität und Zielgenexpression durch PD in ABC-DLBCL Zelllinien.....	80

3.4.3 Mepazin, Thioridazin und Promazin sind selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zellen	82
3.4.4 Mepazin und Thioridazin verringern das Wachstum von ABC-DLBCL <i>in vivo</i>	86
4 Diskussion	89
4.1 Die MALT1 Paracaspase als Ziel der Lymphomtherapie	89
4.2 Mechanistische und funktionelle Homologien zwischen MALT1 und pflanzlichen Metacaspasen	91
4.3 Untersuchung MALT1-aktivierender Einflüsse.....	93
4.4 Mechanismus der MALT1 Inhibition durch PD.....	94
4.5 Potentielle <i>off-target</i> Effekte von Thioridazin auf ABC-DLBCL Zelllinien	96
4.6 Einschätzung des pharmazeutischen <i>in vivo</i> Potentials der Phenothiazine	97
4.6.1 Herkunft und Wirkung der PD Mepazin, Thioridazin und Promazin.....	97
4.6.2 PK von Thioridazin deutet ein effizientes therapeutisches Potential der PD an.....	98
4.6.3 Vergleich der PD mit anderen therapeutischen ABC-DLBCL Inhibitoren	99
4.7 Ausblick	102
5 Zusammenfassung	104
6 Abkürzungsverzeichnis	106
7 Referenzen	108
8 Anhang	124
8.1 Chemische Strukturen der getesteten PD.....	124
Publikationen.....	126
Danksagung.....	127
Erklärung	128

1 Einleitung

1.1 Das adaptive Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere gliedert sich in zwei Teilbereiche. Das phylogenetisch sehr alte angeborene Immunsystem dient der zügigen unspezifischen Abwehr von Infektionserregern und bildet damit eine primäre Verteidigungslinie des Körpers. Es verändert sich nicht im Laufe des Lebens und wird in erster Linie von Phagozyten und Effektormolekülen gebildet. Die adaptive Immunabwehr entstand evolutionsgeschichtlich später und zeichnet sich durch eine verzögerte Immunreaktion mit hoher Spezifität und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus (Boehm, 2012; Cooper & Alder, 2006). Von zentraler Bedeutung für beide Prozesse ist die Antigen-vermittelte Aktivierung von Lymphozyten. Lymphozyten kommen in zwei Haupttypen vor: B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen, und T-Lymphozyten, die ihre Reifung im Thymus erfahren. Lymphozyten können eine große Zahl von Antigenen unterscheiden, wodurch die Anpassung an spezielle Umweltbedingungen ermöglicht wird. Jeder Lymphozyt besitzt dazu Antigenrezeptoren mit einer individuellen Spezifität, so dass das gesamte Antigenrepertoire des Menschen etwa 10^9 Antigene betragen kann. Ein wichtiger Prozess der adaptiven Immunabwehr ist die klonale Selektion: Die spezifische Aktivierung der T- (TCR) oder B-Zell (BCR) Antigenrezeptoren führt zur Aktivierung, Reifung, Differenzierung und klonalen Proliferation der Lymphozyten zu Effektorzellen. T-Zellen reifen dabei zu T-Helfer Zellen (Th-Zellen), die Immunreaktionen regulieren und Entzündungsreaktionen verstärken sowie zytotoxischen T-Zellen, die veränderte und infizierte Zellen töten. B-Zellen entwickeln sich in erster Linie zu Plasmazellen, die Antigen-spezifische Antikörper sezernieren. Ein Teil der aktivierten Lymphozyten wandelt sich zudem in langlebige Gedächtniszellen um, die bei wiederholtem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen eine zügige Immunreaktion einleiten können (Litman et al, 2010; Pancer & Cooper, 2006).

1.1.1 Antigen-vermittelte Lymphozytenaktivierung im Zuge der adaptiven Immunantwort

Die Antigen-vermittelte Aktivierung des TCR oder BCR im Rahmen der adaptiven Immunantwort löst eine Reihe von proximalen Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen an intrazellulären Rezeptoruntereinheiten, Signaladaptoren und Kinasen aus. Dieser Aktivierungsprozess initiiert eine Reihe nachgeschalteter Signalwege, die Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP-1 und NF-κB aktivieren. Diese bewirken in Folge eine Modulation der zellulären Genexpression um die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der Lymphozyten zu steuern. Die Induktion des TCR bewirkt dabei vorrangig die

Sekretion von proliferationsfördernden Zytokinen sowie die Produktion anti-apoptotischer Faktoren. Ein für die Immunreaktion der T-Zelle herausragendes Zytokin ist Interleukin 2 (IL-2), das in erster Linie die autokrine Proliferation von T-Effektorzellen stimuliert. Die Aktivierung des BCR leitet dagegen die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle ein (Weil & Israel, 2004).

1.1.1.1 T-Zell Aktivierung

1.1.1.1 Der T-Zell Rezeptor (TCR)

Der Antigenrezeptor von Th-Zellen und zytotoxischen T-Zellen ist ein Heterodimer aus zwei Transmembranproteinen α und β , die über eine Disulfidbrücke konjugiert sind. An dieses assoziieren CD3 und ζ Proteine, die intrazelluläre ITAM Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) besitzen. Distinkte Tyrosine der ITAMs werden nach Antigenbindung des Rezeptors phosphoryliert, wodurch eine intrazelluläre Signalweiterleitung induziert wird. Im Gegensatz zu B-Zellen können T-Zellen Antigene nur erkennen, wenn sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) über Bindung an ein sogenanntes MHC (*major histocompatibility complex*) Molekül präsentiert werden (Abbildung 1.1 A) (Pitcher & van Oers, 2003).

1.1.1.2 Die Korezeptoren CD4 und CD8

Die spezifische Erkennung von MHC Proteinen wird durch die Korezeptoren CD4 und CD8 auf Th-Zellen bzw. zytotoxischen T-Zellen ermöglicht. CD4 bindet spezifisch an MHC Klasse II Proteinen auf APCs, CD8 an MHC Klasse I Proteinen, die auf allen humanen Zelltypen exprimiert werden. Nach Bindung der T-Zelle an Antigen-MHC-Komplexe vermitteln CD4 oder CD8 zusätzliche kostimulatorische Signale zur Induktion der T-Zell Immunantwort über die Src Kinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*). Diese ist kovalent an beiden Molekülen verknüpft und wird nach Antigenbindung des Rezeptors in die Nähe der ITAM Motive des TCR rekrutiert, worauf die Phosphorylierung der Tyrosine und die Initiierung der Signaltransduktion erfolgt (Kim et al, 2003).

1.1.1.3 Kostimulatorische Signale der T-Zell Aktivierung

T- und auch B-Lymphozyten brauchen grundsätzlich zwei unterschiedliche Signale um ihre Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen zu initiieren. In T-Zellen stellt die Antigenbindung des TCR das erste wichtige Signal zur Aktivierung der Zelle dar. Daneben tragen kostimulatorische Signale des CD28 Oberflächenproteins ebenfalls zur Induktion und Verstärkung der T-Zell Immunantwort bei. Das Immunglobulin-verwandte CD28 erkennt

spezifisch B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) Proteine, die auf dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen exprimiert werden, wodurch gewährleistet wird, dass T-Zellen nur auf MHC-präsentierte Antigene reagieren (Greenwald, Freeman & Sharp, 2005). Nach Aktivierung wird CD28 phosphoryliert und die Rekrutierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelt. Nach PI3K Autophosphorylierung wird nachfolgend die Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) aktiviert, die seinerseits mehrere Ziele, darunter PKC θ an Thr538 und Proteinkinase B (PKB), phosphoryliert. Über PKB wird eine Signalkaskade eingeleitet, die letztlich zur Regulation der Zellproliferation, des Überlebens, des Zellmetabolismus und im speziellen der IL-2 Transkription beiträgt (Boomer & Green, 2010; Lee et al, 2005; Park et al, 2009).

Ist ausschließlich das vom TCR ausgehende Signal vorhanden, bleibt die T-Zelle inaktiv und reagiert mit einem auto-inhibitorischen Mechanismus, der als „T-Zell Anergie“ bezeichnet wird. In diesem permanenten Zustand ist eine Antigen-induzierte Reaktivierung der Zelle nicht mehr möglich, womit B7/CD28-unabhängiges autoreaktives Angreifen von körpereigenem Gewebe verhindert wird (Schwartz, 2003).

1.1.1.4 Proximale Signale der T-Zell Aktivierung

Nach TCR/CD28 Kostimulation wird ein Proteinkomplex an der Kontaktstelle der T- und der Antigenpräsentierenden Zelle ausgebildet. Diese Kontaktstelle wird als immunologische Synapse und der Abschnitt der involvierten T-Zell Membran aufgrund des hohen Gehalts an Cholesterol und Glykosphingolipiden auch als „Lipid Raft“ bezeichnet. Während einige Signalmoleküle wie Lck und LAT bereits konstitutiv mit dieser Membranstruktur assoziiert sind, wird ein Großteil der Signalmoleküle erst nach Aktivierung des Rezeptors rekrutiert (Bromley et al, 2001; Zech et al, 2009). Eines der frühen Schlüsselereignisse bei der TCR Aktivierung involviert das ZAP-70 Protein (*zeta-chain-associated protein 70*). Diese Tyrosinkinase der Syk (*spleen tyrosine kinase*) Familie bindet an phosphorylierte Tyrosine der intrazellulären ITAM Motive der CD3 und ζ Proteine und vermittelt die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung der Adapterproteine LAT (*linker for activation of T cells*) und SLP-76 (*SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa*) (Abbildung 1.1 A). Diese Faktoren rekrutieren in Folge verschiedene Adapterproteine, darunter Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), GADS (*Grb2-related adapter protein*) und den GTP/GDP Austauschfaktor Sos, wodurch der Ras-MAPK-JNK (*c-jun n-terminal kinase*) Signalweg angesteuert wird. Nach Rekrutierung der Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) wird diese aktiviert und hydrolisiert anschließend das Membran-assoziierte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu den beiden Signalfaktoren IP3 (*inositol 1,4,5 trisphosphate*) und Diacylglycerol (DAG). IP3 Bindung an Rezeptoren des endplasmatischen Reticulums führt zur Ca $^{2+}$ Freisetzung in das

Zytoplasma, wodurch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. Diese dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, was zu dessen Translokation in den Zellkern und einer transkriptionellen Aktivierung der NFAT-Zielgenexpression führt (Ohhora, 2009). Durch die Bindung von DAG wird die Proteinkinase C (PKC θ) aktiviert und in die immunologische Synapse rekrutiert, wo sie die Aktivierung des CBM-vermittelten NF- κ B Signalweges einleitet (Weil & Israel, 2004).

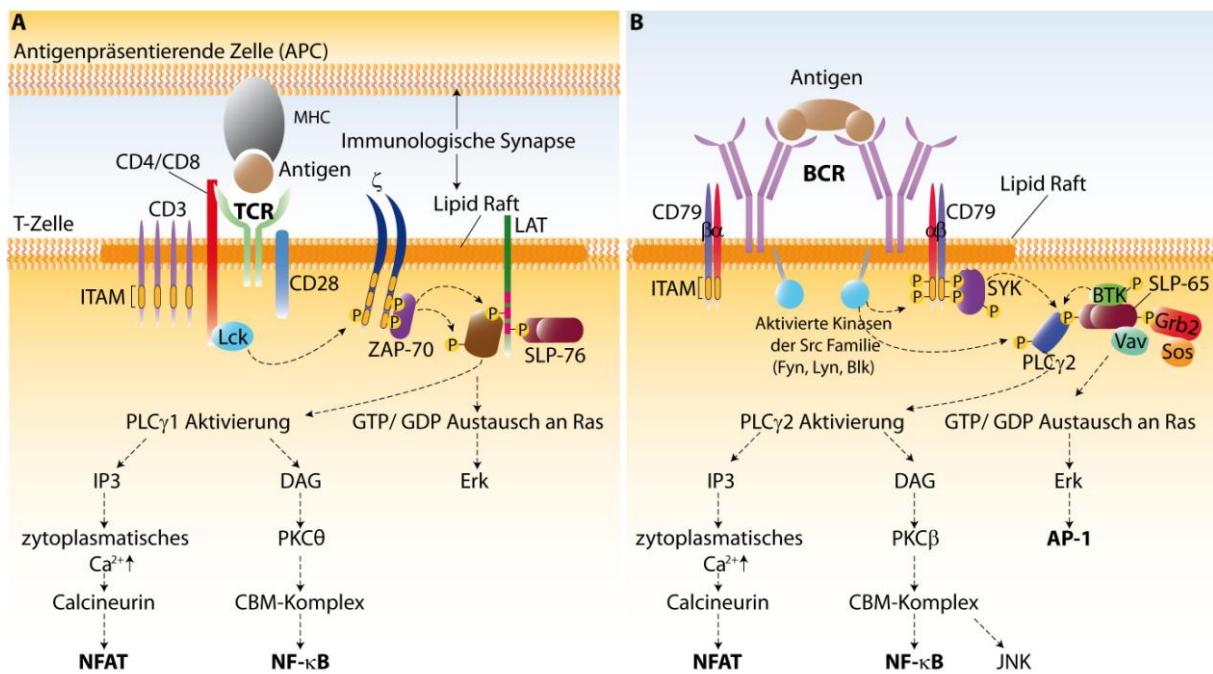


Abbildung 1.1: Antigen-vermittelte Aktivierung des TCR (A) und BCR (B)

Eine Beschreibung der Vorgänge findet sich im Haupttext.

1.1.1.2 Aktivierung des B-Zell Rezeptors (BCR)

Die Aktivierung des BCR soll in erster Linie die Differenzierung der Zelle zu Antikörper produzierenden Plasmazellen induzieren. Der BCR besteht aus einem in der Membran verankerten IgM oder IgD Immunoglobulin assoziiert an zwei invariante Ig α (CD79A) und β (CD79B) Moleküle, die ITAM Motive in ihren zytoplasmatischen Proteinregionen enthalten (Abbildung 1.1 B). Die Antigen-vermittelte Proximität der in der Membran verankerten Ig-Moleküle induziert die Phosphorylierung der in den ITAMs enthaltenen Tyrosine durch membranverankerte Kinäsen der Src Kinasefamilie (Lyn, Fyn oder Blk). Dies induziert alle weiteren Ereignisse des Signalweges, indem das Phosphotyrosin als Bindungstelle für die SH2 (*tandem Src homology 2*) Domäne der Tyrosinkinase Syk dient. Syk wird als Folge der Bindung aktiviert und induziert die Phosphorylierung des SLP-65 Adapterproteins, welches anschließend als Plattform für die Rekrutierung weiterer Signalproteine mit SH2 Domänen, darunter Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2), BTK (*bruton's tyrosine kinase*), der Guanin-

Austauschfaktor Vav und das Grb2 Adapterprotein, dient. Ähnlich wie bei der T-Zell Aktivierung werden auf diese Weise NFAT, MAPK, PI3K, Ras/AP-1 und NF-κB Signalwege angesteuert, die zur Proliferation, Differenzierung und Überlebensfähigkeit der Zelle von hoher Bedeutung sind (Dal Porto et al, 2004; Geahlen, 2009; Lopes-Carvalho & Kearney, 2004; Weil & Israel, 2004).

1.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Die NF-κB (*nuclear factor-κB*) Proteininfamilie ist eine bedeutende Klasse von Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression in zahlreichen biologischen Prozessen regulieren (Ghosh & Hayden, 2008). Die NF-κB Aktivität spielt vor allem im Rahmen der adaptiven und angeborenen Immunantwort sowie bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und dem programmierten Zelltod (Hayden et al, 2006). Aufgrund der vielfältigen zellbiologischen Funktionen steht eine deregulierte NF-κB Aktivität häufig in Verbindung mit chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Immundefizienz und der Karzinogenese (Ghosh & Hayden, 2008). Die Aktivierung von NF-κB ist ein komplexer biologischer Prozess, der über zahlreiche unabhängige Signalwege reguliert wird. Gemeinsames Kennzeichen der NF-κB Signaltransduktion ist die post-translationelle Modifikation NF-κB-vorgesetzter Signalproteine. Hierbei ist die Aktivierung zahlreicher Prozesse durch Phosphorylierung distinkter Serin oder Threonin Aminosäuren von hoher Bedeutung. Des Weiteren hat die Modifikation mit K63-verknüpften und linearen Polyubiquitinketten eine hohe Bedeutung für die Rekrutierung von nachgeschalteten Signalproteinen (Iwai, 2012; Vallabhapurapu & Karin, 2009).

1.2.1 Die NF-κB und IKK Proteininfamilie

Es existieren 12 NF-κB Homo- und Heterodimere, die aus den 5 Untereinheiten p50, p52, RelA/p65, RelB und c-Rel gebildet werden und unterschiedliche, aber auch teils redundante Funktionen bei der Genregulation besitzen (Abb. 1.2 A). NF-κB Proteine besitzen eine gemeinsame DNA-Bindungsdomäne, welche hochkonserviert ist und als „Rel-Homologie Domäne (RHD)“ bezeichnet wird. Neben der DNA-Bindung ist sie zudem für die Dimerisierung, nukleäre Lokalisierung sowie Bindung von IκB verantwortlich (Baeuerle & Henkel, 1994; Chen & Ghosh, 1999). P65, c-Rel und RelB besitzen eine Transkriptionsaktivierungs Domäne (TAD), die für die Aktivierung der Zielgenexpression bedeutend ist. In ruhenden Zellen wird das NF-κB Dimer im Zytoplasma durch Bindung an inhibitorische Proteine der IκB (Inhibitor of NF-κB) Familie in einem inaktiven Zustand sequestriert. Zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors ist der über Phosphorylierung und

Ubiquitinierung induzierte Abbau des I_KB Proteins notwendig. Dieser Prozess wird durch den zentralen I_KB-Kinase (IKK)-Komplex, an welchem zahlreiche Signale der klassischen NF-κB Signalwege konvergieren, eingeleitet (Ghosh & Hayden, 2008).

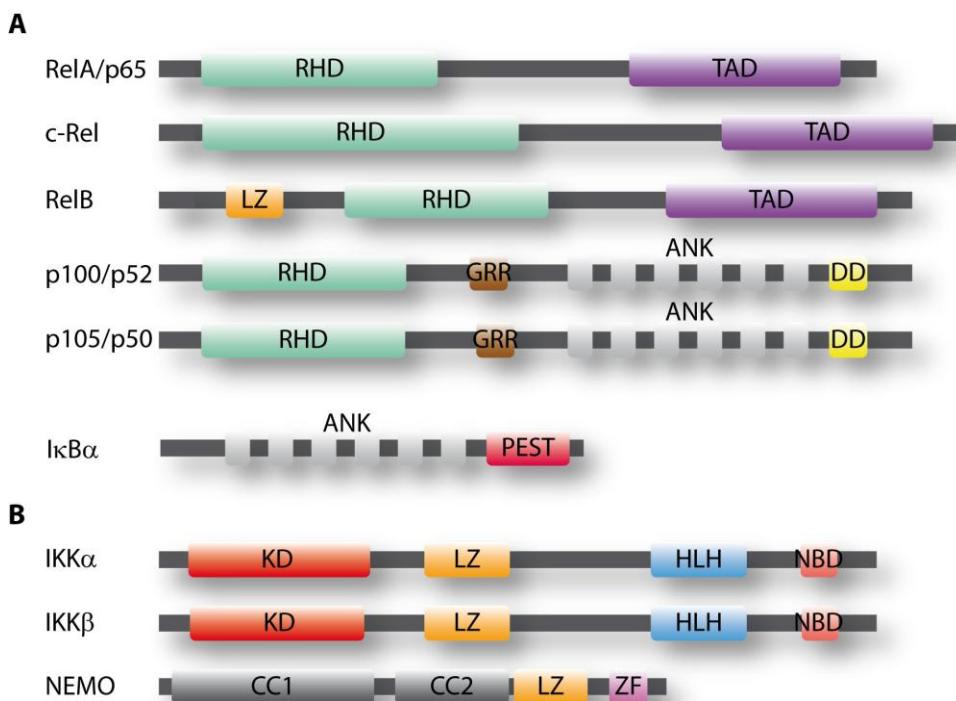


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über die NF-κB und IKK Proteinfamilie. (A) Proteindomänen der NF-κB Untereinheiten und IκBα. Die Transkriptionsaktivierenden NF-κB Untereinheiten RelA, c-Rel und RelB tragen im C-Terminus eine Transkriptionsaktivierungs Domäne (TAD). RHD = Rel-Homologie Domäne; LZ = leucin zipper; GRR = glycine-rich repeat ; ANK = ankyrin repeat; DD = death domain (B) Proteindomänen der IKK Proteine. Die katalytisch aktiven IKKα und IKKβ tragen im N-Terminus eine Kinase Domäne (KD). HLH = helix-loop-helix; NBD = NEMO binding domain; CC = coiled-coil; ZF = zinc finger.

Der IKK-Komplex besteht aus den katalytisch aktiven IKKα und β Proteinen sowie dem regulatorischen IKKγ [synonym: NF-κB essential modulator (NEMO)] Protein (Abb. 1.2 B). Aktive NF-κB Dimere translozieren anschließend in den Zellkern und binden dort an spezifische DNA-Bindungsstellen (sogenannte „κB-sites“) innerhalb des Promotors oder Enhancers ihrer Zielgene, wo sie die Gentranskription mit Hilfe von rekrutierten Koaktivatoren oder -repressoren regulieren (Hoffmann et al, 2006).

1.2.2 Mechanismen der NF-κB Aktivierung und NF-κB Zielgene

Zahlreiche Stimuli führen zur Aktivierung des NF-κB Signalweges: Im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors durch bakterielle oder virale Infektionen, durch inflammatorische Zytokine und zudem nach

Aktivierung von Antigenrezeptoren induziert (Ghosh & Hayden, 2008). Die Liganden-vermittelte Stimulation membranständiger Rezeptoren im Rahmen von Immunreaktionen erfolgt dabei entweder über den klassischen oder den alternativen Signalweg (Bonizzi & Karin, 2004; Hayden & Ghosh, 2004). Zusätzlich kann eine NF- κ B Aktivität auch durch physikalische (z.B. UV-Strahlung) oder chemische (z.B. oxidativer Stress) Reizvermittlung ausgelöst werden. Neben autoregulatorischen Faktoren wie I κ B α oder die NF- κ B Untereinheit p105 zählen auch pro-inflammatorische Moleküle (Zytokine, Chemokine, etc.), Faktoren der Immunantwort (Rezeptoruntereinheiten, MHC Moleküle, etc.) und Regulatoren der Apoptose (Mitglieder der anti-apoptotischen BCL Familie wie BCL_{XL} oder cIAPs, c-FLIP, etc.) und der Zellproliferation (Cycline, Wachstumsfaktoren, etc.) zu den Zielproteinen der NF- κ B-regulierten Genexpression (Ghosh & Hayden, 2008; Vallabhapurapu & Karin, 2009).

1.2.2.1 Aktivierung von NF- κ B über den klassischen Signalweg

Der klassische NF- κ B Signalweg wird im Kontext der Immunantwort durch inflammatorische Zytokine, Antigene und Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) induziert. Dabei werden zahlreiche Liganden-induzierte Rezeptoren angesteuert, darunter TCR/BCR, TNFR (*tumour necrosis factor receptor*), IL-1R/TLR (*toll-like receptors*), RANK (*receptor activator of NF- κ B*) und CD30. Die Aktivierung der Rezeptoren hat die Bindung und Modifikation nachgeschalteter Adapterproteine zur Folge, wodurch eine Reihe von Signalprozessen initiiert werden, die am IKK-Komplex konvergieren (Hacker & Karin, 2006). Der NF- κ B Inhibitor I κ B α (*inhibitor of NF- κ B*) wird durch das aktivierte IKK β des IKK-Komplexes an den Serinen 32 und 36 phosphoryliert, was zu SCF $^{\beta TRCP}$ -abhängiger K48-Polyubiquitinierung und proteasomaler Degradation von I κ B α führt. Vom inhibitorischen Bindungspartner gelöst, kann das NF- κ B Dimer in den Zellkern translozieren und die Zielgenexpression regulieren (Abbildung 1.4) (Ghosh & Hayden, 2008).

1.2.2.2 Aktivierung von NF- κ B über den alternativen Signalweg

Der alternative Signalweg wird nur von einer kleinen Gruppe von Rezeptoren angesteuert, darunter CD40, CD27, BAFF-R (*b-cell activating factor receptor*), TLR4 (*toll-like receptor 4*) und LT β R (*lymphotoxin beta receptor*) (Senftleben et al, 2001; Xiao et al, 2006). Ein zentrales Signalprotein des alternativen Signalweges ist die Kinase NIK (*NF- κ B inducing kinase*). In ruhenden Zellen verhindert der konstitutive Abbau von NIK, der von einem Komplex aus TRAF2 oder 3 und cIAP 1/2 vermittelt wird, die Aktivierung des alternativen Signalweges (Liao et al, 2004; Zarnegar et al, 2008). Nach Rezeptoraktivierung wird die Degradation von TRAF2 oder TRAF3 induziert, wodurch eine Stabilisierung von NIK

ermöglicht wird (Vallabhapurapu et al, 2008). NIK phosphoryliert anschließend IKK α , welches aktiviert wird und anschließend das NF- κ B Vorläuferprotein p100 (NF- κ B2) phosphoryliert. Als Folge wird p100 nach Ubiquitinierung in die aktive p52 NF- κ B Untereinheit prozessiert, die in den Zellkern transloziert und in Form eines p52/RelB Heterodimers die Zielgenexpression aktivieren kann (Gilmore, 2006).

1.2.2.3 Integration des CBM-Komplexes in den Antigen-induzierten klassischen NF- κ B Signalweg

1.2.2.3.1 Aufbau des CBM-Komplexes

Der CBM-Komplex verknüpft die vorgeschalteten Prozesse nach Antigen-vermittelter Stimulation des TCR oder BCR, die zur Aktivierung von PKC θ (in T-Zellen) bzw. β (in B-Zellen) führen, mit der Aktivierung des zentralen Signalkomplexes des klassischen NF- κ B Signalweges – dem IKK-Komplex. Er besteht neben den Adapterproteinen CARMA1 (*caspase recruitment domain containing MAGUK protein 1*; Synonym: CARD11), BCL10 (*B-cell lymphoma 10*) und MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1*) aus zusätzlichen Faktoren, die bei der Regulation der Assemblierung, der Stabilität, des funktionalen Mechanismus und des Zerfalls des Komplexes mitwirken (Abbildung 1.3). Das funktionale Zusammenspiel des CBM-Komplexes bei der Antigen-vermittelten Lymphozytenaktivierung wurde durch Deletionsstudien in Mäusen aufgedeckt. Eine Deletion von CARMA1, MALT1 oder BCL10 in Mäusen erzeugte einen ähnlichen Phänotyp: Die Deletion der Proteine resultierte aufgrund von Proliferations- und Funktionsdefekten der Lymphozyten in einer ausgeprägten Immundefizienz der Mäuse. Molekulare Ursache war die Blockade der Antigen-vermittelten NF- κ B Aktivierung. Anhand dieser Erkenntnisse konnte ein funktionelles Zusammenspiel der Faktoren bei der Antigen-vermittelten Signaltransduktion der IKK/NF- κ B-Achse nachgewiesen werden (Abbildung 1.4) (Egawa et al, 2003; Hara et al, 2003; Ruefli-Brasse et al, 2003; Ruland et al, 2001; Ruland et al, 2003; Xue et al, 2003).

CARMA1 ist ein Mitglied der MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) Proteinfamilie, deren Vertreter vorrangig eine Funktion als Adapterprotein besitzen. Es sind drei CARMA Proteine bekannt, die über alternative Gene exprimiert werden und eine hochgradig ähnliche Sequenz und Proteinstruktur aufweisen (Blonska & Lin, 2011). CARMA1 (~130 kDa) enthält eine N-terminale CARD (*caspase recruitment domain*) Domäne, die in einer Vielzahl von apoptotischen und inflammatorischen Proteinen vorhanden ist. Zusätzlich befindet sich C-terminal der CARD Domäne eine für die Dimerisierung des Proteins wichtige *coiled-coil* Domäne, eine Linkerregion sowie eine PDZ,

SH3 (*Src homology 3*) und GUK Domäne (Abbildung 1.3) (Eitelhuber et al, 2011; Thome & Weil, 2007). Das *BCL10* Gen wurde ursprünglich als Teil der t(1;14)(p22;q32) Translokation in einem MALT Lymphom identifiziert (Abschnitt 1.4.2) (Willis et al., 1999). *BCL10* besteht aus 233 Aminosäuren (~26 kDa) und enthält im N-Terminus eine CARD Domäne. Der C-Terminus des Proteins weist keine signifikanten Sequenzhomologien auf, enthält aber eine beträchtliche Anzahl an Serinen und Threoninen (Thome et al, 2010).

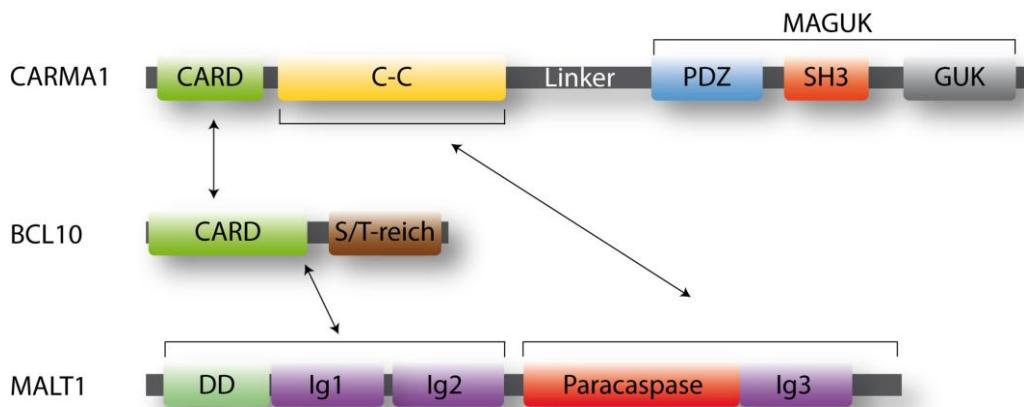


Abbildung 1.3: Übersicht über den Aufbau der CBM-Proteine. CARMA1 besitzt eine N-terminale CARD (*caspase recruitment domain*) Domäne, eine C-C (*coiled-coil*), PDZ (PSD95-Dlg1-Zo-1), SH3 (*src-homology 3*) und eine GUK (*guanylate kinase*) Domäne. BCL10 enthält im N-Terminus eine CARD Domäne und der C-Terminus zeichnet sich durch eine Vielzahl von Serin und Threonin Aminosäuren aus. MALT1 besteht aus einer N-terminalen Todesdomäne (DD = *death domain*) sowie eine C-terminale Paracaspase Domäne die von drei *Ig-like* Domänen flankiert wird.

Das *MALT1* Gen wurde bei der genetischen Untersuchung von MALT Lymphomen als Teil der distinkten t(11;18)(q21;q21) Translokation entdeckt (Akagi et al, 1999). Neben der Adapterfunktion innerhalb des CBM-Komplexes spielt auch die proteolytische Aktivität des Proteins eine bedeutende Rolle bei der Antigen-vermittelten T- und B-Lymphozytenaktivierung sowie der Entstehung, Funktion und dem Überleben NF-κB gesteuerter B-Zell Lymphome. *MALT1* besitzt ein Molekulargewicht von 92 kDa und enthält mehrere Protein-Protein Interaktionsdomänen, die eine Bindung an andere NF-κB Signalfaktoren erlauben. Es besitzt eine N-terminale Todesdomäne (*Death domain; DD*) und eine C-terminale Paracaspase Domäne, welche N-terminal von zwei und C-terminal von einer Immunglobulin-ähnlichen (*Ig-like; Ig*) Domäne flankiert wird (Hailfinger et al, 2009b). Der distale C-Terminus des Proteins bildet keine geordnete Sekundärstruktur, beinhaltet aber mehrere Lysine, an welche regulatorische K63-Polyubiquitinketten konjugiert werden können (Oeckinghaus et al., 2007). Für die Aktivierung von NF-κB ist die konstitutive Bindung von *MALT1* an die CARD Domäne des *BCL10* Proteins über die Todesdomäne und die beiden N-terminalen Ig Domänen entscheidend (Gaide et al, 2001; Langel et al, 2008).

MALT1 enthält zudem zwei Bindungsmotive für die Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6*) im C-Terminus sowie eine weitere Bindungsstelle innerhalb der zweiten Ig Domäne von Aminosäure 309 bis 319 (Thome et al, 2010). Letztere ist nicht in der MALT1 Isoform B enthalten, welche aus diesem Grund im direkten Vergleich zur Isoform A eine schwächere NF-κB Aktivierung bewirkt (Noels et al, 2007). Die MALT1 Proteinstruktur und die proteolytische Funktion werden ausführlicher im Abschnitt 1.3 beschrieben. MALT1-defiziente Mäuse weisen eine starke Beeinträchtigung des NF-κB Signalweges im Zuge der adaptiven Immunantwort auf. Die Stimulation des TCR von *MALT1*^{-/-} T-Zellen resultierte in einer schwachen IL-2 Produktion und Proliferation der Zellen. Weitere immunologische Merkmale der MALT1-Defizienz sind eine signifikante Reduktion von B-Zellen der Marginalzone (MZ) in der Milz und CD5⁺ peritonealen B-Zellen sowie eine Verringerung des Immunglobulin Serumlevels. Über eine essentielle Funktion von MALT1 bei der B-Zell Aktivierung existieren kontroverse Ansichten (Ruefli-Brasse et al, 2003; Ruland et al, 2003). Eine neuere Studie deutet auf eine wichtige Rolle von MALT1 bei der selektiven Aktivierung von c-Rel nach Antigen-vermittelter BCR Stimulation (Ferch et al, 2007). Zudem wurde ein IRAK4-MALT1-abhängiger Signalweg nach BCR Stimulation entdeckt (Dufner & Schamel, 2011).

1.2.2.3.2 Modell der CBM-vermittelten IKK-Aktivierung

Initial für die Rekrutierung des CBM-Komplexes an den TCR oder BCR ist die Phosphorylierung des CARMA1 Proteins durch die aktivierte Kinase PKCθ in T- bzw. PKCβ in B-Zellen notwendig (Abbildung 1.4). CARMA1 ist zunächst in einer inaktiven Konformation konstitutiv mit der zytoplasmatischen Membran assoziiert und wird erst nach Rezeptorstimulation über einen bisher unbekannten Mechanismus in die immunologische Synapse rekrutiert (Gaide et al, 2002). Innerhalb der Membran wird CARMA1 von PKC gebunden und in der Linkerregion an den Serinen S564, S649 und S657 phosphoryliert (Sommer et al, 2005; Wang et al, 2004). Die Folge ist eine Konformationsänderung von CARMA1, in welcher an Stelle der intramolekularen Bindung der *coiled-coil* Domäne an die CARD Domäne, eine Ausbildung des CBM-Komplexes durch CARD-vermittelte Rekrutierung des zytoplasmatischen BCL10 und seines konstitutiven Bindungspartners MALT1 ermöglicht wird (Li et al, 2012; Matsumoto et al, 2005). Eine direkte Bindung von MALT1 über eine Region im C-Terminus des Proteins an die *coiled-coil* Domäne von CARMA1 trägt zudem zur Assemblierung und Stabilität des CBM-Komplexes bei (Che et al, 2004).

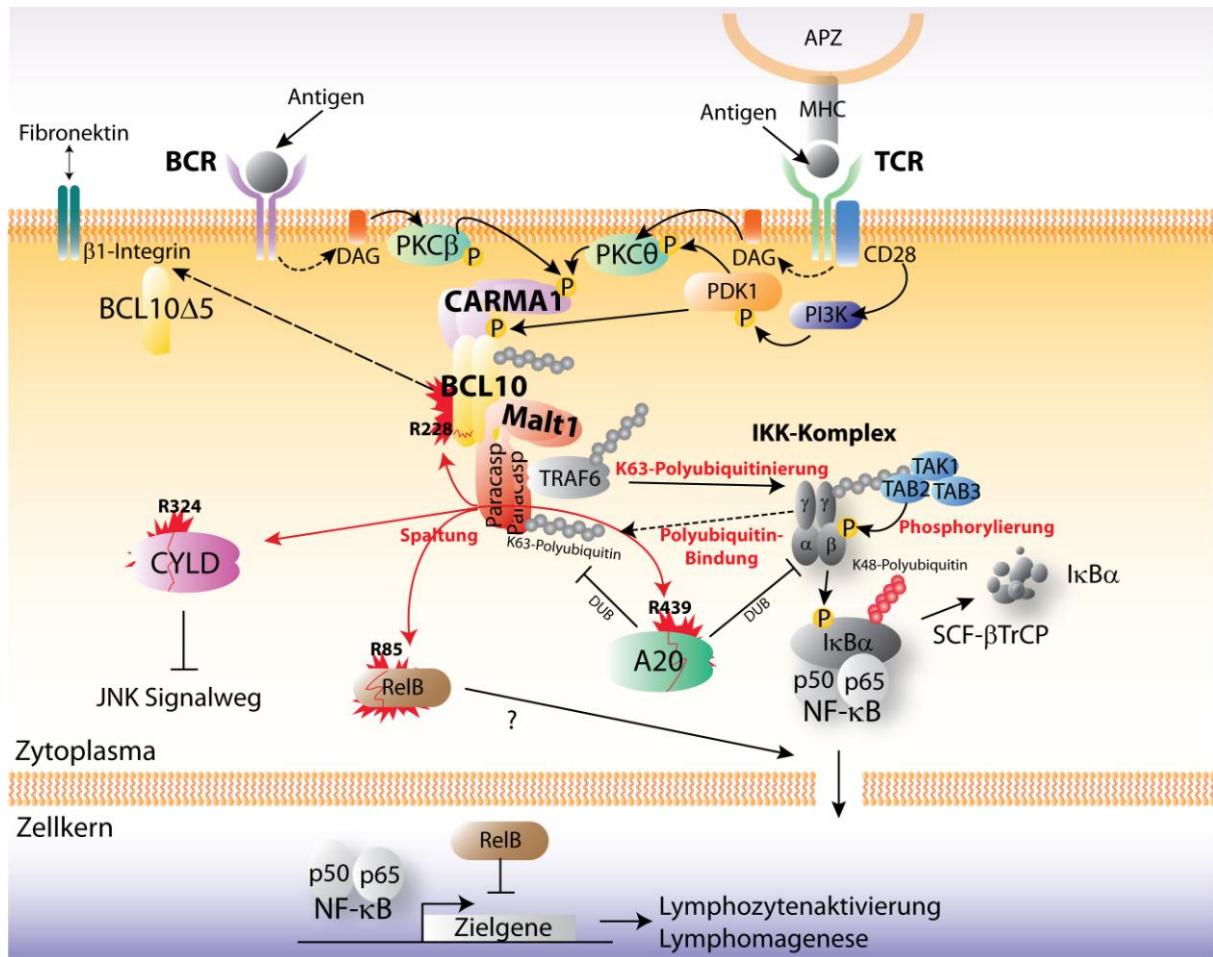


Abbildung 1.4: Darstellung der CBM-vermittelten Signale im Antigen-induzierten NF-κB Signalweg. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge befindet sich im Haupttext.

Es gibt Hinweise dafür, dass BCL10 nach Bindung an CARMA1 die Oligomerisierung von MALT1 induziert und hierdurch die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase TRAF6 ermöglicht wird (Lucas et al, 2001; Noels et al, 2007; Thome et al, 2010). TRAF6 enthält eine Ring-Finger Ubiquitin-Ligase Aktivität, die es zur Konjugation von regulatorischen K63-Polyubiquitinketten an Proteinsubstraten befähigt (Deng et al, 2000). Als Kofaktoren der Ubiquitin-Ligase Aktivität werden außerdem das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) Ubc13 und das katalytisch inaktive Uev1A benötigt (Andersen et al, 2005; Sun et al, 2004). TRAF6 wird nach Bindung an MALT1 über Oligomerisierung basal aktiviert und gewinnt nach K63-Autoubiquitinierung an K124 eine starke katalytische Aktivität. Diese erlaubt eine Konjugation von K63-Polyubiquitinketten an Lysine des MALT1 C-Terminus, die anschließend als Bindungsplattform des IKK-Komplexes zur Verfügung stehen. Die Assoziation des IKK- an den CBM-Komplex entsteht dabei über die Bindung der NEMO UBAN Region an die MALT1-konjugierten Polyubiquitinketten. Als Konsequenz wird die IKK β -Untereinheit des Komplexes aktiviert (Bloor et al, 2008; Wu et al, 2006). Details über die mechanistische und funktionelle

Verknüpfung der CBM-vermittelten IKK Aktivierung wurden durch eine MALT1 Mutationsstudie erzielt. In dieser wurde nach Mutation der MALT1 C-terminalen Lysine zu Arginin, die in einer Unterdrückung der MALT1 K63-Polyubiquitinierung führte, eine deutliche Verminderung der Antigen-induzierten IKK-NF- κ B Aktivierung und IL-2 Produktion nachgewiesen (Oeckinghaus et al, 2007). NEMO kann zusätzlich an die Polyubiquitinketten des BCL10 Proteins, die MALT1-vermittelt an die Lysine 31 und 63 konjugiert werden, interagieren (Wu & Ashwell, 2008). Die molekulare Nähe des CBM-IKK Komplexes erlaubt es dem TRAF6 Protein zusätzliche K63-Polyubiquitinketten an die Komponenten beider Komplexe zu konjugieren. Dies erlaubt die Ubiquitin-abhängige Bindung eines Komplexes aus der TAK1 Kinase, TAB2 (*TAK binding protein 2*) und TAB3 und die Phosphorylierung und Aktivierung der katalytischen IKK β Untereinheit durch TAK1. IKK β phosphoryliert anschließend I κ B α , wodurch NF- κ B aktiviert wird (Oeckinghaus et al, 2007; Shinohara et al, 2005; Sun et al, 2004).

1.3 Die proteolytische Aktivität von MALT1

Obwohl frühe Bemühungen zur Charakterisierung der proteolytischen Funktion von MALT1 scheiterten (Snipas et al, 2004; Uren et al, 2000), konnten dennoch Hinweise auf eine mögliche Rolle der enzymatischen Aktivität bei der NF- κ B Aktivierung ermittelt werden: Die Mutation des als essentiell für die katalytische Funktion vorhergesagten Cysteins 464 führte zu einer verringerten NF- κ B Aktivierung in T-Zellen (Lucas et al, 2001; Uren et al, 2000). Erst im Jahre 2008 gelang es in zwei unabhängigen Studien die proteolytische Aktivität von MALT1 in der Antigen-vermittelten Immunantwort nachzuweisen (Coornaert et al, 2008; Rebeaud et al, 2008). Seit dieser Entdeckung wächst die Liste der identifizierten Substrate, so dass gegenwärtig BCL10, A20, CYLD, NIK und RelB als Proteinsubstrate von MALT1 identifiziert werden konnten (Hailfinger et al, 2011; Rosebeck et al, 2011; Staal et al, 2011) (Abbildung 1.6). Der genaue Mechanismus und Ablauf der MALT1 Aktivierung innerhalb des CBM-Komplexes im Zuge der adaptiven Immunantwort ist allerdings bisher weitgehend unklar. Erst durch Auflösung der Proteinstruktur der Paracaspase Domäne konnten neue Erkenntnisse über den Mechanismus der MALT1 Aktivierung gewonnen werden (Wiesmann et al, 2012).

1.3.1 MALT1 Proteinstruktur

Die proteolytische MALT1 Aktivität wird durch eine katalytische C464-H415 Dyade im aktiven Zentrum ermöglicht. Aufgrund der strukturellen und sequenziellen Homologie der Caspase-ähnlichen Domäne gilt MALT1 als naher Verwandter von Caspasen, und wird daher auch als

„Paracaspase“ bezeichnet (Uren et al, 2000). Die funktionellen und mechanistischen Unterschiede zwischen Caspisen, Paracaspasen und den pflanzlichen Metacaspasen, die zum gleichen Cysteinprotease Clan (CD) zählen, ist allerdings immer noch weitgehend unklar (Snipas et al, 2004). MALT1 ist die einzige bekannte Paracaspase, die im Gegensatz zu den Aspartat-spezifischen Caspisen Arginin-abhängig spaltet, und daher vermutlich näher verwandt mit den auf Spaltung von R/K spezialisierten Metacaspasen ist (Uren et al, 2000; Vercammen et al, 2007).

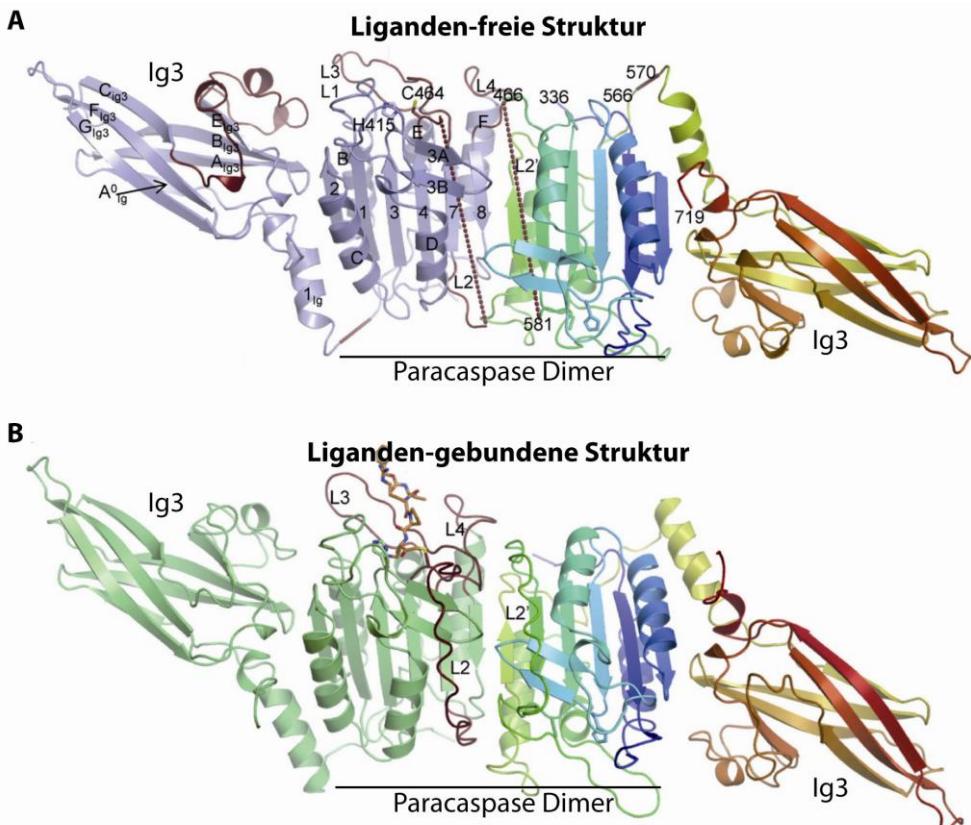


Abbildung 1.5: Proteinstruktur der humanen MALT1 Paracaspase-Ig3 Domäne. (A) Liganden-freie Struktur der Paracaspase-Ig3 Einheit. **(B)** Struktur der Paracaspase-Ig3 Einheit nach Bindung des Peptidinhibitors Z-VRPR-FMK. Modifiziert nach Wiesmann et al, 2012.

Die strukturelle Auflösung des MALT1 N-Terminus enthüllte, dass die Todesdomäne vorwiegend zur Ausbildung von Heterodimeren beiträgt und die Tandem Ig1 und Ig2 Domänen als Dimer, Trimer oder Tetramer eine multimere Aktivierungsplattform ausbilden (Qu & Dhe-Paganon, 2011). Die Strukturen von Liganden-freiem sowie einem mit dem Z-VRPR-FMK Peptidinhibitor gebundenen MALT1 (Paracaspase-Ig3) wurden in zwei Publikationen veröffentlicht (Abbildung 1.5 A und B) (Wiesmann et al, 2012; Yu et al, 2011). Grundsätzlich weist die MALT1 Paracaspase Domäne eine zu Caspisen sehr ähnliche Konformation auf und bildet auch Substrat-unabhängig ein Homodimer. Im Gegensatz zu

Caspasen liegt die aktivierte MALT1 Struktur allerdings als ungespaltene Polypeptidkette vor (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004; Wiesmann et al, 2012). Die Arginin-spezifische Spaltung von MALT1 wird durch die koordinierte Bindung der P1 Argininseitenkette des Substrats durch die sauren Seitenketten von D365, D462 und E500 im aktiven Zentrum ermöglicht (Yu et al, 2011).

Die Auflösung der Proteinstruktur der Paracaspase Domäne lieferte neue Erkenntnisse über die funktionellen Unterschiede zwischen MALT1 und Metacaspasen bzw. Caspasen. Eine direkte funktionelle Abhängigkeit einer Caspase-ähnlichen proteolytischen Aktivität von angrenzenden Proteindomänen, wie sie in MALT1 mit der Ig3 Domäne identifiziert worden ist, scheint einzigartig und in Caspasen oder Metacaspasen bisher nicht gezeigt. Dies verdeutlicht die mechanistische Abgrenzung von MALT1 von diesen beiden Cysteinprotease Gruppen. Zudem wurde durch Auflösung der Struktur ein wichtiges Hilfsmittel für eine zielgerichtete Entwicklung von MALT1 Hemmstoffen gewonnen (Hachmann et al, 2012; Pop & Salvesen, 2009; Wiesmann et al, 2012).

1.3.2 Einfluss der MALT1 Protease auf die Lymphozytenaktivierung

MALT1 spielt in erster Linie eine wichtige Rolle bei der Antigen-vermittelten TCR und BCR Stimulation des NF-κB Signalweges. Rekonstitutionsdaten und Inhibitorstudien deuten allerdings im Kontext eines starken NF-κB Stimulus auf eine nicht-essentielle Funktion der Paracaspase Aktivität bei der Lymphozytenaktivierung hin. Vielmehr wurde eine NF-κB-verstärkende oder -verlängernde Funktion der proteolytischen Aktivität beobachtet, die das Ziel hat, das volle Potential des NF-κB Signalweges zu vermitteln (Coornaert et al, 2008; Duwel et al, 2009; Rebeaud et al, 2008; Thome et al, 2010). Nach Inhibition der proteolytischen MALT1 Aktivität war zudem keine negative Auswirkung auf den proximalen NF-κB Signalweg stimulierter T-Zellen nachweisbar (Duwel et al, 2009). Die Daten deuten auf eine vorwiegend regulatorische Rolle der Paracaspase Aktivität, die an distinkten negativ-regulatorischen Angriffspunkten des NF-κB Signalweges im Kontext spezifischer immunologischer Prozesse agiert. Vermutlich wird im Zuge dieser Prozesse die gezielte Aktivierung eines distinkten NF-κB Gen-Clusters über die Paracaspase Aktivität vermittelt (Ferch et al, 2007). Bisher sind fünf Proteinsubstrate der Paracaspase Aktivität identifiziert worden, die alle eine Rolle im NF-κB Signalweg spielen (Abbildung 1.6). Um den Einfluss der Paracaspase Aktivität im Rahmen der Immunantwort weiter zu erforschen, ist eine Entdeckung neuer MALT1 Substrate unumgänglich.

1.3.2.1 MALT1 Proteinsubstrate

Ein bedeutender regulatorischer Einfluss der Paracaspase Aktivität auf den NF-κB Signalweg entsteht durch die Spaltung der NF-κB Untereinheit RelB. RelB wird von MALT1 nach Stimulation des BCR oder TCR C-terminal von R85 gespalten (Abbildung 1.6). Die Folge ist eine zügige proteasomale Degradation des Proteins. Es stellte sich heraus, dass dies zur Aktivierung distinkter NF-κB Zielgene führt. RelB agiert als Repressor der RelA und c-Rel Genexpression, indem er die NF-κB Untereinheiten von ihren Zielgenen verdrängt. Folglich wurde nach Überexpression von RelB eine signifikante Reduktion der über PMA und Ionomycin-vermittelten kanonischen NF-κB Aktivität sowie eine starke Verminderung der IL-2 Produktion in T-Zellen nachgewiesen. Die IL-2 Produktion der Zellen war zudem nach Expression der MALT1-resistenten R85G RelB Mutante kaum detektierbar. Auch eine Herunterregulation der RelB mRNA über Zugabe einer spezifischen siRNA in primären humanen T-Zellen resultierte in einer signifikanten Erhöhung der IL-2 Sekretion (Hailfinger et al, 2011). Diese Ergebnisse lieferten wichtige Hinweise auf die Funktion der Paracaspase Aktivität bei der Lymphozytenaktivierung.

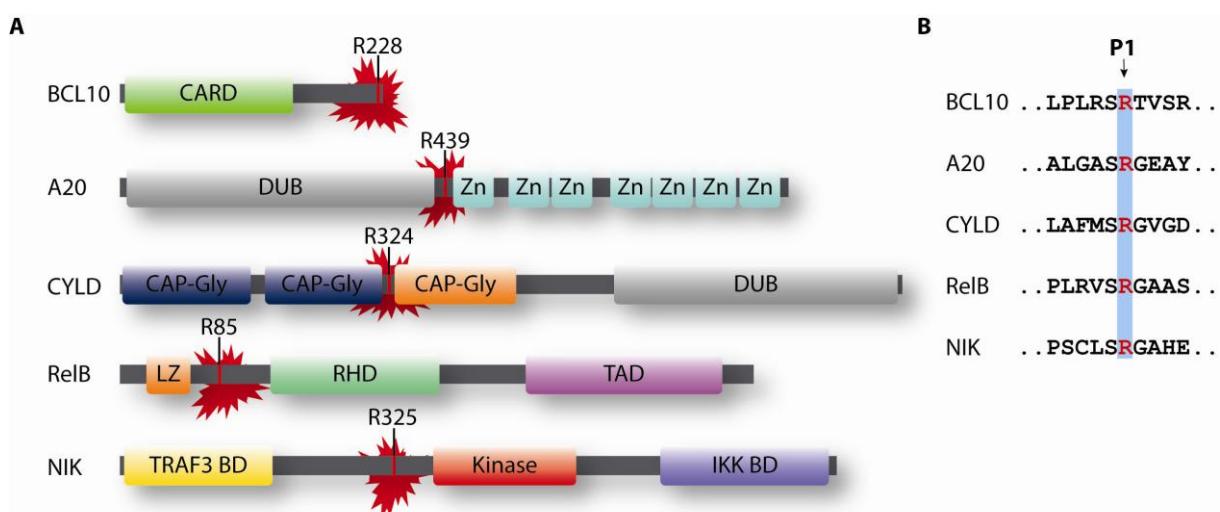


Abbildung 1.6: Schematische Übersicht der MALT1 Proteinsubstrate. (A) Darstellung der Lage der MALT1 Spaltungssequenz in den BCL10, A20, CYLD, RelB und NIK Zielproteinen. **(B)** Vergleich der MALT1 Zielsequenz in den bisher identifizierten Proteinsubstraten.

Eine weitere mechanistische Verknüpfung zwischen der Paracaspase Aktivität und der Aktivierung von NF-κB geht auf die Spaltung des NF-κB Inhibitors A20 (Synonym: TNFAIP3, *tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*) zurück (Coornaert et al, 2008). A20 kann durch duale Modifikation von Ubiquitininketten (*ubiquitin-editing*) zur Regulation von Signalkomplexen beitragen: Neben einer K48 Ubiquitin-Ligase Aktivität besitzt A20 auch eine Deubiquitierungsaktivität (DUB), die eine Hydrolyse von regulatorischen K63-Polyubiquitinketten von Proteinsubstraten ermöglicht (Lin et al, 2008). A20 agiert in erster

Linie als essentielle negativ-regulatorische DUB des NF-κB Signalweges. In diesem Zuge werden die konjugierten K63-Polyubiquitinketten von Adapterproteinen wie RIP1/2, TRAF6, NEMO, TAK1 oder MALT1 durch A20 entfernt und gleichzeitig K48-Polyubiquitinketten angeheftet, wodurch der proteasomale Abbau des Zielproteins eingeleitet wird. Als Folge werden Rezeptor-nachgeschaltete Signalkomplexe aufgelöst und die Signalweiterleitung zum zentralen IKK-Komplex unterbunden (Boone et al, 2004; Duwel et al, 2009; Hymowitz & Wertz, 2010). Unterstützt wird dieser negativ-regulatorische Prozess durch einen DUB-unabhängigen Mechanismus von A20, indem es an polyubiquitiniertes NEMO bindet und die IKK Phosphorylierung durch die vorgeschaltete Kinase TAK1 blockiert (Skaug et al, 2011). Aufgrund seiner kritischen Funktion bei der Kontrolle der NF-κB Aktivität gilt das A20 Gen *TNFAIP3* als Tumorsuppressoren, das in zahlreichen B-Zell Lymphomen inaktiviert vorliegt (Chanudet et al, 2010; Du, 2011; Kato et al, 2009; Schmitz et al, 2009). Eine deregulierte Expression des Gens steht zudem in Verbindung mit einer Reihe von chronischen Entzündungsstörungen und Autoimmunerkrankungen, wie systematischer *Lupus erythematosis* und rheumatoider Arthritis (Dieguez-Gonzalez et al, 2009; Graham et al, 2008). Die MALT1-vermittelte Spaltung von A20 findet im Menschen C-terminal von R439 statt und erzeugt zwei Proteinfragmente: Das N-terminale A20p50 Fragment enthält die intakte OTU Domäne, das A20p37 sechs der sieben C-terminalen Zinkfinger und damit die vollständige E3-Ligase Domäne. Als Konsequenz der Spaltung wird A20 zügig abgebaut und steht folglich nicht mehr als Inhibitor der NF-κB Aktivität zur Verfügung. Angesichts der schwachen Effekte von A20 auf den Signalweg scheint die Spaltung durch MALT1 allerdings einen eher geringen Effekt auf die NF-κB Aktivierung zu haben, was durch Überexpressions- und Hemmstoffstudien bestätigt wurde (Coornaert et al, 2008).

Eine weitere DUB ist das Ziel der MALT1 Aktivität: Die Untersuchung der MALT1-vermittelten CYLD (*cylindromatosis turban tumor syndrome*) Spaltung erbrachte neue Erkenntnisse über die Funktionen der DUB, und folglich von MALT1, bei der Regulation der JNK Aktivierung (Staal et al, 2011). Es ist bekannt, dass CYLD als negativer Regulator des NF-κB und JNK Signalweges agiert, indem es K63- und lineare Polyubiquitinketten von Signalfaktoren entfernt (Komander et al, 2009; Niu et al, 2011). Als Substrate der DUB Aktivität konnten bisher TRAF2, TRAF6, NEMO, TAK1 und RIP1 identifiziert werden (Ahmed et al, 2011; Chen, 2012; Komander et al, 2009; Takami et al, 2008; Wright et al, 2007). Die Spaltung des CYLD Proteins durch MALT1 konnte nach Überexpression von API2-MALT1 und nach TCR oder BCR Aktivierung nachgewiesen werden. CYLD wird dabei C-terminal von R324 in ein ~40 kDa und ein ~70 kDa Fragment gespalten. Als Konsequenz wurde eine Erhöhung der JNK Aktivität und Zielgenexpression nachgewiesen, während die NF-κB Aktivierung nicht beeinflusst wurde. So konnten die Autoren der Studie nach Überexpression

einer Spaltungs-resistenten CYLD R324A Mutante eine stark erniedrigte JNK Aktivierung nach TCR Stimulation nachweisen (Staal et al, 2011).

Das BCL10 Protein ist ein konstitutiver Bindungspartner von MALT1 und ebenfalls ein Substrat der Paracaspase Aktivität. BCL10 wird durch MALT1 C-terminal von R228 nach Antigen-vermittelter Aktivierung des TCR und BCR gespalten. Die Spaltung des Proteins resultiert nicht in einer Aktivierung des NF-κB Signalweges, vielmehr wurde eine Funktion des C-terminalen BCL10 Fragments bei der Lymphozyten-Adhäsion an Fibronektine der extrazellulären Matrix über VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) oder VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$) Integrine beschrieben (Rebeaud et al, 2008).

Die NF-κB-aktivierende Kinase NIK ist ein weiteres Substrat von MALT1, wird aber vermutlich nur durch das chimäre cIAP2-MALT1 Onkoprotein der t(11;18)(q21;q21) Translokation distinkter MALT Lymphome gespalten (Abschnitt 1.4.2). Der C-terminale Teil der Kinase wird durch die Prozessierung stabilisiert und besitzt eine konstitutive Kinaseaktivität, die zu persistierender NF-κB Aktivierung und Apoptoseresistenz führt (Rosebeck et al, 2011).

1.3.2.1 Einfluss von MALT1 auf die Caspase 8-vermittelte Lymphozytenaktivierung

Zahlreiche Studien demonstrieren eine interessante Beziehung von MALT1 und Caspase 8 in Lymphozyten, in welchen die Caspase eine duale Funktion besitzt: Neben einer Funktion bei der Lymphozytenapoptose nach Bindung von Todesrezeptoren wie CD95 (Fas/ Apo-1), TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), und TRAIL (Krammer et al, 2007), besitzt Caspase 8 auch eine essentielle Rolle bei der Antigen-vermittelten Lymphozytenaktivierung, die abhängig von MALT1 ist. Caspase 8 ist eine Cysteinoprotease, die ihre Substrate nach Aspartat spaltet. Zur Regulation der Apoptose wird das Vorläuferprotein Procaspsase 8 nach Stimulation des Todesrezeptors an einen oligomeren Signalkomplex, den sogenannten DISC (*death inducing signaling complex*), innerhalb der Zellmembran rekrutiert. In diesem Komplex erfolgt die Dimerisierung der Pro-Caspase, wodurch die Aktivierung der Caspase durch autonome Spaltung in eine reife Variante induziert wird (Chang et al, 2003). Die Caspase 8 wird freigesetzt und kann anschließend die Effektor-Caspasen 3 und 7 durch Spaltung aktivieren. Innerhalb des DISC-Komplexes wird die Aktivierung von Caspase 8 durch das inaktive Caspase 8 Homolog c-FLIP_L reguliert, welches von Caspase 8 zu p43-FLIP gespalten wird (Chang et al, 2002). Paradoxe Weise besitzt Caspase 8 parallel eine regulatorische Funktion bei der T-Lymphozytenaktivierung und -proliferation, die direkt von der proteolytischen Funktion des Proteins abhängt (Alam et al, 1999; Kennedy et al, 1999). Su et al. zeigten in ihren Studien, dass eine Caspase 8-Defizienz die Aktivierung von NF-κB nach Stimulation des TCR, Fc-Rezeptoren oder TLR4 in humanen und murinen T- und B-

Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK) blockiert (Su et al, 2005). Die Folge ist eine gestörte Apoptose und parallel eine ausgeprägte Immundefizienz der Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Caspase direkt von der proteolytischen Aktivität abhängt: Nach TCR-Stimulation war die Rekrutierung von IKK α/β an den NF- κ B-vorgeschalteten CBM-Komplex in die immunologische Synapse sowie als Folge die IKK-NF- κ B Aktivierung und die Produktion von IL-2 drastisch vermindert (Bidere et al, 2006; Kawadler et al, 2008; Misra et al, 2007; Su et al, 2005). Neuere Studien konnten MALT1 als Bindungspartner und Aktivator von Caspase 8 identifizieren. Über die Paracaspase Domäne (AS 326 - 567) von MALT1 wird dabei die Aktivierung der Procaspsase 8 durch direkte Assoziation und Ausbildung eines MALT1-Procaspsase 8 Heterodimers induziert. Als Folge findet zügig nach TCR Stimulation die limitierte autoproteolytische Spaltung der Procaspsase 8 in eine aktive Form statt. Dies trat auch mit der MALT1 inaktiven C464A Mutante und daher Paracaspase-unabhängig auf. Die aktive MALT1-Caspase 8 Einheit besitzt eine geringe Aktivität gegenüber Caspase 3, ist aber weiterhin fähig c-FLIP_L in die aktive p43 Form zu spalten, die eine Induktion der NF- κ B Aktivierung über Interaktion an TRAF2 bewirkt (Budd et al, 2006; Chau et al, 2005; Kataoka & Tschopp, 2004; Kawadler et al, 2008; Zhang & He, 2005). MALT1 konvertiert in diesem Prozess folglich die Caspase 8 Substratspezifität, und führt die Caspase weg von ihrer apoptotischen Funktion in Richtung proliferativer Signaltransduktion. Die Verbindung zwischen MALT1, Caspase 8 und c-FLIP_L stellt somit einen weiteren distinkten Mechanismus dar, in welchem MALT1 über die Paracaspase Domäne zur NF- κ B Aktivierung beiträgt (Kawadler et al, 2008).

1.3.3 Funktion von MALT1 in weiteren Signalprozessen

Neben seiner Funktion bei der Antigen-vermittelten Aktivierung von Lymphozyten konnte in mehreren Studien auch eine komplexe und essentielle Rolle von MALT1 im Zuge weiterer immunologischer Prozessen zur Aktivierung der Rezeptor-vermittelten NF- κ B Aktivierung gezeigt werden. MALT1 steuert unter anderem die BAFF (*B-cell activation factor of the TNF family*)-regulierte anti-apoptotische Genexpression in B-Zellen der Marginalzone (Tusche et al, 2009) sowie die IgE-Fc ϵ RI-Rezeptor-vermittelte Sekretion von TNF α und IL-6 in Mastzellen (Klemm et al, 2006). In Makrophagen reguliert MALT1 die NF- κ B Aktivierung nach TLR4 (*toll-like receptor 4*)-Stimulation und in einem Signalkomplex zusammen mit CARD9 und BCL10 nach Induktion des Dectin-1 Rezeptors (Dong et al, 2006; Gross et al, 2008). Auch in dendritischen Zellen wurde eine Beteiligung von MALT1 in Dectin-vermittelten Signalwegen, die eine wichtige Form der antimykotischen Abwehr im Rahmen der angeborenen Immunantwort darstellen, entdeckt. Dectine gehören zu den C-Typ Lektinen und sie erkennen spezielle Kohlenhydratstrukturen in der Zellwand krankheitserregender

Pilze. In Dectin Signalwegen dendritischer Zellen scheint auch die Paracaspase Aktivität eine entscheidende Rolle zu spielen. Hinweise stammen aus Inhibitorstudien in dendritischen Zellen: Nach Inkubation mit dem spezifischen MALT1 Peptidhemmstoff Z-VRPR-FMK war als Antwort auf eine Dectin-1 oder -2 Stimulation die Translokation der c-Rel NF-κB Untereinheit in den Zellkern und die Zielgenbindung gestört (Gringhuis et al, 2011). In natürlichen Killerzellen (NK) beteiligt sich MALT1 zudem innerhalb des CBM-Komplexes an der NF-κB-gesteuerten Zytokinsekretion nach Aktivierung einiger ITAM-konjuguierten Rezeptoren wie NK1.1, Ly49D, Ly49H, und NKG2D (Gross et al, 2008).

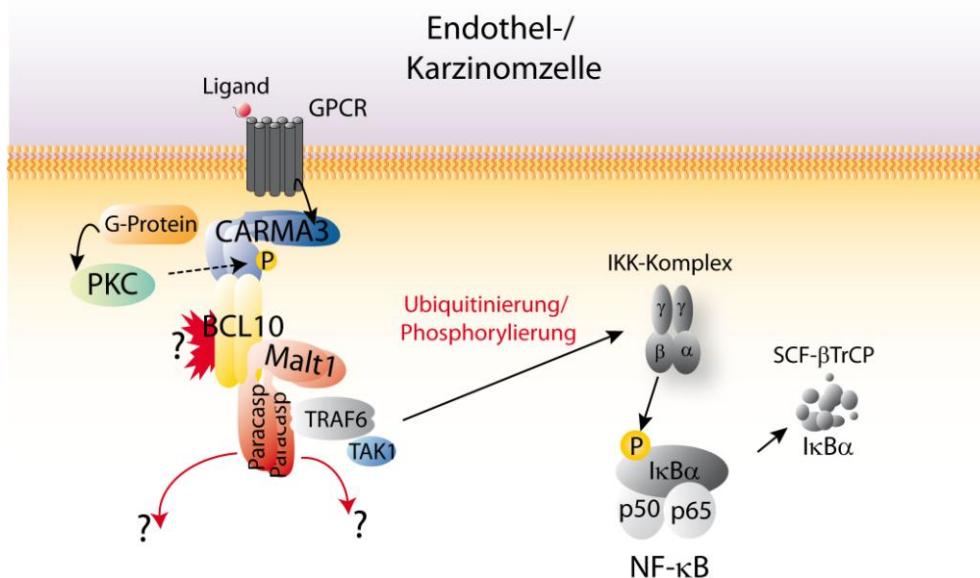


Abbildung 1.7: CARMA3, BCL10 und MALT1 in GPCR-induzierten NF-κB Signalwegen. MALT1 spielt zusammen mit CARMA3 und BCL10 eine wichtige Rolle im GPCR aktivierten NF-κB Signalweg zur Regulation von Entzündungsreaktionen und der Karzinombildung.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen eine Beteiligung von MALT1 zusammen mit dem CARMA1 Homolog CARMA3 bei der GPCR (G protein-coupled receptors) induzierten Aktivierung des NF-κB Signalweges in nicht-hämatopoetischen Zellen (Abbildung 1.7). GPCRs umfassen eine große Proteinfamilie von Transmembranrezeptoren, die eine Vielzahl bedeutender zellphysiologischer Prozesse steuern. Die Rezeptoren können von zahlreichen Liganden stimuliert werden, wodurch eine breite Palette nachgeschalteter Effektoren aktiviert werden (Ye, 2001). Bedeutende Signalwege in welchen MALT1 eine Rolle im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen und der Karzinombildung spielt (Jiang et al, 2011), finden nach GPCR Stimulation durch Lysophosphatidsäure (LPA, *lysophosphatidic acid*) (Klemm et al, 2007), Angiotensin II (McAllister-Lucas et al, 2007), CXCL8 (*cysteine x cysteine chemokine ligand 8*)/IL-8 (Martin et al, 2009), CXCL12/SDF-1 α (*stromal cell-derived*

factor-1 α) (Rehman & Wang, 2009) und Thrombin (Delekta et al, 2010) statt. Ob die proteolytische MALT1 Aktivität einen regulatorischen Einfluss auf die NF- κ B Aktivierung über GPCRs besitzt ist unklar und blieb in den bisherigen Studien offen (McAllister-Lucas et al, 2011).

1.4 Deregulierte Funktion des CBM-Komplexes in B-Zell Lymphomen

Ein Lymphom ist ein solider Tumor, der aus Zellen des Immunsystems gebildet wird und in Lymphknoten oder extranodalen Bereichen entsteht. Morphologisch lassen sich Lymphome in Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphome (NHL) unterteilen. Kennzeichen des Hodgkin Lymphoms ist das Vorkommen von blastoiden „Reed-Sternberg“ Riesenzellen, die durch eine Fusion von monoklonalen B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum des Lymphknotens entstehen und ein Unterscheidungsmerkmal zu den NHL darstellen. Rund 90 % der humanen Lymphome entwickeln sich aus unterschiedlichen Differenzierungsgraden von B-Lymphozyten (Kuppers, 2009). Entsprechend ihrer zellulären Herkunft und ihres Differenzierungsgrades besitzen B-Zell Lymphome daher eine Vielzahl onkogener Signalwege um eine autonome Zellproliferation und ihre Überlebensfähigkeit zu gewährleisten (Staudt & Dave, 2005). Der NF- κ B Signalweg gilt aufgrund seiner proinflammatorischen, proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Wirkung als kritischer Faktor für die Tumorentwicklung. NF- κ B Transkriptionsfaktoren werden normalerweise transient als Antwort auf Entzündungsreaktionen, Infektionen oder andere zelluläre Stresssituationen aktiviert, mit dem Ziel im Zuge dieser Prozesse Signale für ein verlängertes Überleben, zur Proliferation oder zur Differenzierung der Zelle zu liefern. Eine gestörte Regulation des NF- κ B Signalweges kann daher in einer verlängerten Aktivierung des Immunsystems, bei gleichzeitiger Manifestation von kanzerogenen Mechanismen, wie einer Blockade der Apoptose oder unkontrollierter Zellproliferation führen, und so zur Lymphomagenese beitragen. Aus diesem Grund stellt der NF- κ B Signalweg ein bedeutendes Ziel der therapeutischen Behandlung von lymphoiden Malignomen dar (Ghosh & Hayden, 2008; Vallabhapurapu & Karin, 2009).

Angesichts der essentiellen Funktion des CBM-Komplexes im Rahmen der Antigenvermittelten IKK und NF- κ B Aktivierung ist es nicht verwunderlich, dass in zahlreichen Studien eine deregulierte CBM-vermittelte Signaltransduktion als Ursache für die Entstehung und das autonome Wachstum von Lymphomen nachgewiesen wurde (Shaffer et al, 2012; Staudt, 2010). So wurde die onkogenetische Bedeutung des NF- κ B Signalweges durch die Entdeckung von charakteristischen Translokationen in MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) Lymphomen, bei denen MALT1 und BCL10 beteiligt sind, untermauert (Akagi et al,

1999; Morgan et al, 1999; Willis et al, 1999; Zhang et al, 1999). Daneben wurden vor allem in den letzten Jahren zahlreiche molekulare und genetische Abnormitäten des NF-κB Signalweges in Tumorentitäten des Diffus großzelligen B-Zell Lymphoms (*diffuse large b-cell lymphoma*, DLBCL) aufgedeckt, in denen häufig auch die Deregulation des CBM-Komplexes eine bedeutende Rolle einnimmt (Shaffer et al, 2012). Die Identifikation pathogenetischer Mechanismen, die eine kritische Funktion bei der Entwicklung und der Zellbiologie und Überlebensfähigkeit von Lymphomen besitzen, ist auch mit der Hoffnung auf neue zielgerichtete Therapiemöglichkeiten verbunden.

1.4.1 DLBCL

1.4.1.1 Klassifizierung von DLBCL durch Genexpressionsanalysen

Bei etwa 40 % der NHL liegt das Diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) vor, mit etwa 25.000 Fällen pro Jahr allein in den USA (Shaffer et al, 2012). Klinisch gesehen sind DLBCL sehr heterogen, da nur etwa 40 % der Patienten auf eine Chemotherapie ansprechen (Lenz et al, 2008b). Die klinische Heterogenität deutete auf zelluläre und molekulare Unterschiede zwischen DLBCL, deren Charakterisierung lange nicht über klassische pathologische oder klinische Diagnoseverfahren gelang. Erst durch eine systematische Genexpressionsanalyse von DLBCL Patientenbiopsien gelang eine Klassifizierung der Lymphome in Untergruppen. Anhand der Diversität bzw. Übereinstimmung innerhalb der generierten Gensignaturen konnten drei DLBCL Subgruppen identifiziert werden (Alizadeh et al, 2000; Rosenwald & Staudt, 2003). Durch die genetischen Studien konnte zudem eine Abstammung der DLBCL Subtypen von normalen B-Lymphozyten mit unterschiedlichen Aktivitäts- und Differenzierungsgraden nachgewiesen werden. Eine der identifizierten DLBCL Subgruppen zeigt eine hohe genetische Ähnlichkeit zu schnell proliferierenden Zentroblasten des lymphoiden Keimzentrums und wird daher als GCB-DLBCL (*germinal centre B cell-like DLBCL*) bezeichnet. Das Genexpressionsprofil einer anderen DLBCL Subgruppe besitzt dagegen die genetischen Merkmale der BCR-aktivierten peripheren B-Lymphozyten, was die Grundlage für die Bezeichnung ABC-DLBCL (*activated B cell-like DLBCL*) darstellt (Alizadeh et al, 2000). Der genetische Differenzierungsgrad der ABC-DLBCL Lymphome deutete an, dass sich die Lymphome aus Postkeimzentrums Plasmazyten entwickeln (Wright et al, 2003). Die Entdeckung transkriptioneller Unterschiede innerhalb der DLBCL bot erstmals eine Erklärung für die abweichenden Proliferationsraten der Lymphome sowie die heterogenen klinischen Resultate nach Therapie der Patienten. So war die 5-Jahres-Überlebensrate des GCB-DLBCL Subtyps mit 75 % signifikant besser als die des aggressiveren ABC-DLBCL Subtyps, die bei etwa 40 % lag (Bea et al, 2005; Lenz et al, 2008b). Es zeigte sich, dass ABC-DLBCL Lymphome als Folge einer chronischen BCR

Aktivität eine persistierende Aktivierung des anti-apoptotischen IKK-NF-κB Signalweges besitzen. Dies stellt das wichtigste pathogene Unterscheidungsmerkmal zu den weitgehend NF-κB-unabhängigen GCB-DLBCL Lymphomen dar und wird als Ursache für die höhere Widerstandskraft gegenüber einer zytotoxischen Chemotherapie und die höhere Überlebensfähigkeit der ABC- verglichen mit den GCB-DLBCL Lymphomen vermutet (Davis et al, 2001; Lenz et al, 2008a). Unterstützende Hinweise auf diesen Zusammenhang wurden aus Hemmstoff- und Überexpressionsstudien in DLBCL Zellen gewonnen: Eine Unterbrechung des konstitutiven NF-κB Signalweges mit einem IκB Superrepressor oder dem IKK β Hemmstoff MLN120B resultierte in einer selektiven Induktion der Apoptose in ABC-DLBCL Zellen (Davis et al, 2001; Lam et al, 2005). Diese Studien beweisen, dass die Proliferation und das Überleben der ABC-DLBCL Zellen in hohem Maße von einer persistierenden NF-κB Aktivität abhängen. Sie stellen auch die Grundlage für eine zielgerichtete Inhibition des Signalweges im Rahmen einer ABC-DLBCL Therapie dar.

Etwa ein Drittel der DLBCL Fälle konnte weder der ABC- noch der GCB-Subgruppe zugeordnet werden und wurde daher als „Typ 3“ klassifiziert. Hierzu wird auch das primäre mediastinale B-Zell Lymphom (PMBL) gezählt, das aus seltenen B-Lymphozyten Subpopulationen innerhalb des Thymus entsteht (Copie-Bergman et al, 2002; Lenz et al, 2008b). PMBL ist ebenfalls durch eine konstitutive NF-κB Signaltransduktion gekennzeichnet, die häufig aus Überexpression des c-Rel Proteins resultiert (Lam et al, 2005). Die NF-κB Gensignatur ist allerdings DLBCL untypisch und ähnelt eher der Signatur des Hodgkin Lymphoms (Rosenwald & Staudt, 2003; Savage et al, 2003).

1.4.1.2 Pathogenese und molekulare Ursachen von ABC-DLBCL

Neben der konstitutiven Aktivierung des klassischen NF-κB Signalweges in ABC-DLBCL wurden durch die Genexpressionsanalysen weitere pathogenetische Mechanismen von DLBCL aufgedeckt. Als Resultat einer genomweiten Studie konnte die Verknüpfung von genetischen Veränderungen des NF-κB Signalweges und der BCL6/ BLIMP-1 Achse in ABC- sowie von MYC und BCL2 in GCB-DLBCL nachgewiesen werden (Pasqualucci et al, 2011). Das Überleben der meisten ABC-DLBCL Zelllinien hängt von den NF-κB Signalen des chronisch aktiven BCRs ab (Davis et al, 2010). Der Großteil der GCB-DLBCL besitzt dagegen keine oder nur eine geringe Aktivierung des NF-κB Signalweges (Compagno et al, 2009). Zytologisches Kennzeichen des chronisch aktiven IgM BCR Signalweges in ABC-DLBCL Zellen ist die Bildung immobilisierter BCR-Cluster in der Zellmembran, die an ähnliche BCR-Cluster in Antigen-stimulierten B-Lymphozyten erinnern. Nach Antikörperfärbung weisen die Cluster einen hohen Grad an Phosphotyrosinen auf, was auf

eine aktive BCR Signaltransduktion schließen lässt (Davis et al, 2010). In GCB-DLBCL Zellen werden häufig IgG BCR ausgebildet, die hingegen, vergleichbar mit ruhenden B-Lymphozyten, eher diffus entlang der Membran verteilt sind (Davis et al, 2010; Kraus et al, 2004; Lam et al, 1997; Lenz et al, 2007).

Die permanente Aktivierung des NF-κB Signalweges in ABC-DLBCL ist durch eine konstante Umsetzung des IKK Inhibitors I κ B α und eine nukleäre Akkumulierung von p50/p65 und seltener p50/cRel Heterodimeren geprägt (Davis et al, 2001). Die Konsequenz ist eine Aktivierung zahlreicher NF-κB Zielgene, die zum ABC-DLBCL Phänotyp beitragen. Neben anti-apoptotischen Faktoren wie BCL_{XL}, c-FLIP und cIAP1/2 werden auch vermehrt wachstumsfördernde Faktoren wie Zytokine (z.B. IL-10, IL-6) oder Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT3) produziert (Lam et al, 2005; Lam et al, 2008; Shaffer et al, 2012).

Zur Charakterisierung der für die konstitutive Aktivierung essentiellen NF-κB-vorgeschalteten Faktoren wurden eine Reihe genomweiter RNA-Interferenz Studien durchgeführt. Auf diesem Wege wurde eine essentielle Rolle der CBM-Proteine CARMA1, BCL10 und MALT1 in ABC-DLBCL identifiziert, denn die konstitutive NF-κB Aktivität und das Überleben der Zellen war nach singulärer Herunterregulation der Proteine stark beeinträchtigt (Ngo et al, 2006). Auch die BCR-Untereinheiten (IgM, Ig-κ, CD79A oder CD79B) oder die BCR-proximalen Faktoren, darunter Syk, BLNK, PKC β und BTK sind kritisch für das Überleben von ABC-DLBCL Zelllinien wie z.B. HBL1, TMD8, OCI-Ly10 und U2932 (Davis et al, 2010). Eine Sequenzierung potentieller Onkogene des ABC-DLBCL NF-κB Signalweges enthüllte, dass eine Verstärkung der BCR-CBM-NF-κB Signaltransduktion häufig mit einer *gain-of-function* Mutation in den BCR Untereinheiten CD79B oder seltener CD79A assoziiert ist. Diese betrifft die intrazellulären ITAM Regionen und kommt in etwa 21 % der ABC-DLBCL vor (Abbildung 1.8). Obwohl diese Mutationen zum ABC-DLBCL Phänotyp beitragen, scheinen sie isoliert nur ein schwaches onkogenes Potential zu besitzen: Eine Expression in GCB-DLBCL resultierte nicht in der Assemblierung eines BCR-Clusters, wie es in ABC-DLBCL Zelllinien beobachtet wurde (Davis et al, 2010).

Wie die Signalweiterleitung zwischen BCR und dem anti-apoptotischen NF-κB Netzwerk in den ABC-DLBCL Zellen entsteht ist weitgehend ungeklärt. In unserer Arbeitsgruppe konnte nun gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivität der PI3K und der nachgeschalteten PDK1 essentiell für das Überleben von distinkten ABC-DLBCL Zelllinien (HBL1 und TMD8) ist, die eine CD79B Mutation besitzen. Nach Inhibition der PI3K Aktivität wurde eine selektive Beeinträchtigung der IKK-NF-κB-Aktivität in diesen Zellen nachgewiesen, die zu einer Reduktion der NF-κB Zielgenexpression führte. Es zeigte sich auch, dass PI3K und PDK1 essentiell für die Aufrechterhaltung der konstitutiven MALT1 Aktivität und der Überlebensfähigkeit dieser ABC-DLBCL Subgruppe sind (Kloo et al, 2011).

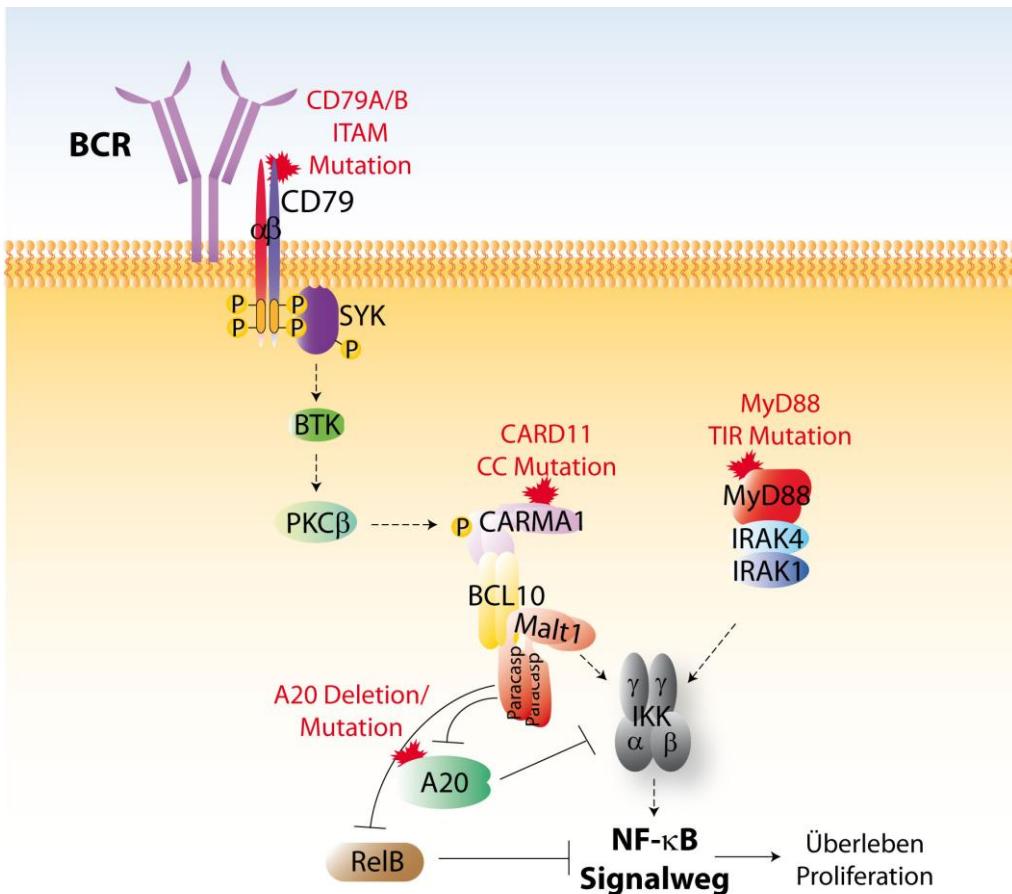


Abbildung 1.8: Onkogene Mechanismen in ABC-DLBCL

Eine Beschreibung der Mechanismen befindet sich im Haupttext

Die konstitutive NF- κ B Aktivität wird allerdings nicht in allen ABC-DLBCL Zelllinien von BCR proximalen Signalproteinen verursacht: Einzelne ABC-DLBCL Zelllinien zeigten sich in den shRNA-Studien resistent gegen die Herunterregulation von BCR-proximalen Signalproteinen. Eine shRNA-vermittelte Herunterregulation von CARMA1 war dennoch toxisch für diese Zellen. Durch eine Sequenzierung der NF- κ B-Signalfaktoren in ABC-DLBCL wurde die Ursache dieses widersprüchlichen Phänomens aufgedeckt. Sie zeigte, dass in etwa 9,6 % der ABC- (z.B. L244P in OCI-ly3), und etwa 3,8 % der GCB-DLBCL Zelllinien somatische Mutationen des *CARD11* (CARMA1) Gens vorliegen, die unabhängig von vorgeschalteten Prozessen den NF- κ B Signalweg antreiben (Davis et al, 2010; Lenz et al, 2008a). Auch in GCB-DLBCL Tumoren tragen die *CARD11* Mutationen zu einer leicht höheren NF- κ B Aktivität im Vergleich zu Wildtyp *CARD11* bei (Lenz et al, 2008a). Die meisten der identifizierten Mutationen sind in sogenannten „hot spots“ innerhalb der *Coiled-coil* Domäne lokalisiert und machen die CARMA1 aktivierende Phosphorylierung durch PKC β oder PDK1 überflüssig (Lamason et al, 2010; Lenz et al, 2008a; Pasqualucci et al, 2011). Die identifizierten *CARD11* Mutationen resultieren daher in einem Funktionsgewinn der Zelle.

Der NF-κB-aktivierende Mechanismus der CARMA1 Mutanten lässt sich vermutlich auf die Bildung diskreter zytoplasmatischer Proteinkomplexe zusammen mit MALT1, CK1 α und phosphoryliertem IKK β zurückführen. Es zeigte sich, dass der Grad der Komplexbildung direkt mit dem NF-κB Aktivierungspotential der unterschiedlichen CARMA1 Mutanten korrelierte (Lenz et al, 2008a).

Die konstitutive NF-κB Aktivität in ABC-DLBCL wird durch weitere onkogenetische Veränderungen von CBM-Signalproteinen ausgelöst oder unterstützt. Eine Deletion oder Inaktivierung des A20 Gens ist in 25 % der ABC- und nur in 2 % der GCB-DLBCL Fälle vorhanden, und essentiell für das Überleben der Lymphome. So wurde als Konsequenz einer A20 Überexpression eine Induktion des apoptotischen Signalweges in ABC-DLBCL Zelllinien beobachtet (Compagno et al, 2009).

Genetische und funktionelle Daten weisen desweiteren auf eine Kooperation des chronisch-aktiven BCR mit einem MyD88-gesteuerten Signalweg bei der Aufrechterhaltung der ABC-DLBCL Überlebensfähigkeit. MyD88 bildet einen Signalkomplex zusammen mit IRAK1/4 und TRAF6, welcher unter anderem die autokrine Sekretion von IL-6 und IL-10 bewirkt. Eine simultane Hemmung des BCR und MyD88 Signalweges resultierte daher in einer kooperativ höheren Sterbensrate von ABC-DLBCL Zelllinien (Ngo et al, 2011). Das Gen für den Signaladapter MyD88 ist in 29 % der ABC-DLBCL Lymphome mutiert und kritisch für das Überleben der Lymphome. In fast allen Fällen ist das L265 innerhalb der TIR Domäne durch Austausch eines Nukleotids zu einem Prolin substituiert. Die Expression der L265P Mutante wirkt sich in einem dominanten Funktionsgewinn für die Zellen aus, was mittels einer shRNA Analyse demonstriert werden konnte. In dieser ermöglichte nur die Expression von L265P MyD88, im Gegensatz zu wt MyD88, das Überleben von über shRNA MyD88-deletierten HBL1 und OCI-Ly3 Zellen. Auch die Aktivität von IRAK1/4 war essentiell für die untersuchten ABC-DLBCL Zelllinien: Eine Behandlung der Zellen mit niedermolekularen IRAK1/4 Hemmstoffen war selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zellen (Ngo et al, 2011). Der IRAK-MyD88-Komplex der ABC-DLBCL Zellen vermittelt die JAK (*janus kinase*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) und NF-κB Aktivität und induziert auf diese Weise die Produktion und autokrine Sekretion von IL-6 und IL-10. Diese Interleukine stellen eine wichtige Grundlage für das autonome Wachstum und die Überlebensfähigkeit der ABC-DLBCL Zellen dar (Ding et al, 2008; Lam et al, 2008).

1.4.2 MALT Lymphome

MALT Lymphome entstehen vorrangig in der gastrischen Mukosa und stellen mit einem Anteil von etwa 8 % der NHL das häufigste extranodale Lymphom dar (Zucca et al, 2000). Zytologische Merkmale und distinkte Oberflächenmarker legen eine Abstammung der

Lymphome von Postkeimzentrums B-Zellen aus der Marginalzone der Milz nahe (Conze et al, 2010). Die meisten gastrischen MALT Lymphome benötigen für ihr kontinuierliches Wachstum ein immunologisches Milieu mit permanenter Antigenstimulation, welches vorrangig mit einer *Helicobacter pylori* Infektion korreliert. Frühe Stadien des Lymphoms können daher häufig durch Auslöschen der Infektion mit Antibiotika geheilt werden (Rosebeck et al, 2011). MALT1 Lymphome entstehen auch an anderen Stellen im Körper, häufig im Kontext von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungsreaktionen.

Obwohl die Lymphomagenese initial in fast allen Fällen von einer Antigen-vermittelten Immunantwort abhängt, wachsen MALT Lymphome in späteren Stadien unabhängig von externen Signalen, indem sie zusätzliche genetische Veränderungen, häufig Translokationen, erwerben (Kingeter & Schaefer, 2010; Wotherspoon et al, 1993). Diese MALT Untergruppen sind, aufgrund ihrer exklusiven chromosomalen Translokationen, Antigen-unabhängig und sprechen nicht auf eine Antibiotika Behandlung an (Liu et al, 2001). Die onkogenetischen Produkte der Translokationen sind häufig positive Regulatoren des NF-κB Signalweges und bewirken eine chronische NF-κB Aktivität, die zur unkontrollierten Proliferation und Lymphomagenese der B-Zellen führt (Isaacson & Du, 2004).

In zwei der in MALT identifizierten chromosomalen Translokationen fällt die Expression von BCL10 und MALT1 unter die Kontrolle des *IgH* Gens. Die t(14;18)(q32;21) Translokation wurde in etwa 18 % der bisher untersuchten MALT Fällen identifiziert. Sie bringt das komplette *MALT1* unter die Kontrolle des *IgH* Gens, wodurch *MALT1* überexprimiert und als Konsequenz der NF-κB Signalweg konstitutiv aktiviert wird (Isaacson, 2005; Streubel et al, 2003). Interessanterweise konnte die Translokation auch in seltenen Fällen von extranodalem DLBCL identifiziert werden (Kuper-Hommel et al, 2013). Die Translokation t(1;14)(p22;q32) bringt das komplette *BCL10* Gen auf 1p22 unter die regulatorische Kontrolle des *IgH* Gens. Als Resultat wird *BCL10* überexprimiert und die Aktivierung des NF-κB- und JNK-Signalweges durch Oligomerisierung der BCL10 CARD Domäne induziert (Du, 2011; Willis et al, 1999).

Die mit etwa 30 % am häufigsten in MALT Lymphomen identifizierte Translokation t(11;18)(q21;q21) resultiert aus der Fusion des *API2* Gens auf 11q21 und des in diesem Kontext entdeckten *MALT1* Gens auf 18q21 (Akagi et al, 1999; Auer et al, 1997; Dierlamm et al, 1999). Als Produkt entsteht eine onkogene Proteinfusion, welche den N-Terminus des Apoptoseinhibitors cIAP2 und den C-terminalen Paracaspase-Ig3 Teil von *MALT1* enthält. Während eine ganze Reihe von chromosomal Bruchstellen innerhalb des *cIAP2* Gens charakterisiert wurden, enthält das *cIAP2-MALT1* Fusionsprotein stets drei intakte BIR (baculovirus IAP repeat) Domänen und zu etwa 98 % die C-terminale UBA Domäne (Abbildung 1.9 A) (Gyrd-Hansen et al, 2008). Das chimäre Protein ist in der

immunologischen Synapse lokalisiert und induziert unabhängig von vorgeschalteten Faktoren sowohl den klassischen als auch den alternativen NF-κB Signalweg (Baens et al, 2006; Conze et al, 2010; Lucas et al, 2001; Uren et al, 2000). Die Translokation beweist damit auch das onkologische Potential einer konstitutiven NF-κB Aktivität: Bei Präsenz der t(11;18)(q21;q21) Translokation sind meist keine weiteren genetischen oder chromosomalen Aberrationen in den MALT Lymphomen vorhanden. Diese Korrelation lässt darauf schließen, dass die über cIAP2-MALT1-vermittelte konstitutive NF-κB Aktivierung bereits ausreichend für die B-Zell Transformation ist (Baens et al, 2006). Der Grund für die starke Aktivierung des klassischen NF-κB Signalweges ist in erster Linie die spontane heterotypische Oligomerisierung der cIAP2 BIR1 Domäne mit der C-terminalen MALT1 Domäne (Lucas et al, 2007). Die Multimerisierung des MALT1 C-Terminus induziert die Aktivierung der Paracaspase Aktivität und vermittelt gleichzeitig die Rekrutierung und Aktivierung des IKK-Komplexes, was zu einer konstitutiven NF-κB Aktivierung führt (Baens et al, 2006; Garrison et al, 2009). Der exakte Mechanismus der IKK-Aktivierung ist noch weitgehend unklar, involviert aber die Bindung von TRAF2 oder TRAF6 an beide Anteile des chimären Proteins: Eine Blockade der TRAF-cIAP2-MALT1 Bindung resultierte in einer deutlichen Abschwächung der NF-κB Aktivierung (Garrison et al, 2009; Noels et al, 2007). Unterstützend für die Rekrutierung des IKK-Komplexes an cIAP2-MALT1 scheint außerdem die Assoziation zwischen der für die NF-κB Aktivierung kritischen UBA Domäne des cIAP2 Abschnitts und ubiquitiniertem IKK γ (Gyrd-Hansen et al, 2008). Auch die BCL10 Bindung an das cIAP2 Fragment des Fusionsproteins (1 - 441) scheint eine Verstärkung der NF-κB Signalkaskade auszulösen (Hu et al, 2006). Ein weiterer Grund für die ausgeprägten NF-κB Signale könnte in der autoregulatorischen Expression der Translokation liegen, die selbst Ziel der NF-κB Genexpression ist und das Potential der NF-κB Aktivierung durch eine positive Rückkopplung erhöht (Hosokawa et al, 2005).

1.4.3 Funktion der MALT1 Paracaspase für die Pathogenese von ABC-DLBCL und MALT Lymphomen

ABC-DLBCL Zelllinien weisen eine konstitutive MALT1 Aktivität auf, die, neben der adaptiven Rolle von MALT1 als Teil des CBM-Komplexes, essentiell für eine vollständige NF-κB Aktivität und das zelluläre Überleben von ABC-DLBCL Zelllinien sind. Zwei parallele Studien offenbarten die kritische Funktion der Paracaspase Aktivität, indem DLBCL Zellen mit dem MALT1 Inhibitor Z-VRPR-FMK behandelt wurden und als Folge eine selektive Reduktion der MALT1 Zielproteinspaltung sowie der NF-κB Genexpression selektiv in ABC-DLBCL Zellen auftrat. Als Resultat war die Zellproliferation und das Überleben der Zellen stark

eingeschränkt (Ferch et al, 2009; Hailfinger et al, 2009a; Hailfinger et al, 2011; Kloo et al, 2011). Die Gründe für die kritische Rolle der Paracaspase Aktivität in ABC-DLBCL liegen vorrangig in der konstitutiven Spaltung von zwei der bisher identifizierten Zielproteine - A20 und RelB. Vor allem die RelB Spaltung hat drastische Folgen für die konstitutive NF-κB Aktivität der ABC-DLBCL: Studien zeigen, dass eine Überexpression des RelB Proteins in einer drastischen Verringerung der NF-κB Aktivität und der ABC-DLBCL Zellzahlen resultiert. Grund ist die Verdrängung der für die konstitutive Aktivität wichtigen NF-κB Untereinheiten RelA und c-Rel von ihren Zielgenen, was die Expression dieser Gene unterbindet (Hailfinger et al, 2011).

Die Entdeckung, dass die Paracaspase Funktion kritisch für das Überleben von ABC-DLBCL Zelllinien ist, weckte das Interesse an MALT1 als Ziel einer therapeutischen Behandlung von ABC-DLBCL. Bisher war unklar, inwiefern eine deregulierte MALT1 Funktion die Tumorgenese von B-Lymphozyten beeinflussen kann. In einer aktuellen Studie konnte nun ein Hinweis auf eine bedeutende Rolle von MALT1 bei der Entwicklung von B-Zell Lymphomen wie DLBCL oder den MALT Lymphomen entdeckt werden: Die Expression des *MALT1* Gens in hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen induzierte die B-Zell Lymphomagenese zu einem MALT- und DLBCL-ähnlichen Phänotyp (Vicente-Duenas et al, 2012).

Alle Fusionsprodukte der t(11;18)(q21;q21) Translokation in MALT Lymphomen besitzen eine deregulierte Paracaspase Aktivität, die einen bedeutenden Anteil an der konstitutiven Aktivierung des klassischen und alternativen NF-κB Signalweges ausmacht (Rosebeck et al, 2011). Als Proteinsubstrate der konstitutiven cIAP2-MALT1 Paracaspase Aktivität wurden bisher A20, CYLD und in einer aktuellen Studie die Kinase NIK identifiziert (Rosebeck et al, 2011; Staal et al, 2011).

Durch Spaltung des A20 Proteins wird, in Übereinstimmung mit der Funktion der Paracaspase in ABC-DLBCL, ein negativer Regulator des NF-κB Signalweges entfernt (Coornaert et al, 2008). Die Spaltung des NIK Proteins C-terminal von R325 konnte nur in t(11;18) positiven MALT Lymphomen nachgewiesen werden und führt zur konstitutiven Aktivierung des alternativen NF-κB Signalweges (Abbildung 1.9 B). Der Grund für die exklusive Spaltung von NIK in diesen MALT Lymphomen liegt in der Rekrutierung von NIK an den N-terminalen cIAP2 Anteil des chimären cIAP2-MALT1 Proteins, was, aufgrund der molekularen Nähe der C-terminalen Paracaspase, die Spaltung des Proteins ermöglicht. Entsprechend ist eine Überexpression von MALT1 alleine nicht ausreichend für die Spaltung von NIK (Rosebeck et al, 2011). Das C-terminale NIK Fragment (~ 70 kDa) besitzt Kinaseaktivität und wird nach Spaltung vom N-Terminus (~ 37 kDa), der die Bindungsregion des negativ-regulatorischen TRAF2/3-cIAP2-Komplexes enthält, stabilisiert (Conze et al,

2010; Rosebeck et al, 2011). Als Folge wird die Aktivierung des alternativen NF-κB Signalweges über Phosphorylierung von IKK α eingeleitet. Als Resultat der cIAP2-MALT1-vermittelten Spaltung von NIK ist das MALT Lymphom durch die konstitutive NF-κB Zielgenexpression vor Apoptose geschützt und weist zudem eine höhere extrazelluläre Adhäsionsfähigkeit auf, was eine Ursache für den aggressiven Charakter dieser Lymphome darstellt (Rosebeck et al, 2011).

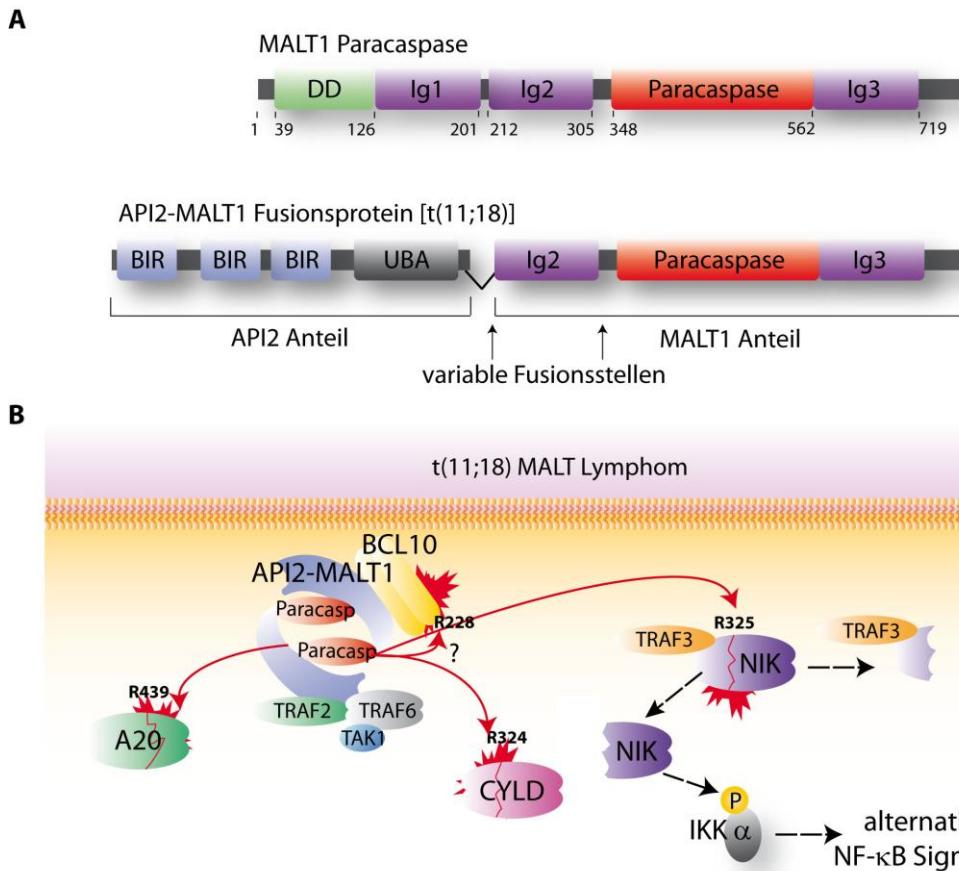


Abbildung 1.9: Darstellung der cIAP2-MALT1-vermittelten Regulation des alternativen NF-κB Signalweges. (A) Übersicht über die Proteindomänen des cIAP2-MALT1 Fusionsproteins. **(B)** Übersicht über die identifizierten Substrate der cIAP2-MALT1 Paracaspase Aktivität und die Induktion des alternativen NF-κB Signalweges durch die Paracaspase-vermittelte Spaltung von NIK.

Die funktionellen Konsequenzen der t(11;18)(q21;q21) Translokation verdeutlichen die zentrale Rolle von MALT1 bei der Regulation der NF-κB Aktivierung und Lymphomagenese. Die starke Aktivierung des NF-κB Signalweges durch cIAP2-MALT1 liegt allerdings im Kontrast zur subtilen Rolle der proteolytischen MALT1 Aktivität bei der Regulation der Antigen-vermittelten NF-κB Antwort.

1.5 Zielsetzung

B-Zell Lymphome des DLBCL Typs gelten als aggressive Tumorentitäten und insbesondere die Diagnose mit dem ABC-DLBCL Subtyp stellt eine schlechte Prognose für die Patienten dar. Die Paracaspase MALT1 ist im Menschen einzigartig und besitzt eine essentielle Funktion bei der Lymphomagenese und dem NF- κ B-vermittelten Überleben der ABC-DLBCL Tumore: Die Behandlung mit einem MALT1-spezifischen Inhibitorpeptid führte zu einem selektiven Absterben der ABC-DLBCL Zelllinien. Die pharmazeutische Hemmung der Paracaspase Aktivität ist somit von herausragender Bedeutung für die Behandlung von ABC-DLBCL.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der ersten niedermolekularen MALT1 Inhibitoren durch einen Hochdurchsatz Wirkstoffscreening. Eine weiterführende Untersuchung der identifizierten Verbindungen sollte ihren Wirkmechanismus, ihre Effektivität und MALT1 Selektivität aufzeigen. Zusätzlich sollte ihr Einfluss auf die T-Zell Aktivierung und die Überlebensfähigkeit von ABC-DLBCL Zelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Anhand der Resultate sollte anschließend eine Einschätzung ihres therapeutischen Potentials für die Behandlung von MALT1-abhängigen Lymphomen vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Produkt	Hersteller/Vertrieb
Agarosegelkammern	Harnischmacher (Nottuln)
Chemilumineszenzfilme ECL Films	GE Healthcare (München)
CO ₂ Inkubator CB150	Binder (Tuttlingen)
Durchflusszytometer LSR-II	BD (Heidelberg)
Einmalküvetten	BRAND (Wertheim)
Einmalpipetten Cell Star	Greiner (Frickenhausen)
Elektroporationsküvetten	Biorad (München)
Elektroporator Gene pulser Xcell System	Biorad (München)
EMSA Apparatur X952.1	Roth (Karlsruhe)
EMSA Filme BioMax MS	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Entwickler Optimax 1170-000	Protec (Obersternfeld)
Feinwaage AB204	Mettler Toledo (Giessen)
Geltrockner 583	Biorad (München)
Gestopfte Spitzen	StarLab (Hamburg)
Hyperfilme	GE Healthcare (München)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Inkubatoren	Sartorius (Göttingen)
Kodak Biomax MS Filme	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kryoröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Mikroskope:	
Zellkultur	Leica (Wetzlar)
Axioplan 2	Zeiss (Oberkochen)
Mikroplatten Reader Synergy II	Bioteck (Bad Friedrichshall)
Mikrotiterplatten Non-binding	Corning (NY, USA)
Mikrotiterplatten Zellkultur	Nunc (Rochester), BD (Heidelberg)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
Rotator	Neolab (München)
pH-Meter HI 221	HANNA Instruments (Kehl)
Petrishalen	Greiner (Frickenhausen)
Photospektrometer	Eppendorf (Hamburg)
Photospektrometer µQuant	Bioteck (Bad Friedrichshall)

Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen epTIPS	Eppendorf (Hamburg)
PVDF Membran	Millipore (Schwalbach)
SDS-PAGE Gelkammern	Roth (Karlsruhe)
Semi-Dry Blotter	PHASE (Lübeck)
Sonifikator U9200S	Hielscher Ultrasonics (Teltow)
Spannungsquelle	Consort (Turnhout, Belgien)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Whatman-Filterpapier	Roth (Karlsruhe)
Zählkammer	Neolab (München)
Zellkulturplatten/-flaschen	Nunc; BD (Heidelberg)
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Gekühlte Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge Zellkultur 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Beckmann Avanti J-26 XP	Beckmann Coulter (Krefeld)

2.1.2 Chemikalien

Reagenz

	Hersteller/Vertrieb
ATP-(γ^{32} P)	Perkin-Elmer (Wiesbaden)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumpersulfat	Biorad (München)
Ammoniumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Atufect	Silence Therapeutics (Berlin)
Bradford Reagenz	Biorad (München)
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA (Pasching, AUT)
β -Glycerophosphat	Merck (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Roth, Life Technologies
CHAPS	Roth (Karlsruhe)
DMEM	Life Technologies (Darmstadt)
DMSO	Roth, Sigma
dNTPs	Fermentas (St.Leon-Roth)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (p.a.)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt)
Glutathion, red.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Ionomycin	Calbiochem (Schwalbach)
LB Pulver	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Lymphoprep	Axis-Shield (Oslo, Norwegen)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roth (Karlsruhe)
Methanol (p.a.)	Merck (Darmstadt)
MES	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Natrium Vanadat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
NP-40 (Nonidet P40 Substitute)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
OptiMEM I	Life Technologies (Darmstadt)
Page Blue Protein Staining Solution	Thermo Scientific (Rockford, IL USA)
PageRuler Protein Standard	Fermentas (St.Leon-Roth)
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Calbiochem (Schwalbach)
Probenpuffer 4 x SDS (RotiLoad 1)	Roth (Karlsruhe)
Proteaseinhibitoren (Complete, Mini)	Roche (Mannheim)
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare (Freiburg)
TEMED (Tetramethylen-Diamin)	Biorad (München)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Life Technologies (Darmstadt)
Trypsin/ EDTA	Life Technologies (Darmstadt)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

2.1.3 Pharmakologische Inhibitoren und Peptide

Reagenz	Hersteller/Vertrieb
Ac-DEVD-AMC (ALX-260-031)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Ac-DEVD-CHO (ALX-260-030)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Ac-LRSR-AMC (MCA-3952-PI)	Peptides International (Kentucky, USA)
Antipain (ALX-260-093)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Aprotinin (A4529)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BOC-LRR-AMC (BML-BW8515-0005)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Bz-VGR-AMC (BML-BW9375-0005)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Chymostatin (C7268)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
E-64 (324890)	Calbiochem (Schwalbach)
Leupeptin-Hemisulfat (108975)	Calbiochem (Schwalbach)
MG132 (474790)	Calbiochem (Schwalbach)
Mepazin (5216177)	Hit2lead (San Diego, USA)
Pepstatin A (P5318)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phenothiazin Derivate	Sigma-Aldrich, LOPAC Library, Hit2lead
Promazin (P6656)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Promethazin (P4651)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Thioridazin (T9025)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TLCK (BML-PI121-0200)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Ubiquitin-AMC (BML-SE211-0025)	ENZO Life Sciences (Lörrach)
Z-VRPR-FMK (ALX-260-166)	ENZO Life Sciences (Lörrach)

2.1.4 Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller/Vertrieb
Dead End Colorimetric TUNEL Kit	Promega (Mannheim)
ELISA h/mIL-2 Kit	eBioScience/Bender Medsystems
Expand High Fidelity PCR system	Roche (Mannheim)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Herculase II DNA Polymerase	Agilent Technologies (Waldbronn)
LC 480 SYBRGreen Master Mix	Roche (Mannheim)
LumiGLO System	Pierce, NEB
Nucleospin Mini Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PE Annexin-V Apoptosis Detection kit	BD (Heidelberg)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

Q1 RNase-freie DNase	Promega (Mannheim)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas/NEB
RNeasy RNA isolation Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript II Reverse Transkriptase	Life Technologies (Darmstadt)

2.1.5 Puffer und Lösungen

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer

50 mM Tris-HCL, pH 8,3; 50 mM Borsäure; 1 mM EDTA;

PBST

1 x PBS; 0,1 % Tween-20

Prokaryotisches Kulturmedium

20 g/L LB

Waschpuffer für Primärzellen

1 x PBS; 0,1 % BSA (w/v); 2 mM EDTA

Zellaufschluss

Aufschlusspuffer

50 mM HEPES, pH 7,5; 10 % Glycerin (v/v); 0,1 % Triton X-100 (v/v); 1 mM Dithiothreitol (DTT); 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 25 x Proteaseinhibitoren (Roche)

Koimmunpräzipitations (KoIP) Puffer

150 mM NaCl; 25 mM HEPES, pH 7,5; 0,2 % NP-40; 1 mM Glycerin; 10 mM NaF; 1 mM DTT; 8 mM β-Glycerophosphat; 20 µM Na-Vanadat (pH 10,0); 25 x Proteaseinhibitoren (Roche)

EMSA

Hochsalzpuffer

20 mM HEPES, pH 7,9; 350 mM NaCl; 20 % Glycerin (v/v); 1 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 0,1 EGTA; 1 % NP-40 (v/v); 0,5 M NaF; 1 M DTT; 1 M β-Glycerophosphat; 200 mM Na-Vanadat; 25 x Proteaseinhibitoren (Roche)

EMSA Annealing Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 70 mM NaCl

Proteinreinigung & Spaltungsexperimente

Waschpuffer

50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl

GST Elutionspuffer

50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 15 mM reduziertes Glutathion

Gefrierpuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl, 20 mM β -Mercaptoethanol; 2,5 mM EDTA, 10 % Saccharose (w/v); 0,1 % CHAPS

Spaltungspuffer (MALT1/ Caspasen)

50 mM MES, pH 7,0; 150 mM NaCl ; 10 % Saccharose (w/v); 0,1 % CHAPS (w/v); 1 M Ammonium-/ Natriumcitrat; 10 mM DTT

SDS-PAGE

Polyacrylamid Sammelgel

125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 % Acrylamid; 0,1 % SDS (w/v); 0,1 % APS (w/v); 0,1 % TEMED (v/v)

Polyacrylamid Trenngel

375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 9-12,5 % Acrylamid; 0,1 % SDS (w/v); 0,075 % APS (w/v); 0,05 % TEMED (v/v)

SDS-PAGE Laufpuffer (1 x)

25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS (w/v)

Western Blot

Blocklösung

3 % BSA oder Milchpulver (w/v) in PBST

Stripping Puffer

pH 2,2; 0,2 M Glycin; 0,1 % SDS (w/v); 1 % Tween 20 (v/v)

Blotpuffer

48 mM Tris, pH 8,0; 39 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v); 0,037 % SDS (w/v);

PBS (Phosphate Buffered Saline) (1x)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄

2.1.6 Zellkulturmedien und -zusätze

Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt)
Humanes Plasma	Klinikum rechts der Isar (München)
Heparin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol	Life Technologies (Darmstadt)
L-Glutamin	Life Technologies (Darmstadt)
Natrium-Pyruvat	Life Technologies (Darmstadt)
OPTIMEM	Life Technologies (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt)
RPMI 1640	Life Technologies (Darmstadt)
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Life Technologies (Darmstadt)

2.1.7 Escherichia coli Stämme

OneShot TOP10 (Life Technologies, Darmstadt)

Chemisch kompetente Bakterien zur stabilen *high copy* Replikation von Plasmiden.

-hsdR, -mcrA, -lacZΔM15, -endA1, -recA1

BL21CodonPlus RILP (Agilent Technologies, Waldbronn)

Auf Produktion rekombinanter Proteine spezialisierter Bakterienstamm. Kodiert für zusätzliche tRNA Gene (*argU*, *ileY*, *leuW*, *proL*).

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

2.1.8.1 B-Zelllinien

DLBCL Zelllinien entstammen humanen B-Zell Lymphomen aus Patientenproben.

2.1.8.1.1 ABC-DLBCL (activated b-cell like diffuse large b-cell lymphoma)

HL6, OCI-Ly3, OCI-Ly10, U2932, TMD8

2.1.8.1.2 GCB-DLBCL (germinal center b-cell like diffuse large b-cell lymphoma)

Su-DHL-6, Su-DHL-4, BJAB

2.1.8.2 T-Zelllinien

Jurkat Humane T-Zelllinie
JPM 50.6 CARMA1-defiziente humane T-Zelllinie

2.1.9 Plasmide

pEF 3x FLAG

Eukaryotischer Expressionsvektor, der aus dem pEF4HIS-C (Invitrogen/Stratagene) Basisvektor abgeleitet wurde: Die His-Sequenz wurde in diesem Prozess durch drei Tandem Flag-Sequenzen ersetzt.

pGEX-6P-1

Prokaryotischer Expressionsvektor, der die Sequenzen zur N-terminalen Konjugation von GST enthält (Amersham).

2.1.10 Oligonukleotide

2.1.10.1 Primer der quantitativen Real-time RT-PCR

hRPII For:	GCACCACGTCCAATGACAT
hRPII Rev:	GTGCGGCTGCTTCCATAA
hIL-2 For:	CACAGCTACAACGGAGCATTAC
hIL-2 Rev:	TGCTGATTAAGTCCCTGGGTC
m β -Aktin For:	CCTCTATGCCAACACAGTGC
m β -Aktin Rev:	GTACTCCTGCTTGCTGATCC
mlL-2 For:	GAGTGCCAATTGATGATGAG
mlL-2 Rev:	AGGGCTTGTTGAGATGATGC

2.1.10.2 siRNA

siA20: GCA-CCA-UGU-UUG-AAG-GAU-A

2.1.10.3 EMSA Sonde

NF- κ B (H2K) For:	GATCCAGGGCTGGGATTCCCCATCTCCACAGG
NF- κ B (H2K) Rev:	GATCCCTGTGGAGATGGGAATCCCCAGCCCTG

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primärantikörper

anti-A20	eBioscience (Frankfurt)
anti-βAKTIN (I-19)	Santa Cruz Technology (Heidelberg)
anti-BCL10 (C-17)	Santa Cruz Technology (Heidelberg)
anti-BCL10 (H-197)	Santa Cruz Technology (Heidelberg)
anti-BCL _{XL}	Cell Signalling/NEB (Frankfurt)
anti-CARMA1 (1D12)	Cell Signalling/NEB (Frankfurt)
anti-hCD3 (HIT3a)	BD (Heidelberg)
anti-hCD28 (CD28.2)	BD (Heidelberg)
anti-mCD3 (145-2C11)	BD (Heidelberg)
anti-mCD28 (37.51)	BD (Heidelberg)
anti-c-FLIP L/S	ENZO Life Sciences (Lörrach)
anti-FLAG (M2)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-MALT1 (B12)	Santa Cruz Technology (Heidelberg)
anti-MALT1 (H-300)	Santa Cruz Technology (Heidelberg)
anti-RelB	Cell Signalling/NEB (Frankfurt)

2.1.11.2 Sekundärantikörper

anti-Kaninchen	Jackson ImmunoRes. (Newmarket, UK)
anti-Maus	Jackson ImmunoRes. (Newmarket, UK)
anti-Ziege	Jackson ImmunoRes. (Newmarket, UK)
anti-Ratte	Jackson ImmunoRes. (Newmarket, UK)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Jurkat T-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Life Technologies) mit Zusatz von 10 % FCS (*fetal calf serum*) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Primäre murine T-Zellen und humane PBMCs wurden im gleichen Medium mit Zusatz von 50 µM β-Mercaptoethanol gehalten. DLBCL Zelllinien wurden in RPMI Medium mit Zusatz von 20 % FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Eine Ausnahme bildete die ABC-DLBCL Zelllinie OCI-Ly10, die in IMDM Medium (Life Technologies) mit 20 % humanem Plasma (Klinikum rechts der Isar), 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin, Heparin (5000 U/ml) und 50

μM β -Mercaptoethanol gehalten wurde. Alle Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert und unter sterilen Bedingungen eingesetzt.

2.2.1.2 Aufreinigung und Kultivierung von primären humanen und murinen Zellen

Die Isolierung von humanen mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus Heparin behandeltem (1000 U/ 50 ml Spenderblut) Gesamtblut erfolgte mit Hilfe von Lymphoprep nach Anleitung des Herstellers (Axis-Shield). Um eine Auftrennung der Erythrozyten, des Blutplasmas und der Lymphozyten zu erzielen wurde das Blut zunächst bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen Blutplasma (oben) und Erythrozyten (unten) sammeln sich bei diesem Verfahren Lymphozyten und Blutplättchen an, die mit einer sterilen Pipette abgenommen wurden. Zur Abtrennung der Blutplättchen wurde die Suspension anschließend mit 35 ml PBS verdünnt und auf 15 ml Lymphoprep geschichtet. Nach Zentrifugation (160 g, 20 min, RT) wurden die im Überstand gesammelten Blutplättchen verworfen und die verbliebene Zellsuspension erneut zentrifugiert (350 g, 20 min, RT). Die Trennschicht zwischen Lymphoprep und Suspension enthält anschließend die isolierten PBMCs, die in ein neues Reaktionsgefäß (50 ml) überführt und nach Zugabe eines Waschpuffers abzentrifugiert wurden (400 g, 5 min, RT). Nach zwei weiteren Waschschriften bei 225 g für 5 min wurden die Zellen anschließend in RPMI Primärmedium kultiviert.

Die Isolierung muriner CD4⁺ T-Zellen erfolgte aus Präparationen der Milz sowie axialen, inguinalen, cervicalen und mesenterialen Lymphknoten unter Verwendung magnetischer Partikel (Life Technologies). Die Aufreinigung basiert auf der spezifischen Interaktion der CD4-exprimierenden T-Lymphozyten an mit CD4-Antikörper beschichteten Partikeln, die aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaft durch ein Magnetfeld aus einer Zellsuspension isoliert werden können. Zur Präparation der Zellen wurden die Milz und Lymphknoten separat durch einen *Cell Strainer* (\varnothing 100 μm) gedrückt und durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und 4°C von Geweberesten befreit. Die Erythrozyten der Zellsuspension wurden durch eine partielle Lyse entfernt. Zu diesem Zweck wurde das Zellpellet in TAC-Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert, wo die Erythrozyten aufgrund ihrer verminderten Fähigkeit zur Regulation der Osmose platzen. Die verbleibenden Zellen wurden gewaschen und zentrifugiert, um verbleibende Gewebsreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen vereint und in RPMI Zellmedium mit 1 % FCS aufgenommen. Die α CD4-Partikel wurden zuerst zweimal in Zellmedium mit 1 % FCS gewaschen und dann je 70 μl pro Maus zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Unter Verwendung eines Magneten wurden die gebundenen CD4⁺ T-Zellen aus der Suspension abgefangen und gewaschen. Durch Zugabe von kompetitiven

Detacha-beads (Life Technologies) wurden die Zellen anschließend von den magnetischen Partikeln entfernt und in Zellmedium aufgenommen.

2.2.1.3 Transfektion, Stimulation und Inkubation mit Inhibitoren

Die Transfektion von Jurkat T-Zellen (8×10^6) mit 2 µg Plasmid-DNA erfolgte per Elektroporation (Gene pulser Xcell System) bei 220 V und 1000 mA in 4 mm Elektroporationsküvetten (Biorad, München). 72 Stunden nach Transfektion konnten die Zellen für weitere Analysen verwendet werden.

Die Stimulation von Jurkat T-Zellen, humanen PBMCs und murinen CD4⁺ T-Zellen wurde entweder durch die Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 200 ng/ml) und Ionomycin (I; 300 ng/ml) oder von hCD3/ hCD28 und mIgG1/ mIgG2a Antikörpern (BD Biosciences) initiiert. PMA ist ein chemisches Analogon von Diacylglycerin (DAG), das durch Bindung an PKC β oder θ die Aktivierung der Kinase und als Folge die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade und Proliferation der Zelle induziert (Iwata et al, 1996). Eine parallele Behandlung der Zellen mit dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin führt zur Calcium Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum und zur Hydrolyse von Phosphoinositiden. Als Konsequenz werden verschiedene Ca²⁺-abhängige Signalwege (Calcineurin/Calmodulin-NFAT, PKC-NF- κ B etc.), die ebenfalls zur Produktion von IL-2 und Aktivierung der Zelle beitragen, induziert (Chatila et al, 1989).

Die Inkubation von primären Zellen und Suspensionszelllinien mit Reagenzien und pharmazeutischen Wirkstoffen erfolgte unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen in sterilen 10 ml Reaktionsflaschen oder 6-/12-Loch Zellkulturplatten. Z-VRPR-FMK (ENZO Life Sciences) wurde in H₂O gelöst. Mepazin-HCL (Hit2lead), Promazin-Hydrochlorid, Thioridazine-Hydrochlorid, Promethazin-Hydrochloride (alle von Sigma-Aldrich) und andere getestete Phenothiazin Derivate (PD) (Hit2lead oder Sigma-Aldrich) wurden in DMSO gelöst. Die Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel versetzt.

2.2.1.4 Lentivirale Transduktion von ABC-DLBCL Zellen

Zur lentiviralen Transduktion der ABC-DLBCL Zelllinie HBL1 mit der konstitutiv aktiven FLAG-IKK β (calKK β) Mutante (SS176, 180EE) wurde die kodierende Sequenz der Mutante über eine ko-translationelle T2A (Hadian et al. 2011) Prozessierungseite an GFP verlinkt und in den lentiviralen Expressionsvektor pLVTHM integriert. Für die Virusproduktion wurden 1×10^6 293 T-Zellen in eine 10cm Platte eingesätzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Lentiviralen Vektor-Konstrukten, 3µg Transfervektor, 1,5µg pMD2.G und 1µg psPAX2 (Wiznerowicz & Trono, 2003) mittels X-tremeGENE HP (Roche) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 72 h wurde der viruspartikelhaltige Überstand abgenommen,

sterilfiltriert (Millipore Filter, Porengröße 0,45 µm) und mittels Amicon Ultra 100K (Millipore) aufkonzentriert. Anschließend wurde der aufkonzentrierte Virusüberstand mit 8 µg/ml Polybrene auf die HBL-1 Zellen gegeben und für 90 min bei 1000 g und 37 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden danach einmal mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Nach Kultivierung für eine Woche wurden die HBL1 Zellen per FACS sortiert, wobei im Anschluss über 95 % der Zellen GFP-positiv waren.

2.2.1.5 Analyse der Zellvitalität und Apoptose

Die Vitalität der DLBCL Zellen wurde 2 Tage nach einmaliger Zugabe der PD mittels MTT Zytotoxizitätstest in Relation zu DMSO-behandelten Referenzzellen ermittelt. Dieses Verfahren beruht auf der zellvermittelten Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blau-violetten Farbstoff (Formazan), dessen Farbintensität ein Maß für die Vitalität der Zellen darstellt, da nur vitale Zellen zur Reduktion des Farbstoffs fähig sind. Die Farbintensität des Formazan wurde durch eine Absorptionsmessung bei $\lambda = 450$ nm mit einem µQuant Mikroplatten Spektrophotometer (Bioteck) bestimmt. Die Bestimmung der DLBCL Zellzahlen erfolgte 4 Tage nach einmaliger PD Gabe unter Trypan-Blau Ausschluss mit einer Zählkammer. Die Apoptoserate wurde analog nach 5 Tagen Inhibitorinkubation durch eine PE-Annexin-V Färbung 7AAD^{neg} Zellen (BD Pharmingen) mittels einer FACS Analyse bestimmt.

2.2.1.6 Präklinisches ABC-DLBCL Tumormodell

Die ABC-DLBCL Zelllinie OCI-Ly10 und die GCB-DLBCL Zelllinie Su-DHL-6 wurden in 6 bis 8 Wochen alte NOD.Cg-Prkdc^{scid} /I2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) Mäuse durch subkutane Injektion von 4×10^6 Zellen in die gegenüberliegenden Flanken individueller Mäuse eingebracht. Ein Wachstum der Tumore erfolgte allerdings nur unter Zugabe von Matrigel (BD). Für jede Behandlungsgruppe wurden 3 Mäuse vorbereitet und die intraperitoneale (i.p.) Verabreichung des Lösungsmittels (PBS) in die Referenzgruppe, sowie 400 µg Mepazin (~16 mg/kg) oder 300 µg Thioridazin (~12 mg/kg) erfolgte erstmalig 24 Std nach Injektion der Zellen und wurde anschließend täglich wiederholt. Die Größe der Tumore wurde nach visuellem Auftreten täglich mit einer Schublehre ermittelt (mm^2 , Länge x Weite). Bei einem Tumorvolumen von 250 (Su-DHL-6) bzw. 200 mm^2 (OCI-Ly10) wurden die Mäuse erlöst und die Tumore entfernt. Die Stastistischen Werte wurden über einen Two-way Anova Test erhoben (Durchgeführt von Stefani Spranger, Institut für molekulare Immunologie, HMGU München).

Zur Bestimmung der Apoptoserate der DLBCL Tumore erfolgte eine kolometrische TUNEL Färbung von kryogenen OCI-Ly10 und Su-DHL-6 Tumorgewebeschnitten (5 - 10 µm) unter

Verwendung des kolorimetrischen *Dead end TUNEL Kits* (Promega) nach Protokoll des Herstellers. Die Gewebeschnitte wurden im Anschluß mit Hämatoxylin angefärbt und mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop analysiert (20 x). Für die pharmakokinetische Studie von Thioridazin wurden NSG Mäuse einmalig mit 12 mg /kg (300 µg) Thioridazin per i.p. Injektion behandelt. Jeweils 1, 2, 6 und 24 Stunden nach der Injektion wurde das Blutserum von 3 Mäusen pro Zeitpunkt isoliert und die Thioridazin Konzentration mittels HPLC durch ein Standard Diagnostikverfahren ermittelt (MVZ Dortmund).

2.2.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.2.2.1 SDS-PAGE

Zur großenabhängigen Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Bei diesem analytischen Verfahren wird die Eigenladung der Proteine durch Denaturierung mit SDS überdeckt und eine lineare Auftrennung anhand des Molekulargewichts ermöglicht. Um den Polymerisierungsgrad des Trengels, und somit die Porengröße des Gels, an die zu analysierende Proteingröße anzupassen, wurde die Acrylamid Konzentration des Trengels variiert. Um ein Austrocknen des Trengels in der Gelkammer zu verhindern wurde es bis zur Zugabe des Sammelgels mit Isopropanol überschichtet. Zur Denaturierung wurde den Proben ein SDS-Probenpuffer zugegeben und die Mischung anschließend für 2 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 14000 rpm und RT. Neben den Proben wurde zusätzlich ein Proteinstandard (PageRuler, Fermentas) zur Abschätzung des Molekulargewichts auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 - 180 Volt und im Anschluss erfolgte entweder die Übertragung der Proteine auf eine PVDF Membran (2.2.2.2) oder die direkte Färbung der Proteinbanden per kolloidaler Coomassie-Färbung (Page Blue). Hierzu wurde das Gel zunächst für 2 - 4 Stunden in der Coomassie Farbstofflösung inkubiert und anschließend durch Waschschrifte mit VE-Wasser partiell entfärbt.

2.2.2.2 Immundetektion von Proteinen per Western Blot

Zur immunologischen Detektion wurden die aufgetrennten Proteine der SDS-PAGE per Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Durchführung des Transfers erfolgte in einem *Semi-Dry Blotter* für 105 Minuten bei einer Stromstärke von 60 mA pro Gel. Die Gele der SDS-PAGE wurden hierzu mit einer über Methanol aktivierten Membran kombiniert und, zur Unterstützung des Stromflusses, beidseitig mit Blotpuffer-getränkten Whatman Papieren (3 x) umhüllt. Nach Transfer der Proteine wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran mittels 60-minütiger Inkubation in einer 3 % BSA- oder Milch-

PBST Lösung blockiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgt anschließend durch Zugabe des spezifischen Erstantikörpers über Nacht bei 4 °C in einer 1,5 % BSA- oder Milch-PBST Lösung. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST wurde die Membran anschließend mit dem gegen den Erstantikörper-gerichteten Zweitantikörper für 1 Std bei RT in 0,75 % BSA- oder Milch-PBST inkubiert. Die am Zweitantikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase besitzt eine katalytische Aktivität, über die nach Zugabe eines chemilumineszenten Substrats (LumiGLO) Licht erzeugt wird, das durch Auflegen eines Licht-sensitiven Films auf die Membran detektiert werden kann. Nach dem Entwickeln weist eine Färbung des Films anschließend auf eine positive Detektion des Zielproteins.

2.2.2.3 Koimmunpräzipitation (KoIP)

Um die Aktivität zellulärer MALT1 Proteine zu messen und die Stimulations-abhängige Bildung des CBM-Komplexes zu untersuchen wurden MALT1 bzw. BCL10 und überexprimierte FLAG-MALT1 Proteine mit einem spezifischen Antikörper aus Zelllysaten präzipitiert. Zur Präzipitation von endogenem MALT1 wurden 5×10^6 Zellen mit einem HEPES Aufschlusspuffer lysiert. Die Immunpräzipitation von MALT1 erfolgte nach Zusatz von 4 µl Antikörper (H-300) zu 400 µl des gereinigten Zelllysats. Nach Inkubation für 16 Std. bei 4 °C wurden 15 µl Protein G-Sepharose (Roche) zugegeben und die Sepharose nach einer weiteren Inkubation für 60 Minuten mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend im Spaltungsexperiment verwendet (Abschnitt 2.2.2.6).

Die Präzipitation von BCL10 und den MALT1 Mutanten erfolgte um die Stimulations-abhängige Rekrutierung von CARMA1 an die präzipitierten Proteine zu untersuchen. Dieses Verfahren kann zur Analyse der CBM-Komplexbildung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen eingesetzt werden. Zur Durchführung wurden 1×10^7 unbehandelte oder $\sim 5 \times 10^7$ transfizierte Jurkat T-Zellen mit KoIP-Puffer lysiert. Die IP von BCL10 erfolgte mit 4 µl (C-17) Antikörper und FLAG-konjugierte Proteine wurden mit 1 µl FLAG Antikörper (M2) präzipitiert. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte wie bei der MALT1-IP beschrieben. Die Sepharose wurde zum Schluss mit KoIP Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) gewaschen, in SDS-Puffer aufgenommen und durch eine SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.4 ELISA

Die Bestimmung der IL-2 Sekretion von Jurkat T-Zellen, primärer humaner PBMCs oder muriner CD4⁺ T-Zellen erfolgte per ELISA. Die IL-2 Konzentration wurde im Zellmedium der Zellen, nach Prä-Inkubation mit Mepazin, Thioridazin oder DMSO für 3 Std und anschließender Stimulation mit P/I oder antiCD3/CD28 für 20 Std ermittelt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach Anleitung des Herstellers (BenderMed Systems). Entsprechend

wurde die IL-6 und IL-10 Sekretion von ABC- und GCB-DLBCL Zellen analysiert (Immunotoools).

2.2.2.5 EMSA

Zur Analyse der NF-κB Aktivität von HBL1 Zellen nach Zugabe von MALT1 Hemmstoffen wurde ein EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) durchgeführt. Prinzip dieser Methode ist die verringerte Migration von DNA nach spezifischer Bindung eines Proteins: Sind aktive NF-κB Heterodimere anwesend verringert sich die Migrationsgeschwindigkeit einer DNAsonde, die eine spezifische H2K κB Bindungssequenz enthält, in einem nativen Polyacrylamidgel. Zunächst wurde eine doppelsträngige Sonde aus synthetisierten DNA-Oligonukleotiden erstellt, die nach Anlagerung der Stränge beidseitige Überhänge enthält. Um die Fragmente radioaktiv zu markieren, wurden die Überhänge des Doppelstranges über eine Klenow-Polymerase Reaktion, in welcher α -32P markiertes dATP zum Einsatz kommt, aufgefüllt. Zur Herstellung der Sonde wurden in einem Reaktionsansatz von 25 µl folgende Komponenten eingesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert:

1 µl H2K Oligonukleotide (~ 400 ng)

2,5 µl 10x Klenow-Puffer

1,8 µl dNTPs (ohne dATP)

3 µl α (³²P)dATP

1 µl (1U) Klenowfragment

Die Aufreinigung der DNA-Sonde erfolgte über die Bindung an eine Silikamembran (Qiagen) und anschließender Elution in 100 µl Wasser. Für den EMSA wurden Zellen mit Hochsalzpuffer lysiert und die folgende Reaktion angesetzt:

1 - 7 µl Zelllysat (je nach Proteingehalt)

10 µl 2x Shiftpuffer

1µl poly-dIdC (2 mg/ml)

1µl DTT (100 mM)

1 µl BSA (10 mg/ml)

Nach Zugabe von 1 - 4 µl H2K Sonde zum Mastermix von etwa 20 Proben wurden die Ansätze für 30 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend auf ein natives Polyacrylamidgel (5 %) aufgetragen und die Elektrophorese mit 26 mA pro Gel in 1 x TBE Laufpuffer durchgeführt. Das Gel wurde Vakuum-getrocknet und nach Auflegen eines Films

(BioMax MS, Kodak), der eine hohe Sensitivität für (³²P)-Radioaktivität besitzt, über Nacht bei -80 °C gelagert und anschließend entwickelt.

2.2.2.6 Rekombinantes und endogenes Spaltungsexperiment

GST-MALT1 Proteine wurden in kompetenten BL21 Codon plus RIL oder RIPL *E.coli* Bakterien produziert. Die Proteinherstellung wurde bei einer bakteriellen Dichte (OD₆₀₀) von 0.6 bis 0.8 mit Zugabe von 50 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und erfolgte für 16 Std bei 18 °C. Die Bakterien wurden geerntet, in einem HEPES Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels einer Ultraschallsonde (10 x 20 Impulse) lysiert. Die Reinigung GST-konjugierter Protein erfolgte über einen ÄKTA™ Flüssig-Chromatographen durch die Bindung an Glutathion *FastTrap* Säulen (GE Healthcare). Um die Proteine zu konzentrieren und das im Elutionspuffer enthaltene Glutathion partiell auszuwaschen, erfolgten 3 Zentrifugationsschritte in Amicon Ultra Konzentrator-Säulen (< 10 kDa) (Millipore). Hierbei wurde für je 60 - 90 Minuten bei 4000 g und 4 °C nach Zugabe von MALT1 Gefrierpuffer zentrifugiert, bis eine Proteinkonzentration von etwa 2 - 5 µg/µl erreicht war.

Für das proteolytische Spaltungsexperiment in 384-Loch Mikroplatten wurden 200 ng GST-MALT1 FL WT/C453A (105 nM), 200 ng GST-MALT1 325 - 632 (165 nM) oder 20 ng GST-MALT1 325 - 760 (17 nM) und 50 µM des Ac-LRSR-AMC Peptidsubstrats in einem Volumen von 20 µl Spaltungspuffer angesetzt. Bei der Reaktion wird das AMC Fluorophor durch MALT1 vom Ac-LRSR-AMC Substrat abgespalten. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 360 nm wird vom abgespaltenen AMC Fluoreszenz freigesetzt, die durch einen Detektor (460 nm) analysiert wird. Die 60-minütige Messung erfolgte nach einer 30-minütigen Prä-Inkubation der Reagenzien bei 30 °C in einem Synergy 2 Mikroplatten Reader (Biotek). Zur Auswertung der MALT1 Aktivität wurde der Fluoreszenzanstieg der Reaktion über die gemessene Zeit berechnet. Hemmstoff-behandelte Ansätze wurden auf DMSO-behandelte Referenzansätze (auf 100 % gesetzt) bezogen. MALT1 war im Spaltungsexperiment nur in einem kosmotropen Milieu unter Zugabe von Natrium- oder Ammoniumcitrat und 5 - 10 µM des Oxidationsmittels Dithiothreitol (DTT) aktiv. Die proteolytische Aktivität der rekombinanten Caspase 3 (Biovision) und Caspase 8 (Cayman Chemical) Proteine wurde entsprechend unter Verwendung von Ac-DEVD-AMC und jeweils 50 und 250 pg Protein ermittelt.

Zur Aufklärung der MALT1 Enzymkinetik wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{Max}) und die Michaelis-Menten Konstante K_M per Spaltungsexperiment bestimmt. Die Messung der initialen MALT1 Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte dabei innerhalb der ersten 20 min einer linearen Reaktion. Die Anfangsgeschwindigkeit (RFU/min) der Ansätze wurde

anschließend gegen die steigende Substratkonzentration aufgetragen und V_{Max} sowie die Michaelis-Menten Konstante K_M durch Anpassen an ein Michaelis-Menten Modell (PRISM 5.01, Graphpad) berechnet.

Um die Aktivität zellulärer MALT1 Proteine zu messen, wurden DLBCL oder Jurkat T-Zellen ($1-5 \times 10^6$ Zellen) unbehandelt oder nach Inkubation mit Inhibitoren für je 4 bzw. 3 Std mit P/I oder antiCD3/CD28 stimuliert und in HEPES Aufschlusspuffer lysiert. Die MALT1-IP erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben. Die gereinigte Sepharose wurde anschließend mit 45 μl MALT1 Spaltungspuffer versetzt und in eine schwarze 384-Loch Mikroplatte (*Non-binding*, Corning) übertragen. Zu Messung der Reaktion wurde den Ansätzen das Ac-LRSR-AMC Peptidsubstrat auf eine Endkonzentration von 20 μM zugefügt. Die MALT1 Aktivität wurde anschließend analog zum rekombinannten Spaltungsexperiment ermittelt.

2.2.2.7 Hochdurchsatz Wirkstoffscreening

Zur Identifikation von MALT1 Hemmstoffen wurde das rekombinante Spaltungsexperiment eingesetzt um rund 18.000 niedermolekulare Hemmstoffe der ChemBioNet Substanz-Bibliothek am Leibniz Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin zu screenen (Lisurek et al, 2010). Pro Ansatz wurden 170 nM GSTMALT1 FL und 50 μM des Ac-LRSR-AMC Substrats und je 10 μM der zu testenden Substanzen eingesetzt. Die Fluoreszenzmessung in einem Reaktionsvolumen von 11 μl in 384-well Non-binding Mikroplatten (Corning) erfolgte bei 30°C mit einem Safire 2 Mikroplatten Reader (Tecan AG, Österreich). Die Parameter des Screenings sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Zur Auswertung des Screenings wurden die Differenzwerte der Fluoreszenzfreisetzung von Wirkstoff-behandelten Ansätzen nach 20 Minuten Reaktion berechnet und graphisch mit den jeweiligen Kontrollen der Mikroplatte verglichen. Als Negativ Kontrolle fungierte die inaktive MALT1 C453A Mutante und als Medium Kontrolle wurde den WT Proteinen 1 nM Z-VRPR-FMK zugesetzt. Die Qualität des Assays wurde durch Bestimmung des Z-Faktors (~ 0.7) bestätigt. Als Kriterium für die Auswahl der Hits wurde eine Reduktion der MALT1 Aktivität von 40 % festgelegt, wodurch 300 primäre Hits identifiziert wurden. Zur Validierung wurden diese Hits anschließend in einer Doppelstudie mit 8 ansteigenden Konzentrationen von 0.7 bis 90.9 μM getestet. Kriterium für die weitere Selektion der Hits waren vor allem eine gute Dosis-abhängigkeit und ein effizienter IC₅₀ (< 50 μM). Die Verbindungen durften dabei keine Autofluoreszenz unter den verwendeten Reaktionsbedingungen aufweisen. Des Weiteren wurden alle 300 Primärhits mittels Massenspektrometrie analysiert und Substanzen, die eine unerwartete Molekülgröße hatten oder zusätzliche Bestandteile enthielten, aussortiert. Auf diese Weise wurden 30 Sekundärhits ausgewählt und zur Analyse der inhibitorischen Selektivität gegen MALT1 und Caspase 8 getestet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNA-Klonierung

Die Klonierung von MALT1-kodierenden Sequenzen in den prokaryotischen pGex6p1 oder den eukaryotischen pEF3xFLAG Expressionsvektor erfolgte über PCR Amplifikation der im pEF3xFLAG-MALT1 Vektor bereits vorhandenen MALT1 Sequenz. Die PCR-Produkte und die Zielvektoren wurden anschließend nach NotI bzw. BamHI/NotI Restriktionsverdau ligiert.

2.2.3.1.1 Amplifikation und Mutagenese von DNA über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels PCR (*polymerase chain reaction*). Folgender Standardansatz unter Verwendung des *Expand High Fidelity Kits* (Roche) wurde eingesetzt:

5 µl 10x Expand High Fidelity Puffer
 1 µl dNTPs (je 10 mM)
 je 1 µl 5' und 3' Primer (20 µM)
 50 - 100 ng Plasmid-DNA
 1 µl DNA Polymerase (Expand High Fidelity Mix)
 Ad 50 µl H₂O (DNase-frei)

PCR-Programm:

	Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	
25 Zyklen	Denaturierung	30s	94 °C	
	Anlagerung	50s	65 °C	
	Verlängerung	30s - 3 min	72 °C	(1 min pro 1000 bp)
	Finale Verlängerung	7 min	72 °C	
	Abkühlen	∞	4 °C	

Zur Mutagenese der DNA-Konstrukte wurde eine Überlappungs-PCR angewandt. Bei dieser Methode werden zuerst in 2 PCR-Reaktionen DNA-Amplifikate generiert, die in der mittleren Sequenz überlappen (ca. 20 bp). In dieser Region befindet sich die Mutation, die während der PCR durch die jeweils innenliegenden Primer (Größe: 60 - 100 bp) eingeführt wurde. Um die beiden DNA-Amplifikate zu verknüpfen, wurde anschließend eine dritte PCR mit beiden Amplifikaten und den jeweiligen Außenprimern durchgeführt.

2.2.3.1.2 Restriktionsverdau, Aufreinigung und Ligation von DNA

Zur Restriktion der PCR-Amplifikate und Zielvektoren wurden endogene DNA-Restriktionsenzyme von NEB oder Fermentas nach Herstellerangaben eingesetzt. Um die DNA-Fragmente aus dem Reaktionsansatz zu isolieren, wurden sie zunächst über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde Agarose auf 1,5 % Endkonzentration in 1x TBE Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (< 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Die Auftrennung der DNA-Banden erfolgte bei einer Spannung von 50 - 100 V und das Ausschneiden der entsprechenden Banden erfolgte unter UV-Licht. Zur Isolation wurde die DNA über Bindung an eine Silikamembran des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation der gereinigten DNA-Fragmente erfolgte anschließend per *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) nach Herstellerangaben.

2.2.3.1.3 Transformation von *E. coli* und Plasmidpräparation

Zur Transformation und Klonierung von frisch-ligierter DNA wurden 0,5 µl des Ansatzes mit 100 µl kompetenten TOP10 Bakterien vermischt und zunächst 20 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch einen Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C induziert und die Bakterien anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 800 µl LB-Medium wurden die Bakterien in einem Thermoschüttler (800 rpm) für 1 Stunde bei 37 °C kultiviert und danach auf LB-Agar Selektionsplatten (Ampicillin) für etwa 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und über Nacht bei 37 °C in 6 ml LB-Medium kultiviert. Nach Ernte der Bakterien erfolgte die Aufreinigung der Plasmide mit dem Nucleospin Mini Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel). Zur Präparation größerer Plasmidmengen erfolgte die Retransformation von Top10 Bakterien und die Kultivierung in 150 ml LB-Medium.

2.2.3.2 Quantitative real-time RT-PCR

Die Extraktion der zellulären mRNA für die quantitative real-time RT-PCR erfolgte mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA wurden durch Inkubation der Proben mit einer RQ1 RNase-freien DNase (Promega) entfernt. Die Synthese von cDNA erfolgte durch reverse Transkription der RNA mit der RT Superscript II (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers. Die real-time PCR wurde anschließend in einem LC 480 Lightcycler System (Roche) unter Verwendung des SYBRGreen PCR Kits durchgeführt. Folgende Reaktionsansätze wurden mit gestopften Spitzen in eine 96-Loch PCR-Platte pipettiert:

Je 1 µl Primer (20 µM)

5 µl SYBRGreen Master Mix
 2 µl cDNA
 41 µl H₂O (Roche)

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und bei 180 g abzentrifugiert. Die PCR im LC 480 Lightcycler System erfolgte unter Verwendung des folgenden Programms:

	10 min	95 °C
40x	10s	95 °C
	10s	60 °C
	10s	72 °C
	15s	65°C – 95°C (Erstellung der Schmelzkurven)

Die Bestimmung der *IL-2*, *TNFA* und *IL-6* Transkriptmenge erfolgte in Relation zur Genexpression der RNA Polymerase II (RP II). Die relative Quantifizierung der *IL-2* Transkriptmenge in Jurkat T-Zellen, primären murinen CD4⁺ T-Zellen und primären humanen PBMCs erfolgte in An- und Abwesenheit von Mepazin, Thioridazin oder DMSO 4 Stunden nach antiCD3/CD28 oder P/I Stimulation der Zellen. Die Quantifizierung der *TNFA* und *IL-6* Transkriptmenge der ABC-DLBCL Zelllinie HBL1 erfolgte 6, 12 und 24 Stunden nach Mepazin oder DMSO Behandlung. Die Auswertung der Daten erfolgte leicht abgewandelt mit dem $\Delta\Delta C_p$ Verfahren nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). Zur Auswertung der *IL-2*, *TNFA* und *IL-6* Daten wurde die DMSO-Referenz auf 1 gesetzt und Inhibitor-behandelte Ansätze darauf bezogen.

2.2.3.3 Genexpressionsanalyse

Die NF-κB und MALT1 Genexpressionssignatur der ABC-DLBCL Zelllinie HBL1 wurde nach 6-, 12- und 24-stündiger Behandlung mit 20 µM Mepazin oder DMSO angefertigt. Die RNA Extraktion aus den Zellen erfolgte mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und genomische DNA wurde mit einer RQ1 RNase-freien DNase (Promega) entfernt. Die Bestimmung der genomweiten Genexpression erfolgte als Auftragsarbeit von der Arbeitsgruppe von Georg Lenz (Charité, Berlin) auf Agilent 4x44K Mikroarrays (Agilent technologies). Die Proben Mepazin-behandelter HBL1 Zellen wurden mit Cy5 und die Proben DMSO-behandelter Zellen mit Cy3 markiert und kompetitiv auf einen NF-κB Lymphochip hybridisiert (Shaffer et al. 2006). Die Änderung der Genexpression wurde anhand der Cy3/Cy5 Relation berechnet und entsprechend farbig skaliert. Die Signifikanz der Verringerung der Genexpression wurde durch einen gepaarten *t*-test ermittelt (*p* < 0.05). Die gemittelten Werte aller MALT1 Zielgene,

sowie die Signifikanz der Mepazin-vermittelten Erniedrigung der Gensignatur, sind für jeden Zeitpunkt angegeben. Ein Vergleich der Ergebnisse mit Gensignaturen, die nach Behandlung von HBL1 Zellen mit Z-VRPR-FMK oder MLN120B generiert wurden, ermöglichte anschließend eine Einschätzung der MALT1-Spezifität und des Einflusses auf die NF-κB Zielgenexpression von Mepazin (Hailfinger et al, 2009a; Kloo et al, 2011).

2.2.3.4 RNA Interferenz in Jurkat T-Zellen

Die Transfektion von siRNAs in Jurkat T-Zellen erfolgte über das Prinzip der Lipofektion. Bei diesem Verfahren werden Nukleinsäuren in Liposomen verpackt und nach deren Fusion mit der Zellmembran in die Zelle abgegeben. Zur Durchführung wurden zunächst $0,5 \times 10^6$ Jurkat T-Zellen in 800 µl RPMI Medium in eine 6-Loch Platte vorgelegt. Anschließend wurden zuerst jeweils 1 µl siRNA einer 100 µM Stocklösung sowie 1 µl Atufect (Silence therapeutics) in insgesamt 100 µl OptiMem aufgenommen. Beide Ansätze wurden anschließend gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, sodass sich siRNA-Liposom-Partikel ausbilden. Die Ansätze wurden anschließend auf die vorbereiteten Zellen gegeben und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die Zugabe von 1 ml Zellmedium und nach etwa 72 Stunden konnten die Zellen analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der proteolytischen MALT1 Aktivität

3.1.1 Messung der zellulären MALT1 Aktivität

Zur Charakterisierung des proteolytischen Mechanismus von MALT1 wurde zunächst ein Spaltungsexperiment zur Messung der zellulären MALT1 Aktivität entwickelt. Die Grundlage des Ansatzes bildete die katalytische Spaltung des fluorogenen Ac-LRSR-AMC Substratpeptids, welches aus der MALT1 Zielsequenz ‚LRSR‘ des konstitutiven Bindungspartners BCL10 entwickelt wurde (Rebeaud et al, 2008). Bei der Reaktion wird nach MALT1 vermittelter Spaltung des Substratpeptids ein 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) Fluorophor freigesetzt, welches nach Anregung Fluoreszenzlicht emittiert. Der Fluoreszenzanstieg stellt das Maß für die MALT1 Aktivität dar (Abb. 3.1 B).

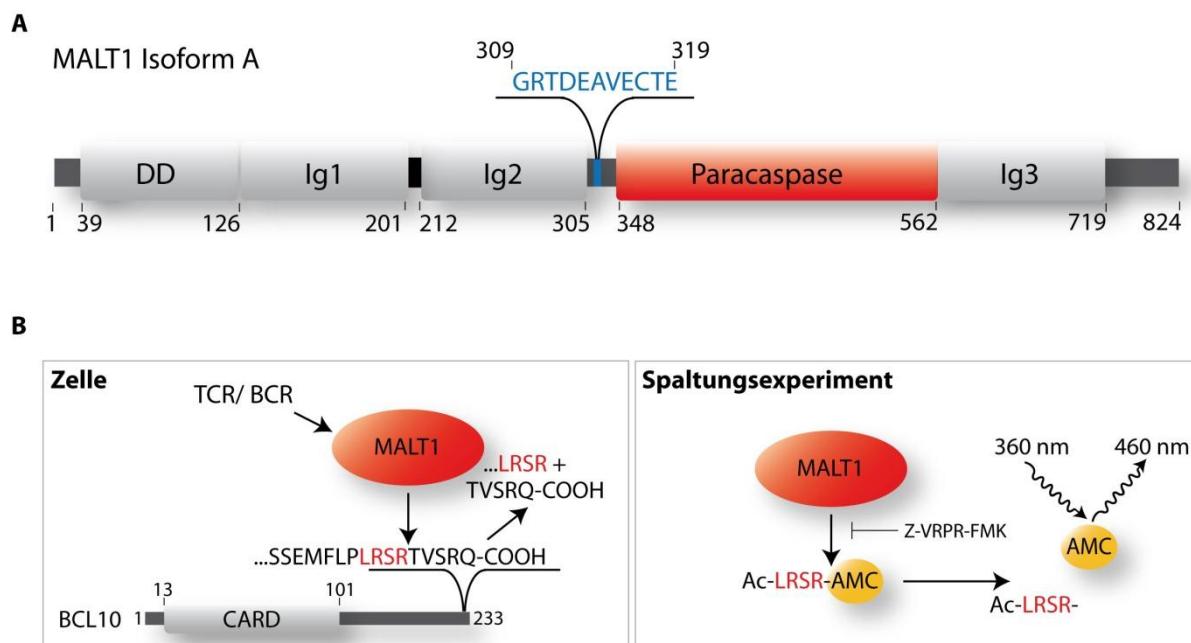


Abbildung 3.1: Schema des proteolytischen MALT1 Spaltungsexperiments. (A) Darstellung der MALT1 Proteindomänen (Isoform A). Die für die proteolytische Aktivität essentielle Paracaspase Domäne liegt zwischen Aminosäure (AS) 348 und 562 und wird von drei Immunoglobulin-ähnlichen (Ig) Domänen flankiert. Die blaue Sequenz kennzeichnet den fehlenden Abschnitt der Isoform B zwischen AS 309 und 319. (B) Durch MALT1 vermittelte Spaltung des fluorogenen Ac-LRSR-AMC Substratpeptids wird das 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) Fluorophor freigesetzt, welches nach Anregung Fluoreszenzlicht emittiert. Der Fluoreszenzanstieg der Reaktion kann in einem Mikroplattenlesegerät detektiert werden. Durch Zugabe des MALT1 Inhibitorpeptids Z-VRPR-FMK kann die Spaltung des Substrats und somit die Fluoreszenzfreisetzung blockiert werden.

3.1.1.1 Induzierbare MALT1 Aktivität in T-Zellen

Die Analyse von Gesamtzelllysat unstimulierter oder PMA/ Ionomycin (P/I) stimulierter Jurkat T-Zellen und DLBCL Zellen auf MALT1 Aktivität wurde zu Beginn unter verschiedenen

Reaktions- und Pufferbedingungen optimiert (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit MALT1 Funktionsdaten einer kürzlich publizierten Arbeit war die enzymatische MALT1 Aktivität ausschließlich bei stark kosmotropen Reaktionsbedingungen unter Verwendung eines 1 M Ammonium- oder Natriumcitratpuffers nachweisbar (Hachmann et al. 2012). Die spezifische Analyse der proteolytischen MALT1 Funktion erfolgte durch Immunpräzipitation (IP) endogener MALT1 Proteine und ihre Reinigung über Protein-G Sepharose. In Abbildung 3.2 A ist der Fluoreszenzanstieg eines Spaltungsexperiments mit präzipitiertem MALT1 (H300) oder BCL10 (C-17) aus unstimulierten oder P/I stimulierten Jurkat und JPM 50.6 T-Zellen abgebildet. Zur Auswertung der MALT1 Aktivität wurde die Fluoreszenzfreisetzung in einer linearen Phase über 60 Minuten ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt. In unbehandelten Zellen war keine MALT1 Aktivität detektierbar. Erst nach Stimulation der Zellen war eine starke Aktivität messbar, die vermutlich auf einer Aktivierung nach Stimulations-bedingter Integration von MALT1 in den CBM-Komplex beruht (Thome et al, 2010; Wiesmann et al, 2012). Nach IP von BCL10, dem konstitutiven Bindungspartner von MALT1, war eine proteolytische Aktivität messbar, die allerdings verhältnismäßig niedrig war. Dies zeigt, dass der *in vitro* Spaltungsassay den spezifischen Nachweis der MALT1 Aktivierung nach T-Zell Stimulation ermöglicht. In CARMA1 defizienten JPM 50.6 T-Zellen war dagegen weder nach IP von MALT1, noch BCL10 eine proteolytische Aktivität detektierbar, was auf einen wichtigen regulatorischen oder funktionellen Einfluss des vorgeschalteten CARMA1 Proteins auf die proteolytische Aktivierung von MALT1 deutet.

Um die Kinetik der MALT1 Aktivität etwas genauer zu ermitteln, wurde ein Spaltungsexperiment zu verschiedenen Zeitpunkten nach antiCD3/CD28 oder P/I Stimulation von Jurkat T-Zellen durchgeführt (Abb. 3.2 B). Es zeigte sich, dass MALT1 bereits wenige Minuten nach Stimulation der Zellen aktiviert wird und nach etwa 30 - 60 Minuten das höchste Aktivitätspotential aufweist. Danach wird die Aktivität graduell schwächer, wobei der Mechanismus der zur Inaktivierung von MALT1 nicht aufgeklärt ist. Um zu beweisen, dass der im Spaltungsexperiment ermittelte Anstieg der MALT1 Aktivität auch zelluläre MALT1 Substrate betrifft, wurde die Spaltung des MALT1 Proteinsubstrats RelB in Zelllysaten von antiCD3/CD28 oder P/I stimulierten Jurkat T-Zellen per Western Blot (WB) untersucht. RelB ist ein bedeutendes Ziel der MALT1 Spaltung nach Induktion des TCR oder BCR. Es wird C-Terminal von R85 in zwei Proteinfragmente geteilt, wodurch es zügig dem proteasomalen Abbau zugeführt wird und seine Funktion als negativer Regulator der c-Rel und RelA Genexpression verliert. Als Folge steigt die Expression anti-apoptotischer und zellwachstumsfördernder NF- κ B Zielgene (Hailfinger et al, 2011). Um eine Detektion der instabilen RelB Spaltprodukte zu ermöglichen wurde den Zellen in einigen Ansätzen das Reagenz MG132 zugefügt. MG132 ist ein spezifischer Hemmstoff des Proteasoms und sollte den Abbau der Spaltprodukte unterbinden. Tatsächlich war die Detektion des C-terminalen

Spaltprodukts deutlich stärker nach Inkubation der Zellen mit MG132 (Abb. 3.2 C, unten). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des fluorogenen Spaltungsexperiments deutet die starke RelB Spaltung etwa 30 - 60 Minuten nach Stimulation der Zellen auf eine hohe MALT1 Aktivität in diesem Zeitraum. In unstimulierten Zellen war dagegen keine RelB Spaltung detektierbar und daher keine MALT1 Aktivität vorhanden.

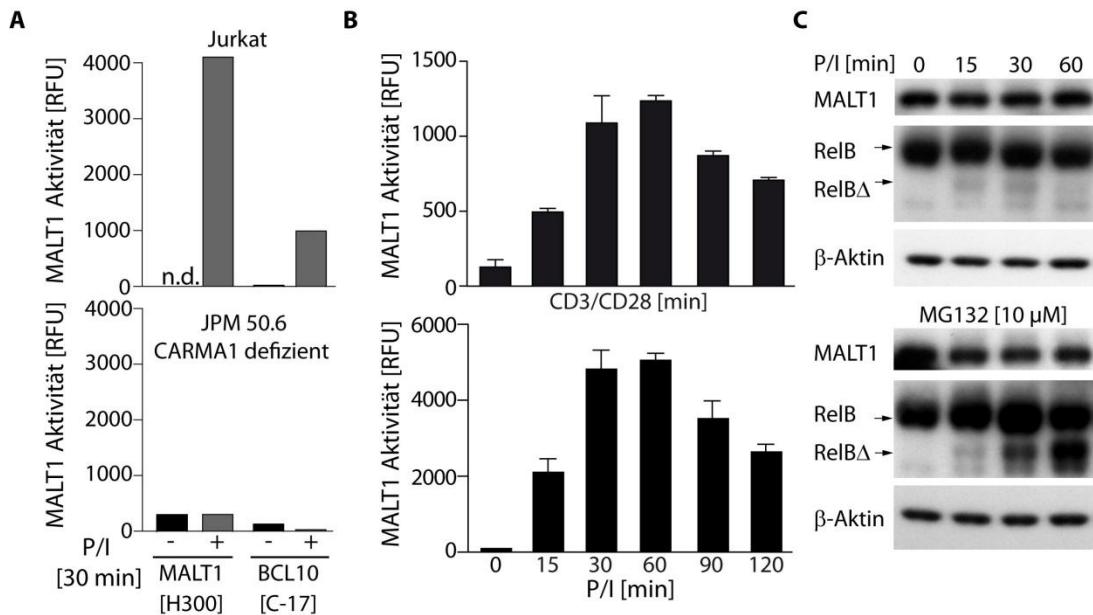


Abbildung 3.2: Analyse der zellulären MALT1 Aktivität in T-Zellen. (A) Messung der Paracaspase Aktivität im Spaltungsexperiment nach Koimmunpräzipitation (KoIP) von MALT1 (H300) und BCL10 (C-17) aus Jurkat und JPM 50.6 T-Zellen. Zur Auswertung der Aktivität wurde die Fluoreszenzfreisetzung einer 60-minütigen Reaktion als Balkendiagramm dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. (B) Messung der enzymatischen Aktivität nach MALT1-KoIP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation von Jurkat T-Zellen mit antiCD3/CD28 (oben) und P/I (unten). Kurze Zeit nach Stimulation wird MALT1 aktiviert. Die Aktivität erreicht ihr volles Potential zwischen 30 und 60 Minuten. Die Balken stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (SD). (C) Western Blot Detektion der MALT1-vermittelten RelB Spaltung nach P/I Stimulation von Jurkat T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.

3.1.1.2 Konstitutive MALT1 Aktivität in ABC-DLBCL Zellen

Die Paracaspase Aktivität spielt eine essentielle Rolle für das Überleben von ABC-DLBCL Zellen. Zu dieser Erkenntnis gelangten zwei unabhängige Studien unter Verwendung des irreversiblen Metacaspase Inhibititors Z-VRPR-FMK. Dieser Peptidinhibitor erwies sich bereits in früheren Studien als spezifischer MALT1 Inhibitor (Rebeaud et al, 2008) und führte in einer DLBCL Überlebensstudie zum selektiven Absterben von MALT1-abhängigen ABC-DLBCL Zellen (Ferch et al, 2009; Haiflinger et al, 2009a). Eine Messung der MALT1 Aktivität von DLBCL Zellen sollte zeigen, in welchem Grad eine konstitutive Aktivität in den ABC-DLBCL Zellen vorhanden ist und ob der Einsatz des Spaltungsexperiments auch für weiterführende Analysen der konstitutiven MALT1 Aktivität möglich ist. Zu Durchführung wurden die Proteinkonzentrationen der ABC- und GCB-DLBCL Zelllysate untereinander

angepaßt und nach MALT1-IP auf Aktivität analysiert. Um zu beweisen, dass es sich bei der detektierten Fluoreszenzfreisetzung um eine MALT1-vermittelte Spaltung des Substrates handelte, wurde einem Teil der Reaktionsansätze vor der Messung 50 nM des Z-VRPR-FMK Inhibitorpeptids zugegeben. Eine stimulations-unabhängige MALT1 Aktivität wurde in allen getesteten ABC-DLBCL Zelllinien HBL1, OCI-Ly3, OCI-Ly10 und U2932 festgestellt, wobei HBL1 Zellen das höchste Potential aufwiesen (Abb. 3.3 A). Nach Zugabe von Z-VRPR-FMK zu den Reaktionsansätzen wurde die MALT1 Aktivität zudem vollständig inhibiert – ein deutlicher Beweis der spezifischen MALT1-vermittelten Spaltung des fluorogenen Substrates (Abb. 3.3 B).

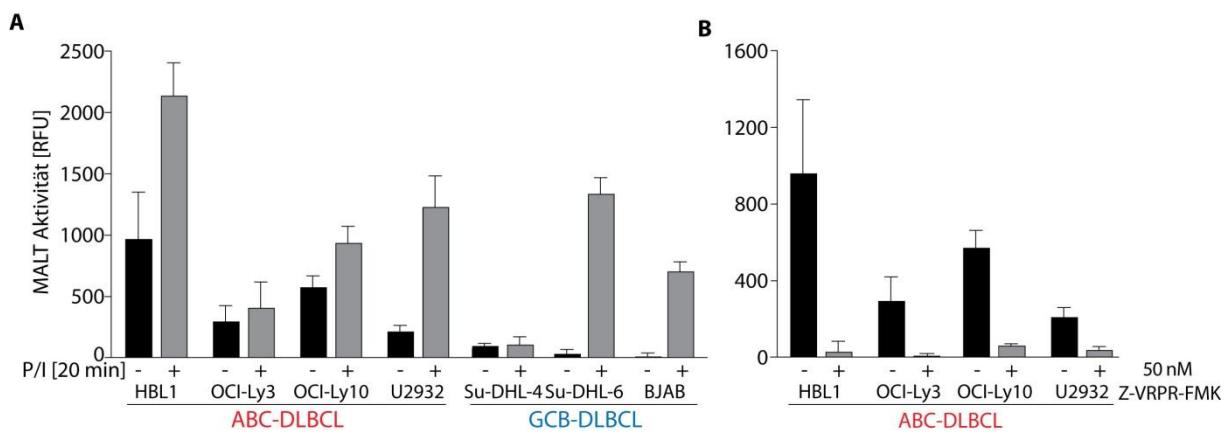


Abbildung 3.3: ABC-DLBCL Zellen weisen eine konstitutive MALT1 Aktivität auf. (A) MALT1-KoIP aus unstimulierten und P/I stimulierten DLBCL Zellen zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität im fluorogenen Spaltungsexperiment. Alle getesteten ABC-DLBCL Zellen besitzen eine konstitutive MALT1 Aktivität, die nach P/I Stimulation der Zellen erhöht ist. Um den Vergleich der MALT1 Aktivität innerhalb der ABC-DLBCL Zelllinien zu ermöglichen, wurde die Proteinmenge der Zellsäfte per Bradford Reagenz angeglichen. (B) Inhibition der konstitutiven MALT1 Aktivität von ABC-DLBCL Zellen (aus A) nach Zugabe von 50 nM Z-VRPR-FMK zur enzymatischen Reaktion.

Das Potential der Aktivität konnte zudem durch P/I Stimulation der Zellen weiter erhöht werden (Abb. 3.3 A). MALT1 aus den GCB-DLBCL Zelllinien Su-DHL-6 und BJAB war nur nach P/I Stimulation der Zellen katalytisch aktiv. In Su-DHL-4 Zellen war dagegen auch nach Stimulation keine MALT1 Aktivität messbar. Dies zeigt, dass mit dem Spaltungsexperiment eine stabile und spezifische Messung der konstitutiven MALT1 Aktivität von ABC-DLBCL für weiterführende Analysen des proteolytischen Mechanismus möglich ist.

3.1.2 Aktivitätsanalyse von MALT1 nach Überexpression in Jurkat T-Zellen

3.1.2.1 Die Ig3 Domäne ist kritisch für die Paracaspase Aktivität

Die Analyse überexprimierter MALT1 Proteine bietet die Möglichkeit Auswirkungen von Mutationen oder Deletionen auf die katalytische Aktivität des Proteins zu untersuchen. Zur Etablierung eines ektopischen Spaltungsexperiments wurden Jurkat T-Zellen mit

verschiedenen Expressionsplasmiden, die für FLAG-MALT1 (Isoform B) kodieren sowie ein nicht-kodierendes Plasmid (mock) transfiziert. Auf diese Weise wurde in einzelnen Ansätzen ein MALT1 Wildtyp (WT) Protein und eine inaktive MALT1 C453A Mutante, in welcher das katalytisch aktive Cystein des aktiven Zentrums zu Alanin mutiert wurde, exprimiert. Die Messung der MALT1 Aktivität erfolgte nach FLAG-IP der exprimierten Proteine aus unstimulierten und P/I stimulierten Zellen. Entgegen den Angaben in der Literatur, wo eine Ko-Expression des MALT1 Bindungspartners BCL10 für die Aktivierung vorausgesetzt wird (Coornaert et al., 2008), konnte unter den gewählten Bedingungen eine hohe enzymatische MALT1 Aktivität des WT Proteins festgestellt werden.

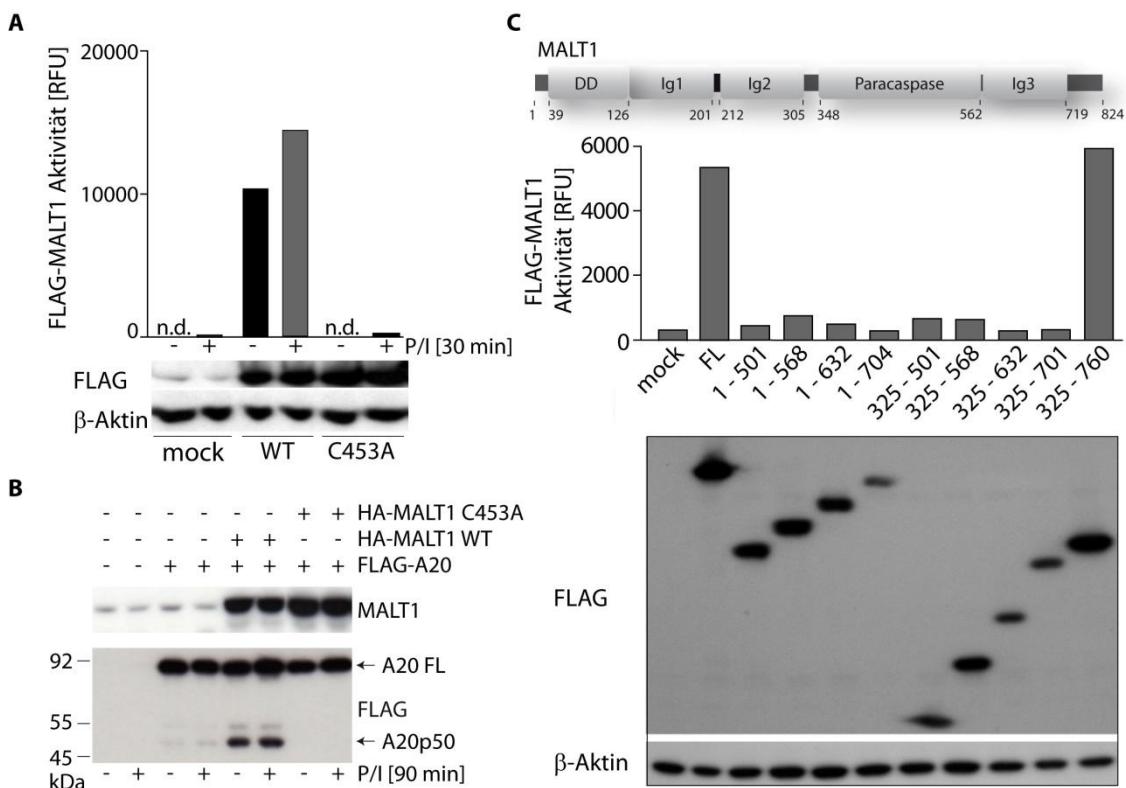


Abbildung 3.4: Aktivitätsanalyse von MALT1 nach Überexpression in Jurkat T-Zellen. **(A)** Überexprimiertes MALT1 ist konstitutiv aktiv. Transfektion von Jurkat T-Zellen (8×10^6) mit eukaryotischen Expressionsplasmiden für 3xFLAG-MALT1 WT und C453A und anschließender FLAG-IP zur Analyse der enzymatischen Aktivität im Spaltungsexperiment. Die Aktivität des ektopischen MALT1 WT Proteins war stimulations-unabhängig. Dargestellt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Bestimmung der zellulären Aktivität ektopischer MALT1 Proteine. Hierzu wurde FLAG-A20 mit HA-MALT1 WT oder C453A in Jurkat T-Zellen ko-exprimiert. Analyse der A20 Spaltung erfolgte in den Zelllysaten mittels Western Blot Detektion des N-terminalen A20p50 Fragments. Nur in Anwesenheit von WT MALT1 war eine Detektion des Fragments per FLAG Antikörper möglich. Dies beweist die konstitutive Aktivität des MALT1 Proteins. **(C)** Deletionsanalyse zur Ermittlung der für die Paracaspase Aktivität essentiellen MALT1 Domänen. Die Bestimmung der Spaltungsaktivität erfolgte nach Transfektion von Jurkat T-Zellen (8×10^6) mit Expressionsplasmiden, die für unterschiedlich lange MALT1 Varianten kodieren, und anschließender FLAG-IP der überexprimierten Proteine. Neben der vollständigen (FL) war nur eine von AS 325 – 760 kodierende MALT1 Variante aktiv. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Aktivität war zudem Stimulations-unabhängig und daher höchstwahrscheinlich unabhängig von vorgeschalteten Ereignissen, wie der Integration von MALT1 in den CBM-Komplex. Die konstitutive MALT1 Aktivität ist daher eher auf eine autonome Aktivierung des Proteins zurückzuführen, die möglicherweise aufgrund der Aggregation der Proteine bei Überexpression entsteht. Die C453A Mutante zeigte sich wie erwartet katalytisch inaktiv, wodurch auch unter diesen Bedingungen auf eine MALT1-spezifische Spaltung des fluorogenen Substrats durch das WT Protein geschlossen werden kann (Abb. 3.4 A).

Um die zelluläre Aktivität der ektopischen MALT1 Proteine zu validieren, erfolgte die Untersuchung des MALT1 Zielproteins A20 in einer WB Analyse. Die MALT1-vermittelte Spaltung des NF- κ B Inhibitors A20 nach Induktion des TCR oder BCR führt zu einer schwachen Erhöhung der NF- κ B-Aktivität. A20 wird in diesem Kontext durch MALT1 in zwei 37 kDa (A20p37) und 50 kDa (A20p50) große Fragmente aufgespalten (Coornaert et al, 2008). Zur Durchführung der Untersuchungen wurde FLAG-A20 alleine sowie zusammen mit HA-MALT1 WT oder C453A in Jurkat T-Zellen ko-exprimiert. Anschließend wurde das N-terminale A20p50 Fragment per FLAG Antikörper in Zelllysaten unstimulierter und P/I stimulierter Jurkat T-Zellen detektiert. Auffallend war, dass bereits bei Überexpression von A20 alleine eine schwache Spaltung des Proteins erfolgte. Nach Ko-expression mit katalytisch aktivem MALT1 (WT) war die Spaltung sehr ausgeprägt und zudem in Übereinstimmung mit den Daten des Spaltungsexperiments Stimulations-unabhängig (Abb. 3.4 B) - ein weiterer Beweis der vorrangig konstitutiven Aktivität ektopischer MALT1 Proteine und eine Bestätigung für die Funktionalität des fluorogenen Spaltungsexperiments. Die C453A Mutante wirkte dominant-negativ, da ihre Expression die schwache A20 Spaltung, die nach singulärer A20 Expression beobachtet wurde, verhinderte.

Sequenzuntersuchungen und der Vergleich zu den nah-verwandten Caspasen weisen der MALT1 Region zwischen der AS 348 und 562 die für die proteolytische Aktivität essentiellen Sequenzen zu (Lucas et al, 2001; Uren et al, 2000). Dabei ist unklar, ob die beschriebene Region ausreichend für eine effiziente Paracaspase Aktivität ist. Um zu ermitteln, welche MALT1 Proteindomänen essentiell für die katalytische Aktivität sind, wurde die Aktivität von verschiedenen Deletionsmutanten nach Überexpression in Jurkat T-Zellen bestimmt. Alle Konstrukte besaßen das für die katalytische Aktivität kritische C453 (Isoform B) des aktiven Zentrums und ein N-terminales FLAG-Tag für die IP. Neben der vollständigen Variante MALT1 FL (FL= engl. „full-length“) war nur eine von AS 325 bis 760 Variante des Proteins (MALT1_{Casp-Ig3}) aktiv (Abb. 3.4 B). Bereits eine zusätzliche C-terminale Deletion von 59 AS im 325 – 701 MALT1 Konstrukt wirkte sich in einer kompletten Verringerung der proteolytischen Aktivität aus. Aus diesem Ergebnis kann auf eine wichtige Funktion der zwischen AS 562 und 719 gelegenen Ig3 Domäne geschlossen werden (Abb. 3.4 C).

3.1.2.2 MALT1 Ubiquitinierung beeinflusst die Paracaspase Aktivität

Die C-terminale Ubiquitinierung von MALT1 ist ein wichtiger Schritt für die TCR-induzierte NF- κ B Aktivierung (Oeckinghaus et al, 2007). A20 wirkt als negativer Regulator, indem es die Ubiquitinketten von MALT1 spaltet (Duwel et al, 2009). Um zu untersuchen, ob die Ubiquitinierung die Aktivität von MALT1 beeinflusst, wurde zunächst die Spaltungsaktivität einer Ubiquitinierungs-defizienten MALT1 Mutante (MALT1 K11R) bestimmt. Nach Überexpression in Jurkat T-Zellen war die Mutante verglichen mit dem WT Protein etwa 50 % weniger aktiv (Abb. 3.5 A). Dies deutet auf eine bisher unbekannte mechanistische oder regulatorische Funktion der C-terminalen Ubiquitinierung für die Paracaspase Aktivität. Hierbei könnte grundsätzlich die Ubiquitin-abhängige Rekrutierung von Kofaktoren unterbunden sein oder eine verminderte Oligomerisierung des mutierten Proteins vorliegen.

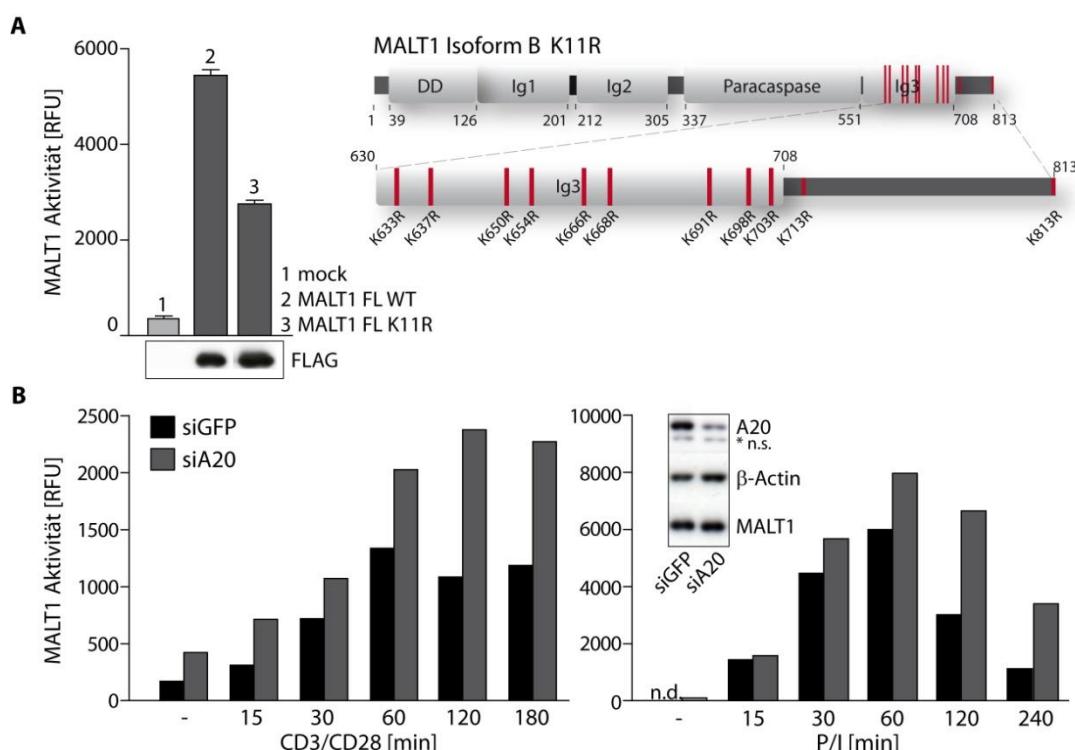


Abbildung 3.5: Die proteolytische MALT1 Aktivität wird durch C-terminale Ubiquitinierung beeinflusst. (A) Nach Überexpression in Jurkat T-Zellen und Präzipitation per FLAG Antikörper war die K11R Mutante im Spaltungsexperiment etwa 50 % weniger proteolytisch aktiv in Relation zum WT Protein. Die mutierten Lysine im MALT1 C-Terminus sind schematisch eingezeichnet (rot). Die Balken stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). **(B)** Analyse der späten MALT1 Aktivität nach erniedrigter A20 Genexpression per siRNA in Jurkat T-Zellen. Während die nach Stimulation mit antiCD3/CD28 (links) oder P/I (rechts) induzierte MALT1 Aktivität im siGFP Kontrollansatz nach etwa 120 Minuten abklängt, ist die Aktivität in siRNA behandelten Zellen stärker und zeitlich deutlich verlängert. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Western Blot Detektion des A20 Proteins nach siRNA Behandlung der Jurkat T-Zellen ist repräsentativ.

Die Bedeutung der MALT1 Ubiquitinierung für die proteolytische Aktivität wurde zudem in einer A20 siRNA Studie in T-Zellen untersucht. Eine Kinetik der MALT1 Aktivität in siA20 und

zur Kontrolle siGFP behandelten Jurkat T-Zellen zeigte, dass sowohl die P/I, als auch die antiCD3/CD28 induzierte MALT1 Aktivität nach Herunterregulation der A20 Expression verstärkt und verlängert war (Abb. 3.5 B). Dies deutet auf eine negativ-regulatorische Funktion des A20 Proteins auf die Paracaspase Aktivität, die möglicherweise mit der MALT1 Inaktivierung etwa 120 bis 240 Minuten nach Stimulation des TCR zusammenhängt.

3.1.2.3 Dimerisierung der MALT1 Paracaspase Domäne ist entscheidend für die proteolytische Aktivität

Die kürzlich publizierte Struktur der Paracaspase Domäne verdeutlicht die hohe Ähnlichkeit von MALT1 zu humanen Caspuren. Insbesondere die Ausbildung eines Homodimers nach Bindung von Z-VRPR-FMK im aktiven Zentrum scheint wichtig für die Ausbildung eines funktionellen und stabilen Komplexes zu sein (Wiesmann et al, 2012; Yu et al, 2011). Im Zuge dieser Studien wurde die Bedeutung der Dimerisierung für die Paracaspase Aktivität allerdings nur ungenügend untersucht. Um diese Fragestellung eingehender zu analysieren, wurden MALT1 Expressionsplasmide zur Expression von MALT1 Dimerisierungsmutanten konstruiert. Hierbei wurden durch Austausch einzelner Basen innerhalb der MALT1 Dimerisierungsdomäne die MALT1 K524E und S552R Mutante generiert.

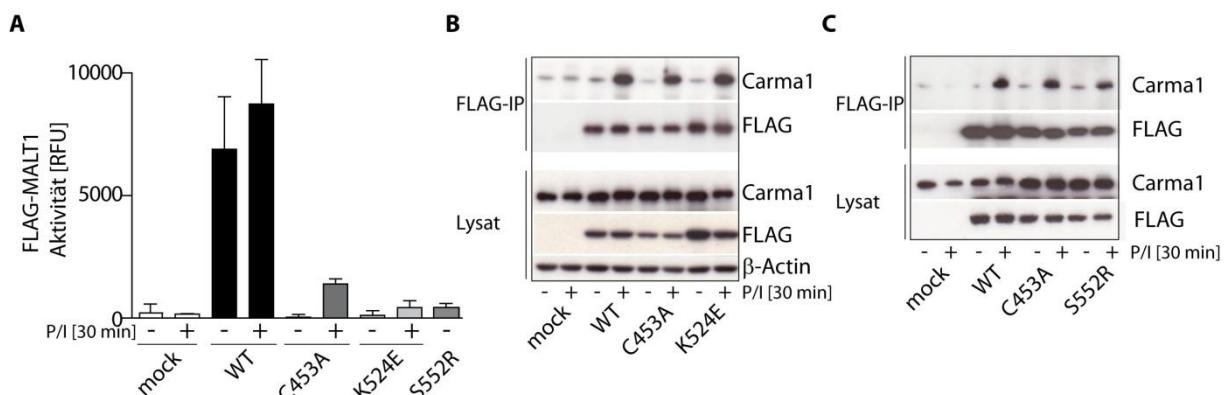


Abbildung 3.6: Mutationen innerhalb der MALT1 Dimerisierungsoberfläche führen zur Inaktivierung der Paracaspase Funktion. (A) Transfektion von Jurkat T-Zellen und FLAG-IP zur Aktivitätsbestimmung von überexprimierten FLAG-MALT1 Mutanten. Die in der Dimerisierungsoberfläche mutierten K524E und S552R MALT1 Mutanten sind katalytisch inaktiv. Die Balken stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). **(B)** und **(C)** Mutationen innerhalb der MALT1 Dimerisierungsoberfläche sind unbedeutend für die CBM-Assemblierung. FLAG-MALT1 K524E und S552R Mutanten wurden nach P/I Stimulation und anschließender FLAG-IP an CARMA1 und somit in den CBM Komplex rekrutiert. Die Daten sind repräsentativ für je 3 (links) oder 2 (rechts) unabhängige Experimente.

Durch unsere Kooperationspartner konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten keine Homodimere ausbilden (Schladerer, Lammens, Hopfner; persönliche Kommunikation). Nach Überexpression der Mutanten in Jurkat T-Zellen erfolgte die Reinigung der Proteine per FLAG-IP und eine Analyse der proteolytischen Aktivität. Hier zeigten sich sowohl die S552R

Mutante in unstimulierten, als auch die K524E in unstimulierten sowie P/I stimulierten Zellen komplett inaktiv. Dies deutet auf eine kritische Rolle der Dimerisierung für die Aktivität des Proteins (Abb. 3.6 A).

Weitgehend unklar ist dagegen die Rolle der MALT1 Dimerisierung bei der Stimulationsvermittelten Assemblierung des CBM-Komplexes. Diese Fragestellung kann über eine Rekrutierung des im Signalweg vorgeschalteten CARMA1 Proteins an die Mutanten aufgedeckt werden, da diese Bindung einen indirekten Hinweis auf die Assemblierung des kompletten CBM-Komplexes darstellt. Zur Durchführung dieser Untersuchung erfolgte nach einer Überexpression die FLAG-KoIP beider Proteine aus den Zelllysaten unstimulierter und stimulierter Jurkat T-Zellen und der immunologische Nachweis des CARMA1 Proteins in der IP Fraktion per WB. In Relation zum MALT1 WT wurde eine vergleichbare Menge CARMA1 mit beiden Mutanten ko-präzipitiert, was auf eine vollständige Integration der MALT1 Dimerisierungsmutanten in den CBM-Komplex und folglich eine unbedeutende Rolle der Dimerisierung der Paracaspase Domäne im Rahmen der CBM-Ausbildung deutet (Abb 3.6 B und C).

Die vorliegenden Daten liefern Hinweise auf eine für die Paracaspase Aktivität essentielle, für die Assemblierung des CBM-Komplexes dagegen unbedeutende Funktion der Paracaspase Dimerisierung.

3.1.3 Messung der proteolytischen Aktivität von rekombinantem MALT1

Zur Charakterisierung der MALT1 Aktivität und zur Identifikation von MALT1 Inhibitoren sollte rekombinantes, proteolytisch-aktives MALT1 hergestellt werden. Die Herstellung N-Terminal GST-konjugierter MALT1 Proteine unter sehr stringenten Expressionsbedingungen (siehe Methoden) führte zu einer effizienten Proteinausbeute. Aufgrund der Ergebnisse aus den zellulären Aktivitätsanalysen (Abb. 3.4 B), wurden neben dem vollständigen Protein (GST-MALT1 FL; Isoform B; ~ 118 kDa) auch kürzere Varianten aus den Aminosäuren 325 - 632 (~ 61 kDa) und 325 - 760 (MALT1_{Casp-Ig3}; ~ 70 kDa) sowie katalytisch inaktive C453A Mutanten der Proteine hergestellt. Die SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Reinigung der Proteine ist in Abbildung 3.7 A abgebildet. In den Fraktionen der FL WT und C453A Proteine wurden neben der erwarteten Bande zusätzliche Proteinbanden angefärbt. Das Muster der Banden war in beiden Fraktionen identisch, und daher unabhängig von der katalytischen Aktivität. Zur Aufklärung ihrer Identität wurden die Banden der FL WT Fraktion massenspektrometrisch analysiert (Abb. 3.7 B). In der Proteinbande A wurden hochsignifikante MALT1 Peptidfragmente identifiziert, welche sich über die gesamte Sequenz erstreckten (rot). Die Verteilung der Fragmente der Bande B deutete dagegen auf eine kurze C-terminale Trunkierung des Proteins. Die Laufstrecke der Banden C und D in der SDS-PAGE sowie die Verteilung der identifizierten Peptide deutete an, dass es sich hierbei

um inaktive N-terminale MALT1 Fragmente handelte. Vermutlich entstehen die Fragmente bereits während der bakteriellen Expression.

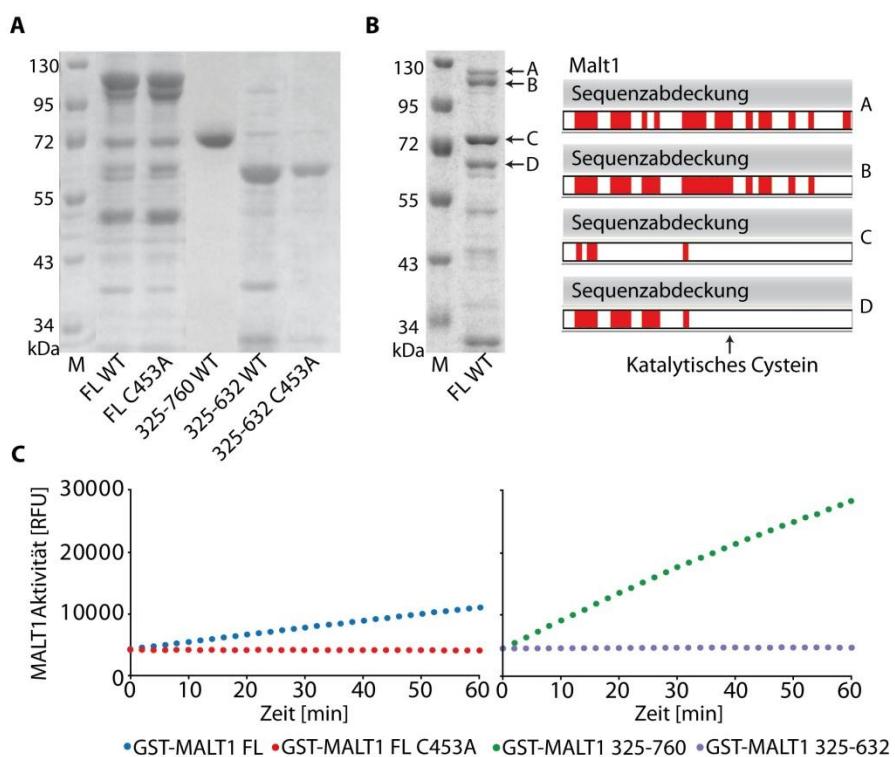


Abbildung 3.7: Massenspektrometrische Analyse der GST-MALT1 Proteinherstellung. (A) SDS-PAGE rekombinanter MALT1 Proteine. Die im BL21-CodonPlus RIPL *E. coli* Stamm produzierten MALT1 Proteine (3 µg des Eluats) wurden nach Reinigung über Glutathion Sepharose FF Säulen durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassie (Page Blue) angefärbt. M = Proteingrößenmarker. (B) MALDI-TOF Analyse der FL WT Elutionsfraktion. Die Sequenzabdeckung der identifizierten MALT1 Peptide ist in rot dargestellt und die Position des katalytischen Cysteins innerhalb der Paracaspase Domäne eingezeichnet. (C) Kinetik der Ac-LRSR-AMC (50 µM) Proteolyse durch GST-MALT1 Varianten. In Übereinstimmung mit den zellulären Daten waren sowohl GST-MALT1 FL (105 nM) als auch MALT1_{Casp-Ig3} (17 nM) proteolytisch aktiv und die im C-Terminus stärker verkürzte 325 - 632 (205 nM) Deletionsmutante inaktiv. Die FL C453A Mutante (105 nM) besaß keine Aktivität.

Eine Untersuchung der GST-MALT1 Proteine im Spaltungsexperiment zeigte, dass in Übereinstimmung mit den zellulären Daten, nur MALT1 FL (1 - 813) und MALT1_{Casp-Ig3} (325 – 760) proteolytisch aktiv waren (Abb. 3.7 C). Die hohe Aktivität von MALT1_{Casp-Ig3} gegenüber der 325 - 632 Deletionsmutante bestätigte auch unter diesen Bedingungen eine essentielle Beteiligung der Ig3 Domäne an der Paracaspase Aktivität. Auch die Aktivität der rekombinanten Proteine war zudem von hohen Ammonium- oder Natriumcitrat Konzentrationen (> 0,5 M) abhängig (nicht gezeigt). Wie erwartet besaß die katalytisch inaktive C453A Mutante keine proteolytische Aktivität. Nach Titration der Protein- und Substratkonzentration wurde in weiteren Ansätzen 105 nM (250 ng/20 µl) FL MALT1 WT oder C453A, 17 nM (25 ng/20 µl) MALT1_{Casp-Ig3} sowie 50 µM des Ac-LRSR-AMC Substrats eingesetzt.

3.1.3.1 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von MALT1

Um weitere Erkenntnisse zur Anwendbarkeit des Spaltungsexperiments in einem Wirkstoffscreen und zusätzlich über die proteolytischen Eigenschaften von MALT1 zu gewinnen, wurde das pH Optimum, die Substratspezifität sowie die Hemmung durch spezifische und allgemeine Proteaseinhibitoren unter Verwendung von rekombinantem MALT1 untersucht.

Angesichts eines Einsatzes des rekombinanten Spaltungsexperiments zur Durchführung des Hochdurchsatz Wirkstoffscreenings bot die Bestimmung des pH Optimums von MALT1 eine einfache Möglichkeit die *in vitro* Aktivität von MALT1 zu steigern.

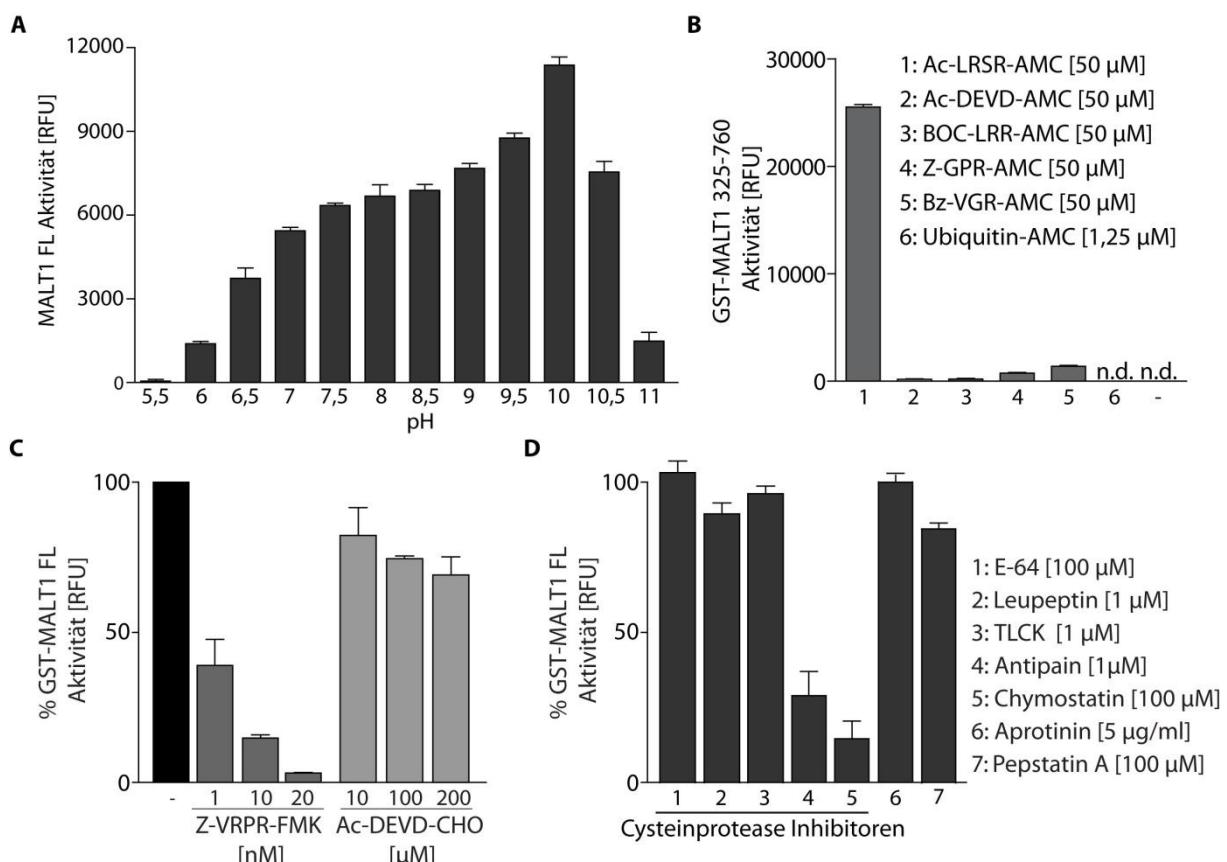


Abbildung 3.8: Charakterisierung der proteolytischen MALT1 Aktivität. (A) Bestimmung des pH Optimums im fluorogenen Spaltungsexperiment. Die Paracaspase Aktivität besitzt ein pH Optimum von 10. Weitere Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzfreisetzung einer 60-minütigen Messung als Balken dargestellt. Dieser repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) MALT1 besitzt eine hohe Substratspezifität gegenüber Ac-LRSR-AMC. Das Caspase Substrat Ac-DEVD-AMC wurde nicht gespalten. (C) Zugabe des irreversiblen Z-VRPR-FMK Inhibitorpeptids führte bereits ab einer Konzentration von 1 nM zu einer ausgeprägten MALT1 Hemmung. Dagegen wurde MALT1 auch nicht durch hohe Konzentrationen des Ac-DEVD-CHO Caspaseinhibititors gehemmt. (D) Analyse der MALT1 Hemmung durch kommerzielle Proteaseinhibitoren. Unter den allgemeinen Proteaseinhibitoren besaßen nur die Cysteinprotease Inhibitoren Antipain und Chymostatin einen negativen Einfluss auf die Paracaspase Aktivität. Zur Auswertung (in C und D) wurde der Differenzwert DMSO-behandelter Kontrollansätze auf 100 % gesetzt und die übrigen Messwerte auf diesen bezogen. Die Konzentrationen der Hemmstoffe wurden nach Angaben des Herstellers festgelegt.

Zur Analyse des optimalen pH Wertes der Paracaspase Aktivität erfolgte die fluorogene Messung in unterschiedlichen Pufferansätzen mit steigendem pH von 5,5 bis 11. Interessanterweise besitzt die enzymatische MALT1 Aktivität *in vitro* ein unphysiologisches pH Optimum von 10 (Abb. 3.8 A). Folgemessungen erfolgten allerdings bei einem pH von 7, da bei höherem pH Bestandteile des Puffers ausfielen. Die Bestimmung der Substratspezifität erfolgte ebenfalls im Spaltungsexperiment nach Zusatz von verschiedenen fluorogenen Peptiden. In diesem Ansatz erwies sich MALT1 als sehr spezifisch gegenüber dem vom BCL10 Protein abgeleiteten Ac-LRSR-AMC Substrat. Das allgemeine Caspase Substrat Ac-DEVD-AMC wurde dagegen nicht von MALT1 gespalten. Dies zeigt, dass MALT1 trotz hoher struktureller Ähnlichkeit zu Caspisen eine unterschiedliche Substratspezifität besitzt. Es konnte außerdem keine Aktivität gegenüber Bz-VGR-AMC (Substrat der Trypsin-ähnlichen Aktivität des 20s Proteasoms), Z-GPR-AMC (Cathepsin Substrat), BOC-LRR-AMC (Substrat für Kallikrein5) sowie Monoubiquitin-AMC (Substrat für Deubiquitininasen) festgestellt werden (Abb. 3.8 B).

Die Zugabe des irreversiblen Z-VRPR-FMK Inhibitors zur MALT1 Spaltungsreaktion unter Verwendung des Ac-LRSR-AMC Substrats resultierte bereits bei einer geringen Konzentration von 10 nM in einer fast vollständigen Hemmung der proteolytischen Aktivität. Dagegen besaß der reversible Caspase 3/7 Hemmstoff Ac-DEVD-CHO bis zu einer Konzentration von 200 µM keine signifikante Wirkung auf MALT1, was grundsätzlich mit den Resultaten der Ac-DEVD-AMC Spaltung korrelierte (Abb. 3.8 C). Um zu prüfen, ob der Ac-DEVD-CHO Hemmstoff funktionsfähig ist wurde ein zur MALT1 Spaltungsreaktion vergleichbares Caspase 3 und Caspase 8 Experiment unter Verwendung des Ac-DEVD-AMC Substrats etabliert (Abb. 3.9 A).

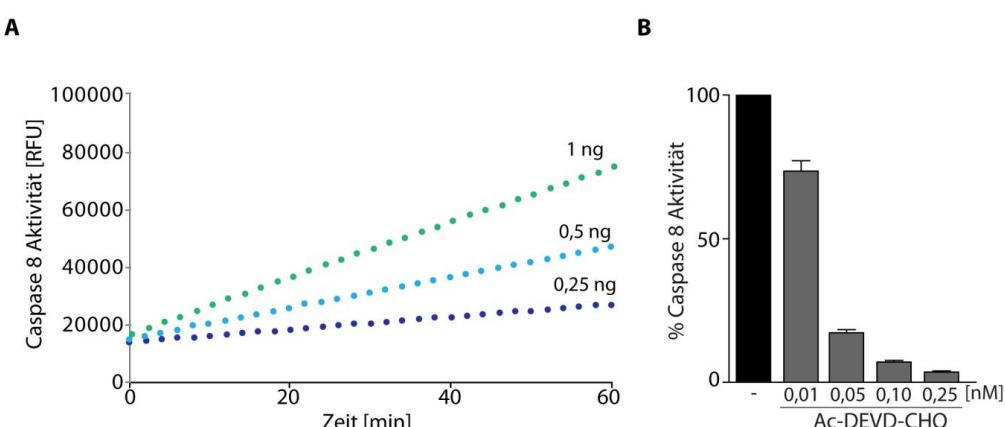


Abbildung 3.9: Etablierung des Caspase 8 Spaltungsexperiments. (A) Titration der Caspase 8 Menge im Spaltungsexperiment in Anwesenheit von 50 µM Ac-DEVD-AMC. Die Caspase besitzt unter identischen Bedingungen eine vielfach höhere Aktivität als MALT1. Für die weiteren proteolytischen Analysen wurde eine Proteinmenge von 0,25 ng eingesetzt. (B) Zugabe des reversiblen Caspase Inhibitors Ac-DEVD-CHO verringerte die proteolytische Aktivität der Caspase 8 bereits ab einer Konzentration von 50 pM auf unter 20 %.

Beide Caspasen besaßen in Relation zum MALT1 Protein eine deutlich höhere katalytische Aktivität und mussten für die Messung entsprechend gering konzentriert werden. Die Zugabe des Ac-DEVD-CHO Inhibitors zur Caspase 8 Spaltungsreaktion führte bereits bei sehr geringen Konzentrationen ab 50 pM zu einer vollständigen Hemmung der Caspase, was die Resistenz von MALT1 gegenüber Ac-DEVD-CHO weiter unterstreicht (Abb. 3.9 B).

Unter den allgemeinen Proteaseinhibitoren hatten die Cysteinprotease Inhibitoren E-64 (100 µM), Leupeptin (1 µM) und TLCK (1 µM) sowie Aprotinin (5 µg/ml) und der Aspartylprotease Inhibitor Pepstatin A (100 µM) keinen negativen Einfluss auf MALT1. Die Zugabe von Antipain (1 µM) und Chymostatin (100 µM) resultierte dagegen in einer Verringerung der enzymatischen MALT1 Aktivität (Abb. 3.8 D).

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine spezifische, zielgerichtete und vor allem stabile MALT1 Aktivität unter den getesteten Bedingungen. Sie beweisen außerdem, dass eine Hemmung der proteolytischen MALT1 Aktivität sowohl durch Peptidinhibitoren, als auch niedermolekulare Substanzen im Spaltungsexperiment möglich ist. Das Spaltungsexperiment eignet sich daher gut für die Identifikation von niedermolekularen MALT1 Hemmstoffen im Rahmen eines Hochdurchsatz Wirkstoffscreenings.

3.2 Identifikation von niedermolekularen MALT1 Hemmstoffen

3.2.1 Identifikation von Phenothiazin Derivaten (PD) als MALT1 Hemmstoffe durch Screening einer Wirkstoffbibliothek

Ein Wirkstoffscreening zur Identifikation von MALT1 Hemmstoffen wurde am Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP, Berlin) durchgeführt. Im Verlauf des Screenings wurden über 18.000 niedermolekulare Verbindungen der ChemBioNet Substanzbibliothek getestet. Diese Wirkstoffbibliothek ist bereits nach Kriterien des „World Drug Index“ (WDI) über maximale Diversität und eine geringe Überlappung der Wirkstoffbeschaffenheit und Oberflächenladung auf pharmazeutisch wirksame Moleküle vorsortiert. Zur Identifikation von MALT1 Hemmstoffen wurde das rekombinante Spaltungsexperiment mit GST-MALT1 FL durchgeführt. Die Qualität des Wirkstoffscreens wurde mit einem Z-Faktor von ~ 0.7 bestätigt. Die experimentellen Parameter des Screenings sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Analyse der Primärdaten erfolgte über eine manuelle Auswertung, in welcher die Differenzwerte einer 20-minütigen Fluoreszenzmessung für alle Ansätze einer 384-Loch Mikroplatte berechnet (Abb. 3.10 A) und graphisch aufsteigend sortiert wurden (Abb. 3.10 B). Zusätzlich wurden die Differenzwerte von DMSO-behandelten (Positiv Kontrolle), Z-VRPR-FMK-behandelten (1 nM, Medium Kontrolle) sowie GST-MALT1 C453A Ansätzen (Negativ Kontrolle) für jede 384-Loch Platte berechnet.

	Primärscreen	Validierung des Primärscreens
Verbindungen	~ 18.000	~ 300
Konz. der Verbindungen	10 µM	0.7- 90.9 µM
GSTMalt1 Konzentration	170 nM	170 nM
Volumen	11 µl	11 µl
Messzeit	20 min	20 min
Substratkonzentration	50 µM	50 µM
Mikroplatten	384 „half-well“ NBS	384 „half-well“ NBS
Hits	~ 300	30
% Hits der Bibliothek	1,67 %	0,17 %

Tabelle 3.1: Übersicht über die experimentellen Parameter des MALT1 Wirkstoffscreenings.

Anhand der Positiv und Medium Kontrollen wurde anschließend die prozentuale MALT1 Aktivität eingeschätzt und bei etwa 100 % und 60 % gekennzeichnet. Als positive Hits wurden anschließend alle Verbindungen festgelegt, die eine Reduktion der MALT1 Aktivität von mindestens 40 % erzielten.

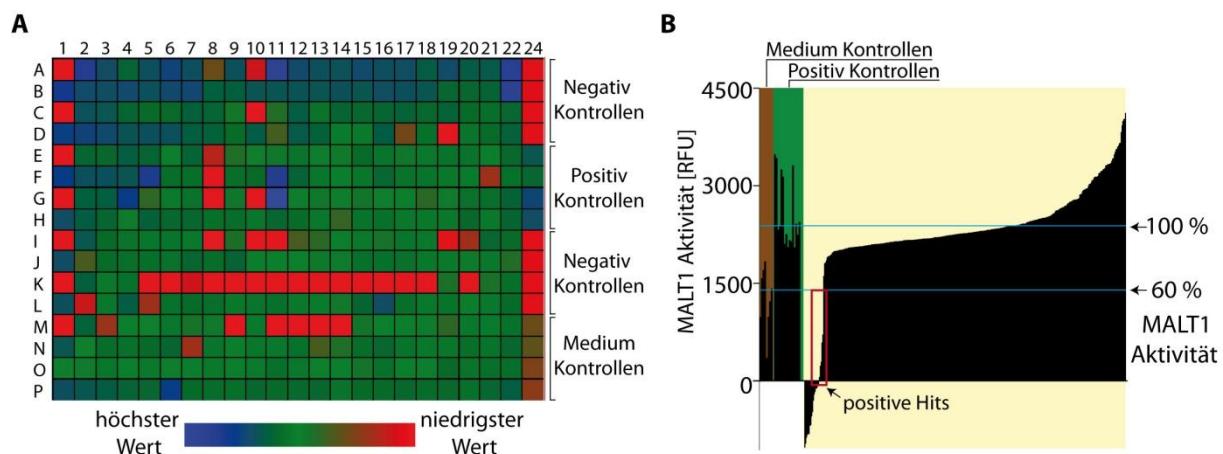


Abbildung 3.10: Schematische Auswertung des MALT1 Wirkstoffscreens. (A) „Heat map“ Darstellung der Fluoreszenzwerte einer exemplarischen 384-Loch Mikroplatte. Die berechneten Fluoreszenzwerte einer 20-minütigen Messung wurden anhand eines Farbschemas skaliert, wobei der höchste Wert der Platte blau, der niedrigste rot markiert. Wirksame Verbindungen wurden entsprechend rot markiert. Die Fehler bei der Durchführung des Screens ließen sich so anhand einer wiederholenden Farbverteilung erkennen. Die Farbverteilung in Reihe 1 deutet auf eine fehlerhafte Zugabe der Reaktionskomponenten. In Reihe 24 sind die Kontrollansätze dargestellt. (B) Schematische Darstellung der graphischen Auswertung einer 384-Loch Mikroplatte. Der gelbe Bereich markiert die Fluoreszenzwerte aller Testansätze der Platte in aufsteigender Anordnung. Die blauen Linien markieren je 100 und 60 % MALT1 Aktivität. Ihre Lage wurde visuell anhand der Positiv (P; grün) bzw. Medium Kontrollen (M; braun) festgelegt. Im roten Feld unterhalb der 60 % Grenze sind die wirksamsten Verbindungen der Platte markiert. Hits mit stark negativen Fluoreszenzwerten wurden manuell aussortiert.

Auf diese Weise wurden etwa 300 Hits des Primärscreens für eine Validierungsmessung in Form einer Dosis-abhängigen Doppelstudie am FMP ausgewählt. Eine genauere Analyse der gewählten Hits machte deutlich, dass bei hohen Konzentrationen einige der Verbindungen eine starke Autofluoreszenz aufwiesen. Hierdurch war die spezifische Messung der AMC Fluoreszenz gestört und als Resultat wurden die entsprechenden Verbindungen von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Nach massenspektrometrischer Analyse der über 300 Primärhits wurden weitere Substanzen, deren Resultate eine unklare chemische Identität oder die Anwesenheit von Nebenprodukten andeutete, aussortiert. Aus den resultierenden Hits wurden die 30 Verbindungen mit der effizientesten Dosis-abhängigkeit gegenüber MALT1 ausgewählt.

Um eine unerwünschte Wirkung der Substanzen auf die MALT1-nahverwandten Caspase auszuschließen, ist eine selektive Wirkung der Inhibitoren von hoher Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde das inhibitorische Potential der 30 verbliebenen Verbindungen einmalig auf MALT1 und parallel auf Caspase 8 getestet.

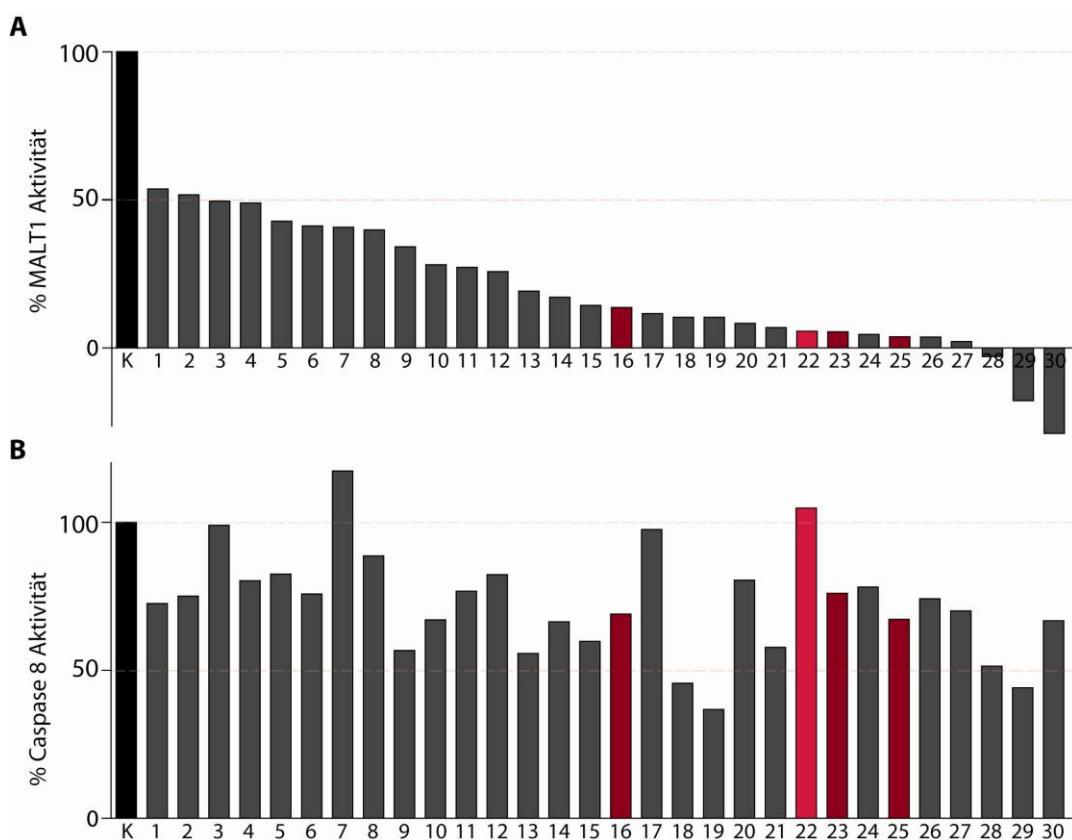


Abbildung 3.11: Einfluss der 30 wirksamsten Verbindungen auf die MALT1 und Caspase 8 Aktivität. (A) und (B) Analyse der 30 wirksamsten Verbindungen des Screens auf Inhibition von MALT1 und Caspase 8. Gegenübergestellt ist die proteolytische Aktivität von MALT1 (A) und Caspase 8 (B) nach Zugabe von 50 µM Wirkstoff. Zur Auswertung wurde die DMSO-behandelte Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Testansätze in Relation gesetzt. In rot sind Verbindungen der Phenothiazin Stoffklasse (dunkel) oder deren verwandte Strukturen (hell) markiert (Abb. 3.12).

In Abbildung 3.11 ist ein graphischer Vergleich der prozentualen MALT1 (3.11 A), bzw. Caspase 8 (3.11 B) Aktivität nach Inkubation mit 50 µM der Verbindungen in Relation zur DMSO Kontrolle dargestellt. Die Hemmstoffe besaßen eine unterschiedliche Wirkung auf MALT1, wobei die schwächste Substanz (1) noch eine Verringerung der Aktivität von etwa 50 % bewirkte.

In einer weiterführenden Analyse wurde jede Verbindung nochmals in steigender Konzentration von 5, 10, 25 und 50 µM gegen MALT1 und Caspase 8 getestet (nicht gezeigt). Nach Vergleich der chemischen Strukturen fiel auf, dass drei der effizientesten und selektivsten Verbindungen eine trizyklische Phenothiazin Grundstruktur besitzen (Abb 3.11 und 3.12 A; Verbindung 16, 23 und 25).

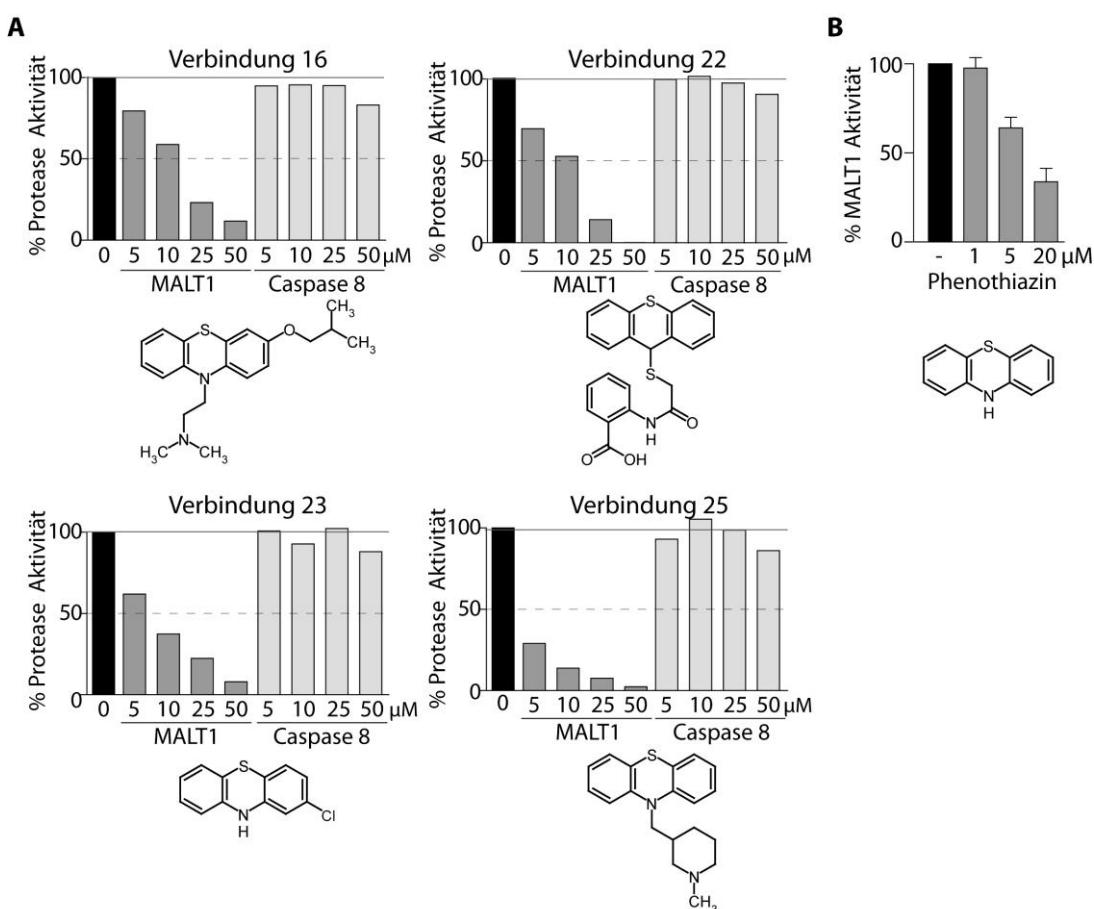


Abbildung 3.12: Identifikation der Phenothiazin Leitstruktur aus den 30 wirksamsten Verbindungen des Wirkstoffscreenings. (A) Dosis-abhängige Analyse der PD auf die proteolytische MALT1 und Caspase 8 Aktivität. Die Substanzen wurden unter den besten 30 Verbindungen des Screenings identifiziert und besitzen eine Phenothiazin (Verbindungen 16, 23, 25) oder Phenothiazin-verwandte Grundstruktur (Verbindung 22). Alle Verbindungen zeigen ein gutes Potential gegenüber MALT1 und eine sehr geringe Wirkung auf Caspase 8. **(B)** Die Phenothiazin Grundstruktur besitzt eine mittelmäßige inhibitorische Wirkung (IC_{50} : ~ 10 µM) auf MALT1.

Diese ist auch als Derivat mit einem durch Kohlenstoff substituierten Stickstoff in Verbindung 22 enthalten. Die Substanzen hemmten MALT1 Dosis-abhängig und wirkten sich bei einer Konzentration von 50 µM in einer Hemmung von über 90 % aus. Ihre Wirkung auf die

Caspase 8 Aktivität war dagegen gering, was eine hohe MALT1-selektive Wirkung der Substanzen andeutete. Um die Phenothiazin Stoffklasse als Leitstruktur für MALT1 Inhibitoren zu verifizieren wurde die Inhibition von MALT1 durch die Phenothiazin Grundstruktur untersucht: Das Phenothiazin hemmte MALT1 dosis-abhängig und besaß einen IC_{50} zwischen 5 – 20 μM (Abb. 3.12 B). Etwa 25 weitere kommerzielle Phenothiazin Derivate (PD) wurden anschließend auf inhibitorische Aktivität nach Zugabe zum rekombinannten MALT1 Spaltungsexperiment analysiert (siehe Anhang). Die Resultate deuteten auf eine breite inhibitorische Diversität innerhalb der PD, da nur ein geringer Anteil der PD eine effiziente Wirkung auf MALT1 besaß. Die meisten Verbindungen (12 - 26) zeigten ein schwaches Wirkpotential ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$) und nur 8 Verbindungen (4 - 11) inhibierten MALT1 mit einem geschätzten IC_{50} zwischen 5 und 20 μM . 3 der Verbindungen besaßen einen IC_{50} von unter 5 μM . Die Verbindung mit dem höchsten inhibitorischen Potential unter den getesteten Substanzen ist auch unter dem Trivialnamen „Mepazin“ bekannt (Abb. 3.13 A). Sie wurde bereits als beste Verbindung im Wirkstoffscreen identifiziert (Abb. 3.11 und 3.12 A; Verbindung 25). Auch die strukturell analogen Wirkstoffe Thioridazin und Promazin besaßen eine sehr gute Wirkung. Insgesamt weisen die Daten auf eine hochwirksame MALT1 Hemmung der PD und deuten an, dass distinkte PD vielversprechende Kandidaten für selektive MALT1 Inhibitoren darstellen könnten.

3.2.2 Wirkprofil und -mechanismus der identifizierten Phenothiazin Derivate (PD)

Zur genaueren Bestimmung des Wirkpotentials von Mepazin, Thioridazin und Promazin erfolgte die Messung der MALT1 Aktivität nach Zugabe von steigenden Konzentrationen der Substanzen. Die Analyse ergab, dass Mepazin bei Verwendung von GST-MALT1 FL mit einem IC_{50} von 0.83 μM am effektivsten war. Die IC_{50} von Thioridazin und Promazin waren mit je 3.43 μM und 3.79 μM etwa um den Faktor 5 höher als der von Mepazin (Abb. 3.13 B). Die Hemmung von GST-MALT1_{Casp-Ig3} war mit einem IC_{50} von 0.4 μM für Mepazin, 3.11 μM für Thioridazin und 3.84 μM für Promazin vergleichbar und deutete auf eine hocheffiziente Wirkung der PD auf MALT1. Alle drei Substanzen waren zudem hochselektiv für MALT1. Selbst bei Konzentrationen bis zu 50 μM war die Aktivität der Caspase 3 und Caspase 8 nicht beeinträchtigt (Abb. 3.13 C).

Um Erkenntnisse über die MALT1 Enzymkinetik und den inhibitorischen Mechanismus von Mepazin zu erhalten wurde eine Michaelis-Menten Analyse der MALT1 Aktivität in An- und Abwesenheit der Substanz durchgeführt. Die enzymkinetischen Parameter die hierzu ermittelt wurden, waren die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{MAX}) sowie die Michaelis-Menten Konstante, welche die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte durch Messung der GST-MALT1 FL Aktivität im fluorogenen Spaltungsexperiment in

Abhängigkeit von steigenden Substratkonzentrationen. Wie erwartet resultierte die Zugabe höherer Konzentrationen an Substrat zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.14 A).

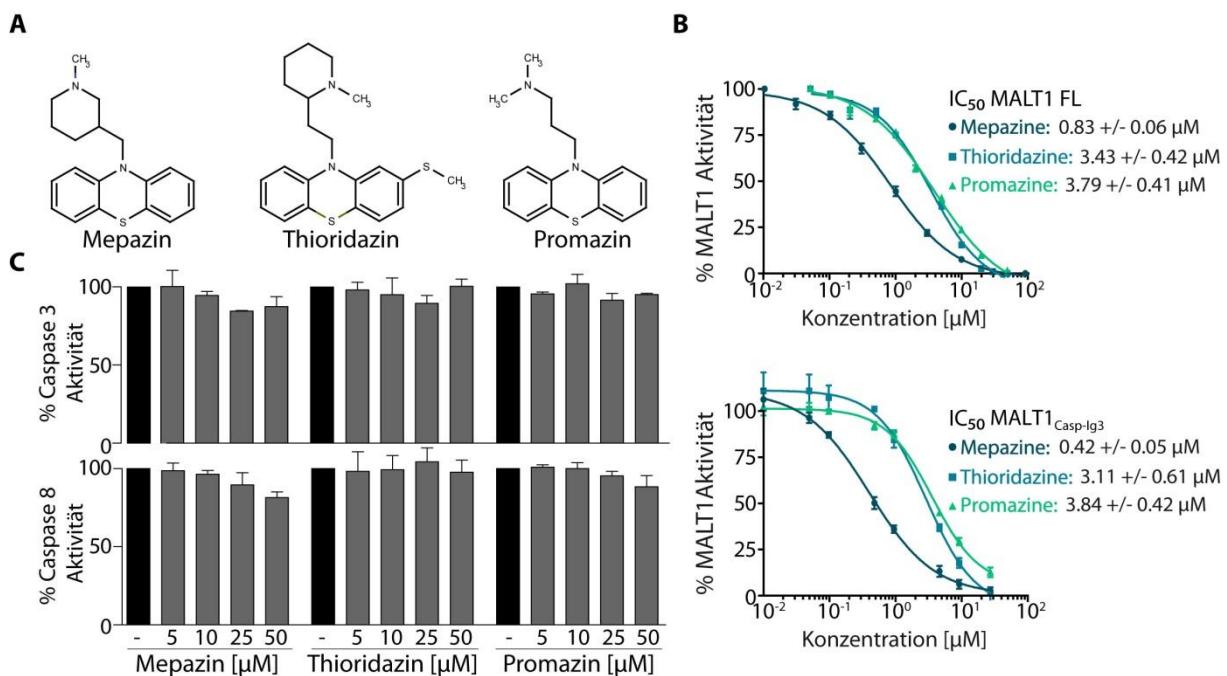


Abbildung 3.13: Mepazin, Thioridazin und Promazin sind hocheffiziente und selektive MALT1 Inhibitoren.

(A) Die chemischen Strukturen von Mepazin, Thioridazin und Promazin. Die Seitenkette der drei PD weist eine ähnliche Struktur auf, in welcher eine Propylkette zwischen zwei Stickstoff Atomen positioniert ist. Die Kette liegt in Promazin frei, in Mepazin und Thioridazin als Teil eines Piperidin-Rings vor. (B) Bestimmung des Wirkprofils (IC_{50}) der PD auf GST-MALT1 FL (oben) und GST-MALT1_{Casp-Ig3} (unten). Die MALT1 Aktivität wurde nach Zugabe steigender Konzentrationen der Substanzen ermittelt und ihr IC_{50} durch eine logarithmische nicht-lineare Regression (PRISM, Graphpad) berechnet. Während Mepazin einen IC_{50} im Bereich von 0.4 bis 0.8 µM aufweist, liegt der IC_{50} von Thioridazin und Promazin zwischen 3 und 4 µM. (C) Die PD besaßen keinen negativen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der Caspase 3 und 8.

Nach Zugabe von 1 µM Mepazin verringerte sich der V_{MAX} der Reaktion von 169.2 ± 7.5 auf 58.47 ± 3.7 RFU/min, während der K_M -Wert von MALT1 bei etwa 48 µM unverändert blieb. Der ermittelte K_M -Wert entspricht in etwa dem von Hachmann et al. unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen ermittelten Wert von 34,5 µM (Hachmann et al, 2012).

Die vorliegenden Daten sind charakteristisch für einen nicht-kompetitiven Inhibitor und weisen somit höchstwahrscheinlich auf eine allosterische Bindung der Substanz. Die Daten schließen somit eine kompetitive Bindung von Mepazin im aktiven Zentrum aus, da sich dies in einer Reduktion des K_M -Wertes widerspiegelt hätte.

Mepazin besitzt keine hoch-reaktiven chemischen Gruppen, die eine irreversible Bindung an MALT1 erlauben. Um dennoch der Frage nachzugehen, ob Malt1 reversibel durch PD gehemmt wird, wurde ein Auswaschexperiment mit rekombinantem GST-MALT1_{Casp-Ig3} und Mepazin durchgeführt (Abb. 3.14 B). Hierzu wurde MALT1 zunächst nach Bindung an

Glutathion-Sepharose mit einer steigenden Konzentration von Mepazin oder DMSO inkubiert. Mepazin wurde dann aus einem Teil der Ansätze durch mehrmaliges Waschen (je 3 x und 6 x) entfernt, während MALT1 in den Kontrollansätzen unbehandelt blieb.

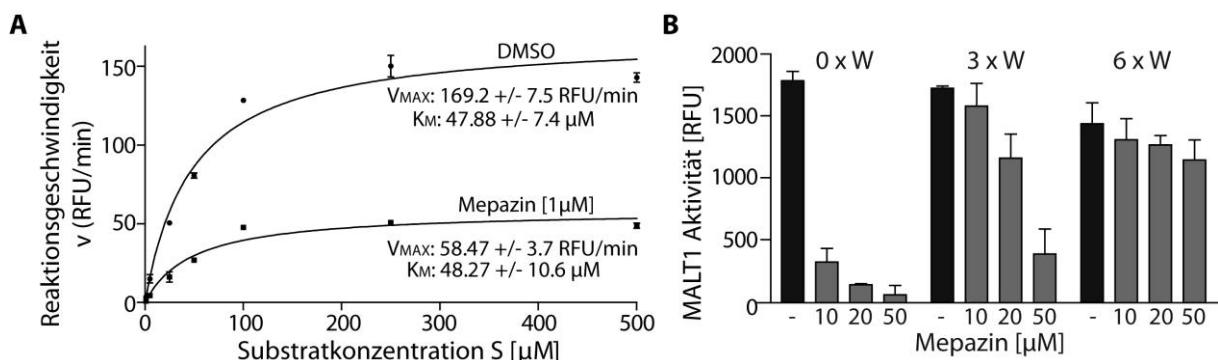


Abbildung 3.14: Mepazin ist ein reversibler und nicht-kompetitiver Inhibitor. (A) Bestimmung der Michaelis-Menten Enzymkinetik von MALT1. Die Zugabe von Mepazin resultierte in der Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit (V_{MAX}), während der berechnete K_m -Wert konstant blieb. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion wurde in verschiedenen Reaktionsansätzen nach Zusatz von steigenden Konzentrationen an Substrat ermittelt und gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Berechnung des V_{MAX} und des K_m -Wertes erfolgte durch eine Anpassung an ein Standard Michaelis-Menten Modell (PRISM). (B) Bestimmung des Wirkmechanismus der PD. Rekombinantes GST-MALT1_{Casp-Ig3} wurde zuerst an Glutathion-Sepharose gebunden und anschließend mit DMSO oder Mepazin behandelt. Während ein Teil der Ansätze unbehandelt blieb, wurden die restlichen Proben mehrfach mit PBS gewaschen um Mepazin zu entfernen. Anschließend wurde die Paracaspase Aktivität des Sepharose-gebundenen MALT1 bestimmt. Unbehandeltes MALT1 war drastisch inhibiert, dagegen resultierten die Waschschritte in einer höheren MALT1 Aktivität der Ansätze und deuten daher auf einen reversiblen Mechanismus der Mepazin Inhibition. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der SD.

Anschließend wurde die Paracaspase Aktivität der Proben analysiert. Es zeigte sich, dass unbehandeltes MALT1 bei Konzentrationen von 10 - 50 μM Mepazin stark inhibiert war. Eine Steigerung der Waschschritte resultierte dagegen in einer deutlichen Erhöhung der Aktivität, sodass nach 6 Waschschritten die MALT1 Aktivität auch nach Inkubation mit der höchsten Mepazin Konzentration von 50 μM fast vergleichbar mit der DMSO-behandelten Kontrolle war. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Mepazin aus den Reaktionsansätzen ausgewaschen werden konnte und beweist, dass die MALT1 Hemmung durch Mepazin auf einem reversiblen und, aufgrund der Resultate der Michaelis-Menten Kinetik, nicht-kompetitiven Mechanismus beruht.

3.3 Untersuchung der Auswirkung von PD auf die T-Zell Aktivierung

Die proteolytische Aktivität von MALT1 ist essentiell für die vollständige Aktivierung von T-Zellen: Rekonstitutionsexperimente von MALT1-defizienten Zellen mit der katalytisch inaktiven C464A Mutante sowie Behandlung mit dem Z-VRPR-FMK Inhibitorpeptid

resultierten in einer verringerten IL-2 Proteinproduktion nach Stimulation des TCR (Duwel et al, 2009). Um zu testen, ob PD eine mit dem Z-VRPR-FMK Peptidinhibitor vergleichbare zelluläre Wirkung besitzen, wurde zunächst die Inhibition der zellulären MALT1 Aktivität untersucht. In weiterführenden Studien wurde zudem analysiert, inwiefern eine PD-vermittelte MALT1 Inhibition die Stimulations-abhängige T-Zell Aktivierung beeinflusst.

3.3.1 PD Behandlung von Jurkat T-Zellen führte zur Erniedrigung der zellulären MALT1 Aktivität

Um den Einfluss der PD auf die zelluläre MALT1 Aktivität zu ermitteln, wurden Jurkat T-Zellen nach Prä-Inkubation mit Mepazin oder Thioridazin mit antiCD3/CD28 oder P/I stimuliert und anschließend die zelluläre MALT1 Aktivität im Spaltungsexperiment bestimmt. Nach Inkubation mit 10 µM war die Hemmung der antiCD3/CD28 und P/I induzierten Aktivität zu allen Zeitpunkten vorhanden, wobei Mepazin verglichen mit Thioridazin deutlich effektiver war (Abb. 3.15 A und B). Angesichts der fast vollständigen Hemmung von MALT1 trotz mehrmaligem Waschen der IP stellte sich die Frage, inwiefern der inhibitorische Mechanismus der PD auch auf zellulärer Ebene reversibel ist. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde, wie bereits mit rekombinantem MALT1 gezeigt, ein zelluläres Auswaschexperiment durchgeführt. Hierzu wurden Jurkat T-Zellen für 1 Std mit Mepazin inkubiert und die Zellen mit Zellmedium gewaschen. Anschließend erfolgte die P/I Stimulation und Messung der MALT1 Aktivität. Eine Analyse der Daten machte deutlich, dass Mepazin zelluläres MALT1 reversibel hemmt: Durch Steigerung der Waschschritte wurde eine vollständige Aktivierung von MALT1 erzielt (Abb. 3.15 C).

Erfolgten die Waschschritte allerdings erst nach Stimulation der Zellen verblieb die MALT1 Aktivität, ähnlich wie in Abbildung 3.15 A dargestellt, Dosis-abhängig verringert (Abb. 3.15 D). Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibitoren die Stimulations-induzierte Aktivierung von MALT1 negativ beeinflussen. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte in der allosterischen Bindung der Substanzen liegen. Vermutlich vermittelt die Bindung der PD an die Paracaspase-Domäne eine Stabilisierung der inaktiven MALT1 Konformation und unterbindet als Folge eine Umstrukturierung in die Stimulations-induzierte aktive MALT1 Konformation.

Zur Verifizierung der zellulären Hemmung von MALT1 durch Mepazin und Thioridazin erfolgte die Untersuchung der MALT1-vermittelten RelB Spaltung (Abb. 3.15 E). Hierzu wurden Jurkat T-Zellen nach Prä-Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Mepazin und Thioridazin mit antiCD3/CD28 und P/I stimuliert. Die Analyse der RelB Spaltung erfolgte im Zelllysat per Western Blot Detektion.

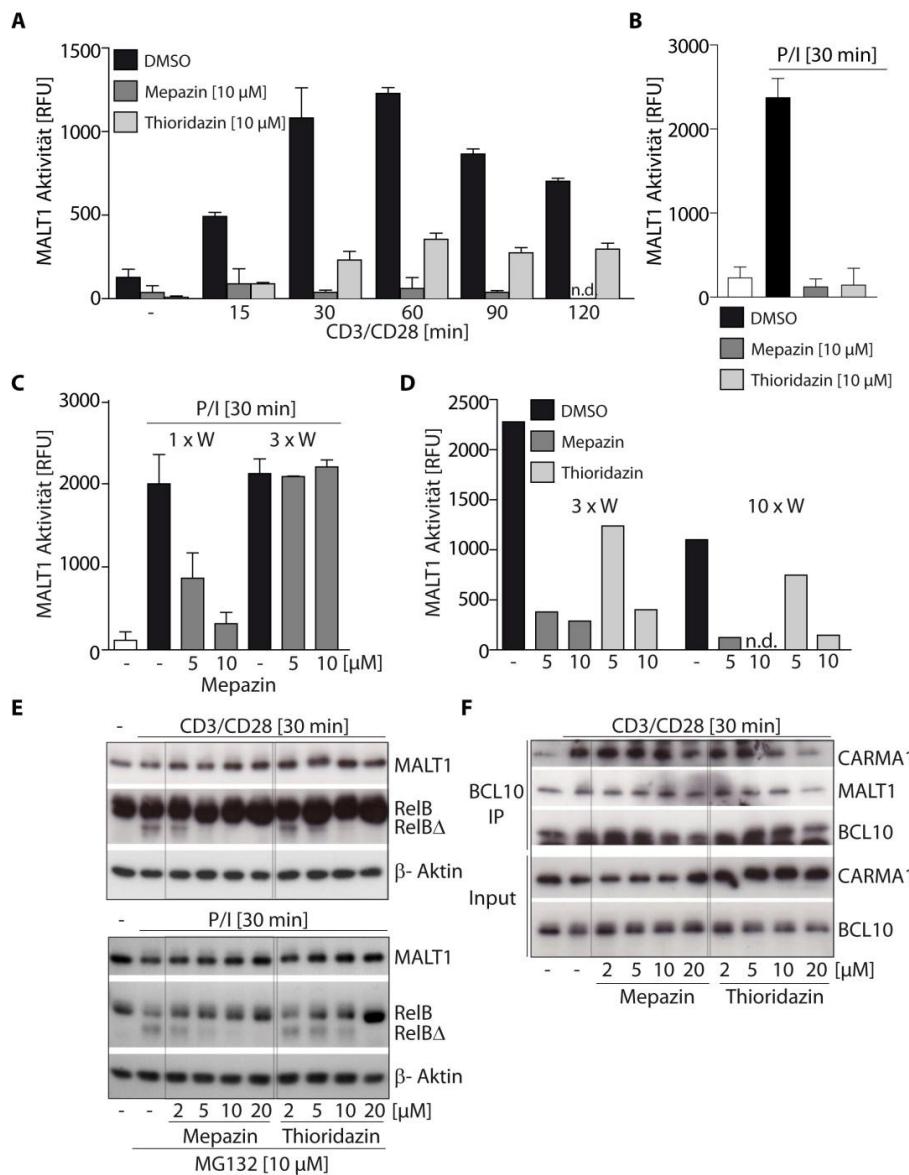


Abbildung 3.15: Mepazin und Thioridazin Behandlung von Jurkat T-Zellen führte zu einer Inhibition der MALT1 Aktivität. (A) MALT1-KoIP nach Inkubation von Jurkat T-Zellen ($2,5 \times 10^5$) mit Mepazin und Thioridazin (3 Std) und Analyse der MALT1 Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach antiCD3/CD28 Stimulation. Die Inkubation mit PD führte zu einer starken Verringerung der MALT1 Aktivität. Die Fluoreszenzwerte wurden als Balkendiagramm dargestellt, welche den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten darstellen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). (B) MALT1-KoIP nach Inkubation von Jurkat T-Zellen mit Mepazin und Thioridazin und Analyse der MALT1 Aktivität nach 30 min P/I Stimulation (wie in A). (C) und (D) Analyse der MALT1 Aktivität von Jurkat T-Zellen nach DMSO oder Mepazin (C) bzw. DMSO, Mepazin oder Thioridazin (D) Inkubation (3 Std) und Auswaschen der Verbindungen aus den Zellen vor (C) bzw. nach (D) P/I Stimulation der Zellen. Die proteolytische MALT1 Aktivität (in C) besaß nach dem Auswaschen von Mepazin aus den Zellen (3 x) das gleiche Potential wie DMSO-behandelte Zellen. Dies deutet grundsätzlich auf eine reversible Hemmung des zellulären MALT1 durch PD. Wurden die Waschschritte erst nach Stimulation der Zellen durchgeführt (in D), waren sie wirkungslos und MALT1 selbst nach 10 Waschschritten Dosis-abhängig inhibiert. Die Balken stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken die Standardabweichung (SD) dar. (E) WB Detektion der RelB Spaltung von Jurkat T-Zellen nach Prä-Inkubation mit Mepazin und Thioridazin und antiCD3/CD28 (oben) oder P/I (unten) Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. (F) BCL10-KoIP und Nachweis der CARMA1 Rekrutierung nach Inkubation mit Mepazin oder Thioridazin. Die Stimulations-abhängige Rekrutierung der BCL10/MALT1 Einheit an CARMA1 wurde nicht durch die Substanzen beeinflusst. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass PD direkt auf MALT1 und nicht auf MALT1-vorgesetzte Faktoren wirkt. Die Daten stellen ein repräsentatives aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Auch auf zellulärer Ebene erwiesen sich die PD als effiziente MALT1 Inhibitoren: Die Stimulations-abhängige Spaltung des RelB Proteins war bereits ab einer Konzentration von 2 µM Mepazin oder 5 µM Thioridazin inhibiert (Abb. 3.15 E).

Die Aktivierung von endogenem MALT1 wird von vorgeschalteten Ereignissen, wie der Rekrutierung des Proteins in den CBM-Komplex induziert. Die Assemblierung des CBM-Komplexes nach TCR und BCR Stimulation hängt von zahlreichen vorgeschalteten Faktoren ab, deren Regulation durch zahlreiche katalytische Reaktionen, wie z. B. Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungen sowie Ubiquitinierungsreaktionen vermittelt wird (Thome et al, 2010) (Abb. 3.2 A). Um auszuschließen, dass die PD-vermittelte Inhibition von MALT1 indirekt auf Hemmung eines MALT1 vorgeschalteten Faktors innerhalb des NF-κB Signalweges beruht, wurde die Ausbildung des CBM-Komplexes in Anwesenheit der PD untersucht (Abb. 3.15 F). Hierbei kann die Rekrutierung des CARMA1 Proteins an präzipitiertes BCL10 oder MALT1 als indirekter Hinweis auf eine funktionelle Ausbildung des CBM-Komplexes gesehen werden. Zur Untersuchung des Einflusses der PD auf den CBM-Komplex wurden daher Jurkat T-Zellen nach Prä-Inkubation mit Mepazin und Thioridazin mit antiCD3/CD28 stimuliert und eine BCL10-IP aus den Zelllysaten durchgeführt. Anschließend erfolgt die Detektion des CARMA1 Proteins per Antikörper (WB) in der IP-Fraktion. Die Analyse zeigte, dass CARMA1 nach Stimulation auch in Anwesenheit von Mepazin oder Thioridazin an BCL10 rekrutiert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass PD vermutlich keine MALT1-vorgeschalteten Ereignisse beeinflussen, sondern in Zellen eine direkte Hemmung der katalytischen MALT1 Aktivität bewirken.

Insgesamt weisen die Daten auf eine hocheffektive, spezifische und reversible Inhibition von zellulärem MALT1 durch Mepazin und Thioridazin. Eine Folgeanalyse sollte daher aufzeigen, ob durch PD-vermittelte MALT1 Inhibition auch die Stimulations-abhängige IL-2 Sekretion und T-Zell Aktivierung beeinflusst wird.

3.3.2 Verminderte T-Zell Aktivierung durch Mepazin und Thioridazin

Um die Auswirkungen der durch Mepazin und Thioridazin vermittelten MALT1 Inhibition auf die Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst die induzierte IL-2 Produktion von Jurkat T-Zellen nach Inkubation mit den Verbindungen ermittelt. Hierzu wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von Mepazin und Thioridazin für 20 Stunden mit P/I oder antiCD3/CD28 stimuliert und die IL-2 Level im Zellkulturmedium mittels ELISA bestimmt (Abb. 3.16 A). Während unstimulierte Zellen sehr geringe Mengen IL-2 sezernierten, war die Sekretion nach P/I auf etwa 150 und nach antiCD3/CD28 Stimulation auf 45 pg/ml erhöht. Prä-Inkubation der Zellen mit 5 und 10 µM Mepazin oder Thioridazin bewirkte eine Dosis-abhängige Verminderung der IL-2 Sekretion. In einer *ex vivo* Studie primärer muriner CD4⁺

T-Zellen konnte der negative Einfluss der PD auf die IL-2 Ausschüttung verifiziert werden (Abb. 3.16 B).

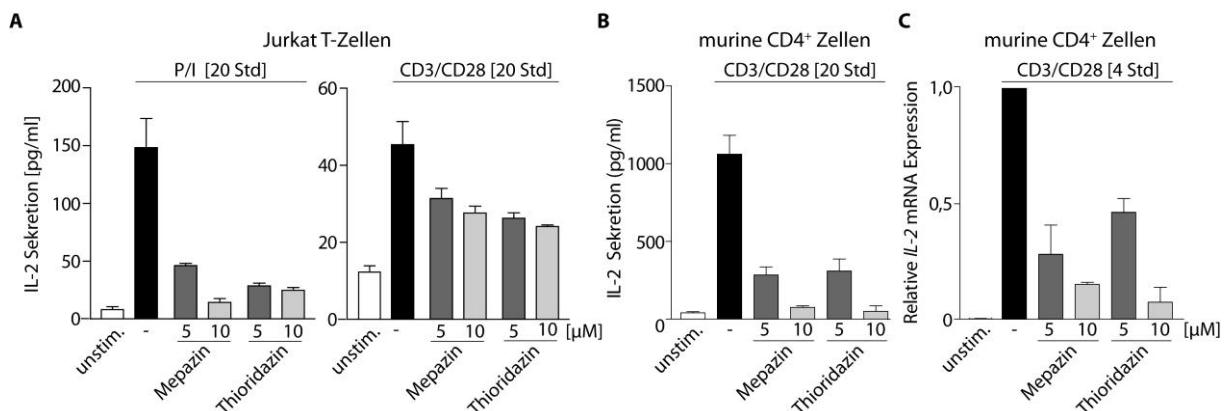


Abbildung 3.16: Inkubation von Mepazin und Thioridazin führte zur verminderten Regulation des NF-κB Zielgens *IL-2* in Jurkat T-Zellen und ex vivo in primären murinen CD4⁺ T-Zellen.

(A) Bestimmung der sezernierten IL-2 Menge Mepazin- oder Thioridazin-behandelter Jurkat T-Zellen (5×10^5) per ELISA. Die IL-2 Sekretion wurde nach Stimulation der Zellen mit P/I (links) oder antiCD3/CD28 (rechts) ermittelt. Verglichen mit DMSO-behandelten Kontrollzellen führte die Prä-Inkubation mit beiden Hemmstoffen zu einer Dosis-abhängigen Verminderung der IL-2 Sekretion. (B) und (C) Ex vivo Analyse der IL-2 Sekretion und Transkriptmenge muriner CD4⁺ T-Zellen nach Prä-Inkubation mit Mepazin oder Thioridazin und Stimulation mit antiCD3/CD28. (B) Behandlung mit Mepazin oder Thioridazin resultierte in einer verringerten IL-2 Sekretion. (C) Die *IL-2* Transkriptmenge war nach Behandlung der Zellen mit den PD ebenfalls erniedrigt. Die RNA Extraktion erfolgte 4 Stunden nach Stimulation und die *IL-2* Transkriptmenge wurde per quantitativer real-time RT-PCR in Relation zum *Actb* (β-Aktin) Haushaltsgen bestimmt. Zur Auswertung wurde die relative Transkriptmenge der DMSO Referenz auf 1 gesetzt und Hemmstoff-behandelte Ansätze in Relation gesetzt.

Es zeigte sich, dass die murinen Zellen im Vergleich zu Jurkat T-Zellen deutlich höhere Mengen IL-2 sezernierten. Nach Prä-Inkubation der Zellen mit 5 und 10 μM beider Verbindungen und Stimulation des TCR mit antiCD3/CD28 war die sezernierte IL-2 Proteinmenge deutlich verringert. Um zu beweisen, dass der negative Einfluss der MALT1 Inhibitoren auf die IL-2 Sekretion auf einer Verringerung der *IL-2* Genexpression beruhte, wurde eine Bestimmung der *IL-2* Genexpression durchgeführt. Hierzu wurde die relative IL-2 Genexpression der Zellen durch eine quantitative real-time RT-PCR analysiert. Nach kurzzeitiger Mepazin und Thioridazin Inkubation der Zellen war eine, mit den Ergebnissen des ELISAs, übereinstimmende Verringerung des IL-2 Transkriptlevels nachweisbar. Dies beweist, dass die Verminderung der IL-2 Sekretion bereits aus einer negativen Wirkung der PD auf die *IL-2* Genexpression resultiert.

Um aufzuzeigen, dass die PD-vermittelte Inhibition der MALT1 Aktivität auch eine verringerte Aktivierung von primären humanen Lymphozyten bewirkt, wurde eine Inhibitorstudie mit aus Spenderblut isolierten humanen PBMCs (mononukleäre Blutzellen; engl.: *peripheral blood mononuclear cells*) durchgeführt. Hierzu wurde die Wirkung der Substanzen auf die IL-2

Sekretion sowie *IL-2* Genexpression der Zellen nach Stimulation mit antiCD3/CD28 analysiert (Abb. 3.17).

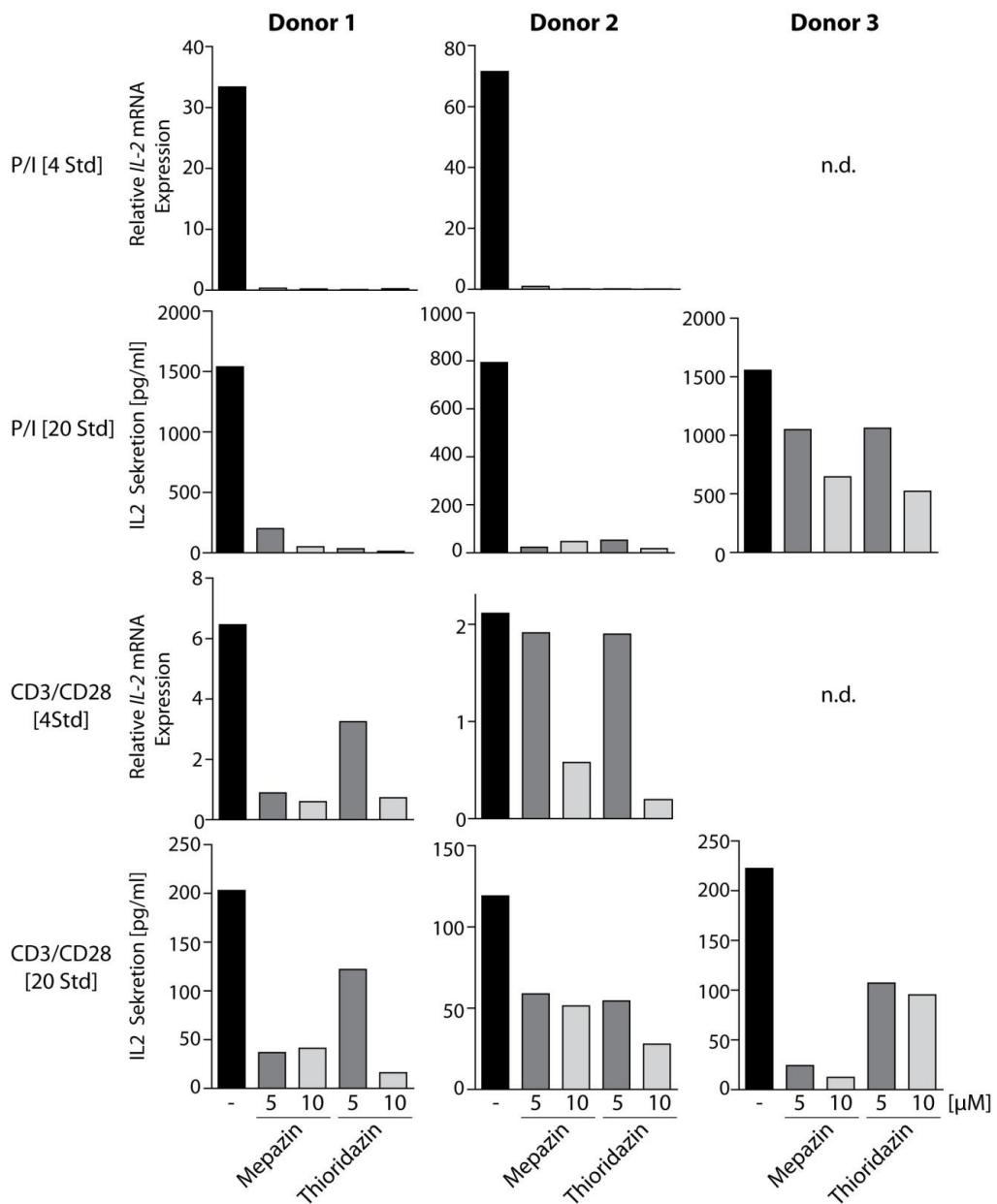


Abbildung 3.17: Inkubation von Mepazin und Thioridazin führte zur verringerten Produktion des NF-κB Zielgens *IL-2* in primären humanen PBMCs. Ex vivo Analyse der *IL-2* Transkriptmenge und Proteinproduktion humaner PBMCs nach Behandlung mit Mepazin oder Thioridazin. Übereinstimmend mit den Effekten in Jurkat und murinen CD4⁺ T-Zellen führte die Behandlung mit Mepazin und Thioridazin zu einer Dosis-abhängigen Reduktion des P/I- und antiCD3/CD28 induzierten IL-2.

Nach Stimulation sezernierten die Zellen je nach Spender 100 bis 200 pg/ml IL-2. Mepazin oder Thioridazin bewirkten analog zu Jurkat T-Zellen und den primären murinen CD4⁺ T-Zellen eine deutliche Absenkung der IL-2 Sekretion. Entsprechend war auch die *IL-2* Transkriptmenge verringert. Die Effekte der PD waren dabei im P/I stimulierten Ansatz sehr ausgeprägt: In Anwesenheit der Hemmstoffe war keine Aktivierung der *IL-2* Genexpression

detektierbar. Die Auswirkung der Hemmstoffe auf die antiCD3/CD28 Stimulation waren dagegen milder und abhängig von der verabreichten Dosis. Dies lag vermutlich an der grundsätzlich schwächeren Aktivierung der Zellen durch antiCD3/CD28, die vor allem in Donor 2 nur in einer Verdopplung der Genexpression resultierte.

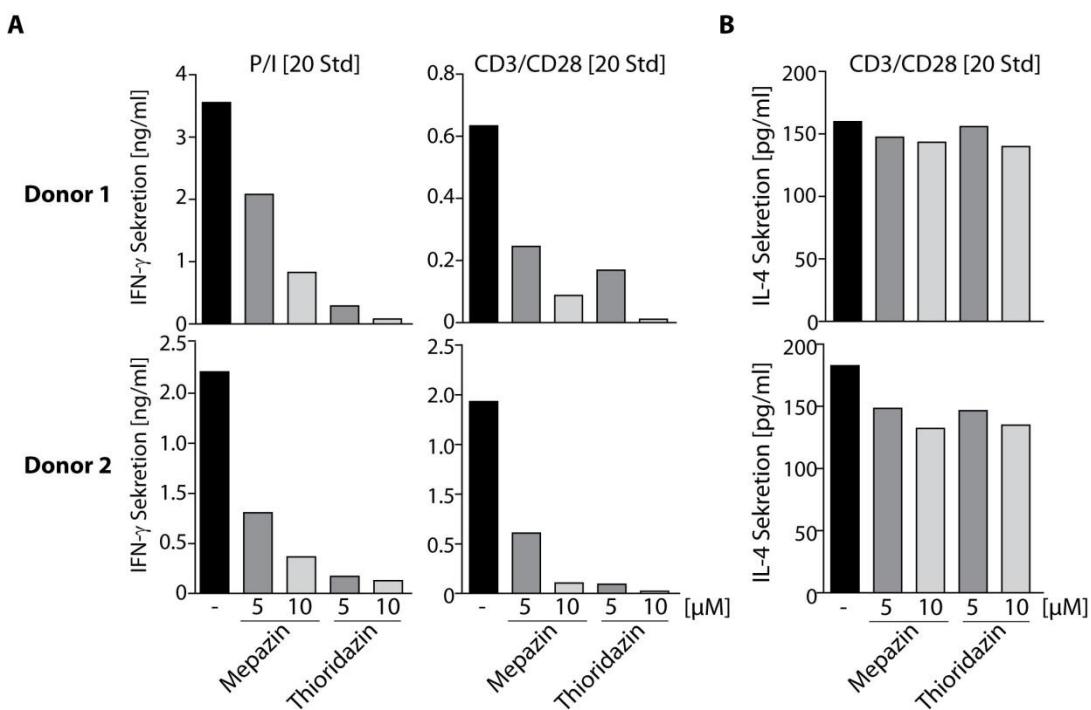


Abbildung 3.18: Mepazin und Thioridazin Inkubation von PBMCs resultierte in einer differentiell erniedrigten Ausschüttung von NF-κB regulierten Zytokinen. Die durch P/I oder antiCD3/CD28 Stimulation induzierte IFN- γ Sekretion humaner PBMCs (5×10^5) war nach Prä-Inkubation mit Mepazin oder Thioridazin reduziert. Die IL-4 Produktion und Ausschüttung der Zellen blieb dagegen unverändert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration weiterer NF-κB regulierter Zytokine weist möglicherweise auf eine neue divergente Rolle von MALT1 bei der NF-κB Genexpression. Während die IFN- γ Ausschüttung der PD-behandelten Zellen erniedrigt war, war die sezernierte IL-4 Konzentration in Relation zur DMSO Kontrolle nahezu unverändert (Abb. 3.18). Dies zeigt, dass PD eine selektive Wirkung auf NF-κB-gesteuerte Zytokine wie IL-2 und IFN γ besitzen und lässt den Schluss zu, dass die *IL-4* Genexpression durch MALT1-unabhängige Mechanismen reguliert wird.

Die Resultate der T-Zell Inhibitorstudien lassen auf eine hoch-effiziente zelluläre Wirkung der PD schließen. Die Wirkstoffe beweisen durch Unterdrückung der MALT1-abhängigen IL-2 Produktion, dass sie ein starkes Potential zu Hemmung der T-Zell Aktivierung besitzen. Dabei ist das Potential und der Wirkmechanismus der Inhibition grundsätzlich mit den Resultaten des Z-VRPR-FMK Inhibitors oder der T-Zell Rekonstitution mit der katalytischen MALT1 C453A Mutante vergleichbar (Coornaert et al, 2008; Duwel et al, 2009; Rebeaud et al, 2008).

3.4 Untersuchung der Auswirkung von PD auf ABC-DLBCL Tumorzellen

ABC-DLBCL Zelllinien zeichnen sich durch einen konstitutiven MALT1-IKK-NF-κB Signalweg aus, welcher durch Aufrechterhaltung anti-apoptotischer Signale kritisch für das Überleben der Lymphome ist (Davis et al., 2010; Ngo et al., 2006). Angesichts der essentiellen Funktion der MALT1 Paracaspase in diesem Zusammenhang war eine Analyse der inhibitorischen PD Wirkung auf die konstitutive NF-κB Signalachse und das Überleben von ABC-DLBCL Zellen von hoher Bedeutung. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich der mögliche Einsatz von PD im Rahmen einer ABC-DLBCL Therapie einschätzen (Ferch et al, 2009; Kloo et al, 2011).

3.4.1 Konstitutive MALT1 Aktivität von ABC-DLBCL Zellen wird durch Mepazin, Thioridazin und Promazin inhibiert

Zu Beginn der DLBCL Studie stellte sich die Frage, inwiefern die konstitutive Paracaspase Aktivität der ABC Zelllinien, wie bei der induzierbaren Aktivität der T-Zellen beschrieben, durch Inkubation mit Mepazin, Thioridazin oder Promazin beeinträchtigt wird. Um dies zu überprüfen, wurden die ABC-DLBCL Zelllinien HBL1, OCI-Ly3, OCI-Ly10, TMD8, und U2932 für 4 Std mit 5 und 10 µM Mepazin, Thioridazin, Promazin, oder entsprechend mit DMSO behandelt und die Aktivität des präzipitierten MALT1 im Spaltungsexperiment untersucht. In allen fünf untersuchten ABC-DLBCL Zelllinien war die MALT1 Aktivität nach Zugabe der PD Dosis-abhängig verringert (Abb. 3.19 A). Die teils starke Hemmung von MALT1 nach partieller Reinigung der IP stimmte mit den Resultaten der MALT1 Analyse nach IP aus Jurkat T-Zellen überein und deutete an, dass PD auch das konstitutive MALT1 der ABC-DLBCL Zellen in eine inaktive Konformation zwingen. Mepazin (10 µM) führte zu einer Verringerung der MALT1 Aktivität von über 75 % und hatte die höchsten Effekte in den Zelllinien. Die Behandlung mit Thioridazin und Promazin führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der MALT1 Aktivität, in Übereinstimmung mit den geringeren *in vitro* IC₅₀ der Substanzen allerdings geringer als Mepazin. Zur Verifizierung des negativen Einflusses der PD auf die MALT1 Aktivität erfolgte eine Analyse der zellulären MALT1 Proteinsubstrate BCL10 und RelB in ABC-DLBCL Zellen (Ferch et al., 2009; Haiflinger et al., 2011). Zur Untersuchung der Spaltung wurden ABC-DLBCL Zellen für 24 Std mit Mepazin inkubiert und BCL10 anschließend in einer WB Studie mit einem N-terminalen Antikörper analysiert. In allen ABC-DLBCL Zellen führte die Zugabe von 1 – 2,5 µM Mepazin bereits zu einer deutlichen Blockade der BCL10 Spaltung (Abb. 3.19 B).

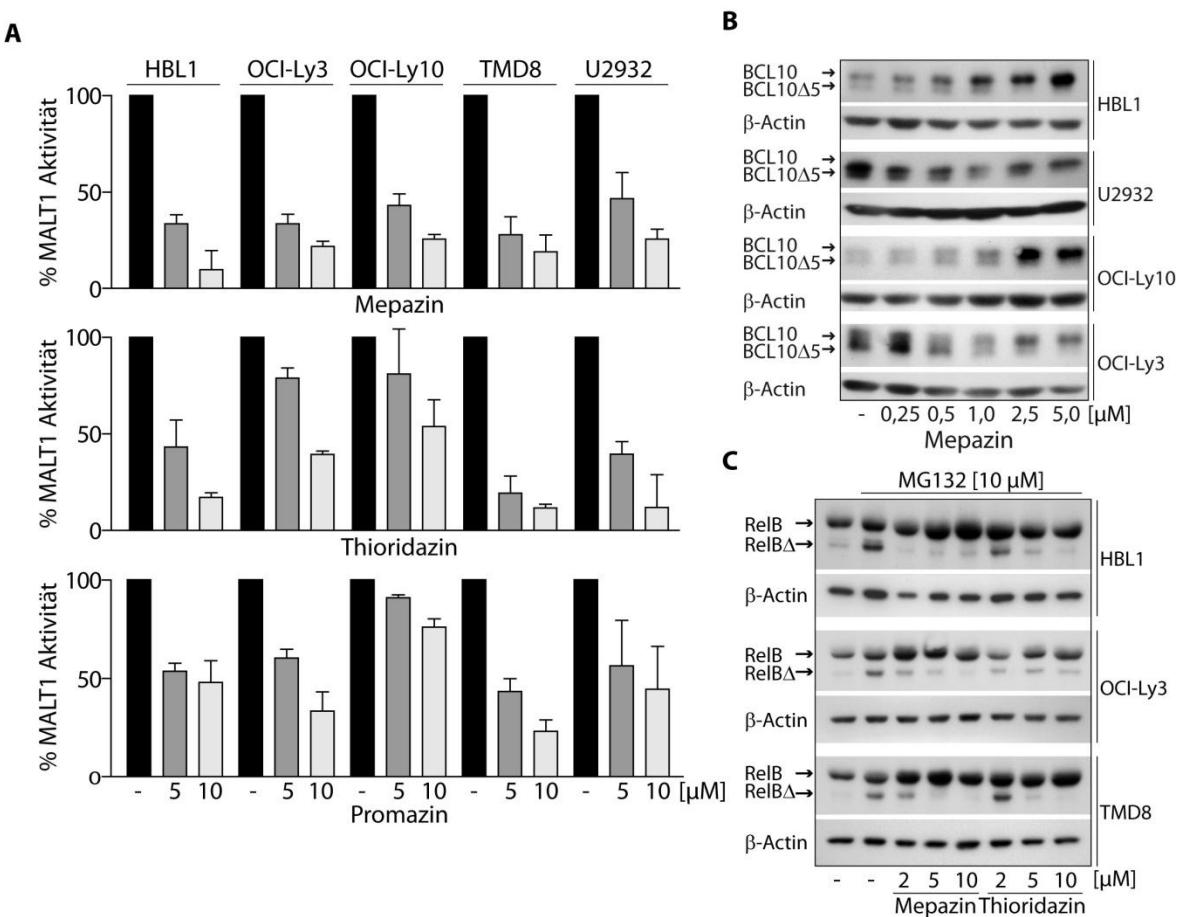


Abbildung 3.19: Die konstitutive MALT1 Aktivität von ABC-DLBCL Zellen wird durch Mepazin, Thioridazin und Promazin inhibiert. (A) MALT1-KoLP zur Bestimmung der konstitutiven Paracaspase Aktivität von ABC-DLBCL Zellen (5×10^6) nach Behandlung mit PD für 4 Std. MALT1 war nach PD Inkubation Dosis-abhängig inhibiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzfreisetzung der DMSO-behandelten Kontrolle auf 100 % gesetzt und die restlichen Messwerte darauf bezogen. Die Balken stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). **(B)** Die konstitutive BCL10 Spaltung durch MALT1 war nach 24-stündiger Inkubation mit Mepazin in verschiedenen ABC Zelllinien blockiert. **(C)** Analyse der zellulären RelB Spaltung in ABC-DLBCL. Western Blot Detektion der konstitutiven RelB Spaltung nach 4-stündiger Behandlung der Zellen mit Mepazin und Thioridazin und Zugabe von MG132 (1 Std). Die Spaltung des Proteins wurde bereits ab einer Konzentration von 2 μM Mepazin, bzw. 5 μM Thioridazin blockiert. Die WB Daten (in B und C) sind repräsentativ für je 3 unabhängige Experimente.

Das instabile RelB Spaltprodukt konnte in den ABC-DLBCL Zellen HBL1, OCI-ly3 und TMD8 in Übereinstimmung zu den Experimenten mit Jurkat T-Zellen erst nach Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 detektiert werden (Abb. 3.19 C). Nach 4-stündiger Mepazin und Thioridazin Behandlung wurde die RelB Spaltung bereits bei niedrigen Konzentrationen der Substanzen stark inhibiert. In Korrelation zu den Ergebnissen der rekombinannten und zellulären MALT1 Hemmung in Jurkat T-Zellen war Mepazin im Vergleich zu Thioridazin deutlich effektiver.

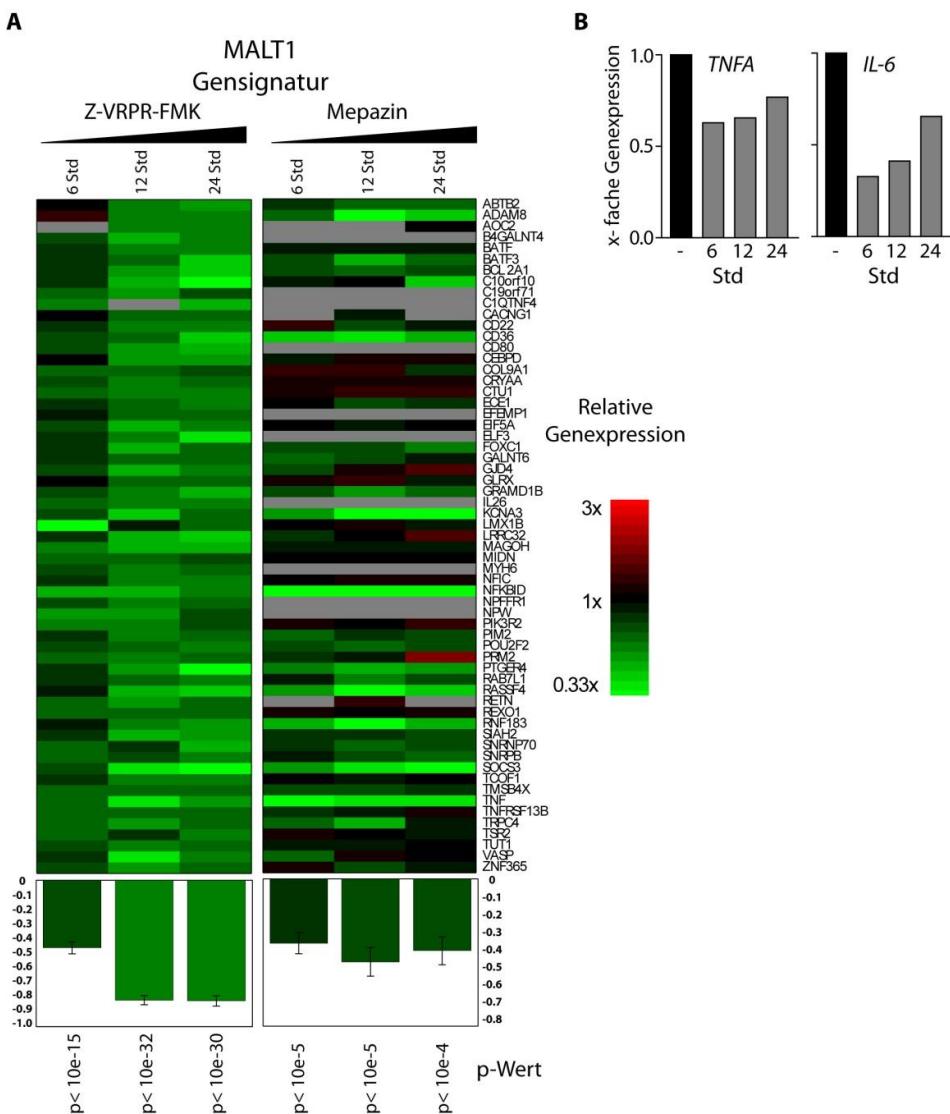


Abbildung 3.20: Mepazin inhibiert die MALT1 Zielgenexpression in der ABC-DLBCL Zelllinie HBL1. (A) Vergleich der Gensignatur (*Agilent Oligonukleotid Microarray*) von Mepazin (rechts) und Z-VRPR-FMK (links) behandelten HBL1 Zellen. Beide Signaturen weisen eine hohe Übereinstimmung negativ regulierter MALT1 Zielgene auf und deuten auf eine vergleichbar spezifische Wirkung von Mepazin. Die Analyse der Genexpression erfolgte nach RNA Extraktion zu den angegebenen Zeitpunkten und Markierung der Ziel- und Referenzproben mit Cy3 bzw Cy5. Die Änderung der Genexpression ist in einer Farbskala aus dem Verhältnis der Ziel- (rot) und Referenzproben (grün) dargestellt. Die Verringerung der NF-κB Genexpression wurde für jeden Zeitpunkt gemittelt, unten als Balkendiagramm dargestellt und die zugrundeliegende Signifikanz mit einem gepaarten *t*-Test verifiziert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). Die Analyse und die Darstellung der Daten erfolgte durch M. Grau, P. Lenz und G. Lenz. (B) Quantitative real-time RT-PCR Analyse zur Kontrolle der für den *Microarray* verwendeten RNA. Die Genexpression der NF-κB-regulierten Gene *TNFA* und *IL-6* war zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mepazin Behandlung verringert.

Um die MALT1-Spezifität von Mepazin in ABC-DLBCL zu bestätigen und zudem eine Einschätzung von unspezifischen (*off-target*) Effekten zu ermöglichen, wurde eine MALT1-regulierte Genexpressionssignatur Mepazin-behandelter HBL1 Zellen auf einem *Microarray* angelegt. Durch Vergleich der Ergebnisse mit einer Gensignatur des spezifischen MALT1 Peptidinhibitors Z-VRPR-FMK sollte anschließend eine Einschätzung der Spezifität

ermöglichen (Hailfinger et al. 2009) (Abb. 3.20 A). Die negative Regulation der ausgewählten Gene durch Mepazin und Z-VRPR-FMK war bereits nach 6 und auch nach 12 und 24 Stunden hoch-signifikant. Die Signaturen wiesen zudem eine hohe Übereinstimmung auf und lassen daher auf eine hochgradig MALT1-spezifische Wirkung von Mepazin schließen. Die im Vergleich mit Z-VRPR-FMK schwächeren Effekte von Mepazin 12 und 24 Stunden nach Behandlung der Zellen lagen vermutlich an dessen reversiblen und nicht-kovalenten Inhibition. Die Unterschiede zwischen beiden Signaturen resultierten vermutlich aus MALT1-unabhängigen Einflüssen von Mepazin oder Z-VRPR-FMK. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Auswirkung von Mepazin auf die NF-κB Zielgenexpression parallel durch eine quantitative real-time RT-PCR untersucht (Abb. 3.20 B). Eine Analyse der *TNFA* und *IL-6* Transkriptmenge bestätigte den negativen Einfluss von Mepazin und die Integrität der *Microarray* Daten: Die Genexpression von *TNFA* und *IL-6* war bereits 6 Stunden nach Mepazin-Behandlung der HBL1 Zellen um jeweils 40 und 70 % verringert. Die Resultate der DLBCL Analyse weisen, in Analogie zu den Ergebnissen aus den T-Zell Studien, auf eine hoch-effektive und spezifische Hemmung der konstitutiven MALT1 Aktivität durch Mepazin, Thioridazin und Promazin in verschiedenen ABC-DLBCL Zellen.

3.4.2 Hemmung der NF-κB Aktivität und Zielgenexpression durch PD in ABC-DLBCL Zelllinien

Die proteolytische MALT1 Aktivität ist ein bedeutender Faktor der NF-κB-vermittelten Genexpression und Überlebensfähigkeit von ABC-DLBCL Zellen (Ferch et al, 2009; Hailfinger et al, 2009a). Um die Konsequenzen der PD-vermittelten Hemmung von MALT1 auf die konstitutive NF-κB Aktivierung aufzuklären, wurde zunächst eine EMSA Studie durchgeführt. Eine Zugabe von 10 und 20 μM Mepazin zu ABC-DLBCL Zellen resultierte in einer Verringerung der NF-κB Aktivität: In allen untersuchten ABC Zelllinien war die Bindung von p50/p65 bzw. p50/c-Rel Heterodimeren an die Gensonde nach Inkubation mit dem Inhibitor verringert (Abb. 3.21 A). Aufgrund dieser Erkenntnisse drängte sich die Frage auf, inwiefern sich eine Mepazin-vermittelte Verringerung der NF-κB Aktivität auf die NF-κB Zielgenexpression auswirkte. Um dies zu überprüfen, wurde, wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben, eine NF-κB Gensignatur nach Mepazin Behandlung von HBL1 Zellen erstellt. Ein Vergleich mit einer NF-κB Gensignatur nach Behandlung der HBL1 Zellen mit dem spezifischen IKKβ Inhibitor MLN120B sollte anschließend eine Einschätzung der NF-κB-Spezifität von Mepazin ermöglichen. Als Kriterium für die Auswahl der Gene wurde eine MLN120B-induzierte Verringerung der NF-κB Zielgenexpression über alle drei Zeitpunkte von 50 % festgelegt (Kloo et al, 2011). Die Inkubation mit Mepazin führte in allen Ansätzen zu einer signifikanten Erniedrigung NF-κB-regulierter Zielgene (Abb. 3.21 B). Dies beweist,

dass die MALT1-vermittelte Hemmung durch Mepazin die konstitutive Aktivität des NF-κB Signalweges in ABC-DLBCL Zellen unterdrückt.

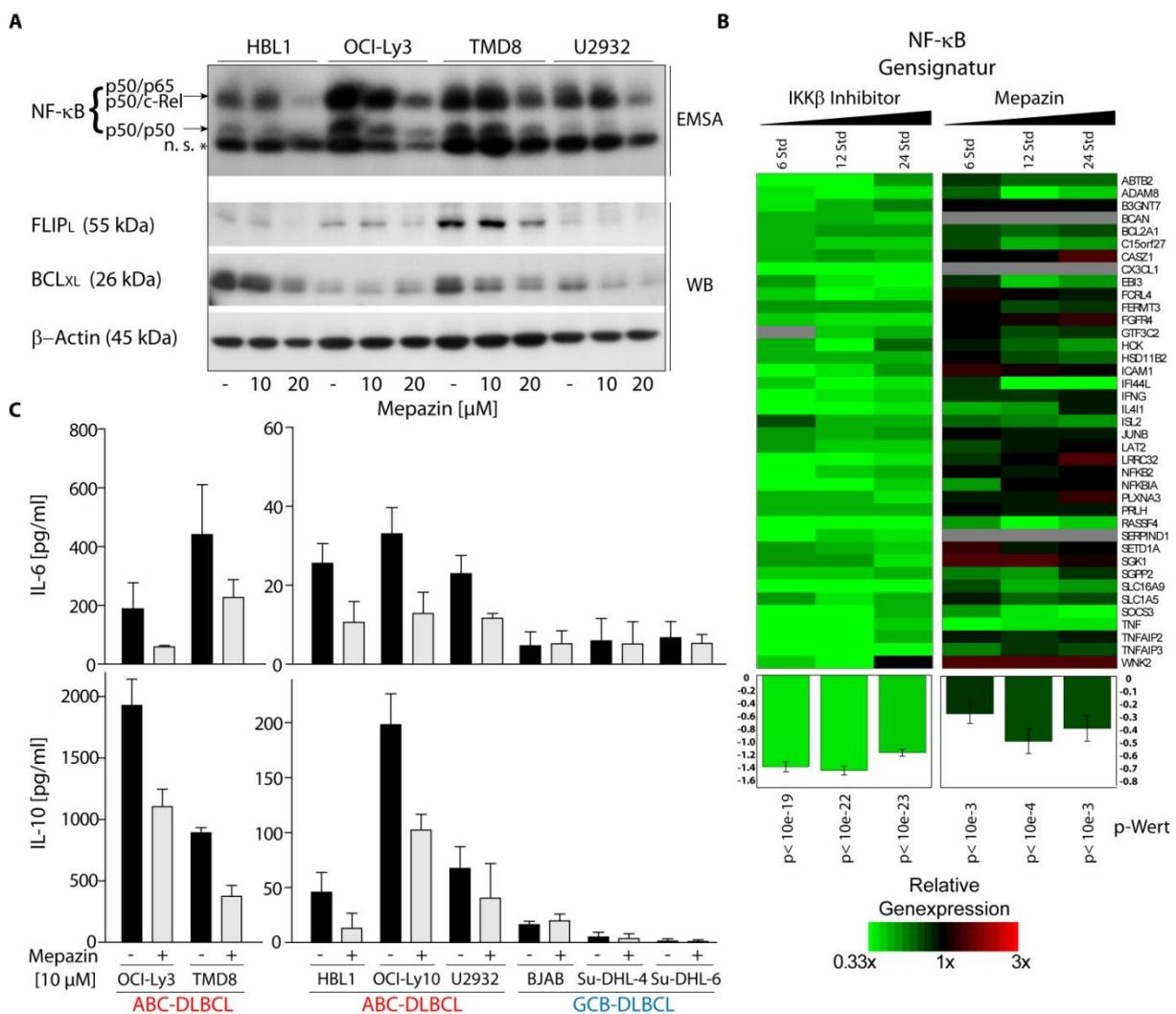


Abbildung 3.21: Verringerung der konstitutiven NF-κB Aktivität in ABC-DLBCL Zellen nach Mepazin Behandlung. (A) EMSA zur Bestimmung der NF-κB Aktivität nach Behandlung von HBL1 Zellen mit Mepazin (24 Std). Die Inkubation mit der Verbindung führte zu einer verminderten Bindung des Transkriptionsfaktors an eine spezifische DNA-Sonde. Als Konsequenz ist die Menge der NF-κB-regulierten c-FLIP_L und BCL_{XL} Proteine verringert. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. **(B)** NF-κB Gensignatur von HBL1 Zellen nach Behandlung mit Mepazin und dem IKKβ Inhibitor MLN120B zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Inkubation mit Mepazin führte zu einer signifikanten Verringerung der NF-κB Zielgenexpression. Das Profil der Mepazin-behandelten Zellen weist zudem eine hohe Übereinstimmung mit dem Profil der MLN120B-behandelten Zellen auf. Eine Beschreibung der Durchführung findet sich in Abbildung 3.20 A. **(C)** Inkubation von DLBCL Zellen mit Mepazin resultierte in einer verminderten Ausschüttung der NF-κB regulierten Zytokine IL-6 und IL-10. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

Um die Wirkung von Mepazin auf den MALT1-regulierten NF-κB Signalweg in anderen ABC-DLBCL Zelllinien zu verifizieren, wurde die Proteinproduktion von ausgewählten NF-κB Zielgenen, die eine essentielle Funktion in ABC-DLBCL Zellen besitzen, analysiert. Eine

Untersuchung der anti-apoptotisch wirkenden NF-κB Zielproteine c-FLIP_L und BCL_{XL} in einer Western Blot Analyse zeigte, dass die Menge beider Proteine nach Inkubation mit 10 und 20 μM in den untersuchten Zelllinien verringert war. Eine Ausnahme bildete die OCI-Ly3 Zelllinie, in welcher die Menge des BCL_{XL} Proteins nach Zugabe des Inhibitors unverändert blieb (Abb. 3.21 A). ABC-DLBCL Zellen sezernieren unterschiedliche Mengen an zellbiologisch wichtigen Zytokinen. IL-6 und IL-10 sind NF-κB-regulierte Zytokine, die durch autokrine Wirkung essentiell für die Aufrechterhaltung des konstitutiven NF-κB Signalweges und somit die Funktionsweise und das Überleben von bestimmten ABC-DLBCL Zelllinien sind (Lam et al. 2008). Die Bestimmung der IL-6 und IL-10 Sekretion von DLBCL Zelllinien erfolgte nach 20-stündiger Inkubation mit 10 μM Mepazin oder DMSO. Die fünf untersuchten ABC Zelllinien sezernierten variierende Mengen an Interleukinen, die nach Inkubation mit Mepazin um etwa 50 % verringert waren. Dagegen produzierten die getesteten GCB Kontrollzelllinien BJAB, Su-DHL-4 und Su-DHL-6 keine oder nur geringe Mengen beider Interleukine (Abb. 3.21 C).

3.4.3 Mepazin, Thioridazin und Promazin sind selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zellen

Angesichts der kritischen Abhängigkeit der ABC-DLBCL Zellen vom anti-apoptotischen NF-κB Signalweg stellte sich die Frage, ob sich die Inkubation mit PD in einer Induktion toxischer Effekte, einer Erhöhung der Apoptoserate und folglich einer Verminderung der Zellzahlen auswirkt. Um dies zu untersuchen, wurde die Zellvitalität von Mepazin-, Thioridazin- oder Promazin-behandelten ABC- und parallel, zur Kontrolle der selektiven Wirkung, GCB-DLBCL Zelllinien untersucht. Die verwendeten GCB-DLBCL Zelllinien besitzen keine konstitutive NF-κB Aktivität und sind MALT1-unabhängig. Dies wurde durch eine Analyse der DLBCL Überlebensfähigkeit als Reaktion auf eine Zugabe des Z-VRPR-FMK Inhibitors bestätigt. In dieser Studie besaß der MALT1 Inhibitor eine selektive Wirkung auf ABC-DLBCL Zellen (Ferch et al., 2009). Die Analyse der Zellvitalität wurde 2 Tage nach einmaliger Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen der Verbindungen per MTT-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Thioridazin besaß eine unspezifisch-toxische Wirkung auf alle untersuchten Zelllinien. Um eine Bestimmung der MALT1-selektiven Wirkung zu gewährleisten, erfolgte die Analyse daher, im Gegensatz zu Mepazin und Promazin, unter Verwendung von 5 und 10 μM. Die Zellvitalität der untersuchten ABC-DLBCL Zelllinien HBL1, OCI-Ly3, TMD8 und U2932 war nach Inkubation mit allen Verbindungen Dosis-abhängig vermindert. Die behandelten GCB-DLBCL Zelllinien BJAB, Su-DHL-4 und Su-DHL-6 wurden dagegen nicht beeinträchtigt (Abb. 3.22).

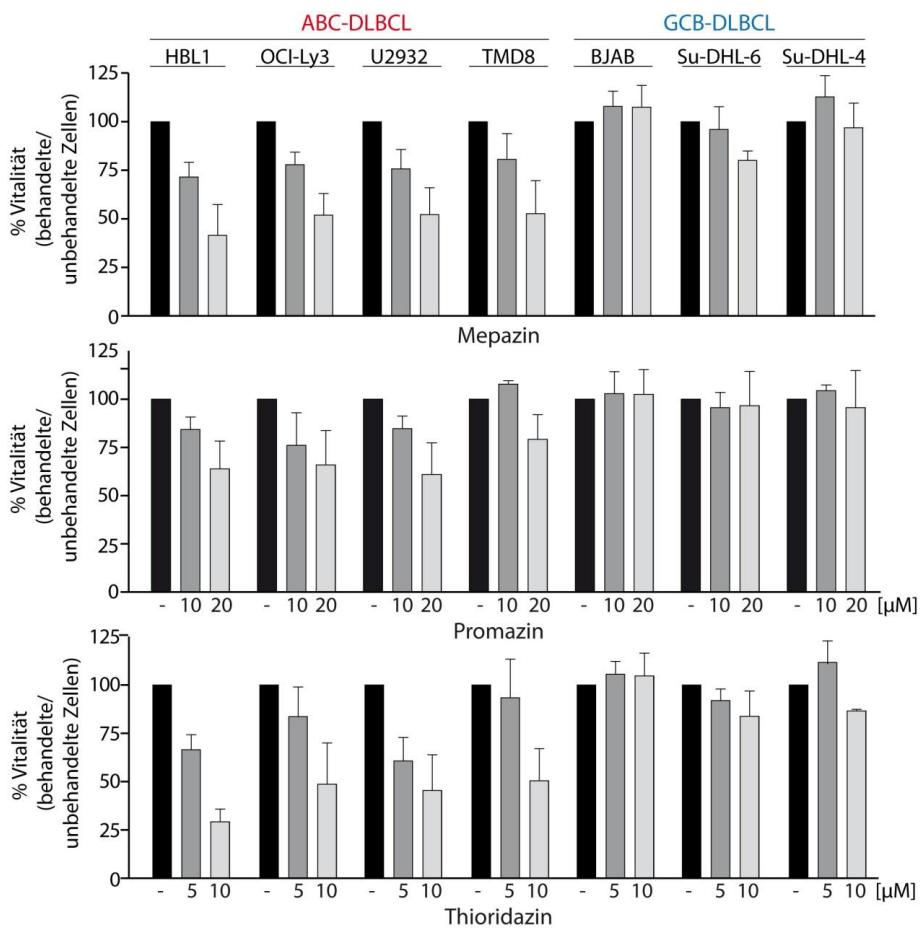


Abbildung 3.22: Mepazin, Thioridazin und Promazin sind selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zellen. MTT Zytotoxizitätstest nach Behandlung von DLBCL Zelllinien ($2,5 \times 10^6$) mit 10 und 20 μM Mepazin oder Promazin, oder 5 und 10 μM Thioridazin für 2 Tage. Die Analyse der MTT Reduktion erfolgte bei 470 nM in einem μQuant Plattenlesegerät (Biotek). Alle drei PD wirkten entsprechend ihres *in vitro* IC₅₀ selektiv toxisch auf ABC-DLBCL. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

Zusätzlich wurden die DLBCL Zellzahlen 4 Tage nach einmaliger Behandlung der Zellen ermittelt. In Übereinstimmung mit dem MTT-Test wirkte sich die Zugabe der Inhibitoren in einer selektiven Verringerung der ABC-DLBCL Zellzahlen aus (Abb. 3.23 A). Analog zu den *in vitro* IC₅₀ Daten war die Wirkung von Promazin auf ABC-DLBCL Zellen in beiden Analyseverfahren am schwächsten, was die Relevanz der Daten unterstreicht.

Um zu zeigen, dass die verminderte ABC-DLBCL Zellvitalität nach PD-Behandlung nicht auf unspezifischen Effekten der Substanzen basiert, wurde die Wirkung der PD auf HBL1 Zellen, die eine konstitutiv-aktive IKK β Mutante exprimieren, untersucht. Die calKK β SS177/181EE Mutante induziert eine starke Aktivierung des NF- κ B Signalweges (Darwech et al, 2010), die MALT1-nachgeschaltet wirkt und somit den HBL1 Zellen eine Möglichkeit bieten sollte, die durch MALT1-Inhibition verursachte Unterdrückung des Signalweges auszugleichen. Zur Durchführung wurden HBL1 Zellen mit lentiviralen Vektoren infiziert. Diese exprimierten die konstitutiv aktive calKK β -GFP Mutante oder GFP alleine (mock). Infizierte (GFP-positive)

Zellen wurden anschließend per FACS isoliert und einmalig mit Mepazin oder Thioridazin versetzt. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte täglich für insgesamt 4 Tage unter Trypanblau-Ausschluss (Abb. 3.23 B).

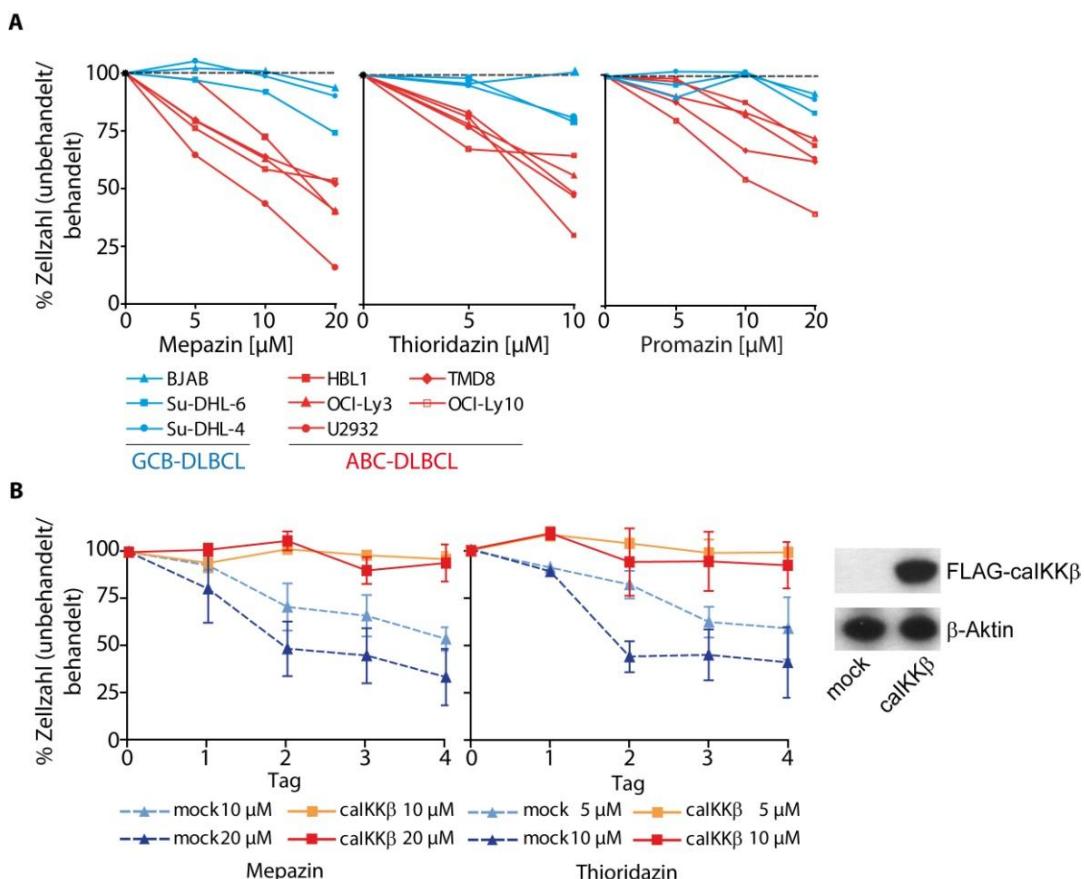


Abbildung 3.23: Mepazin, Thioridazin und Promazin sind selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zellen. (A) Zellzahlbestimmung durch Trypan-Blau Ausschluss nach Behandlung von DLBCL Zelllinien ($2,5 \times 10^6$) mit 10 und 20 µM Mepazin oder Promazin, oder 5 und 10 µM Thioridazin für 4 Tage. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des MTT-Tests wirkten alle drei PD selektiv-toxisch auf ABC-DLBCL Zellen. (B) Zellzahlbestimmung (wie in A) nach lentiviraler Infektion von HBL1 Zellen zur Produktion von konstitutiv aktivem FLAG-IKK β (calKK β) oder GFP (mock). Die dominante Wirkung des IKK β Proteins führte zu einer Erhöhung der MALT1-nachgeschalteten IKK-NF- κ B Aktivität und ermöglicht es den HBL1 Zellen resistent gegenüber PD zu werden.

Wie erwartet waren die Zellzahlen der mock-infizierten Zellen nach Zugabe von Mepazin und Thioridazin deutlich verringert (Abb. 3.23 A). Nach Expression der calKK β Mutante waren die Zellen resistent gegen die Wirkung von Mepazin oder Thioridazin. Dies zeigt, dass eine MALT1-nachgeschaltete Aktivierung des NF- κ B Signalweges der toxischen Wirkung der PD entgegenwirken kann.

Hinweise auf eine MALT1-zielgerichtete Aktivität distinkter PD wurde durch eine Inhibitorstudie mit dem PD Promethazin erhalten. Promethazin besaß trotz struktureller Ähnlichkeit zu Promazin nur eine sehr schwache Wirkung auf MALT1 (Abb. 3.24 A). Die

Zellvitalität der ABC-DLBCL Zellen wurde nach Zugabe von 10 und 20 μM der Substanz entsprechend nicht beeinflusst (Abb. 3.24 B).

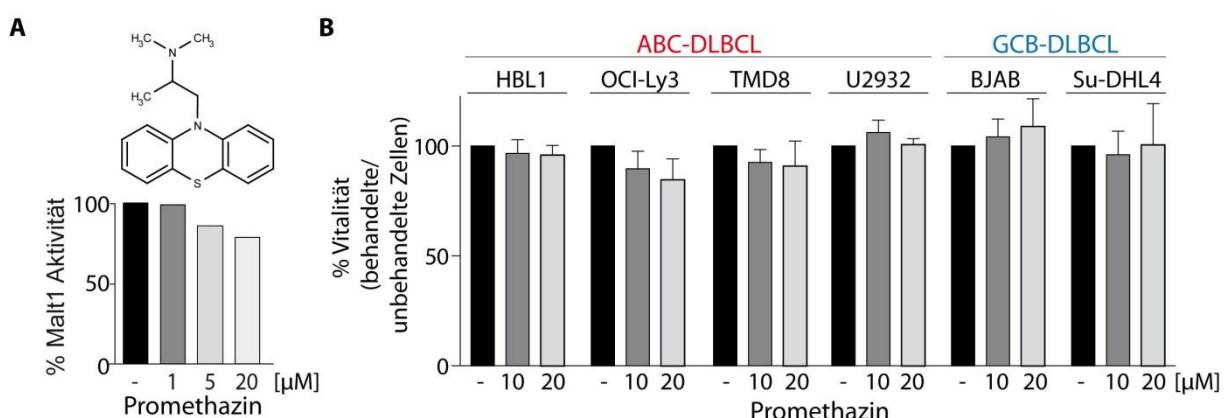


Abbildung 3.24: Die Promazin-verwandte Verbindung Promethazin hat keinen negativen Einfluss auf MALT1 und die Vitalität von ABC-DLBCL Zellen. (A) MALT1 Aktivitätsmessung und Struktur von Promethazin. Die Inkubation von MALT1 mit der strukturell zu Promazin homologen Substanz führte zu einer schwachen Hemmung des Proteins. (B) Die Behandlung von DLBCL Zelllinien mit Promethazin hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

Daraus lässt sich ableiten, dass die durch Mepazin, Thioridazin und Promazin-vermittelten Effekte in den ABC-DLBCL nicht auf einer unspezifischen Wirkung der Phenothiazin Grundstruktur beruhen, sondern vielmehr einer spezifischen Wirkung auf MALT1.

Das Ziel vieler Krebstherapeutika ist das Auslöschen der Tumorzellen durch toxische Effekte, die auf einer verstärkten Induktion des apoptotischen Signalweges beruhen. Um die Ursache der toxischen Effekte in den ABC-DLBCL Zelllinien zu untersuchen, wurde die Apoptoserate von Inhibitor-behandelten DLBCL Zellen ermittelt.

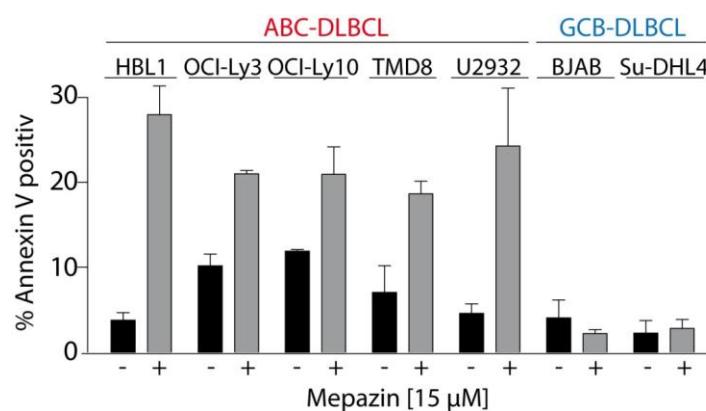


Abbildung 3.25: Mepazin Inkubation löst eine Erhöhung der Apoptoserate in ABC-DLBCL Zellen aus. FACS Analyse der Apoptoserate Mepazin-behandelter ($15 \mu\text{M}$) DLBCL Zelllinien. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde aus PE Annexin-V positiven und 7-AAD negativen Zellen ermittelt. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

Hierzu wurde der Anteil der apoptotischen Zellen 5 Tage nach Mepazin (15 µM) oder DMSO (Referenz) Inkubation in einer FACS Analyse ermittelt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen war nach Inkubation mit Mepazin in allen ABC-DLBCL Zellen erhöht, wobei der Anteil behandelter HBL1-Zellen mit einem Anstieg von etwa 25 % am höchsten war (Abb. 3.25). Die Apoptoserate der getesteten GCB-DLBCL Zelllinien war dagegen nach Inkubation mit Mepazin unverändert. Die Resultate der DLBCL-Studie zeigen, dass PD hocheffiziente MALT1 Inhibitoren sind, die durch Unterdrückung der konstitutiven NF-κB Aktivität eine selektive Toxizität in ABC-DLBCL Zellen induzieren. Angesichts des guten zellulären Potentials der Wirkstoffe wäre daher eine Anwendung von Mepazin oder strukturell-verwandten Substanzen in der ABC-DLBCL Therapie denkbar.

3.4.4 Mepazin und Thioridazin verringern das Wachstum von ABC-DLBCL *in vivo*

Eine klinische Anwendung von Wirkstoffen hängt von einer Vielzahl von pharmakologischen Eigenschaften der Substanzen ab und setzt die Analyse in einem prä-klinischen *in vivo* Modell voraus. Um die Wirkung von Mepazin und Thioridazin *in vivo* zu bestimmen, wurde ein xenogenes DLBCL Transplantationsmodell in NOD/scid IL-2R γ ^{null} (NSG) Mäusen etabliert. In diesem kann das Wachstum der MALT1-abhängigen ABC-DLBCL Zelllinie OCI-Ly10, und als Referenz der MALT1-unabhängigen GCB-DLBCL Zelllinie Su-DHL-6 unter Wirkstoffbehandlung der Mäuse beobachtet werden.

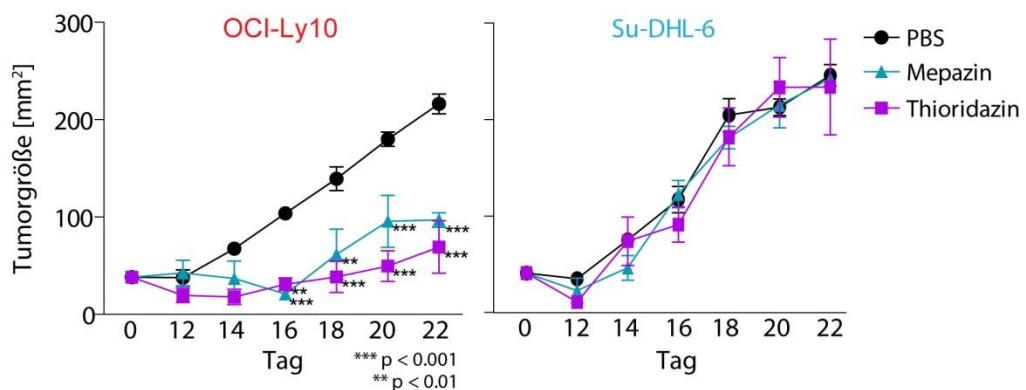


Abbildung 3.26: Mepazin und Thioridazin führen zum selektiven Absterben von ABC-DLBCL Zellen *in vivo*. Die Transplantation der ABC Zelllinien OCI-Ly10 und die GCB Zelllinie Su-DHL-6 zusammen mit Matrigel in die gegenüberliegenden Flanken individueller NOD/scid IL-2R γ ^{null} (NSG) Mäuse erfolgte am Tag 0. Die Injektion mit PBS (Kontrollgruppe), Mepazin (16 mg/kg; q.d; i.p.) oder Thioridazin (12 mg/kg; q.d; i.p.) erfolgte erstmalig nach 24 Stunden. Die Tumorgröße wurde täglich mit einer Schublehre ermittelt. Beide Wirkstoffe führten zur selektiv-eingeschränkten Expansion des OCI-Ly10 Tumors. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten ANOVA Test und beweist die hochsignifikante Relevanz der Daten mit P-Werten von < 0.001 bis < 0.01 von Tag 16 bis 22 (Durchgeführt von Stefani Spranger, AG Schendel, Institut für molekulare Immunologie, HMGU).

Hierzu erfolgte zu Beginn der Studie die subkutane Injektion beider Zelllinien in je eine gegenüberliegende Flanke einer Maus. In den Voruntersuchungen erwies sich bereits, dass

für die erfolgreiche Aufnahme der Lymphomzellen in das Gewebe und ihr effizientes Wachstum die Injektion zusammen mit Matrikel (BD) notwendig war. Die intraperitoneale (i.p.) Gabe von 16 mg/kg Mepazin oder 12 mg/kg Thioridazin sowie 0,5 x PBS in jeweils 3 Tiere erfolgte täglich und erstmalig 24 Stunden nach Injektion der Zellen. In den Tieren der PBS-behandelten Referenzgruppe wuchsen beide Lymphomzelllinien innerhalb von drei Wochen zu einem soliden Tumor heran (Abb. 3.26). Während die Behandlung mit Mepazin oder Thioridazin zu einer hochsignifikanten Verminderung der OCI-Ly10 Tumorexpansion führte, hatten die Wirkstoffe keinen Einfluss auf das Wachstum der Su-DHL-6 Tumore in den gleichen Tieren (Durchgeführt von Stefani Spranger, AG Schendel, Institut für molekulare Immunologie, HMGU).

Die weiterführende Analyse der Tumore sollte die spezifische und therapeutisch-realisierte Wirkung der Substanzen beweisen. Zunächst erfolgte eine pharmakokinetische Bestimmung der Thioridazin Konzentration aus dem Blutserum von NSG Mäusen. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass die beobachteten Effekte auf einer therapeutisch realisierbaren Wirkstoffkonzentration beruhen, wie sie auch bei einer Anwendung des Wirkstoffs im Patienten messbar ist. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.p. Gabe von 12 mg/kg Thioridazin in je 3 NSG Mäusen (Abb. 3.27 A).

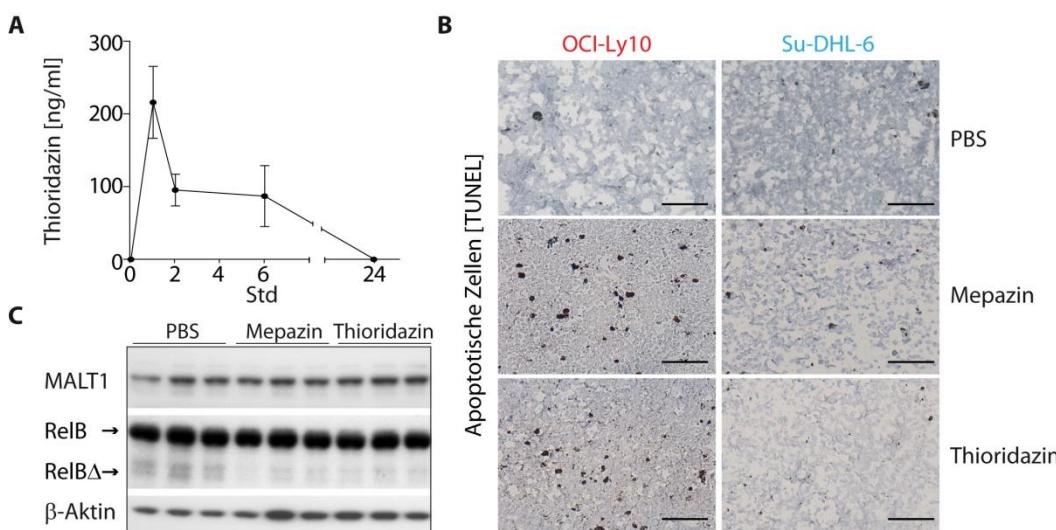


Abbildung 3.27: Mepazin und Thioridazin wirken direkt auf DLBCL Tumore. (A) Pharmakokinetische Bestimmung der Thioridazin Konzentration in murinem Serum (NSG) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.p. Gabe von Thioridazin (12 mg/kg). Die Analyse erfolgte per HPLC (MVZ, Dortmund). (B) Apoptotische Zellen wurden nach 22 Tagen per TUNEL Färbung auf DLBCL Tumorgewebsschnitten (5 µm) markiert. Die Rate apoptotischer Zellen ist nur nach PD-Behandlung in OCI-ly10 Zellen erhöht. Die Aufnahmen zeigen die Färbung repräsentativer Tumorsektionen. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Hämatoxilin und die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop angefertigt (20 x, Skalierung ~ 100 µm). (C) Western Blot Detektion von RelB nach SDS-PAGE der Tumorlysate.

Die höchste Thioridazin Konzentration war bereits nach einer Stunde messbar und lag zwischen 170 und 270 ng/ml. Der ermittelte Maximalwert der Konzentration lag damit

deutlich unter dem effizienten therapeutischen Bereich im Menschen, der sich zwischen 200 und 2000 ng/ml Thioridazin im Blutserum bewegt (Baumann et al, 2004). Bereits 2 Stunden nach Wirkstoffgabe wurde eine Erniedrigung der Konzentration gemessen, was den raschen Abbau des Hemmstoffes durch den Stoffwechsel der Mäuse andeutet. Als Konsequenz war die Thioridazin Konzentration nach 24 Stunden unter dem Detektionslimit von 20 ng/ml.

Um abzusichern, dass die Effekte auf die OCI-Ly10 Tumore aus der direkten Wirkung der Substanzen resultierten, wurde die Apoptoserate des Tumorgewebes sowie die konstitutive Spaltung des RelB Proteins in Tumorlysaten untersucht. Die transplantierten Tumore wurden am Ende der Behandlungszeit entfernt und apoptotische Zellen per TUNEL Färbung auf Tumorgewebeschnitten visualisiert (Abb. 3.27 B). Übereinstimmend mit den selektiv-toxischen Effekten der PD in der ABC-DLBCL Zellstudie resultierte die Behandlung der Mäuse mit beiden Wirkstoffen in einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen im OCI-ly10 Tumor. Dagegen wurden auf den Gewebeschnitten des GCB-DLBCL Su-DHL-6 Tumors keine apoptotischen Zellen detektiert. Dies deutet die direkte Aufnahme der Substanzen in die Tumore an und beweist eine selektiv-toxische Wirkung auf die injizierte OCI-Ly10 Zelllinie.

Um die Aufnahme der Wirkstoffe zu verifizieren sowie parallel eine der molekularen Ursachen der selektiv-toxischen Wirkung zu untersuchen, wurde die konstitutive RelB Spaltung in Lysaten der OCI-Ly10 Tumore per WB untersucht (Abb. 3.27 C). Es zeigte sich, dass eine Behandlung der Mäuse mit Mepazin oder Thioridazin die konstitutive RelB Spaltung in den OCI-Ly10 Tumoren inhibierte.

Die Resultate des xenogenen Tumormodells zeigen, dass Mepazin und Thioridazin auch in einem prä-klinischen *in vivo* Modell eine selektiv-toxische Wirkung auf ABC-DLBCL Zellen besitzen. Die Ergebnisse lassen auf eine effiziente Wirkung der Wirkstoffe bei der therapeutischen Anwendung in ABC-DLBCL hoffen.

4 Diskussion

Das ABC-DLBCL Lymphom gehört zu den aggressiven Lymphom-Entitäten und ist daher mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden. Das Protein MALT1 besitzt eine proteolytische Aktivität, die neben der Adapterfunktion des Proteins die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nach Antigen-vermittelter T- und B-Lymphozytenaktivierung reguliert (Coornaert et al, 2008; Rebeaud et al, 2008). In einer shRNA Studie konnte gezeigt werden, dass MALT1 und andere Bestandteile des CBM-Komplexes wichtig für die Funktion und das Überleben von ABC-DLBCL Zelllinien sind. Durch aktuelle Studien wurde eine kritische Rolle der proteolytischen MALT1 Funktion bei der NF- κ B-gesteuerten Lymphomagenese und dem Überleben der ABC-DLBCL nachgewiesen (Ferch et al, 2009; Hailfinger et al, 2009a; Hailfinger et al, 2011). Diese Entdeckung weckte die Hoffnung einer MALT1-zielgerichteten Behandlung der ABC-DLBCL Lymphome im Rahmen einer Therapie.

In dieser Arbeit wurden Phenothiazin Derivate (PD) identifiziert, die effektiv und selektiv die proteolytische Aktivität von rekombinantem und zellulärem MALT1 inhibieren. Von hoher Bedeutung für die Relevanz der Phenothiazin Grundstruktur als Leitstruktur war, dass nur ein geringer Anteil der PD eine effiziente Inhibition von MALT1 bewirkten. Die besten Substanzen Mepazin, Thioridazin und Promazin sind bekannte Medikamente, die bereits in der Klinik als Antipsychotika oder Sedativa eingesetzt wurden. Alle drei bewirkten eine Inhibition der induzierbaren MALT1 Aktivität aktiver Jurkat T-Zellen und der konstitutiven Aktivität in ABC-DLBCL Zellen. Zusätzlich führte die Inkubation mit Mepazin und Thioridazin zu einer verminderten T-Zell Aktivierung sowie zu einer selektiven Verringerung der ABC-DLBCL Überlebensfähigkeit, zwei Prozesse, die von einer funktionellen MALT1 Aktivität abhängen (Duwel et al, 2009; Hailfinger et al, 2009a). Beide Verbindungen führten zudem zu einer Inhibition der MALT1 Aktivität und zur selektiven Apoptose-Induktion und, als Konsequenz, einer Reduktion des ABC-DLBCL Zellwachstums in einem präklinischen Xenotransplantationsmodell. Die zellulären und *in vivo* Daten weisen auf ein hoch-effizientes Potential der PD als pharmakologische MALT1 Inhibitoren hin und lassen auf eine potentielle Anwendung der Verbindungen für die klinische Behandlung bei der ABC-DLBCL Therapie hoffen.

4.1 Die MALT1 Paracaspase als Ziel der Lymphomtherapie

Die proteolytische MALT1 Funktion beeinflusst drei Aspekte des NF- κ B Signalweges: (I) Sie reguliert die optimale NF- κ B Aktivierung (Duwel et al, 2009; Rebeaud et al, 2008), (II) sie initiiert den alternativen NF- κ B Signalweg in B-Zellen und MALT Lymphomen, die das cIAP2-MALT1 Fusionsprotein exprimieren (Rosebeck et al, 2011), und (III) sie steuert die selektive

c-Rel Aktivität in B-Zellen, ABC-DLBCL und dendritischen Zellen (Ferch et al, 2007; Gringhuis et al, 2011; Hailfinger et al, 2011). Daneben besitzt MALT1 viele Eigenschaften eines guten therapeutischen Ziels. MALT1-defiziente Mäuse sind fruchtbar und lebensfähig, was darauf schließen lässt, dass eine Therapie im Menschen verträglich wäre (Ruefli-Brasse et al, 2003; Ruland et al, 2003). Zudem resultiert die Inhibition der proteolytischen Funktion nur in einer partiellen Reduktion der Lymphozytenaktivierung. Eine Inhibition der Protease im Menschen würde daher vermutlich nur zu einer abgeschwächten Lymphozytenfunktion führen und der Grad der Immunsuppression im Rahmen einer Lymphomtherapie wäre akzeptabel (Coornaert et al, 2008; Duwel et al, 2009).

Ein Schlüsselement bei der Entwicklung von zielgerichteten antikanzerogenen Medikamenten ist die Identifikation von Tumor-spezifischen katalytischen oder enzymatischen Aktivitäten. Die proteolytische MALT1 Funktion spielt eine kritische Rolle bei der Lymphomagenese und der Überlebensfähigkeit von B-Zell Lymphomen wie ABC-DLBCL und distinkten MALT Lymphomen (Ferch et al, 2009; Rosebeck et al, 2011). MALT1 ist die einzige bekannte Paracaspase im Menschen und besitzt verglichen mit seinen strukturell nächsten Verwandten, den Caspisen, unterschiedliche funktionelle und mechanistische Eigenschaften. Caspisen besitzen eine ganze Reihe von wichtigen Funktionen innerhalb der Zelle, sind aber vorrangig von Bedeutung für die Zellapoptose. Als positiver Regulator der NF-κB Aktivität besitzt MALT1 dagegen eine anti-apoptotische Wirkung. Mechanistisch gehören Paracaspasen und Caspisen zu den Cysteinproteasen. Während Caspisen allerdings Aspartat-spezifisch spalten, benötigt MALT1 ein Arginin in der P1 Position seines Substrates. Effektorcaspasen wie die Caspase 3 liegen im Gegensatz zu MALT1 zudem als Procaspsen vor und müssen zur Aktivierung proteolytisch gespalten werden (Hachmann et al, 2012; Riedl & Salvesen, 2007; Wiesmann et al, 2012). Die Einzigartigkeit von MALT1 im Menschen deutet an, dass hoch-spezifische MALT1 Inhibitoren grundsätzlich vielversprechende Wirkstoffkandidaten zur selektiven Inhibition der onkogenen Paracaspase Aktivität mit sehr geringen Nebenwirkungen darstellen sollten. Die selektive Inhibition von MALT1 im Menschen ist ein sehr kritischer Punkt. Eine Inhibition von Caspisen würde eine Blockade der Apoptose auslösen, was nachteilig für eine therapeutische Behandlung wäre. Caspase 8 beeinflusst zudem MALT1-abhängig die Lymphozytenaktivierung (Kawadler et al, 2008). Eine pharmazeutische Hemmung der Caspase 8 würde daher auch eine unspezifische Beeinträchtigung der adaptiven Immunantwort bewirken. MALT1 zeigte in der durchgeführten Studie weder eine proteolytische Aktivität mit dem Caspase Substrat DEVD-AMC, noch wurde es vom Caspase-spezifischen Inhibitor Ac-DEVD-CHO inhibiert. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis auf eine unterschiedliche Substratbindung sowie mechanistische Funktion der beiden Cysteinprotease-Untergruppen und lässt auf eine spezifische Wirkung von MALT1 Inhibitoren im Menschen hoffen.

Von einer auf MALT1 abgezielten Therapie könnten vorrangig Patienten mit MALT1-abhängigen B-Zell Lymphomen wie ABC-DLBCL oder bestimmten MALT Lymphomen profitieren. Trotz einer in den letzten Jahren verbesserten Behandlung des aggressiven ABC-DLBCL liegt die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit immer noch bei knapp 40 %, was die kritische Notwendigkeit neuer Therapiemöglichkeiten verdeutlicht (Lenz et al, 2008b). Aktuell finden daher zahlreiche Studien statt, in denen Inhibitoren des BCR-NF-κB Signalweges auf ihre Anwendbarkeit als pharmazeutische Wirkstoffe in ABC-DLBCL getestet werden (Naylor et al, 2011; Yang et al, 2012). Eine Reihe der untersuchten Wirkstoffe inhibieren BCR-proximale Faktoren wie z.B. die Kinasen BTK oder PKCβ. Ein großer Vorteil der MALT1 Inhibition gegenüber BCR-proximal zielgerichtete Inhibitoren läge in der Behandlung von ABC-DLBCL Tumoren, die eine onkogene *gain-of-function* Mutation tragen die den NF-κB Signalweg unabhängig von den vorgesetzten Signalen des BCR antreibt (bspw. CARD11) (Abbildung 4.1).

Neben einer Lymphomtherapie wäre auch eine Anwendung der MALT1 Inhibitoren als Immunsuppressiva zur Abschwächung der adaptiven Immunantwort denkbar. In diesem Zusammenhang würde sich die Behandlung einer breiten Palette von Autoimmunerkrankungen, Entzündungsprozessen oder chronischen Störungen des Immunsystems wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma oder auch Multiple Sklerose anbieten.

4.2 Mechanistische und funktionelle Homologien zwischen MALT1 und pflanzlichen Metacaspasen

MALT1 gehört zusammen mit den Caspasen und den Metacaspasen in die gleiche Gruppe verwandter Cysteinproteasen (Clan CD). Die Differenzen und Gemeinsamkeiten zwischen diesen Untergruppen sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. Metacaspasen kommen in Pflanzen, Pilzen und Protisten vor und spalten ihre Substrate ähnlich wie MALT1 Arginin-spezifisch, wobei einige Vertreter auch Lysin in der P1 Position akzeptieren (Uren et al, 2000; Vercammen et al, 2004). Es wird angenommen, dass Metacaspasen die evolutionär ältesten Vertreter dieses Protease-Clans sind. Ihre Funktion in Pflanzen ist allerdings sehr umstritten. Während der Großteil der Metacaspasen eine zielgerichtete Funktion beim programmierten Zelltod besitzen, stößt die Annahme einer strikt-apoptotischen Funktion der Metacaspasen auch auf starken Widerspruch, da für einzelne pflanzliche Metacaspasen ausschließlich Zelltod-unabhängige Funktionen bei der Zellproliferation und bei Stressprozessen entdeckt wurden (Coll et al, 2010; Lam & Zhang, 2012; Shrestha & Megeney, 2012; Tsatsiani et al, 2011). Ein Vergleich des in dieser Arbeit generierten MALT1 Proteaseprofils mit publizierten Daten zu den verwandten *Arabidopsis thaliana*

Metacaspasen AtMC4 und 9 (Vercammen et al, 2004) weist überraschend hohe Übereinstimmungen auf (Tabelle 4.1). Ebenso wie die Metacaspasen wird MALT1 von Chymostatin und Antipain inhibiert, dagegen nicht durch die Anwesenheit von Pepstatin, Aprotinin, E-64 oder eines Caspasen DEVD-Peptidinhibitors beeinflusst. Die Resistenz beider Cysteinproteasegruppen gegen den Caspaseinhibitor ist ein weiterer Hinweis auf die mechanistische Abgrenzung der Metacaspasen und der Paracaspase von Caspisen.

	Malt1	Atmc4 *	Atmc9 *	
Pepstatin [100 µM]	83 %	66 %	69 %	Aspartylproteasen
Aprotinin [5 µg/ml]	100 %	114 %	113 %	
TLCK [1 µM]	97 %	79 %	0 %	Serinproteasen
Chymostatin [100 µM]	10 %	14 %	10 %	Cysteinproteasen
Leupeptin [1 µM]	91 %	12 %	5 %	
Antipain [1 µM]	30 %	6 %	1 %	
E-64 [100 µM]	105 %	44 %	93 %	
Ac-DEVD-CHO [100 µM]	75 %	n.d.	n.d.	Caspasen
t-DEVD-cmk [100 µM]	n.d.	94 %	94 %	
pH Optimum	10	7.5	5.5	

* Vercammen et al., 2004

Tabelle 4.1: Das proteolytische Profil der Paracaspase hat hohe Ähnlichkeit mit dem Profil von Metacaspasen. Ein Vergleich der proteolytischen MALT1 Charakterisierung mit den in Vercammen et al. 2004 publizierten Daten zu den *A. thaliana* Metacaspasen AtMC4 und AtMC9 deutet auf eine hohe Zahl von Übereinstimmungen hin und weist auf eine mechanistische Verwandtschaft zwischen MALT1 und pflanzlichen Metacaspasen. Die Prozentangaben entsprechen der Restaktivität der Proteasen.

Drastische Aktivitätsunterschiede zwischen MALT1 und den Metacaspasen resultierten nur nach Inkubation mit TLCK (Nα-Tosyl-Lys-chloromethylketone) und Leupeptin. TLCK ist ein Inhibitor für Chymotrypsin-ähnliche Proteasen, der keinen Einfluss auf die MALT1 Aktivität besaß. Die publizierten Daten zeigen, dass TLCK selektiv AtMC9 inhibiert ohne die Aktivität von AtMC4 zu beeinflussen, was andeutet dass MALT1 und AtMC4 möglicherweise in diesem Zusammenhang eine gemeinsame Substratpräferenz besitzen. Im Gegensatz zu den Metacaspasen wird MALT1 zudem nicht durch den Cysteinprotease Inhibitor Leupeptin inhibiert. Beim pH-Optimum der enzymatischen Aktivität bestehen deutliche Unterschiede zwischen MALT1 und den Metacaspasen. Während die höchste Aktivität der AtMC9

Metacaspase eher im sauren, die der AtMC4 Metacaspase im neutralen pH-Bereich liegt, zeigte MALT1 sein höchstes Potential erst bei einem alkalischen pH von 10.

Insgesamt lassen die Daten auf eine vergleichbare Substratpräferenz sowie proteolytischen Mechanismus schließen und deuten daher auf einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen MALT1 und den pflanzlichen Metacaspasen AtMC4 und 9 hin.

4.3 Untersuchung MALT1-aktivierender Einflüsse

MALT1 wird nach Stimulation des Antigenrezeptors aktiviert. Dieser Prozess verläuft parallel mit der Rekrutierung des Proteins in den CBM-Komplex und es wird angenommen, dass die Aktivierung durch eine Oligomerisierung des Proteins initiiert wird (Noels et al., 2007). Ein vollständiger Beweis für die Abhängigkeit der MALT1 Aktivierung von der Lokalisation der Protease innerhalb des Komplexes wurde allerdings bisher nicht erbracht. Zumindest die Bindung an CARMA1 ist für die Aktivierung von MALT1 notwendig: Nach P/I Stimulation der CARMA1-defizienten JPM50.6 Zellen wurde MALT1 nicht aktiviert. Diese Beobachtung stimmt mit publizierten Daten überein, in denen gezeigt wurde, dass nach Herunterregulation von CARMA1 in Jurkat T-Zellen die MALT1-vermittelte RelB Spaltung gestört war (Hailfinger et al, 2011).

Mechanistisch existieren drei grundsätzliche Möglichkeiten wie MALT1 aktiviert werden kann: Durch eine proteolytische Spaltung, eine Konformationsänderung einer Monomerstruktur oder durch eine Dimerisierungs-induzierte Konformationsänderung. Der strukturelle Mechanismus der Paracaspase Aktivierung war bis zur Auflösung der Proteinstruktur unbekannt. Die Analyse der Struktur enthüllte, dass aktivierte MALT1 ungespalten als Homodimer vorliegt und Konformationsänderungen in der Ig3 Domäne die MALT1 Aktivität beeinflussen können (Wiesmann et al, 2012). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der Ig3 Domäne kritisch für die Paracaspase Aktivität ist. Des Weiteren ist auch die Dimerisierung der Paracaspase Domäne wichtig für die Aktivität des Proteins. Bisher unbekannt war, dass die Dimerisierung der Paracaspase Domäne nicht für die Integration von MALT1 in den CBM-Komplex benötigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem eine mögliche Funktion der MALT1 C-terminalen Polyubiquitinierung für die Aktivierung nachgewiesen. Die analysierte MALT1 Mutante K11R wird aufgrund der mutierten Lysine des C-Terminus nicht mehr K63-polyubiquitiniert. Die Stimulations-induzierte Integration der Mutante in den CBM-Komplex war allerdings vollständig, was auf eine funktionelle Konformation und Faltung des Proteins deutet (Oeckinghaus et al, 2007). Die Mutante besaß im Vergleich zum Wildtyp Protein eine etwa 50 % reduzierte MALT1 Aktivität. Zwei mögliche Ursachen sind für dieses Resultat vorstellbar: (I) Die Ubiquitinketten stellen eine Bindungsplattform für positiv-regulatorische

Ko-Faktoren der proteolytischen Aktivität dar. (II) Die K63-Polyubiquitinketten vermitteln eine Oligomerisierung des Proteins oder unterstützen die Konformationsänderung in eine aktive MALT1 Struktur. Auch die beobachtete Steigerung der MALT1 Aktivität nach Herunterregulation von A20 spricht für eine MALT1-aktivierende Funktion der Ubiquitinketten, da A20 nach Induktion de TCR die Spaltung der Ketten einleitet (Duwel et al, 2009). Um die Funktion der Ubiquitinierung für die Paracaspase Aktivität aufzuklären, wäre eine Analyse der MALT1 Aktivierung nach Herunterregulation der TRAF Ubiquitin-Ligase interessant.

4.4 Mechanismus der MALT1 Inhibition durch PD

Als Ergebnis des Hochdurchsatz Screenings konnte Mepazin neben weiteren Phenothiazin Derivaten (PD) als effizienter MALT1 Inhibitor identifiziert werden. Die Analyse weiterer PD deutete an, dass MALT1 nur von einer distinkten Gruppe dieser Substanzklasse inhibiert wird. Neben Mepazin besaßen auch Thioridazin und Promazin ein gutes Wirkpotential, was vermutlich auf der strukturellen Ähnlichkeit der Moleküle beruht. Alle drei Verbindungen weisen eine sehr ähnliche Seitenkette auf, in der zwei Stickstoff Atome über eine Propylkette verbunden sind. Diese Kette liegt in Promazin frei, in Mepazin und Thioridazin als Teil eines Piperidins vor. Phenothiazine mit längerer oder stark geladener Seitenkette waren dagegen durchweg mittelmäßig bis schlechte MALT1 Inhibitoren. In einer ersten medizinal-chemischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Länge der Seitenkette sowie die Position und Anwesenheit des Stickstoffs kritisch für die inhibitorische Aktivität der Phenothiazine sind. Insgesamt deutete die Analyse von 30 verschiedenen synthetisierten Molekülen auf eine gute Struktur-Aktivitätsrelation (SAR) zwischen Mepazin und MALT1. Eine weitere Verifizierung der Phenothiazin Stoffklasse als Leitstruktur für MALT1 Inhibitoren gelang im Rahmen eines zweiten MALT1 Wirkstoffscreenings, welches in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. In diesem Screening wurden etwa 100.000 niedermolekulare Verbindungen auf Inhibition der Paracaspase analysiert. Die Analyse der Hits ergab, dass unter den effizientesten 10 Verbindungen erneut zwei PD vertreten waren. Die Michaelis-Menten Enzymkinetik und Auswaschexperimente enthüllten, dass Mepazin kein kompetitiver Inhibitor des aktiven Zentrums ist, sondern als nicht-kompetitiver und reversibler Inhibitor agiert. Die getesteten PD inhibierten die verkürzte MALT1_{Casp-Ig3} Variante (325 – 760) vergleichbar wie das vollständige MALT1, was beweist, dass die allosterische Bindung der PD an das MALT1_{Casp-Ig3} Fragment erfolgt. Dies könnte ein sehr wichtiges Kriterium für die Spezifität der Verbindungen darstellen. Ergebnisse jahrelanger Studien zeigen, dass Inhibitoren des aktiven Zentrums von Proteasen oftmals aufgrund der unspezifischen Inhibition von verwandten Proteasen starke Nebenwirkungen in klinischen Phasen auslösen (Coussens et al, 2002; Salvesen & Riedl, 2007). In der durchgeföhrten

Studie zeigten Mepazin, Thioridazin und Promazin eine hohe Präferenz für MALT1. Sie inhibierten weder die Initiator-Caspase 8, noch die Effektor-Caspase 3, was höchstwahrscheinlich auf die allosterische Inhibition von MALT1 zurückzuführen ist. Als Konsequenz war es beiden Verbindungen möglich Apoptose in MALT1-abhängigen ABC-DLBCL Zelllinien *in vitro* und *in vivo* zu induzieren.

Die kürzlich aufgelöste Proteinstruktur des MALT1_{Casp-Ig3} Fragments enthüllte, dass die Homodimerisierung und Bindung des Substrats eine umfassende Konformationsänderung induziert, die zur Aktivierung von MALT1 führt. Es zeigte sich auch, dass die C-terminale Ig3 Domäne eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Proteins spielt, indem sie zur Stabilisierung der inaktiven MALT1 Struktur beiträgt (Wiesmann et al, 2012). Eine allosterische Bindung der Phenothiazine zwischen der Paracaspase und der Ig3 Domäne könnte daher eine Inhibition von MALT1 bewirken, indem die inaktive Struktur von MALT1 stabilisiert wird. Dieser Mechanismus wird durch die Ergebnisse der rekombinanten und zellulären MALT1 Hemmung gestützt. Mepazin und Thioridazin inhibieren die konstitutive Aktivität von rekombinantem MALT1_{Casp-Ig3}, was andeutet, dass die PD durch allosterische Bindung an das Fragment den strukturellen Änderungen, welche die konstitutive Konformation von MALT1 aufrechterhalten, entgegenwirken. Rekombinantes MALT1 ist nur in Anwesenheit eines kosmotropen Reagens wie Natriumcitrat konstitutiv aktiv, was vermutlich auf eine Dimerisierung der Paracaspase aufgrund der adhäsiven Kräfte im kosmotropen Milieu zurückzuführen ist (Wiesmann et al, 2012). Durch eine Analyse der MALT1_{Casp-Ig3}-Dimerisierung konnte allerdings ein negativer Einfluss der PD auf die Dimerisierung als Ursache der PD-vermittelten MALT1 Inhibition ausgeschlossen werden (AG Hopfner, Daten nicht gezeigt).

Die Verbindungen hemmen zudem die Stimulations-abhängige MALT1 Aktivität in Jurkat T-Zellen, was die Inhibition der RelB und BCL10 Spaltung beweist. Die zelluläre MALT1 Aktivität war zudem nach MALT1 IP und Zugabe der PD in einem *in vitro* Spaltungsexperiment inhibiert. Die zellulären Auswaschexperimente beweisen zudem einen reversiblen Mechanismus der PD, wenn das Auswaschen der Substanzen vor der Stimulation der Zellen erfolgte. Diese Beobachtungen deuten die Stabilisierung einer inaktiven MALT1 Konformation durch PD an, die eine Aktivierung des Proteins durch die proximalen Signale der Stimulation unterbindet. Die Studien in DLBCL lassen einen ähnlichen Schluss zu: PD inhibierten die konstitutive MALT1 Aktivität nach Präzipitation und partieller Reinigung des Proteins aus ABC-DLBCL Zellen. Vermutlich zwingen die PD MALT1 innerhalb der Zellen in eine strukturell inaktive Konformation. Die strukturelle Anordnung dieser Konformation ähnelt dabei möglicherweise dem inaktiven Enzym vor Stimulation der Zellen. Die Ergebnisse der zellulären Inhibition stimmen grundsätzlich mit dem allosterischen und nicht-kompetitiven Mechanismus der rekombinanten MALT1

Inhibition überein. Eine Auflösung der Paracaspase Struktur zusammen mit den Wirkstoffen wäre ein geeignetes Mittel zur Aufklärung des Wirkmechanismus und der genauen Bindungsstelle der Inhibitoren.

4.5 Potentielle off-target Effekte von Thioridazin auf ABC-DLBCL Zelllinien

Die starke Inhibition von zellulärem MALT1 nach relativ kurzer Inkubationszeit der PD lassen auf eine direkte Wirkung der Substanzen auf die proteolytische MALT1 Aktivität schließen. Dabei war die Wirkung von Mepazin sowohl auf rekombinantes als auch zelluläres MALT1 etwa 4 - 5-fach höher verglichen mit Thioridazin, was eine vergleichbare Aufnahme in die Zellen sowie Stabilität und zelluläre Konzentration beider Verbindungen andeutet. Im Gegensatz zu den direkten Effekten von Mepazin und Thiodiazin auf MALT1 enthüllten die ABC-DLBCL Zytotoxizitätstests eine unterschiedliche Wirkung der Verbindungen. Thioridazin war in Vorstudien relativ toxisch für ABC- und GCB-DLBCL Zellen und wurde aus diesem Grund in einer niedrigeren Konzentration eingesetzt. Dennoch war die Wirkung von Thioridazin auf die ABC-DLBCL Zellen durchaus mit den Effekten einer höheren Mepazin Konzentration vergleichbar. Natürlich können neben der MALT1 Inhibition auch unspezifische Effekte des Thioridazins zur toxischen Wirkung der Verbindung in ABC-DLBCL beitragen. In diesem Zusammenhang wurde eine inhibitorische Wirkung von Thioridazin auf den PI3K-PDK1-AKT Signalweg in einem Ovarialkarzinom nachgewiesen (Choi et al, 2008; Rho et al, 2011). Die konstitutive AKT Phosphorylierung ist ein Kennzeichen von DLBCL Zellen, das unabhängig von ihrer Klassifizierung ist (Baohua et al, 2008; Renne et al, 2007; Uddin et al, 2006). Eine Wirkung von hohen Thioridazin Konzentrationen auf die AKT Phosphorylierung wurde zwar im Verlauf der DLBCL Studien beobachtet, aber nicht weiter aufgeklärt (Daten nicht gezeigt). Allerdings besitzen die verwendeten GCB-DLBCL Zellen ebenfalls einen konstitutiven PI3K-AKT Signalweg (Mori & Sairenji, 2006; Petrich et al, 2012; Uddin et al, 2006) und waren resistent gegen Thioridazin, so dass unter den experimentellen Bedingungen von einer weitgehend spezifischen MALT1 Inhibition als Ursache der toxischen Effekte ausgegangen werden kann. Vor kurzem konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine Beteiligung der konstitutiven PI3K/PDK1 bei der Aufrechterhaltung der MALT1 Aktivität in den ABC-DLBCL Zelllinien HBL1 und TMD8 demonstriert werden, die als gemeinsames Kennzeichen eine onkogene Mutation im BCR Signalprotein CD79B aufweisen (Kloo et al, 2011). Thioridazin bewirkte allerdings nicht nur die MALT1 Hemmung in diesen, sondern in allen untersuchten ABC-DLBCL Zelllinien, was zusätzlich die spezifische Wirkung des Wirkstoffs andeutet. Nichtsdestotrotz kann eine begleitende PI3K-PDK1 Inhibition durchaus zu einer Verstärkung der über MALT1 Inhibition induzierten toxischen Effekte führen und aus

diesem Grund eine Ursache für die stärkere Wirkung von Thioridazin auf DLBCL Zellen gegenüber MALT1 darstellen.

4.6 Einschätzung des pharmazeutischen *in vivo* Potentials der Phenothiazine

4.6.1 Herkunft und Wirkung der PD Mepazin, Thioridazin und Promazin

Aktuell sind zahlreiche Phenothiazine vor allem als Antipsychotika, Sedativa und Antihistaminika in der klinischen Anwendung, was grundsätzlich auf ein gutes pharmazeutisches Potential der Phenothiazin Grundstruktur hinweist. Mepazin, Thioridazin und Promazin sind Antipsychotika, die in den 50er Jahren synthetisiert wurden und teils bis heute eingesetzt werden. Ein großer Vorteil dieser Phenothiazine ist daher, dass ihre Pharmakokinetik und Nebenwirkungen sehr gut beschrieben sind. Die effiziente Pharmakokinetik des Phenothiazin Grundgerüsts stellt vermutlich auch die Grundlage für das hohe *in vivo* Potential der drei identifizierten Verbindungen als MALT1 Inhibitoren dar.

Die sedative und antipsychotische Wirkung der Phenothiazine geht in erster Linie auf ihre Funktion als D2-Dopaminrezeptor Antagonisten zurück (Barth et al, 2006; Seeman et al, 1976). Der effizienteste MALT1 Inhibitor, Mepazin, wurde 1954 zum ersten Mal pharmakologisch beschrieben und in den späten 50er bis in die Mitte der 60er Jahre als Medikament unter dem Namen „Pacatal“ zur Behandlung von psychischen Störungen und Unruhezuständen in klinischen Studien eingesetzt (Nieschulz et al, 1954). Eine antipsychotische Wirkung von Mepazin konnte allerdings nur in wenigen Studien signifikant belegt werden (King et al, 1957; Sarwer-Foner & Koranyi, 1957; Simpson, 1957; Whittier et al, 1960). Im direkten Vergleich mit dem bekanntesten antipsychotischen Phenothiazin-Wirkstoff Chlorpromazin war Mepazin deutlich weniger wirksam und auch weniger toxisch (Lomas, 1957). Die Nebenwirkungen der Behandlung wurden in den meisten Studien als gering eingestuft. Wie die meisten Neuroleptika können Phenothiazine extrapyramidal-motorische Störungen hervorrufen. Als seltene Nebenwirkung nach Behandlung mit Mepazin trat eine milde Form von Leukopenie auf (Lomas, 1957). In Einzelfällen wurde auch eine Verminderung asthmatischer Anfälle beobachtet, was eine potentiell immunsuppressive Aktivität andeutet (Sarwer-Foner & Koranyi, 1957).

Thioridazin ist als Medikament unter dem Trivialnamen Mellaryl (auch: Melleril, Thioril) zur Behandlung von speziellen Formen der Schizophrenie und chronischen Psychosen, bei denen psychomotorische Unruhe- und Erregungszustände auftreten, zugelassen. Es besitzt eine geringe antipsychotische und eine stark-sedierende Wirkung. Der Nutzen von Thioridazin wird aktuell auch für weitere medizinische Anwendungen diskutiert. Es wirkt selektiv toxisch in verschiedenen Tumorzelllinien (Rho et al, 2011; Zhelev et al, 2004) und

stimuliert durch Blockade distinkter D2-Dopaminrezeptoren die Differenzierung von Tumorstammzellen und Brustkrebszellen (Sachlos et al, 2012). Es wird zudem als Therapeutikum gegen Malaria oder Tuberkulose getestet, wobei die molekulare Ursache der antimikrobiellen und antiparasitischen Wirkung bisweilen unklar ist (van Soolingen et al, 2010; Weisman et al, 2006). Als bedenkliche Nebenwirkungen von Thioridazin gelten Herzrhythmusstörungen, die auf Verlängerung des QT-Intervalls beruhen und in seltenen Fällen nach Aufnahme des Wirkstoffes auftreten. Dies liegt höchstwahrscheinlich an einer unspezifischen Wirkung von Thioridazin. Tatsächlich weist die Substanz in Vergleichsstudien nur eine geringe Selektivität für D2-Dopaminrezeptoren auf und besitzt eine vergleichbare Bindungsaffinität an den Serotoninrezeptor 5-HAT-2A und an den spannungsabhängigen Kaliumkanal hERG. Der hERG-Kanal ist an der Repolarisierung des Aktionspotentials im Herzen beteiligt. Die molekulare Grundlage für die Verlängerung des QT-Intervalls ist häufig eine antagonistische Bindung des Kanals und dies stellt vermutlich auch die Ursache im Falle von Thioridazin dar (Kongsamut et al, 2002).

Promazin (Handelsname Prazine, Sparin) besaß die schwächsten toxischen Effekte in den ABC-DLBCL Zelllinien. Der Wirkstoff ist ein sehr schwaches Antipsychotikum, das immer noch Verwendung in der klinischen Behandlung von Unruhezuständen und Psychosen findet. Auch die Wirkung von Promazin wird aktuell im Rahmen zahlreicher Studien für verschiedene medizinische Anwendungen analysiert (Ashoor et al, 2011; Chen et al, 2012; Kuzma-Richeret et al, 2011). Der Wirkstoff Promethazin besaß trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Promazin kein inhibitorisches Potential auf MALT1, was eine spezifische Wirkung von distinkten Phenothiazinen auf MALT1 unterstreicht. Promethazin wird nicht mehr als Antipsychotikum eingesetzt, findet aber immer noch Anwendung als Antihistaminikum und Sedativum (Jo et al, 2009; Wittekindt et al, 2006).

Das aktuelle Interesse am Wirkspektrum der Phenothiazine für verschiedene medizinische Anwendungsbereiche ist ungebrochen, was das pharmazeutische Potential dieser Verbindungen widerspiegelt.

4.6.2 PK von Thioridazin deutet ein effizientes therapeutisches Potential der PD an

Ein wichtiges Kriterium, um das therapeutische Potential eines Wirkstoffes einzuschätzen zu können, ist die Pharmakokinetik (PK) des Wirkstoffs nach Aufnahme in den Organismus. Im Gegensatz zu Mepazin existieren für Thioridazin zahlreiche aktuelle PK Daten sowie diagnostische Standardverfahren zur Identifikation des Wirkstoffes im Blutserum. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen der Arbeit eine PK Studie von Thioridazin. Die Analyse von Thioridazin eine Stunden nach i.p. Injektion von 12 mg/kg des Wirkstoffs in NSG Mäuse ergab eine maximale Plasmakonzentration von 170 bis 270 mg/ml. Dieses Ergebnis

entspricht den Literaturangaben nach Thioridazin Injektion (10 mg/kg, i.p.) in Ratten (Daniel et al, 1997). Zudem stimmen die ermittelten Werte in den NSG Mäusen mit dem Konzentrationsbereich überein, der im Menschen eine Stunde nach Aufnahme von etwa 100 mg Thioridazin gemessen wurde (130 - 650 ng/ml) (Chakraborty et al, 1989; Shvartsburg et al, 1984). Im Menschen kann allerdings noch 24 Stunden nach einmaliger Aufnahme von Thioridazin eine hohe Serumkonzentration detektiert werden, wohingegen in Nagetieren zu diesem Zeitpunkt kein Wirkstoff mehr vorhanden ist (Daniel et al, 1997). Angesichts der in den in vivo Experimenten eingesetzten Dosis von Thioridazin (12 mg/kg), die umgerechnet einer erlaubten Maximaldosis im Menschen von etwa 800 mg entspricht, kann daher auf einen deutlich höheren Stoffwechsel der Nagetiere geschlossen werden. Die chronische Thioridazin Konzentration nach wiederholter Injektion der Verbindung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. In Ratten lag sie nach mehrfacher Injektion (10 mg/kg; i.p.; q.i.d) über zwei Wochen hinweg maximal bei etwa 750 ng/ml und fiel auf ~ 90 ng/ml nach 24 Stunden (Daniel et al, 1997). Die empfohlene therapeutische Plasmakonzentration zur Behandlung psychischer Störungen im Menschen liegt zwischen 200 und 2000 ng/ ml (Baumann et al, 2004). Die in der Literatur beschriebenen Werte und die in dieser Arbeit generierten Daten lassen darauf schließen, dass die Thioridazin Konzentration, die zur Inhibition des selektiven ABC-DLBCL Tumorwachstums im Xenotransplantationsmodell führte, deutlich unter dem therapeutischen Fenster im Menschen nach oraler Aufnahme des Wirkstoffs liegt. Die Resultate des murinen Xenograft Tumormodells, in welchem Mepazin und Thioridazin eine vergleichbare Wirkung zeigten, deuten an, dass Mepazin höchstwahrscheinlich eine mit Thioridazin übereinstimmende PK aufweist. Die PK Studie von Thioridazin lässt somit grundsätzlich auf ein hohes Potential der Substanzen zur Behandlung von ABC-DLBCL oder MALT Lymphomen hoffen.

4.6.3 Vergleich der PD mit anderen therapeutischen ABC-DLBCL Inhibitoren

Das Ziel einer optimalen Krebstherapie sollte das selektive Absterben der Tumorzellen sein, ohne dass normale Zellen beeinflusst werden. Angesichts der kritischen Rolle des NF-κB Signalweges für das Überleben der ABC-DLBCL Zellen gilt eine Unterbrechung des Signalweges als bedeutend für eine zielgerichtete Therapie dieser und anderer B-Zell Lymphome. Die ersten Anzeichen für das Potential einer NF-κB zielgerichteten Therapie wurden aus einer Hemmstoffstudie mit dem IKK β Hemmstoff MLN120B deutlich (Abb. 4.1). MLN120B greift in die Signalweiterleitung zwischen dem IKK-Komplex und NF-κB ein, indem es die Kinaseaktivität der IKK β Untereinheit inhibiert. In Zellstudien führt die Inkubation mit dem Inhibitor zu einer fast vollständigen Inhibition der NF-κB Aktivität (Hideshima et al, 2006). Die Behandlung von DLBCL Zellen mit dem Inhibitor resultierte in einer selektiven

Apoptose-Induktion in ABC-DLBCL Zellen (Lam et al, 2005). Es zeigte sich allerdings, dass eine langfristige und ausgeprägte NF-κB Hemmung, wie sie aus einer MLN120B-vermittelten Inhibition von IKK β resultiert, inakzeptable Nebenwirkungen entfaltet, da IKK β eine wichtige Funktion in zahlreichen zellulären Prozessen und in verschiedenen Zelltypen spielt. Die Analyse der MLN120B Wirkung auf die NF-κB Genexpression in HBL1 Zellen in der vorliegenden Arbeit spiegelt die drastische Wirkung des IKK β Inhibitors wider. MLN120B erzielte in dieser Studie deutlich stärkere Effekte in Relation zu Mepazin. Dies liegt an der starken Wirkung des IKK β Inhibitors auf die NF-κB Aktivität.

Die proteolytische MALT1 Aktivität bewirkt dagegen eine indirekte NF-κB Aktivierung in Lymphozyten, indem NF-κB negativ-regulatorische Faktoren wie RelB oder A20 proteolytisch gespalten und abgebaut werden (Haiflinger et al, 2011). Auf diesem Wege reguliert MALT1 die Aktivität bestimmter NF-κB-Untereinheiten wie c-Rel (Ferch et al, 2007). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Paracaspase Funktion die Expression eines definierten NF-κB Gen-Clusters reguliert und eine Hemmung der Protease folglich in einer verringerten Expression definierter NF-κB Zielgene resultiert. Der Einfluss der MALT1 Inhibition auf die NF-κB Genexpression in Lymphozyten sollte sich daher grundsätzlich von den massiven Effekten einer IKK β Inhibition unterscheiden und eine Ursache für die ausgeprägten Effekte des MLN120B Inhibitors sowie die ermittelten Unterschiede zwischen den HBL1 Gensignaturen darstellen. Die partielle NF-κB Unterdrückung, die durch eine MALT1 Inhibition entsteht, könnte daher vorteilhaft für eine zielgerichtete Therapie NF-κB-abhängiger Lymphome sein, weil hierdurch toxische Nebenwirkungen vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit zur NF-κB-zielgerichteten Lymphomtherapie bietet die Blockade von IKK vorgesetzten Faktoren des konstitutiven BCR-Signalweges (Abb. 4.1). In diesem Zusammenhang werden aktuell vor allem Kinaseinhibitoren gegen Syk, BTK, PI3K oder PKC β getestet. Syk ist in vielen B-Zell Lymphomen konstitutiv aktiv und eine klinische Phase I/II mit dem Syk Inhibitor Fostamatinib Disodium erzielte bereits eine akzeptable Wirkung in DLBCL Patienten (Friedberg et al, 2010). Die Syk-nachgeschaltete Kinase BTK ist ein kritischer Faktor für die Aufrechterhaltung der chronischen NF-κB Aktivität in ABC-DLBCL und wird durch den irreversiblen Inhibitor Ibrutinib gehemmt. Studien mit DLBCL Zelllinien zeigten, dass bereits geringe Mengen des Wirkstoffs reichen um Apoptose in bestimmten ABC-DLBCL Zelllinien auszulösen. Er wird daher aktuell in einer klinischen Phase I zur Behandlung von ABC-DLBCL getestet (Yang et al, 2012). Die Wirkstoffe Sotustaurin (STN, AEB071) und Enzastaurin inhibieren jeweils PKC θ und β und vermindern dadurch eine Antigen-vermittelte Lymphozytenaktivierung. Sotustaurin wird momentan in einer klinischen Phase II für Psoriasis und zur Anwendung in Fällen akuter Abstoßung nach einer Organtransplantation getestet (Friman et al, 2011; Kovarik & Slade, 2010; Skvara et al,

2008). Es wirkt zudem selektiv auf CD79-mutierte ABC-DLBCL Zelllinien (HBL1, TMD8 und OCI-Ly10) in einem präklinischen Mausmodell (Naylor et al., 2011, Lenz et al., 2008). Enzastaurin wird aktuell mit Erfolg in einer klinischen Phase II für refraktäre DLBCL Fälle getestet (Robertson et al, 2007).

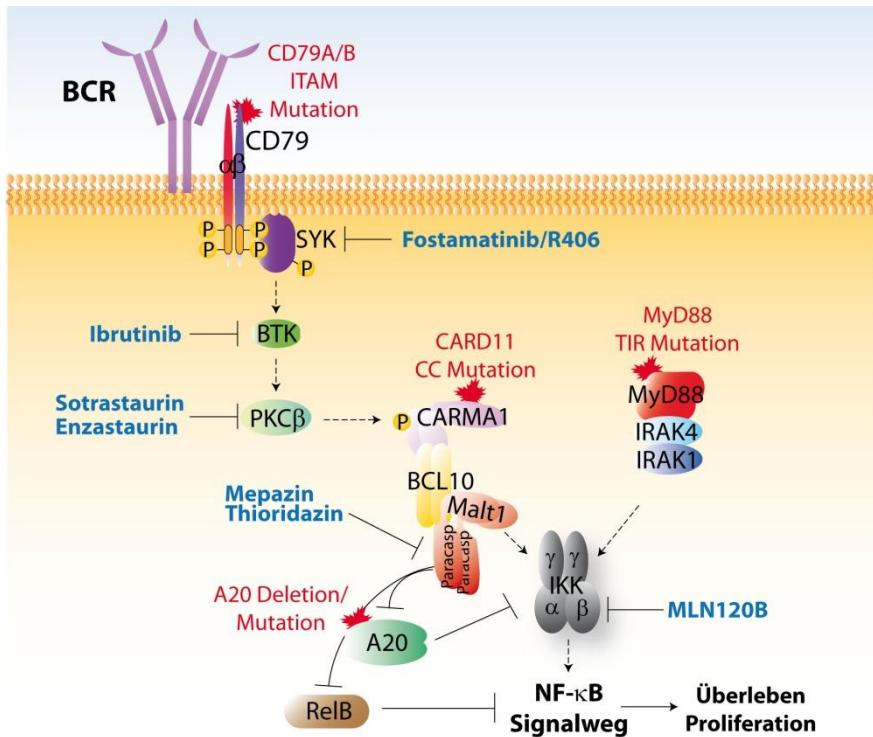


Abbildung 4.1: Onkogene Mechanismen in ABC-DLBCL und Hemmstoffe für die zielgerichtete Therapie
Eine detaillierte Beschreibung der Ereignisse befindet sich im Haupttext.

Inhibitoren der beschriebenen Signalfaktoren wirken allerdings nicht in ABC-DLBCL Zelllinien, die eine PKC β -nachgeschaltete Mutation, wie bspw. eine CARD11 Mutation, besitzen. Hier läge der große Vorteil einer MALT1-zielgerichteten Therapie, die somit eine Behandlung von einem größeren Anteil unterschiedlicher ABC-DLBCL Fälle ermöglichen würde. Eine kombinatorische Therapie von MALT1 zusammen mit anderen Inhibitoren des NF- κ B oder MyD88 Signalweges (Abb. 4.1), der ebenfalls in einem Großteil der ABC-DLBCL Fälle aktiv ist, sowie weiterer onkogener Faktoren, könnte zudem zu einer synergistischen Wirkung bei der Behandlung der Lymphome führen. Ein Vorteil dieser Therapieform ist, dass die Konzentration der Substanzen aufgrund der synergistischen Wirkweise häufig verringert werden kann, wodurch sich potentielle toxische Nebenwirkungen vermeiden lassen.

4.7 Ausblick

Trotz Aufklärung der Paracaspase Struktur ist der genaue Mechanismus der MALT1 Aktivierung gegenwärtig immer noch unklar. Vor allem der Einfluss von regulatorischen Faktoren auf die Aktivität wurde bisher nur ungenügend adressiert. Die einzige bekannte Modifikation von MALT1 stellt die TRAF6-vermittelte K63-Polyubiquitinierung des C-Terminus dar. In dieser Arbeit konnte eine funktionelle Rolle der Ubiquitinierung für die MALT1 Aktivierung aufgedeckt werden. Um die Bedeutung der Ubiquitinierung für die MALT1 Aktivität genauer zu untersuchen, wäre eine Analyse der proteolytischen Aktivität nach siRNA Herunterregulation oder Überexpression von TRAF6 interessant. Als Resultat sollte eine Verringerung bzw. Verstärkung der MALT1 Ubiquitinierung induziert werden, die möglicherweise einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität besitzt.

PD stellen hoch-effiziente und selektive MALT1 Inhibitoren dar. Angesichts der Ergebnisse des präklinischen Mausmodells und aufgrund der pharmakokinetischen Vergleichsanalyse von Thioridazin kann auf ein hohes *in vivo* Potential der Substanzen geschlossen werden. Die Resultate und die einfache Verfügbarkeit der Substanzen stützen somit eine potentielle zulassungsüberschreitende Anwendung (*off-label-use*) der Wirkstoffe zur kurzfristigen Therapie von ABC-DLBCL oder MALT Lymphomen. Hierbei wäre eine kombinatorische Therapie erstrebenswert: Durch die reduzierte Expression von anti-apoptotischen Faktoren nach PD-vermittelter MALT1 Inhibition wären die ABC-DLBCL Tumore für die Apoptose-induzierenden Signale der Chemotherapie sensibilisiert.

Eine kombinatorische ABC-DLBCL Therapie von MALT1 zusammen mit anderen Inhibitoren des NF-κB oder MyD88 Signalweges könnte zu einer synergistischen Wirkung bei der Behandlung der Lymphome führen. Um zu überprüfen, ob eine Kombination der PD mit dem BTK Inhibitor Ibrutinib zu einer synergistischen Toxizität in ABC-DLBCL führt, wäre die Durchführung einer Zellstudie bei gleichzeitiger und, zum Vergleich, getrennter Inkubation der Substanzen erforderlich.

Um zu testen, ob sich die PD auch zur Behandlung von immunologischen Erkrankungen eignen, wäre eine Analyse ihrer Wirkung in einem murinen Immunmodell interessant. Ein passendes Modell hierfür stellt die experimentelle Autoimmunerkrankung EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) dar, die MALT1 abhängig ist und als Mausmodell für Multiple Sklerose gilt (Brustle et al, 2012). In Anlehnung an die Resultate des ABC-DLBCL Xenograft Mausmodells wäre hierzu eine Behandlung der Mäuse mit Mepazin oder Thioridazin und eine Analyse des pathologischen EAE Mausphänotyps erforderlich.

Der langfristige Einsatz der identifizierten Verbindungen als Immunsuppressiva wäre angesichts der zu erwartenden Nebenwirkungen höchstwahrscheinlich nicht empfehlenswert. Zur Verringerung der Nebenwirkungen und zur Erhöhung der Effizienz und

Selektivität der Inhibitoren müsste zuerst eine erweiterte medizinal-chemische Optimierung der Verbindungen durchgeführt werden. Ein wichtiges Hilfsmittel für die zielgerichtete Synthese von effizienten Inhibitoren im Rahmen einer medizinal-chemischen Studie stellt die Struktur des Zielproteins dar. Eine Strukturanalyse von MALT1 zusammen mit den gebundenen PD Inhibitoren wäre daher wichtig für die Optimierung der Substanzen. Diese Analyse würde zudem Aufschluss über den inhibitorischen Mechanismus der Verbindungen und die genaue Bindungsstelle an MALT1_{Casp-Ig3} geben. Diese Informationen würden dazu helfen, eine medizinal-chemische Trennung der neurologischen und der anti-tumoralen Effekte der PD zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die MALT1 Paracaspase Aktivität ist wichtig für die vollständige Lymphozytenaktivierung und kritisch für das NF-κB-gesteuerte Überleben von B-Zell Lymphomen wie dem MALT Lymphom oder dem aggressiven ABC-DLBCL Subtyp. MALT1 besitzt eine einzigartige proteolytische Aktivität, die sich mechanistisch von den nächsten verwandten Cysteinproteasen im Menschen, den Caspisen, unterscheidet. Effektive und selektive MALT1 Inhibitoren sollten aus diesem Grund ein hohes klinisches Potential zur zielgerichteten Therapie von distinkten MALT1-abhängigen B-Zell Neoplasien und Störungen der Immunantwort besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der proteolytische Mechanismus von zellulärem und rekombinantem MALT1 charakterisiert. Es zeigte sich, dass MALT1 proteolytische Eigenschaften besitzt, die grundsätzlich mit pflanzlichen Metacaspasen vergleichbar sind und auf eine stärkere Abgrenzung von MALT1 zu humanen Caspisen schließen lassen. Eine Analyse der Dimerisierung der MALT1 Paracaspase Domäne erbrachte zudem die Erkenntnis, dass die Dimerisierung der Domäne kritisch für die enzymatische Aktivierung des Proteins, aber unbedeutend für die Integration von MALT1 in den CBM-Komplex ist. Des Weiteren konnte durch Mutationsstudien eine unbekannte regulatorische Funktion der C-terminalen K63-Polyubiquitinierung für die MALT1 Aktivität aufgezeigt werden.

Die Untersuchung des proteolytischen Mechanismus von MALT1 lieferte wichtige Erkenntnisse um eine Identifikation der ersten niedermolekularen MALT1 Inhibitoren zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde ein Hochdurchsatz Wirkstoffscreening mit niedermolekularen Verbindungen durchgeführt, in welchem MALT1 Inhibitoren aus der Phenothiazin Stoffklasse identifiziert wurden. Dabei inhibierte nur ein geringer Anteil der getesteten Phenothiazine die proteolytische MALT1 Aktivität effektiv, was auf eine hohe Spezifität des Phenothiazin Grundgerüsts als pharmazeutische Leitstruktur hindeutet. Die wirksamsten Substanzen Mepazin, Thioridazin und Promazin sind bekannte Pharmazeutika, die teilweise seit den späten 50-er Jahren eine klinische Anwendung als Antipsychotika oder Sedativa erfahren. Durch eine Studie des inhibitorischen Mechanismus von Mepazin wurde aufgedeckt, dass die Wirkweise auf einer reversiblen und nicht-kompetitiven Bindung der Phenothiazine beruht. Alle drei Verbindungen bewirkten zudem eine spezifische Inhibition der Stimulations-abhängigen MALT1 Aktivität in T-Zellen und der konstitutiven Aktivität in ABC-DLBCL Zellen. Als Konsequenz führten die beiden effektivsten Verbindungen, Mepazin und Thioridazin, zu einer verminderten T-Zell Aktivierung in *ex vivo* Studien mit primären humanen und murinen T-Zellen. Beide Verbindungen bewirkten außerdem eine Verringerung der NF-κB Aktivität in ABC-DLBCL Zelllinien. Dies resultierte in einer selektiven Reduktion des ABC-DLBCL Wachstums in Zellstudien und einem murinen Xenotransplantationsmodell

in vivo. Die *in vivo* Daten des präklinischen Modells weisen auf ein hoch-effizientes Potential der PD als pharmakologische MALT1 Inhibitoren und lassen auf eine therapeutische Anwendung bei der Behandlung von ABC-DLBCL oder als Immunsuppressiva hoffen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator Protein 1
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BSA	Rinderserumalbumin
BCR	B-Zell Rezeptor
CARD	Caspase Recruitment Domain
CARMA1	CARD Containing MAGUK Protein 1
CBM	CARMA1/BCL10/MALT1
CC	Coiled-Coil
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DD	Death Domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämaggglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
IAP	Inhibitor of Apoptosis
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IP	Immunopräzipitation
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
Jnk	Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAT	Linker of Activation In T-Cells
LB	Luria-Bertani Medium
Lck	Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase
MAGUK	Membrane Associated Guanylate Kinase
MALT1	Mucosa Associated Lymphoid Tissue 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NF-AT	Nuclear Factor of Activated T-Cells
NF-κB	Nuclear Factor κB
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	3-Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 Domäne
P/I	PMA/Ionomycin
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RFU	Relative Fluorescent Unit
RHD	Rel Homologie Domain
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	Src Homology 3
SLP76	SH2 Domain Containing Leukocyte Protein Of 76 kD
Std	Stunde
TAB	TAK1-binding Protein
TAK1	Transforming Growth Factor β Activated Kinase 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	T-Zell receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZAP70	ζ -Chain Associated Protein

7 Referenzen

Ahmed N, Zeng M, Sinha I, Polin L, Wei WZ, Rathinam C, Flavell R, Massoumi R, Venuprasad K (2011) The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld act together to regulate Tak1 and inflammation. *Nat Immunol* **12**: 1176-1183

Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, Ota H, Nakamura S, Morishima Y, Taniwaki M, Seto M (1999) A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* **18**: 5785-5794

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* **190**: 1879-1890

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**: 503-511

Andersen PL, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, Ellison MJ, Dixit VM, Xiao W (2005) Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* **170**: 745-755

Ashoor A, Lorke D, Nurulain SM, Kury LA, Petroianu G, Yang KH, Oz M (2011) Effects of phenothiazine-class antipsychotics on the function of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* **673**: 25-32

Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE (1997) t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* **8**: 979-985

Baens M, Fevery S, Sagaert X, Noels H, Hagens S, Broeckx V, Billiau AD, De Wolf-Peeters C, Marynen P (2006) Selective expansion of marginal zone B cells in Emicro-API2-MALT1 mice is linked to enhanced IkappaB kinase gamma polyubiquitination. *Cancer Res* **66**: 5270-5277

Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**: 141-179

Baohua Y, Xiaoyan Z, Tiecheng Z, Tao Q, Daren S (2008) Mutations of the PIK3CA gene in diffuse large B cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol* **17**: 159-165

Barth VN, Chernet E, Martin LJ, Need AB, Rash KS, Morin M, Phebus LA (2006) Comparison of rat dopamine D2 receptor occupancy for a series of antipsychotic drugs measured using radiolabeled or nonlabeled raclopride tracer. *Life Sci* **78**: 3007-3012

Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Muller-Oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G (2004) The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry* **37**: 243-265

Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A (2005) Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* **106**: 3183-3190

Bidere N, Snow AL, Sakai K, Zheng L, Lenardo MJ (2006) Caspase-8 regulation by direct interaction with TRAF6 in T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *Curr Biol* **16**: 1666-1671

Blonska M, Lin X (2011) NF-kappaB signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. *Cell Res* **21**: 55-70

Bloor S, Ryzhakov G, Wagner S, Butler PJ, Smith DL, Krumbach R, Dikic I, Randow F (2008) Signal processing by its coil zipper domain activates IKK gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1279-1284

Boehm T (2012) Evolution of vertebrate immunity. *Curr Biol* **22**: R722-732

Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**: 280-288

Boomer JS, Green JM (2010) An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a002436

Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**: 1052-1060

Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A, Dustin ML (2001) The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* **2**: 1159-1166

Brustle A, Brenner D, Knobbe CB, Lang PA, Virtanen C, Hershenfield BM, Reardon C, Lacher SM, Ruland J, Ohashi PS, Mak TW (2012) The NF-kappaB regulator MALT1 determines the encephalitogenic potential of Th17 cells. *J Clin Invest* **122**: 4698-4709

Budd RC, Yeh WC, Tschopp J (2006) cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* **6**: 196-204

Chakraborty BS, Midha KK, McKay G, Hawes EM, Hubbard JW, Korchinski ED, Choc MG, Robinson WT (1989) Single dose kinetics of thioridazine and its two psychoactive metabolites in healthy humans: a dose proportionality study. *J Pharm Sci* **78**: 796-801

Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* **22**: 4132-4142

Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmler A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* **21**: 3704-3714

Chanudet E, Huang Y, Ichimura K, Dong G, Hamoudi RA, Radford J, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Ferry J, Du MQ (2010) A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* **24**: 483-487

- Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R (1989) Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* **143**: 1283-1289
- Chau H, Wong V, Chen NJ, Huang HL, Lin WJ, Mirtsos C, Elford AR, Bonnard M, Wakeham A, You-Ten AI, Lemmers B, Salmena L, Pellegrini M, Hakem R, Mak TW, Ohashi P, Yeh WC (2005) Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J Exp Med* **202**: 405-413
- Che T, You Y, Wang D, Tanner MJ, Dixit VM, Lin X (2004) MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **279**: 15870-15876
- Chen FE, Ghosh G (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18**: 6845-6852
- Chen YW, Chu CC, Chen YC, Kan CD, Wang JJ (2012) Promazine and chlorpromazine for prolonged spinal anesthesia in rats. *Neurosci Lett* **521**: 115-118
- Chen ZJ (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* **246**: 95-106
- Choi JH, Yang YR, Lee SK, Kim SH, Kim YH, Cha JY, Oh SW, Ha JR, Ryu SH, Suh PG (2008) Potential inhibition of PDK1/Akt signaling by phenothiazines suppresses cancer cell proliferation and survival. *Ann N Y Acad Sci* **1138**: 393-403
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, Van Breusegem F, Dangl JL, Epple P (2010) Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* **330**: 1393-1397
- Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **459**: 717-721
- Conze DB, Zhao Y, Ashwell JD (2010) Non-canonical NF-kappaB activation and abnormal B cell accumulation in mice expressing ubiquitin protein ligase-inactive c-IAP2. *PLoS Biol* **8**: e1000518
- Cooper MD, Alder MN (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**: 815-822
- Coornaert B, Baens M, Heyninck K, Bekaert T, Haegman M, Staal J, Sun L, Chen ZJ, Marynen P, Beyaert R (2008) T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol* **9**: 263-271
- Copie-Bergman C, Plonquet A, Alonso MA, Boulland ML, Marquet J, Divine M, Moller P, Leroy K, Gaulard P (2002) MAL expression in lymphoid cells: further evidence for MAL as a distinct molecular marker of primary mediastinal large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* **15**: 1172-1180
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387-2392
- Dal Porto JM, Burke K, Cambier JC (2004) Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck. *Immunity* **21**: 443-453

- Daniel WA, Syrek M, Mach A, Wojcikowski J, Boksa J (1997) Pharmacokinetics of thioridazine and its metabolites in blood plasma and the brain of rats after acute and chronic treatment. *Pol J Pharmacol* **49**: 439-452
- Darwech I, Otero JE, Alhawagri MA, Abu-Amer Y (2010) Tyrosine phosphorylation is required for IkappaB kinase-beta (IKKbeta) activation and function in osteoclastogenesis. *J Biol Chem* **285**: 25522-25530
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* **194**: 1861-1874
- Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Brazil RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM (2010) Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**: 88-92
- Delekta PC, Apel IJ, Gu S, Siu K, Hattori Y, McAllister-Lucas LM, Lucas PC (2010) Thrombin-dependent NF-{kappa}B activation and monocyte/endothelial adhesion are mediated by the CARMA3.Bcl10.MALT1 signalosome. *J Biol Chem* **285**: 41432-41442
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**: 351-361
- Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, Balsa A, Blanco FJ, Canete JD, Caliz R, Carreno L, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Ortiz AM, Herrero-Beaumont G, Pablos JL, Narvaez J, Navarro F, Marenco JL, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A (2009) Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther* **11**: R42
- Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P (1999) The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* **93**: 3601-3609
- Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shaknovich R, Zhang Y, Cattoretti G, Ye BH (2008) Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **111**: 1515-1523
- Dong W, Liu Y, Peng J, Chen L, Zou T, Xiao H, Liu Z, Li W, Bu Y, Qi Y (2006) The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **281**: 26029-26040
- Du MQ (2011) MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor-kappaB activation. *Histopathology* **58**: 26-38
- Dufner A, Schamel WW (2011) B cell antigen receptor-induced activation of an IRAK4-dependent signaling pathway revealed by a MALT1-IRAK4 double knockout mouse model. *Cell Commun Signal* **9**: 6

- Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloo B, Ferch U, Darnay BG, Ruland J, Marynen P, Krappmann D (2009) A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol* **182**: 7718-7728
- Egawa T, Albrecht B, Favier B, Sunshine MJ, Mirchandani K, O'Brien W, Thome M, Littman DR (2003) Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol* **13**: 1252-1258
- Eitelhuber AC, Warth S, Schimmack G, Duwel M, Hadian K, Demski K, Beisker W, Shinohara H, Kurosaki T, Heissmeyer V, Krappmann D (2011) Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T-cell activation. *Embo J* **30**: 594-605
- Ferch U, Kloo B, Gewies A, Pfander V, Duwel M, Peschel C, Krappmann D, Ruland J (2009) Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* **206**: 2313-2320
- Ferch U, zum Buschenfelde CM, Gewies A, Wegener E, Rauser S, Peschel C, Krappmann D, Ruland J (2007) MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. *Nat Immunol* **8**: 984-991
- Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, Schaefer-Cutillo J, De Vos S, Sinha R, Leonard JP, Cripe LD, Gregory SA, Sterba MP, Lowe AM, Levy R, Shipp MA (2010) Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**: 2578-2585
- Firman S, Arns W, Nashan B, Vincenti F, Banas B, Budde K, Cibrik D, Chan L, Klempnauer J, Mulgaonkar S, Nicholson M, Wahlberg J, Wissing KM, Abrams K, Witte S, Woodle ES (2011) Sotustaurin, a novel small molecule inhibiting protein-kinase C: randomized phase II study in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **11**: 1444-1455
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**: 201-232
- Gaide O, Favier B, Legler DF, Bonnet D, Brissoni B, Valitutti S, Bron C, Tschopp J, Thome M (2002) CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **3**: 836-843
- Gaide O, Martinon F, Micheau O, Bonnet D, Thome M, Tschopp J (2001) Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **496**: 121-127
- Garrison JB, Samuel T, Reed JC (2009) TRAF2-binding BIR1 domain of c-IAP2/MALT1 fusion protein is essential for activation of NF-kappaB. *Oncogene* **28**: 1584-1593
- Geahlen RL (2009) Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1115-1127
- Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**: 837-848
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**: 6680-6684
- Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, Burtt NP, Guiducci C, Parkin M, Gates C, Plenge RM, Behrens TW, Wither JE, Rioux JD, Fortin PR, Graham DC, Wong AK, Vyse TJ, Daly MJ, Altshuler D, Moser KL, Gaffney PM (2008) Genetic variants

near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **40**: 1059-1061

Gringhuis SI, Wevers BA, Kaptein TM, van Capel TM, Theelen B, Boekhout T, de Jong EC, Geijtenbeek TB (2011) Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. *PLoS Pathog* **7**: e1001259

Gross O, Grupp C, Steinberg C, Zimmermann S, Strasser D, Hanneschager N, Reindl W, Jonsson H, Huo H, Littman DR, Peschel C, Yokoyama WM, Krug A, Ruland J (2008) Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF-kappaB and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* **112**: 2421-2428

Gyrd-Hansen M, Darding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, Xue W, Tenev T, da Fonseca PC, Zvelebil M, Bujnicki JM, Lowe S, Silke J, Meier P (2008) IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* **10**: 1309-1317

Hachmann J, Snipas SJ, van Raam BJ, Cancino EM, Houlihan EJ, Poreba M, Kasperkiewicz P, Drag M, Salvesen GS (2012) Mechanism and specificity of the human paracaspase MALT1. *Biochem J* **443**: 287-295

Hacker H, Karin M (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**: re13

Hailfinger S, Lenz G, Ngo V, Posvitz-Feifar A, Rebeaud F, Guzzardi M, Penas EM, Dierlamm J, Chan WC, Staudt LM, Thome M (2009a) Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19946-19951

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

Hailfinger S, Rebeaud F, Thome M (2009b) Adapter and enzymatic functions of proteases in T-cell activation. *Immunol Rev* **232**: 334-347

Hara H, Wada T, Bakal C, Kozieradzki I, Suzuki S, Suzuki N, Nghiem M, Griffiths EK, Krawczyk C, Bauer B, D'Acquisto F, Ghosh S, Yeh WC, Baier G, Rottapel R, Penninger JM (2003) The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* **18**: 763-775

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

Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* **25**: 6758-6780

Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Dang L, Munshi N, Richardson P, Schenkein D, Anderson KC (2006) MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **12**: 5887-5894

Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G (2006) Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**: 6706-6716

- Hosokawa Y, Suzuki H, Nakagawa M, Lee TH, Seto M (2005) API2-MALT1 fusion protein induces transcriptional activation of the API2 gene through NF-kappaB binding elements: evidence for a positive feed-back loop pathway resulting in unremitting NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 51-60
- Hu S, Du MQ, Park SM, Alcivar A, Qu L, Gupta S, Tang J, Baens M, Ye H, Lee TH, Marynen P, Riley JL, Yang X (2006) cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J Clin Invest* **116**: 174-181
- Hymowitz SG, Wertz IE (2010) A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **10**: 332-341
- Isaacson PG (2005) Update on MALT lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* **18**: 57-68
- Isaacson PG, Du MQ (2004) MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer* **4**: 644-653
- Iwai K (2012) Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation. *Trends Cell Biol* **22**: 355-364
- Iwata M, Ohoka Y, Kuwata T, Asada A (1996) Regulation of T cell apoptosis via T cell receptors and steroid receptors. *Stem Cells* **14**: 632-641
- Jiang T, Grabiner B, Zhu Y, Jiang C, Li H, You Y, Lang J, Hung MC, Lin X (2011) CARMA3 is crucial for EGFR-Induced activation of NF-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* **71**: 2183-2192
- Jo SH, Hong HK, Chong SH, Lee HS, Choe H (2009) H(1) antihistamine drug promethazine directly blocks hERG K(+) channel. *Pharmacol Res* **60**: 429-437
- Kataoka T, Tschoopp J (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* **24**: 2627-2636
- Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* **459**: 712-716
- Kawadler H, Gantz MA, Riley JL, Yang X (2008) The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation. *Mol Cell* **31**: 415-421
- Kennedy NJ, Kataoka T, Tschoopp J, Budd RC (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* **190**: 1891-1896
- Kim PW, Sun ZY, Blacklow SC, Wagner G, Eck MJ (2003) A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* **301**: 1725-1728
- King A, Mitchell PH, Sykes P (1957) Effects of pacatal on symptoms in chronic psychotic female in-patients. *Br Med J* **1**: 204-207
- Kingeter LM, Schaefer BC (2010) Malt1 and cIAP2-Malt1 as effectors of NF-kappaB activation: kissing cousins or distant relatives? *Cell Signal* **22**: 9-22

- Klemm S, Gutermuth J, Hultner L, Sparwasser T, Behrendt H, Peschel C, Mak TW, Jakob T, Ruland J (2006) The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* **203**: 337-347
- Klemm S, Zimmermann S, Peschel C, Mak TW, Ruland J (2007) Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 134-138
- Kloo B, Nagel D, Pfeifer M, Grau M, Duwel M, Vincendeau M, Dorken B, Lenz P, Lenz G, Krappmann D (2011) Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 272-277
- Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JD, Odenwaelder P, Wilkinson KD, Barford D (2009) Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **10**: 466-473
- Kongsamut S, Kang J, Chen XL, Roehr J, Rampe D (2002) A comparison of the receptor binding and HERG channel affinities for a series of antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol* **450**: 37-41
- Kovarik JM, Slade A (2010) Overview of sotрастaurin clinical pharmacokinetics. *Ther Drug Monit* **32**: 540-543
- Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**: 532-542
- Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K (2004) Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* **117**: 787-800
- Kuper-Hommel MJ, Schreuder MI, Gemmink AH, van Krieken JH (2013) T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes occurs in extranodal diffuse large B-cell lymphomas of the breast and testis. *Mod Pathol* **26**: 421-427
- Kuppers R (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* **9**: 15-27
- Kuzma-Richeret A, Saczko J, Choromanska A, Dumanska M, Drag-Zalesinska M, Wysocka T, Chwilowska A, Pola A, Mosiadz D, Marcinkowska A, Kulbacka J (2011) The influence of phenothiazine derivatives on doxorubicin treatment in sensitive and resistant human breast adenocarcinoma cells. *Folia Biol (Praha)* **57**: 261-267
- Lam E, Zhang Y (2012) Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends Plant Sci* **17**: 487-494
- Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**: 1073-1083
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM (2005) Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* **11**: 28-40
- Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, Chan JW, Rosenwald A, Gascoyne RD, Staudt LM (2008) Cooperative signaling through the signal transducer and

activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **111**: 3701-3713

Lamason RL, McCully RR, Lew SM, Pomerantz JL (2010) Oncogenic CARD11 mutations induce hyperactive signaling by disrupting autoinhibition by the PKC-responsive inhibitory domain. *Biochemistry* **49**: 8240-8250

Langel FD, Jain NA, Rossman JS, Kingeter LM, Kashyap AK, Schaefer BC (2008) Multiple protein domains mediate interaction between Bcl10 and MALT1. *J Biol Chem* **283**: 32419-32431

Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, Shim JH, Ghosh S (2005) PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF- κ B activation. *Science* **308**: 114-118

Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM (2008a) Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319**: 1676-1679

Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, Dave SS, Tan B, Zhao H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Smeland EB, Fisher RI, Kuehl WM, Chan WC, Staudt LM (2007) Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* **204**: 633-643

Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM (2008b) Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **359**: 2313-2323

Li S, Yang X, Shao J, Shen Y (2012) Structural insights into the assembly of CARMA1 and BCL10. *PLoS One* **7**: e42775

Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC (2004) Regulation of the NF- κ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* **279**: 26243-26250

Lin SC, Chung JY, Lamothe B, Rajashankar K, Lu M, Lo YC, Lam AY, Darnay BG, Wu H (2008) Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF- κ B inhibitor A20. *J Mol Biol* **376**: 526-540

Lisurek M, Rupp B, Wichard J, Neuenschwander M, von Kries JP, Frank R, Rademann J, Kuhne R (2010) Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Molecular diversity* **14**: 401-408

Litman GW, Rast JP, Fugmann SD (2010) The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **10**: 543-553

Liu H, Ruskon-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, Ye H, Molina T, Bouhnik Y, Hamoudi RA, Diss TC, Dogan A, Megraud F, Rambaud JC, Du MQ, Isaacson PG (2001) Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to Helicobacter pylori eradication therapy. *Lancet* **357**: 39-40

- Lomas JL (1957) Treatment of schizophrenia pacatal and chlorpromazine compared. *Br Med J* **2**: 78-80
- Lopes-Carvalho T, Kearney JF (2004) Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* **197**: 192-205
- Lucas PC, Kuffa P, Gu S, Kohrt D, Kim DS, Siu K, Jin X, Swenson J, McAllister-Lucas LM (2007) A dual role for the API2 moiety in API2-MALT1-dependent NF-kappaB activation: heterotypic oligomerization and TRAF2 recruitment. *Oncogene* **26**: 5643-5654
- Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G (2001) Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* **276**: 19012-19019
- Martin D, Galisteo R, Gutkind JS (2009) CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* **284**: 6038-6042
- Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, Chen Y, Lin X (2005) Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* **23**: 575-585
- McAllister-Lucas LM, Baens M, Lucas PC (2011) MALT1 protease: a new therapeutic target in B lymphoma and beyond? *Clin Cancer Res* **17**: 6623-6631
- McAllister-Lucas LM, Ruland J, Siu K, Jin X, Gu S, Kim DS, Kuffa P, Kohrt D, Mak TW, Nunez G, Lucas PC (2007) CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 139-144
- Misra RS, Russell JQ, Koenig A, Hinshaw-Makepeace JA, Wen R, Wang D, Huo H, Littman DR, Ferch U, Ruland J, Thome M, Budd RC (2007) Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF-kappaB adaptors during T cell activation. *J Biol Chem* **282**: 19365-19374
- Morgan JA, Yin Y, Borowsky AD, Kuo F, Nourmand N, Koontz JI, Reynolds C, Soreng L, Griffin CA, Graeme-Cook F, Harris NL, Weisenburger D, Pinkus GS, Fletcher JA, Sklar J (1999) Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res* **59**: 6205-6213
- Mori T, Sairenji T (2006) Functional role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on cell growth and lytic cycle of Epstein-Barr virus in the Burkitt's lymphoma cell line, P3HR-1. *Virus Genes* **32**: 327-334
- Naylor TL, Tang H, Ratsch BA, Enns A, Loo A, Chen L, Lenz P, Waters NJ, Schuler W, Dorken B, Yao YM, Warmuth M, Lenz G, Stegmeier F (2011) Protein kinase C inhibitor sotрастaurин selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res* **71**: 2643-2653
- Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM (2006) A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* **441**: 106-110

Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Brazil RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **470**: 115-119

Nieschulz O, Popendiker K, Sack KH (1954) [Pharmacological studies on N-alkyl-piperidyl-phenothiazine derivatives]. *Arzneimittelforschung* **4**: 232-242

Niu J, Shi Y, Iwai K, Wu ZH (2011) LUBAC regulates NF-kappaB activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. *Embo J* **30**: 3741-3753

Noels H, van Loo G, Hagens S, Broeckx V, Beyaert R, Marynen P, Baens M (2007) A Novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF-kappaB activation by API2middle dotMALT1 fusions. *J Biol Chem* **282**: 10180-10189

Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, Ferch U, Arslan SC, Ruland J, Scheidereit C, Krappmann D (2007) Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *Embo J* **26**: 4634-4645

Oh-hora M (2009) Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* **231**: 210-224

Pancer Z, Cooper MD (2006) The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **24**: 497-518

Park SG, Schulze-Luehrman J, Hayden MS, Hashimoto N, Ogawa W, Kasuga M, Ghosh S (2009) The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. *Nat Immunol* **10**: 158-166

Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabidan R, Dalla-Favera R (2011) Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* **43**: 830-837

Petrich AM, Leshchenko V, Kuo PY, Xia B, Thirukonda VK, Ulahannan N, Gordon S, Fazzari MJ, Ye BH, Sparano JA, Parekh S (2012) Akt inhibitors MK-2206 and nelfinavir overcome mTOR inhibitor resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **18**: 2534-2544

Pitcher LA, van Oers NS (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol* **24**: 554-560

Pop C, Salvesen GS (2009) Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**: 21777-21781

Qiu L, Dhe-Paganon S (2011) Oligomeric structure of the MALT1 tandem Ig-like domains. *PLoS One* **6**: e23220

Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Feijfar A, Tapernoux M, Moser R, Rueda D, Gaide O, Guzzardi M, Iancu EM, Rufer N, Fasel N, Thome M (2008) The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* **9**: 272-281

Rehman AO, Wang CY (2009) CXCL12/SDF-1 alpha activates NF-kappaB and promotes oral cancer invasion through the Carma3/Bcl10/Malt1 complex. *Int J Oral Sci* **1**: 105-118

Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Doring C, Tacci E, Klapper W, Moller P, Kuppers R, Hansmann ML, Siebert R, Brauninger A (2007) High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* **21**: 780-787

Rho SB, Kim BR, Kang S (2011) A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* **120**: 121-127

Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 405-413

Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, de Vos S, Laughlin M, Flynn PJ, Rowland K, Cruz JC, Goldberg SL, Musib L, Darstein C, Enas N, Kutok JL, Aster JC, Neuberg D, Savage KJ, LaCasce A, Thornton D, Slapak CA, Shipp MA (2007) Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **25**: 1741-1746

Rosebeck S, Madden L, Jin X, Gu S, Apel IJ, Appert A, Hamoudi RA, Noels H, Sagaert X, Van Loo P, Baens M, Du MQ, Lucas PC, McAllister-Lucas LM (2011) Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science* **331**: 468-472

Rosenwald A, Staudt LM (2003) Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **44 Suppl 3**: S41-47

Ruefli-Brasse AA, French DM, Dixit VM (2003) Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* **302**: 1581-1584

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

Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW (2003) Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity* **19**: 749-758

Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, Malig M, McNicol JD, Fiebig-Comyn A, Graham M, Levadoux-Martin M, Lee JB, Giacomelli AO, Hassell JA, Fischer-Russell D, Trus MR, Foley R, Leber B, Xenocostas A, Brown ED, Collins TJ, Bhatia M (2012) Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell* **149**: 1284-1297

Salvesen GS, Riedl SJ (2007) Caspase inhibition, specifically. *Structure* **15**: 513-514

Sarwer-Foner GJ, Koranyi EK (1957) The clinical investigation of pacatal in open psychiatric settings. *Can Med Assoc J* **77**: 450-459

Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RC, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL, Aster JC, Golub TR, Shipp MA (2003) The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**: 3871-3879

Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G, Klapper W, Vater I, Giefing M, Gesk S, Stanelle J, Siebert R, Kuppers R (2009) TNFAIP3

(A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* **206**: 981-989

Schwartz RH (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**: 305-334

Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* **261**: 717-719

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**: 1495-1499

Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM (2012) Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* **30**: 565-610

Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, Watarai H, Sakurai H, Kurosaki T (2005) PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med* **202**: 1423-1431

Shrestha A, Megeney LA (2012) The non-death role of metacaspase proteases. *Front Oncol* **2**: 78

Shvartsburd A, Nwokeafor V, Smith RC (1984) Red blood cell and plasma levels of thioridazine and mesoridazine in schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)* **82**: 55-61

Simpson RW (1957) The effects of pacatal on chronic mental illness. *J Ment Sci* **103**: 610-613

Skaug B, Chen J, Du F, He J, Ma A, Chen ZJ (2011) Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol Cell* **44**: 559-571

Skvara H, Dawid M, Kleyn E, Wolff B, Meingassner JG, Knight H, Dumortier T, Kopp T, Fallahi N, Stary G, Burkhardt C, Grenet O, Wagner J, Hijazi Y, Morris RE, McGeown C, Rordorf C, Griffiths CE, Stingl G, Jung T (2008) The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis. *J Clin Invest* **118**: 3151-3159

Snipas SJ, Wildfang E, Nazif T, Christensen L, Boatright KM, Bogyo M, Stennicke HR, Salvesen GS (2004) Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol Chem* **385**: 1093-1098

Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ (2005) Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity* **23**: 561-574

Staal J, Driege Y, Bekaert T, Demeyer A, Muylwaert D, Van Damme P, Gevaert K, Beyaert R (2011) T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. *Embo J* **30**: 1742-1752

Staudt LM (2010) Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000109

Staudt LM, Dave S (2005) The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* **87**: 163-208

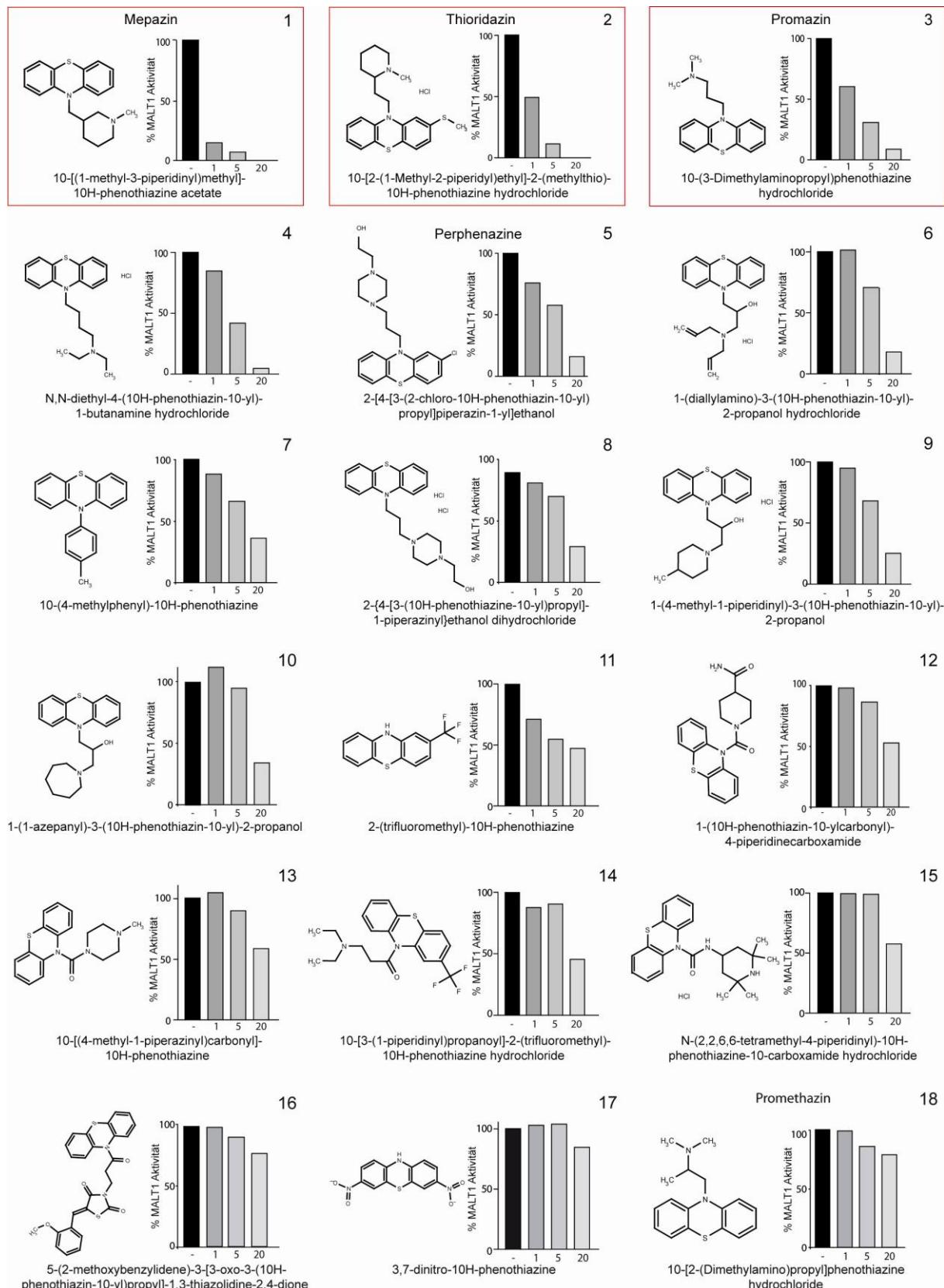
- Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, Raderer M, Chott A (2003) T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* **101**: 2335-2339
- Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, Salmena L, Hakem R, Straus S, Lenardo M (2005) Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* **307**: 1465-1468
- Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**: 289-301
- Takami Y, Nakagami H, Morishita R, Katsuya T, Hayashi H, Mori M, Koriyama H, Baba Y, Yasuda O, Rakugi H, Ogihara T, Kaneda Y (2008) Potential role of CYLD (Cylindromatosis) as a deubiquitinating enzyme in vascular cells. *Am J Pathol* **172**: 818-829
- Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S (2010) Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003004
- Thome M, Weil R (2007) Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10. *Trends Immunol* **28**: 281-288
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV (2011) Metacaspases. *Cell Death Differ* **18**: 1279-1288
- Tusche MW, Ward LA, Vu F, McCarthy D, Quintela-Fandino M, Ruland J, Gommerman JL, Mak TW (2009) Differential requirement of MALT1 for BAFF-induced outcomes in B cell subsets. *J Exp Med* **206**: 2671-2683
- Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, Moorji A, Atizado V, Al-Dayel F, Belgaumi A, El-Sohi H, Ezzat A, Bavi P, Al-Kuraya KS (2006) Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* **108**: 4178-4186
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (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**: 961-967
- Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**: 693-733
- Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**: 1364-1370
- van Soelingen D, Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D, Magis-Escurra C, Amaral L, van Ingen J, Boeree MJ (2010) The antipsychotic thioridazine shows promising therapeutic activity in a mouse model of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One* **5**
- Vercammen D, Declercq W, Vandenebeeck P, Van Breusegem F (2007) Are metacaspases caspases? *J Cell Biol* **179**: 375-380
- Vercammen D, van de Cotte B, De Jaeger G, Eeckhout D, Casteels P, Vandepoele K, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Inze D, Van Breusegem F (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem* **279**: 45329-45336

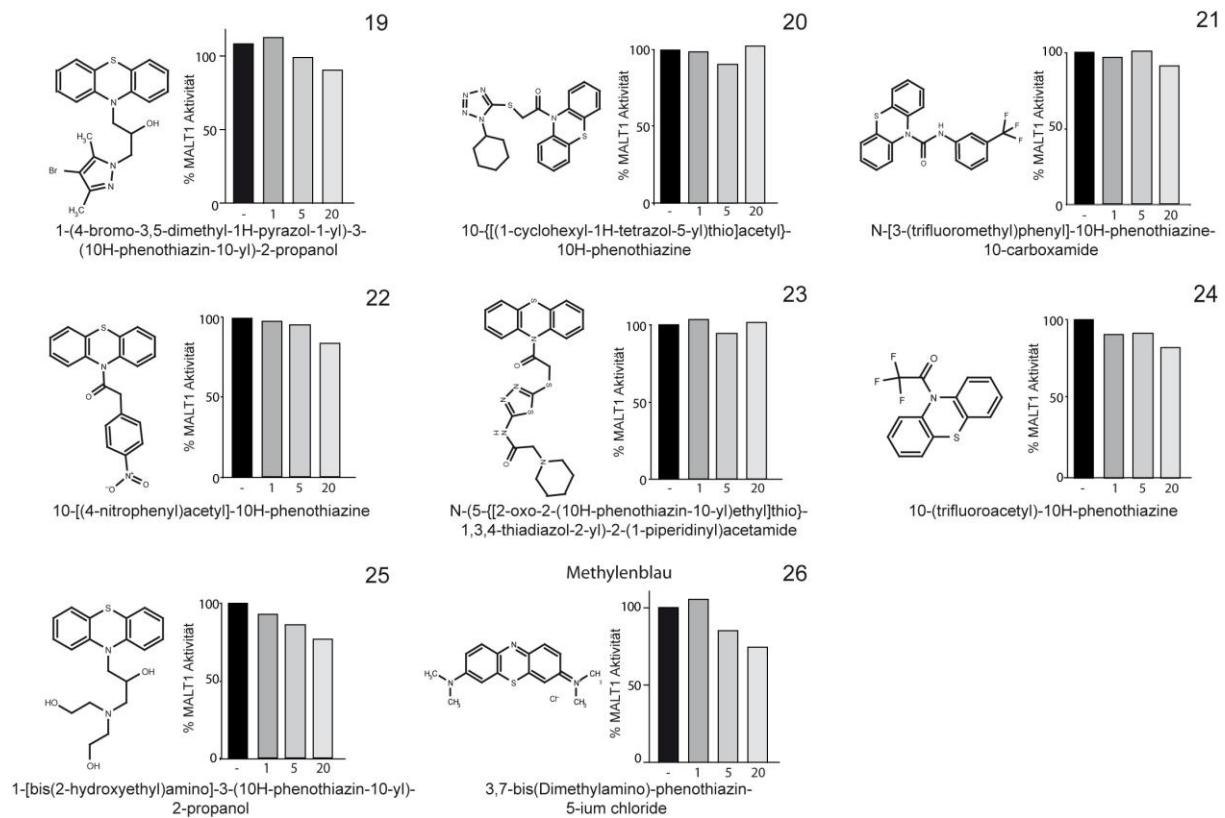
- Vicente-Duenas C, Fontan L, Gonzalez-Herrero I, Romero-Camarero I, Segura V, Aznar MA, Alonso-Escudero E, Campos-Sanchez E, Ruiz-Roca L, Barajas-Diego M, Sagardoy A, Martinez-Ferrandis JI, Abollo-Jimenez F, Bertolo C, Penuelas I, Garcia-Criado FJ, Garcia-Cenador MB, Tousseyn T, Agirre X, Prosper F, Garcia-Bragado F, McPhail ED, Lossos IS, Du MQ, Flores T, Hernandez-Rivas JM, Gonzalez M, Salar A, Bellosillo B, Conde E, Siebert R, Sagaert X, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I, Martinez-Climent JA (2012) Expression of MALT1 oncogene in hematopoietic stem/progenitor cells recapitulates the pathogenesis of human lymphoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 10534-10539
- Wang D, Matsumoto R, You Y, Che T, Lin XY, Gaffen SL, Lin X (2004) CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol* **24**: 164-171
- Weil R, Israel A (2004) T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **16**: 374-381
- Weisman JL, Liou AP, Shelat AA, Cohen FE, Guy RK, DeRisi JL (2006) Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem Biol Drug Des* **67**: 409-416
- Whittier JR, Klein DF, Levine G, Weiss D (1960) Mepazine (pacatal): clinical trial with placebo control and psychological study. *Psychopharmacologia* **1**: 280-287
- Wiesmann C, Leder L, Blank J, Bernardi A, Melkko S, Decock A, D'Arcy A, Villard F, Erbel P, Hughes N, Freuler F, Nikolay R, Alves J, Bornancin F, Renatus M (2012) Structural Determinants of MALT1 Protease Activity. *J Mol Biol*
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ (1999) Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* **96**: 35-45
- Wittekindt OH, Schmitz A, Lehmann-Horn F, Hansel W, Grissmer S (2006) The human Ca²⁺-activated K⁺ channel, IK, can be blocked by the tricyclic antihistamine promethazine. *Neuropharmacology* **50**: 458-467
- Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**: 8957-8961
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* **342**: 575-577
- Wright A, Reiley WW, Chang M, Jin W, Lee AJ, Zhang M, Sun SC (2007) Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev Cell* **13**: 705-716
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM (2003) A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9991-9996
- Wu CJ, Ashwell JD (2008) NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3023-3028

- Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD (2006) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* **8**: 398-406
- Xiao G, Rabson AB, Young W, Qing G, Qu Z (2006) Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 281-293
- Xue L, Morris SW, Orihuela C, Tuomanen E, Cui X, Wen R, Wang D (2003) Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells. *Nat Immunol* **4**: 857-865
- Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC, Ceribelli M, Zhang M, Wright G, Xiao W, Powell J, Platig J, Kohlhammer H, Young RM, Zhao H, Xu W, Buggy JJ, Balasubramanian S, Mathews LA, Shinn P, Guha R, Ferrer M, Thomas C, Waldmann TA, Staudt LM (2012) Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **21**: 723-737
- Ye RD (2001) Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J Leukoc Biol* **70**: 839-848
- Yu JW, Jeffrey PD, Ha JY, Yang X, Shi Y (2011) Crystal structure of the mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1 (MALT1) paracaspase region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 21004-21009
- Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G (2008) Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**: 1371-1378
- Zech T, Ejsing CS, Gaus K, de Wet B, Shevchenko A, Simons K, Harder T (2009) Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *Embo J* **28**: 466-476
- Zhang N, He YW (2005) An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med* **202**: 395-404
- Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B, Morris SW (1999) Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* **22**: 63-68
- Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, Hadjimitova V, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y (2004) Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**: 267-275
- Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Cavalli F (2000) The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* **96**: 410-419

8 Anhang

8.1 Chemische Strukturen der getesteten PD





Publikationen

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

Kloo B, **Nagel D**, Pfeifer M, Grau M, Duwel M, Vincendeau M, Dorken B, Lenz P, Lenz G, Krappmann D (2011) Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 272-277

Hadian K, Griesbach RA, Dornauer S, Wanger TM, **Nagel D**, Metlitzky M, Beisker W, Schmidt-Suprian M, Krappmann D (2011) NF-kappaB essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **286**: 26107-26117

In Vorbereitung:

Schlauderer F., **Nagel D.**, Lammens K., Krappmann D., Hopfner K.P.: Structure of MALT1 bound to Thioridazine reveals two-step activation mechanism of the paracaspase. *Angewandte Chemie*.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und die Betreuung danke ich meinem Doktorvater Daniel Krappmann. Auch den Mitgliedern des Prüfungskomitees ein herzliches Dankeschön.

Ein weiterer Dank geht an die Kooperationspartner, die einen wichtigen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Toxikologie und Pharmakologie bin ich sehr dankbar für die wissenschaftlichen Gespräche, die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich stets unterstützt und mir durch ihren Zuspruch viel Kraft gegeben hat. Vielen Dank an meine lieben Eltern, die für mich immer ein offenes Ohr hatten. Und nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an meine Tanja, die so viele Abende und Wochenenden verständnisvoll auf mich verzichten musste und mir unsere Tochter schenkte, die mir Tag für Tag zeigt, auf was es im Leben ankommt.

Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ~~dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach
und in den Nebenfächern
bei der Fakultät für der
(Hochschule/Universität)
unterzogen habe.~~
- ~~dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.~~

München, den..... .

(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen