

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Interferenz mit dem Argininstoffwechsel als neue Therapiestrategie beim Multiplen Myelom

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Björn Jacobi
aus Fulda

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

10. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | V |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| 1. Einleitung/Ziel der Dissertation | 1 |
| 2. Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1. Das Multiple Myelom | 3 |
| 2.2. Proteinfehlfaltung und Kompensationsmechanismen in Myelomzellen..... | 4 |
| 2.3. Der Argininstoffwechsel als therapeutisches Ziel bei Tumorerkrankungen..... | 9 |
| 2.4. L-Canavanin – ein natürliches Arginin-Analogon | 12 |
| 3. Material und Methoden | 15 |
| 3.1. Material | 15 |
| 3.1.1. <i>Allgemeine Substanzen</i> | 15 |
| 3.1.2. <i>Allgemeine Materialien</i> | 16 |
| 3.1.3. <i>Geräte</i> | 17 |
| 3.1.4. <i>Puffer und Lösungen</i> | 18 |
| 3.1.5. <i>SDS-Proteingele</i> | 19 |
| 3.1.6. <i>Medien für Zellkulturen</i> | 20 |
| 3.1.7. <i>Kulturzelllinien</i> | 21 |
| 3.1.8. <i>Kits</i> | 21 |
| 3.1.9. <i>Inhibitoren</i> | 21 |
| 3.1.10. <i>Antikörper</i> | 22 |
| 3.2. Methoden..... | 23 |
| 3.2.1. <i>Passagierung von Kulturzelllinien</i> | 23 |
| 3.2.2. <i>Kryokonservierung von Kulturzelllinien</i> | 23 |
| 3.2.3. <i>Behandlung der Zelllinien unter differierenden Aminosäurekonzentrationen</i> | 24 |
| 3.2.4. <i>Herstellung und Lagerung von Proteinlysaten</i> | 24 |
| 3.2.5. <i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i> | 25 |
| 3.2.6. <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> | 25 |
| 3.2.7. <i>Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)</i> | 25 |
| 3.2.8. <i>Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen</i> | 26 |
| 3.2.9. <i>MTS-Proliferationsassay</i> | 26 |
| 3.2.10. <i>Durchflusszytometrie (FACS)</i> | 27 |
| 3.2.11. <i>NOD/SCID-γ_c^{null} (NSG) Xenograft Mausmodell</i> | 28 |
| 3.2.12. <i>Explantation und Verarbeitung von ex-vivo Tumorgewebe</i> | 30 |
| 3.2.13. <i>Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen aus Mäuseplasma</i> | 30 |
| 3.2.14. <i>Histologie & Immunhistochemie (IHC)</i> | 30 |
| 3.2.15. <i>Verwendete Software</i> | 31 |
| 3.2.16. <i>Statistik</i> | 31 |
| 4. Ergebnisse | 33 |
| 4.1. In-vitro-Untersuchungen zur Arginindepletion im Multiplen Myelom | 33 |
| 4.1.1. <i>MTS-Assay</i> | 33 |
| 4.1.2. <i>Viabilitätstestungen</i> | 34 |
| 4.1.3. <i>Expression von ASS1 im Multiplen Myelom</i> | 37 |
| 4.1.4. <i>Argininauxotrophie von Myelomzellen</i> | 39 |
| 4.1.5. <i>UPR-Induktion durch Argininmangel</i> | 41 |
| 4.2. <i>Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in vivo</i> | 43 |
| 4.3. <i>Effekte von ADI-PEG 20 auf Arginin- und Citrullinplasmaspiegel in vivo</i> | 46 |
| 4.4. <i>Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin in vivo</i> | 47 |
| 4.4.1. <i>Pharmakokinetik von Canavanin in vivo</i> | 47 |
| 4.4.2. <i>Überlebensdaten</i> | 48 |
| 4.4.3. <i>Induktion von Apoptose in Ex-vivo-Tumoren</i> | 49 |

| | | |
|-----------|---|-------------|
| 4.4.4. | <i>De-novo-Expression von ASS1 und Sensitivität gegenüber erneuter Canavanin-Exposition ex vivo</i> | 50 |
| 4.4.5. | <i>Arginin- und Canavaninspiegel im Tumorgewebe</i> | 53 |
| 4.4.6. | <i>Induktion von Autophagie</i> | 54 |
| 5. | Diskussion | 56 |
| 5.1. | Arginin-Abhängigkeit des Multiplen Myeloms | 57 |
| 5.2. | Kombination von Argininmangel und Bortezomib | 58 |
| 5.3. | Induktion von Proteinstress durch Argininmangel | 59 |
| 5.4. | NOD/SCID- γ_c^{null} (NSG) Xenograft Myelommodell | 61 |
| 5.4.1. | <i>Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in vivo</i> | 61 |
| 5.4.2. | <i>Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin in vivo</i> | 62 |
| 5.5. | Tumorselektivität | 67 |
| 5.6. | Ausblick | 69 |
| 6. | Zusammenfassung | 72 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 73 |
| | Danksagung | VII |
| | Tabellarischer Lebenslauf | VIII |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ADI-PEG 20 | Pegylierte Arginindeiminase (20 kDa) |
| AG | Arbeitsgruppe |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASS1 | Argininosuccinat-Synthetase 1 |
| Borax | Dinatriumtetraborat-decahydrat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| d | Tag/e |
| DAB | 3'3'-Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERAD | ER-assoziierte Proteindegradation |
| FACS | <i>engl.</i> fluorescence-activated cell scanning |
| FELASA | <i>engl.</i> Federation of European Laboratory Animal Science Associations |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| h | Stunde/n |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HR | Hazard Ratio |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| IAP | Inhibitoren von Apoptoseproteinen |
| IHC | Immunhistochemie |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.t. | intratumoral |
| i.v. | intravenös |
| Kap. | Kapitel |
| KG | Körpergewicht |
| LC3 | <i>engl.</i> Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 |
| min | Minute/n |
| MTS | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form) |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form) |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| Nr | Nummer |
| NSG | NOD/SCID γ_c^{null} (experimentelles Mausmodell) |
| OD | Optische Dichte |
| o.g. | oben genannt/e/r |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCL | Plasmazelleukämie |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PE | Phycoerythrin |

| | |
|-------|---|
| PECA | Plattenepithelkarzinom |
| PFS | engl. progression-free survival |
| PI | Propidiumiodid |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PS | Phosphatidylserin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RIDD | engl. regulated IRE1 dependent decay |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| s. | siehe |
| s.c. | subcutan |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sog. | so genannt/e/r |
| TBS | engl. Tris-buffered saline |
| TBST | engl. Tris-buffered saline with Tween20 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| UPR | Unfolded Protein Response |
| UPS | Ubiquitin-Proteasom-System |
| Xbp1 | X-Box-Bindungsprotein 1 |
| z.B. | zum Beispiel |

Tabellenverzeichnis

| Nr. | Titel | Seite |
|------------|--|--------------|
| 1 | Verwendete allgemeine Substanzen | 15 |
| 2 | Verwendete Materialien | 16 |
| 3 | Verwendete Geräte | 17 |
| 4 | Bestandteile verwendeter SDS-Gele | 20 |
| 5 | Verwendete Zelllinien | 21 |
| 6 | Verwendete Inhibitoren | 21 |
| 7 | Verwendete Antikörper in Western Blots | 22 |
| 8 | Verwendete FACS-Antikörper | 22 |
| 9 | Verwende IHC-Antikörper | 22 |

Abbildungsverzeichnis

| Nr. | Titel | Seite |
|-----|---|-------|
| 1 | Übersicht der UPR | 6 |
| 2 | Übersicht der (Makro-)Autophagie | 8 |
| 3 | Darstellung des Argininstoffwechsels im menschlichen Organismus sowie seiner Auswirkungen auf die Tumorbiologie | 11 |
| 4 | Darstellung der proteinogenen Aminosäure L-Arginin und seines natürlichen δ -Oxo-Strukturanalogons L-Canavanin | 13 |
| 5 | Proliferationsassay (MTS) verschiedener Myelomzelllinien | 34 |
| 6 | Untersuchung der Zellviabilität unter simultaner Arginindepletion und Proteasomeninhibition | 36 |
| 7 | Zellviabilität verschiedener Myelomzelllinien nach Behandlung mit Bortezomib unter prolongiertem Argininmangel | 37 |
| 8 | Expression des ASS1 Proteins in verschiedenen Myelomzelllinien | 38 |
| 9 | Einfluss der Verfügbarkeit von Arginin auf die Expression des ASS1 Proteins in verschiedenen Myelomzelllinien | 39 |
| 10 | Nachweis der Argininauxotrophie von Myelomzelllinien | 41 |
| 11 | UPR-Induktion durch Argininmangel in Myelomzellen | 43 |
| 12 | Nachweis von Xbp1-Splicing mittels durchflusszytometrischer Untersuchung | 44 |
| 13 | Entwicklung der Tumorgrößen von U266-Xenografts in NSG Mäusen unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib | 46 |
| 14 | Gesamtüberleben von NSG Mäusen unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib | 47 |
| 15 | Western Blot von Ex-vivo-Tumoren nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib | 48 |
| 16 | Bestimmung der Plasmaspiegel von Arginin und Citrullin in NSG Mäusen mittels HPLC | 49 |
| 17 | Bestimmung der Plasmaspiegel von Arginin und Canavanin in NSG Mäusen mittels HPLC | 50 |
| 18 | Überlebenskurven von NSG Mäusen unter Kombinationstherapie von ADI-PEG 20 und Canavanin | 51 |
| 19 | Immunhistochemische Analyse der Apoptoseinduktion in Myelom-Xenograft-Tumoren unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin | 19 |
| 20 | Größenprogress der Xenograft-Tumoren unter Behandlung mit ADI-PEG 20 und Canavanin | 53 |
| 21 | ASS1-Expression in explantierten Xenograft-Tumoren nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin | 54 |
| 22 | Erhalt der Arginin-Auxotrophie in Ex-vivo-Myelomzellen nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin | 55 |
| 23 | Messungen von Arginin- und Canavaninkonzentrationen aus Tumorgewebe mittels HPLC | 56 |
| 24 | Zunahme der Expression von LC3-II unter Kombinationstherapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin als Hinweis auf eine Autophagie-Induktion | 57 |
| 25 | Schematische Darstellung einer tumorzellspezifischen Arginindepletion beim Multiplen Myelom als neue metabolische Therapiestrategie | 71 |

1. Einleitung/Ziel der Dissertation

Das Multiple Myelom zählt mit ca. 6500 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland zu den häufigsten bösartigen hämatologischen Erkrankungen des Menschen. Diese Tumorart ist gekennzeichnet durch eine Proliferation von entarteten Plasmazellen im blutbildenden Knochenmark, das insbesondere im Stammskelett des Menschen lokalisiert ist. Die Interaktion der Myelomzellen mit Stromazellen sowie Osteoblasten und Osteoklasten führt zur Entwicklung einer ausgeprägten Knochenbrüchigkeit, sog. Osteolysen und schließlich pathologischen Knochenfrakturen. Neben dieser häufig schmerzhaften Affektion der Knochenstabilität stellen die begleitende Anämie, Hypercalcämie und Niereninsuffizienz typische Endorganschäden der Myelomerkrankung dar. Plasmazellen dienen als letzte Entwicklungsstufe der B-Lymphozyten beim Menschen normalerweise der Produktion von Antikörpern (Immunglobuline), einem wichtigen Bestandteil der humoralen Immunantwort. Im Falle einer monoklonalen Plasmazellerkrankung kommt es zur Ausbildung einer sog. monoklonalen Gammopathie, also einem Zustand, bei dem große Mengen identischer Immunglobuline gebildet und ins Blut abgegeben werden. Insbesondere die leichten Ketten der Immunglobuline können dann in den Nierentubuli zu Proteinaggregaten ausfallen und zu dem klinischen Bild eines Nierenversagens führen. Im Rahmen einer AL-Amyloidose oder anderer Ablagerungskrankheiten können auch weitere Organsysteme wie Herz, Nervensystem oder Leber von toxischen Eiweißablagerungen (sog. Amyloid) betroffen sein. Aufgrund der beschriebenen Krankheitsprozesse ist das Multiple Myelom eine schwerwiegende Erkrankung, die häufig erst nach Eintritt einer Endorganschädigung diagnostiziert wird. Trotz wesentlicher Fortschritte bei der Therapie der Erkrankung seit der letzten Jahrtausendwende gilt das Multiple Myelom immer noch als unheilbare Krebserkrankung. Die mittlere Lebenserwartung beträgt bei jüngeren Patienten (<65-70 Jahre) heute zwar mehr als 5 Jahre, allerdings tritt die Erkrankung in höherem Lebensalter immer häufiger auf. Ein Großteil der Patienten ist daher nicht mehr mit intensiven Therapieregimen wie z.B. einer autologen Stammzelltransplantation behandelbar, sodass sich ihre Prognose deutlich eingeschränkter darstellt. Gerade für dieses Patientenkollektiv sowie jüngere Patienten mit refraktärer Myelomerkrankung oder genetischem Hochrisikoprofil werden neue Therapieansätze daher dringend benötigt.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit vielen Jahren mit dem Stoffwechsel der proteinogenen Aminosäure L-Arginin in hämatopoetischen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass ein künstlich herbeigeführter Argininmangel zur Induktion von Proteinstress in humanen T-Zellen führt. Myelomzellen sind aufgrund ihrer übersteigerten Immunglobulin-Produktion bereits unter normalen Bedingungen einem erhöhten Maß an intrazellulärem Proteinstress ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Myelomzellen durch eine übermäßige Induktion

von Proteinstress abgetötet werden können, da in diesem Fall die zelleigenen Protein-Entsorgungsmechanismen überfordert sind. Zu diesen Mechanismen zählen zytoplasmatische Multiproteinkomplexe (Proteasomen), der Abbau fehlgefalteter Proteine in Lysosomen (Autophagie) sowie biochemische Anpassungsprogramme (Unfolded Protein Response, UPR).

Im Rahmen dieser Arbeit soll geprüft werden, inwiefern die Depletion der Aminosäure Arginin zur Therapie des Multiplen Myeloms geeignet ist. Hierzu soll mittels In-vitro-Versuchen getestet werden, ob Myelomzellen in Abwesenheit von Arginin überlebens- bzw. proliferationsfähig sind. Im Rahmen eines neu an der Universitätsmedizin Mainz zu etablierenden Myelom-Mausmodells sollen Strategien der Arginindepletion schließlich ersten In-vivo-Testungen unterzogen werden. Hierzu steht unserem Labor das rekombinante Enzym ADI-PEG 20 (Polaris Pharmaceuticals) zur Verfügung, eine Arginin-Deiminase, die Arginin effektiv in Ammoniak und Citrullin spaltet. Zahlreiche Tumorentitäten können Citrullin aufgrund der fehlenden Expression des Enzyms Argininosuccinat-Synthetase (ASS1) nicht zu Arginin umwandeln, sodass sie auf extrazellulär verfügbares Arginin angewiesen sind (Argininauxotrophie). Im Gegensatz hierzu sind die meisten gesunden Körpergewebe durch eine Expression von ASS1 vor den Wirkungen von ADI-PEG 20 geschützt. In dieser Arbeit soll mittels biochemischer Assays überprüft werden, ob es sich auch beim Multiplen Myelom um eine argininauxotrophe Tumorentität handelt. Aus präklinischen und klinischen Studien mit ADI-PEG 20 in argininauxotrophen Tumoren wie dem hepatozellulären Karzinom ist bekannt, dass eine alleinige Arginindepletion zwar zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt, jedoch tiefe Remissionen meist nicht erreicht werden. Falls die Arginindepletion in Myelomzellen zur Hyperinduktion von Proteinstress führt, könnte eine Kombination mit Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib zu einer signifikanten Steigerung der zytotoxischen Effekte einer Argininverarmung führen. Bortezomib ist seit 2004 zur Behandlung des Multiplen Myeloms in Deutschland zugelassen und stellt nach wie vor das Rückgrat zahlreicher Kombinationsregime in der klinischen Anwendung dar. Als weiterer hochinteressanter Kombinationspartner von ADI-PEG 20 sollte sich im Laufe dieser Arbeit aus parallelen In-vitro-Versuchen unserer Arbeitsgruppe L-Canavanin herausstellen. Canavanin ist eine natürlich vorkommende Aminosäure, die Leguminosen als Fraßschutz vor Tieren dient. Da die humane Arginyl-tRNA nicht zwischen Arginin und seinem Strukturanalogon Canavanin unterscheiden kann, wird unter Argininmangel Canavanin anstelle von Arginin in neu synthetisierte Peptidketten eingebaut. Dies führt aufgrund der physikochemischen Unterschiede zwischen Canavanin und Arginin zu einer massiven Proteinfehlfaltung mit konsekutivem Zelltod. In abschließenden Mausexperimenten soll daher überprüft werden, inwieweit sich Canavanin in vivo zu einer Steigerung der zytotoxischen Wirkung von ADI-PEG 20 beim Multiplen Myelom einsetzen lässt.

2. Literaturdiskussion

2.1. Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom stellt eine der häufigsten bösartigen hämatologischen Erkrankungen in der westlichen Welt dar (1). An dieser Entartung der sog. Plasmazellen erkranken in Deutschland jährlich ca. 6500 Menschen (2). Nach aktueller WHO-Klassifikation von 2016 zählt das Multiple Myelom zu den reifzelligen B-Zell-Neoplasien, da Plasmazellen die finale Reifungsstufe der B-Zell-Entwicklung darstellen (3). Plasmazell Dyskrasien sind durch eine gesteigerte Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark, selten auch in Form von extramedullären Tumoren, gekennzeichnet. Das Multiple Myelom basiert auf genetischen Veränderungen wie Gentranslokationen sowie -mutationen, epigenetischen Veränderungen und Dysregulation von mikro-RNA in Plasmazellen bzw. Post-Keimzentrums-B-Zellen (4). In der Folge entsteht zunächst ein maligner Plasmazellklon, der durch die Prozesse der klonalen Evolution i.d.R. mehrere unabhängige Subklone entwickelt (5). Da Plasmazellen die Produktionsstätte von hochvariablen Antikörper-Molekülen darstellen, kommt es bei der Entstehung von monoklonalen Plasmazell Dyskrasien zur Bildung großer Mengen monoklonaler Immunglobuline. Dieser Zustand wird entsprechend des Laufverhaltens von Immunglobulinen in der Serumelektrophorese als monoklonale Gammopathie bezeichnet. Zur Diagnose eines Multiplen Myeloms muss der Nachweis einer monoklonalen Gammopathie bzw. eines monoklonalen Plasmazellklons im Knochenmark sowie bestimmter klinischer Kriterien (sog. CRAB-Kriterien, zuletzt erweitert um die sog. „SLiM-CRAB- oder MDE-Kriterien“) erbracht sein (6). Diese Kriterien basieren auf den biologischen Folgen der Plasmazellaktivität.

Die ungezügelte Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark führt zu einer gesteigerten Aktivität von Osteoklasten und verminderten Aktivität von Osteoblasten (7). Hierdurch kommt es zu charakteristischen Osteolysen, pathologischen Knochenfrakturen mit ausgeprägten Schmerzzuständen und einer Hypercalcämie. Eine Verdrängung der gesunden Hämatopoese im Knochenmark führt häufig zu Anämie und seltener zu Thrombozytopenie. Durch die Produktion großer Mengen monoklonaler Immunglobuline („Paraproteine“) bzw. deren leichten Ketten können weitere Organsysteme geschädigt werden. So kann die Ausfällung von Leichtketten in den proximalen Tubuli der Niere zu einem akuten Nierenversagen (Cast-Nephropathie), die Ablagerung von Paraproteinen in peripheren Nerven zu dem Bild einer Polyneuropathie führen. Seltener Folgen monoklonaler Gammopathien sind die Ablagerung fehlgefalteter Leichtketten in anderen Organen, z.B. im Rahmen der sog. AL-Amyloidose, welche Herzinsuffizienz, nephrotisches Syndrom, Leberversagen und schwere Störungen der

Verdauungsfunktionen nach sich ziehen kann. Zudem kann die eingeschränkte Diversität von Antikörpermolekülen zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit führen („Immunoparese“).

Durch diese Komplikationen beträgt die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten mit Multiplem Myelom je nach zytogenetischem Risikoprofil weiterhin lediglich 40 – 65 % bei häufig deutlich eingeschränkter Lebensqualität (8, 9). Zur Behandlung werden derzeit Proteasomeninhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib), Immunmodulatoren („Imids“, Lenalidomid, Pomalidomid) in Kombination mit Dexamethason sowie klassischen Chemotherapeutika (z.B. Melphalan, Cyclophosphamid, Doxorubicin) eingesetzt. Bei jüngeren (<65–70 Jahre) bzw. biologisch „fitten“ Patienten stellt die autologe Stammzelltransplantation aufgrund langer Remissionszeiträume weiterhin als integraler Bestandteil der Erstlinientherapie den Goldstandard dar, ist jedoch u.a. aufgrund einer Neutropeniephase von ca. 14 Tagen mit nicht unerheblichen potentiellen Komplikationen behaftet. Die allogene Stammzelltransplantation wird aufgrund der im Vergleich zu anderen hämatologischen Neoplasien geringeren Effektivität und höheren Komplikationsrate beim Multiplen Myelom bisher nur in begründeten Einzelfällen oder im Rahmen von klinischen Studien empfohlen (10). Vielversprechend verläuft seit 2016 die Einführung monoklonaler Antikörper wie Elotuzumab (Anti-SLAMF7) und Daratumumab (Anti-CD38), die insbesondere in Kombination mit „Imids“ bzw. Proteasomeninhibitoren hohe Ansprechraten bei Patienten mit rezidiviertem bzw. refraktärem Multiplen Myelom aufweisen. Allerdings führen auch moderne Kombinationstherapien in der Rezidivsituation i.d.R. zu einer mittleren progressionsfreien Überlebenszeit (*engl. progression-free survival, PFS*) von weniger als zwei Jahren (11-14). Trotz Einführung dieser neuen Therapeutika besteht daher weiterhin ein großer Bedarf an der Entwicklung neuer und zielgerichteter Therapiestrategien. Diese sollten sich im Wirkmechanismus möglichst von den o.g. Substanzen unterscheiden, um hocheffektive und gleichermaßen verträgliche Kombinationsstrategien zu ermöglichen.

2.2. Proteinfehlfaltung und Kompensationsmechanismen in Myelomzellen

Myelomzellen zeichnen sich durch ihre enorm gesteigerte Immunglobulinsynthese aus (15). Aufgrund von Fehlern, die bei der Proteinsynthese und -faltung entstehen, kommt es daher in Myelomzellen zu einem besonders ausgeprägten Proteinstress mit Anreicherung polyubiquitinerter Proteine. Myelomzellen sind daher von Kompensationsmechanismen abhängig, die den Proteinstress im Zellinneren reduzieren. Hierzu zählen insbesondere der Ubiquitin-Proteasom-Weg (UPS), die Unfolded Protein Response (UPR) sowie die Autophagie bzw. das Aggresomen-System (16, 17). Alle drei Mechanismen führen auf unterschiedlichem Weg zu einer Verminderung der Anzahl fehlgefalteter Proteine und dienen in erster Linie dem

Überleben der Tumorzelle. Sie stellen daher interessante Angriffspunkte für zielgerichtete Myelomtherapien dar. Die Ubiquitinierung dient hierbei der Markierung gealterter oder fehlgefalteter Proteine zum intrazellulären Abbau mittels UPS oder Autophagie. Sie wird durch die gemeinsame Aktion dreier Enzyme bewerkstelligt: einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-transferierenden Enzym (E2) und einer Ubiquitin-Ligase (E3), die Ubiquitin auf Lysin-Reste des Substrates überträgt (18). Es sind inzwischen mehr als 800 E3-Ligasen bekannt und über 1000 verschiedene Proteine sind in den Prozess der Ubiquitinierung involviert (19). Darüber hinaus wird analog zum genetischen Code von einem „Ubiquitin Code“ gesprochen, da die Bindungstypen und Längen der Ubiquitinketten das weitere Schicksal eines markierten Proteins wesentlich beeinflussen (18).

Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib, Carfilzomib oder Ixazomib sind bereits klinisch etabliert und führen über eine Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität der katalytischen Untereinheit des 26S-Proteasoms zu einem reduzierten Abbau fehlgefalteter ubiquitiniertes Proteine (16). Im Falle von (entarteten) Plasmazellen stellen diese insbesondere die Immunglobuline und Leichtketten des exozytotischen Pfades dar, die im ER anfallen. Sie werden normalerweise ins Zytosol exportiert und dort proteasomal abgebaut, ein Prozess, der als ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) bezeichnet wird (20). Wird dieser Prozess gehemmt, steigt die Menge ungefalteter Proteine im ER auf ein kritisches Maß an (21). Bereits unter Normalbedingungen sind Myelomzellen in besonderem Maße von einer Anpassungsreaktion des ER, der sog. UPR, abhängig, da sie zunächst das Zellüberleben sicherstellt. Dies wird u.a. durch eine verminderte Translation neuer Proteine, Expansion des ER, Steigerung der proteasomalen Aktivität sowie Induktion von Chaperonen gewährleistet (adaptive Antwort) (22). Ist der proteotoxische Stress des ER jedoch zu groß oder dauert zu lange an, wird eine übermäßige Steigerung der UPR induziert, die zur Apoptose der Zelle führt („terminale UPR“) (21, 23). Bei der Regulation der UPR sind drei wesentliche Signaltransduktionskaskaden verantwortlich, die durch die drei „Stress-Sensoren“ IRE1, PERK und ATF6 in der ER-Membran vermittelt werden (Abbildung 1).

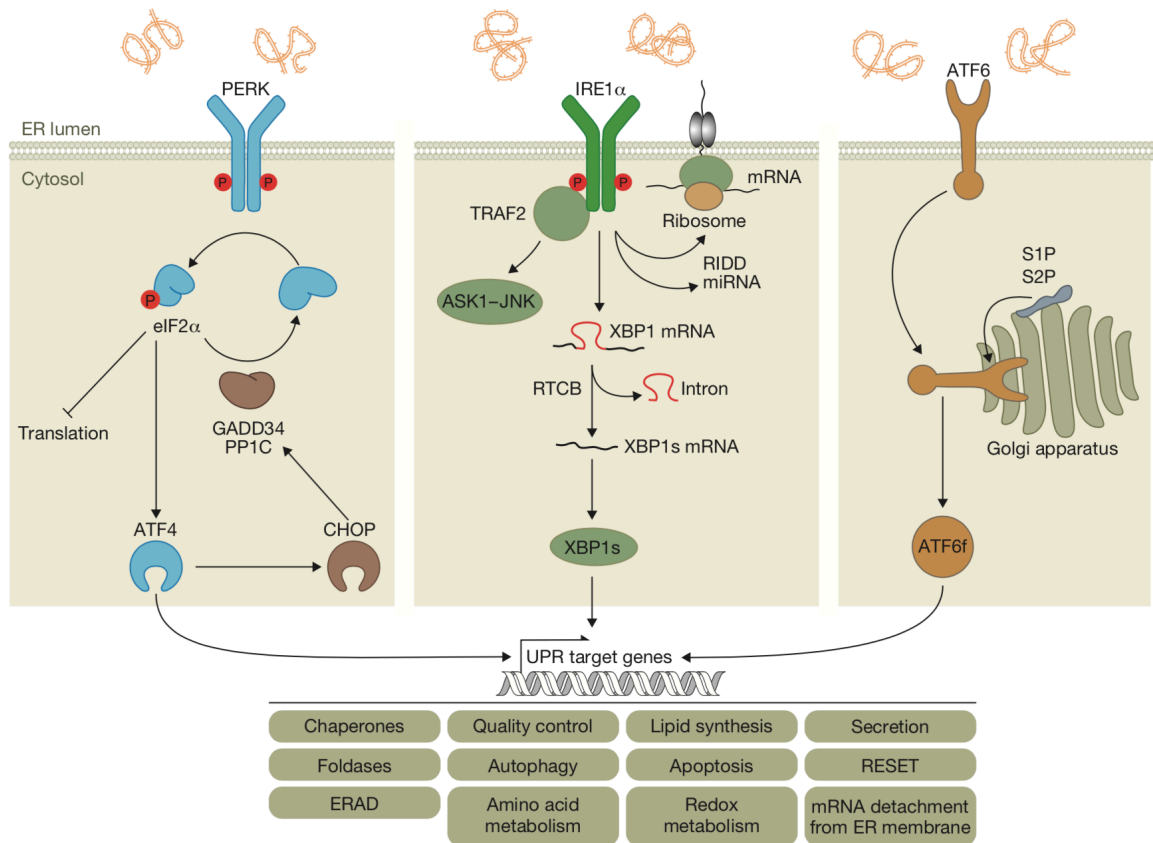


Abbildung 1: Übersicht der UPR. Die drei Pfade der UPR gehen von den "Stress-Sensoren" IRE1, PERK und ATF6 aus, die in der ER-Membran verankert sind und durch die Fehlfaltung luminaler Proteine aktiviert werden. Durch diverse zelluläre Reaktionen soll die Proteinhomeostase aufrechterhalten werden, bei übersteigter Antwort ("terminale UPR") kommt es zur Apoptose. Abbildung aus (24).

Fallen fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen an, führt dies über eine Dissoziation des Chaperons Bip (GRP78) von den luminalen Domänen der Stress-Sensoren zu einer Auto-Transphosphorylierung von IRE1 und PERK sowie der Freilegung eines ER-Exportmotivs im Transkriptionsfaktor ATF6(25). PERK phosphoryliert in der Folge den Translationsfaktor eIF2 α und reduziert damit die globale Proteintranslation an den Ribosomen (26). Außerdem führt phospho-eIF2 α zur Steigerung der Expression von ATF4, einem Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene der Proteinhomeostase steigert (27). Nach Aktivierung durch Transphosphorylierung wird durch die zytosolisch lokalisierte Endoribonuclease-Aktivität von IRE1 die mRNA von XBP1 in XBP1s prozessiert (28). Xbp1s wird durch den erfolgten Frameshift ribosomal zu einem aktiven Transkriptionsfaktor translatiert, der die Transkription zahlreicher Gene kontrolliert, die an Proteinfaltung, -sekretion und ERAD beteiligt sind (24). Xbp1s spielt interessanterweise eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von B-Lymphozyten in Plasmazellen (29). IRE1 ist zudem in die Spaltung weiterer RNAs involviert, ein Vorgang, der als RIDD (engl. *regulated IRE1 dependent decay*) bezeichnet wird und neben diversen noch ungenau charakterisierten zellphysiologischen Antworten durch den Abbau anti-apoptotisch wirkender miRNAs auch zur Apoptose der Zelle führen kann (30). Durch

Oligomerisierung von IRE1 kann sich eine Signaltransduktionsplattform („UPRosome“) bilden, an der u.a. pro-apoptotische Kinasen wie ASK1 und JNK sowie weitere pro-apoptotische Faktoren aktiviert werden (31, 32). Ebenso kann die Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP durch PERK, IRE1 oder ATF6 zum programmierten Zelltod führen, da CHOP die Bildung anti-apoptotischer Proteine wie BCL-2 hemmt und die Transkription pro-apoptotischer Faktoren wie Bim, TRB3 oder DR-5 fördert (33, 34). Des Weiteren spielt wohl eine räumliche Nähe von PERK an sog. Mitochondrien-assoziierten Membranen („MAMs“) eine Rolle bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit konsekutiver mitochondrial vermittelter Apoptose (35). Die genauen Hintergründe der Determinierung des Zellschicksals (Erhalt der Proteinhomöostase und Überleben vs. Einleitung der Apoptose) durch die drei Signaltransduktionswege der UPR sind auch aufgrund ihrer umfangreichen Vernetzungen und sehr differenzierten Regulation noch unklar und weiterhin Gegenstand intensiver Forschung (34, 36-38). Eine gezielte Induktion von Proteinstress in Myelomzellen könnte jedoch dazu genutzt werden, das bereits belastete UPR-Gleichgewicht vollständig auf die Seite der apoptotischen Signalwege zu verschieben und so zum selektiven Tumorzelltod führen. Klassische UPR-Stressinduktoren wie Tunicamycin, Thapsigargin oder Brefeldin A zeigten zwar z.T. synergistische Aktivität mit Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib in vitro, wiesen aber ein ausgeprägtes Toxizitätsprofil in ersten In-vivo-Studien auf, sodass sie keine klinische Bedeutung besitzen (16, 23). Die klinische Relevanz der beschriebenen engen Verzweigungen zwischen UPR und UPS zeigt aber z.B. die Tatsache, dass eine funktionierende IRE1-Xbp1-Achse notwendig für die Wirksamkeit von Bortezomib ist, was sowohl an ihrer essentiellen Funktion im Rahmen der Plasmazelldifferenzierung (29) als auch Xbp1s-unabhängigen pro-apoptotischen Signalen liegen könnte, die in der entsprechenden Studie nicht überprüft wurden (39). Als erste Substanz, die aber neben ihrer Rolle in der ER-Stressinduktion auch andere pleiotrope Effekte auf Myelomzellen besitzt, wird derzeit der HIV-Proteaseinhibitor Nelfinavir in klinischen Studien getestet. Nelfinavir zeigte in Kombination mit Bortezomib eine beeindruckende Wirksamkeit auch bei Bortezomib-refraktären Myelompatienten nach mindestens zwei Vortherapielinien (40).

Neben dem proteasomalen Abbau dient auch die Autophagie dem Abbau fehlerhafter Proteine. Autophagie beschreibt einen distinkten katabolen Prozess, bei dem zelleigene Bestandteile bis hin zu ganzen Zellorganellen in Lysosomen verdaut werden. Es werden drei unterschiedliche Autophagie-Pfade unterschieden, abhängig von dem Weg, auf welchem abzubauenende Substrate zu den Lysosomen transportiert werden: Makroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Mikroautophagie (17, 41, 42).

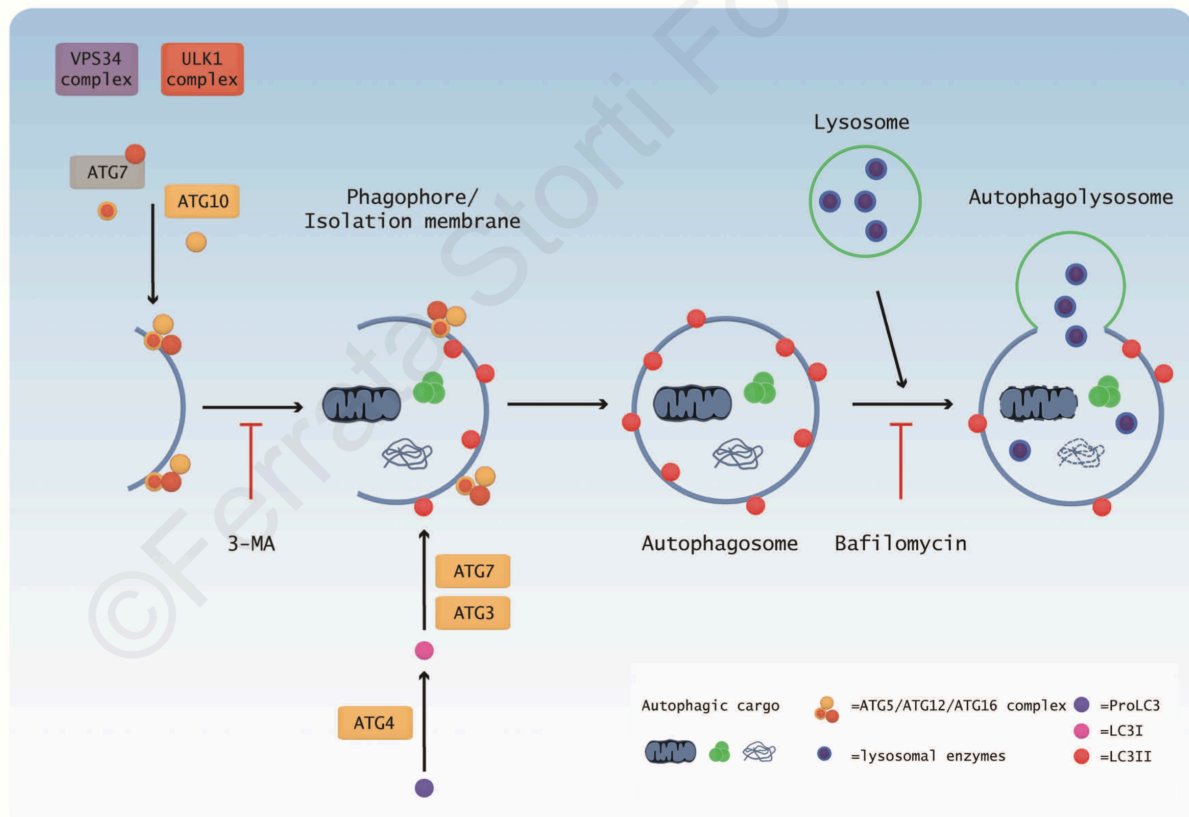


Abbildung 2: Übersicht der (Makro-)Autophagie. Nach Formation eines Initiationskomplexes führen verschiedene Proteine der ATG-Familie zur Nukleation einer Phagophore, die das zu verdauende Zellmaterial schließlich in einem Autophagosom umschließt. Autophagosomen sind von einer LC3-II-haltigen Doppelmembran umgeben. Sie fusionieren schließlich mit Lysosomen zu Autophagolysosomen, in deren sauren Milieu Hydrolasen den Abbau des eingeschlossenen Zellmaterials bewerkstelligen. Abbildung aus (17).

Bei dem klassischen Prozess der Makroautophagie (Abbildung 2) werden abzubauen Makromoleküle oder Zellorganellen zunächst von einer Phagophore umschlossen. Hierzu erforderlich ist die koordinierte Aktion von mTOR (inaktiv) und PI3K (Klasse III), die in einem Komplex mit Beclin1 und p150 vorliegt und mit verschiedenen Proteinen interagiert, welche die Entstehung der Phagophore fördern oder hemmen können (17). Bei positivem Signal expandiert die Phagophore, umschließt das zu verdauende Material und reift zu einem sog. Autophagosom, das von einer Doppelmembran umgeben ist und ein charakteristisches Merkmal der Makroautophagie darstellt. Für diesen Prozess ist die Spaltung des Proteins LC3 in LC3-II und Bindung an ein Phosphatidylethanolamin in der Autophagosomenmembran entscheidend (43). Adapterproteine wie p62, NBR1 und HDAC6 können ubiquitinierte Proteine, die häufig in sog. Aggresomen vorliegen, über einen Dynein-abhängigen Mikrotubulus-assoziierten Transportmechanismus in das Innere der Phagophore einbringen, bevor diese sich vollständig zu einem Autophagosom verschließt (44-47). Im Anschluss fusioniert dieses mit Lysosomen zum sog. Autophagolysosom. Hier findet schließlich der Abbau des Zellmaterials durch saure Hydrolasen statt. Wie die UPR hält auch die Autophagie eine Basalaktivität zur Erhaltung der Balance zwischen Abbau und Synthese von Makromolekülen und Organellen aufrecht (42). Diese Basalaktivität kann unter Bedingungen

wie Proteinstress, Nährstoffdeprivation, Hypoxie oder der Anreicherung von Proteinaggregaten gesteigert werden, um das Überleben einer Zelle sicher zu stellen. Aus diesen Überlegungen ergab sich früh eine potentielle Rolle der Autophagie in der Onkogenese, da Tumorzellen in besonderem Maße mit diesen Bedingungen umgehen müssen. Allerdings mehrten sich im Laufe der Zeit auch Hinweise auf eine Rolle der Autophagie in der Vermittlung von Zelltod, Apoptose und Seneszenz (48). Einige Bestandteile des Autophagie-Pfades, wie z.B. Beclin1, sind zudem bekannte Tumorsuppressorgene (49). Die spezielle Rolle der Autophagie in der Entscheidung des Zellschicksals scheint hier ähnlich wie diejenige der UPR komplexen Regulationsmechanismen zu unterliegen, die noch weitgehend unverstanden sind. Zudem gilt es ein komplexes Regulationsnetzwerk zwischen UPR, Autophagie und Proteasomensystem zu berücksichtigen (42). So führt etwa eine Dysfunktion oder Hemmung der Proteasomen zu einer Induktion der UPR, die wiederum über den PERK- und ATF6-Pfad sowie eine Steigerung der Expression von Bip Autophagie induziert (42). Auf diese Weise scheinen Zellen mit exzessivem Proteinstress ihr Überleben sichern zu wollen, auch wenn einer oder zwei der beschriebenen Kompensationsmechanismen überlastet sind. Diese Vorgänge sind in Grundzügen bereits für das Multiple Myelom beschrieben und könnten sich therapeutisch durch sinnvolle Substanzkombinationen ausnutzen lassen (50-52). Entsprechend wurden Autophagie-Inhibitoren wie Chloroquin oder Clarithromycin in ersten klinischen Studien beim Multiplen Myelom getestet, wobei sich in Kombination mit Lenalidomid bzw. Bortezomib in einer signifikanten Anzahl an Patienten Resistenzen gegenüber letzteren Substanzen überwinden ließen (53, 54). Erste klinische Studien zur Testung von selektiven HDAC6-Inhibitoren wie Ricolinostat beim Multiplen Myelom zeigen ebenfalls eine Wirksamkeit in Kombination mit Bortezomib bzw. Pomalidomid und Dexamethason (55, 56).

2.3. Der Argininstoffwechsel als therapeutisches Ziel bei Tumorerkrankungen

Das zunehmende Verständnis des Metabolismus von Tumorzellen hat in den letzten 100 Jahren wesentlich zum Fortschritt in der Onkologie beigetragen. Exemplarisch seien die Arbeiten von Otto Warburg als Grundstein moderner funktioneller Tumorbildgebung und die Entdeckung von Antimetaboliten wie den Antifolaten durch Sidney Faber erwähnt, die zu ersten Erfolgen bei der Therapie kindlicher Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) führten (57-59). Seit den 1970er Jahren hat die Hinzunahme von Asparaginase als erstem zugelassenen rekombinanten Enzym zur Therapie der ALL zu deutlichen Verbesserungen im Gesamtüberleben der Patienten geführt (60, 61). Die semiessentielle Aminosäure Arginin dient dem menschlichen Organismus als eine der 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren der Proteinbiosynthese. Darüber hinaus ist Arginin aber auch Quelle für die Harnstoffausscheidung im Rahmen des Harnstoffzyklus, Substrat für NO-Synthase, die

und Aspartat) eine wichtige Rolle. In blau sind relevante Inhibitoren bzw. Arginin abbauende Enzyme mit ihren Angriffspunkten aufgeführt. Nicht alle dargestellten Stoffwechselwege kommen in allen physiologischen bzw. maligne entarteten Zellen vor. Abbildung aus (62).

Im Gegensatz hierzu sind zahlreiche Tumorentitäten durch eine Defizienz der ASS1 charakterisiert (62, 68). Der Verlust an ASS1 unterstützt die Tumorpheriferation durch eine Steigerung der Pyrimidinsynthese über vermehrt anfallendes Aspartat (69-71). Derartige Tumorzellen bezeichnet man aufgrund ihrer Abhängigkeit von extrazellulärem Arginin als argininauxotroph. Als Mechanismus der Argininauxotrophie spielen epigenetische Faktoren wie die Methylierung des Promotors des ASS1 Gens häufig eine wichtige Rolle (72-75). Bei zahlreichen Tumoren wie dem Melanom, hepatozellulärem Karzinom (HCC), Pleuramesotheliom, Nierenzellkarzinom, Blasenkarzinom und Glioblastom ist der Verlust der ASS1-Expression mit einer Refraktärität gegenüber klassischen Chemotherapeutika assoziiert (62, 76). Gerade unter solchen Voraussetzungen spielen neue innovative Therapieansätze eine wichtige Rolle. Auch das Multiple Myelom zeichnet sich durch ein eher schlechtes und nur kurzfristiges Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika aus, sodass diese in jüngeren Patienten hochdosiert appliziert werden (77). Unter den hämatologischen Neoplasien wurde in Lymphomen und der akuten myeloischen Leukämie eine niedrige Rate an ASS1-Expression und damit resultierender Sensitivität gegenüber ADI-PEG 20 beschrieben (78, 79). In frühen klinischen Studien mit ADI-PEG 20 zeigte sich eine geringe Rate an tiefen Remissionen bei verbesserter Krankheitskontrolle insbesondere in ASS1-defizienten soliden Tumoren (80-83). Eine entscheidende Rolle für das kurze Ansprechen auf ADI-PEG 20 stellen wahrscheinlich neutralisierende Antikörper dar, die zu einer Inaktivierung des Enzyms mit konsekutivem Anstieg der Argininspiegel im Blut der Patienten führen (84, 85). Aufgrund der geringen Toxizität der Behandlung sind daher Kombinationsstrategien mit weiteren Substanzen eine Möglichkeit zur Steigerung der Effektivität. Zudem wurde in bestimmten Tumorentitäten unter Therapie mit ADI-PEG 20 eine Reinduktion der ASS1-Expression beschrieben (86, 87). Hierbei scheint die Bindung von c-Myc an den ASS1-Promotor eine mögliche Rolle zu spielen. Folge ist eine endogene Resynthese von Arginin aus Citrullin durch die Tumorzellen und damit eine Resistenz gegenüber ADI-PEG 20.

Neben ADI-PEG 20 befindet sich eine durch Cobaltsubstitution im aktiven Zentrum für den physiologischen menschlichen pH-Bereich optimierte humane Arginase in der präklinischen Entwicklung (88, 89). Sie metabolisiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Da die meisten physiologischen Gewebe Arginin nicht aus Ornithin resynthetisieren können (Fehlen des Enzyms Ornithin-Transcarbamylase), erklärt sich bei suffizienter Arginindepletion mittels Arginase in vivo eine erhebliche Toxizität in präklinischen in-vitro und in-vivo Tumormodellen (89, 90). Diese kann jedoch durch Supplementierung von Citrullin reduziert werden (91). Die

klinische Testung der rekombinanten Arginase ist bisher noch nicht soweit fortgeschritten wie im Falle von ADI-PEG 20 (u.a. NCT02285101, NCT02732184, NCT02561234).

Bisher existieren keine Erkenntnisse über die Empfindlichkeit von Myelomzellen gegenüber einer metabolischen Therapie mittels Arginindepletion. Zudem sind keine Informationen über die ASS1-Expression in dieser Entität bekannt. Es konnte u.a. durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Argininmangel zur Induktion von Proteinstress in Form einer aktivierten UPR sowie Induktion von Autophagie in humanen T-Zellen führt (92). Eine kürzlich erschienene Publikation bestätigte vergleichbare Mechanismen in soliden humanen Tumorzelllinien (93). Die Induktion von Proteinstress kann daher einen wesentlichen Mechanismus für die Vernichtung von Tumorzellen unter Argininmangel darstellen. Da das Multiple Myelom aufgrund oben genannter Eigenschaften besonders empfänglich für Proteinstress ist, soll im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher therapeutischer Nutzen der Arginindepletion in dieser häufigen und bisher unheilbaren hämatologischen Tumorentität untersucht werden.

2.4. L-Canavanin – ein natürliches Arginin-Analogon

Eine hochinteressante Strategie zur Maximierung der Proteinfehlfaltung und konsekutiver UPR-Induktion durch Interferenz mit dem Arginin-Metabolismus besteht möglicherweise in der Substanz L-Canavanin ((2S)-2-Amino-4-(diaminomethylidenamino)oxybutansäure). Bei L-Canavanin handelt es sich um ein toxisches δ -Oxo-Analogon des L-Arginin, das natürlicherweise in über 1500 Leguminosenspezies wie z.B. der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) als Fraßschutz vor Herbivoren vorkommt (94, 95). In der Natur, insbesondere bei pflanzlichen Organismen, sind über 700 verschiedene nicht-proteinogene Aminosäuren bekannt (96). Es konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von Canavanin für tierische Organismen auf einem Einbau dieser Aminosäure in neu synthetisierte Proteine beruht, da die tierische Arginyl-tRNA-Synthetase neben L-Arginin auch L-Canavanin erkennt und im Gegensatz zum pflanzlichen Enzym nicht zwischen beiden Substanzen unterscheiden kann (94, 95, 97). Kürzlich wurde die 3D-Struktur von Canavanin gebundener humaner Arginyl-tRNA-Synthase publiziert (98). Dieser „Fehler“ bei der Erkennung der korrekten Aminosäure führt aufgrund der fehlenden positiven Ladung der Seitenkette im Canavanin (Abbildung 4) nach dem Einbau in naszierende Polypeptidketten zu Änderungen in der Faltung und Funktion der betroffenen Proteine (99-101). So führte beispielsweise der Einbau von Canavanin anstelle von nur 18 der insgesamt ca. 200 vorkommenden Arginin-Reste des Vitellogenins, eines essentiellen Eiproteins der weiblichen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria migratorioides* zu signifikanten Konformationsänderungen des Proteins (102). Studien an verschiedenen bakteriellen und eukaryoten Proteinen wie Lysozym, Diptericin, β -

Galaktosidase, Präproalbumin oder POMC (Proopiomelanocortin) zeigten einen partiellen bis kompletten Funktionsverlust bzw. eine deutliche Einschränkung der proteolytischen Prozessierung nach Inkorporation von Canavanin anstelle von Arginin (100, 103-106).

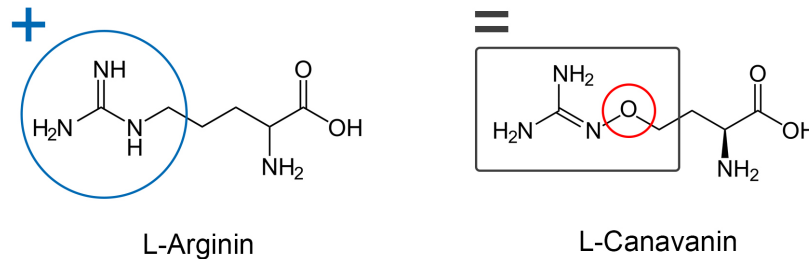


Abbildung 4: Darstellung der proteinogenen Aminosäure L-Arginin und seines natürlichen δ -Oxo-Strukturanalogons L-Canavanin. Durch die Oxo-Gruppe fehlt dem Canavanin die positive Ladung der Guanidino-Seitenkette des Arginins, was die toxischen Eigenschaften von Canavanin erklärt. Quelle: eigene Schemazeichnung.

In älteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch eine Monotherapie mit Canavanin in Tumorzellen effektiv Zelltod induzierbar ist (107, 108). Diese Strategie wurde allerdings wieder verlassen, da die notwendigen hohen Canavanin-Konzentrationen in vivo zu erheblicher Toxizität (u.a. schwere Alopezie, Gewichtsverlust) geführt haben (109, 110). Zudem waren lange Behandlungszeiträume mit großen Substanzmengen notwendig. Vor dem Hintergrund einer Competition von Canavanin mit Arginin um dieselbe tRNA-Synthetase war in einem Arginin-depletierten Milieu eine deutliche Verstärkung des antitumoralen Canavanin-Effektes bei sehr viel niedrigeren Canavanin Konzentrationen zu erwarten. Zudem kann durch die Kombination mit Canavanin die zytotoxische Wirkung der Arginindepletion deutlich verstärkt werden. Üblicherweise wirkt die alleinige Arginindepletion zwar ausgeprägt zytostatisch im Sinne eines Proliferationsstopps, allerdings zeigen Tumorzellen in vitro sowie in vivo selbst unter prolongiertem Argininmangel häufig nur eine geringe Zelltodinduktion und können bei Reexposition gegenüber Arginin erneut proliferieren (66, 111-113). In Kombination mit Canavanin zeigte sich in verschiedenen In-vitro-Versuchen mit soliden Tumorzelllinien, dass im argininfreien Milieu bereits bei sehr niedrigen Canavanin-Konzentrationen von 100 μ M eine signifikante Caspase-Aktivierung über den intrinsischen apoptotischen Signalweg mit konsekutivem Zelltod stattfindet (112). Cycloheximid, ein Hemmstoff der Proteintranslation, konnte den zytotoxischen Effekt von Canavanin auf Tumorzellen unter Argininmangel komplett aufheben, was für den Einbau von Canavanin in zelluläre Proteine als Wirkungsmechanismus spricht. Zudem konnte in dieser Arbeit eine gute Toleranz immortalisierter humaner Zelllinien und von Fibroblasten gegenüber der Behandlung mit Canavanin nachgewiesen werden. Eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Effekte einer Arginindepletion durch Canavanin konnte auch an humanen Tumor-Sphäroidmodellen gezeigt werden, die unter normalen Bedingungen resistent gegenüber einem alleinigen Argininmangel sind (113). Die Kombinationstherapie

wirkte in vitro zudem sehr effektiv als Radiosensitizer, auch in Kolonkarzinomen mit induzierbarer ASS1-Expression im Argininmangel (114). In einer weiteren Studie wirkte die Kombination aus Argininmangel und Canavanin synergistisch mit klassischen Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Cisplatin auf solide Tumorzelllinien in vitro (115). Erste Versuche an soliden humanen Tumorzelllinien deuten auf eine Verstärkung proapoptotischer Signalwege der UPR hin, die durch eine Canavanin-Behandlung im Argininmangel ausgelöst wird (93). Zusammengefasst stellen Argininanaloga wie Canavanin hochinteressante potentielle Krebstherapeutika dar, da sie die zytotoxische Wirkung eines artifiziellen Argininentzugs deutlich steigern können und in niedriger Dosierung angewandt vermutlich nur zu geringen Nebenwirkungen führen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Substanzen

Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet (Tabelle 1). Sämtliche Additiva von Zellkulturmedien wurden als steril-filtrierte, zellkultur-geeignete Fertiglösungen erworben oder mittels Filtrapur S 0,2 µm Spritzenvorsatzfiltern steril filtriert. Die Lösung von Trockensubstanzen erfolgte mit Reinstwasser (ddH₂O) bzw. entsprechenden Lösungsmitteln nach Angaben des Herstellers.

| Substanz | Hersteller | Produktnummer |
|--|---------------------|---------------|
| 2x Laemmli Ladepuffer | Sigma-Aldrich | S3401 |
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth | 4227.1 |
| 2-Propanol | Carl Roth | T910.1 |
| 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) | Vector Laboratories | SK-4100 |
| Acrylamid 4K Lösung (30 %) | AppliChem | A1672 |
| Albumin Fraktion V | Carl Roth | 8076.4 |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich | A3678 |
| Brij 96V | Fluka | 16011 |
| Dinatriumtetraborat-decahydrat (Borax) | Carl Roth | T880.2 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich | D4540 |
| Dulbecco's PBS | Sigma-Aldrich | D8537 |
| Ethanol | Carl Roth | 9065.2 |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Sigma-Aldrich | C8056 |
| Formaldehydlösung 37 % | Carl Roth | 7398.1 |
| HCl rauchend 37 % | Carl Roth | 4625.2 |
| L-Arginin | Sigma-Aldrich | A5006 |
| L-Canavanin | Sigma-Aldrich | C1625 |
| L-Citrullin | Sigma-Aldrich | C7629 |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich | L9783 |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich | G7513 |
| L-Glycin | Carl Roth | 3187.3 |
| L-Lysin | Sigma-Aldrich | L5501 |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth | KK36.2 |

| | | |
|---|---------------------|--------------|
| Methanol | Carl Roth | KK39.2 |
| Milchpulver Blotting-Grade | Carl Roth | T145.3 |
| Natriumhydroxid 1M | Carl Roth | K021.1 |
| Natriumborat | Sigma-Aldrich | S9640 |
| Natriumchlorid | Carl Roth | 3957.2 |
| Natriumfluorid | Carl Roth | 2618.1 |
| Natriumorthovanadat | Sigma-Aldrich | S6508 |
| Natriumpyruvat-Lösung | Sigma-Aldrich | S8636 |
| N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich | T9281 |
| Normales Ziegen Serum | Vector Laboratories | S-1000 |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich | P4333 |
| Pepstatin A | Sigma-Aldrich | P5318 |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich | P7626 |
| Protein Assay | Bio-Rad | 5000006 |
| Proteinstandard | Bio-Rad | 5000005 |
| RPMI-1640 | Sigma-Aldrich | R8758 |
| RPMI-1640 | Caisson | RPL17 |
| SDS | Carl Roth | 183.3 |
| Trinatriumcitrat-dihydrat | Sigma-Aldrich | W302600 |
| Tris base | Carl Roth | 4855.2 |
| Trypsin-EDTA | Sigma-Aldrich | T4049 |
| Tween-20 | Carl Roth | 9127.1 |
| Western Lightning Plus ECL | Perkin Elmer | NEL1050001EA |
| Xylol | Carl Roth | 9713.1 |

Tabelle 1: Verwendete allgemeine Substanzen.

3.1.2. Allgemeine Materialien

Folgende allgemeine Materialien sind in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen (Tabelle 2).

| Artikel | Hersteller | Artikelnummer |
|---|-----------------|----------------------|
| Cellstar Zellkulturflaschen mit Filterkappe 25/75/175 cm ² | Greiner Bio-One | 690175/658175/660175 |
| Cellstar Zellkultur Schalen 35/10 /60/15 /100/20 | Greiner Bio-One | 627170/628160/664160 |

| | | |
|--|------------------------------|-----------------------------|
| Cellstar 6/24/96 Well Multiwell Platten, F-Boden | Greiner Bio-One | 657160/662160/655161 |
| Cell Strainer 40/100 µm | Greiner Bio-One | 542000/352340 |
| Gefrierlagerröhrchen Cryo.s | Greiner Bio-One | 122279 |
| Kova Glasstic Slide 10 mit Grid | Thermo Fisher Scientific | 22-270141 |
| Nadeln BD Microlance 22 G | Becton Dickinson | BD300900 |
| Neubauer Zählkammer improved Tiefe 0,100 mm | Marienfeld | 0640010 |
| Pipettenspitzen 5/10/25/50 ml | Greiner Bio One | 606180/607180/760180/768180 |
| Pipettenspitzen 0,5–10/10–200/200–1000 µl | Greiner Bio One | 771287/739261/740274 |
| Reaktionsgefäße 0,5/2 ml („Eppendorf-Tubes“) | Sarstedt | 72.699/72.695.500 |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml („Eppendorf-Tubes“) | Greiner Bio-One | 616201 |
| Röhrchen „Falcon“ 15/50 ml | Greiner Bio-One | 188271/227261 |
| Rundbodenröhrchen „FACS-Tubes“ | Corning Science; New York | 352008 |
| Schwämme („Foam Pads“) | Bio-Rad | 1703933 |
| Semi-Mikro Küvetten 1,5 ml | Bio-Rad | 2239955 |
| Spritzen 1 ml | Braun | 2022-04-01 |
| Spritzen 5/10/20 ml | Beckton Dickinson | 2023-02/2022-12/2023-05-31 |
| Sterilfilter 0,2 µm | Pall Life Sciences, Dreieich | 4433 |
| Thick Plot Paper | Bio-Rad | 1703956 |
| Western Blotmembran PVDF Amersham Hybond 0,45 µm | GE Healthcare Life Sciences | 10600029 |

Tabelle 2: Verwendete Materialien.

3.1.3. Geräte

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Geräte (Tabelle 3) verwendet.

| Gerät | Hersteller |
|---|------------------|
| Analysenwaage | Sartorius |
| Einkanalpipetten „Pipetman“ | Gilson |
| Eppendorf Research plus Einkanal Pipetten | Eppendorf |
| Eppendorf Multipette M4 | Eppendorf |
| FACS Canto II | Becton Dickinson |
| Gelkammer Mini PROTEAN Tetra Cell | Bio-Rad |
| GS800 Calibrated Densitometer | Bio-Rad |

| | |
|--|-----------------------------|
| Hera Cell Inkubator | Hera |
| HPLC-Instrument mit 2250 HPLC-Pumpen | Bischoff |
| Hypercassette Amersham | GE Healthcare Life Sciences |
| Inkubationsbad 1008 | GFL, Großburgwedel |
| Lichtmikroskop Motic BA310 (Zellkultur) | Motic, Wetzlar |
| Lichtmikroskop Motic AE2000 mit Moticom 10+ (Histologie) | Motic, Wetzlar |
| Magnetrührer VMS-A | VWR, Darmstadt |
| Megafuge 1.0 R Heraeus | Thermo Fisher Scientific |
| Megafuge 40R | Thermo Fisher Scientific |
| Mini-Rocking Platform WT15 | Biometra |
| Oasis MCX Ionenaustauscher-Säule | Waters, Eschborn |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick |
| Photometer | Eppendorf |
| Pipettierhelfer Pipetboy acu 2 | VWR, Darmstadt |
| Powerbank PS-300 | Labnet |
| Schüttler The Belly Dancer | Stovall Life Science |
| Sterilbbänke HS-18/HeraSafe | Heraeus |
| Thermomixer Thermo Stat Plus | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5471R | Eppendorf |
| Trans-Blot SD Semi Dry | Bio-Rad |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries |

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

3.1.4. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt, im Folgenden sind die verwendeten Substanzen mit ihrer jeweiligen Endkonzentration angegeben.

Lower Tris (pH 8,8):

| | |
|---------------------------|-------|
| Tris | 1,5 M |
| SDS | 0,4 % |
| Zugabe von HCl bis pH 8,8 | |

1 % Brij 96V Lösung (pH 7,5):

| | |
|---------------------------|-------|
| Brij 96V | 1 % |
| Tris | 50 mM |
| Zugabe von HCl bis pH 7,5 | |

Protein-Lysepuffer:

| | |
|---------------------|-------|
| Natriumfluorid | 10 mM |
| Natriumorthovanadat | 1 mM |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Leupeptin | 1 µg/ml |
| Pepstatin | 1,5 µg/ml |
| PMSF | 1 mM |
| in 1%iger Brij 96V Lösung | |
| 10x SDS-Laufpuffer: | |
| Tris | 240 mM |
| L-Glycin | 1,9 M |
| SDS | 1 % |
| 5x TBS (pH 8,0): | |
| Tris | 50 mM |
| NaCl | 750 mM |
| Zugabe von HCl bis pH 8,0 | |
| 1x TBST (pH 8,0): | |
| Tris | 10 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Tween-20 | 0,1 % |
| in 1x TBS-Lösung | |
| Tris (pH 7,5): | |
| Tris | 50 mM |
| Zugabe von HCl bis pH 7,5 | |
| Upper Tris (pH 6,8): | |
| Tris | 0,5 M |
| SDS | 0,4 % |
| Zugabe von HCl bis pH 6,8 | |
| Blottingpuffer: | |
| Tris | 48 mM |
| Glycin | 39 mM |
| SDS | 0,04 % |
| Methanol | 20 % |
| Strippingpuffer: | |
| Tris | 62,5 mM |
| 2-Mercaptoethanol | 100 mM |
| SDS | 2 % |
| Natriumboratpuffer (pH 9,7): | |
| Borax | 12,5 mM |
| Zugabe von 1 M NaOH bis pH 9,7 | |
| Citratpuffer (pH 6,0): | |
| Trinatriumcitrat-dihydrat | 10 mM |
| Zugabe von HCl bis pH 6,0 | |

3.1.5. SDS-Proteingele

Im Rahmen der durchgeführten Western Blots wurden 12 %- beziehungsweise 15%ige SDS-Gele gegossen (Tabelle 4).

| Gelkonzentration | Bestandteile | Sammelgel | Trenngel |
|------------------|--------------------|-----------|----------|
| 12 % | ddH ₂ O | 3,05 ml | 3,5 ml |
| | Upper Tris | 1,25 ml | - |
| | Lower Tris | - | 2,5 ml |
| | Acrylamid 4K 30 % | 650 µl | 4 ml |
| | APS 10 % | 25 µl | 100 µl |
| | TEMED | 5 µl | 7 µl |
| 15 % | ddH ₂ O | 3,05 ml | 2,3 ml |
| | Upper Tris | 1,25 ml | - |
| | Lower Tris | - | 2,6 ml |
| | Acrylamid 4K 30 % | 0,65 ml | 5 ml |
| | APS 10 % | 25 µl | 100 µl |
| | TEMED | 5 µl | 4 µl |

Tabella 4: Bestandteile verwendeter SDS-Gele.

Als Größenstandard für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der Proteinmarker Prestained RTU Protein ladder I von PromoKine (PK-MB713-001P) verwendet.

3.1.6. Medien für Zellkulturen

Folgende Zellkulturmedien wurden in dieser Arbeit verwendet:

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R5886)
 + FKS 10 %
 + L-Glutamin 2 mM
 + Penicillin (10.000 Units)/
 Streptomycin (10 mg/ml) 1 %

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R5886) für NCI-H929 bzw. NCI-A2 (RPMI-NCI)
 + FKS 10 %
 + L-Glutamin 2 mM
 + Penicillin (10.000 Units)/
 Streptomycin (10 mg/ml) 1 %
 + L-Glutamin 1 %
 + Natriumpyruvat 1 mM
 + 2-Mercaptoethanol 50 µM

RPMI 1640 ohne L-Glutamin, L-Arginin und L-Lysin (Caisson, RPL17-500ML)
 + FKS dialysiert 10 %
 + L-Glutamin 2 mM
 + Penicillin (10.000 Units)/
 Streptomycin (10 mg/ml) 1 %
 + L-Lysin 2,2 mM
 + MgCl₂ 10 µM

Im Rahmen der unterschiedlichen genutzten Experimentalbedingungen wurden zu diesem argininfreien Medium unterschiedliche Mengen L-Arginin (bzw. L-Citrullin) zugesetzt. Für In-vivo-Versuche wurde die Aminosäure L-Canavanin (C1625) verwendet (alle Sigma-Aldrich).

3.1.7. Kulturzelllinien

Folgende Zelllinien wurden im Rahmen der Arbeit verwendet (Tabelle 5). Die einzelnen Zelllinien wurden bei 37° C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

| Bezeichnung | Erkrankungsstadium/ Ursprungsgewebe | Kulturmedium | Herkunft |
|-------------|--|--------------|---|
| U266 | PCL | RPMI-1640 | M. Theobald, Universitätsmedizin Mainz |
| NCI-H929 | Pleuraerguss bei MM | RPMI-NCI | H. Goldschmidt, Universitätsklinik Heidelberg |
| OPM2 | PCL | RPMI-1640 | H. Goldschmidt |
| RPMI-8226 | MM | RPMI-1640 | H. Goldschmidt |
| KMS-12-BM | MM | RPMI-1640 | H. Goldschmidt |
| A431 | PECA | RPMI-1640 | M. Theobald, Universitätsmedizin Mainz |

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.

Bei der Zelllinie NCI-A2 handelt es sich um eine Variante der NCI-H929-Zelllinie mit stabiler Expression von humanem HLA-A2.1, die von E. Amann (AG Theobald) generiert wurde. Sie weist vergleichbare biochemische und funktionelle Eigenschaften wie NCI-H929-Zellen auf und wurde ebenfalls im modifizierten RPMI-1640-Medium (RPMI-NCI, s. Kap. 3.1.6) kultiviert.

3.1.8. Kits

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden in den Experimenten verwendet:

- CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) von Promega, G3580
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen, 556547
- Transcription Factor Buffer Set von BD Pharmingen, 562574
- Hämatoxylin Eosin Stain Kit, Vector Laboratories, H-3502
- Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, SP-2001
- Vectastain Elite ABC HRP Reagent, Vector Laboratories, PK-7100

3.1.9. Inhibitoren

Folgende Inhibitoren wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 6).

| Inhibitor | Wirkung | Dosierung | Hersteller | Produktnr. |
|-------------|---------------|------------|---------------|------------|
| Tunicamycin | UPR-Induktion | 1-10 µg/ml | Sigma-Aldrich | T7765 |
| Toycamycin | UPR-Inhibitor | 0,1-3 µM | Sigma-Aldrich | T3580 |

| | | | | |
|------------|----------------------|---------|-------------------------|-----------|
| Bortezomib | Proteasomeninhibitor | 1-10 nM | Santa-Cruz | Sc-217785 |
| Chloroquin | Autophagieinhibitor | 10 µM | Sigma-Aldrich | C6628 |
| ADI-PEG 20 | Arginindeiminase | 5 IU | Polaris Pharmaceuticals | - |

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren.

3.1.10. Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Proteindetektion in Western Blots in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 7).

| Antikörper | Klonalität | Host | Konz. | Hersteller | Produktnr. |
|--------------------------|------------|-------|---------------------|----------------|------------|
| ASS1 | polyklonal | Hase | 1:1000 in 5 % BSA | Sigma-Aldrich | HPA020896 |
| Akt(pan) C67E7 | monoklonal | Hase | 1:1000 in 5 % BSA | Cell Signaling | 4691 |
| β-Tubulin | polyklonal | Hase | 1:1000 in 5 % BSA | Cell Signaling | 2146 |
| GAPDH | monoklonal | Hase | 1:5000 in 5 % BSA | Cell Signaling | 2118 |
| Phospho-eIF2α (Ser51) | polyklonal | Hase | 1:1000 in 5 % BSA | Cell Signaling | 9271 |
| Xbp-1s | monoklonal | Hase | 1:1000 in 5 % Milch | Cell Signaling | 12782 |
| Goat-anti-rabbit IgG-HRP | monoklonal | Ziege | 1:5000 in 5 % BSA | Santa Cruz | L1013 |

Tabelle 7: Verwendete Antikörper in Western Blots.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Experimente wurden die Antikörper aus Tabelle 8 verwendet.

| Antikörper | Isotyp | Host | Hersteller | Produktnr. |
|--------------------------------|--------|------|---------------|------------|
| PE Xbp-1s | IgG1k | Maus | BD Pharmingen | 562642 |
| PE Mouse IgG1k Isotype Control | IgG1k | Maus | BD Pharmingen | 555749 |

Tabelle 8: Verwendete FACS-Antikörper.

Zur Immunhistochemie wurden folgenden Antikörper verwendet (Tabelle 9).

| Antikörper | Host | Konz. | Hersteller | Produktnr. |
|---------------------------------|-------|--------|----------------|------------|
| Cleaved Caspase-3 | Hase | 1:1000 | Cell Signaling | 9661S |
| ASS1 | Hase | 1:500 | Sigma-Aldrich | HPA020896 |
| Biotinylierter Goat-anti-rabbit | Ziege | 1:200 | Vector Labs | BA-1000 |

Tabelle 9: Verwendete IHC-Antikörper.

3.2. Methoden

3.2.1. Passagierung von Kulturzelllinien

Alle verwendeten Kulturzelllinien wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % mit 5 % CO₂ in den oben genannten Zellmedien (Kapitel 3.1.6) in Zellkulturflaschen von Greiner BioOne gehalten. Sämtliche Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Um die logarithmische Wachstumsphase der Zellen zu erhalten, wurden die Zelllinien je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 3–4 Tage in neue Kulturflaschen im Verhältnis 1:7 bis 1:10 umgesetzt. Hierbei wurde ein entsprechendes Volumen aus einem bebrüteten Kulturgefäß entnommen und in 15 ml Röhrchen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in entsprechendem Kulturmedium und eine Überführung in eine neue Kulturflasche. Im Falle der z.T. adhärent wachsenden RPMI-8226-Zellen wurde nach Zentrifugation des alten Kulturmediums der Boden der Kulturflasche mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend für 3 min mit 1–3 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten die Resuspension in einem entsprechenden Volumen des RPMI-1640-Mediums und Überführung in ein neues Kulturgefäß.

3.2.2. Kryokonservierung von Kulturzelllinien

Die Langzeitlagerung von Zellkulturen erfolgt in der Gasphase eines Stickstofftanks bei -180°C. Hierzu wurden Zellen einer ausreichend dicht bewachsenen Zellkulturflasche nach o.g. Schema entnommen und anschließend in ihrem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, das zuvor mit 20 % FKS und 10 % DMSO angereichert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in entsprechende Gefrierlagerröhrchen (Greiner Bio-One) überführt, zunächst für eine Stunde bei -20 °C eingefroren und nach Lagerung bei -80 °C für weitere mindestens 24 h in den Stickstofftank eingelagert. Zum Auftauen von kryokonservierten Zelllinien wurden entsprechende Gefrierlagerröhrchen aus dem Tank entnommen und direkt bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss erfolgte die rasche Verdünnung des Gefriermediums mit einem 10-fachen Überschuss an Zellkulturmedium in 15 ml Röhrchen und Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml frischem Medium resuspendiert und zunächst in 25 cm² Kulturflaschen überführt, die sofort unter Standardbedingungen inkubiert wurden. Der erste Mediumwechsel erfolgte innerhalb der nächsten 12–24 h.

3.2.3. Behandlung der Zelllinien unter differierenden Aminosäurekonzentrationen

Zur Herstellung von Zellkulturpräparaten wurden in den einzelnen Experimenten Zellkulturschalen bzw. Multiwell-Platten passender Größe (Greiner Bio-One) verwendet. Vor Resuspension der entsprechenden Zellzahl in einem Medium mit abweichender Aminosäurekonzentration erfolgten drei Waschschriffe mit PBS um Medienreste aus der Kultur sicher zu beseitigen. Bei jedem dieser Waschschriffe wurden die Zellen in Zellkulturröhrchen (15 bzw. 50 ml) bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Restmedium wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Zellpellet je nach Zellzahl in 200 µl bis 10 ml PBS durch mehrfaches auf- und abpipettieren resuspendiert. Nach dem dritten Waschschriff erfolgte schließlich die Resuspension im benötigten Probenvolumen des vorbereiteten argininfreien Mediums (Caisson). Diesem wurden ggf. entsprechende Konzentrationen von Canavanin oder Citrullin zugegeben. Im Anschluss erfolgte nach Zellzählung mittels Zählkammer die Aussaat der korrekten Zellzahl in die Experimentalgefäße. Inhibitoren wurden im Anschluss in der jeweils genannten Konzentration zugegeben. Zur genaueren Einstellung der Zielkonzentration erfolgte zuvor die Anlage von Stock-Lösungen im entsprechenden Lösungsmittel. Äquivalente Mengen des Lösungsmittels dienten in den jeweiligen Versuchen als Negativkontrolle („Mock“).

3.2.4. Herstellung und Lagerung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen aus den Kultur- bzw. Experimentalgefäßen entnommen und zunächst in 15 ml Reaktionsgefäßen bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen in kaltem PBS resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets für mindestens 30 min in -80 °C eingefroren. Im Anschluss erfolgte ein langsames Auftauen auf Eis, wonach die Zellen in 50–100 µl kaltem Protein-Lysepuffer resuspendiert wurden. Im Falle von ex-vivo Untersuchungen wurde ein Teil des Tumorgewebes nach Explantation mechanisch mittels steril abgeflammter Drahtnetze homogenisiert, wie oben beschrieben abzentrifugiert, bei -80 °C für mindestens 30 min eingefroren und im Anschluss in Protein-Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Lysate über 30 min auf Eis gelagert und regelmäßig alle 5 min durch Auf- und Abpipettieren sowie Vortexen agitiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C über 10 min. Der Überstand wurde als fertiges Proteingemisch in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach 1:1-Mischung mit 2xLaemmli Probenpuffer über 5 min bei 95 °C gekocht und bei -20 °C eingefroren oder unmittelbar der SDS-PAGE zugeführt.

3.2.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration eines Proteinlysates wurde mittels Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde der Protein Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei bindet der Farbstoff Comassie-Brilliant Blue G-250 (CBBG) an kationische und aromatische Aminosäuren von Peptiden und Proteinen, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nM in Lösung auf 595 nM erhöht. Mithilfe einer zuvor durchgeführten Kalibration des Photometers anhand eines Proteinstandards bekannter Konzentration kann so die Proteinkonzentration in einer Probe ermittelt werden. Es wurden 200 µl Bradford Reagenz zu 800 µl ddH₂O und 2 µl Probenvolumen gegeben. Die Zugabe von 2 µl Lysepuffer diente als Blank-Probe.

3.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist das Auftrennen von Proteingemischen in einzelne Proteine nach Molekülgröße möglich (116). Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet als anionisches Detergenz in regelmäßigem Abstand an die Seitenketten der Aminosäuren und führt zu einer stark negativen Ladung, sodass die eigentliche Nettoladung der Proteine, die in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz stark schwanken kann, für die Auftrennung keine Rolle mehr spielt. Die Stärke des Trenngels wurde auf die Größe der zu untersuchenden Proteine abgestimmt (Tabelle 4). Für das Trenngel wurden entsprechende Mengen Wasser, 1,5 M Tris (pH 8,8) incl. SDS sowie 30 % Acrylamid in einem Falcon unter einem Abzug gemischt, anschließend wurden APS und TEMED hinzugefügt. Diese Mischung wurde in eine Glaskammer eingefüllt und mit 70%igem Ethanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel hergestellt, nach Entfernen des Ethanol auf das Trenngel gegeben und mit einem Kamm versehen, so dass sich Taschen für das Einfüllen der Proteine bildeten. Nach der Polymerisierung des Trenngels, wurde die Elektrophoresekammer zusammengebaut und mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Eingefrorene Proteinproben wurden aufgetaut und 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden 6 µl des Proteinmarkers bzw. 30 µg Protein der jeweiligen Probe pro Geltasche geladen. Die Proben liefen bei 75 V für 25 min durch das Sammelgel und bei 120 V weitere 90 min durch das Trenngel. Nach der erfolgten elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele 10 min im Blottingpuffer äquilibriert und die Proteine anschließend im „Western Blot“ – Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen.

3.2.7. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Mit dieser Methode können Proteine, die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen werden, sodass eine spezifische Detektion mittels Antikörpermolekülen möglich ist (117). Der Transfer der Proteine auf die

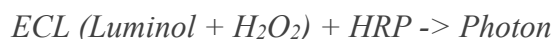
Membran erfolgte mittels Semy-dry-Blot-Verfahren. Hierzu wurde die PVDF-Membran nach Äquilibration im Blottingpuffer mit Methanol ca. 10 s aktiviert. Danach wurde eine entsprechende Halteklemme in der Blotkammer in Richtung Kathode zu Anode wie folgt blasenfrei mit den in Blottingpuffer angefeuchteten Komponenten aufgebaut:

- 1 Schwamm
- 2 Schichten Whatman-Papier
- Gel
- PVDF-Membran
- 2 Schichten Whatman-Papier
- 1 Schwamm

Der Transfer der Proteine erfolgte in Blottingpuffer über 90 min bei 45 mA. Danach wurde die Membran 5 min in TBST gewaschen.

3.2.8. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte zunächst die Inkubation der Membran in 5 % Magermilch oder 5 % BSA in TBST für 1 h. Die Verdünnungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper erfolgten ebenfalls in den o.g. Lösungen und sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte jeweils über 90 min bei Raumtemperatur oder eingeschweißt in Folie bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln. Danach wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST über je 5 min entfernt. Passende Sekundärantikörper, welche den Fc-Teil der Primärantikörper erkennen und an eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt sind, wurden im Anschluss für eine weitere Stunde mit der Membran inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte in TBST über jeweils 5 min. Zur Detektion wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion mit einem ECL-Reagenz (1:1 Mischung beider Bestandteile, Inkubation für 2 min im Dunkeln) durchgeführt. Dieses Reagenz enthält Luminol und Sauerstoff-Radikale, welche mit der HRP folgendermaßen reagieren:



Die Detektion der entstehenden Photonen erfolgte als sog. Gelbanden mittels des Biorad GS-800 Imaging Densitometers und entsprechender Software (Kap. 3.2.15).

3.2.9. MTS-Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Zellzahl im Rahmen eines Proliferationsassays wurde das CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega verwendet. Das Reagenz besteht aus der Tetrazolium-Verbindung 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium („MTS“) und einem

Elektronenkoppler (Phenazine Ethosulfat, PES), die in einer Lösung verwendet werden. Die MTS Tetrazolium Komponente wird im Assay durch NADH- bzw. NADPH-abhängige Oxidoreduktasen metabolisch aktiver Zellen in ein orange-braunes Formazanprodukt reduziert, das ein Absorptionsmaximum bei 490 nm besitzt (118). Die gemessene Lichtabsorption verhält sich im optimalen Messfenster proportional zu der Anzahl an Zellen im Ansatz. Zu Beginn des jeweiligen Experiments wurden 5×10^4 Zellen pro Well in $100 \mu\text{l}$ Medium ausgesät. Die Absorption (OD) wurde nach einer entsprechenden Inkubationszeit in Triplikaten in einem 96-well Plattenleser nach Zugabe von $20 \mu\text{l}$ des MTS-Reagenz für die letzten 2 h der Inkubationszeit ausgelesen und gegen eine Blank-Probe (nur Kulturmedium + MTS-Reagenz) normalisiert.

3.2.10. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (*engl. fluorescence-activated cell scanning, FACS*) stellt eine automatisierte Licht- und Fluoreszenzmikroskopie an Einzelzellen im kontinuierlichen Probendurchfluss dar. Hierzu wird die Zellsuspension in einer Flüssigkeitskapillare unter Druck vereinzelt und an einem Detektor vorbeigeführt. Als Lichtquelle dient ein Laser. Mittels Detektoren werden die entstehenden Lichtsignale (Forward-Scatter, FSC entspricht Zellgröße, Sideward-Scatter, SSC entspricht Zellgranularität) oder Fluoreszenzsignale von Fluorochrom-markierten Antikörpern gemessen, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wurden. So lassen sich unterschiedlichste Oberflächenantigene oder – nach Permeabilisierung der Zellmembran – auch lösliche zytoplasmatische Antigene detektieren. Mittels des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FACS Canto von Becton Dickinson lassen sich bis zu 6 unterschiedliche Fluorochrome gleichzeitig detektieren (sog. multiparametrische Durchflusszytometrie). Das von den Fluorochromen ausgehende Licht wird über eine Reihe von Filtern in die einzelnen Farben aufgetrennt und in elektronische Signale übersetzt. Diese Signale werden digitalisiert an einen Computer übertragen, wo die Datenakquise, Korrektur der spektralen Überlappung und Auswertung mit der u.g. Software durchgeführt wurde. Die Daten wurden schließlich mittels Flow-Jo in Form von Histogrammen oder sog. Dot-Plots dargestellt. Der Vorteil der Methode liegt insbesondere in der Erfassung großer Zellzahlen und der gleichzeitigen Differenzierung von Antigenexpression auf Einzelzellebene. So ist auch die Erfassung seltener Ereignisse (schwache Expression bzw. nur Expression in einer Subpopulation) mit hoher Sensitivität möglich. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FACS-Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt. Zur Permeabilisierung und Fixierung intrazellulärer Antigene wurde das Transcription Factor Buffer Set von BD Pharmingen nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurden die vorbehandelten Zellen zunächst in PBS gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 1 ml des 1x Fix/Perm Puffers und Inkubation bei 4°C im Dunkeln für 40 min.

Anschließend wurden die Proben erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 1 ml des 1x Perm/Wash Puffers gewaschen. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl des Perm/Wash Puffers resuspendiert und mit 5 µl des PE Mouse anti-Xbp1s Antikörpers gefärbt. Als Isotypkontrolle diente ein PE Mouse IgG1κ-Antikörper (BD). Nach der Inkubation für 40 min bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen erneut mit dem Perm/Wash Puffer gewaschen und in 350 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte direkt im Anschluss im Durchflusszytometer, die Darstellung der Xbp1s-Expression mittels Histogramm.

Die Annexin-PI-Messungen zur Detektion von Apoptose und Zelltod erfolgten mittels des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen, das ebenfalls nach Herstellerangaben angewendet wurde. Kurz zusammengefasst wurden die verwendeten Zellsuspensionen über unterschiedlich lange Zeiträume in 6-well Platten behandelt. Nach dem Behandlungszeitraum wurden je nach Versuchsbedingung 1–2 x 10⁶ Zellen in 15 ml Falcons überführt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl Annexin-Bindungs-Puffer resuspendiert und in FACS-Tubes überführt. Daraufhin wurden jeweils 5 µl Annexin und 2 µl PI (50 µg/ml) der Probe hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden den Proben 400 µl Annexin-Bindungs-Puffer zugefügt und diese unmittelbar durchflusszytometrisch analysiert. Im Rahmen der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid, das normalerweise exklusiv in der inneren Lipidschicht der Zellmembran vorkommt, in das äußere Blatt der Zellmembran geflippt. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid-Bindungsprotein, das eine hohe Affinität für PS aufweist. Die Bindung von Annexin V an PS ist ein typisches frühes Ereignis im Rahmen der Apoptose (119). Propidiumiodid ist ein DNA-Interkalator, der jedoch nur in tote Zellen mit defekter Zellmembran eindringen und an ihre DNA-Fragmente binden kann. Entsprechend können Zellen einer Suspension mittels Dot-Plot in eine viable Population (Annexin-/PI-), eine apoptotische Population (Annexin+/PI-) und eine tote Population (Annexin+/PI+) unterteilt werden. In der Regel werden nur wenige Annexin-/PI+ tote Zellen nachweisbar sein, die eine Population widerspiegeln, welche z.B. durch Nekrose oder andere Mechanismen des Zelltodes abgestorben sind.

3.2.11. NOD/SCID- γ_c^{null} (NSG) Xenograft Mausmodell

Alle in vivo Versuche wurden durch die lokalen Tierschutzbehörden der Universitätsmedizin Mainz sowie durch das Landesuntersuchungsamt des Landes Rheinland-Pfalz genehmigt (AZ LUA 23177-07/G10-1-053) und entsprechend der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Die Mäuse wurden durch die AG Theobald/Munder vom translationalen Tierforschungszentrum der Universitätsmedizin Mainz (*engl. Translational*

Animal Research Center, TARC) erworben. Alle Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien für Tierhaltung des TARC und der FELASA unter normalen Bedingungen gehalten. Mit Hilfe eines NOD/SCID- γ_c^{null} Mausmodells lassen sich in besonders einfacher Weise Zellen eines fremden Organismus (Xenograft) in den Mausorganismus einführen. Bei diesem Modell wird die SCID-Mutation (*engl. severe Combined Immunodeficiency*, schwerer kombinierter Immundefekt) mit einer homozygoten Interleukin-2-Rezeptor-gamma Ketten-Mutation vor einem genetischen NOD-Hintergrund kombiniert (120). In den Tieren bilden sich keine funktionellen Lymphozyten (T-/B-Zellen) aus. Zudem besteht eine deutlich eingeschränkte Produktion von Cytokinen wie Interferon- γ oder IL-6 bei eingeschränkten Funktionen von Zellen des angeborenen Immunsystems sowie von NK-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Mausmodell hervorragend zum Engraftment von humanen Xenografts eignet (120). Die Anwendbarkeit des NOD/SCID- γ_c^{null} Mausmodells als i.v. Empfänger für humane Myelomzellen wurde bereits seit 2004 mit Erfolg *in vivo* getestet (121). Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit einer Ganzkörperbildgebung (Mikro-CT) für Mäuse wurden in den hier gezeigten *In-vivo* Versuchen unserer Arbeitsgruppe Xenograft-Tumoren s.c. an der Flanke der Mäuse injiziert. Diese Methode eignet sich in besonderer Weise zur raschen *in vivo* Testung neuer potentieller Myelomtherapien (121). Hier ließ sich das Tumolvolumen mittels Messlehre einfach nach folgender Formel (V =Volumen, L =Länge, B =Breite) berechnen:

$$V = L \times B^2$$

An Tag -9 bzw. -7 erfolgte die Injektion von 10×10^6 U266- bzw. 2×10^6 NCI-A2-Zellen in die rasierte Flanke von ca. 6–10 Wochen alten NSG Mäusen ($n=4$ –6/Gruppe). ADI-PEG 20 diente in sämtlichen *In-vivo*-Experimenten der Depletion von L-Arginin. Hierzu wurde eine Dosis von 5 IU/Injektion gelöst in 100 μ l PBS zweimal pro Woche i.p. verabreicht (79, 122). Bortezomib (12,5 μ g/Injektion i.p. gelöst in 100 μ l PBS) wurde ebenfalls zweimal pro Woche zusammen mit ADI-PEG 20 injiziert. L-Canavanin (10 mg/Injektion gelöst in 100 μ l PBS intratumoral, i.t.) wurde dreimal pro Woche injiziert (montags und freitags kombiniert mit ADI-PEG 20). Die Dosierung von Bortezomib (0,6 mg/kg KG) wurde der Literatur entnommen, die Dosis für L-Canavanin im Rahmen der durchgeführten Pharmakokinetik-Experimente ermittelt und schließlich aufgrund der relativ großen benötigten Menge bei einer maximalen Löslichkeit von 100 mg/ml auf 10 mg/Injektion festgelegt (123). Im Rahmen der pharmakokinetischen Testungen sind die exakten Behandlungsregime jeweils im entsprechenden Ergebnisteil angegeben (Kapitel 4.2 bis 4.4). Als Kontrolle („Mock“) diente die Injektion von äquivalenten Volumina PBS i.p. bzw. i.t. (100 μ l). Bei ersten Anzeichen von tumorbedingten Symptomen (z.B. Nekrose, Ulzeration, signifikante Allgemeinsymptome) oder einem Tumolvolumen $>1500 \text{ mm}^3$ wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet und die Tumoren explantiert.

3.2.12. Explantation und Verarbeitung von ex-vivo Tumorgewebe

Zur weiteren histologischen Verarbeitung wurden die explantierten Tumoren in 4%ige Formalinlösung eingelegt und an Claudia Braun von der Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz übergeben. Für weitere molekularbiologische Analysen wurde ein Teil der Tumoren mittels sterilem Skalpell abgetrennt und in 0,5 mm große Gewebsfragmente zerkleinert. Im Anschluss erfolgte die sterile Filtration durch einen 100 µm Cell Strainer um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Daraufhin wurde das erhaltene Tumorzellhomogenisat entweder in entsprechendem Zellkulturmedium für weitere Versuche resuspendiert, zur durchflusszytometrischen Analyse in PBS aufgenommen oder mittels Proteinlysepuffer zum Western Blotting nach obigem Protokoll lysiert.

3.2.13. Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen aus Mäuseplasma

Zur Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen aus Mäuseplasma erfolgte die Blutentnahme über eine Schwanz- oder Mandibularvene. Die Probe wurde in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei 850 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Plasma wurde dann vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen und residuelle Zellbestandteile in einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500 g, 4 °C über 10 min) abgetrennt. Bei der Messung aus Tumorgewebe erfolgte zunächst eine mechanische Gewebekomogenisierung mittels Skalpell und Cell Strainer wie oben beschrieben. Nach Aliquotierung erfolgte die Messung der Aminosäurekonzentration durch Alice Habermeier (AG Prof. Dr. Ellen I. Closs, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC). Hierbei wurden zur Quantifizierung von L-Arginin und L-Canavanin 2–10 µl Plasma mit 2-4 nmol N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) als internem Standard versetzt und nach Zugabe von 0,9 ml PBS auf eine Oasis MCX Säule gegeben. Diese wurde im Anschluss mit je 1 ml 0,1 M NaCl und Methanol gewaschen. Arginin und Canavanin wurden im Anschluss mit einem Methanol:Wasser:Ammoniak-Gemisch (5:4:1) eluiert, vakuumgetrocknet und in 0,2 ml Natriumboratpuffer resuspendiert. Zur Quantifizierung von L-Citrullin wurden 2–10 µl Plasma 5 nmol Homoserin (L-HS) und 1 nmol L-NMMA zugegeben. Es erfolgte eine Proteinpräzipitation mit 70 % Ethanol. Der Überstand wurde durch Vakuumzentrifugation getrocknet und ebenfalls in 0,2 ml Boratpuffer resuspendiert. Die vollständig automatisierte Bestimmung der Aminosäurekonzentration durch OPA-Derivatisierung und Fluoreszenz-Detektion mittels eines HPLC-Instruments (Bischoff) wurde bereits in der Literatur beschrieben (124).

3.2.14. Histologie & Immunhistochemie (IHC)

Zum Nachweis von Tumorantigenen wie ASS1 oder Caspase-3 wurden explantierte Maustumore in 4%iger Formalinlösung für mindestens 12 h fixiert und zur weiteren

Verarbeitung an die Histologie Core Facility der Universitätsmedizin Mainz (Claudia Braun) übergeben. Kurz zusammengefasst erfolgte hier die Herstellung von histologischen Dauerpräparaten mittels aufsteigender Alkoholreihe (4 % Formalin, Isopropanol 70 %, 96 %, 100 %) und Eindeckung mit Xylol sowie im Anschluss das Einblocken in heißem Paraffin. Nach Anfertigung von 2 µm Gewebeschnitten mittels Mikrotom und Trocknung für 1 h im Brutschrank bei 60 °C erfolgte die Entparaffinierung (Xylol, Isopropanol 100 %, 96 %, 70 %, ddH₂O) und im Anschluss die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin als Standardfärbung (entsprechend Hämatoxylin and Eosin Stain Kit, Vector Laboratories) bzw. den entsprechenden Antikörpern im Rahmen der IHC. Zur letzteren Methode erfolgte eine Antigen-Demaskierung in Citratpuffer im Dampfgerar für 40 min. Nach Abkühlung erfolgten vor und zwischen den folgenden Schritten jeweils zwei Waschschrirte für 5 min mit TBST-Waschpuffer. Zunächst wurden überschüssige Antigene mit Peroxidase für 5 min, mit Avidin/Biotin Lösung für 15 min und in 5 % Ziegenserum in TBST für 5 min blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (s. Tabelle 9) für 1 h. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit anti-Rabbit Sekundärantikörper für eine weitere Stunde. Abschließend wurde für 30 min mit ABC-Komplex inkubiert und schließlich mit 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) entwickelt. Isolierte Färbungen mit dem Sekundärantikörper wurden zur Kontrolle der spezifischen Bindung der Primärantikörper eingesetzt und in parallel gefärbten Gewebeschnitten stets mitgeführt. Nur bei Nachweis einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers an das Zielantigen wurden die Schnitte zur Auswertung verwendet. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Motic AE2000 Mikroskop mit Moticom 10+ Kamera Dokumentationssystem. Es wurden repräsentative Abschnitte der jeweiligen Tumoren dokumentiert und mindestens 200 Zellen pro Schnitt zur Auswertung ausgezählt.

3.2.15. Verwendete Software

Im Rahmen der FACS-Messungen wurde das Programm FACS Diva (Becton Dickinson) verwendet. Zur Analyse der FACS-Daten kam FlowJo der Firma FlowJo LLC zum Einsatz. Im Rahmen der Western Blot-Auswertung wurde die Software Quantity One (BioRad) am GS-800 Densitometer zur Auswertung genutzt. Am Lichtmikroskop wurde die Motic Images Plus 3.0 Software zur Bildspeicherung sowie für Messungen und zur Auszählung der Zellzahlen genutzt. Zur Datenspeicherung und -analyse und statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel und Prism 8 (Graph Pad) verwendet. Die graphische Gestaltung der Daten erfolgte mittels Photoshop CC 2019 (Adobe) sowie Graphic (Picta Inc).

3.2.16. Statistik

Im Rahmen der statistischen Berechnungen der In-vitro-Experimente wurden in dieser Arbeit die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (wenn nicht

anders angegeben) mittels Graph Pad Prism 8 berechnet. Hierzu diente ein ungepaarter Student's T-Test. Zur Signifikanzberechnung der Überlebenskurven der In-vivo-Experimente wurde der Mantel-Cox-Test angewendet. Die Hazard Ratio wurde nach Mantel-Haenszel berechnet. Folgende Signifikanzniveaus werden in dieser Arbeit angegeben:

- ns $p > 0,05$ nicht signifikant
- * $p \leq 0,05$ signifikant
- ** $p \leq 0,01$ hoch signifikant
- *** $p \leq 0,001$ höchst signifikant

4. Ergebnisse

4.1. In-vitro-Untersuchungen zur Arginindepletion im Multiplen Myelom

4.1.1. MTS-Assay

Um die Auswirkungen einer Arginindepletion auf Myelomzellen in vitro zu untersuchen, wurde mit unterschiedlichen Myelomzelllinien eine Zellkultur angelegt, die argininfreies Zellkulturmedium enthielt. Die Zellen wurden für eine Zeitdauer von 36 h inkubiert und über die letzten 2 h des Experiments einem MTS-Assay zur Messung der metabolischen Aktivität der Zellen unterzogen. Da die metabolische Aktivität der Ansätze im Wesentlichen durch die Zellzahl determiniert ist, konnte über die Menge des entstandenen Formazan-Produktes, gemessen mittels der Zunahme der Absorption bei 490 nm im Vergleich zu zellfreiem Medium, indirekt auf die Zellzahl und damit die Proliferationsrate der Zellen über den Experimentalzeitraum geschlossen werden. Aufgrund des relativ starken Effekts von Bortezomib auf die MTS-Aktivität erfolgte eine Inkubation mit 2 nM Bortezomib in den entsprechenden Ansätzen nur über die letzten 12 h des Experiments. Folgende Ansätze wurden pipettiert: Mock-Kontrolle (Zugabe von 2 % DMSO in argininhaltiges Vollmedium), argininfreies Medium, argininhaltiges Medium + 2 nM Bortezomib (gelöst in DMSO, für die letzten 12 h der Inkubationszeit), argininfreies Medium + 2 nM Bortezomib (gelöst in DMSO, für die letzten 12 h der Inkubationszeit). Es zeigte sich in allen Zelllinien eine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität unter Argininmangel sowie Behandlung mit Bortezomib im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Abbildung 5). Die Zugabe von 2 nM Bortezomib zu argininfreiem Medium führte in U266-, NCI-H929- und RPMI-8226-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der metabolischen Aktivität im Vergleich zur alleinigen Bortezomib-Behandlung. Dieser Effekt zeigte in OPM2 zumindest einen Trend zur Signifikanz, KMS-12-BM-Zellen zeigten keine weitere Abnahme der Absorption im Vergleich zur alleinigen Bortezomib-Behandlung. Möglicherweise liegt dies in einer bereits maximalen Reduktion der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter alleiniger Bortezomib-Behandlung begründet und könnte durch ein alternatives Expositionsregime aufgelöst werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse der durchgeführten MTS-Assays jedoch auf eine Verstärkung der zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekte der Proteasomeninhibition mit Bortezomib durch gleichzeitigen Argininentzug in Myelomzellen hin.

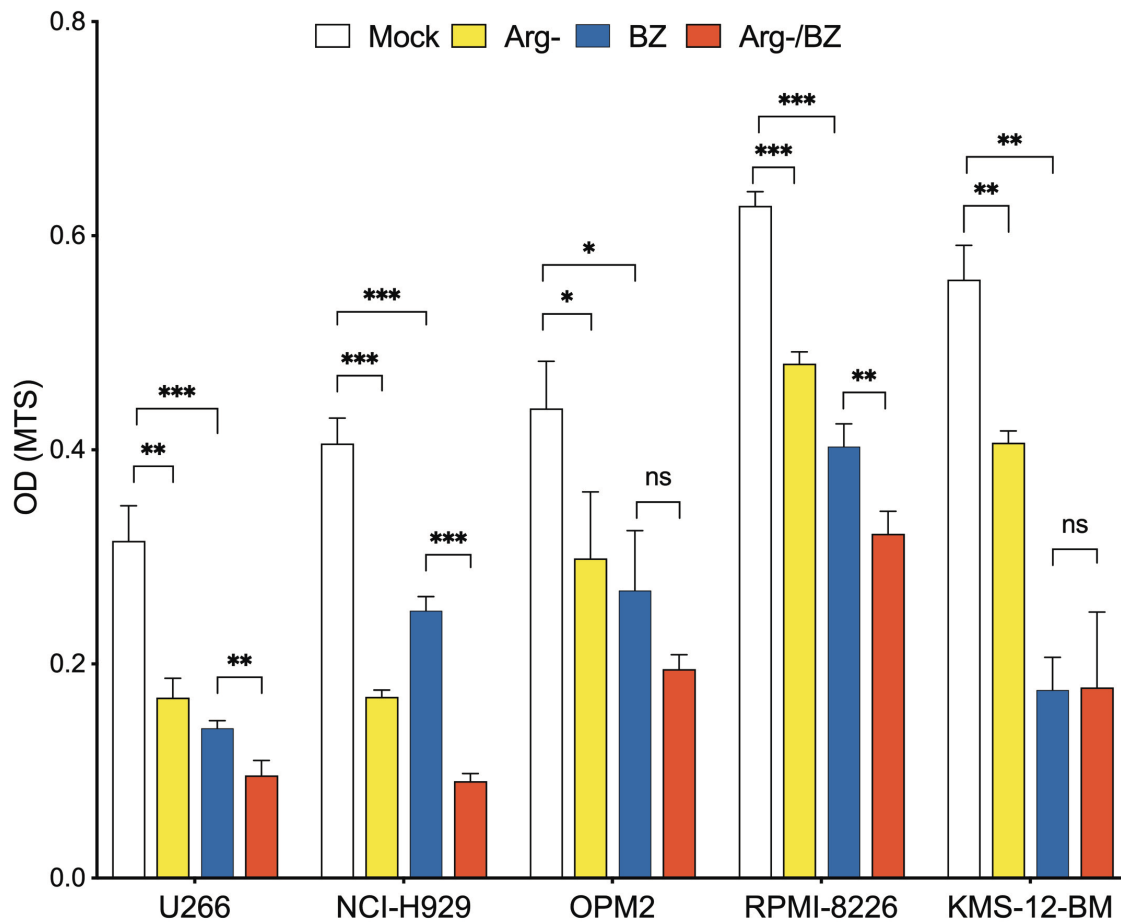


Abbildung 5: Proliferationsassay (MTS) verschiedener Myelomzelllinien. Es erfolgte eine Inkubation verschiedener Myelomzelllinien über 36 h unter Kontrollbedingungen (Mock = argininhaltiges Medium + 2 % DMSO), Arginindefizienz (Arg-), in argininhaltigem Medium mit Zugabe von 2 nM Bortezomib für die letzten 12 h der Inkubationszeit (BZ) sowie in argininfreiem Medium mit Zugabe von 2 nM Bortezomib für die letzten 12 h der Inkubationszeit (Arg-/BZ). Aufgetragen ist jeweils die mittlere metabolische Aktivität +/- Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente gemessen als Absorption (OD) bei 490 nM. Jede einzelne Versuchsbedingung wurde in Triplikaten pipettiert und deren Mittelwert für die nachfolgende statistische Auswertung verwendet.

4.1.2. Viabilitätstestungen

Zur weiteren Differenzierung zytostatischer von zytotoxischen Effekten führten wir gezielte Viabilitätstestungen durch. Um apoptotische Zellen von toten Zellen zu unterscheiden, erfolgte eine Färbung sowohl mit Annexin als auch mit Propidiumiod mit unmittelbar anschließender durchflusszytometrischer Analyse („FACS“). Die Auswertung erfolgte nach Anzahl verbleibender viabler Zellen (Annexin-/PI-) unter den verschiedenen Versuchsbedingungen [Mock: Zugabe von 2 % DMSO in argininhaltigem Medium, Arg-: argininfreies Medium, BZ: 10 nM (12 h) bzw. 2 nM (48 h, 72 h) Bortezomib, Arg-/BZ: argininfreies Medium + Bortezomib 10 nM (12 h) bzw. 2 nM (48 h, 72 h)]. Hierbei zeigte sich in ersten Experimenten überraschenderweise zunächst ein protektiver Einfluss von Argininmangel auf die Zellviabilität nach Behandlung mit Bortezomib. Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots von U266-Zellen nach 12, 48 bzw. 72 h Behandlungsdauer (Abbildung 6). Ein alleiniger Argininmangel bedingte keine wesentliche Zytotoxizität in den untersuchten Myelomzellen, auch nicht nach

prolongierter Behandlung über bis zu 72 h. Interessanterweise scheint sich die protektive Wirkung des Argininmangels auf die Bortezomib-induzierte Zelltodinduktion mit zunehmender Behandlungsdauer zu relativieren. Dies könnte an einem synergistischen pro-apoptotischen Effekt bei protrahiertem Proteinstress liegen, wie er durch eine Aminosäuredepletion ausgelöst werden kann.

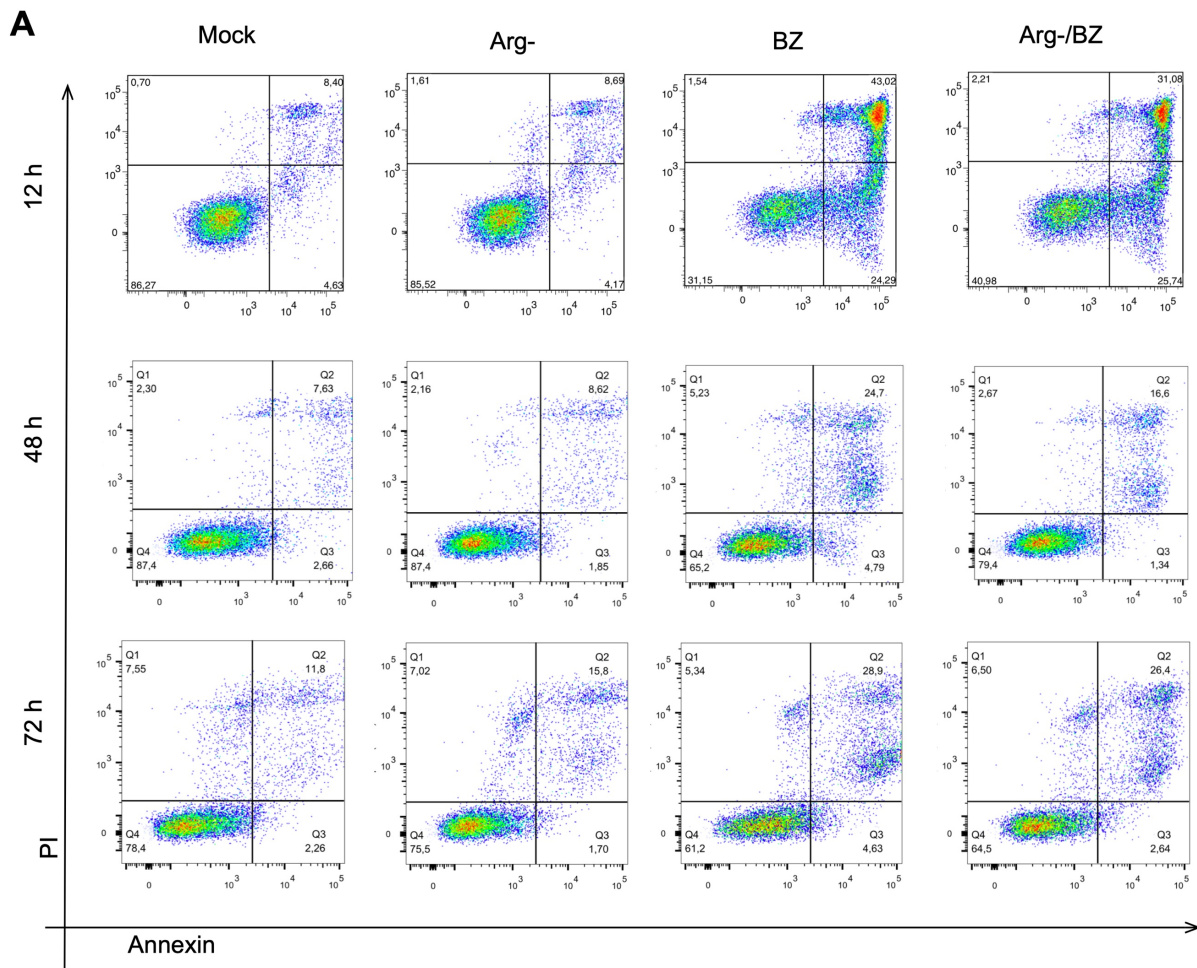


Abbildung 6: Untersuchung der Zellviabilität unter simultaner Arginindepletion und Proteasomeninhibition. Hier dargestellt sind Dot Blots nach Annexin/PI-FACS von U266-Zellen als repräsentatives Beispiel für sämtliche der untersuchten Myelomzelllinien ($n=5$). Die Zellen wurden für die dargestellten Zeiträume in 2 % DMSO (Mock), argininfreiem Medium (Arg-), Bortezomib (BZ) in Normalmedium bzw. in Argininmangel (Arg-/BZ) inkubiert und anschließend nach Färbung mit Annexin-FITC sowie PI einer FACS-Analyse zugeführt. Anmerkung: Aufgrund der zunehmenden toxischen Effekte bei prolongierter Behandlung wurde die Bortezomibkonzentration von 10 nM (12 h) auf 2 nM (48 h, 72 h) reduziert.

Zur Testung dieser Hypothese präinkubierten wir verschiedene Myelomzelllinien in den nächsten Versuchen zunächst über 96 h in argininhaltigem oder argininfreiem Medium und behandelten im Anschluss über 24 h mit 2 nM Bortezomib bzw. DMSO wie oben angegeben. Bei diesem Versuchsansatz zeigte sich weiterhin nur eine geringe zytotoxische Wirkung von Argininmangelbedingungen auf Myelomzellen, nur in der U266-Zelllinie kam es zu einer signifikanten Reduktion viable Zellen im Argininmangel nach 120 h (Abbildung 7). Bortezomib

zeigte in allen Ansätzen die bekannte zytotoxische Wirkung auf Myelomzellen. Im Gegensatz zur synchronen Behandlung zeigten sich nach verlängerter Exposition im Argininmangelmilieu allerdings ausgeprägte synergistische Effekte mit Bortezomib. Die Anzahl verbleibender viabler Zellen ließ sich im Kombinationsansatz im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Bortezomib in allen Zelllinien hochsignifikant reduzieren. Offensichtlich scheint die Vorbehandlung in argininfreiem Medium die Myelomzellen für eine Therapie mit Bortezomib zu sensibilisieren. Dies könnte in der Tat an einer Induktion von Proteinstress im Zellinneren liegen, da der prolongierte Entzug der proteinogenen Aminosäure Arginin zur Fehlfaltung von Proteinen mit konsekutivem ER-Stress führen kann (93, 125). Eine kurzfristige etwa < 72 h anhaltende alleinige Arginindepletion hingegen scheint eher zytoprotektive Zellprogramme zu induzieren.

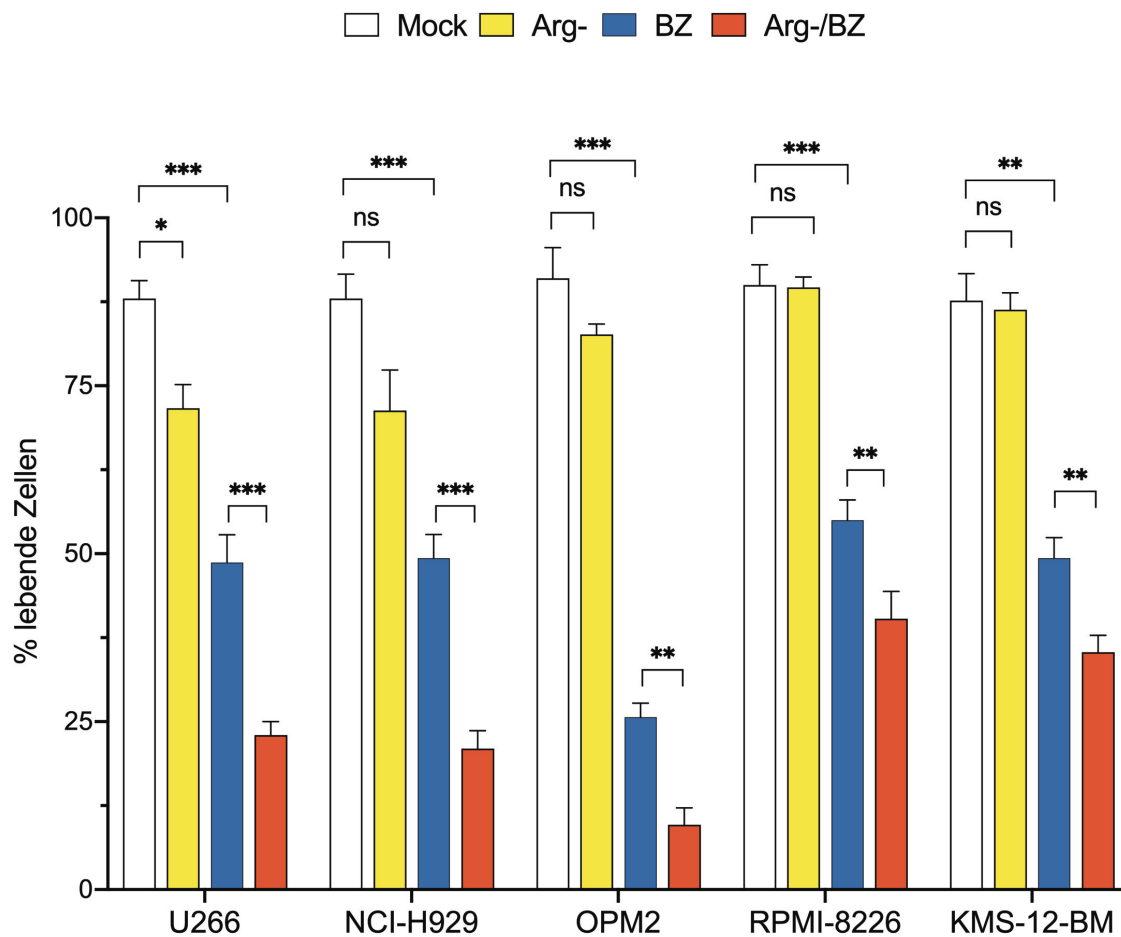


Abbildung 7: Zellviabilität verschiedener Myelomzelllinien nach Behandlung mit Bortezomib unter prolongiertem Argininmangel. Sämtliche Zellen wurden über 96 h in argininhaltigem bzw. argininfreiem Medium präinkubiert und im Anschluss je nach Versuchsansatz wie folgt behandelt: Mock: argininhaltiges Medium + 2 % DMSO, Arg-: argininfreies Medium, BZ: 2 nM Bortezomib in argininhaltigem Medium, Arg-/BZ: 2 nM Bortezomib in argininfreiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

4.1.3. Expression von ASS1 im Multiplen Myelom

Zur In-vivo-Depletion der Aminosäure Arginin werden rekombinante Enzyme wie ADI-PEG 20 oder Arginase verwendet. Beim Abbau von Arginin durch die Arginin Deiminase entstehen Citrullin und Ammoniak. Zahlreiche Körpergewebe sind bei Argininmangel auf vorhandenes Citrullin zur intrazellulären Resynthese von Arginin angewiesen. Tumorzellen fehlt häufig eines der hierfür notwendigen Enzyme, die Argininosuccinat-Synthetase 1 (ASS1), was sie empfänglich für arginindeprivierende Therapien macht. Die oben dargestellten In-vitro-Ergebnisse wurden mit einem artifiziell herbeigeführten Argininmangel durchgeführt, ohne dass Citrullin im Kulturmedium vorhanden war. Um abschätzen zu können, ob eine Arginindepletion auch in vivo zu zytotoxischen Effekten führen kann, führten wir Expressionsanalysen von ASS1 in unterschiedlichen Myelomzelllinien durch (Abbildung 8). Hierbei zeigte sich in drei der fünf untersuchten Linien keine wesentliche ASS1-Expression (U266, KMS-12-BM, OPM2) auf Proteinebene. RPMI-8226 konnte reproduzierbar als stark ASS1 exprimierende Zelllinie identifiziert werden. NCI-H929 zeigen ein schwaches aber nachweisbares Expressionsniveau. Die ASS1-exprimierende Zelllinie A431 diene als Positivkontrolle (126).

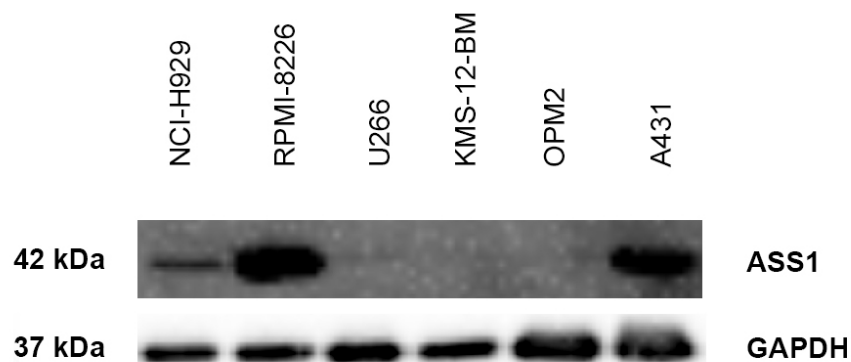


Abbildung 8: Expression des ASS1 Proteins in verschiedenen Myelomzelllinien. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Um eine Induktion des ASS1 Proteins unter Argininentzug zu überprüfen, wurden die o.g. Zelllinien über unterschiedliche Zeiträume in argininfreiem Medium inkubiert und im Anschluss lysiert (Abbildung 9). U266 (A) und NCI-H929 (B) zeigten auch nach einer Inkubationsdauer von bis zu 96 h keine relevante Zunahme des Expressionsniveaus von ASS1. KMS-12-BM (C) zeigten eine signifikante Reexpression des ASS1 Proteins unter Argininmangel bereits nach 24 h. OPM2 zeigten in den unterschiedlichen Versuchen eine inkonstante Expression von ASS1 unter argininhaltigen Kulturbedingungen. Diese könnten Folge einer bereits durch geringen Zellkulturstress (z.B. in Form von beginnendem Nährstoffmangel) bedingten

Induktion des ASS1 Promotors sein. Eine differentielle epigenetische Modulation der ASS1-Expression ist in der Literatur beschrieben (73). Unter Argininmangel zeigen OPM2-Zellen eine konstante Expression des ASS1 Proteins. RPMI-8226-Zellen zeigen keine weitere Steigerung ihres ohnehin bereits unter Normalbedingungen extrem hohen ASS1-Expressionslevels (Daten nicht gezeigt).

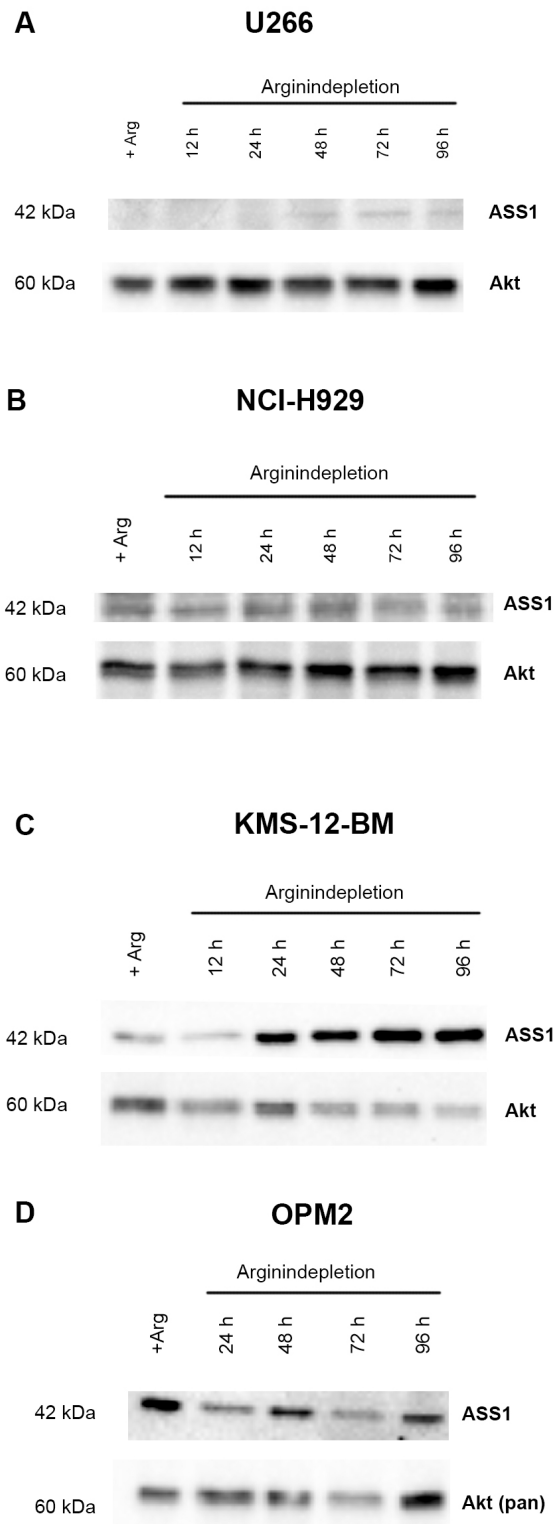


Abbildung 9: Einfluss der Verfügbarkeit von Arginin auf die Expression des ASS1 Proteins in verschiedenen Myelomzelllinien. Die unterschiedlichen Myelomzelllinien wurden für die angegebenen Zeiträume unter Arginin-defizienten Kulturbedingungen oder in argininhaltigem Medium (Arg+) kultiviert. Gesamtzelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten. Akt diente jeweils als Ladekontrolle.

4.1.4. Argininauxotrophie von Myelomzellen

Um die funktionellen Auswirkungen der ASS1-Expression auf die Proliferation bzw. Viabilität von Myelomzellen zu untersuchen, führten wir erneut MTS-Assays durch. Hierbei wurden die verschiedenen Myelomzelllinien für 36 h in argininfreiem RPMI-1640-Medium unterschiedlichen Argininkonzentrationen (1 mM, 20 μ M, 0 M) ausgesetzt. 20 μ M entspricht hierbei einer deutlich reduzierten Argininkonzentration, wie sie physiologischerweise in Körpergeweben unter Argininmangel auftreten kann. Als weitere Experimentalbedingung wurde ein Ansatz mit argininfreiem Medium unter Zusatz von Citrullin im Überschuss (1 mM) gewählt, um die Auswirkungen einer möglichen intrazellulären Resynthese über ASS1/ASL auf die metabolische Aktivität der Zellen zu beurteilen (Abbildung 10). Jeder Ansatz wurde in den letzten 12 h des Experimentes mit 1 nM Bortezomib bzw. 1 % DMSO behandelt.

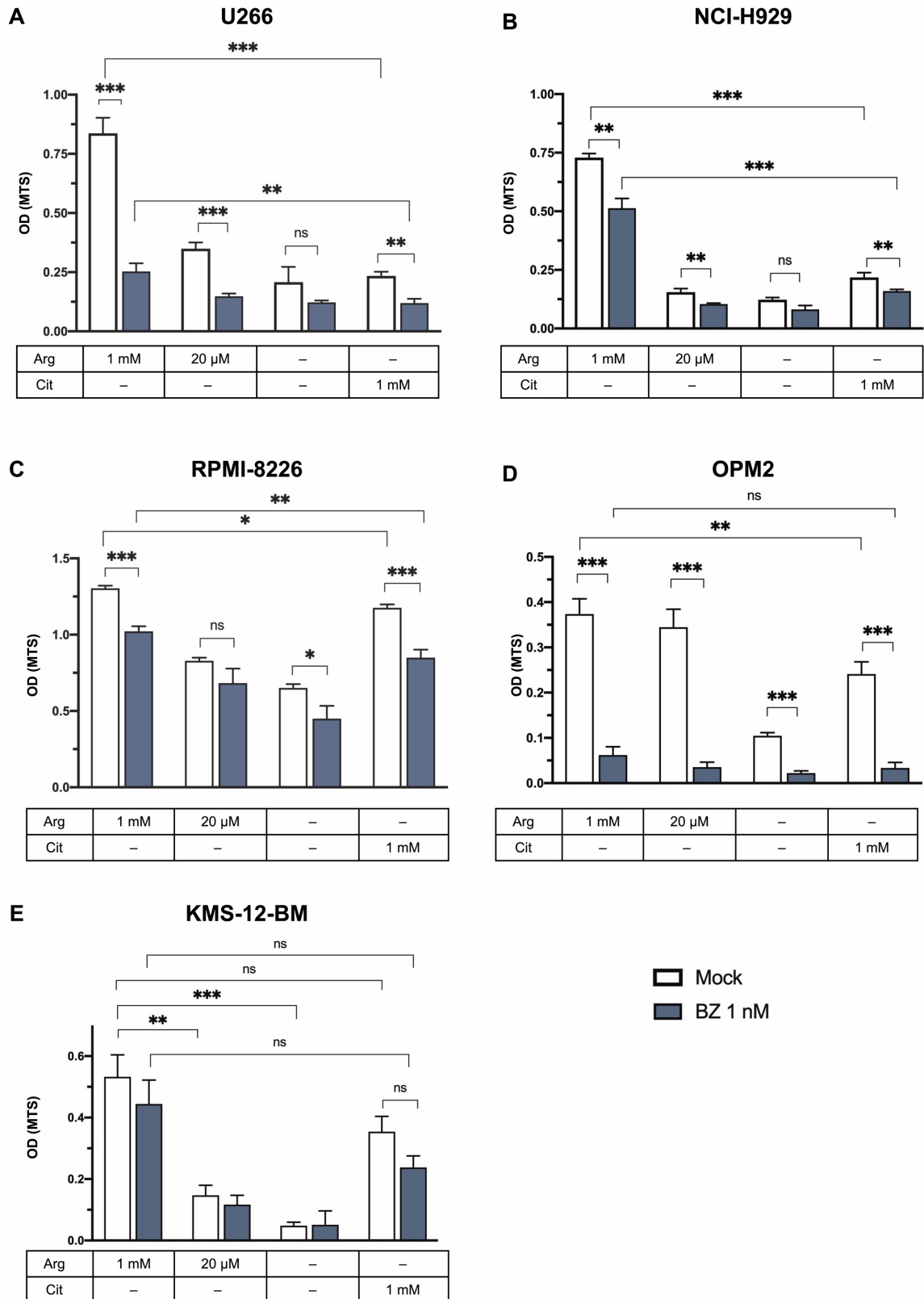


Abbildung 10: Nachweis der Argininauxotrophie von Myelomzelllinien. Die hier gezeigten Myelomzelllinien wurden für 36 h unterschiedlichen Arginin- bzw. Citrullinkonzentrationen ausgesetzt und anschließend in MTS-Assays untersucht. Mock: Zugabe von 2 % DMSO während der letzten 12 h des Experiments. BZ: Zugabe von 1 nM Bortezomib während der letzten 12 h des Experiments. Aufgetragen ist jeweils die mittlere metabolische Aktivität \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente gemessen als Absorption (OD) bei 490 nm. Jede einzelne Versuchsbedingung wurde in Triplikaten pipettiert und deren Mittelwert für die nachfolgende statistische Auswertung verwendet.

Sowohl in Gegenwart von Arginin als auch unter ausgeprägter Argininknappheit (20 μ M) zeigte sich mit Ausnahme der KMS-12-BM Linie eine additive Wirkung von Bortezomib auf die MTS-Aktivität. Insbesondere in Myelomzellen mit fehlender oder schwacher ASS1-Expression wie U266, NCI-H929 und KMS-12-BM wurde die metabolische Zellaktivität nach Verarmung des Kulturmediums auf 20 μ M Arginin deutlich eingeschränkt (A, B, E) – dieser Effekt ist in ASS1-positiven RPMI-8226- und OPM2-Zellen deutlich schwächer ausgeprägt (C, D). Die stärksten Auswirkungen auf die metabolische Aktivität sind in allen Zelllinien unter vollständiger Argininfreiheit und gleichzeitiger Bortezomib-Behandlung zu sehen. Dieser Effekt lässt sich in ASS1-positiven Myelomzelllinien (RPMI-8226) sowie Zelllinien, die die Möglichkeit zur signifikanten Reinduktion von ASS1 im Argininmangel besitzen (KMS-12-BM, OPM2) nach Zugabe von 1 mM Citrullin zum Medium verhindern. Insgesamt ließ sich durch diese Versuche die vollständige Abhängigkeit bestimmter Myelomzelllinien (U266, NCI-H929) von extrazellulärem Arginin zeigen. Sie sind als argininauxotroph zu bezeichnen und eignen sich daher prinzipiell für die präklinische Testung arginindeprivierender Therapiestrategien in vivo.

4.1.5. UPR-Induktion durch Argininmangel

Es konnte u.a. durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Argininmangel zur Induktion von Proteinstress in humanen T-Zellen sowie verschiedenen soliden Tumorzelllinien führen kann (92, 93). Als wesentlicher zellulärer Stressmechanismus wurde hierbei die Unfolded Protein Response (UPR) ausgemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die IRE1-Xbp1-Achse sowie die Aktivierung von PERK anhand der Phosphorylierung des Substrats eIF2 α unter Argininmangel über einen Zeitraum von bis zu 96 h in U266 Myelomzellen untersucht (Abbildung 11). Als Kontrolle diente normales RPMI-Medium. Es zeigte sich eine Zunahme des Xbp1-Splicings durch IRE1 mit einem Maximum nach 48 h sowie eine deutliche Phosphorylierung von eIF2 α , die im Verlauf nach 72-96 h wieder abnahm. Der ER-Stress-Induktor Tunicamycin diente als Positivkontrolle.

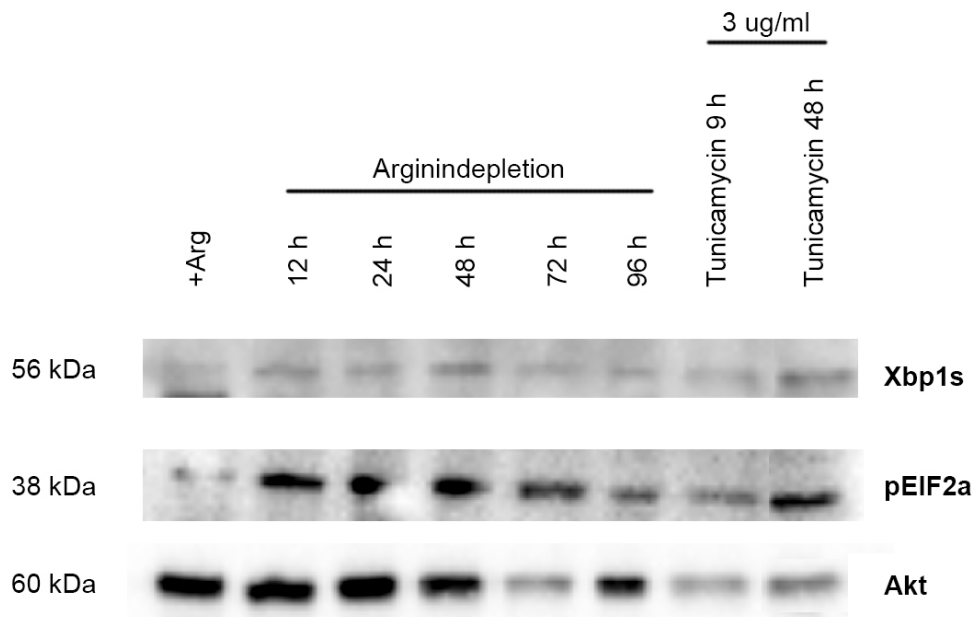


Abbildung 11: UPR-Induktion durch Argininmangel in Myelomzellen. U266-Zellen wurden über unterschiedlich lange Zeiträume in argininfreiem Medium oder Normalmedium (Arg+) kultiviert. Eine Behandlung mit dem klassischen UPR-Induktor Tunicamycin diente als Positivkontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten. Akt diente als Ladekontrolle.

Aufgrund der relativ schwachen Darstellung von Xbp1s im Western Blot erfolgte zudem ein Versuch, den Transkriptionsfaktor Xbp1s nach Permeabilisierung der Zellmembran mittels intrazellulärer FACS-Analyse nachzuweisen (Abbildung 12). Hierbei wurden der UPR-Induktor Tunicamycin (3 µg/ml) bzw. der UPR-Inhibitor Toyocamycin (3 µM) als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet, um das Proteinstressniveau in U266-Zellen ausgehend von normalen Zellkulturbedingungen (Arginin im Überschuss) zu modulieren (linkes Panel).

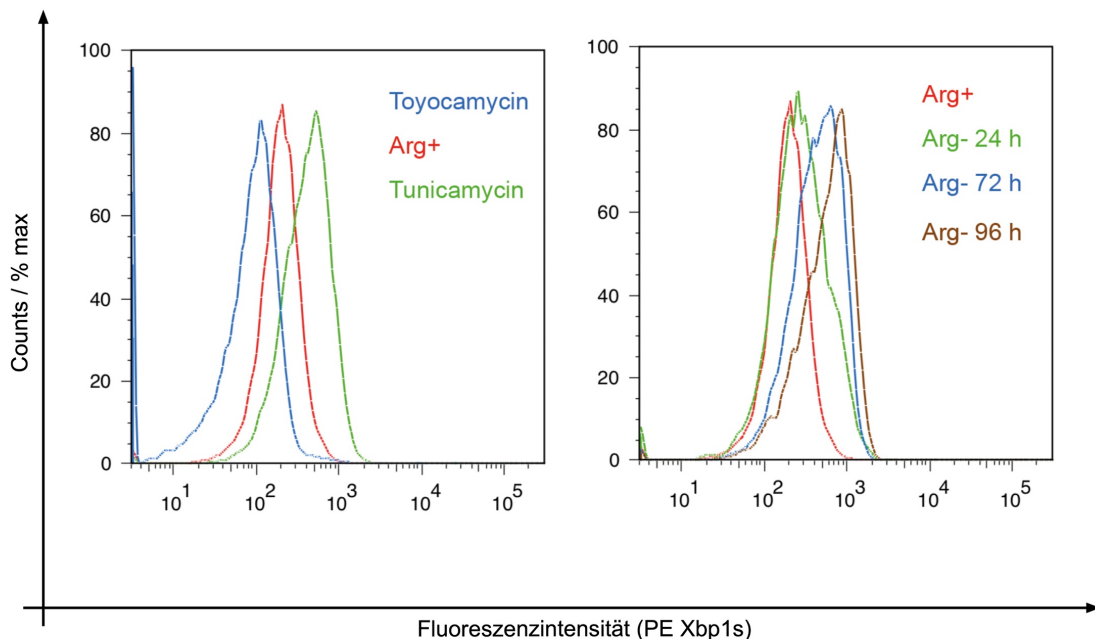


Abbildung 12: Nachweis von Xbp1-Splicing mittels durchflusszytometrischer Untersuchung. Nach Permeabilisierung erfolgten nach Färbung mit einem Xbp1s-PE-Antikörper durchflusszytometrische Untersuchungen auf ein intrazelluläres Splicing von Xbp1. Links: Positiv- und Negativkontrollen in argininhaltigem Normalmedium (rot) sowie nach Zugabe von Toyocamycin als UPR-Repressor (blau) bzw. Tunicamycin als UPR-Induktor (grün) über 24 h. Rechts: Zunahme der Expression von Xbp1s unter zunehmend langer Arginindeprivation im Vergleich zu argininhaltigem Vollmedium (rot). Beide Darstellungen zeigen Kurven aus einem repräsentativen von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Es erfolgte schließlich eine Inkubation der Zellen in argininfreiem Kulturmedium über Zeiträume bis 96 h (rechtes Panel). Hierbei führte eine zunehmend lange Inkubation der Zellen in argininfreiem Medium zu einer stetigen Zunahme der Expression von Xbp1s, sichtbar an einem Rechtsshift der Population im Vergleich zur argininhaltigen Kontrolle. Entsprechende Isotypkontrollen (Maus IgG1 κ -PE) erfolgten zum Ausschluss einer unspezifischen Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche zeigen eine Aktivierung sowohl der IRE1-Xbp1s als auch der eIF2 α -Achse der UPR unter Argininmangel in Myelomzellen. Alternativ kann auch die sog. GCN2-Kinase zur Phosphorylierung von eIF2 α beigetragen haben, ein Enzym, das durch unbeladene tRNAs unter Aminosäuredepletion aktiviert wird und zu den UPR-unabhängigen Stresssensoren der Zelle zu zählen ist (127). Der klassischerweise als wesentlicher Vermittler der adaptiven UPR (Rescue-Pfad) angesehene Xbp1-Pfad scheint in Myelomzellen unter alleinigem Argininmangel allerdings definitiv zur Anpassung der Zelle an die Stressbedingungen und ihrem Überleben beizutragen. Tieferegreifende mechanistische Untersuchungen weiterer UPR-Proteine (z.B. ATF4, ATF6, PERK, CHOP) in Myelomzellen unter Arginindepletion werden auf der Basis der hier vorgestellten Daten durch unsere Arbeitsgruppe derzeit durchgeführt.

4.2. Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in vivo

Um die Wirksamkeit der hier dargestellten Kombinationsbehandlung aus Arginindepletion und Proteasomeninhibition in vivo zu testen, wurde zunächst ein NSG Mausmodell etabliert, bei dem 10 x 10⁶ U266-Zellen s.c. in die Flanke von NSG Mäusen injiziert wurden. Ein stabiles Engraftment mit ersten kleinen tastbaren Tumoren an der Injektionsstelle war im Mittel nach ca. 9 Tagen zu sehen (Daten nicht gezeigt). Jeweils 5–6 Mäuse wurden zufällig auf verschiedene Experimentalgruppen verteilt: Mock (Behandlung mit äquivalentem Volumen PBS), Bortezomib (12,5 μ g/Injektion), ADI-PEG 20 (5 IU/Injektion) sowie Bortezomib (12,5 μ g/Injektion) und ADI-PEG 20 (5 IU/Injektion) kombiniert. Die erste Injektion von ADI-PEG 20 erfolgte an Tag 0, im Anschluss wurde das rekombinante Enzym zweimal wöchentlich gespritzt. In den beiden Gruppen mit Bortezomibtherapie erfolgte die erste Gabe an Tag 1 und im Verlauf ebenfalls zweimal wöchentlich zu den Gaben von ADI-PEG 20. In allen vier Gruppen war ein stabiles Engraftment der Xenografts festzustellen (Abbildung 13). Unter Therapie mit ADI-PEG 20 zeigte sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums im Vergleich zur Mock-Behandlung. Die Therapie mit Bortezomib führte in 2 von 5 Mäusen zu einem

Ansprechen mit kurzzeitiger Abnahme des Tumolvolumens. Allerdings zeigten die übrigen 3 Mäuse eine stetige und rasche Tumorprogression. Die Kombination aus beiden Therapien führte zum besten Ansprechen mit leichtem Rückgang der Tumorgöße in 3 von 5 Mäusen und Verzögerung des Tumorwachstums, allerdings konnte auch in diesem Versuchsansatz kein durchgreifendes Ansprechen erreicht werden. Zudem zeigten sich unter den Mäusen mit Kombinationsbehandlung die stärksten Nebenwirkungen (Beeinträchtigung des Allgemeinzustands, struppiges Fell, Alopezie), weshalb drei Tiere bereits vor Erreichen einer Tumorgöße von 1500 mm^3 getötet werden mussten.

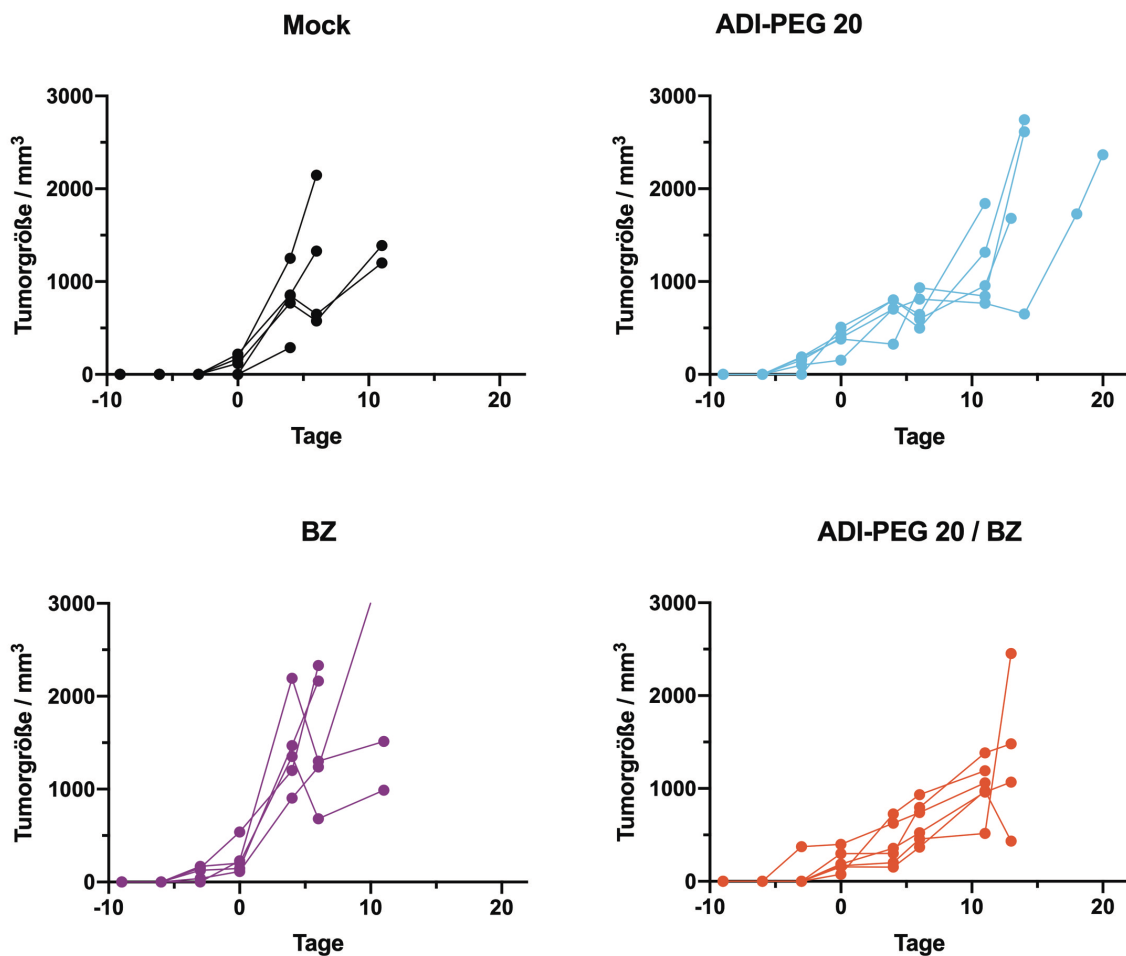


Abbildung 13: Entwicklung der Tumorgößen von U266-Xenografts in NSG Mäusen unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib. Dargestellt sind die Größenverläufe (in mm^3) jedes Xenografts unterteilt in die 4 Behandlungsgruppen zu je 5–6 Mäusen (Mock = äquivalentes Injektionsvolumen PBS, ADI-PEG 20: 5 IU/Injektion, Bortezomib (BZ): $12,5 \mu\text{g}/\text{Injektion}$ sowie beide letztere Behandlungen in Kombination, Details zum Behandlungsregime s. Text).

Es zeigte sich unter Therapie mit ADI-PEG 20 eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (mittleres Überleben 14 vs. 6 Tage, $p=0,0421$). Unter Kombinationsbehandlung mit ADI-PEG 20 und Bortezomib zeigte sich sogar eine hoch-signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (mittleres Überleben 15 vs. 6 Tage, $p=0,0080$) (Abbildung 14). Signifikante Überlebensvorteile im Vergleich zur alleinigen

Therapie mit ADI-PEG 20 zeigten sich durch die Hinzunahme von Bortezomib in vivo allerdings nicht ($p=0.3936$). Die Effektivität von Bortezomib in diesem speziellen Experiment war im Vergleich zur Literatur nur gering ausgeprägt, obwohl aus der Literatur als wirksam beschriebene Konzentrationen von 0,6 mg/kg KG verwendet wurden (123, 128). Eine Erklärung für die insgesamt überschaubaren Therapieeffekte könnte die relativ lange Engraftmentperiode von 9 Tagen bei hoher injizierter Tumorzellzahl (10×10^6 Zellen/Maus) sein, da das Tumorwachstum sehr rasch nach Therapiestart in die exponentielle Wachstumsphase überging und die Gesamtüberlebensdauer in allen Gruppen entsprechend kurz war.

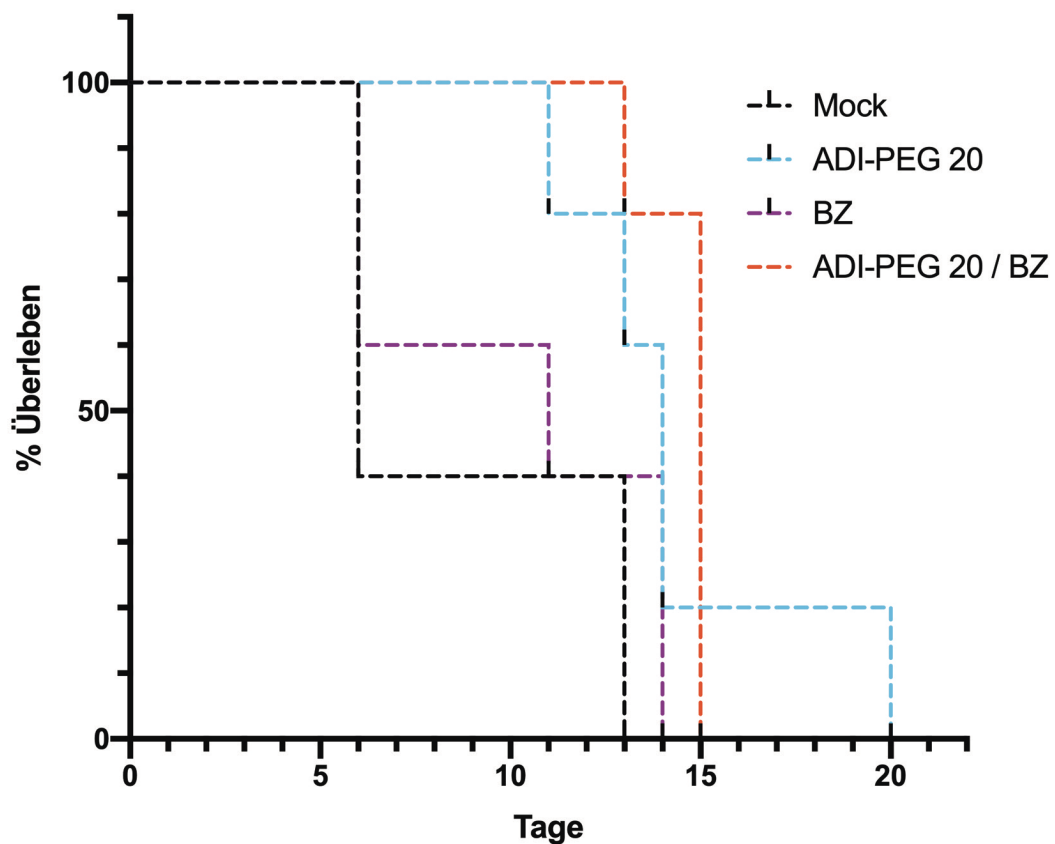


Abbildung 14: Gesamtüberleben von NSG Mäusen unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven von NSG Mäusen mit U266-Xenograft-Tumoren. Nur die Behandlungen mit ADI-PEG 20 ($p=0,0421$) und ADI-PEG 20 + Bortezomib ($p=0,0080$) führten zu einem signifikanten bzw. hoch-signifikanten Überlebensvorteil der behandelten NSG Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mock). Details zu den Behandlungsregimen: s. Abb. 13 sowie Text. BZ=Bortezomib.

In keiner der beiden Behandlungsgruppen mit Arginin-Depletion durch ADI-PEG 20 kam es zu einer Reexpression von ASS1 in den Myelomzellen: dies wurde nach Explantation der Xenograft-Tumoren und Herstellung von Tumor-Gewebelysaten mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 15). Im dargestellten Westernblot dienten A431- bzw. U266-Zelllysate als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Dies beweist, dass die Argininauxotrophie von U266-Myelomzellen auch nach längerer Arginindepletion über einen Zeitraum von bis zu 20

Tagen in vivo erhalten bleibt. Eine Reexpression von ASS1 konnte daher als möglicher Resistenzmechanismus in diesem Experiment ausgeschlossen werden.

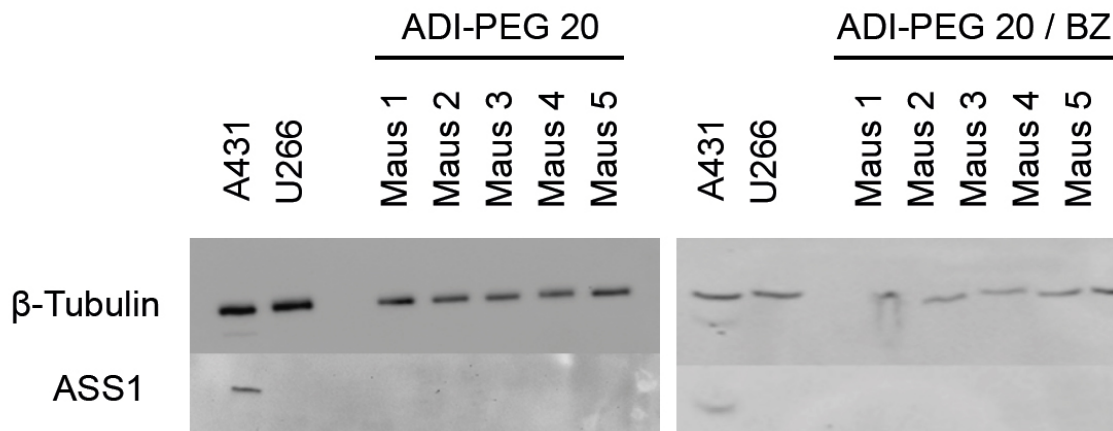


Abbildung 15: Western Blot von Ex-vivo-Tumoren nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Bortezomib (s. Abb. 13 und Abb. 14). Nach Töten der Mäuse wurden Gewebelysate der Myelom-Tumoren hergestellt und im Western Blot auf eine Expression des Proteins ASS1 untersucht. Details zu den Experimentalbedingungen: s. Abb. 13 und Text. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. ASS1: Argininosuccinat-Synthetase 1.

4.3. Effekte von ADI-PEG 20 auf Arginin- und Citrullinplasmaspiegel in vivo

Um die Effektivität der Arginindepletion von ADI-PEG 20 in vivo zu untersuchen, führten wir in NSG Mäusen eine Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Arginin und dem Reaktionsprodukt Citrullin mittels HPLC durch (Messungen durch Alice Habermeier, AG E. I. Closs, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz). Unsere Arbeitsgruppe konnte das Arginin-Analogon L-Canavanin in vitro als weiteren interessanten Kombinationspartner für ADI-PEG 20 beim Multiplen Myelom identifizieren (Lea Ströher, Daten bisher nicht publiziert). Um eine Beeinträchtigung von ADI-PEG 20 durch eine Kombinationstherapie mit Canavanin – wie sie in der Literatur für einige bakteriellen Arginin-Deimininasen beschrieben ist – in unserem Modell zu untersuchen, führten wir die Bestimmung von Arginin und Citrullin im Plasma der Mäuse auch unter Gegenwart von Canavanin (Einmalinjektion von 10 mg s.c.) sowie ADI-PEG 20 (Einmalinjektion von 5 IU i.p.) bzw. der Kombination beider Behandlungen durch (Abbildung 16) (129). Pro Versuchsansatz wurden drei NSG Mäuse verwendet, die Blutentnahmen erfolgten 24 h nach Injektion. In unbehandelten NSG Mäusen zeigen sich physiologische Plasma-Konzentrationen von Arginin und Citrullin, ebenso nach alleiniger Gabe von Canavanin. Arginin wird durch ADI-PEG 20 in vivo hocheffizient in Citrullin umgewandelt, sodass eine signifikante Änderung beider Plasmaspiegel eintritt. Diese Reaktion findet unabhängig von der Gegenwart von Canavanin im Organismus statt, da auch nach kombinierter Behandlung quasi kein Arginin im Plasma der Mäuse nachweisbar ist bei vergleichbar hohen Citrullinspiegeln wie nach alleiniger ADI-PEG-20-Therapie. Diese

Ergebnisse decken sich mit unseren in-vitro-Beobachtungen zur Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 unter Anwesenheit von Canavanin (Lea Ströher, Daten bisher nicht publiziert).

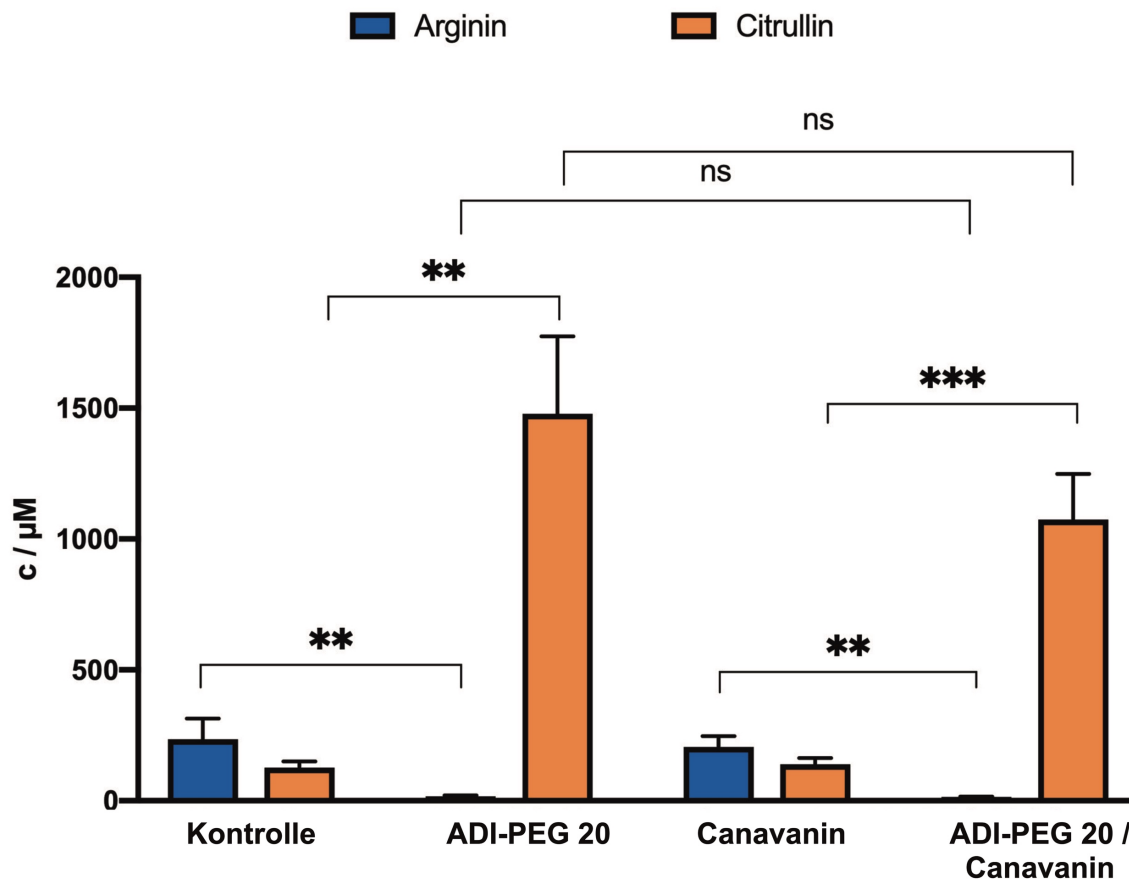


Abbildung 16: Bestimmung der Plasmaspiegel von Arginin und Citrullin in NSG Mäusen mittels HPLC. Jeweils drei Mäuse erhielten eine Blutabnahme 24 h nach Applikation von PBS (Kontrolle), ADI-PEG 20 (5 IU), Canavanin (10 mg) oder beiden letzteren Substanzen kombiniert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Plasmaspiegel mit Standardabweichung.

4.4. Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin in vivo

4.4.1. Pharmakokinetik von Canavanin in vivo

Vor Einsatz des Arginin-Analogons L-Canavanin in Kombination mit ADI-PEG 20 in unserem NSG Myelommodell führten wir Messungen der Arginin- und Canavanin-Plasmaspiegel in zwei NSG Mäusen nach s.c. Applikation von 10 mg Canavanin durch. Dies war notwendig, da in der publizierten Literatur keine Erfahrungen zum Einsatz von Canavanin in niedriger Dosierung unter Arginindepletion in Mausmodellen beschrieben sind. Nach s.c. Applikation von 10 mg Canavanin zeigte sich ein schneller Abfall der Canavanin-Plasmakonzentration bei hohen initialen Plasmaspiegeln. Die parallele Bestimmung des Arginin-Plasmaspiegels diente als Referenz (Abbildung 17). Aus In-vitro-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass zum Erreichen ausgeprägter zytotoxischer Effekte auf Myelomzellen unter Argininmangel etwa 10-fach höhere Canavanin-Konzentrationen notwendig sind (Lara Kürzer, Daten bisher

nicht publiziert). Aufgrund der errechneten kurzen Plasmahalbwertszeit von 14,52 min erscheint eine s.c. Applikation von Canavanin im Mausmodell selbst bei deutlicher Dosiserhöhung daher kaum praktikabel. Unter ADI-PEG 20 Therapie werden zwar konstant niedrige Argininspiegel zwischen 10–20 μM erreicht (Kap 4.3), zytotoxische Canavaninkonzentrationen würden unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nur für ca. 1 h nach s.c. Injektion bestehen bleiben.

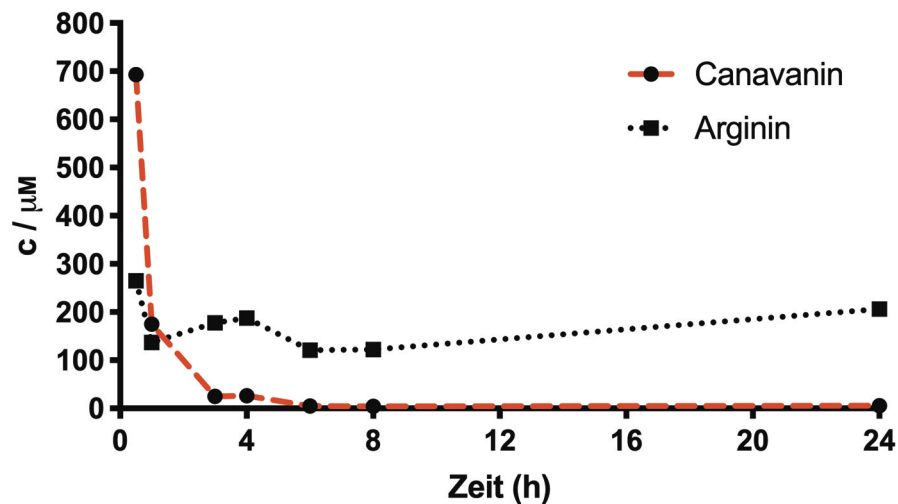


Abbildung 17: Bestimmung der Plasmaspiegel von Arginin und Canavanin in NSG Mäusen mittels HPLC. Es erfolgten Blutentnahmen in zwei NSG Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation von 10 mg Canavanin s.c. mit anschließender Bestimmung der Arginin- bzw. Canavaninkonzentrationen im Plasma.

4.4.2. Überlebensdaten

Aufgrund der parallel zu dieser Arbeit entstandenen In-vitro-Daten zur ausgeprägten Zytotoxizität von Canavanin unter Argininmangel auf Myelomzellen (Lea Ströher, Daten bisher nicht publiziert) erfolgte nach Optimierung des unter Kap 4.2 eingeführten NSG Xenograft Modells ebenfalls eine Testung der Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin in vivo. Aufgrund der sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von L-Canavanin nach s.c. Injektion in NSG Mäusen erfolgte zur Steigerung der lokalen Wirkspiegel im Mikromilieu der Xenograft-Tumoren eine intratumorale Injektion (i.t.) von Canavanin. Es wurde eine Konzentration von 10 mg Canavanin pro Injektion gewählt bei einer Frequenz von drei Injektionen pro Woche. ADI-PEG 20 wurde zweimal wöchentlich in der Dosis von 5 IU pro Injektion i.p. verwendet. Erneut wurden vier Experimentalgruppen aus jeweils 4–5 Mäusen pro Gruppe gebildet (Mock: PBS in äquivalenten Mengen, ADI-PEG 20, Canavanin sowie ADI-PEG 20 + Canavanin). Zudem wechselten wir aufgrund von Erkenntnissen paralleler In-vivo-Experimente von U266 auf NCI-H929-Zellen, die stabil mit dem humanen HLA-A2.1 Gen transfiziert wurden („NCI-A2“). Diese Zelllinie zeigte nach Injektion von 2×10^6 Tumorzellen s.c. ein langsames Engraftment und wurde bereits in vitro auf ihre Argininauxotrophie getestet (Lea Ströher und

Eva Amann, Daten nicht gezeigt). Die Zeitdauer von Tumorzellinjektion bis zum Start der Behandlung wurde auf sieben Tage reduziert. Mit diesem Versuchsansatz zeigte sich wie aus den In-vitro-Ergebnissen zu erwarten keine wesentliche Effektivität einer Monotherapie mit Canavanin, da die Myelomzellen durch vorhandenes Arginin vor dem Einbau von Canavanin in naszierende Proteinketten geschützt sind (Lea Ströher, Daten bisher nicht publiziert). Die Monotherapie mit ADI-PEG 20 führte bereits zu einer signifikanten Verlängerung der mittleren Überlebenszeit der behandelten NSG Mäuse (Abbildung 18, 25 vs. 12 Tage, $p=0,0088$). Nach Kombination von ADI-PEG 20 mit Canavanin zeigt sich jedoch eine weitere Verlängerung des Gesamtüberlebens der Tiere mit einer mehr als verdreifachten Lebensspanne gegenüber der Kontrollgruppe (Mittleres Gesamtüberleben 41 vs. 12 Tage, $p=0,0038$). Das Sterberisiko war in der Mock-Gruppe gegenüber der Kombinationstherapiegruppe 19,8-fach erhöht (Hazard Ratio 19,8 [2,616–149,9]). Im Gegensatz zur Therapie mit Bortezomib war in diesem Experiment quasi keine Toxizität durch die Behandlung zu verzeichnen.

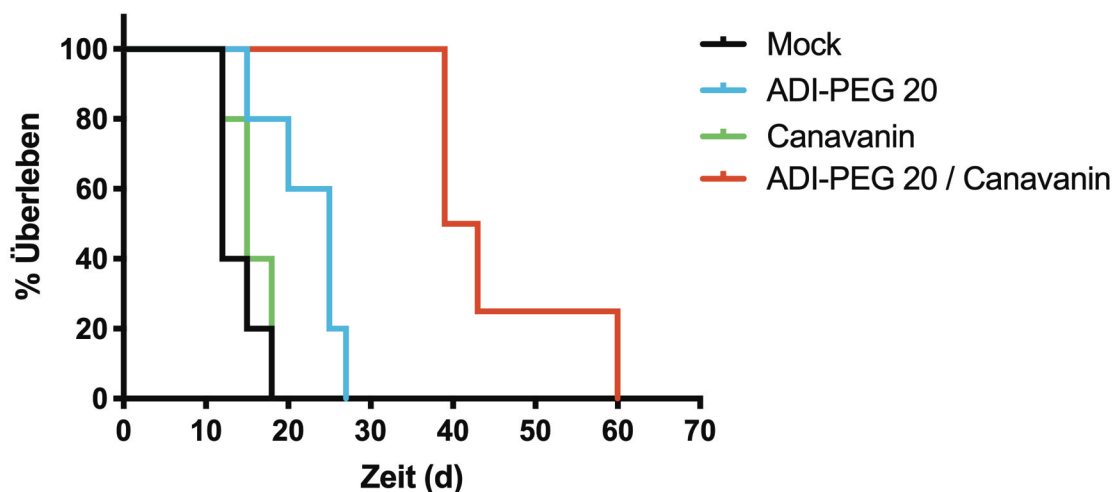


Abbildung 18: Überlebenskurven von NSG Mäusen unter Kombinationstherapie von ADI-PEG 20 und Canavanin. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven der vier Experimentalgruppen eines modifizierten NSG Xenograft Modells (Details Kap. 3.2.11 und 4.4.2). Es zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung des Gesamtüberlebens der Mäuse unter Therapie mit Canavanin bei gleichzeitiger Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 (Mittleres Gesamtüberleben 41 vs. 12 Tage, HR 19,8 [2,616 – 149,9], $p=0,0038$). Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei vergleichbar durchgeführten In-vivo-Experimenten.

4.4.3. Induktion von Apoptose in Ex-vivo-Tumoren

Aufgrund des hocheffektiven Ansprechens der Kombinationsbehandlung mit ADI-PEG 20 und Canavanin führten wir in Kooperation mit der Core Facility Histologie des Forschungszentrums für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in explantierten Xenograft-Tumoren durch. Hierzu wurden nach Konservierung in Formalin Paraffinschnitte von Tumorgewebe angefertigt und immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper auf Spaltprodukte von Caspase-3 durchgeführt. Es zeigte sich keine wesentliche Spaltung von Caspase-3 in der Mock-, Canavanin- und ADI-PEG-20-Gruppe.

Hingegen konnte eine signifikante Zunahme der apoptotischen Aktivität in den Tumoren aus denjenigen Mäusen nachgewiesen werden, die mit der Kombination aus ADI-PEG 20 und Canavanin behandelt worden waren (Abbildung 19).

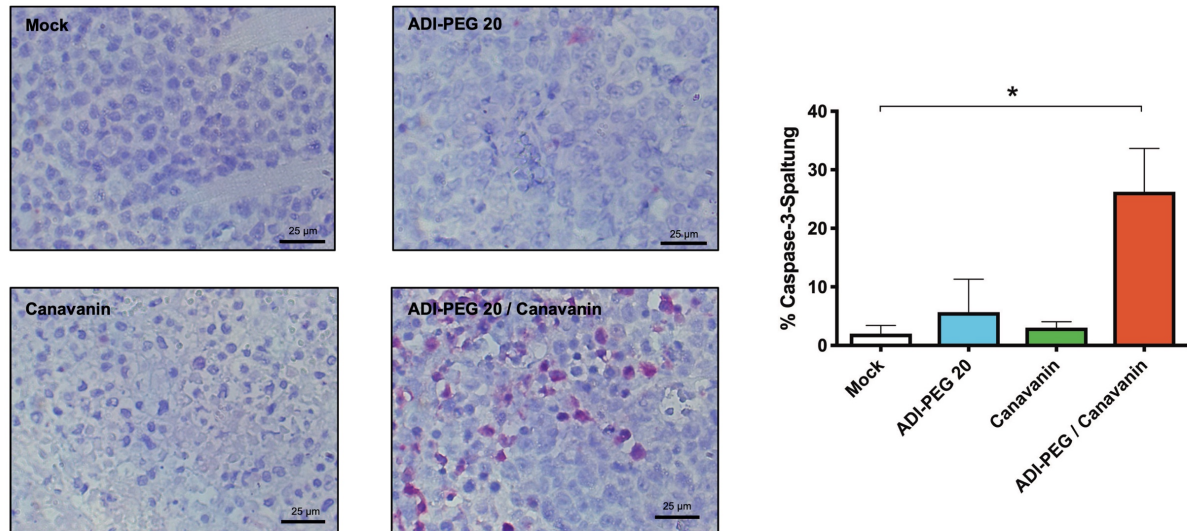


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse der Apoptoseinduktion in Myelom-Xenograft-Tumoren unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Nach Explantation der Myelom-Xenograft-Tumoren konnte eine signifikant gesteigerte Spaltung von Caspase-3 in den Tumoren von Mäusen nachgewiesen werden, die mit einer Kombination aus ADI-PEG 20 und Canavanin behandelt worden waren. Zur Quantifizierung wurden je 200 Zellen aus repräsentativen Tumorregionen dreier unabhängiger Maustumoren jeder Experimentalgruppe ausgewertet. Zu den detaillierten Experimentalbedingungen s. Kap. 3.2.11 und 4.4.2.

4.4.4. De-novo-Expression von ASS1 und Sensitivität gegenüber erneuter Canavanin-Exposition ex vivo

Trotz des deutlich längeren Überlebens der Mäuse unter Kombinationstherapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin kam es letztendlich jedoch dennoch zum Tumorprogress, allerdings nach einem deutlich prolongierten Stadium der Tumorfreiheit von ca. 27 Tagen (Abbildung 20).

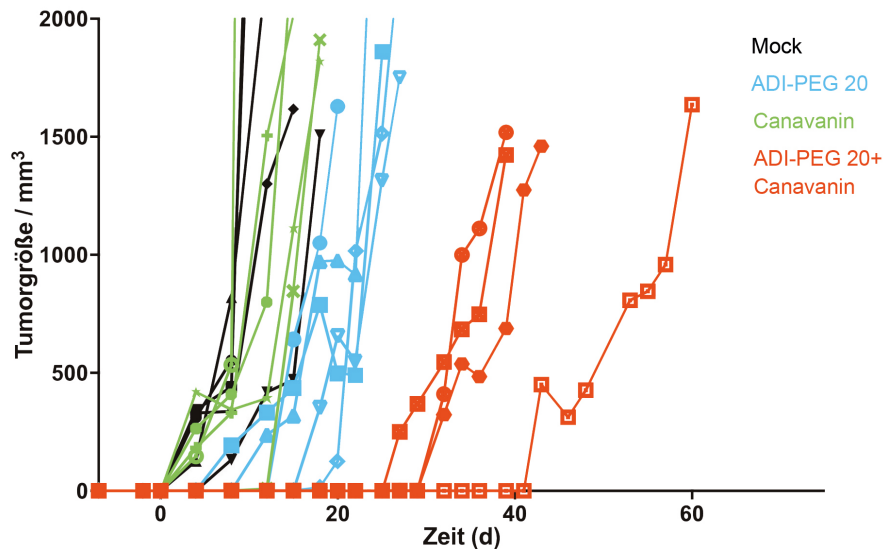


Abbildung 20: Größenprogress der Xenograft-Tumoren unter Behandlung mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Jede Kurve zeigt das Tumorwachstum in mm^3 einer NSG Maus über den Verlauf des Experiments geordnet nach Experimentalgruppe (s. Legende). Zu den detaillierten Experimentalbedingungen s. Kap. 3.2.11 und 4.4.2.

Um eine De-novo-Expression von ASS1 als möglichen Resistenzmechanismus auch nach solch langer Überlebenszeit der Tumorzellen *in vivo* auszuschließen, führten wir immunhistochemische Analysen auf ASS1 an explantiertem Tumorgewebe durch (Abbildung 21). Hierbei zeigte sich eine zumindest schwache fokale Expression von ASS1 in Tumorgewebe der Mäuse, die mit ADI-PEG 20 mit oder ohne Kombination mit Canavanin behandelt wurden. Um die funktionellen Auswirkungen dieser gesteigerten ASS1-Expression in Maustumoren unter prolongierter Therapie mit ADI-PEG 20 zu beurteilen, wurden von einer Maus nach ADI-PEG-20- und Canavanin-Behandlung (Kombinationstherapie) die Tumorzellen direkt nach Explantation des Tumors vereinzelt und erneut der Zellkultur zugeführt. Nach erneuter Exposition gegenüber Argininmangel in Gegenwart von Canavanin (+/- Citrullin) über 24 h *in vitro* erfolgte ein Annexin-PI-FACS zur Messung von Apoptose- bzw. Zelltod (Abbildung 22). Bei diesem Versuch zeigte sich eine deutliche Zytotoxizität im Argininmangelmilieu bereits ohne Zugabe von Canavanin (15–20 % viable Zellen). Bei Zugabe von Canavanin überlebten praktisch keine Zellen den Versuch, diese Zahl ließ sich auch nach Zugabe von Citrullin nur auf knapp 1 % steigern. Insgesamt korreliert die immunhistochemisch nachgewiesene schwache ASS1-Expression der NCI-A2-Zellen nach prolongiertem Argininmangel *in vivo* mit keinen relevanten funktionellen Einschränkungen in der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit Canavanin.

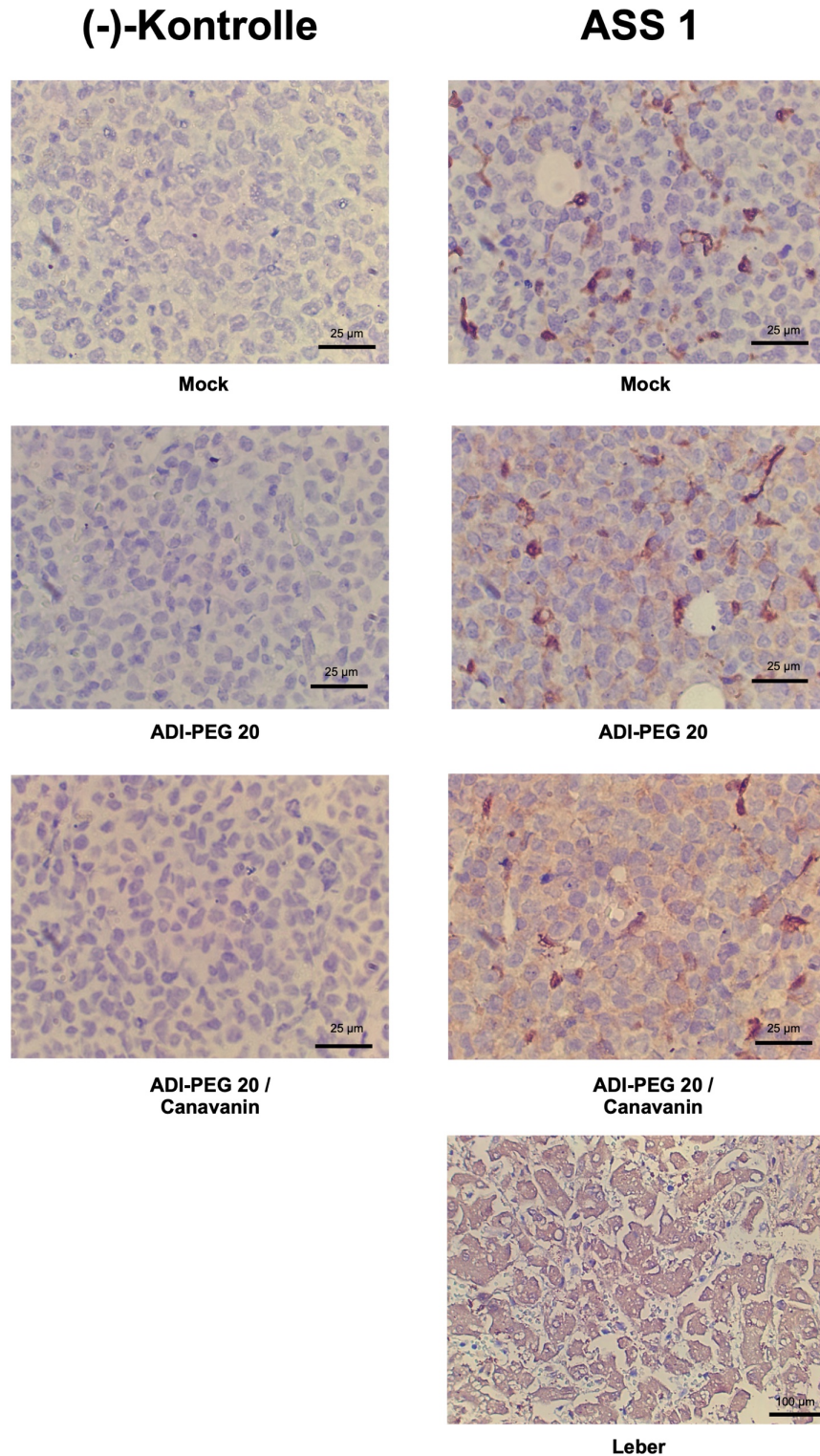
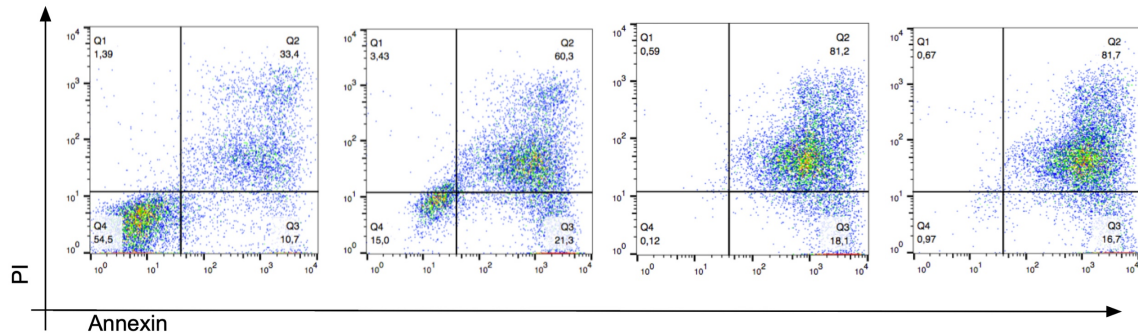


Abbildung 21: ASS1-Expression in explantierten Xenograft-Tumoren nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Dargestellt sind repräsentative Gewebeschnitte einzelner Mäuse der unterschiedlichen Experimentalgruppen (s. Legende). Die Mäuse der Mock-Gruppe zeigten nur eine sehr schwache ASS1-Expression, passend zu den Ergebnissen der In-Vitro-Untersuchungen von NCI-H929 im Western Blot (Panel oben rechts). Stellenweise zeigt sich eine leichte Steigerung der ASS1-Expression im Tumorgewebe derjenigen Mäuse, die mit ADI-PEG alleine bzw. in Kombination mit Canavanin behandelt wurden (Panels 2. und 3. Reihe). Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers dienten Tumorschnitte ohne Inkubation mit Primärantikörper (links). Als Positivkontrolle dienten Schnitte aus dem Lebergewebe einzelner Mäuse (unten). Stark ASS1-positive Zellen in den Tumorschnitten ähneln morphologisch Fibroblasten bzw. Endothelzellen. Zu den detaillierten Experimentalbedingungen s. Kap. 3.2.11 und 4.4.2.



| | | | | |
|-----|------|------|--------|--------|
| Arg | 1 mM | 0 mM | 0 mM | 0 mM |
| Can | – | – | 100 µM | 100 µM |
| Cit | – | – | – | 1 mM |

Abbildung 22: Erhalt der Arginin-Auxotrophie in Ex-vivo-Myelomzellen nach Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Myelomzellen aus einem explantierten progredienten Maustumor, der in vivo unter Kombinationstherapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin gestanden hatte, wurden wie in Kap. 3.2.12 erläutert vereinzelt und den in der Tabelle dargestellten Experimentalbedingungen in vitro ausgesetzt.

4.4.5. Arginin- und Canavaninspiegel im Tumorgewebe

Aus In-vitro-Versuchen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Zytotoxizität von Canavanin im Argininmangelmilieu von der Ratio der Konzentrationen beider Aminosäuren abhängt. Zur relevanten Apoptoseinduktion in Myelomzellen muss die Canavanin-Konzentration diejenige von Arginin etwa um das 10-fache übersteigen (Lara Kürzer, Daten bisher nicht publiziert). Um die Effektivität der intratumoralen Arginindepletion und Canavanin-Anreicherung im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, führten wir HPLC-Messungen der Arginin- bzw. Canavanin-Konzentrationen an Lysaten von ex-vivo-Tumoren einzelner Mäuse der Canavanin bzw. Kombinationsgruppe durch (Abbildung 23). Diese Messungen zeigen, dass unter Kombinationstherapie eine wirksame Canavanin:Arginin-Ratio für einen Zeitraum von bis zu 12 h im Tumor-Mikromilieu erzielt werden konnte. In denjenigen Mäusen, die alleine Canavanin erhalten hatten, betrug die Canavanin:Arginin-Ratio jedoch nie mehr als 3:1, passend zum fehlenden Nachweis einer Apoptoseinduktion bzw. Überlebensverlängerung dieser Mäuse (Abbildung 23 A). ADI-PEG 20 führte jedoch zu einer nahezu vollständigen Depletion von Arginin aus dem Tumormilieu zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 23 B). Entsprechend zeigte sich in der ersten Stunde nach Canavaningabe eine deutlich erhöhte Canavanin:Arginin-Ratio (ca. 60:1), diese blieb jedoch auch im Tumormikromilieu nur über ca. 12 h in einem Bereich >10:1 erhalten. Eine weitere Optimierung der Pharmakokinetik könnte daher zu einer noch effektiveren Tumorkontrolle führen.

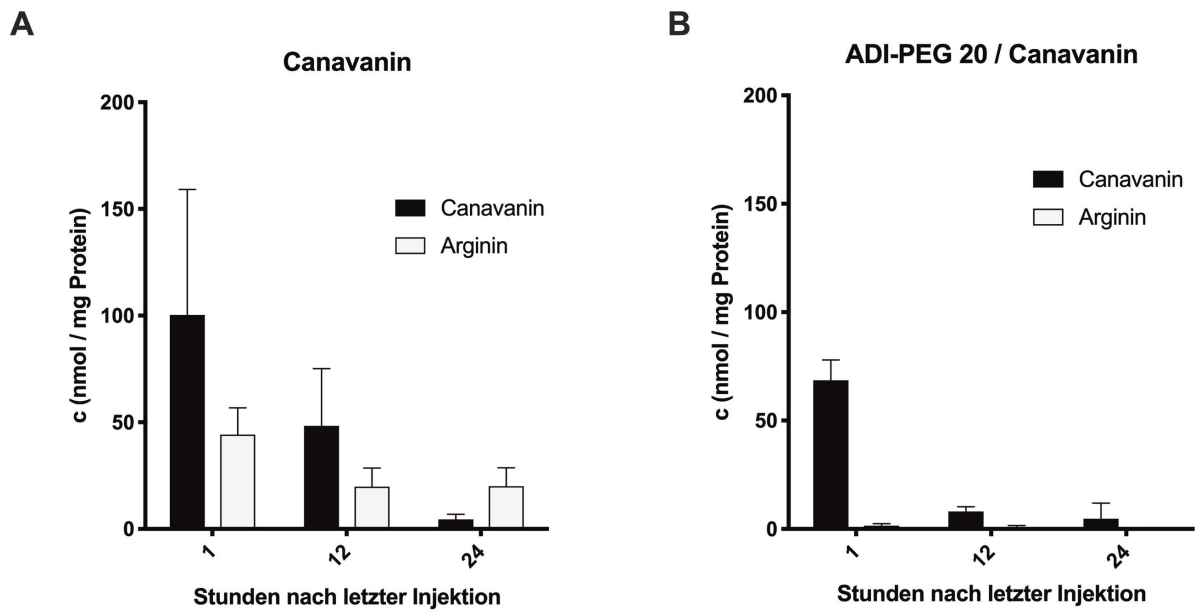


Abbildung 23: Messungen von Arginin- und Canavaninkonzentrationen aus Tumorgewebe mittels HPLC. Es sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten Messergebnisse von Tumorsysaten aus je 3 Mäusen der Canavanin bzw. ADI-PEG 20/Canavanin – Gruppe aufgeführt, die aufgrund von Tumorprogress 1 h, 12 h oder 24 h nach der letzten Medikamenteninjektion getötet werden mussten. Die Standardabweichungen wurden aus Triplikaten errechnet, die aus je drei unterschiedlichen Tumorbereichen gewonnen wurden, um der Heterogenität des Tumor-Mikromilieus Rechnung zu tragen. Die Konzentration der Aminosäuren wurde in nmol/mg Gesamtprotein des Tumorsysats angegeben. Zu den detaillierten Experimentalbedingungen s. Kap. 3.2.11 und 4.4.2.

4.4.6. Induktion von Autophagie

Als weiteren Überlebensmechanismus können Zellen unter Proteinstress bzw. Entzug von Nährstoffen endogene Autophagie aktivieren. Um einen Hinweis auf die Induktion des Autophagie-Pfades zu erhalten, wurden mit Gewebelysaten der explantierten Tumoren nach SDS-PAGE Western Blot-Analysen zum Nachweis einer Expression von LC3-I und LC3-II durchgeführt (Abbildung 24). In der Tat konnte eine verstärkte LC3-II-Expression, welche mit einer verstärkten Autophagie korreliert, in den Tumorsysaten von drei der vier Mäuse unter Kombinationstherapie (ADI-PEG 20/Canavanin) festgestellt werden. Die Behandlung von NCI-A2-Zellen mit Chloroquin diente als Positivkontrolle, da dieser Inhibitor die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen hemmt (130). Eine Induktion von Autophagie kommt daher als möglicher Resistenzmechanismus in unserem In-vivo-Modell in Frage.

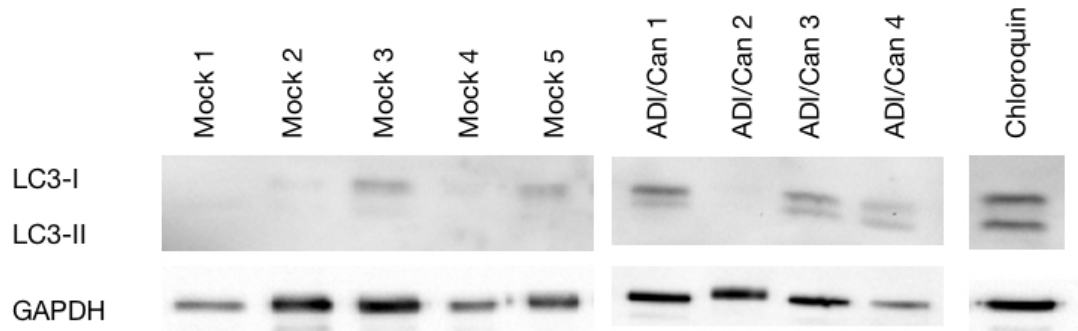


Abbildung 24: Zunahme der Expression von LC3-II unter Kombinationstherapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin als Hinweis auf eine Autophagie-Induktion. Gewebelysate der Ex-vivo-Tumoren der Kontrollgruppe bzw. Kombinationsgruppe des obigen In-vivo-Experimentes (Details s. Kap. 3.2.11 und 4.4.2) wurden nach SDS-PAGE einem Western Blot zum Nachweis der LC3-Expression unterzogen. Es ist eine vermehrte LC3-II-Expression in drei von vier Mäusen der Kombinationstherapiegruppe nachweisbar. Mit Chloroquin ($10 \mu\text{M}$) behandelte NCI-A2-Zellen dienen als Positivkontrolle für eine verstärkte LC3-II-Expression.

5. Diskussion

Trotz zahlreicher therapeutischer Fortschritte in den letzten 15 Jahren stellt das Multiple Myelom nach wie vor eine in den meisten Fällen unheilbare und mit erheblicher Morbidität behaftete hämatologische Neoplasie dar. Aufgrund der fortschreitenden Alterung der Gesellschaft, der Zunahme der Erkrankungshäufigkeit im Alter und der verbesserten therapeutischen Möglichkeiten steigt zudem der Anteil von Myelompatienten mit hohem Lebensalter und erheblichen Komorbiditäten (131, 132). Patienten mit biologisch aggressiver Myelomerkrankung, zytogenetischem Hochrisikoprofil oder frühem Rezidiv der Erkrankung nach durchgeführter Therapie stellen eine besondere Herausforderung für die Behandler dar (8, 133, 134). Neue Strategien sind daher zur Therapie dieser häufigen hämatologischen Tumorerkrankung notwendig. Diese sollten gut verträglich und aufgrund der bekannten Resistenz von Myelomzellen gegenüber Monotherapien gut zur Kombination mit bereits etablierten Substanzen geeignet sein. Metabolische Tumortherapien befinden sich derzeit in zahlreichen Tumorentitäten in der wissenschaftlichen Erprobung, fanden aber bisher nur vereinzelt den Weg in die routinemäßige klinische Anwendung (z.B. PEG-Asparaginase bei ALL) (61, 135). Vielversprechend hierbei ist das vollständig andere Wirkprinzip im Gegensatz zu Antimetaboliten, klassischen Chemotherapeutika oder zielgerichteten Therapien wie Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonalen Antikörpern (136). Aufgrund der hohen metabolischen Anforderungen von proliferierenden Tumorzellen sind zahlreiche Enzyme in Tumorzellen anders als in Normalgeweben exprimiert oder reguliert, sodass die Möglichkeit der Entwicklung von tumorselektiven Therapien besteht (137, 138). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Interferenz mit dem Argininstoffwechsel als neue antineoplastische Strategie zur Therapie des Multiplen Myeloms zu untersuchen. Details über die Regulation des Argininstoffwechsels in Myelomzellen, insbesondere eine mögliche Abhängigkeit von extrazellulär vorhandenem Arginin, sind bisher noch unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Proliferation von Myelomzelllinien an die Verfügbarkeit von extrazellulärem Arginin gebunden ist. Nur ein Teil der untersuchten Myelomzelllinien exprimiert eine ausreichende Menge an Argininosuccinat-Synthetase 1 (ASS1), dem Schlüsselenzym der zellulären Argininsynthese aus Citrullin. Zwei der untersuchten Zelllinien (NCI-H929 und U266) stellten sich als funktionell argininauxotroph heraus, auch unter prolongiertem Argininmangel. In biochemischen Assays zeigte sich eine Hyperinduktion von UPR-Komponenten bzw. Stresssensoren in Myelomzellen unter Argininmangel. Diese Beobachtung könnte Grundlage der festgestellten synergistischen Toxizität des Proteasomeninhibitors Bortezomib mit Arginindepletion auf Myelomzellen *in vitro* sein. Aufgrund der eingeschränkten Langzeiteffekte der Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib *in vivo* führten wir zudem erstmals *In-Vivo*-Untersuchungen zum Einsatz des

Arginin-Analogons Canavanin unter gleichzeitiger Arginindepletion in einem Tumormausmodell durch. Hierbei zeigte sich eine beeindruckende Steigerung der Überlebenszeit der Mäuse sowie eine sehr lange Tumorkontrolle der Myelom-Xenografts. Abschließende Experimente zur Identifikation möglicher Resistenzmechanismen deuten auf eine Beteiligung der Autophagie sowie suboptimale pharmakokinetische Eigenschaften von Canavanin als mögliche Ursachen des festgestellten Myelomprogresses unter Therapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin hin. Hinweise auf eine signifikante Steigerung der Expression von ASS1, die zu einer funktionellen Arginin-Unabhängigkeit der Tumorzellen führen könnte, zeigten sich nicht. Die Entwicklung von Arginin-depletierenden Enzymen in Kombination mit Proteasomeninhibitoren oder Argininanaloga erscheint vor dem Hintergrund der dargestellten Ergebnisse im Rahmen weiterer präklinischer und klinischer Studien äußerst vielversprechend.

5.1. Arginin-Abhängigkeit des Multiplen Myeloms

Zur Untersuchung, inwiefern die Proliferation von Myelomzellen von extrazellulär verfügbarem Arginin abhängig ist, wurden MTS-Assays in normalem Kulturmedium (Arginin mit ca. 1,1 mM im Überschuss vorhanden) sowie unter Argininmangel (0 mM Arginin im Kulturmedium) durchgeführt. Sämtliche der untersuchten Zelllinien zeigten eine deutliche und statistisch signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität im MTS-Assay unter Argininentzug. Dies deutet auf eine zumindest eingeschränkte intrazelluläre Resynthese von Arginin in sämtlichen der untersuchten Myelomzelllinien bzw. einen entsprechend hohen Argininbedarf hin. Interessanterweise zeigten zwei der untersuchten Zelllinien (U266 und NCI-H929) eine besonders starke Reduktion der metabolischen Aktivität unter Argininmangel. Einschränkend ist zu bemerken, dass in den initial durchgeführten MTS-Assays kein Citrullin im Umgebungsmedium vorhanden war und den Myelomzellen für den wichtigsten Resyntheseweg von Arginin lediglich intrazellulär vorhandenes Citrullin zur Verfügung stand. Um die Sinnhaftigkeit einer möglichen Kombinationstherapie mit Proteasomeninhibitoren zu untersuchen, behandelten wir die Zelllinien zusätzlich mit Bortezomib. Unter der Kombinationstherapie (Argininmangel und Bortezomib) zeigte sich in allen Zelllinien die maximale Einschränkung der Proliferation, eine signifikante Steigerung der Proliferationshemmung gegenüber einer alleinigen Bortezomibbehandlung konnte in drei von fünf Linien erzielt werden. Dies kann einerseits an der bereits submaximalen Hemmung der Proliferation unter Bortezomib alleine liegen, andererseits zeigten OPM2- und KMS-12-BM-Zellen in dem Versuch eine relativ große Varianz der OD in den einzelnen Messungen, sodass keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. In jedem Fall lieferten diese initialen MTS-Assays erste Hinweise darauf, dass eine Kombination von Proteasomeninhibition und Argininmangel als therapeutisches Prinzip beim Multiplen Myelom wirksam ist.

5.2. Kombination von Argininmangel und Bortezomib

Da mittels MTS-Assay die metabolische Aktivität einer Zellsuspension gemessen wird, welche sowohl von Proliferation der Zellen als auch deren Viabilität abhängig ist, führten wir im nächsten Schritt reine Viabilitätstestungen mittels Annexin/PI-FACS durch. Interessanterweise zeigten sich unter synchroner Therapie mit Bortezomib eher protektive Effekte unter Argininmangel auf die Zellviabilität. Zudem führte eine alleinige Arginindepletion selbst nach 72 h nur zu einer begrenzten Induktion von Apoptose bzw. Zelltod von Myelomzellen (ca. 25 % bei U266). Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen aus anderen Tumorentitäten, wo eine alleinige Arginindepletion zunächst zu einem Proliferationsstopp führte und signifikante zytotoxische Effekte erst nach mehreren Tagen der Arginindepletion auftraten (65, 76). Unter Argininmangel ist für verschiedene Tumorentitäten der Übergang in einen Zellzyklusarrest durch Alteration von regulatorischen Zellzyklusproteinen sowie von Cyclin-abhängigen Kinasen beschrieben (92, 139-141). Senescente bzw. nicht-proliferierende Tumorzellen sind weniger anfällig für die zytotoxischen Effekte einer Proteasomeninhibition, da (I) weniger fehlgefaltete Proteine anfallen, (II) zytoprotektive Mechanismen aktiviert werden und (III) toxische Auswirkungen auf Mitosespindeln nicht zum Tragen kommen (142-144). Als mögliche zytotoxische Mechanismen unter Arginindepletion werden Caspase-abhängige oder -unabhängige apoptotische Signalwege, der Autophagie-Weg sowie eine durch Nährstoffmangel ausgelöste Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie dem Apoptosis-inducing Factor (AIF) oder der Endonuklease G (EndoG) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert (145-147). Unabhängig vom Mechanismus der Zelltodinduktion scheint diese unter prolongierter Arginindepletion in den Vordergrund zu rücken. In den untersuchten Myelomzelllinien schien sich die protektive Wirkung der Arginindepletion auf die Induktion von Apoptose und Zelltod durch Bortezomib bei längeren Inkubationszeiträumen (>48 h) zu reduzieren. Wir vermuteten, dass dies an einem synergistischen pro-apoptotischen Effekt unter prolongiertem Proteinstress liegen könnte.

Aus diesem Grund präinkubierten wir verschiedene Myelomzelllinien über 96 h in argininfreiem Medium und behandelten für weitere 24 h mit Bortezomib bzw. DMSO. Gegenüber Myelomzellen, die in argininhaltigem Medium über dieselben Zeiträume inkubiert wurden, zeigte sich so eine hoch- bis höchstsignifikante Steigerung von Apoptose bzw. Zelltod unter Bortezomibtherapie. Argininmangel alleine wirkte auf Myelomzelllinien nur gering zytotoxisch, sodass unter Zusammenschau mit den MTS-Assays bei alleiniger Arginindepletion zumindest bis zum Zeitpunkt von 120 h proliferationshemmende Effekte im Vordergrund stehen. Zur effektiven Behandlung des Multiplen Myeloms sollten arginindepletierende Maßnahmen daher stets in Kombination mit weiteren Substanzen

eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der prolongierte Entzug der proteinogenen Aminosäure Arginin zur Fehlfaltung von Proteinen mit konsekutivem ER-Stress führen kann (93, 125). Aus diesem Grund scheinen zielgerichtete Therapeutika, die den Abbau fehlgefalteter Proteine inhibieren, ideale Kombinationspartner zu sein. Hierzu könnten neben Proteasomeninhibitoren auch Autophagie-Inhibitoren zählen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Autophagie in vielen Situationen ein wichtiger zytoprotektiver Mechanismus unter Argininmangel ist, da in argininauxotrophen Zellen hierüber ein Wiederauffüllen des zellulären Argininpools erfolgen kann (92, 136). Alternativ könnten Substanzen, welche zu einer weiteren Steigerung des durch Arginindepletion induzierten Proteinstresslevels beitragen können, ebenfalls als sinnvolle Kombinationspartner in Frage kommen. Hierzu zählen z.B. UPR-Induktoren, Inhibitoren von Chaperonen, Heat-Shock-Proteinen oder der ERAD (148-150).

5.3. Induktion von Proteinstress durch Argininmangel

In humanen T-Zellen und soliden Tumorzelllinien konnte eine Induktion von Proteinstress unter Argininmangel hervorgerufen werden, sichtbar an einer Induktion von Proteinen der UPR (92, 93). Auch unsere Daten aus Myelomzelllinien zeigen eine vermehrte Expression von Xbp1s unter Argininmangel sowohl im Western Blot als auch mittels Durchflusszytometrie nach intrazellulärer Färbung mittels PE-gekoppeltem Xbp1s-Antikörper. Im Western Blot zeigte sich zudem eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51, einem wichtigen Substrat des ER-Stressensors PERK. Die alternative Phosphorylierung von eIF2 α durch die General Control Nonderepressible 2 (GCN2) Kinase, welche einen weiteren zellulären Stresssensor unter Aminosäureentzug darstellt, konnte an dieser Stelle in Ermangelung eines kommerziell verfügbaren Antikörpers zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit leider nicht überprüft werden (151, 152). Die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 führt jedoch in jedem Fall zur Reduktion der generellen Rate an Proteintranslation. Sie stellt damit einen wesentlichen zytoprotektiven Effektormechanismus der PERK-Aktivierung im Rahmen der UPR dar (34). Die hohe Intensivität der Phosphorylierung von eIF2 α über einen Zeitraum von ca. 12–72 h nach Arginindepletion geht genau mit der beobachteten Resistenz gegenüber Bortezomib einher. Eine nachlassende Intensivität der eIF2 α -Phosphorylierung nach 96 h könnte damit eine wesentliche Voraussetzung für zytotoxische Effekte unter einer Arginindepletion in Myelomzellen sein. In der Tat konnte gezeigt werden, dass der wesentliche proapoptotische Effektor des PERK-Weges CHOP sich in dieser Zeitspanne anreichert und über eine Induktion der Expression von GADD34 die Dephosphorylierung von eIF2 α vermittelt (153). Dieser Vorgang könnte zur vermehrten Expression von proapoptotischen Molekülen der BCL-2-Familie beitragen, welche schließlich über den intrinsischen apoptotischen Weg den Zelltod von Zellen vermittelt, die über eine zu lange Zeitdauer Proteinstress ausgesetzt waren (33,

154). Ein weiterer Mechanismus der Apoptoseinduktion bei protrahierter Aktivierung der PERK-Pfades liegt in einer transienten Induktion von bestimmten Inhibitoren von Apoptoseproteinen (sog. IAPs). Diese Proteine werden bei kurzzeitigem Proteinstress im Rahmen einer transienten Aktivierung des PI3K/Akt-Weges möglicherweise durch Nfkb sowie posttranskriptionelle Mechanismen induziert und hemmen die Aktivierung von Caspasen in diesem Zeitraum (155). Ein Abfall der IAP-Expression unter protrahiertem Proteinstress führt schließlich zur Apoptoseinduktion (153).

Die vermehrte Expression von Xbp1s ist als Korrelat der Aktivierung der IRE1-Xbp1-Achse der UPR zu werten. Sie wird entsprechend der hier vorgestellten Ergebnisse unter Argininmangel in Myelomzellen ebenfalls verstärkt aktiviert und erst nach ca. 96 h wieder zunehmend inaktiv. U266-Zellen weisen aber bereits unter argininhaltigen Kulturbedingungen eine gewisse Aktivierung des IRE1-Weges, sichtbar an einer Expression von Xbp1s, auf. Diese Beobachtung ist durch die essentielle Bedeutung des Transkriptionsfaktors Xbp1s für die Erhöhung der ER-Faltungskapazität und Differenzierung von Plasmazellen gut erklärbar (156, 157). Tatsächlich kann ein Verlust der IRE1/Xbp1-Aktivität zu einer Entdifferenzierung von Plasmazellen und Resistenz gegenüber Proteasomeninhibitoren beitragen (39). Die IRE1-Achse stellt in Plasmazellen somit einen zentralen Pfad der adaptiven UPR dar, eine prolongierte oder übersteigerte Aktivierung kann jedoch v.a. über Xbp1s-unabhängige Mechanismen zur Apoptose der Zelle führen. Die genauen molekularen Schalter, welche das Zellschicksal unter Proteinstress zwischen einer adaptiven (zytoprotektiven) oder einer terminalen (Apoptose induzierenden) UPR determinieren, sind derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung (34). Detailliertere mechanistische Untersuchungen von Proteinstress-Signalwegen waren nicht Ziel dieser Arbeit, jedoch konnte eine eindeutige Modulation mindestens zweier dieser Pfade gezeigt werden.

Die Induktion von Proteinstress bei zellulärem Argininmangel könnte neben Veränderungen an der Primärstruktur der Proteine durch einen fehlenden Arginin-Einbau auch an einem Verlust eines „Detergens-Effektes“ von gelöstem Arginin auf Protein-Protein-Interaktionen bedingt sein, was allerdings nur in zellfreien Systemen gezeigt wurde (125). Bereits 2009 konnte gezeigt werden, dass Myelomzellen, die einem gesteigerten Maß an Proteinstress ausgesetzt sind, empfänglicher für eine Behandlung mit Bortezomib sind (158). In der vorgelegten Arbeit konnte durch Vergleiche zwischen einer synchronen bzw. sequentiellen Kombination von Argininmangel und Proteasomeninhibition gezeigt werden, dass Myelomzellen eine ausgedehnte Vorbehandlung unter argininfreien Bedingungen benötigen, um eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Proteasomeninhibitoren aufzuweisen. Entsprechend der gemachten Beobachtungen zu der Induktion der Proteinstress-Signalwege ist es durchaus möglich, dass das gesteigerte intrazelluläre Stresslevel ursächlich für die

erhöhte Sensitivität gegenüber Bortezomib ist. Weitere Untersuchungen, die zur exakten Klärung der Apoptose induzierenden Signalwege unter Argininmangel führen, sind nicht nur aus zellbiologischer Sicht hochinteressant, sondern hätten sicherlich auch direkte Implikationen bezüglich einer pharmakologischen Verstärkung der zytotoxischen Wirkung des Argininmangels auf Myelomzellen im Rahmen von Kombinationsstrategien.

5.4. NOD/SCID- γ_c^{null} (NSG) Xenograft Myelommodell

Murine Tiermodelle haben sich in der Krebsforschung aufgrund der einfachen Haltung und kurzen Generationszeit von Mäusen sowie der Möglichkeit von genetischen Manipulationen durch molekularbiologische Methoden und Kreuzung als Goldstandard in der präklinischen Entwicklung neuer Tumorthérapien durchgesetzt. Für unsere In-vivo-Versuche wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem NSG Mäuse s.c. im Bereich der Flanke mit argininauxotrophen Myelomzellen der Linien U266 bzw. NCI-A2 injiziert wurden. In ausreichendem zeitlichen Abstand wurde nach Engraftment der Tumore eine Kombinationstherapie von ADI-PEG 20 mit Bortezomib bzw. dem Arginin-Analogen Canavanin eingeleitet. Aufgrund der relativ einfachen Implementation dieses Modells, unabhängig von apparativer Bildgebung zur Messung der Tumorprogression, favorisierten wir dieses Mausmodell in unseren Versuchen. Ein Nachteil des s.c. Xenograftmodells ist das untypische extramedulläre Wachstum von Myelomzellen ohne Kontakt zum Knochenmarksstroma (159). Gerade zur Simulation des typischen osteolytischen Verlaufs der Erkrankung sowie Berücksichtigung von Myelom-Stroma-Interaktionen wären syngene Mausmodelle zwar zu bevorzugen, allerdings sind die entarteten Plasmazellen in solchen Modellen gänzlich murinen Ursprungs, was die Übertragung auf menschliche Myelomzellen erschwert. Ein solches Modell (MOPC315.BM) wurde durch uns auf ASS1-Expression sowie funktionelle Argininauxotrophie getestet, allerdings mit dem Nachweis einer deutlichen intrazellulären Resynthese von Arginin aus Citrullin (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt) (160). Es kam daher zur Verwendung in Versuchen mit ADI-PEG 20 nicht in Frage, da durch dieses Enzym Arginin in Citrullin und Ammoniak gespalten wird. Aufgrund der komplexen Handhabung und fehlenden Verfügbarkeit kamen Mausmodelle mit Transplantation von humanen fetalen Knochenfragmenten (SCID-hu Modell) oder synthetischen Knochenreplikaten (SCID-synth-hu Modell) nicht für unsere Versuche in Frage. Unter Verwendung der dargestellten Anzahl injizierter Tumorzellen kam es in unserem NSG Modell in 100 % der Fälle zu einem stabilen Engraftment der Xenografts.

5.4.1. Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in vivo

Zunächst wurde aufgrund der synergistischen Effekte auf Apoptose- und Zelltodinduktion auf Myelomzellen in vitro die Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in dem etablierten NSG Modell getestet. Leider zeigten sich unter der klinisch gut etablierten Substanz

Bortezomib keine signifikante Verzögerung der Tumorprogression in unserem In-vivo-Modell. Dies könnte an der relativ hohen Zahl an verwendeten Tumorzellen (10×10^6 Zellen/Maus) liegen, da sich sehr rasch ein exponentielles Wachstum der Xenografts zeigte. Als Folge könnte die verwendete Konzentration von Bortezomib (0,6 mg/kg KG) zu niedrig gewesen sein, um eine ausreichende zytotoxische Wirkung entfalten zu können. In der Literatur sind Steigerungen der Bortezomibdosis auf bis zu 1 mg/kg KG beschrieben, jedoch wurde ein weiteres Experiment mit erhöhter Bortezomibdosis aufgrund der attraktiven Kombination mit ADI-PEG 20 mit dem natürlichen Arginin-Analogon Canavanin zunächst zurückgestellt (123). Die Verwendung der Zelllinie U266 könnte ein weiteres Problem bei diesem initialen In-vivo-Experiment dargestellt haben. Zwar konnten wir eine ausgeprägte Arginin-Auxotrophie der U266-Zelllinie *in vitro* zeigen, sodass sie sich ideal für eine In-vivo-Behandlung mit ADI-PEG 20 eignet, allerdings stammen U266 Zellen aus einem Patienten mit Plasmazelleukämie und verlaufen *in vivo* häufig als sehr aggressive Myelomvariante (159, 161). Aus diesem Grund wechselten wir im zweiten In-vivo-Experiment auf eine in unserem Labor hergestellte Variante der NCI-H929-Zelllinie (sog. NCI-A2), die für tumorimmunologische Experimente stabil mit dem humanen HLA-A2.1-Gen transfiziert wurde und sich funktionell wie NCI-H929 argininauxotroph verhält. Von dieser Zelllinie sind ein langsames, ebenfalls sehr stabiles Engraftment in NSG Mäusen und ein rein lokales Tumorwachstum im Bereich des s.c. Injektionsortes aus Versuchen der AG Theobald der Universitätsmedizin Mainz bekannt (Eva Amann, Daten bisher nicht publiziert). Eine Steigerung der Therapieeffekte von Bortezomib und damit auch der Kombinationstherapie von ADI-PEG 20 und Bortezomib sollte sich nach weiterer Optimierung der Experimentalbedingungen daher erzielen lassen.

5.4.2. Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin *in vivo*

Kürzlich von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte In-Vitro-Versuche zeigten eine massive Zelltodinduktion von Myelomzellen im Argininmangel bei gleichzeitiger Zugabe des Arginin-Analogons Canavanin (Lea Ströher, Daten bisher nicht publiziert). L-Canavanin kann anstelle von Arginin in Peptidketten von Proteinen eingebaut werden und zu einer Proteinfehlfaltung führen (94, 95, 97). In ersten Untersuchungen konnte zwar eine vermehrte Induktion von Proteinstress bzw. UPR in Myelomzellen unter Canavaninbehandlung im Argininmangel gezeigt werden, jedoch deutet die rasche Kinetik der Apoptoseinduktion auf alternative Zelltodmechanismen wie z.B. die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hin (162). Durch Untersuchungen an humanen Kolonkarzinom-Zelllinien konnte die vermehrte Expression von CHOP als möglicher Vermittler einer terminalen UPR unter Canavaninbehandlung bei Argininmangel nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in den Experimenten eine eher schwache Induktion von UPR-Proteinen bei deutlicher Spaltung von PARP als Zeichen einer starken Apoptoseinduktion nach 24 h, sodass möglicherweise

weitere, bisher unbekannte Mechanismen an der Apoptoseinduktion durch Canavanin beteiligt sind (93). Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus scheint die Kombination von Canavanin bzw. von Argininanaloga und einer effektiven Arginindepletion ein überaus vielversprechender Behandlungsansatz für das Multiple Myelom zu sein. Entsprechend führten wir im Rahmen dieser Arbeit erstmals Versuche mit niedrig dosiertem Canavanin und gleichzeitiger Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 in einem In-vivo-Tumormodell durch.

Da bisher noch keine Untersuchungen mit Canavanin unter Argininentzug in Maus-Tumormodellen publiziert sind, führten wir zunächst pharmakokinetische HPLC-Messungen zur Optimierung des Applikationsweges und der Dosierung von Canavanin durch. Es zeigte sich eine sehr kurze Halbwertszeit von Canavanin im Plasma untersuchter NSG Mäuse nach s.c. Injektion von knapp 15 Minuten. Diese Beobachtung deckt sich mit einer sehr kurzen beobachteten Halbwertszeit von Canavanin in B6D2F-Mäusen nach i.v. Injektion (108). Somit läge der Wirkspiegel von Canavanin aufgrund der aus unseren In-vitro-Testungen bekannten minimalen zytotoxischen Arginin:Canavanin:Ratio von ca. 10:1 nur innerhalb der ersten Stunde post injectionem im Zielbereich. Eine orale Aufnahme größerer Canavanin-Mengen über das Trinkwasser ist zwar potentiell möglich, allerdings verzichteten wir aufgrund der reduzierten Vergleichbarkeit der Tumorprogression in den einzelnen Versuchstieren auf diese Applikationsform. Durch natürliche Unterschiede im Trinkverhalten der Tiere, die unter Tumorprogress bzw. Behandlungsmaßnahmen wie der Applikation von ADI-PEG 20 noch verstärkt auftreten könnten, bestünde das Risiko einer nicht mehr vergleichbaren Canavanin-Aufnahme der einzelnen Mäuse (163). Die s.c. Implantation von Pumpensystemen mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung erschien uns aufgrund der begrenzten Kammergröße solcher Systeme nicht sinnvoll. Wir entschlossen uns daher zu einer intratumoralen Injektion von Canavanin in unserem In-vivo-Modell. Hierdurch können hohe lokale Wirkspiegel eines Medikaments oder Zellproduktes im Tumorgewebe erzielt werden (164, 165).

Aufgrund der oben geschilderten Erfahrungen aus den Versuchen zur Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib in vivo optimierten wir das NSG Xenograftmodell weiter. Um ein langsames Engraftment zu erreichen, wurden NCI-A2-Zellen in niedrigerer Dosis (2×10^6 Zellen pro Maus) s.c. in die rasierte Flanke von NSG Mäusen injiziert. Die Zeitdauer bis zum Start der Behandlung konnte so auf 7 Tage reduziert werden. Es zeigte sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums unter Monotherapie mit ADI-PEG 20. Eine Monotherapie mit Canavanin zeigte, wie zu erwarten war, keine Effekte auf das Wachstum der Xenograft-Tumoren. Diese sind in Gegenwart von Arginin aufgrund dessen präferentieller Bindung an die Arginyl-tRNA vor den toxischen Effekten des Canavanins geschützt (95). Die Kombination aus einer Therapie mit Canavanin und einer effektiven Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 bewirkte allerdings eine hoch signifikante Steigerung der Überlebensrate der

Mäuse. Das Tumorwachstum trat erst deutlich verzögert auf. Der extrem toxische Effekt von Canavanin auf Tumorzellen bei gleichzeitigem Argininmangel konnte anhand der vorliegenden Arbeit also erstmals auch in einem In-Vivo-Modell nachgewiesen werden. Die Kombinationstherapie führte zu einer deutlichen Verlängerung der tumorfreien Zeit. Das Risiko zu versterben lag bei einer Maus der Kontrollgruppe fast 20-fach über dem Sterberisiko einer Maus unter Behandlung mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Zudem zeigten sich keine toxischen Effekte bei der Kombinationstherapie mit ADI-PEG 20 und Canavanin. Dieser Umstand scheint der deutlich reduzierten Canavaninspiegel im Vergleich zu den historischen Canavanin-Experimenten unter Gegenwart von Arginin zuzuschreiben zu sein. Zudem sind bei der Kombination mit ADI-PEG 20 alle ASS1-exprimierenden Körpergewebe vor den Auswirkungen von Canavanin geschützt, da Citrullin in sehr großen Mengen gebildet wird. Dieses kann über ASS1 und ASL in gesunden Körperzellen wieder zu Arginin verstoffwechselt werden. Allerdings zeigten aber auch die Mäuse unter Kombination von ADI-PEG 20 und Canavanin schließlich eine Progression der Xenograft-Tumoren. Um Hinweise auf mögliche Resistenzmechanismen zu erhalten, explantierten wir die Xenografts aus den getöteten Mäusen und führten biochemische, durchflusszytometrische und immunhistochemische Untersuchungen durch. Zudem erfolgten HPLC-Messungen der Arginin- und Canavaninspiegel im Gewebe explantierter Xenograft-Tumoren.

Passend zu den beobachteten Überlebenskurven war eine signifikante Apoptoseinduktion in den immunhistochemischen Färbungen auf gespaltene Caspase-3-Fragmente nur in Tumoren sichtbar, die aus Mäusen der Kombinationstherapiegruppe entnommen wurden. Alle drei anderen Gruppen zeigten keine vermehrte Spaltung von Caspase-3. Diese Beobachtung deckt sich sehr gut mit den Erfahrungen unserer In-vitro-Untersuchungen zur Apoptose- und Zelltodinduktion unter Argininmangel und bestätigt einmal mehr, dass die Strategie der Arginindepletion zur effektiven Tumorzelleradikation auch beim Multipen Myelom mit weiteren Therapiestrategien kombiniert werden sollte.

Da die Bildung von Autoantikörpern gegen ADI-PEG 20, wie sie in frühen klinischen Studien beim Menschen beobachtet wurde, in NSG Mäusen aufgrund des Fehlens von B-Lymphozyten und Plasmazellen der Mäuse ausgeschlossen werden konnte, führten wir Untersuchungen zu weiteren möglichen Resistenzmechanismen durch (62). Hierzu stellten wir zunächst Untersuchungen zur Expression von ASS1 in Tumoren der unterschiedlichen Experimentalgruppen mittels Immunhistochemie an. Die Induktion einer ASS1-Expression stellt den häufigsten Resistenzmechanismus unter Arginindeprivation dar (62, 76, 86). Passend zu den Western Blots von NCI-H929-Zellen zeigten Tumoren der Mock-Gruppe allenfalls eine minimale ASS1-Expression. Unter Behandlung mit ADI-PEG 20 alleine bzw. in Kombination mit Canavanin kam es zu einer geringen Steigerung der ASS1-Expression in den

untersuchten Tumoren. Um die funktionelle Relevanz dieser schwachen ASS1-Expression zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment Tumorzellen direkt nach Entnahme aus einem Versuchstier der Kombinationstherapiegruppe (ADI-PEG 20 + Canavanin) vereinzelt und über 24 h in Zellkultur in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Arginin, Canavanin und Citrullin inkubiert. Mittels anschließendem Annexin-PI-FACS konnte gezeigt werden, dass unter Argininmangel auch durch Zugabe von Citrullin keine Verminderung der Zelltodinduktion durch Canavanin eintritt. Die Tumorzellen dieses Versuchstiers waren also auch nach ca. 60 Tagen Überlebenszeit im Mausmodell noch als argininauxotroph zu bezeichnen. Aufgrund der begrenzten Menge an Tumorzellen der anderen drei Mäuse dieser Behandlungsgruppe konnte dieses Experiment nur einmal durchgeführt werden. Bei vergleichbar geringer ASS1-Expression in allen vier Versuchstieren der Kombinationsgruppe halten wir eine Induktion der ASS1-Expression aber nicht für den zentralen Resistenzmechanismus in unserem Myelommodell.

Um die Effektivität der Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 auch unter Anwesenheit von Canavanin in vivo zu überprüfen, wurden HPLC-Messungen aus Ex-vivo-Tumorgewebe durchgeführt. Diese bestätigten die Persistenz wirksamer Canavanin-Spiegel über bis zu 12 h post injectionem in unserem Xenograft-Myelommodell nach intratumoraler Injektion auch unter gleichzeitiger Behandlung mit ADI-PEG 20. Durch Verwendung der i.t. Injektionstechnik konnte also eine etwa 10-fache Verlängerung des effektiven Wirkspiegels von Canavanin gegenüber einer einfachen s.c. Injektion erreicht werden. Da die Applikationen von Canavanin zur Schonung der Versuchstiere nur an drei Tagen der Woche stattfanden (Mo-Mi-Fr), wäre allerdings eine weitere Optimierung der Canavanin-Exposition denkbar. Diese könnte z.B. über neue pharmazeutische Applikationsformen (z.B. polymere Nanopartikel) oder die kontinuierliche Applikation über Pumpensysteme erfolgen (166, 167). Solche Systeme müssten z.B. mit einem befüllbaren Medikamentenreservoir ausgestattet sein (z.B. Alzet iPRECIO®), da relativ große Canavaninmengen bei begrenzter Löslichkeit in wässriger Lösung (100 mg/ml) benötigt werden. Solche Devices könnten sich allerdings wieder negativ auf das Verhalten der Versuchstiere auswirken. Offensichtlich fand keine relevante Spaltung von Canavanin durch ADI-PEG 20 in unseren Versuchen statt. Dieser Prozess, bei dem aus Canavanin Ammoniak und O-Ureido-L-Homoserin entstehen, ist in der Literatur u.a. für die Arginindeiminase aus *Mycoplasma arthritidis* beschrieben (168). In-Vitro-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits in-vitro eine persistierende zytotoxische Aktivität von Canavanin in Kombination mit ADI-PEG 20 (Lea Ströher, Daten noch nicht publiziert). Zudem findet keine relevante Hemmung der ADI-PEG-20-Aktivität durch Canavanin statt, wie unsere hier präsentierten HPLC-Messungen sowie präklinische Untersuchungen gezeigt haben (Lea Ströher, Daten noch nicht publiziert). Dies könnte an einem höheren K_m -Wert der Arginindeiminase für Canavanin im Vergleich zu Arginin sowie einer möglicherweise weiteren

Verstärkung der Substratspezifität durch Pegylierung liegen (168). Zudem setzen Arginindeiminasen Canavanin nur langsam und in Abhängigkeit der Canavanin-Konzentration um (129). Detaillierte pharmakologische Untersuchungen zu einer möglichen Reaktion von ADI-PEG 20 mit Canavanin sind derzeit noch nicht publiziert, stehen aber einer Kombination beider Substanzen zur Anti-Tumorthherapie vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse sicherlich nicht im Wege. Untersuchungen zu der Kombination von Canavanin mit boviner bzw. humaner Arginase I konnten ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt von Canavanin auf dieses Arginin-verstoffwechelnde Enzym nachweisen (112). Eine mögliche Kombinationstherapie von Canavanin mit Arginase wäre also ebenfalls in vivo möglich, allerdings müsste dann zum Schutz vor Nebenwirkungen vermutlich eine zusätzliche Citrullin-Supplementation stattfinden (91, 169).

Der Abbau zelleigener Proteine durch Autophagie kann unter Argininmangel durch humane T-Zellen und Tumorzellen zum Recycling von proteingebundenem Arginin genutzt werden (92, 145). Aufgrund der Beteiligung der Autophagie an Mechanismen der Zelltodinduktion wie auch der Zelladaptation an Proteinstress bzw. den Entzug von Nährstoffen ist die Bedeutung dieses zellphysiologischen Prozesses in vielen Fällen noch unverstanden (42). Beim Multiplen Myelom mehren sich Hinweise darauf, dass eine basale Autophagieaktivität, die unter Stressbedingungen noch induziert werden kann, eine protektive Rolle für das Tumorzellüberleben spielt (170). Wir stellten daher einen präliminären Versuch zur Autophagieinduktion in unseren Ex-vivo-Tumorlysaten an. Im Vergleich zu Tumoren aus Tieren der Kontrollgruppe wiesen Lysate aus Tumorgewebe derjenigen Mäuse, die mit ADI-PEG 20 und Canavanin behandelt wurden, eine vermehrte Lipid-Konjugation von LC3-I in LC3-II auf. Dies kann als Hinweis auf eine vermehrte Bildung von Autophagosomen, die LC3-II auf ihrer Oberfläche tragen, gesehen werden. Da jedoch auch die Inhibition später Schritte des Autophagie-Pfades zu einem vermehrten Nachweis von LC3-II führen kann (wie z.B. die Positivkontrolle mit Chloroquin zeigt), sind weitere Untersuchungen zur Autophagieinduktion durch Argininmangel in Myelomzellen notwendig. In vitro scheinen protektive Autophagiemechanismen unter Argininmangel und gleichzeitiger Canavanin-Behandlung nach ersten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe keine Rolle zu spielen, da sie entweder zu spät eingreifen oder insuffizient bleiben (162). Diese Zusammenhänge könnten sich jedoch in vivo aufgrund der deutlich längeren Adaptationszeit der Myelomzellen anders darstellen. Zum Zeitpunkt der Planung dieser Arbeit waren weitere Autophagie-Assays wie z.B. Elektronenmikroskopie oder Western-Blotting auf p62, Immunfluoreszenz-Imaging usw. nicht vorgesehen bzw. etabliert. Solche Untersuchungen sollten allerdings aufgrund der möglicherweise großen Relevanz von Autophagie-Prozessen im Rahmen der Resistenzentwicklung von argininauxotrophen Myelomzellen unter Argininmangel in zukünftigen In-vivo-Versuchen mit einbezogen werden.

Über die untersuchten Mechanismen hinaus sind selbstverständlich weitere Resistenzmechanismen denkbar. Die Aktivierung antiapoptotischer und pro-proliferativer Signalwege sowie Transkriptionsfaktoren ist bereits für andere Tumorentitäten unter Argininmangel beschrieben. So spielt z.B. die Aktivierung von c-myc durch Phosphorylierung via Ras/PI3K/ERK-Signalweg eine Rolle bei der Resistenzentwicklung von Melanomzellen (171). C-myc führt nicht nur zur Induktion einer ASS1-Expression, sondern hat neben seinen pro-proliferativen auch pleiotrope Effekte auf den Stoffwechsel der Tumorzellen, u.a. führte es zur Induktion von Glutaminolyse und Glykolyse (172, 173). Eine detaillierte Charakterisierung von zellulären Signalwegen im Rahmen der Resistenzentwicklung von Myelomzellen unter Arginindepletion war jenseits der Zielsetzung dieser Arbeit und wird derzeit in in-vitro durch unsere Arbeitsgruppe untersucht (Johannes Windschmitt, Lilli Sester). Aminosäuretransporter spielen bei der Aufnahme von essentiellen Aminosäuren aus dem Blut in Körperzellen eine entscheidende Rolle. Erste Versuche unserer Arbeitsgruppe bestätigten, dass die neutrale Aminosäure Canavanin über andere Transporter in Myelomzellen aufgenommen wird als die kationische Aminosäure Arginin. Eine Herunterregulation der Expression von Canavanintransportern wäre daher ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus von Myelomzellen, der derzeit durch unsere Arbeitsgruppe untersucht wird (Alice Habermeier & Anke Werner, Daten bisher nicht publiziert).

5.5. Tumorselektivität

Entsprechend der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergibt sich ein interessanter Ansatz einer hochselektiven metabolischen Therapie argininauxotropher Tumoren wie dem Multiplen Myelom. Die Wirkungsspezifität von ADI-PEG 20 erlaubt es nämlich, die extreme zytotoxische Wirkung von Canavanin im lebenden Organismus ausschließlich auf die Tumorzellen zu konzentrieren (Abbildung 25). Da ADI-PEG 20 Arginin im Blut eines Organismus in Citrullin und Ammoniak spaltet, besteht für ASS1-positive Körpergewebe die Möglichkeit der intrazellulären Resynthese von Arginin nach Aufnahme von Citrullin. Die intrazellulär deutlich höheren Argininspiegel verdrängen Canavanin von den Arginyl-tRNA-Bindungsstellen. In ASS1-negativen Tumorgeweben kann Canavanin bei vollständigem Argininmangel jedoch ungehindert an die Arginyl-tRNA binden und somit hocheffektiv Proteinstress, UPR und Apoptose auslösen. Aufgrund der Nebenwirkungsfreiheit dieser metabolischen Therapie ist eine Kombination mit weiteren therapeutischen Substanzen wie z.B. Proteasomeninhibitoren oder Autophagieinhibitoren hochattraktiv. Zu bedenken sind allerdings die komplexen extrazellulären Auswirkungen der Arginindepletion auf das Tumormikromilieu. So sind z.B. wichtige Funktionen von humanen tumorreaktiven T-Zellen auf das Vorhandensein von extrazellulärem Arginin angewiesen (174, 175). Diese Argininabhängigkeit kann jedoch in Gegenwart von Citrullin und geringen Mengen an

extrazellulärem Arginin durch die Induktion von ASS1 und des Citrullin-Transporters LAT1 überwunden werden (176). In unserem Szenario könnte also ein selektiver Argininentzug von Myelomzellen bei erhaltener Anti-Tumorimmunität den Grundstein einer hocheffektiven und gut verträglichen Kombinationstherapie darstellen. Eine Kombination wäre dann auch mit neuen Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren oder adoptivem T-Zell-Transfer möglich. An einer Integration dieser Therapiekonzepte wird derzeit durch unsere Arbeitsgruppe in enger Kooperation mit der AG Theobald der Universitätsmedizin Mainz gearbeitet.

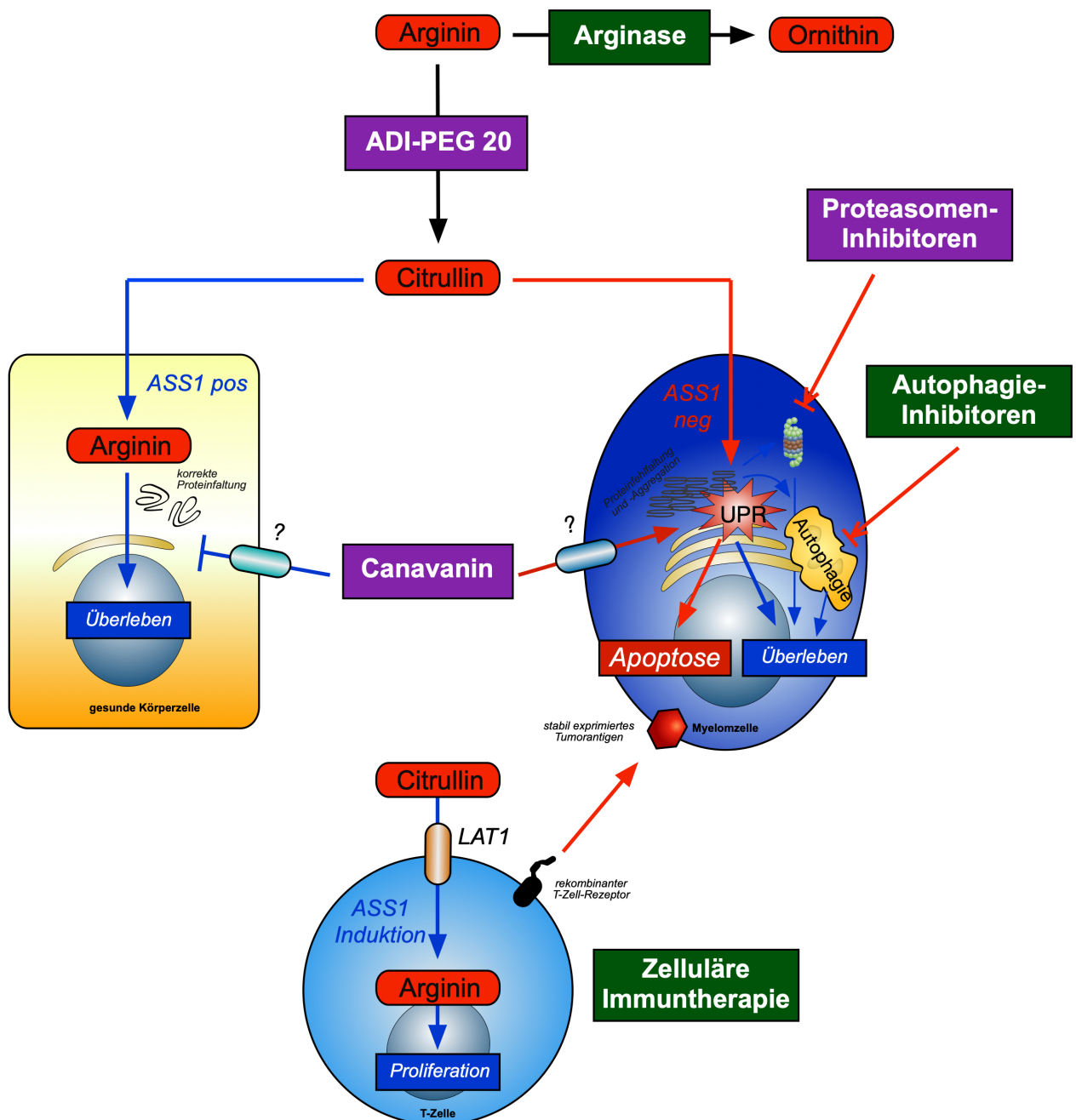


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer tumorspezifischen Arginindepletion beim Multiplen Myelom als neue metabolische Therapiestrategie. Arginin-depletierende Enzyme wie ADI-PEG 20 und Arginase können zur

effektiven Beseitigung der proteinogenen Aminosäure Arginin genutzt werden. Das im Falle von ADI-PEG 20 entstehende Citrullin kann in argininauxotrophen Myelomzellen aufgrund einer fehlenden Expression des Enzyms ASS1 nicht wieder zu Arginin verstoffwechselt werden. Das Arginin-Analogon Canavanin kann stattdessen in neu synthetisierte Proteine eingebaut werden und induziert eine massive Fehlfaltung und Proteinaggregation. Der Abbau fehlgefalteter Proteine in Proteasomen und durch Autophagie könnte betroffene Zellen vor Apoptose und Zelltod schützen, weshalb eine Kombination mit Proteasomeninhibitoren oder Autophagieinhibitoren sinnvoll erscheint. Normale Körperzellen sind durch die Expression von ASS1 vor den zytotoxischen Effekten von Canavanin geschützt. Humane T-Zellen können Citrullin über LAT1 aufnehmen und eine ASS1-Expression induzieren. Unter bestimmten Voraussetzungen (stabil exprimiertes Tumorantigen, ASS1-Expression der T-Zelle) ist damit auch eine Kombination der vorgestellten Arginindepletion mit zellulären Immuntherapien möglich. Rote Pfeile: zytotoxische Wirkung. Blaue Pfeile: Vorgang fördert Zellüberleben und -Proliferation. Rote Kästen: Aminosäuren des Argininstoffwechsels. Lila Kästen: in dieser Arbeit nachgewiesene Wirkung. Grüne Kästen: sinnvolle bzw. alternative Kombinationspartner. Quelle: eigene Schemazeichnung.

5.6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Interferenz mit dem Argininstoffwechsel eine neue sinnvolle Therapiestrategie beim Multiplen Myelom darstellt. Zwei der untersuchten Myelomzelllinien zeigten eine stabile Argininauxotrophie auch unter prolongiertem Argininmangel. Mittlerweile wurden zwei weitere argininauxotrophe Myelom-Zelllinien (FD-50 und LP-1) in unserem Labor identifiziert. Ein Screening von primären Patientenproben bezüglich einer Expression von ASS1 befindet sich derzeit im Gange. Erste gewonnene Daten lassen die Schätzung zu, dass etwa 50 % der untersuchten Myelomproben keine ASS1-Expression aufweisen (AG Munder, Daten noch nicht publiziert). Wie viele dieser Myelome eine De-novo-Expression von ASS1 unter Argininmangel induzieren können, ist noch nicht analysiert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die hier vorgestellte metabolische Therapie auch in zahlreichen klinischen Fällen sinnvoll anzuwenden wäre. Durch eine pharmakologische Modifikation der ASS1-Expression könnte ADI-PEG 20 auch in primär argininprototrophen Tumoren Anwendung finden. Eine weitere Möglichkeit zur Erweiterung des einer Arginindepletion zuführbaren Kollektivs von Myelompatienten stellt die Nutzung einer rekombinanten humanen Arginase dar, wobei Ornithin und Harnstoff als Produkte des Argininsatzes entstehen. Ornithin kann nur durch das leberspezifische Enzym Ornithin-Transcarbamylase (OCT) über Citrullin wieder zu Arginin recycelt werden, sodass Myelomzellen unabhängig von der ASS1-Expression auf eine Therapie mit Arginase ansprechen sollten. Zudem sind bisher noch keine Daten zu einer möglichen aberranten Expression von OCT in Myelomzellen bekannt. Diese sollte jedoch vor dem Einsatz von Arginase in präklinischen Studien mit Myelomzelllinien überprüft werden. Auch Arginase lässt sich in-vitro mit Canavanin kombinieren, ohne dass es zu einer Reduktion der Zytotoxizität dieser Substanz kommt (93). In einigen klinischen Studien beim Menschen konnten neutralisierende Antikörper als Resistenzmechanismus gegenüber einer Arginindepletion mittels ADI-PEG 20 nachgewiesen werden. Polaris Pharmaceuticals arbeitet derzeit an einer neuen Enzymvariante mit geringerer Antigenität und weiter optimierten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften. Die Entwicklung von

effektiven tumorspezifischen Kombinationsstrategien mit diesem arginindepletierenden Enzym erscheinen daher weiterhin hochinteressant.

Die im Rahmen dieser Arbeit und an anderer Stelle durchgeführten biochemischen Untersuchungen legen nahe, dass unter Arginindepletion Proteinstress in Tumorzellen ausgelöst wird. Die Kombination mit Substanzen, welche die Anpassungsreaktionen einer Zelle an diesen Proteinstress hemmen, erscheint daher sinnvoll. Wir konnten *in vitro* eine additive Wirkung zwischen Arginindepletion und Proteasomeninhibition mittels Bortezomib zeigen. Die Kombination mit HDAC6-Inhibitoren wie Ricolinostat soll zeitnah überprüft werden. Die detaillierten mechanistischen Zusammenhänge zwischen induziertem Proteinstress, UPR, Autophagie und Apoptoseinduktion waren jenseits der Ziele dieser Arbeit. Tiefergreifende biochemische Untersuchungen weiterer UPR- und Autophagieproteine wie ATF4, ATF6, PERK, CHOP, p62 und BAG3 unter Arginindepletion werden auf der Basis der hier vorgestellten Daten durch unsere Arbeitsgruppe derzeit durchgeführt. Zudem sind Immunfluoreszenz-basierte Untersuchungen bzgl. der Formation von Aggresomen und Autophagosomen geplant. Hierdurch sollen die vermuteten Zusammenhänge zwischen Stressinduktion und Apoptose von Myelomzellen besser verstanden werden. Wir vermuten, dass in Alterationen der zugrunde liegenden Signalwege bzw. Stressantworten der Schlüssel zur Resistenzentwicklung in unserem *In-vivo*-Tumormodell liegt.

Vor dem Hintergrund der beeindruckenden Wirkung von Canavanin auf Myelomzellen unter Argininmangel erscheint die weitere klinische Entwicklung dieses Arginin-Analogons äußerst attraktiv. Ein Ziel unserer Arbeitsgruppe ist hierbei ein besseres Verständnis der Pharmakokinetik von Canavanin im humanen bzw. murinen Organismus zu gewinnen. Hierbei steht die Identifikation von Zellmembranproteinen im Vordergrund, die für die Aufnahme von Canavanin in Myelomzellen und andere Körperzellen verantwortlich sind. Hilfreich wäre auch ein besseres Verständnis der kurzen Halbwertszeit von Canavanin im Organismus, insbesondere die Suche nach Canavanin-abbauenden Enzymen. Aufgrund der beschriebenen pharmakokinetischen Limitationen stellt die Entwicklung von chemisch optimierten Arginin-Analoga, welche die zytotoxischen Eigenschaften von Canavanin bewahren, aber eine optimierte Pharmakokinetik im Organismus aufweisen, ein hochinteressantes Therapiekonzept für argininauxotrophe Tumorentitäten dar. Bei der Entwicklung solcher Analoga sollte auf die Möglichkeit der Kombination mit Arginin-depletierenden Enzymen wie ADI-PEG 20 oder Arginase Wert gelegt werden. Eine entsprechende synthetische Substanz sollte möglichst nur an die Arginyl-tRNA-Synthetase und nicht an weitere Arginin-verstoffwechelnde Enzyme binden. Hilfreich bei der Medikamentensynthese könnte sich die kürzlich publizierte Struktur der humanen Arginyl-tRNA-Synthetase sowie ihrer Canavanin-Bindungsstelle herausstellen (98). Die Entwicklung solcher optimierter Arginin-Analoga in

Kooperation mit der pharmazeutischen Industrie ist eines der wesentlichen nächsten Ziele unserer Arbeitsgruppe.

Eine langfristige Tumoreradikation ist häufig nur durch eine effektive Immunantwort gegen die Tumorzellen möglich. Beim Multiplen Myelom ist ein Langzeitüberleben nach allogener Blutstammzelltransplantation als Immuntherapie möglich, allerdings mit großen potentiellen Risiken verbunden (177). Dies liegt unter anderem an der relativ hohen Rate an Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (*engl. Graft-vs-Host-Disease, GvHD*), die in diesem Zusammenhang beobachtet werden. Mithilfe adoptiver T-Zell-Therapien, die sich autologer T-Zellen des Patienten bedienen, welche gentechnisch mit Tumorantigen-reaktiven Rezeptoren ausgestattet und im Anschluss nach einer Konditionierungstherapie in den Patienten zurückgeführt werden, befindet sich derzeit in der intensiven tumorimmunologischen Forschung und frühen klinischen Anwendung (178, 179). Durch die Verwendung autologer T-Zellen sind GvHD-Reaktionen und die damit assoziierte Langzeitmorbidity und -mortality ausgeschlossen. Durch genetische Modifikationen an den verwendeten T-Zell- bzw. Chimären-Antigen-Rezeptoren lässt sich die tumorspezifische Zytotoxizität der Zellpräparate deutlich steigern. Allerdings kommt es auch bei diesen modernen zellulären Immuntherapien in einem signifikanten Anteil zu Rückfällen der Tumorerkrankung. Unsere Strategie der metabolischen Tumorthherapie ließe sich auf der Basis der umfangreichen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Proliferation und Funktion von T-Zellen im Argininmangel möglicherweise ideal mit einer adoptiven T-Zelltherapie beim Multiplen Myelom kombinieren. Der Schwerpunkt der Untersuchungen, die in Kooperation mit der AG Theobald stattfinden, liegt hierbei auf einer Optimierung der T-Zell-Funktionen im Argininmangel und einer Identifikation optimaler Tumorantigene, die auch unter den Bedingungen eines Argininmangels in ausreichend großer Zahl auf der Zelloberfläche der Myelomzellen exprimiert werden.

6. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom zählt zu den häufigsten bösartigen hämatologischen Erkrankungen des Menschen und ist durch schwerwiegende klinische Symptome wie Osteolysen, Niereninsuffizienz, Anämie und Hypercalcämie gekennzeichnet. Trotz zahlreicher Fortschritte bei der Behandlung des Multiplen Myeloms seit der letzten Jahrtausendwende ist weiterhin keine kurative Therapie der Erkrankung bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interferenz mit dem Stoffwechsel der proteinogenen Aminosäure L-Arginin in Myelomzellen erstmalig als völlig neue Therapiestrategie bei dieser Tumorentität beschrieben werden. Bestimmte Myelomzelllinien sind aufgrund einer fehlenden Expression des Enzyms Argininosuccinat-Synthetase 1 (ASS1) auf die Verfügbarkeit von extrazellulärem Arginin angewiesen. Der Entzug von Arginin führte *in vitro* zu einer raschen Inhibition der Zellproliferation bei allerdings nur langsamer und geringer Induktion von Apoptose und Zelltod. Die zytotoxische Wirkung des klinisch zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassenen Proteasomeninhibitors Bortezomib konnte durch Präinkubation der Myelomzellen im Argininmangel sehr stark gesteigert werden, möglicherweise durch eine Induktion von vermehrtem Proteinstress in den Myelomzellen. In einem neu in unserer Arbeitsgruppe etablierten Xenograft-Myelommodell unter Verwendung von NOD/SCID- γ_c^{null} (NSG) Mäusen konnte eine Verlangsamung des Tumorwachstums unter Behandlung mit Bortezomib und ADI-PEG 20, einer pegylierten Arginin-Deiminase, die extrazelluläres Arginin in Citrullin und Ammoniak spaltet, festgestellt werden. Allerdings blieb die Kontrolle des Tumorwachstums unter der Kombination von ADI-PEG 20 und Bortezomib nur von kurzer Dauer. In parallel durchgeführten Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte das Arginin-Analogon L-Canavanin als möglicher sinnvoller Kombinationspartner von ADI-PEG 20 *in vivo* identifiziert werden. Die Kombination von ADI-PEG 20 mit Canavanin führte zu einer hoch signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der NSG Mäuse sowie einem deutlich verlängerten tumorfreien Überleben. Sie war zudem frei von relevanten Nebenwirkungen. Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Aktivität von ADI-PEG 20 durch Canavanin ergaben sich in den durchgeführten HPLC-Messungen aus Tumorgewebe nicht. Zudem konnten gute Wirkspiegel von Canavanin im Tumorgewebe erzielt werden. Allerdings kam es auch unter dieser Therapiestrategie letztendlich zu einem Tumorwachstum. Dies könnte mit einer vermehrten Induktion von Autophagie in den Myelomzellen erklärt werden. Tatsächlich ließ sich in Mäusen der Kombinationstherapiegruppe eine vermehrte Umwandlung von LC3-I in LC3-II nachweisen. Eine signifikante Expression von ASS1, die zu einer funktionellen Arginin-Unabhängigkeit führen könnte, konnte in den entnommenen Xenograft-Tumoren nicht nachgewiesen werden. Die Interferenz mit dem Argininstoffwechsel stellt somit eine vielversprechende neue Therapieoption beim Multiplen Myelom dar.

7. Literaturverzeichnis

1. A. Smith, D. Howell, R. Patmore, A. Jack, E. Roman, Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network, *Br J Cancer* **105**, 1684–1692 (2011).
2. B. Wörmann, C. Driessen, H. Einsele, H. Goldschmidt, E. Gunsilius, M. Kortüm, N. Kröger, H. Ludwig, L.-O. Mügge, R. Naumann, R. Pritzkeleit, C. Röllig, C. Scheid, C. Taverna, K. Weisel, F. Weissinger, Leitlinie Multiples Myelom der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (DGHO). Stand: August 2018. (available at <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html>).
3. S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz, E. S. Jaffe, The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
4. B. A. Walker, K. Mavrommatis, C. P. Wardell, T. C. Ashby, M. Bauer, F. E. Davies, A. Rosenthal, H. Wang, P. Qu, A. Hoering, M. Samur, F. Towfic, M. Ortiz, E. Flynt, Z. Yu, Z. Yang, D. Rozelle, J. Obenauer, M. Trotter, D. Auclair, J. Keats, N. Bolli, M. Fulciniti, R. Szalat, P. Moreau, B. Durie, A. K. Stewart, H. Goldschmidt, M. S. Raab, H. Einsele, P. Sonneveld, J. San Miguel, S. Lonial, G. H. Jackson, K. C. Anderson, H. Avet-Loiseau, N. Munshi, A. Thakurta, G. J. Morgan, Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma, *Blood* **132**, 587–597 (2018).
5. G. J. Morgan, B. A. Walker, F. E. Davies, The genetic architecture of multiple myeloma, *Nat Rev Cancer* **12**, 335–348 (2012).
6. S. V. Rajkumar, M. A. Dimopoulos, A. Palumbo, G. Merlini, S. Kumar, J. Hillengass, E. Kastritis, P. Richardson, O. Landgren, B. Paiva, A. Dispenzieri, B. Weiss, X. Leleu, S. Zweegman, S. Lonial, E. Zamagni, S. Jagannath, O. Sezer, S. Y. Kristinsson, J. Caers, S. Z. Usmani, J.-J. Lahuerta, M. Cavo, H. Goldschmidt, E. Terpos, R. A. Kyle, K. C. Anderson, B. G. M. Durie, J. F. S. Miguel, International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma, *The Lancet Oncology* **15**, e538–e548 (2014).
7. A. Palumbo, K. Anderson, Multiple Myeloma, *N Engl J Med* **364**, 1046–1060 (2011).
8. N. S. Joseph, S. Gentili, J. L. Kaufman, S. Lonial, A. K. Nooka, High-risk Multiple Myeloma: Definition and Management, *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **17S**, 80–87 (2017).
9. R. Fonseca, S. Abouzaid, M. Bonafede, Q. Cai, K. Parikh, L. Cosler, P. Richardson, Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, *Leukemia* **31**, 1915–1921 (2017).
10. H. Lokhorst, H. Einsele, D. Vesole, B. Bruno, J. S. Miguel, J. A. Pérez-Simon, N. Kröger, P. Moreau, G. Gahrton, C. Gasparetto, S. Giralt, W. Bensinger, International Myeloma Working Group Consensus Statement Regarding the Current Status of Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma, *Journal of Clinical Oncology* **28**, 4521–4530 (2010).
11. M. A. Dimopoulos, A. Oriol, H. Nahi, J. San Miguel, N. J. Bahlis, S. Z. Usmani, N. Rabin, R. Z. Orlowski, M. Komarnicki, K. Suzuki, T. Plesner, S.-S. Yoon, D. Ben Yehuda, P. G. Richardson, H. Goldschmidt, D. Reece, S. Lisby, N. Z. Khokhar, L. O'Rourke, C. Chiu, X. Qin, M. Guckert, T. Ahmadi, P. Moreau, Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma, *N Engl J Med* **375**, 1319–1331 (2016).
12. A. Palumbo, A. Chanan-Khan, K. Weisel, A. K. Nooka, T. Masszi, M. Beksac, I. Spicka, V. Hungria, M. Munder, M. V. Mateos, T. M. Mark, M. Qi, J. Schecter, H. Amin, X. Qin, W.

- Deraedt, T. Ahmadi, A. Spencer, P. Sonneveld, Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma, *N Engl J Med* **375**, 754–766 (2016).
13. K. C. Weisel, J. San Miguel, G. Cook, M. Leiba, K. Suzuki, S. Kumar, M. Cavo, H. Avet-Loiseau, H. Quach, V. Hungria, S. Lentzsch, R. Hajek, P. Sonneveld, K. Wu, X. Qin, C. Chiu, D. Soong, M. Qi, J. M. Schecter, M. A. Dimopoulos, Efficacy of daratumumab in combination with lenalidomide plus dexamethasone (DRd) or bortezomib plus dexamethasone (DVd) in relapsed or refractory multiple myeloma (RRMM) based on cytogenetic risk status, *Journal of Clinical Oncology* **35**, 8006 (2017).
14. M.-V. Mateos, M. A. Dimopoulos, M. Cavo, K. Suzuki, A. Jakubowiak, S. Knop, C. Doyen, P. Lucio, Z. Nagy, P. Kaplan, L. Pour, M. Cook, S. Grosicki, A. Crepaldi, A. M. Liberati, P. Campbell, T. Shelekhova, S.-S. Yoon, G. Iosava, T. Fujisaki, M. Garg, C. Chiu, J. Wang, R. Carson, W. Crist, W. Deraedt, H. Nguyen, M. Qi, J. San Miguel, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma, *N Engl J Med* **378**, 518–528 (2018).
15. S. Meister, U. Schubert, K. Neubert, K. Herrmann, R. Burger, M. Gramatzki, S. Hahn, S. Schreiber, S. Wilhelm, M. Herrmann, H. M. Jack, R. E. Voll, Extensive Immunoglobulin Production Sensitizes Myeloma Cells for Proteasome Inhibition, *Cancer Research* **67**, 1783–1792 (2007).
16. M. H. Z. Guang, G. Bianchi, Targeting Protein Synthesis and Degradation in Multiple Myeloma: A Look at What's on the Horizon, *American Journal of Hematology/Oncology* **13**, 4–14 (2017).
17. L. I. Aronson, F. E. Davies, F. E. Davies, DangER: protein ovERload. Targeting protein degradation to treat myeloma, *Haematologica* **97**, 1119–1130 (2012).
18. Y. T. Kwon, A. Ciechanover, The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy, *Trends in Biochemical Sciences* **42**, 873–886 (2017).
19. A. Ciechanover, The unravelling of the ubiquitin system, *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 322–324 (2015).
20. M. M. Hiller, A. Finger, M. Schweiger, D. H. Wolf, ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway, *Science* **273**, 1725–1728 (1996).
21. G. Bianchi, L. Oliva, P. Cascio, N. Pengo, F. Fontana, F. Cerruti, A. Orsi, E. Pasqualetto, A. Mezghrani, V. Calbi, G. Palladini, N. Giuliani, K. C. Anderson, R. Sitia, S. Cenci, The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition, *Blood* **113**, 3040–3049 (2009).
22. P. Walter, D. Ron, The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation, *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
23. E. A. Obeng, L. M. Carlson, D. M. Gutman, W. J. Harrington, K. P. Lee, L. H. Boise, Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells, *Blood* **107**, 4907–4916 (2006).
24. C. Hetz, E. Chevet, S. A. Oakes, Proteostasis control by the unfolded protein response, *Nat Cell Biol* **17**, 829–838 (2015).
25. A. Bertolotti, Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, D. Ron, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response, *Nat Cell Biol* **2**, 326–332 (2000).

26. H. P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells, *Molecular Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
27. R. Asada, S. Kanemoto, S. Kondo, A. Saito, K. Imaizumi, The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology, *J Biochem* **149**, 507–518 (2011).
28. H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, K. Mori, XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor, *Cell* **107**, 881–891 (2001).
29. A. M. Reimold, N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravallese, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt, L. H. Glimcher, Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1, *Nature* **412**, 300–307 (2001).
30. J.-P. Upton, L. Wang, D. Han, E. S. Wang, N. E. Huskey, L. Lim, M. Truitt, M. T. McManus, D. Ruggero, A. Goga, F. R. Papa, S. A. Oakes, IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2, *Science* **338**, 818–822 (2012).
31. C. Hetz, L. H. Glimcher, Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 α Interactome, *Molecular Cell* **35**, 551–561 (2009).
32. F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding, D. Ron, Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1, *Science* **287**, 664–666 (2000).
33. K. D. McCullough, J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw, N. J. Holbrook, Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state, *Molecular and Cellular Biology* **21**, 1249–1259 (2001).
34. R. Jäger, M. J. M. Bertrand, A. M. Gorman, P. Vandenabeele, A. Samali, The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress, *Biology of the Cell* **104**, 259–270 (2012).
35. T. Verfaillie, N. Rubio, A. D. Garg, G. Bultynck, R. Rizzuto, J.-P. Decuypere, J. Piette, C. Linehan, S. Gupta, A. Samali, P. Agostinis, PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress, *Cell Death Differ.* **19**, 1880–1891 (2012).
36. J. H. Lin, H. Li, D. Yasumura, H. R. Cohen, C. Zhang, B. Panning, K. M. Shokat, M. M. LaVail, P. Walter, IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response, *Science* **318**, 944–949 (2007).
37. T.-K. Chang, D. A. Lawrence, M. Lu, J. Tan, J. M. Harnoss, S. A. Marsters, P. Liu, W. Sandoval, S. E. Martin, A. Ashkenazi, Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate, *Molecular Cell* **71**, 629–636.e5 (2018).
38. C. Hetz, F. R. Papa, The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control, *Molecular Cell* **69**, 169–181 (2018).
39. C. Leung-Hagesteijn, N. Erdmann, G. Cheung, J. J. Keats, A. K. Stewart, D. E. Reece, K. C. Chung, R. E. Tiedemann, Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma, *Cancer Cell* **24**, 289–304 (2013).

40. C. Driessen, M. Kraus, M. Joerger, H. Rosing, J. Bader, F. Hitz, C. Berset, A. Xyrafas, H. Hawle, G. Berthod, H. S. Overkleeft, C. Sessa, A. Huitema, T. Pabst, R. von Moos, D. Hess, U. J. M. Mey, Treatment with the HIV protease inhibitor nelfinavir triggers the unfolded protein response and may overcome proteasome inhibitor resistance of multiple myeloma in combination with bortezomib: a phase I trial (SAKK 65/08), *Haematologica* **101**, 346–355 (2016).
41. T. Shintani, D. J. Klionsky, Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword, *Science* **306**, 990–995 (2004).
42. D. M. Benbrook, A. Long, Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis, *Experimental oncology* **34**, 286–297 (2012).
43. N. Fujita, M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, T. Yoshimori, S. Subramani, Ed. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure, *MBoC* **19**, 4651–4659 (2008).
44. M. W. Wooten, T. Geetha, J. R. Babu, M. L. Seibenhener, J. Peng, N. Cox, M.-T. Diaz-Meco, J. Moscat, Essential role of SQSTM1/p62 in regulating accumulation of K63-ubiquitinated proteins, *J Biol. Chem* **283**, 6783–6789.
45. G. Matsumoto, K. Wada, M. Okuno, M. Kurosawa, N. Nukina, Serine 403 Phosphorylation of p62/SQSTM1 Regulates Selective Autophagic Clearance of Ubiquitinated Proteins, *Molecular Cell* **44**, 279–289 (2011).
46. T. Lamark, T. Johansen, Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy, *International Journal of Cell Biology* **2012**, 1–21 (2012).
47. Y. Kawaguchi, J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito, T.-P. Yao, The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress, *Cell* **115**, 727–738 (2003).
48. A. R. J. Young, M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. J. Darot, S. Tavaré, S. Arakawa, S. Shimizu, F. M. Watt, M. Narita, Autophagy mediates the mitotic senescence transition, *Genes & Development* **23**, 798–803 (2009).
49. X. Qu, J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.-L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, B. Levine, Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene, *J. Clin. Invest.* **112**, 1809–1820 (2003).
50. I. Savvidou, T. T. Khong, A. Spencer, The Role of Autophagy in Multiple Myeloma Progression, *Blood* **130**, 5355–5355 (2017).
51. T. Kawaguchi, K. Miyazawa, S. Moriya, T. Ohtomo, X.-F. Che, M. Naito, M. Itoh, A. Tomoda, Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: Crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress, *Int J Oncol* **38** (2011), doi:10.3892/ijo.2010.882.
52. S. Moriya, X.-F. Che, S. Komatsu, A. Abe, T. Kawaguchi, A. Gotoh, M. Inazu, A. Tomoda, K. Miyazawa, Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells, *Int J Oncol* **42**, 1541–1550 (2013).
53. D. T. Vogl, E. A. Stadtmauer, K.-S. Tan, D. F. Heitjan, L. E. Davis, L. Pontiggia, R. Rangwala, S. Piao, Y. C. Chang, E. C. Scott, T. M. Paul, C. W. Nichols, D. L. Porter, J. Kaplan,

- G. Mallon, J. E. Bradner, R. K. Amaravadi, Combined autophagy and proteasome inhibition, *Autophagy* **10**, 1380–1390 (2014).
54. N. Ghosh, N. Tucker, M. Zahurak, J. Wozney, I. Borrello, C. A. Huff, Clarithromycin overcomes resistance to lenalidomide and dexamethasone in multiple myeloma, *Am. J. Hematol.* **89**, E116–E120 (2014).
55. N. S. Raje, W. Bensinger, C. E. Cole, S. Lonial, S. Jagannath, C. E. Arce-Lara, J. Valent, A. E. Rosko, W. A. Harb, I. Sandhu, N. J. Bahlis, D. Reece, E. Terpos, J. Supko, D. Tamang, S. S. Jones, C. Wheeler, R. J. Markelewicz, P. G. Richardson, Ricolinostat (ACY-1215), the First Selective HDAC6 Inhibitor, Combines Safely with Pomalidomide and Dexamethasone and Shows Promising Early Results in Relapsed-and-Refractory Myeloma (ACE-MM-102 Study), *Blood* **126**, 4228–4228 (2015).
56. D. T. Vogl, N. S. Raje, S. Jagannath, P. G. Richardson, P. Hari, R. Z. Orlowski, J. G. Supko, D. Tamang, M. Yang, S. S. Jones, C. Wheeler, R. J. Markelewicz, S. Lonial, Ricolinostat, the first selective histone deacetylase 6 inhibitor, in combination with bortezomib and dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma, *Clinical Cancer Research* **23**, 3307–3315 (2017).
57. W. H. Koppenol, P. L. Bounds, C. V. Dang, Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, *Nat Rev Cancer* **11**, 325–337 (2011).
58. M. D. Farwell, D. A. Pryma, D. A. Mankoff, PET/CT imaging in cancer: Current applications and future directions, *Cancer* **120**, 3433–3445 (2014).
59. S. Faber, Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer, *Blood* **4**, 160–167 (1949).
60. J. M. Hill, J. Roberts, E. Loeb, A. Khan, A. MacLellan, R. W. Hill, L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia, *JAMA* **202**, 882–888 (1967).
61. B. L. Marini, A. J. Perissinotti, D. L. Bixby, J. Brown, P. W. Burke, Catalyzing improvements in ALL therapy with asparaginase, *Blood Rev.* **31**, 328–338 (2017).
62. B. Delage, D. A. Fennell, L. Nicholson, I. McNeish, N. R. Lemoine, T. Crook, P. W. Szlosarek, Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer, *Int. J. Cancer* **126**, 2762–2772 (2010).
63. E. Gilroy, The influence of arginine upon the growth rate of a transplantable tumour in the mouse, *Biochem. J.* **24**, 589–595 (1930).
64. H. F. Yerushalmi, D. G. Besselsen, N. A. Ignatenko, K. A. B. Mangone, J. L. P. Torres, D. E. Stringer, J. M. Guillen, H. Holubec, C. M. Payne, E. W. Gerner, Role of polyamines in arginine-dependent colon carcinogenesis in ApcMin/+ mice, *Molecular Carcinogenesis* **45**, 764–773 (2006).
65. M. T. Kuo, N. Savaraj, L. G. Feun, Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes, *Oncotarget* **1**, 246–251 (2010).
66. M. M. Phillips, M. T. Sheaff, P. W. Szlosarek, Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges, *Cancer Res Treat* **45**, 251–262 (2013).
67. S. M. Morris, Enzymes of Arginine Metabolism, *J Nutr* **134**, 2743S–2747S (2004).

68. D. N. Wheatley, E. Campbell, Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 3. Deficient utilisation of citrulline by malignant cells, *Br J Cancer* **89**, 573–576 (2003).
69. K. Birsoy, T. Wang, W. W. Chen, E. Freinkman, M. Abu-Remaileh, D. M. Sabatini, An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis, *Cell* **162**, 540–551 (2015).
70. L. B. Sullivan, D. Y. Gui, A. M. Hosios, L. N. Bush, E. Freinkman, M. G. Vander Heiden, Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells, *Cell* **162**, 552–563 (2015).
71. S. Rabinovich, L. Adler, K. Yizhak, A. Sarver, A. Silberman, S. Agron, N. Stettner, Q. Sun, A. Brandis, D. Helbling, S. Korman, S. Itzkovitz, D. Dimmock, I. Ulitsky, S. C. Nagamani, E. Ruppin, A. Erez, Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis, *Nature* **527**, 379–383 (2015).
72. P. W. Szlosarek, A. Klabatsa, A. Pallaska, M. Sheaff, P. Smith, T. Crook, M. J. Grimshaw, J. P. Steele, R. M. Rudd, F. R. Balkwill, D. A. Fennell, In vivo Loss of Expression of Argininosuccinate Synthetase in Malignant Pleural Mesothelioma Is a Biomarker for Susceptibility to Arginine Depletion, *Clinical Cancer Research* **12**, 7126–7131 (2006).
73. J. Lan, H.-C. Tai, S.-W. Lee, T.-J. Chen, H.-Y. Huang, C.-F. Li, Deficiency in expression and epigenetic DNA Methylation of ASS1 gene in nasopharyngeal carcinoma: negative prognostic impact and therapeutic relevance, *Tumor Biol.* **35**, 161–169 (2013).
74. N. Syed, J. Langer, K. Janczar, P. Singh, C. Lo Nigro, L. Lattanzio, H. M. Coley, E. Hatzimichael, J. Bomalaski, P. Szlosarek, M. Awad, K. O'Neil, F. Roncaroli, T. Crook, Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma, *Cell Death & Disease* **2012 3:7 4**, e458–e458 (2013).
75. H.-Y. Huang, W.-R. Wu, Y.-H. Wang, J.-W. Wang, F.-M. Fang, J.-W. Tsai, S.-H. Li, H.-C. Hung, S.-C. Yu, J. Lan, Y.-L. Shiue, C.-H. Hsing, L.-T. Chen, C.-F. Li, ASS1 as a Novel Tumor Suppressor Gene in Myxofibrosarcomas: Aberrant Loss via Epigenetic DNA Methylation Confers Aggressive Phenotypes, Negative Prognostic Impact, and Therapeutic Relevance, *Clinical Cancer Research* **19**, 2861–2872 (2013).
76. L. G. Feun, M. T. Kuo, N. Savaraj, Arginine deprivation in cancer therapy, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **18**, 78–82 (2015).
77. P. L. Bergsagel, Chemotherapy of multiple myeloma: Melphalan—40 years old and still going strong, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **9**, 2–3 (2003).
78. B. Delage, P. Luong, L. Maharaj, C. O'riain, N. Syed, T. Crook, E. Hatzimichael, A. Papoudou-Bai, T. J. Mitchell, S. J. Whittaker, R. Cerio, J. Gribben, N. Lemoine, J. Bomalaski, C.-F. Li, S. Joel, J. Fitzgibbon, L.-T. Chen, P. W. Szlosarek, Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis, *Cell Death & Disease* **2012 3:7 3**, e342–e342 (2012).
79. F. Miraki-Moud, E. Ghazaly, L. Ariza-McNaughton, K. A. Hodby, A. Clear, F. Anjos-Afonso, K. Liapis, M. Grantham, F. Sohrabi, J. S. Bomalaski, J. G. Gribben, P. W. Szlosarek, D. Bonnet, D. C. Taussig, Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo, *Blood* **125**, 4060–4068 (2015).
80. E. S. Glazer, M. Piccirillo, V. Albino, R. Di Giacomo, R. Palaia, A. A. Mastro, G. Beneduce, G. Castello, V. De Rosa, A. Petrillo, P. A. Ascierto, S. A. Curley, F. Izzo, Phase II Study of

Pegylated Arginine Deiminase for Nonresectable and Metastatic Hepatocellular Carcinoma, *Journal of Clinical Oncology* **28**, 2220–2226 (2016).

81. T. S. Yang, S. N. Lu, Y. Chao, I. S. Sheen, C. C. Lin, T.-E. Wang, S.-C. Chen, J.-H. Wang, L.-Y. Liao, J. A. Thomson, J. Wang-Peng, P.-J. Chen, L.-T. Chen, A randomised phase II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in Asian advanced hepatocellular carcinoma patients, *Br J Cancer* **103**, 954–960 (2010).

82. P. A. Ott, R. D. Carvajal, N. Pandit-Taskar, A. A. Jungbluth, E. W. Hoffman, B.-W. Wu, J. S. Bomalaski, R. Venhaus, L. Pan, L. J. Old, A. C. Pavlick, J. D. Wolchok, Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma, *Invest New Drugs* **31**, 425–434 (2012).

83. P. W. Szlosarek, J. P. Steele, L. Nolan, D. Gilligan, P. Taylor, J. Spicer, M. Lind, S. Mitra, J. Shamash, M. M. Phillips, P. Luong, S. Payne, P. Hillman, S. Ellis, T. Szyszko, G. Dancey, L. Butcher, S. Beck, N. E. Avril, J. Thomson, A. Johnston, M. Tomsa, C. Lawrence, P. Schmid, T. Crook, B.-W. Wu, J. S. Bomalaski, N. Lemoine, M. T. Sheaff, R. M. Rudd, D. Fennell, A. Hackshaw, Arginine Deprivation With Pegylated Arginine Deiminase in Patients With Argininosuccinate Synthetase 1–Deficient Malignant Pleural Mesothelioma: A Randomized Clinical Trial, *JAMA Oncol* **3**, 58–66 (2017).

84. P. A. Ott, R. D. Carvajal, N. Pandit-Taskar, A. A. Jungbluth, E. W. Hoffman, B.-W. Wu, J. S. Bomalaski, R. Venhaus, L. Pan, L. J. Old, A. C. Pavlick, J. D. Wolchok, Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma, *Invest New Drugs* **31**, 425–434 (2012).

85. P. W. Szlosarek, P. Luong, M. M. Phillips, M. Baccharini, S. Ellis, T. Szyszko, M. T. Sheaff, N. Avril, Metabolic Response to Pegylated Arginine Deiminase in Mesothelioma With Promoter Methylation of Argininosuccinate Synthetase, *Journal of Clinical Oncology* **31**, e111–e113 (2013).

86. L. Feun, M. You, C. J. Wu, M. T. Kuo, M. Wangpaichitr, S. Spector, N. Savaraj, Arginine Deprivation as a Targeted Therapy for Cancer, *Curr Pharm Des* **14**, 1049–1057 (2018).

87. Y. Long, W.-B. Tsai, Y. Long, W. B. Tsai, M. Wangpaichitr, T. Tsukamoto, N. Savaraj, L. G. Feun, M. T. Kuo, Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells Is Associated with Metabolic Reprogramming, Glucose Dependence, and Glutamine Addiction, *Molecular Cancer Therapeutics* **12**, 2581–2590 (2013).

88. O. Khoury, N. Ghazale, E. Stone, M. El-Sibai, A. E. Frankel, R. J. Abi-Habib, Human recombinant arginase I (Co)-PEG5000 [HuArgI (Co)-PEG5000]-induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human glioblastoma cells, *J Neurooncol* **122**, 75–85 (2015).

89. R. Tanios, A. Bekdash, E. Kassab, E. Stone, G. Georgiou, A. E. Frankel, R. J. Abi-Habib, Human recombinant arginase I(Co)-PEG5000 [HuArgI(Co)-PEG5000]-induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human acute myeloid leukemia cells, *Leukemia Research* **37**, 1565–1571 (2013).

90. Z. Wang, X. Shi, Y. Li, X. Zeng, J. Fan, Y. Sun, Z. Xian, G. Zhang, S. Wang, H. Hu, D. Ju, Involvement of autophagy in recombinant human arginase-induced cell apoptosis and growth inhibition of malignant melanoma cells, *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 2485–2494 (2013).

91. J. P. Mauldin, I. Zeinali, K. Kleypas, J. H. Woo, R. S. Blackwood, C.-H. Jo, E. M. Stone, G. Georgiou, A. E. Frankel, Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation, *Translational Oncology* **5**, 26–31 (2012).

92. R. García-Navas, M. Munder, F. Mollinedo, Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes, *Autophagy* **8**, 1557–1576 (2012).
93. Y. Bobak, Y. V. Kurlishchuk, B. Vynnytska-Myronovska, O. Grydzuk, G. Shuvayeva, M. J. Redowicz, L. A. Kunz-Schughart, O. Stasyk, Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **70**, 29–38 (2016).
94. A. K. Bence, P. A. Crooks, The Mechanism of L-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **18**, 383–394 (2003).
95. G. L. Igloi, E. Schiefermayr, Amino acid discrimination by arginyl-tRNA synthetases as revealed by an examination of natural specificity variants, *FEBS J.* **276**, 1307–1318 (2009).
96. A. D R Nurcahyanti, M. Wink, L-Canavanine Potentiates Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Human Breast Cancer Cells, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **17**, 106–211 (2017).
97. C. C. Allende, J. Allende, Purification and substrate specificity of arginyl-ribonucleic acid synthetase from rat liver, *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 1102–1106 (1964).
98. H. S. Kim, S. Y. Cha, C. H. Jo, A. Han, K. Y. Hwang, The crystal structure of arginyl-tRNA synthetase from Homo sapiens, *FEBS Letters* **588**, 2328–2334 (2014).
99. D. N. Wheatley, J. H. Robertson, Uptake and incorporation of amino acids by suspension cultured mammalian cells: a comparative study involving eleven naturally-occurring and four analogue amino acids, *Cytobios* **30**, 101–126 (1981).
100. C. M. Redman, G. Avellino, S. Yu, Secretion of proalbumin by canavanine-treated Hep-G2 cells, *Journal of Biological Chemistry* **258**, 3446–3452 (1983).
101. G. A. Rosenthal, M. A. Berge, J. A. Bleiler, T. P. Rudd, Aberrant, canavanyl protein formation and the ability to tolerate or utilize L-canavanine, *Experientia* **43**, 558–561 (1987).
102. G. A. Rosenthal, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 13693–13696 (1989).
103. W. F. Prouty, M. J. Karnovsky, A. L. Goldberg, Degradation of abnormal proteins in Escherichia coli. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs, *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1112–1122 (1975).
104. P. Crine, L. Dufour, Effects of monensin on the processing of pro-opiomelanocortin in the intermediate lobe of the rat pituitary, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **109**, 500–506 (1982).
105. G. A. Rosenthal, J. Lambert, D. Hoffmann, Canavanine incorporation into the antibacterial proteins of the fly, *Phormia terranova* (Diptera), and its effect on biological activity, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 9768–9771 (1989).
106. G. A. Rosenthal, D. L. Dahlman, Studies of L-canavanine incorporation into insectan lysozyme, *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15684–15687 (1991).
107. D. A. Thomas, G. A. Rosenthal, D. V. Gold, K. Dickey, Growth inhibition of a rat colon tumor by L-canavanine, *Cancer Research* **46**, 2898–2903 (1986).

108. M. H. Green, T. L. Brooks, J. Mendelsohn, S. B. Howell, Antitumor activity of L-canavanine against L1210 murine leukemia, *Cancer Research* **40**, 535–537 (1980).
109. D. S. Swaffar, C. Y. Ang, P. B. Desai, G. A. Rosenthal, D. A. Thomas, P. A. Crooks, W. J. John, Combination therapy with 5-fluorouracil and L-canavanine: in vitro and in vivo studies, *Anti-Cancer Drugs* **6**, 586–593 (1995).
110. A. K. Bence, P. A. Crooks, The Mechanism of L-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **18**, 383–394 (2008).
111. T. L. Bowles, R. Kim, J. Galante, C. M. Parsons, S. Virudachalam, H.-J. Kung, R. J. Bold, Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase, *Int. J. Cancer* **123**, 1950–1955 (2008).
112. B. O. Vynnytska, O. M. Mayevska, Y. V. Kurlishchuk, Y. P. Bobak, O. V. Stasyk, Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells, *Anti-Cancer Drugs* **22**, 148–157 (2011).
113. B. Vynnytska-Myronovska, Y. Bobak, Y. Garbe, C. Dittfeld, O. Stasyk, L. A. Kunz-Schughart, Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation, *Int. J. Cancer* **130**, 2164–2175 (2012).
114. Y. V. Kurlishchuk, B. Vynnytska-Myronovska, P. Grosse-Gehling, Y. Bobak, F. Manig, O. Chen, S. R. Merker, T. Henle, S. Löck, D. E. Stange, O. V. Stasyk, L. A. Kunz-Schughart, Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability, *Oncotarget* **7**, 73292–73308 (2016).
115. A. D. Nurcahyanti, M. Wink, L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells, *PeerJ* **4**, e1542 (2016).
116. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685 (1970).
117. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350–4354 (1979).
118. M. V. Berridge, A. S. Tan, Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**, 474–482 (1993).
119. G. Koopman, C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals, M. H. van Oers, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood* **84**, 1415–1420 (1994).
120. M. Ito, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike, T. Nakahata, NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, *Blood* **100**, 3175–3182 (2002).
121. M. A. Lawson, J. M. Paton-Hough, H. R. Evans, R. E. Walker, W. Harris, D. Ratnabalan, J. A. Snowden, A. D. Chantry, R. Cui, Ed. NOD/SCID-GAMMA mice are an ideal strain to assess the efficacy of therapeutic agents used in the treatment of myeloma bone disease, *PLoS ONE* **10**, e0119546 (2015).

122. C. M. Ensor, F. W. Holtsberg, J. S. Bomalaski, M. A. Clark, Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo, *Cancer Research* **62**, 5443–5450 (2002).
123. R. LeBlanc, L. P. Catley, T. Hideshima, S. Lentzsch, C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, D. Neubergh, O. Goloubeva, C. S. Pien, J. Adams, D. Gupta, P. G. Richardson, N. C. Munshi, K. C. Anderson, Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model, *Cancer Research* **62**, 4996–5000 (2002).
124. A. Habermeier, J. Graf, B. F. Sandhöfer, J. P. Boissel, F. Roesch, E. I. Closs, System I amino acid transporter LAT1 accumulates O-(2-fluoroethyl)-l-tyrosine (FET), *Amino Acids* **47**, 335–344 (2014).
125. B. M. Baynes, D. I. C. Wang, B. L. Trout, Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation, *Biochemistry* **44**, 4919–4925 (2005).
126. Anti-ASS1 Antibody, clone 2C10 MABN704, (available at <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/mabn704?lang=de®ion=DE>). Stand: August 2018.
127. R. Sood, A. C. Porter, D. Olsen, D. R. Cavener, R. C. Wek, A Mammalian Homologue of GCN2 Protein Kinase Important for Translational Control by Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor-2 α , *Genetics* **154**, 787–801 (2000).
128. R. A. Fryer, T. J. Graham, E. M. Smith, S. Walker-Samuel, G. J. Morgan, S. P. Robinson, F. E. Davies, M. D'Incalci, Ed. Characterization of a Novel Mouse Model of Multiple Myeloma and Its Use in Preclinical Therapeutic Assessment, *PLoS ONE* **8**, e57641–9 (2013).
129. L. Li, Z. Li, D. Chen, X. Lu, X. Feng, E. C. Wright, N. O. Solberg, D. Dunaway-Mariano, P. S. Mariano, A. Galkin, L. Kulakova, O. Herzberg, K. B. Green-Church, L. Zhang, Inactivation of Microbial Arginine Deiminases by l-Canavanine, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1918–1931 (2008).
130. M. Mauthe, I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K.-J. Hijlkema, R. P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, F. Reggiori, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion, *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
131. S. K. Weiland, K. Rapp, J. Klenk, U. Keil, Zunahme der Lebenserwartung, *Deutsches Ärzteblatt* **103**, 1072–1077 (2006).
132. A. J. King, T. Eyre, F. Sharpley, C. Watson, K. Ramasamy, J. Willan, Multiple myeloma in the very elderly patient: challenges and solutions, *CIA* **11**, 423–13 (2016).
133. H. S. H. Chan, C. I. Chen, D. E. Reece, Current Review on High-Risk Multiple Myeloma, *Curr Hematol Malig Rep* **12**, 96–108 (2017).
134. C. S. Chim, S. K. Kumar, R. Z. Orlowski, G. Cook, P. G. Richardson, M. A. Gertz, S. Giralt, M. V. Mateos, X. Leleu, K. C. Anderson, Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond, *Leukemia* **32**, 252–262 (2017).
135. N. Gökbüget, D. Hoelzer, Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults, *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* **6**, 114–141 (2002).
136. S.-Y. Kim, Cancer Metabolism: a Hope for Curing Cancer, *Biomolecules & Therapeutics* **26**, 1–3 (2018).

137. L. Galluzzi, O. Kepp, M. G. Vander Heiden, G. Kroemer, Metabolic targets for cancer therapy, *Nature Publishing Group* **12**, 829–846 (2013).
138. A. Luengo, D. Y. Gui, M. G. Vander Heiden, Targeting Metabolism for Cancer Therapy, *Cell Chemical Biology* **24**, 1161–1180 (2017).
139. H. Gong, F. Zölzer, G. von Recklinghausen, W. Havers, L. Schweigerer, Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis, *Leukemia* **14**, 826–829 (2000).
140. E. J. Noh, S. W. Kang, Y. J. Shin, S. H. Choi, C. G. Kim, I. S. Park, D. N. Wheatley, B. H. Min, Arginine deiminase enhances dexamethasone-induced cytotoxicity in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells, *Int. J. Cancer* **112**, 502–508 (2004).
141. T. L. Lam, G. K. Y. Wong, H. C. Chong, P. N. M. Cheng, S. C. Choi, T. L. Chow, S. Y. Kwok, R. T. O. Poon, D. N. Wheatley, W. H. Lo, Y. C. Leung, Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest, *Cancer Letters* **277**, 91–100 (2009).
142. L.-J. Shen, K. Beloussow, W.-C. Shen, Modulation of arginine metabolic pathways as the potential anti-tumor mechanism of recombinant arginine deiminase, *Cancer Letters* **231**, 30–35 (2006).
143. I. B. Roninson, E. V. Broude, B.-D. Chang, If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, *Drug Resistance Updates* **4**, 303–313 (2001).
144. A. G. Ehrhardt, G. Sluder, Spindle pole fragmentation due to proteasome inhibition, *Journal of Cellular Physiology* **204**, 808–818 (2005).
145. R. H. Kim, J. M. Coates, T. L. Bowles, G. P. McNerney, J. Sutcliffe, J. U. Jung, R. Gandour-Edwards, F. Y. S. Chuang, R. J. Bold, H.-J. Kung, Arginine Deiminase as a Novel Therapy for Prostate Cancer Induces Autophagy and Caspase-Independent Apoptosis, *Cancer Research* **69**, 700–708 (2009).
146. F. Qiu, Y.-R. Chen, X. Liu, C.-Y. Chu, L.-J. Shen, J. Xu, S. Gaur, H. J. Forman, H. Zhang, S. Zheng, Y. Yen, J. Huang, H.-J. Kung, D. K. Ann, Arginine Starvation Impairs Mitochondrial Respiratory Function in ASS1-Deficient Breast Cancer Cells, *Science signaling* **7**, ra31 (2014).
147. M. D. Patil, J. Bhaumik, S. Babykutty, U. C. Banerjee, D. Fukumura, Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor, *Oncogene* **35**, 4957–4972 (2016).
148. E. A. Repasky, J. R. Subjeck, Heat shock proteins and cancer therapy: The trail grows hotter! *Oncotarget* **2**, 433–434 (2011).
149. H. J. Clarke, J. E. Chambers, E. Liniker, S. J. Marciniak, Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy, *Cancer Cell* **25**, 563–573 (2014).
150. M. Cerezo, A. Lehraiki, A. Millet, F. Rouaud, M. Plaisant, E. Jaune, T. Botton, C. Ronco, P. Abbe, H. Amdouni, T. Passeron, V. Hofman, B. Mograbi, A.-S. Dabert-Gay, D. Debayle, D. Alcor, N. Rabhi, J.-S. Annicotte, L. Héliot, M. Gonzalez-Pisfil, C. Robert, S. Moréra, A. Virougoux, P. Gual, M. M. U. Ali, C. Bertolotto, P. Hofman, R. Ballotti, R. Benhida, S. Rocchi, Compounds Triggering ER Stress Exert Anti- Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance, *Cancer Cell* **29**, 805–819 (2016).

151. T. E. Dever, L. Feng, R. C. Wek, A. M. Cigan, T. F. Donahue, A. G. Hinnebusch, Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast, *Cell* **68**, 585–596 (1992).
152. N. Donnelly, A. M. Gorman, S. Gupta, A. Samali, The eIF2 α kinases: their structures and functions, *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3493–3511 (2013).
153. A. M. Gorman, S. J. M. Healy, R. Jäger, A. Samali, Stress management at the ER: Regulators of ER stress-induced apoptosis, *Pharmacology & Therapeutics* **134**, 306–316 (2012).
154. H. Puthalakath, L. A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P. N. Kelly, N. D. Huntington, P. D. Hughes, E. M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, A. Strasser, ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim, *Cell* **129**, 1337–1349 (2007).
155. R. B. Hamanaka, E. Bobrovnikova-Marjon, X. Ji, S. A. Liebhaber, J. A. Diehl, PERK-dependent regulation of IAP translation during ER stress, *Oncogene* **28**, 910–920 (2009).
156. A. L. Shaffer, M. Shapiro-Shelef, N. N. Iwakoshi, A. H. Lee, S.-B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B. K. Tan, A. Rosenwald, E. M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J. W. Yewdell, K. Calame, L. H. Glimcher, L. M. Staudt, XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation, *Immunity* **21**, 81–93 (2004).
157. R. Sriburi, S. Jackowski, K. Mori, J. W. Brewer, XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum, *The Journal of Cell Biology* **167**, 35–41 (2004).
158. G. Bianchi, L. Oliva, P. Cascio, N. Pengo, F. Fontana, F. Cerruti, A. Orsi, E. Pasqualetto, A. Mezghrani, V. Calbi, G. Palladini, N. Giuliani, K. C. Anderson, R. Sitia, S. Cenci, The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition, *Blood* **113**, 3040–3049 (2009).
159. M. Rossi, C. Botta, M. Arbitrio, R. D. Grembiale, P. Tagliaferri, P. Tassone, Mouse models of multiple myeloma: technologic platforms and perspectives, *Oncotarget* **9**, 20119–20133 (2018).
160. P. O. Hofgaard, H. C. Jodal, K. Bommert, B. Huard, J. Caers, H. Carlsen, R. Schwarzer, N. Schünemann, F. Jundt, M. M. Lindeberg, B. Bogen, A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease, *PLoS ONE* **7**, e51892 (2012).
161. K. Nilsson, H. Bennich, S. G. Johansson, J. Pontén, Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient, *Clinical and Experimental Immunology* **7**, 477–489 (1970).
162. J. Windschmitt, B. Jacobi, Y. Bülbül, L. Sester, J. Tappe, C. Hiebel, C. Behl, M. Theobald, M. Munder, Arginine Depletion in Combination with Canavanine Supplementation Induces Massive Cell Death in Myeloma Cells By Interfering with Their Protein Metabolism and Bypassing Potential Rescue Mechanisms, *Blood* **132**, 3205–3205 (2018).
163. K. L. J. Ellacott, G. J. Morton, S. C. Woods, P. Tso, M. W. Schwartz, Assessment of Feeding Behavior in Laboratory Mice, *Cell Metabolism* **12**, 10–17 (2010).

164. K. Yasuda, T. Nirei, N. H. Tsuno, H. Nagawa, J. Kitayama, Intratumoral injection of interleukin-2 augments the local and abscopal effects of radiotherapy in murine rectal cancer, *Cancer Science* **102**, 1257–1263 (2011).
165. M. A. Aznar, N. Tinari, A. J. Rullán, A. R. Sánchez-Paulete, M. E. Rodriguez-Ruiz, I. Melero, Intratumoral Delivery of Immunotherapy—Act Locally, Think Globally, *The Journal of Immunology* **198**, 31–39 (2017).
166. J. Zhao, S.-S. Feng, Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents, *Nanomedicine (Lond)* **10**, 2199–2228 (2015).
167. J. Reinholz, K. Landfester, V. Mailänder, The challenges of oral drug delivery via nanocarriers, *Drug Deliv* **25**, 1694–1705 (2018).
168. D. W. Smith, R. L. Ganaway, D. E. Fahrney, Arginine deiminase from *Mycoplasma arthritidis*. Structure-activity relationships among substrates and competitive inhibitors, *Journal of Biological Chemistry* **253**, 6016–6020 (1978).
169. V. Agrawal, J. H. Woo, J. P. Mauldin, C. Jo, E. M. Stone, G. Georgiou, A. E. Frankel, Cytotoxicity of human recombinant arginase I (Co)-PEG5000 in the presence of supplemental L-citrulline is dependent on decreased argininosuccinate synthetase expression in human cells, *Anti-Cancer Drugs* **23**, 51–64 (2012).
170. Z. Yun, J. Zhichao, Y. Hao, J. Ou, Y. Ran, D. Wen, S. Qun, Targeting autophagy in multiple myeloma, *Leukemia Research* **59**, 97–104 (2017).
171. W. B. Tsai, I. Aiba, Y. Long, H. K. Lin, L. Feun, N. Savaraj, M. T. Kuo, Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells, *Cancer Research* **72**, 2622–2633 (2012).
172. W.-B. Tsai, I. Aiba, S.-Y. Lee, L. Feun, N. Savaraj, M. T. Kuo, Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1 α /Sp4, *Molecular Cancer Therapeutics* **8**, 3223–3233 (2009).
173. Y. Long, W.-B. Tsai, M. Wangpaichitr, T. Tsukamoto, N. Savaraj, L. G. Feun, M. T. Kuo, Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells Is Associated with Metabolic Reprogramming, Glucose Dependence, and Glutamine Addiction, *Molecular Cancer Therapeutics* **12**, 2581–2590 (2013).
174. M. Munder, Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *British Journal of Pharmacology* **158**, 638–651 (2009).
175. R. Geiger, J. C. Rieckmann, T. Wolf, C. Basso, Y. Feng, T. Fuhrer, M. Kogadeeva, P. Picotti, F. Meissner, M. Mann, N. Zamboni, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity, *Cell* **167**, 829–842.e13 (2016).
176. A. Werner, M. Koschke, N. Leuchtner, C. Luckner-Minden, A. Habermeier, J. Rupp, C. Heinrich, R. Conradi, E. I. Closs, M. Munder, Reconstitution of T Cell Proliferation under Arginine Limitation: Activated Human T Cells Take Up Citrulline via L-Type Amino Acid Transporter 1 and Use It to Regenerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression, *Front. Immunol.* **8**, 864 (2017).
177. C. Greil, M. Engelhardt, G. Ihorst, K. Schoeller, H. Bertz, R. Marks, R. Zeiser, J. Duyster, H. Einsele, J. Finke, R. Wäsch, Allogeneic transplantation of multiple myeloma patients may

allow long-term survival in carefully selected patients with acceptable toxicity and preserved quality of life, *Haematologica* **104**, 370–379 (2019).

178. S. A. Rosenberg, N. P. Restifo, Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer, *Science* **348**, 62–68 (2015).

179. C. H. June, M. Sadelain, Chimeric Antigen Receptor Therapy, *N Engl J Med* **379**, 64–73 (2018).

Danksagung

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Björn Jacobi

Anschrift:

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Staatsangehörigkeit:

Familienstand:

Schulbildung

1991 – 1995 Grundschule Weyhers

1995 – 2004 Gymnasium, Rabanus-Maurus-Schule in Fulda

Juni 2004 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,0)

Berufsausbildung

August 2005 – Juni 2012 Studium an der Universität Heidelberg (Humanmedizin)

September 2007 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Durchschnittsnote 1,0)

Juni 2012 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Durchschnittsnote 1,33)
Approbation als Arzt

Berufserfahrung

Seit März 2013 Arzt in Weiterbildung / wissenschaftlicher Mitarbeiter in der 3. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz