

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

**Kombination von Arginindepletion mit dem Argininanalogon Canavanin als
innovative Therapiestrategie beim Multiplen Myelom**

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

Vorgelegt von

Lea Tschakert, geb. Ströher
aus Dortmund

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

8. Dezember 2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Multiples Myelom.....	3
2.1.1 Therapie	4
2.2 Argininstoffwechsel	4
2.3 Canavanin.....	7
2.4 Unfolded Protein Response.....	8
2.4.1 IRE1	9
2.4.2 PERK.....	9
2.4.3 ATF6.....	10
2.4.4 Tunicamycin	11
2.4.5 ERAD.....	11
2.5 Apoptose und Autophagie.....	11
2.5.1 CHOP	11
2.5.2 Caspase	12
2.5.3 Autophagie.....	13
2.6 Ubiquitin-Proteasom-System	13
3. Verwendete Materialien	15
3.1 Allgemeine Substanzen.....	15
3.2 Allgemeine Materialien	16
3.3 Geräte.....	16
3.4 Puffer und Lösungen.....	17
3.5 Nährmedien für Zellkultur	19
3.6 Kits	20
3.7 Antikörper.....	20
3.7.1 Primärantikörper	20
3.7.2 Sekundärantikörper	21
3.8 Biologisches Material	21

3.8.1 Humane Zelllinien.....	21
3.8.2 Knochenmarkaspirate von Tumorpatienten	21
3.9 Oligonukleotide und Sonden.....	22
4. Methoden.....	23
4.1 Biochemische Techniken	23
4.1.1 Isolierung von Proteinen.....	23
4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford Assay).....	23
4.1.3 Elektrophorese	24
4.1.4 Semi-Dry Blotting.....	25
4.1.5 Strippen der Membran	25
4.1.6 Auswertung des Western Blot	26
4.2 Molekularbiologische Techniken	26
4.2.1 RNA-Gewinnung aus Zellen	26
4.2.2 Ermittlung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop	27
4.2.3 Quantitative Realtime-PCR.....	27
4.3 Zellbiologische Techniken.....	28
4.3.1 Kultivierung humaner Tumorzelllinien.....	28
4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	29
4.3.3 MTS-Assay	29
4.3.4 Separation CD138-positiver Zellen.....	30
4.3.4.1 EasySep.....	30
4.3.4.2 RosetteSep	30
4.3.5 Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence activated cell sorting</i> ; FACS)	31
4.3.5.1 Viabilitätstest durch Annexin-/Propidiumiodid-Färbung	31
4.3.5.2 CD138	32
4.3.5.3 Xbp1s (intracellular staining)	32
4.3.5.3 Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester-Assay.....	32
4.4 Statistik.....	33
5. Ergebnisse	34
5.1 Proliferation	34
5.1.1 Effekt von L-Canavanin unter Arginin-suffizienten Bedingungen	37
5.1.2 Effekt von Canavanin unter Argininmangel.....	38

5.1.3 ASS1-Status	38
5.1.4 Zugabe von Citrullin	39
5.2 Viabilität.....	42
5.2.1 Synergistische Induktion von Zelltod durch Arginindepletion und Canavanin	42
5.2.2 ADI-PEG-Behandlung.....	46
5.2.3 Sequentielle Arginindepletion und Canavaninzugabe: Viabilitätstestung ...	47
5.3 Unfolded Protein Response	48
5.3.1 Splicing von Xbp1	49
5.3.2 Phosphorylierung von eIF2 α	52
5.4 Caspase 3.....	53
5.5 Ubiquitin-Proteasomen-System	56
5.6 Patientenproben	57
5.6.1 Reinheitskontrolle	57
5.6.2 ASS1-Expression	59
5.6.3 Viabilität.....	61
6. Diskussion	63
6.1 Argininauxotrophie	63
6.2 Einfluss von Arginindepletion und Canavanin auf die Zellproliferation.....	66
6.3 Einfluss von Arginindepletion und Canavanin auf die Viabilität	67
6.4 Unfolded Protein Response	69
6.5 Apoptose/CHOP/Caspase 3	71
6.6 Ubiquitin-Proteasomen-System	72
6.7 Patientenproben	73
7. Zusammenfassung	75
8. Literaturverzeichnis.....	77
Danksagung	85
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
Arg	Arginin
ASL	Argininosuccinat Lyase
ASS1	Argininosuccinat Synthase 1
ATF6	activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-Zell-Lymphom
Bz	Bortezomib
Can	Canavanin
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CHOP	C/EBP homologous protein
Cit	Citrullin
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
eIF2B	eukaryotic initiation factor 2 subunit B
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 subunit α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated protein degradation
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GADD153	growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153
gpr78	G-protein coupled receptor 78
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IRE1	inositol-requiring enzyme 1
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})

M	Molarität
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting (magnetisch aktivierte Zelltrennung)
MFI	mean fluorescence intensity (mittlere Fluoreszenzintensität)
min	Minute
MM	Multiplés Myelom
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten Ribonukleinsäure)
n	nano (10^{-9})
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
pEIF2α	phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 subunit α
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PI	Propidiumiodid
PVSF-Membran	Polyvinyliden Difluorid Membran
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
TBS	Tris-buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit Tween-20
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer Ribonukleinsäure)
Tun	Tunicamycin
UPR	Unfolded Protein Response
V	Volt
WB	Western Blot
Xbp1	X-box binding protein 1
Xbp1s	spliced X-box binding protein 1

1. Einleitung

Ein Großteil der Todesfälle in Deutschland beruht auf bösartigen Neubildungen und deren Folgeerkrankungen (1). Ziel intensiver Forschung ist es, stets neue kurative oder palliative Therapiemöglichkeiten für Neoplasien zu entwickeln.

Eine Limitation vieler Chemotherapeutika zur Behandlung von Neoplasien ist die einhergehende Toxizität auf gesunde Gewebe. Daher werden neue innovative Therapiestrategien untersucht, die eine geringere Toxizität auf gesundes Gewebe haben und doch spezifisch gegen Tumore wirken. Eine dieser Therapiestrategien besteht darin, den Tumorzellen bestimmte Nährstoffe zu entziehen.

So wird das Enzym Asparaginase seit vielen Jahren zur Behandlung der Akuten lymphoblastischen Leukämie eingesetzt (2). Ein neues Agens, die pegylierte Arginin Deiminase (ADI-PEG), depletiert Arginin und wird bereits in Phase I- und II-Studien für Patienten mit Hepatozellulären Karzinomen und Malignen Melanomen getestet (3). Als Monotherapie scheint die Therapie mit ADI-PEG keine ausreichende Wirkung zu zeigen, bei allerdings sehr guter Verträglichkeit (4). Daher sind Kombinationstherapien mit ADI-PEG Teil weiterer Untersuchungen.

Das Multiple Myelom ist die zweithäufigste hämatologische Neoplasie. Bei dieser Erkrankung infiltrieren maligne Plasmazellen das Knochenmark. Die Myelomzellen sind durch ihre Produktion von Immunglobulinen oder Leichtketten durch eine starke de novo Produktion von Proteinen charakterisiert (5). Die Myelomzelle ist somit insbesondere von einem geordneten Protein-Metabolismus, d.h. in der Synthese sowie der Entsorgung fehlgefalteter Proteine, abhängig. Aus proteinogenen Aminosäuren, wie zum Beispiel dem Arginin, werden Polypeptide aufgebaut. Auch nicht-proteinogene Aminosäuren, wie das Canavanin, können unter bestimmten Bedingungen in Proteine eingebaut werden. Als Argininanalogon konkurriert Canavanin mit Arginin um die Erkennung durch die entsprechende Aminoacyl tRNA Synthase und kann prinzipiell an Stelle von Arginin in Proteine eingebaut werden. Als Konsequenz eines derartigen Fehleinbaus von Canavanin resultiert eine veränderte Faltung der Proteine und somit ein Funktionsverlust sowie die Notwendigkeit der Entsorgung dieser fehlgefalteten Polypeptidketten. In dieser Arbeit wurden unter Laborbedingungen verschiedene Myelom-Zelllinien in vitro einer Argininmangelsituation ausgesetzt. Es wurde hierzu in Kombination der Effekt einer additiven Behandlung mit Canavanin auf Proliferation und Viabilität untersucht.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Unfolded Protein Response analysiert. Schließlich erfolgte die Untersuchung der Wirkung von Arginindepletion und Canavaninbehandlung auf primäre Myelom-Patientenproben. Ziel der Arbeit war es, die Wirkung von Arginindepletion in Kombination mit Canavanin in vitro zu untersuchen, um die Basis für weiterführende Untersuchungen zur Entwicklung einer neuen innovativen Therapiestrategie zu setzen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung, die durch monoklonale Plasmazellvermehrung charakterisiert ist. Diese Erkrankung wird zu den B-Zell-Lymphomen gezählt. Durch die Plasmazellvermehrung kommt es zu einer vermehrten Produktion von monoklonalen Immunglobulinen v.a. der Klassen IgG, IgA oder selten IgD, welche dann Paraproteine genannt werden. In ca. 20 % aller Patienten mit Multiplem Myelom findet sich nur eine Sekretion von monoklonalen Leichtketten (kappa oder lambda), was dann als Leichtketten-Myelom bezeichnet wird.

Das Multiple Myelom ist mit 13% die zweithäufigste hämatologische Neoplasie (6). Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnosestellung liegt bei ca. 70 Jahren. Man nimmt an, dass das Multiple Myelom immer aus einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) entsteht, wobei diese natürlich nur bei einem kleinen Teil der Patienten im Vorfeld der Myelomdiagnose bekannt ist. Aus der MGUS entwickelt sich zunächst ein intramedulläres Myelom, dann fakultativ zusätzlich extramedulläre Manifestationen und schließlich kann sich in seltenen Fällen eine Plasmazell-Leukämie entwickeln (7). Etwa 1% der Patienten mit MGUS entwickeln pro Jahr ein Multiples Myelom (5, 8, 9).

Zu Symptomen der Krankheit kommt es typischerweise durch das Auftreten monoklonaler Immunglobuline im Plasma oder Ausscheidung dieser mit dem Urin. Es resultiert häufig eine Niereninsuffizienz, Polyneuropathie oder selten ein Hyperviskositätssyndrom. Eine Infiltration des Knochenmarks kann zu Verdrängung der Hämatopoese mit Symptomen v.a. der Anämie, sehr viel seltener der Thrombozytopenie oder Leukozytopenie führen (5, 9). Aus einem sekundären Mangel physiologischer Immunglobuline resultiert in der Regel eine erhöhte Infektanfälligkeit. Desweiteren aktivieren Myelomzellen die Osteoklasten und hemmen die Funktion der Osteoblasten. Dadurch hervorgerufene Osteolysen oder eine Osteoporose können Knochenschmerzen, pathologische Frakturen sowie eine Hyperkalzämie hervorrufen (8, 9).

2.1.1 Therapie

Die Indikation zur Therapie des multiplen Myeloms richtet sich nach den Endorganschäden, die mit Hilfe der CRAB-Kriterien bestimmt werden. Zu diesen zählen Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie sowie die Knochenbeteiligung. Bereits bei Zutreffen eines Kriteriums wird eine Therapie eingeleitet (9). Desweiteren muss der Allgemeinzustand des Patienten eingeschätzt und seine Eignung zu einer Hochdosistherapie beurteilt werden (10).

Ziel der Therapie ist das Erreichen einer Remission, die Vermeidung und Verringerung von Komplikationen, welche durch das Myelom bedingt sind, sowie die Verringerung von Symptomen der Erkrankung.

Die Therapiemöglichkeiten beim Multiplen Myelom haben sich in den letzten Jahren sehr stark verbessert. So sind neue Substanzen wie die Immunmodulatoren (Lenalidomid, Pomalidomid), Proteasomeninhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib) und monoklonale Antikörper (Daratumumab, Elotuzumab) bzw. unterschiedliche Kombinationen aus diesen Substanzen in diversen Therapielinien in die Zulassung gekommen. Für fitte Patienten wird in der Erstlinie weiterhin auch eine Melphalan-Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation als Therapiebaustein verwendet. Neu in der Entwicklung sind v.a. zahlreiche immunologisch orientierte Therapieverfahren, wie neue mono- oder bispezifische Antikörper, Antikörper-Toxin-Konjugate und zelluläre Therapieverfahren (11-16).

2.2 Argininstoffwechsel

Essentielle Aminosäuren sind solche Aminosäuren, die der Körper nicht endogen herstellen kann, sondern auf die exogene Zufuhr aus der Nahrung angewiesen ist. Arginin ist eine bedingt essentielle Aminosäure. Ein Teil des Arginins wird über die Nahrung aufgenommen (bei westlicher Diät ca. 25-30% des im Stoffwechsel benötigten (17)), 10-15 % werden neu aus Citrullin synthetisiert und der Rest entsteht durch den Abbau von Proteinen (18). Bedingt essentiell bedeutet, dass der Körper in bestimmten Situationen den Bedarf nicht alleine durch Synthese decken kann und dann auf die exogene Zufuhr angewiesen ist. Solche Situationen sind zum Beispiel Wachstum in der Kindheit (19), Wundheilung, Immunantwort (20) und schwere Infektionen (21). Arginin spielt nicht nur eine Rolle in der Biosynthese von Proteinen, sondern auch in der Herstellung von Stickstoffmonoxid, Polyaminen, Harnstoff, Kreatinin, Nukleotiden, Prolin, Glutamat und Agmatin (22, 23). Arginin ist

Teil des Harnstoffzyklus und kann aus Citrullin synthetisiert werden. So wird Citrullin unter Anlagerung von Aspartat ATP-abhängig zu Argininosuccinat umgewandelt. Dieses wird durch das Enzym Argininosuccinatsynthase (EC 6.3.4.5) katalysiert. Unmittelbar aus Argininosuccinat entsteht durch das Enzym Argininosuccinatlyase (EC 4.3.2.1) unter Abspaltung von Fumarat das Arginin (24, 25). Der limitierende Schritt der Argininsynthese aus Citrullin im Harnstoffzyklus und in der NO-Synthese wird durch das Enzym ASS1 katalysiert (22).



Citrullin kann aus verschiedenen Quellen bezogen werden. Es kann aus Arginin mit Hilfe des Enzyms NOS unter Abspaltung von NO synthetisiert werden oder zum Beispiel aus Ornithin (im Harnstoffzyklus der Leber) hergestellt werden. Das Enzym NOS hat 3 Isoformen, die endotheliale NOS, die neuronale NOS und die induzierbare NOS (iNOS) (25). Arginin reguliert selbst abhängig von der vorhandenen Konzentration seine Synthese. So wird die Expression der Enzyme ASS1 und ASL bei Überschuss von Arginin vermindert (26). Wenn wenig Arginin vorhanden ist, dafür aber mehr Citrullin, resultiert eine erhöhte Transkription des ASS1-Gens (27). Auch Werner et. al konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass ASS1 in humanen T-Zellen unter Argininmangel induzierbar ist. Die Argininsynthese und somit die Funktion der T-Zellen kann durch Citrullinzugabe in einer Argininmangelsituation wieder hergestellt werden (28). Die Expression von iNOS wird inhibiert, wenn die Konzentration des extrazellulären Arginins abnimmt. So wird bei verminderter Arginin-Konzentration die Translation von iNOS-mRNA inhibiert. (29) Auch die Expression bestimmter Arginin-Transporter, wie zum Beispiel Cat-1 (cationic amino acid transporter-1), wird bei Argininmangel gesteigert (30, 31).

Maligne Zellen zeigen eine vermehrte Aufnahme von Glukose und Aminosäuren (32). Diese Tatsache kann man sich therapeutisch zu Nutzen machen und der Tumorzelle einzelne Nährstoffe, wie z.B. Aminosäuren, entziehen. Ein Beispiel für eine therapeutische Depletion von Aminosäuren ist die Asparaginase, die als Asparagin-depletierendes Enzym als zentraler Bestandteil der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt wird (2).

Während die Bedeutung des Arginins für das humane Immunsystem schon sehr intensiv studiert worden ist (33-35), konnte in Studien mittlerweile auch gezeigt

werden, dass Arginin eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt. So führt eine erhöhte Argininzufuhr in Mausmodellen zu einem verstärkten Tumorwachstum (22) und das Blockieren der Zufuhr metabolischer Ressourcen kann als Therapiestrategie genutzt werden (36). Es konnte gezeigt werden, dass Tumore mit einem schlechten klinischen Ansprechen häufig die Expression von ASS1 verlieren. Dies scheint ein Vorteil bezüglich Proliferation für die Zellen zu sein (36). Eine ASS1-Herunterregulierung verstärkt das Tumorwachstum durch erhöhte intrazelluläre Aspartatspiegel, welche dann der Pyrimidinsynthese zur Verfügung stehen (22, 37). Diese Tumore sind gehäuft chemoresistent. Durch den Verlust von ASS1 sind diese Tumorzellen darauf angewiesen Arginin exogen zuzuführen (d.h. sie sind argininauxotroph) und haben somit einen höheren Argininbedarf als gesundes Gewebe. Der Mechanismus der Herunterregulation von ASS1 ist bislang unklar. Die Arginin-Auxotrophie vieler Malignome ausnutzend, wurde ein Enzym als neues Agens entwickelt: die Arginin Deiminase (ADI). Um das immunogene Potential zu vermindern und die Halbwertszeit zu verlängern, wurde das Enzym pegyliert (ADI-PEG 20). Das Enzym vermindert das zirkulierende Arginin, indem es die Degradierung von Arginin zu Citrullin und Ammoniak katalysiert und so zum Zelltod von Arginin-auxotrophen Tumoren führt (22, 38, 39). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass ADI-PEG 20 einen G1-Zellzyklus Arrest mit anschließender Apoptose induziert (40).

ADI-PEG 20 wurde bereits in Phase I und II-Studien zur Bestimmung der Pharmakodynamik, Pharmakokinetik, Sicherheit und Antitumoraktivität beim metastasierten Melanom erfolgreich eingesetzt (41, 42). ADI-PEG 20 zeigt ein geringes Nebenwirkungsprofil, da die meisten physiologischen Zellen ASS1 (und ASL) exprimieren und so in der Lage sind, Arginin aus Citrullin endogen herzustellen (36). Studien zeigen, dass nicht nur solide Tumore mit ADI-PEG 20 erfolgreich behandelt werden können. So zeigen Miraki-Moud et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass AML-Tumorzellen, sofern sie ASS1-negativ sind, auf die Therapie mit ADI-PEG 20 ansprechen (36).

Werner et al. konnten in ihrer Arbeit *in vitro* und in einem Xenograft Modell *in vivo* zeigen, dass Zellen der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) arginin-auxotroph sind. Zudem konnten sie zeigen, dass CAT-1 der einzige exprimierte Arginin-Importer in CLL-Zellen ist. Ein Knockdown dieses Transporters führte zu einer verminderten Argininaufnahme und resultierte in verminderter Proliferation und Viabilität (31).

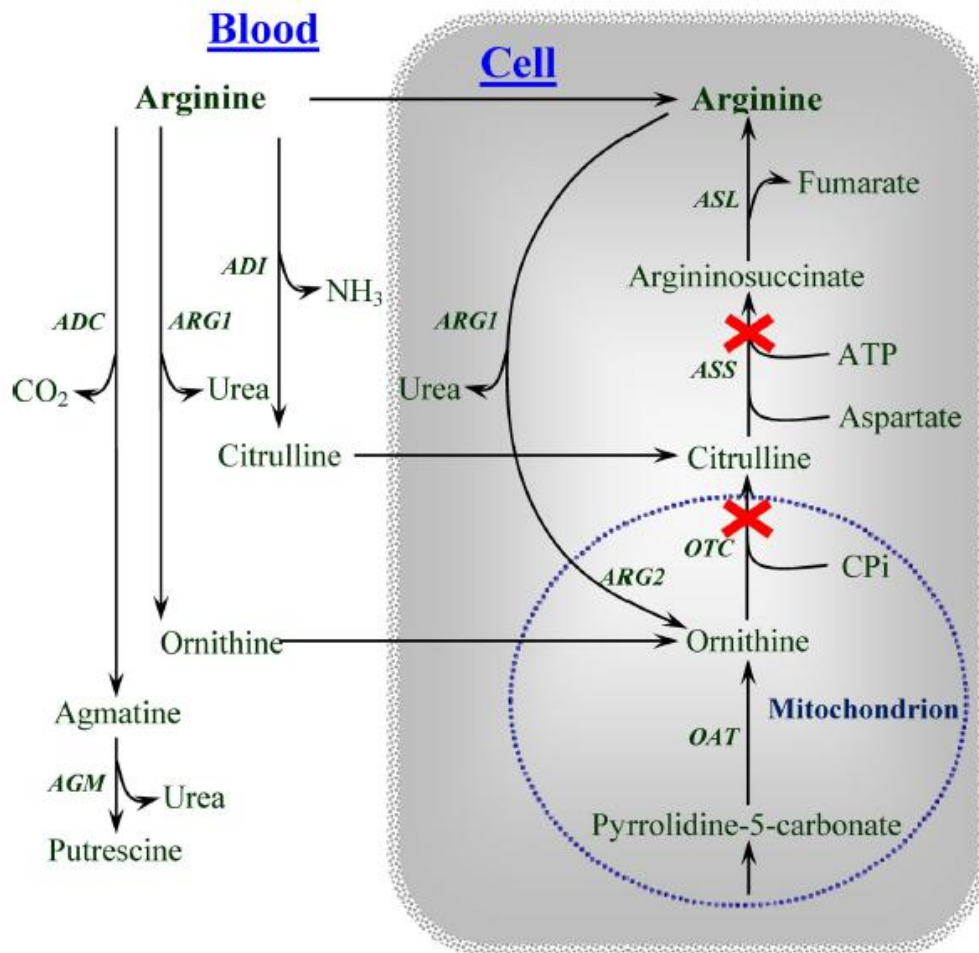


Abb. 1: Schematische Darstellung des Argininmetabolismus sowie Ansatzpunkte der Therapeutika, welche die Argininauxotrophie von Tumoren ausnutzen. Abkürzungen: ARG: Arginase; ADI: Arginin Deiminase; ADC Arginin Decarboxylase, ASS: Argininsuccinat Synthetase; ASL Argininosuccinat Lyase; OTC: Ornithin Transcarbamylase; OAT: Ornithin Aminotransferase; COi: Carbamoylphosphat; X: Enzymatische Defekte in Arginin auxotrophen Tumoren; Quelle: (43)

2.3 Canavanin

Canavanin ist als eine von mehr als 700 nicht-proteinogenen Aminosäuren ein Argininanalogon, welches natürlich in Hülsenfrüchtlern vorkommt (44). In diesen Pflanzen wirkt es als chemischer Schutz gegenüber anderen Organismen (45). Ist Canavanin in der Zelle vorhanden, konkurriert es mit Arginin. So kann es auf die Arginyl-tRNA geladen werden und an Stelle von Arginin in Proteine inkorporiert werden (46). Dadurch resultiert eine veränderte Proteinfunktion und -konformation. Dieser Effekt kann in der Tumorthherapie eingesetzt werden. So konnte in Studien gezeigt werden, dass die Exposition von Tumorzellen mit Canavanin eine verminderte Proliferation, sowie eine Zytotoxizität zur Folge hat. Allerdings müssen bei alleiniger Tumorthherapie mit Canavanin hohe Effektdosen eingesetzt werden, da

eine niedrige Dosierung nicht effektiv genug mit Arginin um die Inkorporation in Proteine konkurriert (44). Dies führt dazu, dass Canavanin nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in gesunde Zellen inkorporiert wird, wodurch es zu einer generellen Toxizität kommt, die sich nicht nur auf Tumorzellen beschränkt (38, 46).

Um den antiproliferativen und toxischen Effekt auf Tumorzellen zu nutzen ohne eine generelle Toxizität auf gesundes Gewebe zu bewirken, wurden in Studien Tumorzellen in argininarmem Milieu mit geringen Dosen Canavanin behandelt. Bei Vynnytska et al. zeigt sich, dass Canavanin den apoptotischen Effekt von Arginindeprivation in Tumorzellen (zum Beispiel in A431- und HepG2-Zellen) augmentiert. Dieser Effekt zeigte sich nicht bei gesunden Zellen. Als gesunde Zellen dienten WI-38 Lungenfibroblasten und N1 Hautfibroblasten N1 (38). Auch konnte in Studien gezeigt werden, dass Canavanin in einer geringeren Dosis als Adjuvanz in einer Kombination mit Chemotherapeutika oder mit Bestrahlung eingesetzt werden kann (44, 47).

2.4 Unfolded Protein Response

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein netzförmiges intrazelluläres System, in dem Proteine synthetisiert, gefaltet und sortiert werden (48). Nur korrekt gefaltete Proteine werden an den Golgi-Komplex weitergeleitet. Der Prozeß, der kontrolliert, dass nur korrekt gefaltete Proteine zu ihrem Zielort weitergeleitet werden, nennt sich ER-assoziierte Degradation (ERAD) (49). Verschiedene Störeinflüsse können dazu führen, dass fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren. Dazu gehört eine vermehrte Proteinsynthese, beeinträchtigte Ubiquitinierung und beeinträchtigte proteasomale Degradierung, vermindertes Nährstoffangebot, Inflammation oder Hypoxie (50). So wird ein Selbstschutzmechanismus aktiviert: die Antwort des ER auf Stress. Dieser wird durch die Signalwege der Unfolded Protein Response initiiert (50, 51). Ziel der UPR ist es, das Überleben der Zelle zu fördern. Hält der Zellstress zu lange an oder ist er zu hoch, kann die UPR auch den Zelltod initiieren (49).

In höheren eukaryoten Zellen sind drei Sensoren für den ER-Stress in der ER Membran eingebaut. Diese sind normalerweise durch das ER Chaperon grp78 gebunden, wodurch die Aktivierung verhindert wird (52). Fällt nun vermehrt ER Stress an, werden die integralen Membranproteine IRE1, ATF6 und PERK aktiviert und transportieren die Information über den ER-Stress in das Zytosol (Abb. 2).

2.4.1 IRE1

Das Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) ist ein Typ-1-Transmembranprotein, welches eine Serin/Threonin Kinase Domäne und eine Endoribonuklease Domäne enthält. Fallen vermehrt fehlgefaltete Proteine an, stimuliert dies die Oligomerisation von IRE1, sowie seine Autophosphorylierung, welche dann die Endonuklease-Aktivität stimuliert (53). Wird IRE1 aktiviert, spaltet IRE1 ein Intron von Xbp1-mRNA ab. Durch dieses Splicing (Abspalten) kommt es zu einem Rasterschub und die gespleißte Form von Xbp1 (=Xbp1s) wird translatiert (49). Die aktive Form Xbp1s bindet nun an Promoter verschiedener Gene, die in der UPR und ERAD eine Rolle spielen. Zudem wird dadurch auch die Expression des Proteins CHOP hochreguliert (54). Der IRE1-Signalweg wird in der UPR früh aktiviert und schwächt sich schnell ab (49). Diese Abschwächung erfolgt wenn die zytosolische Domäne mit der Domäne von BAX-Inhibitor-1 (BI-1), einem Protein des ER, interagiert. Diese Bindung inhibiert die Endoribonuklease Aktivität von IRE1 und moduliert das Xbp1-Spleißen unter mildem ER-Stress (49, 55). Zudem wird die Dauer des Effekts von Xbp1s dadurch reguliert, dass die ungespleißte Form, Xbp1u, ein Heterodimer mit Xbp1s formt und den Abbau fördert (56).

Die Überexpression von IRE1 induziert zudem die Apoptose. IRE1 bindet das Protein TRAF2 und aktiviert so ASK1 (Apoptose Signal-regulierende Kaskade). Hierdurch werden JNK und p38 aktiviert. Die Überaktivierung von ASK1 führt durch Mitochondrien-abhängige Caspase-Aktivierung zu Apoptose (57).

2.4.2 PERK

Die Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) ist ebenfalls ein Typ1 Transmembranprotein. Oligomerisation von PERK induziert die Autophosphorylierung und aktiviert die Serin/Threonin Kinase Aktivität. Dadurch wird eIF2 α phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird eIF2B inhibiert. Dies führt zur Unterdrückung der Proteintranslation (58). Dadurch gewinnt die Zelle Zeit, die vermehrt angefallenen fehlgefalteten Proteine zu degradieren (48, 59). Allerdings werden bestimmte mRNAs bevorzugt durch Phosphorylierung von eIF2 α translatiert. Hierzu gehört ATF4, ein Transkriptionsfaktor der C/EBP-Familie (48). ATF4 fördert unter anderem die Expression von Genen, welche in die Glutathion-Synthese oder in den Stoffwechsel und Transport von Aminosäuren involviert sind. Auf der anderen Seite induziert ATF4 aber auch CHOP und damit Zelltod (49).

In hohen Konzentrationen kann das phosphorylierte eIF2 α den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren, der genaue Mechanismus ist nicht abschließend geklärt (58).

2.4.3 ATF6

Der Activating Transcription Factor 6 (ATF6) ist ein Typ 2 Transmembranprotein, welches unter ER Stress zum Golgi Apparat transportiert wird, wo es gespalten und der zytosolische Bereich befreit wird. Dieser transloziert in den Zellkern und induziert unter anderem die Expression von CHOP, ER Chaperonen und ERAD Komponenten (49).

CHOP, auch GADD153 genannt, sensibilisiert Zellen für ER-Stress unter anderem durch Herunterregulierung von bcl-2 und vermehrten oxidativen Stress (60).

Myelom-Zellen produzieren eine große Menge monoklonaler Immunglobuline. Dadurch kommt es zu einem hohen Niveau an intrazellulärem Proteinstress und die UPR wird hochreguliert (61, 62).

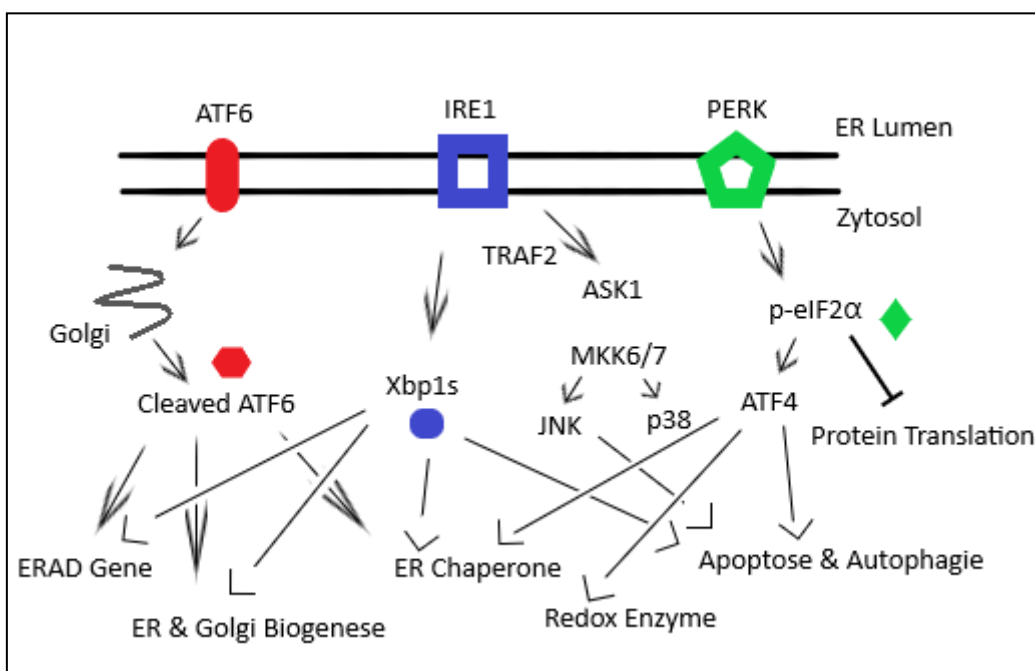


Abb. 2: Schematische Darstellung der UPR. Fällt vermehrt ER-Stress an, werden die integralen Membranproteine IRE1, ATF6 und PERK aktiviert und transportieren die Information über den ER-Stress in das Zytosol. Abb. nach (49).

2.4.4 Tunicamycin

Tunicamycin ist ein pharmakologisches Agens, welches ER-Stress induziert. Dieses Antibiotikum, welches durch *Streptomyces lysosuperificus* produziert wird, inhibiert das Enzym N-acetylglucosamin-1-Phosphat Transferase und inhibiert so die N-verknüpfte Glykolysierung neu synthetisierter Proteine (63-65).

2.4.5 ERAD

Gefaltete Proteine werden im ER einer Qualitätskontrolle unterzogen. Chaperone lagern sich an die gefalteten Proteine an. Korrekt gefaltete Proteine werden zu ihrem Zielort geschickt, fehlgefaltete Proteine werden in die ER-assoziierte Degradation (ERAD) eingeschleust (66).

Durch die UPR werden ERAD-Komponenten hochreguliert, beide sind für eine optimale Zellfunktion sehr wichtig. ERAD spielt eine wichtige Rolle im ER, indem es fehlgefaltete Proteine degradiert und die Zahl der Proteine dem metabolischen Bedürfnis der Zelle anpasst (49).

2.5 Apoptose und Autophagie

Apoptose ist bekannt als programmierter Zelltod. Bei Aktivierung der Signalkaskaden der Apoptose werden katabolische Enzyme, insbesondere Proteasen, aktiviert, was zum Abbau von zellulären Strukturen und Organellen führt. Die Zelle schrumpft mit Kondensation des Zellchromatins (Pyknose) und Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhesis) (67).

Eine wichtige Rolle im Kontext der Apoptose spielen Mitochondrien. Zu den Mechanismen gehören Störungen von Elektronentransport, oxidativer Phosphorylierung, ATP-Produktion, Freisetzung von Proteinen, die Proteasen der Caspase-Familie aktivieren und Veränderung des zellulären Redoxpotentials (68).

2.5.1 CHOP

Das Protein CHOP gehört zur Familie der CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs). Ein Synonym für CHOP ist GADD153 (growth arrest and DNA damage 153 153) (69). CHOP hat zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale Transkriptions-Aktivierungsdomäne und eine C-terminale Leucin-Zipper Domäne

(bZIP) (70). Besteht kein ER-Stress, wird CHOP ubiquitär auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Besteht ER-Stress, steigt die Expression stark an (54).

Als Transkriptionsfaktor reguliert CHOP viele pro-, aber auch antiapoptotische Gene (54). Unter anderem werden durch CHOP die Proteine der Bcl2-Familie reguliert, welche wiederum in pro- und antiapoptotische Proteine unterteilt werden können. Antiapoptotische Proteine beinhalten BCL2, BCL-XL, MCL-1 und BCL-W. Die proapoptotischen Proteine können in zwei Kategorien unterteilt werden, Proteine mit einer Multidomäne (BAK, BAX und BOK) und BH3-Domänen-Proteine (BID, BIM, BAD, BIK, NOXA und PUMA). Die BH3-Domänen-Proteine regulieren zum Beispiel Zellapoptose, indem sie die Expression der antiapoptotischen BCL2-Familie inhibieren (54, 71). Durch CHOP wird das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Teilen der Bcl2-Familie zu Gunsten der proapoptotischen Proteine gerichtet (48).

CHOP kann die Expression von BCL-2, BCL-XL und MCL-1 herunterregulieren und die Expression von BIM steigern. Durch gesteigerte Expression von BIM werden BAK und BAX verstärkt exprimiert. BAK und BAX oligomerisieren, woraufhin diese Oligomere die Ausschüttung von apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c und Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) durch erhöhte Permeabilität der Mitochondrien verursachen, wodurch schließlich der Zelltod induziert wird (54).

TRB3 ist eine intrazelluläre Pseudokinase. Während ER-Stress wird TRB3 durch ATF4-CHOP induziert. Durch die hochregulierte TRB3-Expression wird Caspase3 aktiviert (54).

2.5.2 Caspase

Während der Apoptose wird Cytochrom C aus Mitochondrien freigesetzt. Das zytosolische Cytochrom C bildet einen Komplex mit Apaf-1 und der Procaspase-9. Dadurch wird Caspase-9 aktiviert, welche wiederum andere Caspasen aktiviert, so zum Beispiel auch Caspase 3 (68, 72).

Alle proapoptotischen Signale führen letztlich zu einer Caspase-Aktivierung, welche dann zu einem geordneten Zelltod führt. Viele unterschiedliche Caspasen, unter anderem Caspase 3, sind dabei beteiligt. Der genaue Ablauf der Caspase-Aktivierung ist bisher noch nicht vollständig geklärt (48).

Die aktivierten Caspasen spalten eine Vielzahl von Proteinen, wodurch wichtige zelluläre Prozesse deaktiviert werden. Strukturkomponenten der Zelle abgebaut werden und die genomische DNA fragmentiert wird (72).

2.5.3 Autophagie

Autophagie ist ein Mechanismus der Zellen um mit Zell-Stress umzugehen und Apoptose zu umgehen. Während der Autophagie werden Teile des Zytoplasmas und der intrazellulären Organellen in Vakuolen gebunden, den sogenannten Autophagosomen (67). Anschließend werden diese zu Lysosomen zum Abbau transportiert. Im Lysosom bewirken verschiedene Hydrolasen den Abbau der zellulären Bestandteile (73).

Ist der Stress zu stark oder zu lang, wird die Apoptose eingeleitet. So kann CHOP während des ER-Stress zunächst die Expression von Genen, die mit Autophagie zu tun haben, regulieren. Während länger andauerndem Stress inhibiert CHOP dann die Autophagie und initiiert die Apoptose. Daher spielt CHOP eine wichtige Rolle im Wechsel zwischen Autophagie und Apoptose (54).

2.6 Ubiquitin-Proteasom-System

In eukaryoten Zellen wird der Großteil der Proteine im Proteasom degradiert. Im Proteasom kommt es zu einer selektiven Proteolyse durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (74). Die Ubiquitinierung ist eine schrittweise Kaskade, die das Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym (E1), das Ubiquitin-Konjugierungs-Enzym (E2) und die Ubiquitin-Ligase (E3) benötigt. Zunächst aktiviert E1 Ubiquitin ATP-abhängig und verbindet es mit E2, welches dann einen Komplex mit E3 und dem Ziel-Substrat bildet. Das aktivierte Ubiquitin wird dann an einen Lysin-Rest des Ziel-Substrats transferiert. Die Zahl der Ubiquitinierungen des Ziel-Substrats bestimmt über das funktionelle Ergebnis des Substrats. Polyubiquitinierte Proteine werden für die Degradierung durch das Proteasom gekennzeichnet (75-78). Proteine, welche nicht die richtige Konformation haben, werden zurück ins Zytosol transloziert, dort ubiquitiniert und vom 26S-Proteasom durch ER-abhängige Degradation abgebaut. Fallen zu viele fehlgefaltete Proteine an, aggregieren sie im ER und der programmierte Zelltod wird eingeleitet. Dies geschieht in der Regel durch Induktion von proapoptotischen Proteinen wie zum Beispiel CHOP (79). In mehreren Studien

konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen stärker auf Proteasom-abhängigen Proteinabbau zur Degradierung von abnormalen Proteinen angewiesen sind als gesunde Zellen. Deshalb wurden Proteasominhibitoren, wie zum Beispiel Bortezomib, zur Therapie von bösartigen Erkrankungen entwickelt. Bortezomib hemmt reversibel die chymotryptische Aktivität der 20S-Untereinheit des Proteasoms. So können ungefaltete Proteine nicht vom Proteasom abgebaut werden, es entsteht ER-Stress, die terminale UPR wird aktiviert und Apoptose wird induziert. 2003 wurde Bortezomib als erster Proteasomeninhibitor zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen (61, 78, 79).

3. Verwendete Materialien

3.1 Allgemeine Substanzen

- 2-Mercaptoethanol von Roth
- 2xLaemmli Probenpuffer von Sigma
- Acrylamid 4K 30 % Solution von AppliChem
- Albumin Fraktion V von Roth
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) von Sigma
- Brij 96V von Fluka
- Cell Titer Aqueous Solution von Promega
- Ethanol von AppliChem
- Fetales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*; FCS) von Sigma
- Glycin von Sigma
- L-Canavanine von Sigma-Aldrich (100 mM Stock in Millipore Wasser)
- Leupeptin von Sigma
- L-Glutamin von Sigma
- Magnesiumchlorid von Roth
- Milchpulver von Roth
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) von Sigma
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) von AppliChem
- Natriumchlorid von Merck
- Natriumdodecylsulfat (*Sodiumdodecylsulfat*; SDS) von Roth
- Natriumfluorid von Sigma-Aldrich
- Natriumorthovanadat von Sigma
- Natriumpyruvat von Sigma
- Penicillin/Streptomycin von Sigma
- Pepstatin von Sigma
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) von Sigma
- Protein Assay von Bio-Rad
- Rotiphorese Gel 30 von Roth
- RPMI-1640 von Caisson
- RPMI-1640 von Sigma
- Salzsäure (HCl) von Roth

- Tris von AppliChem
- Trypsin-EDTA Lösung von Sigma
- Tween-20 von Roth
- Vorgefärbte Proteinladung (*Prestained RTU Protein ladder I*) von PromoKine
- *Western Lightning Plus ECL* mit *Enhanced Luminol Reagent Plus*, und *Oxidizing Reagent Plus* von Perkin Elmer

3.2 Allgemeine Materialien

- 0,2 µm Filter von Sarstedt
- 1,5 ml Reaktionsgefäße von Greiner bio-one
- 15 ml, 50 ml Tubes von cellstar, Greiner bio-one
- 200 µl gelbe Spitzen, 10 µl Spitzen, 1000 µl blaue Spitzen von Starlab
- 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Pipetten, einzeln verpackt mit Spitze von Greiner bio-one
- 50 ml Spritzen von BD
- 96, 24, 6 Well Zellkulturplatten F-bottom von cellstar, Greiner bio-one
- MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte, 0,1 ml von applied biosystems
- PVDF-Membran Amersham Hybond 0,45 µm von GE Healthcare Life Sciences
- T75- und T25- Zellkulturflaschen von cellstar, Greiner bio-one
- Zählkammer von Hycor

3.3 Geräte

- Centrifuge 5471R von Eppendorf
- ChemiDoc von Bio-Rad
- Durchflusszytometer Canto II von Becton Dickinson
- Gelelektrophoresekammer, Glasplatten von Bio-Rad
- GS800 Kalibrier-Densitometer von Bio-Rad
- Inkubator Hera cell von Thermo Scientific
- Magnetrührer VMS-A von VWR International
- Mikroskop von Hund Wetzlar
- Mikroskop von Motic

- Mini-PROTEAN Tetra System von Bio-Rad
- pH Meter 766 Calimatic von Knick
- PowerStation 300 von labnet
- Schüttler Mini Rocking Platform von Biometra
- Schüttler von Stovall life science
- Sterilbank von ThermoScientific
- ThermoStat plus von Eppendorf
- Trans-Blot SD, Semi-Dry transfer cell von Bio-Rad
- Vortex-Genie 2 von Scientific Industries
- Waage von Sartorius
- Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus von Thermo Scientific
- Zentrifuge Megafuge 40R von Thermo Scientific

3.4 Puffer und Lösungen

- DPBS (1x) von Sigma
- 5x TBS Lösung (2 l) finale Konzentration
 - 12,00 g Tris 50 mM
 - 87,65 g Natriumchlorid 0,75 M
 - Millipore Wasser
 - pH 8,0 (eingestellt mit konz. HCl)
- 1x TBST (5 l) finale Konzentration
 - 1 l 5x TBS
 - 4 l Millipore Wasser
 - 5 ml Tween-20 0,1%
- 10%ige Sodiumdodecylsulfat (SDS) Lösung (1 l) finale Konzentration
 - 100 g SDS
 - Millipore Wasser
- 10x SDS-Running Puffer (1 l) finale Konzentration
 - 30,26 g Tris 0,24 M
 - 144 g Glycin 1,9 M
 - 100 ml 10%ige SDS-Lösung 1%
 - Millipore Wasser
- 10%ige Ammoniumperoxidsulfat (APS) Lösung

- 1 g APS
9 ml Millipore Wasser
- Lower Tris finale Konzentration
 - 91 g Tris ad 300 ml H₂O 1,5 M
 - 20 ml 10%ige SDS-Lösung 0,4%
 - pH 8,8 (eingestellt mit konz. HCl)
 - bis 500 ml mit H₂O auffüllen
 - Upper Tris finale Konzentration
 - 6,05 g Tris ad 40 ml H₂O 0,5 M
 - 4 ml 10%ige SDS-Lösung 0,4%
 - pH 6,8 (eingestellt mit konz. HCl)
 - bis 100 ml H₂O auffüllen
 - 50 mM Tris/HCl pH 7,5 (1 l)
 - 6,057 g Tris
 - Millipore Wasser
 - pH 7,5 (eingestellt mit konz. HCl)
 - 10%ige Brij 96V Stock-Lösung in Millipore Wasser
 - 1%ige Brij 96V Lösung
 - 10%ige Brij 96V Stock 1:10 verdünnt in 50mM Tris/HCl pH 7,5
 - Lysepuffer für Proteingewinnung (5 ml) finale Konzentration
 - 5 ml 1%ige Brij 96V Lösung
 - 50 µl Natriumfluorid (1000 mM Stock in H₂O) 10 mM
 - 50 µl Natriumorthovanadat (100 mM Stock in H₂O) 1 mM
 - 5 µl Leupeptin (1 mg/ml Stock in H₂O) 1 µg/ml
 - 5 µl Pepstatin (1,5 mg/ml Stock in Methanol) 1,5 µg/ml
 - 50 µl PMSF (100 mM Stock in Ethanol) 1 mM
 - Western-Blotting Puffer (Semi-Dry-Blot) (1 l) finale Konzentration
 - 5,82 g Tris 48 mM
 - 2,93 g Glycin 39 mM
 - 3,75 ml 10%ige SDS-Lösung 0,04%
 - 200 ml Methanol 20%
 - Millipore Wasser
 - Stripping Puffer (50 ml) finale Konzentration
 - 10 ml 10%ige SDS-Lösung 2%

350 µl 2-Mercaptoethanol	100 mM
3,13 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8	62,5 mM
Millipore Wasser	

3.5 Nährmedien für Zellkultur

- Vollmedium finale Konzentration
 - 450 ml RPMI-1640 von Sigma
 - 50 ml FCS 10%
 - 5,7 ml L-Glutamin (200 mM) 1%
 - 5,7 ml Penicillin (10000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml) 1%
- Vollmedium für NCI-H929 finale Konzentration
 - 450 ml RPMI-1640 von Sigma
 - 50 ml FCS 10%
 - 5,7 ml L-Glutamin (200 mM) 1%
 - 5,7 ml Penicillin (10000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml) 1%
 - 5,7 ml Natriumpyruvat (100 mM) 100 mM
 - 28 µl β-Mercaptomethanol 0,05 mM
- Argininfreies Medium finale Konzentration
 - 450 ml RPMI von Caisson
 - 50 ml dialysiertes FCS 10%
 - 5,7 ml L-Glutamin (200 mM) 1%
 - 5,7 ml ml Penicillin (10000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml) 1%
 - 1,1 ml L-Lysin (100 mM Stock) 0,219 mM
 - 500 µl MnCl₂ (10 mM Stock) 10 µM
- Einfriermedium
- FCS (Hitzeinaktiviert)
- 10% DMSO steril
- Density Medium (Lymphoprep) von Stemcell, #07851
- MACS-Medium finale Konzentration
 - 500 ml PBS von Sigma
 - 10 ml FCS 2%
 - EDTA 1 mM

3.6 Kits

- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen, CAT-# 556547
- Transcription Factor Buffer Set von BD Pharmingen, CAT-# 562574
- Human Whole Blood And Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit von StemCell, CAT-# 18387
- Human Multiple Myeloma Enrichment Cocktail von Stemcell, CAT-# 15129/15169
- QuantiTect Probe RT-PCR Kit von Qiagen, CAT-# 204443
- RNeasy Mini Kit von Qiagen, CAT-# 74106

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

Antikörper Western Blot	Produktnummer	Isotyp/Spezies	Verdünnung	Inkubations- zeit
Ubiquitin (P4D1)	Cell Signaling, CAT-# 3936	Mouse IgG1	1:1000 in 5% Magermilch	über Nacht
Phospho- eIF2 α (Ser51)	Cell Signaling, CAT-# 9721	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	über Nacht
eIF2 α	Cell Signaling, CAT-# 9722	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	über Nacht
Caspase-3	Cell Signaling, CAT-# 9662	Rabbit	1:1000 in 5% Magermilch	über Nacht
β -Actin	Cell Signaling, CAT-# 4967	Rabbit	1:5000 in 5% BSA	über Nacht
ASS1	Sigma, CAT-# HPA020896	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	über Nacht
GAPDH (14C10)	Cell Signaling, CAT-# 2118	Rabbit	1:5000 in 5% BSA	über Nacht
Akt (pan) (C67E7)	Cell Signaling, CAT-# 4691	Rabbit	1:1000 in 5% BSA	3 h

Antikörper FACS	Produktnummer	Isotyp
FITC Mouse Anti-Human CD138	BD Pharmingen, CAT-# 552723	Mouse BALB/c IgG ₁ , κ
FITC Mouse IgG ₁ , κ Isotype Control	BD Pharmingen, CAT-# 555748	Mouse IgG ₁ , κ
PE Mouse anti-XBP-1S	BD Pharmingen, CAT-# 562642	Mouse IgG ₁ , κ
PE Mouse IgG ₁ , κ Isotype Control	BD Pharmingen, CAT-# 555749	Mouse IgG ₁ , κ

3.7.2 Sekundärantikörper

- Goat anti-rabbit IgG-HRP von Santa Cruz Biotechnology, # L1013
- Goat anti-mouse IgG-HRP von Santa Cruz Biotechnology, # A2413

3.8 Biologisches Material

3.8.1 Humane Zelllinien

Quelle: AG Prof. Dr. Hartmut Goldschmidt (Medizinische Klinik V, Universitätsklinik Heidelberg)

Zelllinie	Zelltyp	Verdopplungszeit
U266	Multiples Myelom	Ca. 55 h
NCI-H929	Multiples Myelom	Ca. 70-80 h
KMS-12-BM	Multiples Myelom	Ca. 60 h
LP-1	Multiples Meylom	35-80 h
OPM-2	Multiples Myelom	50-60 h
RPMI-8226	Multiples Myelom	60-70 h
Ramos	Burkitt Lymphom	Ca. 48 h
A431	Epidermoid Tumor	80-100 h

3.8.2 Knochenmarkaspirate von Tumorpatienten

Die Verarbeitung der Knochenmarkaspirate erfolgte nach ausführlicher Aufklärung, Bedenkzeit, sowie Zustimmung der Patienten. Die Proben wurden pseudonymisiert verarbeitet.

Dem Antrag "Tumorerkrankungen und Myeloische Suppressorzellen" mit der Bearbeitungsnummer 873.119.10 (7128) wurde durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zugestimmt.

Bei allen Patienten handelte es sich um eine Erstdiagnose.

	Datum der Aufreinigung	Erkrankung	ISS Stadium	Zytogenetik
Patient 1	02.12.2014	Multiples Myelom IgG lambda	III	-13, +1q
Patient 2	09.01.2015	Leichtketten-Myelom Typ lambda	III	del17p, del13q, t(11;14)
Patient 3	15.01.2015	Multiples Myelom IgA kappa	III	-13, +1q, t(4;14)
Patient 4	28.01.2015	Leichtketten-Myelom Typ lambda	III	+1, -13
Patient 5	17.03.2015	Primäre Plasmazelleukämie IgG kappa	III	-13, +1q, +5p, del 17p

3.9 Oligonukleotide und Sonden

Die folgenden Sequenzen der Primer und Sonden wurden verwendet:

Bezeichnung Primer/ Sonde	Sequenz (5'-3')
Xbp1s_for	CTGAGTCCGCAGCAGGT
Xbp1s_rev	TCCAGAATGCCCAACAGGAT
Xbp1s_probe	TCCCATGGATTCTGGCGGT
Xbp1u_for	AGCCAAGGGGAATGAAGTGA
Xbp1u_rev	GAGGTGCACGTAGTCTGAGT
Xbp1u_probe	AGTGGCCGGGTCTGCTGAGT

Die Sonden wurden am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher versehen.

Die Primer und Sonden wurden von Eurofins MWG synthetisiert und bezogen.

4. Methoden

4.1 Biochemische Techniken

4.1.1 Isolierung von Proteinen

Die Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen in T25- oder T75-Zellkulturflaschen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Röhrchen geerntet, für 5 min bei 1500 rpm (471 g) zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei 3000 rpm (956 g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert. Dann wurden die Tubes mit den Zellen für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Die Pellets wurden, je nach Größe der Pellets, mit 50 oder 100 µl Lysepuffer durch Auf- und Abpipettieren auf Eis lysiert. Die Lysate wurden für 30 min auf Eis gestellt und alle 10 min durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach Zentrifugation über 15 min bei 12.000 rpm (15.294 g) und 4°C sammelten sich die Zellreste am Boden des Tubes und die Proteinlysate konnten als Überstand in ein neues Tube überführt werden. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 4.1.2) wurden die Lysate 1:1 mit 2xLaemmli Sample Buffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und direkt auf ein SDS-Gel geladen oder bei -20°C zur Lagerung eingefroren.

4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford Assay)

Der Biorad Protein Assay ist ein Testverfahren, bei dem der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) je nach Proteinkonzentration einen Farbwechsel vollzieht. Das maximale Absorptionsspektrum von CBBG wechselt von 465 nm in saurer Lösung zu 595 nm wenn er an kationische oder unpolare Seitenketten von Aminosäuren eines Polypeptids bzw. Proteins gebunden ist.

Zunächst wurde eine Proteinstandard-Verdünnungsreihe angesetzt. Die Konzentration des Proteinstandards betrug 4000 µg/ml. Dieser wurde 1:1 mit Lysepuffer vermischt. Ein Teil dieser Mischung wurde wiederum 1:1 mit Lysepuffer vermischt. Dies wurde bis zu einer Konzentration von 62,5 µg/ml fortgeführt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in eine 96-Loch Flachbodenplatte 5 µl Standard bzw. Lysat pipettiert. Für den Standard wurden Doppelansätze, für die Lysate Dreifachansätze verwendet. 1000 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz S wurden gemischt. Von diesem Gemisch wurden je 25 µl/ Loch zum

Standard bzw. Lysat zupipettiert. Anschließend wurden jedem Loch 200 µl Reagenz B zugefügt. Nach Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung am ELISA-Reader bei 540/690 nm.

4.1.3 Elektrophorese

Für die folgenden Versuche wurden 12%- beziehungsweise 15%ige Gele gegossen. Die folgende Tabelle zeigt die Konzentrationen der verwendeten Substanzen für ein Gel.

	Trenngel		Sammelgel
	12%	15%	
Millipore Wasser	3,5 ml	2,3 ml	3,05 ml
Upper Tris (Sammelgel)/ Lower Tris (Trenngel)	2,5 ml	2,6 ml	1,25 ml
Acrylamid 4K 30 % Solution	4 ml	5 ml	0,65 ml
10% APS	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	7 µl	4 µl	5 µl

Für das Trenngel wurden Wasser, 1,5 M Tris (pH 8,8) incl. SDS sowie 30% Acryl-bisacrylamide mix in einem Falcon unter einem Abzug gemischt, anschließend wurden APS und TEMED zugefügt. Diese Mischung wurde in eine Glaskammer, welche in eine Halterung gespannt war, 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 Kammer zusammengebaut und mit SDS Running Buffer aufgefüllt. Eingefrorene Proteinproben wurden aufgetaut und 5 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurden die Proben geladen, dabei wurden 6 µl des Proteinmarkers bzw. 30 µg Protein 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.

4.1.4 Semi-Dry Blotting

Die PVDF-Membranen wurden in Methanol und anschließend in Western Blotting Puffer eingelegt. Die Gele wurden aus der Kammer herausgelöst und in Western Blotting Puffer gewaschen. Vier Blotting Paper Sheets wurden mit WB-Puffer durchtränkt und blasenfrei auf den SemiDryBlotter aufgelegt. Darauf wurde erst die Membran und dann das Gel gelegt, welches mit einzeln befeuchteten Blotting Paper Sheets belegt wurde. Die Ausrichtung des Gels erfolgte so, dass die negativ geladenen Proteine von der Kathode auf die Anode im elektrischen Feld zuliefen. Anschließend wurde die Kammer geschlossen und circa 1 h bei 45 mA pro Blot geblottet. Danach wurde der Blot 2x2 min in TBST gewaschen und 1,5-2 h mit 5% Magermilch in TBST inkubiert. Dies dient dazu unspezifische Bindungen abzudecken. Anschließend wurde die Membran 2x5 min in TBST gewaschen.

Je nach verwendetem primären Antikörper wurden die Antikörper in 5% Magermilch in TBST oder 5% BSA in TBST verdünnt. Die Membran wurde mit 4 ml Antikörperverdünnung in Folie eingeschweißt und bei 4°C im Kühlraum auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen mindestens 3x5 min in TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:2500 in 5% Magermilch in TBST verdünnt. Davon wurden 5 ml auf den Blot gegeben und bei RT auf dem Schüttler für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x5 min mit TBST gewaschen. Nach dem 1:1 Mischen der beiden ECL-Reagenzien wurden 2 ml des Gemisches auf den Blot gegeben und 2 min inkubiert. Dann wurde die Membran in Folie eingeklebt und zum Lichtschutz in eine Filmkassette gelegt.

4.1.5 Strippen der Membran

Um auf einem Blot zwei verschiedene Proteine nachzuweisen, die auf gleicher oder ähnlicher Höhe verlaufen, muss der gegen das erste Protein gerichtete Primärantikörper vom Blot entfernt werden. Hierzu wird ein Puffer verwendet, der die Antikörper-Protein-Bindung löst, aber nicht die Proteine von der Membran entfernt.

Der Puffer, bestehend aus 10%iger SDS-Lösung und 1 M Tris (pH 6,8), wurde in einem Wasserbad auf 50°C erwärmt und nach Erwärmung mit 2-Mercaptoethanol versetzt. Von dieser Mischung wurden 20 ml auf den Blot gegeben und dieser 30 min bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Blot mindestens 3x10 min mit TBST gewaschen. Nun musste der Blot erneut mit 5%

Magermilch in TBST inkubiert werden, woraufhin die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden konnte.

4.1.6 Auswertung des Western Blot

Die Auswertung der entwickelten Membranen erfolgte mittels ChemiDoc von Bio-Rad. Dieser ermittelt durch das Programm ImageLab von Bio-Rad die Dichte der einzelnen Banden, für welche sich nach Abzug des Hintergrundes die Optische Dichte ergibt. Die ermittelten Banden zeigen eine steigende Intensität, je mehr Protein auf der Membran vorhanden ist. Nach Detektion des gesuchten Proteins wurde bei jedem Blot ein durch die verschiedenen Behandlungen, zum Beispiel mit oder ohne Arginin, unbeeinflusstes konstitutiv exprimiertes Protein, ein sogenanntes Haushaltsprotein, detektiert. Anhand dieser Ladekontrolle wurde geprüft, ob die einzelnen Taschen mit einer vergleichbaren Proteinmenge beladen worden waren. So konnte die optische Dichte der Banden des gesuchten Proteins im Verhältnis zur optischen Dichte der Ladekontrolle gesetzt werden um die Menge des gesuchten Proteins bei verschiedenen Proben bzw. Versuchsbedingungen vergleichen zu können.

4.2 Molekularbiologische Techniken

4.2.1 RNA-Gewinnung aus Zellen

Die RNA-Gewinnung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden mit RNase-freien, autoklavierten Reagenzien durchgeführt.

1×10^6 Zellen pro Ansatz wurden zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Durch Zugabe von 350 μ l RLT-Puffer und Auflösen des Zellpellets durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen zerstört. Das Lysat wurde 5 bis 10 Mal durch eine Nadel mit 0,9 mm Durchmesser an einer RNase-freien Spritze gedrückt, um das Lysat zu homogenisieren. Anschließend wurde das Lysat 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt. Bis zu 700 μ l der Mischung wurde auf eine QIAshredder spin Säule geladen, in ein Sammeltube gegeben und für 15 s bei 10000 rpm (8000 g) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin wurde die Membran der Säulen mit 700 μ l RW1 Puffer und 500 μ l RPE Puffer gewaschen, jeweils für 15 s bei 10000 rpm (8000 g) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde

die Membran erneut mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und 2 min bei 10000 rpm (8000 g) zentrifugiert, um sicher zu gehen, dass kein Ethanol bei der RNA-Auswaschung interferiert. Wieder wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein neues Sammel tube platziert und erneut für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die spin column in ein 1,5 ml Sammel tube platziert und mit 50 µl RNase freiem Wasser versehen für 1 min bei 10000 rpm (8000 g) zentrifugiert, um die RNA auszuwaschen. Betrug die ermittelte RNA-Menge mehr als 30 µg, wurde der letzte Schritt wiederholt.

4.2.2 Ermittlung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mittels NanoDrop ermittelt. Hierbei wurde photometrisch die UV-Absorption gemessen, welche in Relation zur Konzentration des gelösten Stoffes steht. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Messung wurde 1 µl benötigt.

4.2.3 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion und der quantitativen Bestimmung der gewonnenen Nukleinsäuren während jedes Zyklus der PCR.

In diesem Fall wurde eine One-Step qRT-PCR durchgeführt, bei der sowohl die reverse Transkription als auch die PCR in einem Schritt stattfinden.

Diese Taqman-Messung geschieht mittels einer Sonde, welche am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher versehen ist. Wird der Reporter von einer Lichtquelle angeregt, kommt es zur Emission von Energie, welche vom Quencher absorbiert wird. Während der Elongationsphase der PCR wird die Sonde durch die Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität gespalten. Hierdurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und das vom Reporter emittierte Licht wird detektiert. Dieses ist proportional zum akkumulierten PCR-Produkt. Bei der Messung wurden die C(T)-Werte bestimmt, die besagen, nach wie vielen Zyklen das Plateau der Amplifikation erreicht wurde. Die Expression der gesuchten RNA wurde bezogen auf das Haushaltsgen GAPDH ermittelt.

Die qRT-PCR wurde mit dem QuantiTect Probe RT-PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt (Gesamtvolumen 20 μ l):

Substanz	pro Ansatz [μ l]
PCR Mastermix	10
sense Primer (10 μ M)	1,6
antisense Primer (10 μ M)	1,6
TaqMan Probe (10 μ M)	0,8
Polymerase	0,2
dNTPs (10 mM each)	0,4
MgCl ₂ (25 mM)	1,4
Template RNA 20 ng/ μ l	4

Die Mischung wurde in PCR-Tubes überführt. Anschließend wurde der Real-Time-Cycler mit folgendem Programm eingestellt:

Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50°C
PCR-Aktivierungs-Schritt	14 min	95°C
Denaturierung	15 s	94°C
Primer-Hybridisierung und Extension	60 s	60°C
Menge an Zyklen	40-45	

4.3 Zellbiologische Techniken

4.3.1 Kultivierung humaner Tumorzelllinien

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

Die Tumorzellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit Vollmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zelllinien zwei- bis dreimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3, 1:5 oder 1:10 verdünnt, um Überwachsungen zu vermeiden. Dazu musste die adhärent wachsende Zelllinie RPMI-8226 vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen um das Medium vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Resuspension in FCS-haltigem RPMI-Medium gestoppt.

Für die Kultivierung der Zellen in argininfreiem Medium wurden die Zellen bei 1500 rpm (471 g) für 5 min zentrifugiert und anschließend dreimalig mit 1 ml sterilem PBS

gewaschen. Der Überstand musste vollständig entfernt werden. Anschließend wurden die Zellen in argininfreiem Medium resuspendiert und in T75- oder T25-Zellkulturflaschen über den gewünschten Zeitraum inkubiert.

4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung können Zellen im Stickstofftank bei -196°C kryokonserviert werden. Die Zelllinien wurden nach Zentrifugation und Entfernung des Mediums in 1 ml FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden sie über 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in den Stickstofftank überführt. DMSO schützt die Zellen vor Eiskristallbildung und Dehydratation.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C unter Schwenken möglichst rasch erwärmt. Die im Einfriermedium aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml tube überführt und 5 min bei 1500 rpm (471 g) zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde das Zellpellet mit dem entsprechenden Vollmedium resuspendiert und in T25-Zellkulturflaschen überführt.

4.3.3 MTS-Assay

Um die Zahl der viablen Zellen in Proliferation festzustellen, wurde ein MTT-Proliferationsassay durchgeführt. Dazu wurden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 96-well Platte in entsprechendem Medium ausgesät. Das gesamte Volumen pro Vertiefung betrug 100 μl . Nach einer Inkubationszeit in der entsprechenden Bedingung wurde für 2 h Cell Titer AQueos Solution zugegeben (20 μl pro 100 μl Versuchsvolumen). Das Reagenz enthält ein Gemisch aus einem Tetrazoliumsalz (MTS) sowie Elektron-verkoppeltes Reagenz (PES). Das MTS wird von stoffwechselaktiven Zellen in ein farbiges Formazan Produkt reduziert, welches in Zellkulturmedium löslich ist. Die Menge des Formazan Produktes ist direkt proportional zur Menge der lebenden Zellen in Kultur. Nach der Inkubation mit dem Reagenz wurde die optische Dichte bei 490 nm im Elisa-Reader gemessen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt, der Mittelwert der drei detektierten OD-Werte wurde in den statistischen Analysen verwendet. Als Referenz wurde das Medium verwendet.

4.3.4 Separation CD138-positiver Zellen

4.3.4.1 EasySep

Bei der Separation mit Positivselektion wurde das Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit von Stemcell verwendet.

4,5 ml heparinisiertes Knochenmarkblut, welches im Rahmen einer aus medizinischer Indikation erforderlichen Knochenmarkpunktion zusätzlich abgenommen wurde, wurde in ein 15 ml Polystyrentube gefüllt und 1:1 mit 1x EasySep RBC Lyse Puffer vermischt. Dann wurden 25 µl des EasySep Human WB and BM CD138 Positive Selection Cocktails pro ml der Probe/Puffer-Mischung zugefügt, gut gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 25 µl der, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischten, EasySep Whole Blood Magnetic Particles pro ml der Probe/Lyse-Puffer Mischung hinzugefügt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Faste die Probe weniger als 10 ml, wurde die Probe mit MACS-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach dem erneuten Mischen der Zellen wurde das Tube ohne Kappe in den Magneten gestellt. Nach 5 min wurde der Überstand ausgeschüttet. Die mit Magneten markierten Zellen verblieben so im Tube. Dann wurden die Zellen in 10 ml des Mediums resuspendiert und erneut für 5 min in den Magneten platziert. Dieser Vorgang wurde 3 Mal wiederholt. Anschließend konnten die Zellen im gewünschten Medium resuspendiert werden.

4.3.4.2 RosetteSep

Für diese Negativselektion von Myelom-Zellen inklusive ihrer unmittelbaren Vorläufer im Rahmen der B-Zell-Reifung wurde der Human Multiple Myeloma Enrichment Cocktail der Firma Stemcell verwendet. Dieser enthält eine Mischung aus tetrameren Antikörperkomplexen, welche durch Bindung an definierte Nicht-Plasmazell-Antigene Rosetten bilden gegen unerwünschte Zellen, um diese aus der Probe zu entfernen. Die gewünschten Myelom-Zellen werden nicht an die Antikörper gebunden (Negativselektion der aufzureinigenden Zellen).

Je einem ml einer Knochenmarkprobe wurden 50 µl Multiple Myeloma Enrichment Cocktail hinzugefügt, gut gemischt und bei RT für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe 1:1 mit MACS-Medium vermischt. Diese Mischung wurde vorsichtig auf das Density Medium geschichtet, ohne die Probe mit dem Density Medium zu vermischen.

Folgende Tabelle zeigt die Mengen an benötigtem Density Medium in ml:

Knochenmark	MACS-Medium	Density Medium
1	1	1,5
2	2	3
3	3	3
4	4	4
5	5	15
10	10	15

Die geschichtete Probe wurde für 20 min bei 1200 g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Myelom-Zellen lagerten sich nach der Zentrifugation zwischen Plasma und Density Medium ab und konnten vorsichtig zwischen diesen Schichten entfernt werden. Nach zweimaligem Waschen mit MACS-Medium konnten die Zellen verwendet werden.

4.3.5 Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*; FACS)

4.3.5.1 Viabilitätstest durch Annexin-/Propidiumiodid-Färbung

Der Viabilitätstest wurde mit einem FITC Annexin V Apoptose-Detection Kit von BD Pharmingen durchgeführt und im Durchflusszytometer gemessen.

Eine der ersten Veränderungen, welche Zellen durchmachen, die sich in Apoptose befinden, ist der Verlust der physiologischen Plasmamembranstruktur. Dabei wird das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran verlagert. So wird PS dem Extrazellulärraum exponiert. Annexin V ist ein Phospholipid-Bindungsprotein mit einer hohen Affinität für PS. Die Zellmembran von viablen Zellen ist für Propidium-Iodid (PI) undurchlässig, Zellmembranen von spät-apoptotischen bzw. abgestorbenen Zellen sind allerdings für PI durchlässig. In der Zelle interkaliert PI mit der DNA.

Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit unterschiedlichen Bedingungen in 6-Well Platten behandelt. Nach dem Behandlungszeitraum wurden die Zellen in ein 15 ml Tube überführt und bei 1500 rpm (471 g) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 ml 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 hinzugefügt und durchflusszytometrisch analysiert.

Viable, nicht apoptotische Zellen zeigen sich in der FACS-Analyse PI- und Annexin-negativ.

4.3.5.2 CD138

CD138 ist ein Transmembranprotein, welches stark auf gesunden Plasmazellen sowie auf malignen Plasmazellpopulationen exprimiert wird.

Die gewaschenen Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert und 20 µl des FITC Anti-Human CD138-Antikörpers zugefügt. Zu jeder Probe wurde auch eine Isotypkontrolle mitgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 20 µl des Antikörpers FITC Mouse IgG₁, κ gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden die Proben erneut gewaschen und in 350 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

4.3.5.3 Xbp1s (intracellular staining)

Zunächst mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden um die Färbung von spezifischen intracytoplasmatischen und intranukleären Proteinen zu ermöglichen. Hierzu wurde das Transcription Factor Buffer Set verwendet.

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden in 1 ml des 1x Fix/Perm Puffers resuspendiert und bei 4°C im Dunkeln für 40 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 1500 rpm (471 g) 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 1x Perm/Wash Puffers resuspendiert und mit 5 µl des PE Mouse anti-Xbp1s Antikörpers gefärbt. Als Isotypkontrolle diente der PE Mouse IgG₁, κ Antikörper. 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.

4.3.5.3 Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester-Assay

Die Zellen wurden mit CFSE markiert, einem Farbstoff, der von Zellen ins Zytoplasma aufgenommen wird und dort an Proteine bindet. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff zur Hälfte auf die Tochterzellen übertragen und die Farbtintensität (nach

Laseranregung im Durchflusszytometer) nach jeder Zellteilung halbiert. So eignet sich die CFSE-Färbung zur Proliferationstestung.

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend in 450 µl PBS resuspendiert. Es wurden 50 µl des 1:200 in PBS gelösten CFSE (finale Konzentration 5 µM) hinzugefügt und bei RT für 5 min inkubiert. Dann wurden die Zellen drei mal mit 5 ml eiskaltem PBS/5% BSA gewaschen. Nun wurden die markierten Zellen in entsprechendem Medium resuspendiert und in einer 24-Well Platte ausgesät. Eine Probe für den Zeitpunkt direkt vor Start des Experimentes Tag 0 (day 0, d0) wurde in 500 µl 1% PFA fixiert, die anderen Proben wurden zu den Zeitpunkten d1, d2 und d4 fixiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer im FL-1-Kanal.

4.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Excel durchgeführt. Dabei wurde ein 2-seitiger T-Test mit zwei Stichproben mit ungleicher Varianz durchgeführt.

p>0,05: nicht signifikant (ns)		wurde in den graphischen Abbildungen nicht markiert
p<0,05	*	signifikant
p<0,01	**	sehr signifikant
p<0,01	***	hoch signifikant

5. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, *in vitro* eine neue Therapiestrategie für das Multiple Myelom zu entwickeln. Hierbei wurden die Tumorzellen in einen Arginin-Mangelzustand versetzt, indem sie in Zellkulturmedium ohne Arginin bzw. mit reduziertem Arginingehalt kultiviert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Argininanalogon Canavanin in einer niedrigen Konzentration (100 μM) behandelt. Ebenso wurden die Zellen als Vergleich unter Arginin-suffizienten Bedingungen mit und ohne Canavanin behandelt. Diese Strategie beruht auf der Hypothese, dass hierdurch selektiv Canavanin statt Arginin in neu gebildete Proteine eingebaut wird und es so zu einer massiven Fehlfaltung von Proteinen mit konsekutivem Zelltod kommt.

In funktionellen Assays wurden die so behandelten Zellen hinsichtlich Proliferation und Viabilität untersucht.

Mögliche Mechanismen des induzierten Zelltodes im Kontext der metabolischen Therapie (Argininmangel + Canavanin) wurden durch Western Blot und FACS-Analysen untersucht. Hierbei wurden spezielle Aspekte der UPR, des Ubiquitin-Proteasomen-Systems sowie der Apoptose-Kaskade analysiert.

Alle Versuche wurden mit dem L-Enantiomer des Canavanins durchgeführt. Ist für Canavanin keine bestimmte Konzentration angegeben, wurden 100 μM verwendet.

5.1 Proliferation

Um den Einfluss der An- oder Abwesenheit von Arginin auf Myelomzellen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays an allen vorhandenen Myelom-Zelllinien durchgeführt. Ebenso wurde untersucht, ob die Zellen durch Zugabe von Citrullin zu Argininfreiem Medium in der Lage sind, Arginin selbst zu synthetisieren und dadurch proliferieren können. Ferner wurde das Experiment mit der Burkitt-Lymphom Zelllinie Ramos durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine sich sehr schnell teilende Tumorzelllinie. Die folgenden Daten wurden mittels MTS-Assay erhoben. Die Zellen wurden unter verschiedenen Arginin-Bedingungen behandelt: Arginin-suffiziente Bedingungen (1000 μM), Argininmangel (20 μM Arginin), Arginin-freie Bedingungen (0 μM Arginin), Arginin-freies Medium mit Zugabe von 1 mM Citrullin. Die Experimente wurden mit diesen vier Bedingungen jeweils mit und ohne

Zugabe von 100 μM Canavanin durchgeführt. Insgesamt betrug die Behandlungszeit der Zellen 24 h. Es wurden drei Versuche mit jeweils Triplets durchgeführt. In den folgenden Grafiken sind die Mittelwerte der optischen Dichte, welche mit der Zahl viabler Zellen und somit dem Ausmaß der Zell-Proliferation korreliert, mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

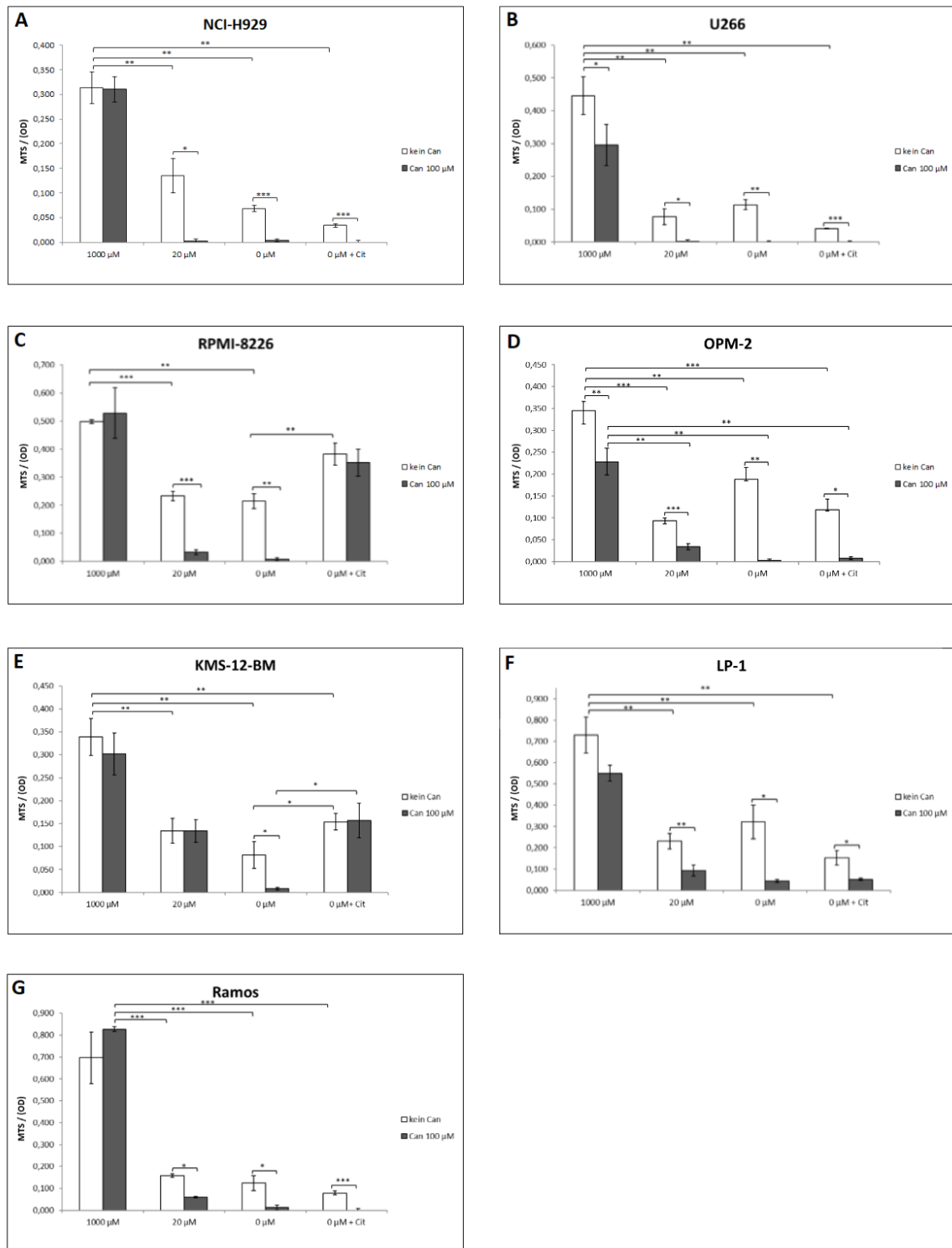


Abb. 3 A-G: Hemmung der Proliferation durch Arginindepletion und Canavaninzugabe. Die Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden für 24 h unter Arginin-suffizienten Bedingungen (1000 μ M Arginin), Argininmangel (20 μ M Arginin), Arginin-freien Bedingungen (0 μ M Arginin) und Argininfreiem Medium (0 μ M Arginin) mit Zugabe von 1 mM Citrullin (Cit) inkubiert. Wie angegeben, erfolgte ferner noch die Zugabe von Canavanin (Can, finale Konzentration 100 μ M). Dargestellt ist die zusammenfassende Auswertung von drei unabhängigen Versuchen eines MTS Proliferationsassays, die jeweils mit Proben-Tripletts durchgeführt wurden.

Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte. A: NCI-H929, B: U266, C: RPMI-8226, D: OPM-2, E: KMS-12-BM, F: LP-1, G: Ramos

5.1.1 Effekt von L-Canavanin unter Arginin-suffizienten Bedingungen

In den Zelllinien NCI-H929 (Abb. 3A), RPMI-8226 (Abb. 3C), KMS-12-BM (Abb. 3E), LP-1 (Abb. 3F) und Ramos (Abb. 3G) zeigt sich, dass unter Arginin-suffizienten Bedingungen, im Gegensatz zu den Argininmangelbedingungen, keine signifikante Minderung der Proliferation durch Zugabe von Canavanin (100 μ M) zu beobachten ist.

Lediglich in zwei Zelllinien, U266 (Abb. 3B) und OPM-2 (Abb. 3D), ist eine leichte Inhibition der Proliferation nach Canavanin-Zugabe messbar. Um dies zu überprüfen, wurden zusätzlich zum MTS-Assay in der Zelllinie U266 CFSE-Assays durchgeführt (Abb. 4).

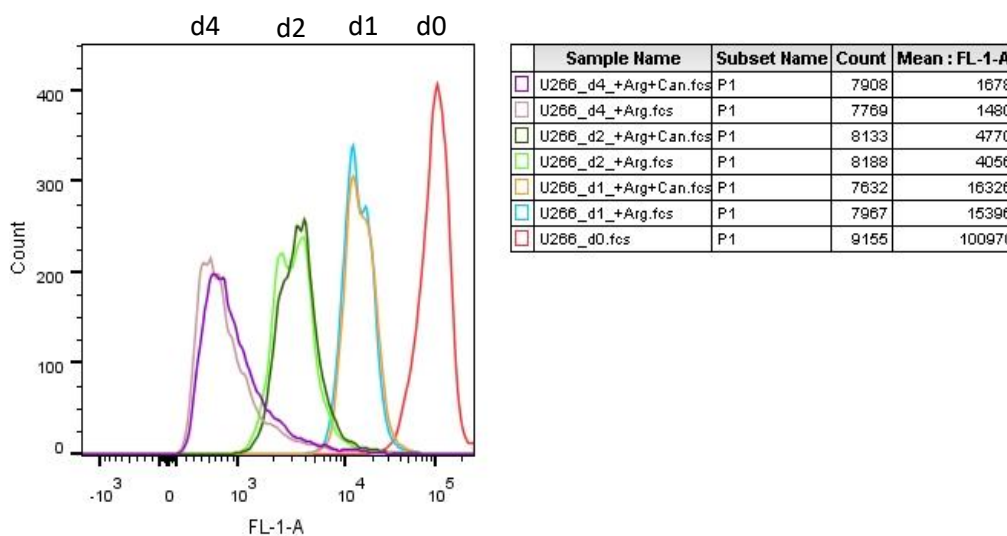


Abb. 4: Keine Hemmung der Proliferation bei Behandlung mit Canavanin unter Arginin-suffizienten Bedingungen. Zellen der Myelom-Linie U266 wurden mit CFSE markiert und unter Arginin-suffizienten Bedingungen mit und ohne Zugabe von Canavanin (100 μ M Can) behandelt. Als Referenz wurde eine Probe an Tag 0 gemessen. Die folgenden Messungen fanden an Tag 1, 2, und 4 statt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (n=2).

In diesen Experimenten konnte keine Einschränkung der Proliferation nach Zugabe von Canavanin beobachtet werden. Die Kurven, welche die Verdünnung des Fluoreszenz-Farbstoffs CFSE nach Zellteilung darstellen, zeigen zu den Zeitpunkten von einem, zwei und vier Tagen mit und ohne Canavanin-Zugabe einen nahezu identischen Verlauf. Dieses Experiment bestätigt also, wie in der Mehrzahl der

Zelllinien gezeigt, dass Canavanin unter Arginin-suffizienten Bedingungen keine Hemmung der Proliferation bewirkt.

5.1.2 Effekt von Canavanin unter Argininmangel

Bei Behandlung der Zellen unter Bedingungen, in denen die Zellen entweder wenig (20 μM) oder kein Arginin im Zellkulturmedium zur Verfügung hatten, zeigt sich in allen Zelllinien, dass bereits die alleinige Arginindepletion zu einer signifikanten Einschränkung der Proliferation führt (Abb. 3A-G). Dabei ist kein signifikanter Unterschied der Proliferations-Inhibition bei 20 μM gegenüber 0 μM Arginin detektierbar. Wird nun Canavanin unter Argininmangelbedingungen zugefügt, geht die Messung der OD gegen 0. Das bedeutet, dass nahezu keine Proliferation unter Behandlung der Zelllinien mit Canavanin unter Argininmangel besteht. Dies konnte in allen Zelllinien statistisch signifikant gezeigt werden (Abb. 1A-G).

Als Beispiel lässt sich hier die Zelllinie NCI-H929 nennen. Ohne Arginin und ohne Zugabe von Canavanin beträgt die OD 0,068, nach Zugabe von Canavanin 0,004. Es ergibt sich ein p-Wert von 0,0008 (hoch signifikant) (Abb. 3A).

5.1.3 ASS1-Status

In einem Teil des Harnstoffzyklus sowie in vielen physiologischen Zellen wird Arginin aus Citrullin über den Zwischenschritt Argininosuccinat synthetisiert. Für diese Reaktion werden zwei Enzyme benötigt: die induzierbare oder bereits konstitutiv exprimierte Argininosuccinatsynthase 1 (ASS1) und die konstitutiv exprimierte Argininosuccinatlyase (ASL).

Bei therapeutischer Arginindepletion ist es wünschenswert, dass die Tumorzellen keine ASS1 exprimieren, so dass die Zellen nicht aus dem im Tumor-Mikromilieu physiologisch vorhandenen bzw. beim Einsatz des Arginin-depletierenden Enzyms ADI-PEG de novo in hoher Konzentration entstehenden Citrullin intrazellulär Arginin selbst synthetisieren können. Bei ASS1-positiven Tumorzellen besteht durch die endogene Argininsynthese ein protektiver Effekt gegenüber einer Behandlung mit Canavanin. Physiologische Körperzellen dagegen exprimieren in der Regel ASS1 und sollten so durch die in der Therapie induzierte Arginindepletion nicht beeinflusst werden, ebensowenig durch die Zugabe von Canavanin.

Um zu untersuchen, ob die in den Versuchen verwendeten Zelllinien Arginin- auxotroph sind, wurde die Proteinexpression von ASS1 mittels SDS-Page und

Western Blots analysiert. Zunächst wurden die Zelllinien unter Argininsuffizienz kultiviert und anschließend lysiert. Als Positivkontrolle diente die ASS1 exprimierende Zelllinie A431. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, exprimiert die Linie RPMI-8226 deutlich ASS1. Die Zelllinie U266 hingegen exprimiert das Enzym ASS1 überhaupt nicht. Die Linie NCI-H929 exprimiert ASS1 nur in mittlerer Expressionsstärke, während Ramos, OPM-2 und LP-1 das Protein ASS1 jeweils nur gering exprimieren.

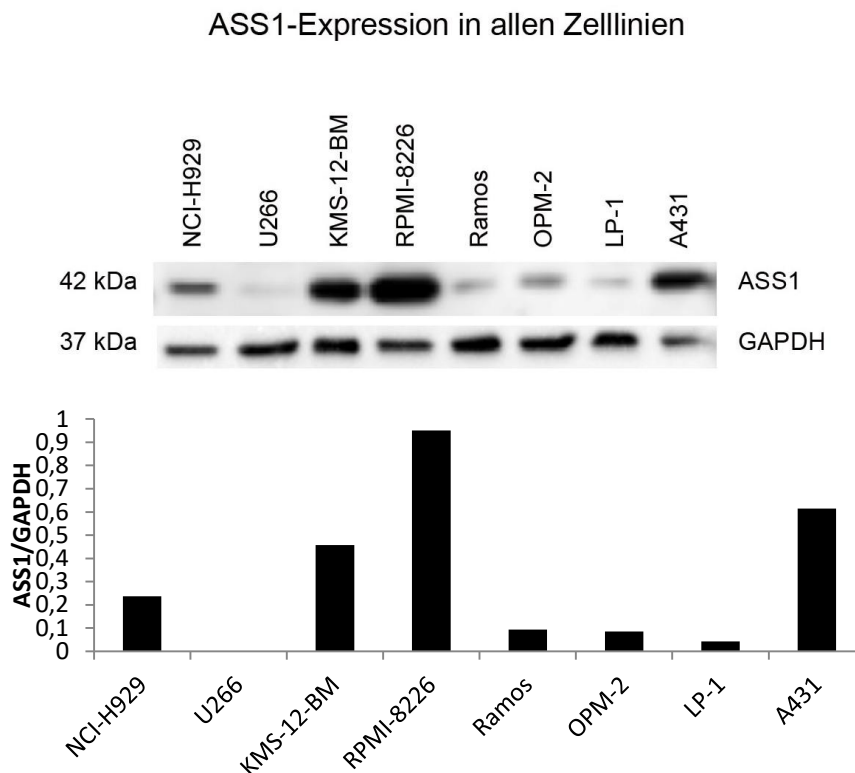


Abb. 5: Analyse der ASS1-Expression in verschiedenen Myelom-Zelllinien bzw. einer Burkittlymphom Zell-Linie unter Arginsuffizienz. Verschiedene Zelllinien wurden in RPMI-Medium kultiviert. Nach Lyse der Zellen wurden die Lysate nach SDS-PAGE im Western Blot mit einem ASS1-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle wurde die Expression von GAPDH bestimmt. Als zelluläre Positivkontrolle dient die ASS1 exprimierende Zelllinie A431. Die graphische Darstellung zeigt das Verhältnis der optischen Dichten (gemessen im Densitometer) der Banden von ASS1 bezogen auf die der jeweiligen Ladekontrollen. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot mit der zugehörigen Auswertung (n=2).

In einer weiteren Arbeit der Arbeitsgruppe wurde der Effekt von Arginindepletion auf die ASS1-Expression und die mögliche Induktion der ASS1 unter Argininmangel untersucht (80).

5.1.4 Zugabe von Citrullin

Der ASS1-Status der Tumorzelllinien wurde mittels Western Blot ermittelt (s. Abschnitt 5.1.3). Verfügt eine Zelle über ein aktives Enzym ASS1, kann sie aus

angebotenen Citrullin selbst Arginin herstellen, sollte extrazellulär nicht genügend Arginin zur Verfügung stehen.

Die Zelllinie RPMI-8226 exprimiert konstitutiv ASS1 sehr stark (Abb. 5). Dies führt funktionell dazu, dass bei Zugabe von 1 mM Citrullin unter Argininmangel die Zellen Arginin aus Citrullin synthetisieren und verstärkt (im Vergleich zur Arginindepletion ohne Citrullin-Zugabe) proliferieren können (Abb. 3C). Unter Argininmangelbedingung beträgt die im MTS Assay gemessene OD in der Zelllinie RPMI-8226 $0,214 \pm 0,027$, durch Zugabe von Citrullin $0,382 \pm 0,039$ ($p = 0,005$).

Die Zellen werden ferner bei Citrullinzugabe vollkommen resistent gegenüber einer gleichzeitigen Canavaninapplikation bei Argininmangel: die Proliferation ist nicht mehr eingeschränkt (Abb. 3C).

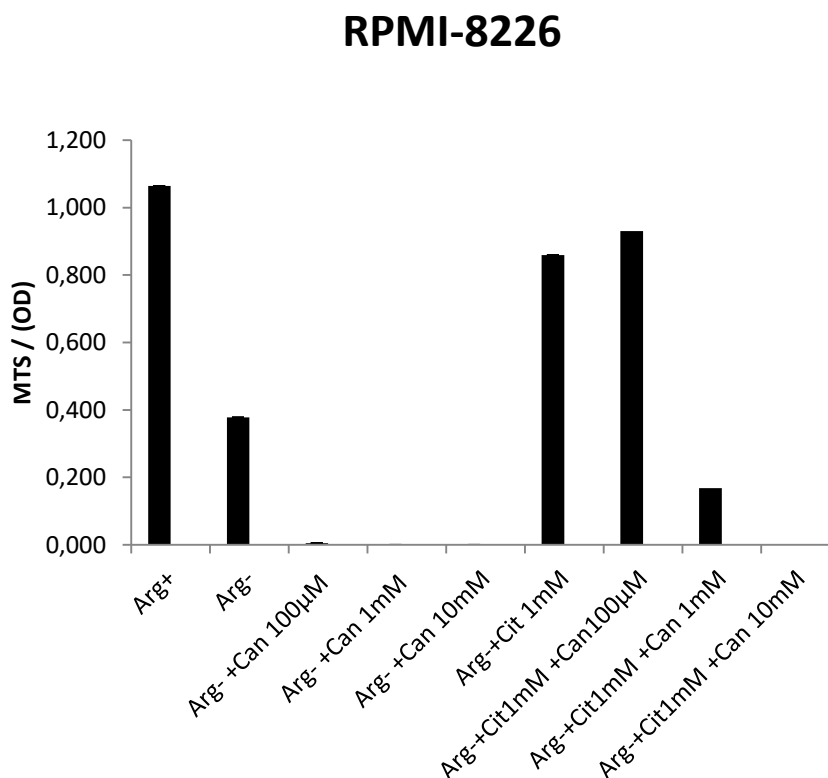


Abb. 6: Proliferation der ASS1-exprimierenden Myelom-Zelllinie RPMI-8226 nach Zugabe von verschiedenen Canavaninkonzentrationen mit und ohne Citrullin. Zellen der Linie RPMI-8226 wurden für 24 h in Arginin-haltigem (Arg+, 1 mM) bzw. in Arginin-freiem (Arg-) Zellkulturmedium, jeweils mit oder ohne Citrullin-Zugabe (Cit; 1mM) kultiviert. Canavanin wurde, wie angegeben, in den Konzentrationen 100 µM, 1 mM oder 10 mM hinzugefügt. Das Experiment wurde einmalig durchgeführt mit jeweils als Tripletts angesetzten unterschiedlichen Bedingungen

Bei dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob durch die höheren Canavanin-Konzentrationen (1 mM und 10 mM) kompetitiv mehr Canavanin für die Proteinbiosynthese zur Verfügung steht als das endogen aus Citrullin synthetisierte

Arginin (Abb. 6). Da Canavanin aber in höheren Konzentrationen auf Zellen toxisch wirkt, wurde die Viabilität der Zellen unter den gleichen Bedingungen wie im MTS-Assay mittels Annexin-PI-FACS gemessen (Abb. 7). Hier ist zu beobachten, dass die Dosen von 1 mM und 10 mM Canavanin einen starken toxischen Effekt auf die Zellen haben, es sind mit oder ohne Citrullin keine viablen Zellen mehr messbar. Die Daten sind vereinbar mit der Hypothese, dass durch die Zugabe von 1 mM Citrullin die ASS1 nicht genügend Arginin herstellt, um dem Canavanin-Überschuss entgegen zu wirken. Canavanin würde so kompetitiv vermehrt statt Arginin in die neu synthetisierten Proteine eingebaut, so dass dies die Zytotoxizität und entsprechend auch die Hemmung der Proliferation bewirkt. Der protektive Effekt von Citrullin wird aufgehoben. Eine interessante Ergänzung des Experiments wäre, die Citrullindosis bei fixierter Canavanindosis zu erhöhen.

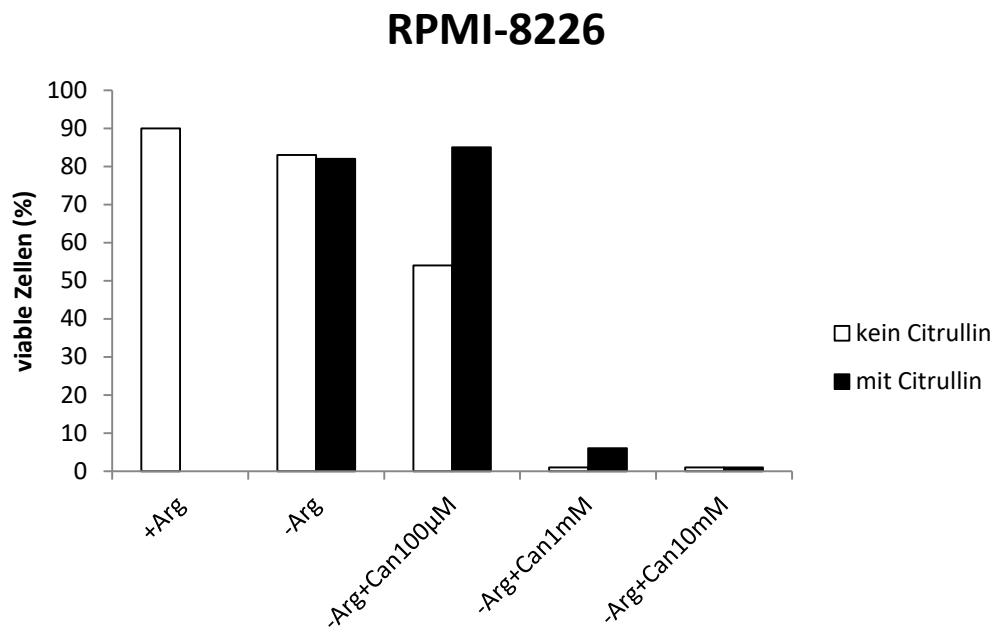


Abb. 7: Viabilität der RPMI-8226 Zellen unter Arginindepletion und Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Canavanin mit und ohne Citrullin Zellen der Linie RPMI-8226 wurden für 24 h in Arginin-haltigem (Arg+, 1 mM) bzw. in Arginin-freiem (Arg-) Zellkulturmedium, jeweils mit oder ohne Citrullin-Zugabe (Cit; 1mM) kultiviert. Canavanin wurde, wie angegeben, in den Konzentrationen 100 µM, 1 mM oder 10 mM hinzugefügt. Die Zellen wurden mittels Annexin-PI-FACS analysiert. Dargestellt sind die viablen Zellen in %. Das Experiment wurde einmalig durchgeführt.

Wird bei der Kultivierung der Zelllinie KMS-12-BM Arginin im Zellkulturmedium depletiert, kommt es zu einer Induktion von ASS1 in den Zellen (siehe Promotionsarbeit Dr. B. Jacobi (80)). Diese Induktion lässt sich funktionell im MTS-Assay bestätigen. Nach Zugabe von Citrullin lässt sich eine signifikante Zunahme der Proliferation messen (Abb. 3E). Auch hier wird vermutlich durch die ASS1/ASL-

vermittelte Synthese von intrazellulärem Arginin der proliferationshemmende Effekt von Canavanin verhindert.

Die Zelllinie NCI-H929 zeigt nur eine moderate ASS1 Protein-Expression (Abb.5). Es kommt bei Zugabe von Citrullin im Proliferationstest nicht zu einer Zunahme der Proliferation unter Argininmangel (Abb. 3A). Unklar bleibt, ob die mäßige ASS1 Expression funktionell nicht ausreicht für eine suffiziente, vom Citrullin ausgehende Argininversorgung. Alternativ könnte dieser Phänotyp dadurch erklärt werden, dass für die Argininsynthese aus Citrullin nicht nur das Enzym ASS1 notwendig ist, sondern auch ASL. Die Expression dieses Enzyms wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt.

Alle anderen Zelllinien exprimieren ASS1 konstitutiv und bei Argininmangel nicht (U266) oder nur in geringer Stärke (OPM-2, LP-1, Ramos). Die Zugabe von Citrullin führt entsprechend nicht dazu, dass die Zellen stärker proliferieren als unter Argininmangelbedingungen. Der proliferationshemmende Effekt von Canavanin lässt sich auch bei Citrullinzugabe weiterhin beobachten (Abb. 3A,B,D,F,G).

5.2 Viabilität

Um den Einfluss von Argininmangel und Canavanin auf die Viabilität zu bestimmen, wurden die Zellen mit Annexin V und Propidium-Iodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen, die in Apoptose übergehen, stellen sich als Annexin V positiv, PI negativ dar. Zellen, die bereits nicht mehr viabel sind, stellen sich als Annexin und PI positiv dar.

5.2.1 Synergistische Induktion von Zelltod durch Arginindepletion und Canavanin

Die Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden für 24 h, 48 h, 72 h und zum Teil 96 h simultan mit und ohne Arginin sowie mit und ohne Zugabe von 100 μ M Canavanin kultiviert.

Abb. 8 stellt die Viabilität der Zelllinie U266 dar. Ist genügend Arginin (1 mM) vorhanden und wird Canavanin in einer Konzentration von 100 μ M zugefügt, hat dies keinen Einfluss auf die Viabilität.

Wird allerdings Arginin depletiert, sinkt der Anteil der viablen Zellen. Bei Zugabe von Canavanin zu Arginin-depletierten Zellen, sind nach 48 h praktisch keine viablen

Zellen mehr nachweisbar. In den folgenden Auswertungen wurden alle Annexin-positiven Zellen zusammengefasst. In den durchflusszytometrischen Analysen war der Anteil der apoptotischen (Annexin V positiven), noch viablen (PI-negativen) Zellen vernachlässigbar klein (immer < 5% bei der Zelllinie U266).

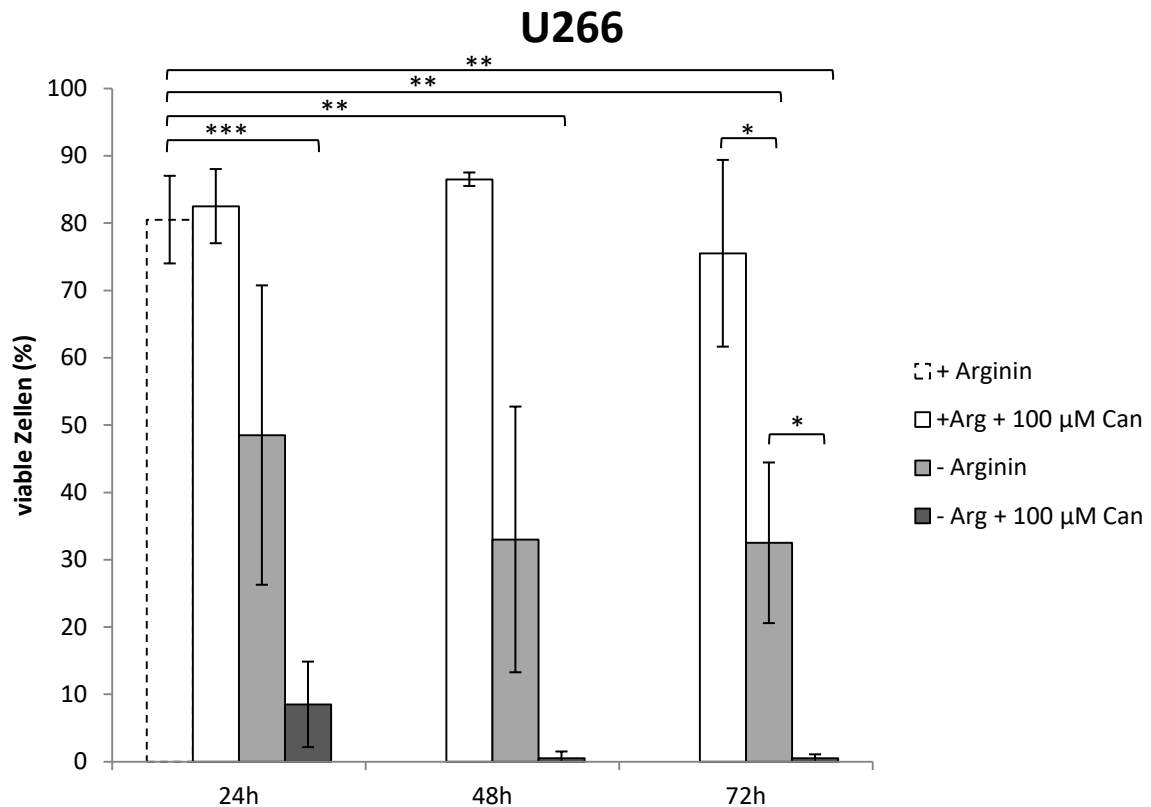


Abb. 8: Synergistische Hemmung der Tumorzell-Viabilität durch Arginindepletion und Canavaninapplikation. Zellen der U266 Myelom-Linie wurden für 24, 48 und 72 h in Arginin-haltigem (Arg+, 1 mM) bzw. in Arginin-freiem (Arg-) Zellkulturmedium kultiviert sowie mit und ohne Zugabe von Canavanin (finale Konzentration 100 µM). Die Zellen wurden mittels Annexin-PI-FACS analysiert. Erfasst wurden die viablen Zellen in %. Die Grafik stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar.

Der Versuch wurde ebenso mit der Zelllinie NCI-H929 durchgeführt (Abb. 9). Auch hier ist zu erkennen, dass Canavanin keinen Einfluss auf die Viabilität hat, wenn genügend Arginin zur Verfügung steht. Die Arginindepletion alleine hat wiederum einen Effekt auf die Viabilität, dieser Effekt ist allerdings nicht so deutlich und später auftretend im Vergleich zur Linie U266. Wird Canavanin bei Argininmangel zu den Zellen zugefügt, zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Viabilität, ebenfalls auf nahezu 0%.

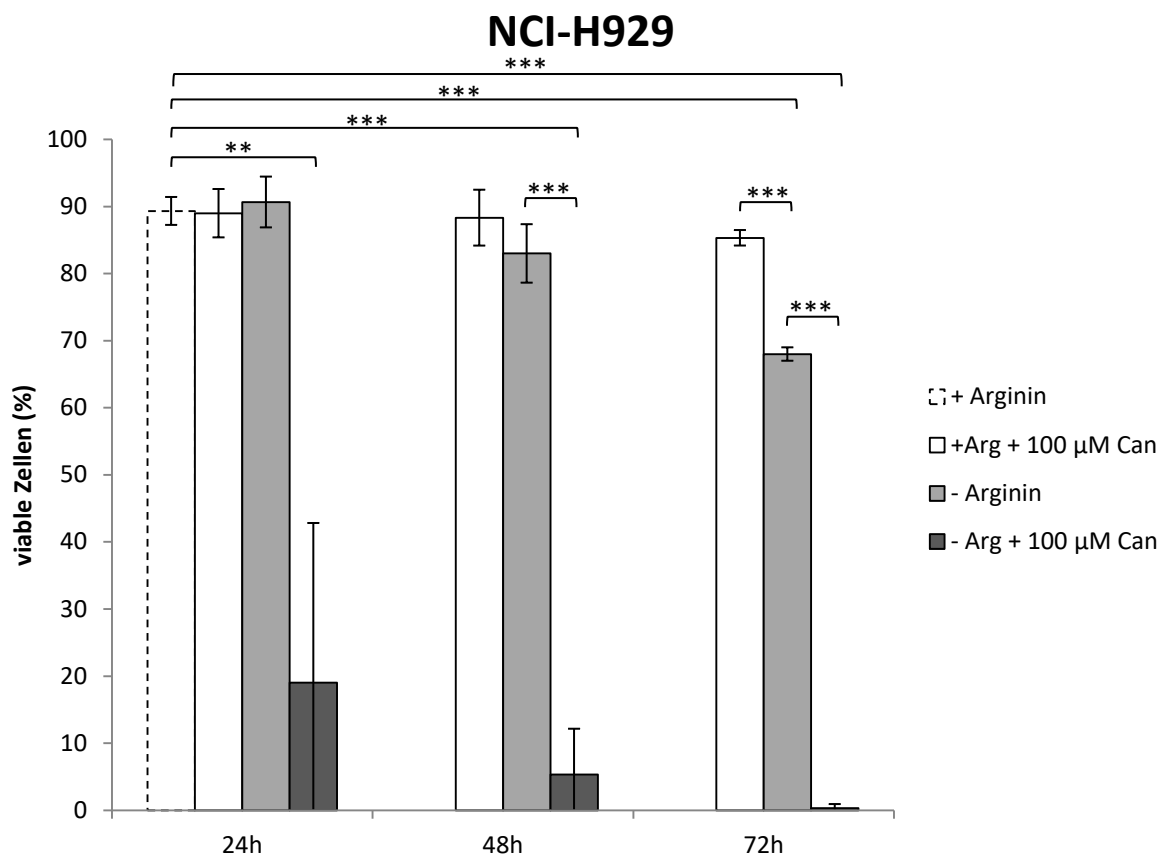


Abb. 9: Synergistische Hemmung der Tumorzell-Viabilität durch Arginindepletion und Canavaninapplikation. Zellen der NCI-H929 Myelom-Linie wurden für 24, 48 und 72 h in Arginin-haltigem (Arg+, 1 mM) bzw. in Arginin-freiem (Arg-) Zellkulturmedium kultiviert sowie mit und ohne Zugabe von Canavanin (finale Konzentration 100 µM). Die Zellen wurden mittels Annexin-PI-FACS analysiert. Erfasst wurden die viablen Zellen in %. Die Grafik stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar.

Die Viabilität wurde auch in allen anderen vorhandenen Zelllinien getestet. Hier wurde auch der Wert nach 96 h bestimmt.

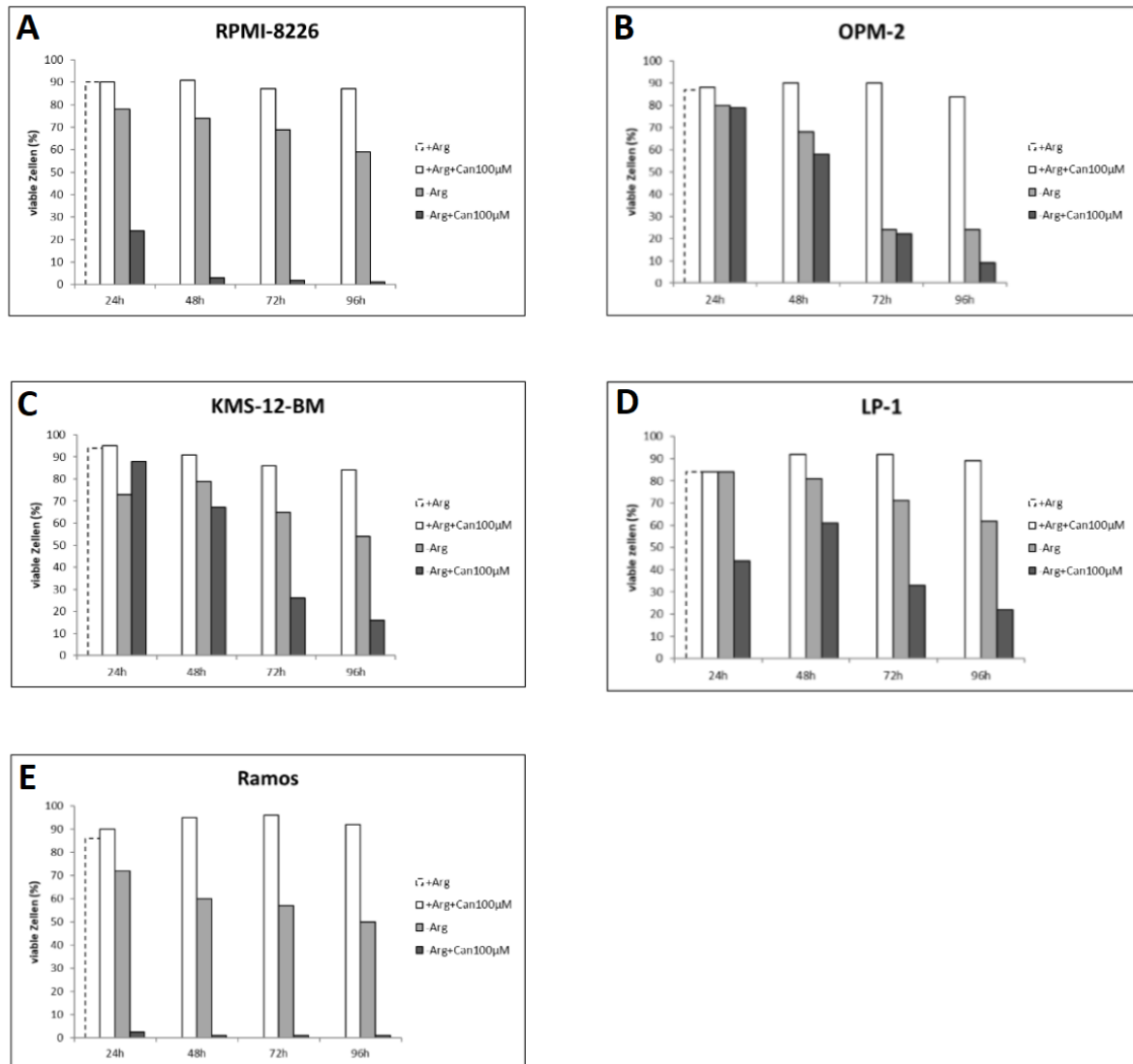


Abb. 10: Synergistische Hemmung der Tumorzell-Viabilität durch Arginindepletion und Canavaninapplikation. Die Zellen wurden für 24, 48, 72 und 96 h in Arginin-haltigem (Arg+, 1 mM) bzw. in Arginin-freiem (Arg-) Zellkulturmedium kultiviert sowie mit und ohne Zugabe von Canavanin (finale Konzentration 100 µM). Die Zellen wurden mittels Annexin-PI-FACS analysiert. Erfasst wurden die viablen Zellen in %. Das Experiment wurde einmalig durchgeführt (n=1). A: RPMI-8226, B: OPM-2, C: KMS-12-BM, D: LP-1, E: Ramos

Insgesamt zeigt sich in allen Zelllinien (Abb. 10A-E), dass Canavanin in Anwesenheit von Arginin keinen negativen Effekt auf die Viabilität hat. In allen Zelllinien lassen sich allerdings die synergistischen Effekte von Arginindepletion in Kombination mit Canavanin hinsichtlich der Induktion von Zelltod erkennen. Wird Arginin depletiert, hat dies einen erkennbaren Effekt auf die Viabilität. Bei zusätzlicher Zugabe von Canavanin führt dies bei einem Großteil der Zellen zum Zelltod. Hierbei ist zu beobachten, dass der Effekt von Canavanin früher und deutlicher eintritt, wenn es sich um eine in Kultur schnell teilende Zelllinie handelt wie U266 oder Ramos.

Dagegen ist der Effekt in sich langsam teilenden Linien (KMS-12-BM, LP-1) etwas schwächer bzw. zeitverzögert ausgeprägt (siehe Abschnitt 3.8.1, Verdopplungszeiten Zelllinien).

5.2.2 ADI-PEG-Behandlung

Eine Substanz zur Depletion von Arginin in vivo ist das Enzym ADI-PEG 20. Diese sich in klinischer Entwicklung befindliche Substanz kann systemisch in Tiermodellen und im Menschen Arginin depletieren. ADI-PEG 20 ist auch in der AG Munder Teil der weiterführenden Experimente in Mausmodellen in vivo zur Entwicklung von Canavanin als neues Co-Therapeutikum. Zur Bestimmung derjenigen Konzentration von ADI-PEG 20, welche in der Myelomlinie U266 durch suffiziente Arginindepletion funktionelle Effekte erzielt, wurde mittels durchflusszytometrischer Testung der zellulären Viabilität (Annexin V-PI) eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht. Es wurden Konzentrationen von 25-100 ng/ml ADI-PEG 20 getestet. Die U266-Zellen wurden für 72 h in Zellkulturmedien mit den angegebenen ADI-PEG 20-Konzentrationen kultiviert, als Referenz dienten für 72 h in Arginin-freiem Medium kultivierte Zellen. Ein Rückgang des Anteils viabler Zellen lässt sich bei ADI-PEG 20-Konzentrationen ≥ 75 ng/ml beobachten. Der Effekt ist allerdings nicht ganz so stark wie die Arginindepletion (Abb. 11). Die Zellen wurden nach den ersten 72 h für weitere 12 h mit und ohne Canavanin behandelt. Diese sequentielle Behandlung der Zellen erfolgte, um zunächst eine ausreichende arginindepletierende Wirkung durch ADI-PEG 20 zu erzielen, um anschließend die kompetitive Wirkung von Canavanin versus residuellem Arginin untersuchen zu können. Hierbei ist ein klarer dosisabhängiger Effekt hinsichtlich der erzielten Viabilitäts-Reduktion und ab einer ADI-PEG-Konzentration ≥ 75 ng/ml eine komplette Hemmung der Viabilität wie bei Arginin-freiem Medium und Canavanin-Applikation zu beobachten (Abb. 11).

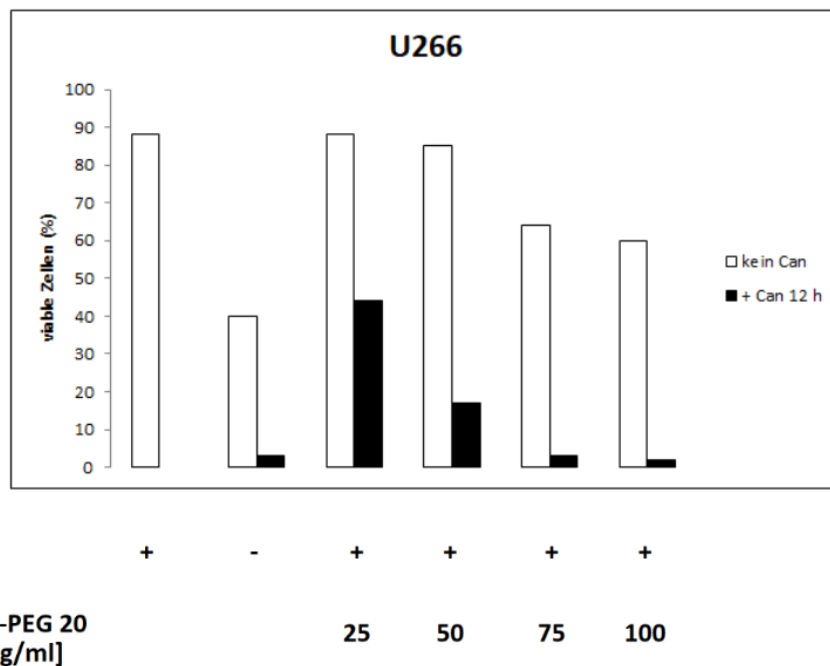


Abb. 11: Viabilität nach Behandlung mit ADI-PEG 20 mit und ohne Canavanin. Die Zellen (U266) wurden für 72 h in Zellkulturmedien (1 mM Arginin) mit Zugabe von ADI-PEG 20 in den angegebenen Konzentrationen (25-100 ng/ml) kultiviert. Als Referenz wurden die Zellen für 72 h in Arginin-freiem Medium kultiviert. Für weitere 12 h wurden die Zellen mit und ohne Canavanin (100 μ M) behandelt. Die mit Annexin V und PI gefärbten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die viablen Zellen in %.

5.2.3 Sequentielle Arginindepletion und Canavaninzugabe: Viabilitätstestung

Um den Effekt von Canavanin bei Argininmangel, der sich in Proliferations- und Viabilitäts-Assays gezeigt hatte, kausal näher zu untersuchen, sollten in der Folge mögliche biochemische Signalwege untersucht werden. Hierbei wurden Zellen der Myelom-Linie U266 ausgewählt, da sie Arginin-unabhängig keine ASS1 exprimieren (siehe Abschnitt 4.1.3). Es musste ferner bedacht werden, dass Endpunktbestimmungen biochemischer Prozesse zu den bisherigen Zeitpunkten (bei fast 100% Zelltod) nicht sinnvoll sein würden bzw. die dem Zelltod möglicherweise zugrunde liegenden biochemischen Prozesse zeitlich vor Einsetzen des Viabilitätsverlustes untersucht werden mussten.

Um genügend viable Zellen für diese Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen sequentiell behandelt. Zunächst wurden die Zellen in Arginin-freiem Zellkulturmedium für 24 h bzw. 48 h kultiviert, anschließend wurde für weitere 3 h bzw. 6 h Canavanin zugefügt. Zunächst wurde der Anteil viabler Zellen für

weitergehende biochemische Analysen durchflusszytometrisch mittels Annexin V-PI-Messungen untersucht.

Das Experiment (Abb. 12) zeigt, dass nach dieser sequentiellen Behandlung sowohl nach 3 h als auch nach 6 h Canavanin-Applikation noch mindestens die Hälfte der Zellen viabel sind, was als ausreichend für die nachfolgend geplanten biochemischen Analysen erachtet wurde.

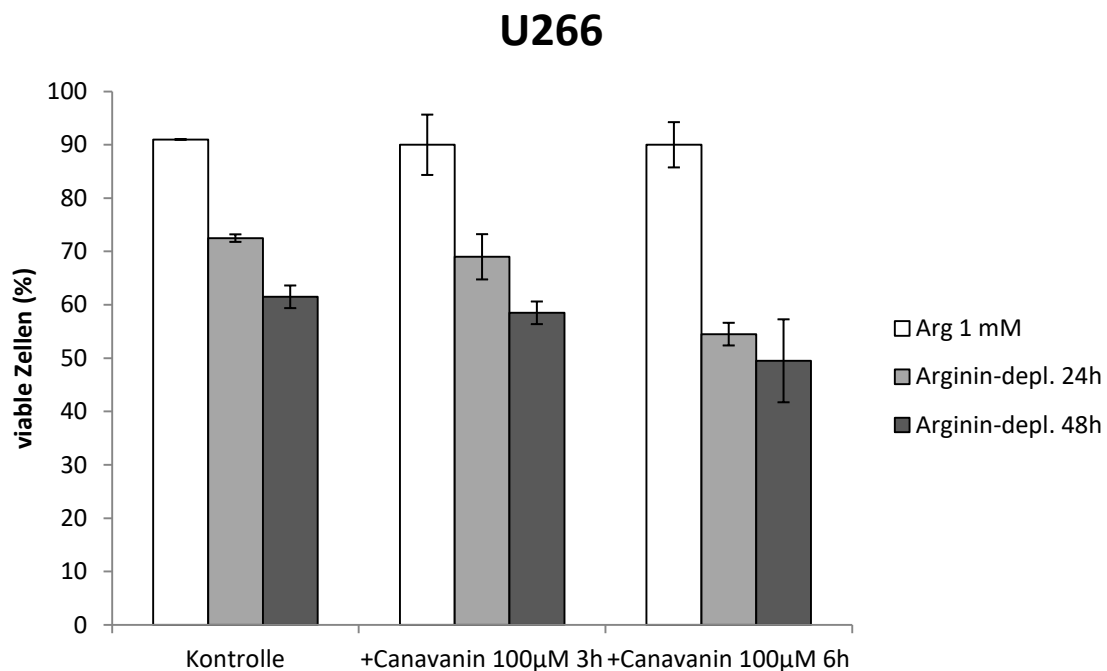


Abb. 12: Viabilität von U266 Myelomzellen nach sequentieller Arginindepletion und zeitlich limitierter Canavaninzugabe. Die Zellen (U266) wurden für 24 h oder 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Für weitere 3 h oder 6 h wurde Canavanin (finale Konzentration: 100 µM) zugefügt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der viablen Zellen am Ende der jeweiligen Inkubationen. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig durchgeführten Einfachmessungen.

5.3 Unfolded Protein Response

Wie in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschrieben, führt die Kombination von Arginindepletion und Canavaninsupplementation in hohem Maße zu einer Einschränkung der Proliferation sowie zu fast vollständigem Zelltod.

Kommt es in Zellen durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine zu ER-Stress (siehe Abschnitt 2.4), wird die sogenannte Unfolded Protein Response (UPR) aktiviert. Hierbei werden im wesentlichen drei intrazelluläre UPR Signalkaskaden aktiviert, nämlich IRE1, PERK und ATF6. Das führt zur Transkription von Genen, die für ER-Chaperone, Oxidoreduktasen und ERAD-Komponenten codieren, während

gleichzeitig die Proteintranslation fast global gehemmt wird. Dadurch kann die Kapazität des ER zur Faltung von Proteinen verbessert werden und bereits akkumulierte ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine können reduziert werden. Kommt es allerdings zu anhaltendem ER-Stress, ist die Zelle nicht mehr in der Lage, die un- bzw. fehlgefalteten Proteine abzubauen und die terminale UPR, welche Apoptose induziert, wird aktiviert (81). Um zu untersuchen, ob es bei Kombination von Arginindepletion und Canavaninsupplementation zu einer Induktion von UPR-Signalkaskaden kommt, wurde das Splicing von Xbp1 sowie die Phosphorylierung von eIF2 α untersucht. Tunicamycin, ein pharmakologisches Agens, welches ER-Stress induziert, wurde als Positivkontrolle genutzt (siehe Abschnitt 2.4.4).

5.3.1 Splicing von Xbp1

Das Splicing von Xbp1 wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen (U266) wurden unter Arginin-suffizienten Bedingungen (1 mM Arginin) und für 24 h bzw. 48 h unter Arginin-freien Bedingungen kultiviert und anschließend für 3 h bzw. 6 h mit Canavanin (100 μ M) behandelt. Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert, um anschließend die Färbung von spezifischen intracytoplasmatischen und intranukleären Proteinen, in diesem Fall Xbp1s, zu ermöglichen. Tunicamycin diente als Positivkontrolle.

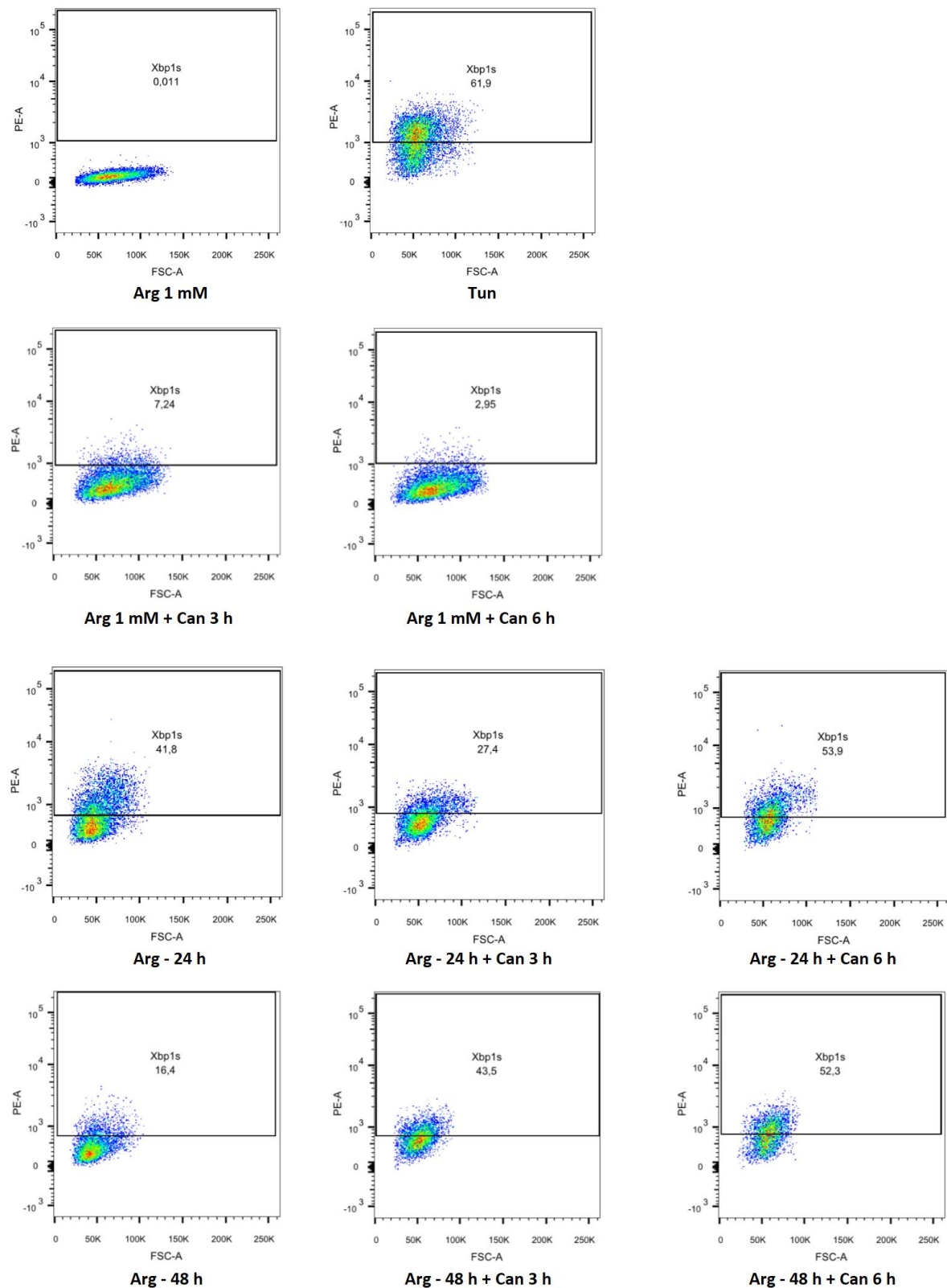


Abb. 13: Vermehrtes Splicing von Xbp1 nach Arginindepletion und Canavanin-Applikation: durchflusszytometrische Bestimmung. Die Zellen (U266) wurden unter Arginin-suffizienten Bedingungen (1 mM Arg) und für 24 h bzw. 48 h unter Arginin-freien Bedingungen kultiviert (Arg- 24 h, Arg- 48 h) und anschließend für 3 h bzw. 6 h mit Canavanin (Can 3 h, Can 6 h, finale Konzentration 100 μ M) behandelt. Als Positivkontrolle diente die Behandlung der Zellen in Arginin-haltigem Medium mit dem ER Stress-Induktor Tunicamycin (Tun, 18 h; 3 μ g/ml). Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Diese wurden mit

dem Antikörper für Xbp1s intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. x-Achse: FSC, y-Achse: Xbp1s-PE Dargestellt ist der Anteil des gefärbten Xbp1s in % im Vergleich zur jeweils gefärbten Isotypkontrolle, welche zum Setzen des Gates diente.

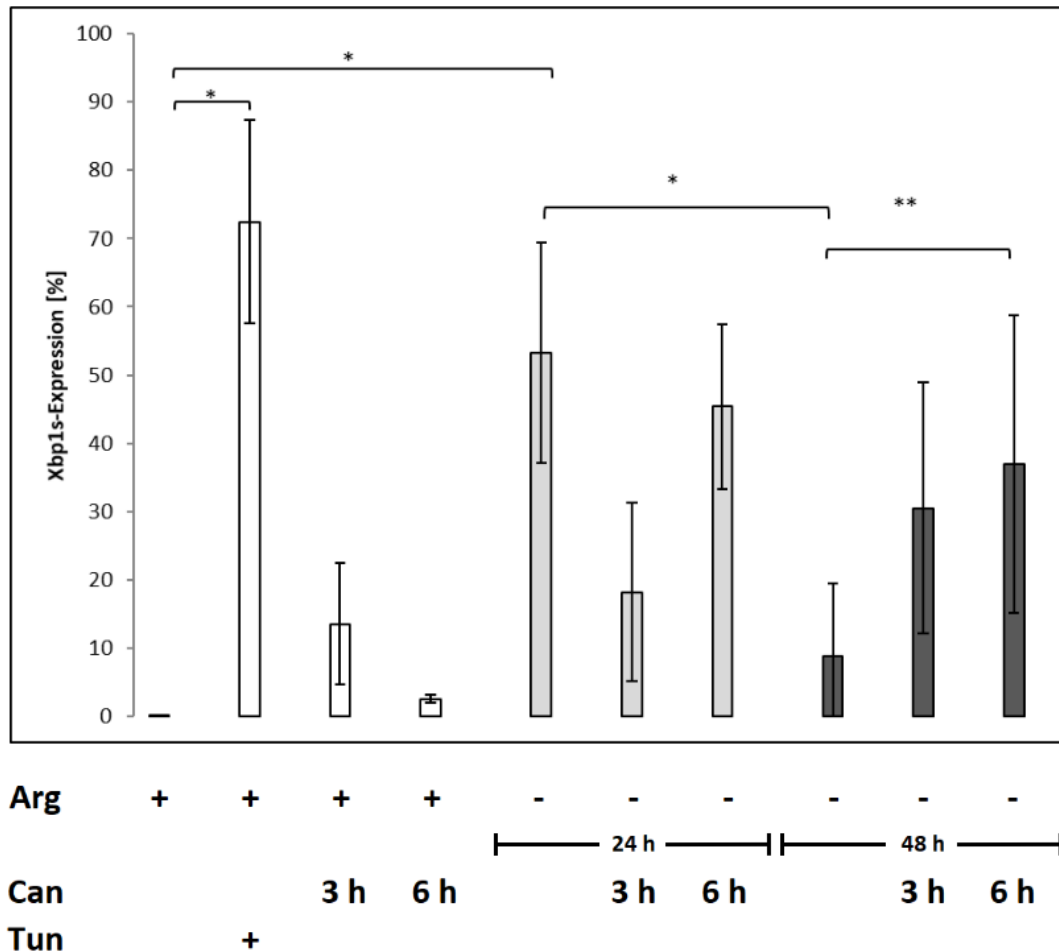


Abb. 14: Vermehrtes Splicing von Xbp1 nach Arginindepletion und Canavanin-Applikation: Quantitative Auswertung. Die Zellen (U266) wurden unter Arginin-suffizienten Bedingungen (1 mM Arg) und für 24 h bzw. 48 h unter Arginin-freien Bedingungen kultiviert und anschließend für 3 h bzw. 6 h mit Canavanin (100 μ M) behandelt. Als Positivkontrolle diente die Behandlung der Zellen in Arginin-haltigem Medium mit dem ER Stress-Induktor Tunicamycin (18 h; 3 μ g/ml). Gemessen wurde die Xbp1s-Expression in % aller Zellen in der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Durch die Behandlung der Zellen mit dem als Positivkontrolle zur Induktion von ER-Stress eingesetzten Tunicamycin kommt es zu einem deutlich vermehrten Splicing von Xbp1. Werden die Zellen für 24 h unter Argininmangel gesetzt, kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der intrazellulären Xbp1s Expression (Abb. 14). Nach einer Arginindepletion von 48 h ist allerdings ein Rückgang der Xbp1s

Expression im Vergleich zum 24 h Zeitpunkt zu beobachten, dieser stellte sich als signifikant dar. Durch Zugabe von Canavanin für 3 h bzw. 6 h nach 24 h persistiert die Xbp1s Expression, es kommt nicht zu einem statistisch signifikanten Rückgang. Bei Zugabe von Canavanin nach 48 h Argininmangel ist eine statistisch signifikante Zunahme der Xbp1s Expression im Verlauf der kurzzeitigen Canavaninzugabe feststellbar. Wird Canavanin zu U266 Zellen zugefügt, die genügend Arginin zur Verfügung haben, hat dies keinen signifikanten Einfluss auf die Xbp1s-Expression (Abb. 13, 14).

5.3.2 Phosphorylierung von eIF2 α

Die Phosphorylierung von eIF2 α in der Zelllinie U266 wurde im Western Blot mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente die der Nachweis von eIF2 α unter Verwendung eines phosphorylierungsunabhängigen Antikörpers. Als Positivkontrolle für einer erfolgreiche ER-Stress Induktion und Phosphorylierung von eIF2 α diente der UPR-Induktor Tunicamycin. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium kultiviert und anschließend wurde für 3 h bzw. 6 h Canavanin (finale Konzentration 100 μ M) zugefügt.

Der Western Blot zeigt, dass es nach Arginindepletion von 48 h zu einer vermehrten Phosphorylierung von eIF2 α kommt. Bei Ko-Applikation von Canavanin ist zu keinem Zeitpunkt eine weitere Zunahme der eIF2 α Phosphorylierung zu beobachten (Abb. 15).

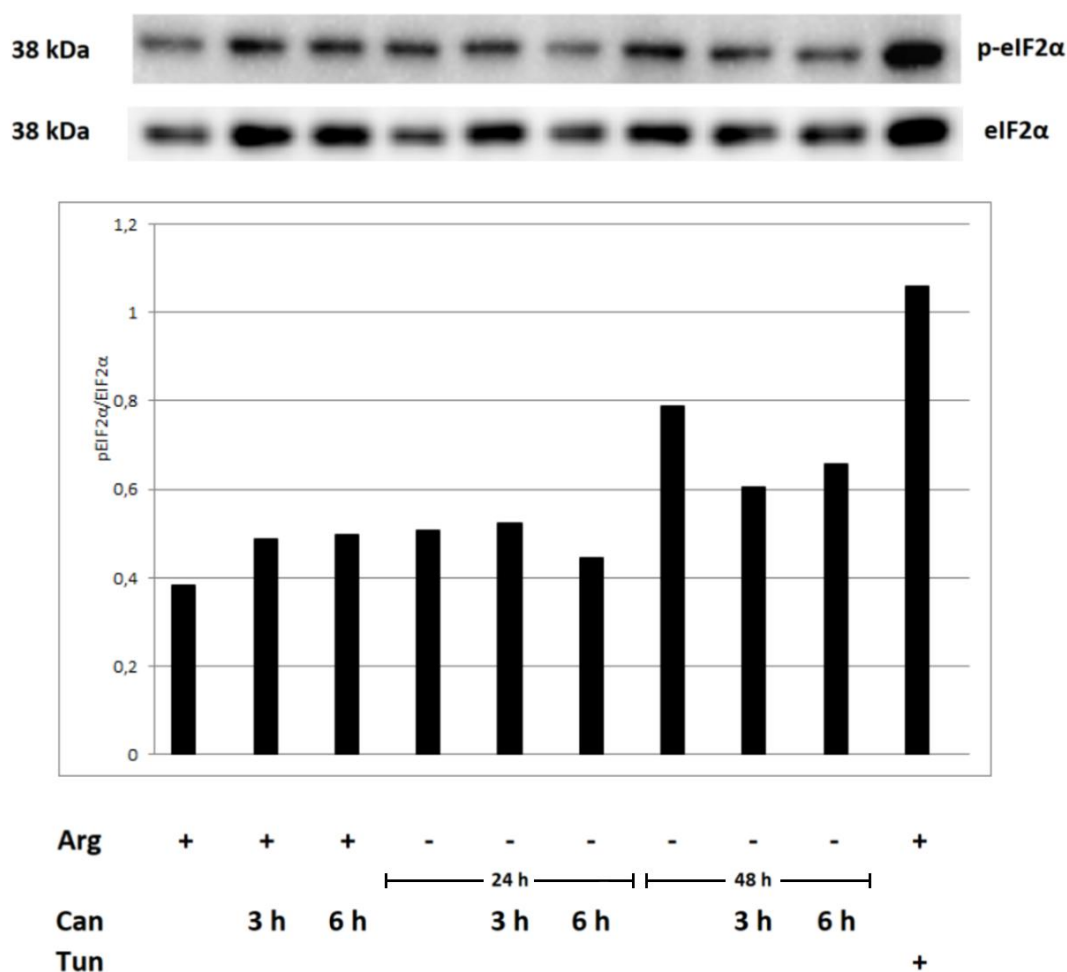


Abb. 15 Zunahme der Phosphorylierung von eIF2α nach Arginindepletion, kein verstärkender Einfluss durch Canavanin-Supplementation. U266 -Zellen wurden in Arginin-haltigem (1 mM) bzw. für 24 h oder 48h in Arginin-freiem (Arg -) Medium kultiviert. Den Zellen wurde für 3 h bzw. 6 h Canavanin (100 μM finale Konzentration) zugefügt. Als Positiv-Kontrolle diente Tunicamycin (3 μg/μl, 24 h Inkubation). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE wurde mittels Western Blot die Expression von phosphoryliertem eIF2α (p-eIF2α) analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Expression von eIF2α (phosphorylierungs-unabhängig) nachgewiesen. Die graphische Darstellung zeigt das Verhältnis der optischen Dichte (gemessen im Densitometer) der Banden von p-eIF2α zu eIF2α.

5.4 Caspase 3

Caspase 3 ist ein wichtiges Effektormolekül der Enzymkaskade der Apoptose. Die Aktivierung von Caspase 3 beruht auf der proteolytischen Spaltung der inaktiven Enzymvorstufe in aktivierte p17 und p12 Fragmente (= Cleaved Caspase 3). Der hier benutzte Antikörper detektiert Caspase 3 in voller Länge sowie das größere gespaltene Caspase 3-Fragment (p17 bei 17 kDa).

Die Zellen (U266) wurden für 24 h bzw. 48 h in Zellkulturmedium mit und ohne Arginin kultiviert. Den Zellen wurden dann jeweils für 3 h und 6 h Canavanin (100 μ M finale Konzentration) zugefügt. Als Positivkontrolle für eine bekannte Induktion der Caspase 3 Aktivierung diente die Inkubation der Zellen mit dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib (finale Konzentration 10 nM, Inkubationszeit 6 h).

Der Versuch zeigt, dass es nach alleiniger Arginindepletion nicht zu einer verstärkten Spaltung der Caspase 3 kommt. Wird allerdings Canavanin für einen Zeitraum von 3 h zu den für 24 h oder 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium inkubierten Zellen zugefügt, ist eine vermehrte Spaltung (= Aktivierung) der Caspase zu beobachten. Behandelt man die Arginin-depletierten Zellen über einen längeren Zeitraum (6 h) mit Canavanin steigt die Menge der gespaltenen Caspase 3 weiter an (Abb. 16).

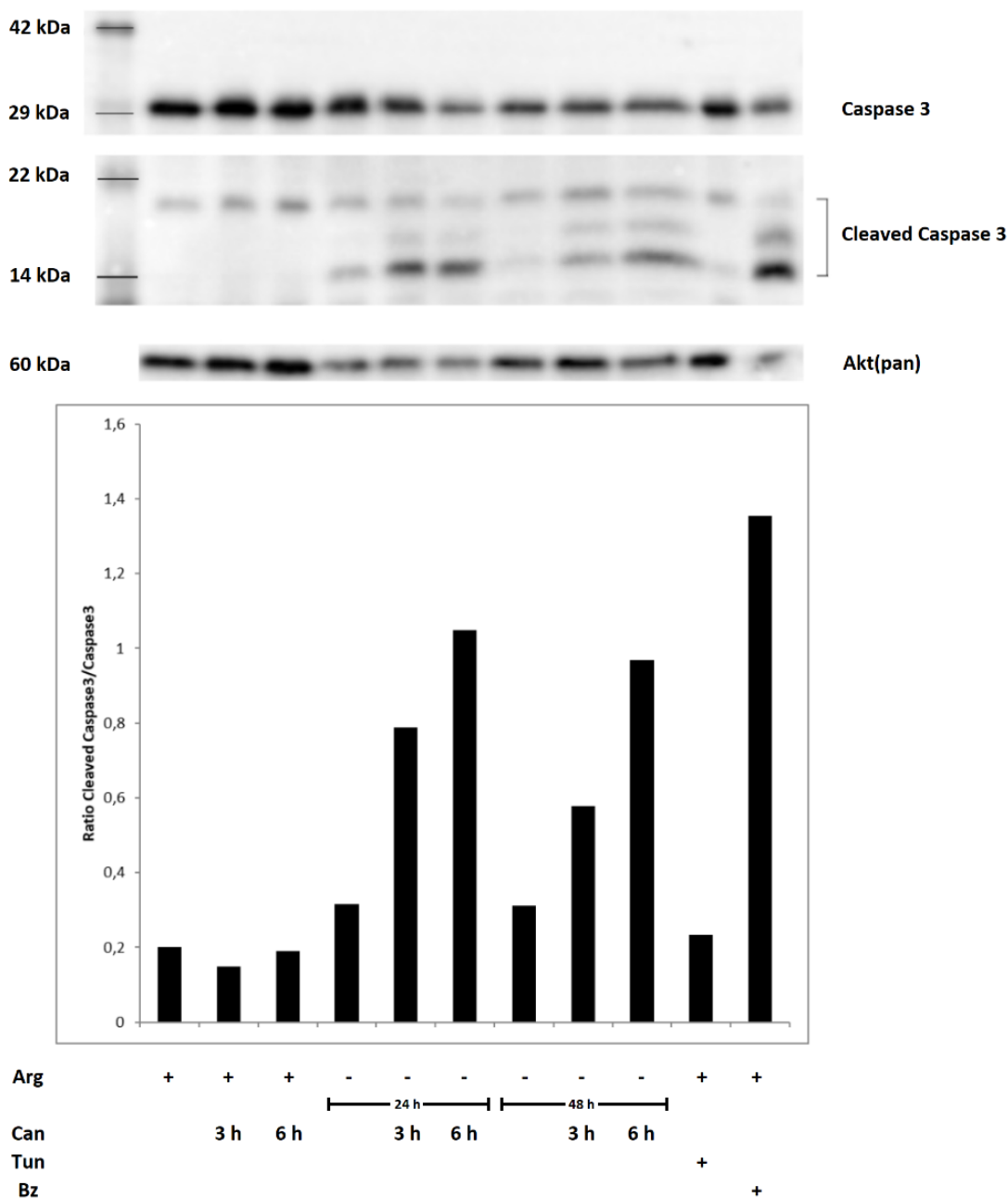


Abb. 16: Vermehrte Spaltung von Caspase 3 nach Arginindepletion und Canavanin-Applikation. U266-Zellen wurden für 24 h oder 48 h in Arginin-haltigem (1 mM) oder Arginin-freiem (Arg -) Zellkulturmedium kultiviert. Den jeweiligen Zellen wurden anschließend für 3 h und 6 h Canavanin (finale Konzentration 100 μ M) zugefügt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE wurde mittels Western Blot die Expression von Caspase 3 und cleaved Caspase 3 analysiert. Als Positiv-Kontrolle für eine Caspase 3 Spaltung (Cleaved Caspase 3) dient der Proteasomeninhibitor Bortezomib (finale Konzentration 10 nM für 6 h in 1 mM Arginin-haltigem Medium). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die graphische Darstellung zeigt die Ratio der ODs der summierten Banden der gespaltenen Caspase 3 zu den ODs der Banden von Caspase 3-Gesamtprotein.

5.5 Ubiquitin-Proteasomen-System

Durch Verknüpfung mit Ubiquitin werden Proteine für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Dieser Abbau ist Teil der Regulation von Zellstress und Apoptose. Der hier benutzte Antikörper detektiert Ubiquitin, Polyubiquitin und ubiquitinierte Proteine, insofern ist bei verstärkter genereller Protein-Ubiquitinierung eine verstärkte Signalintensität im Bereich des kompletten Molekulargewichtsspektrums im Western Blot nach Auftrennung zellulärer Proteine mittels SDS-PAGE zu erwarten.

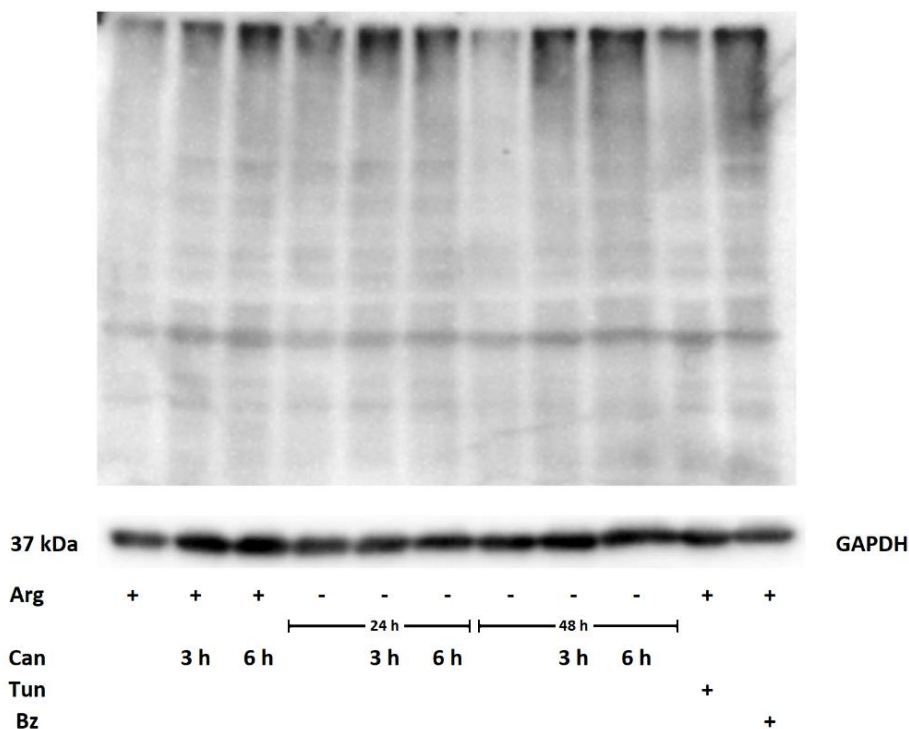


Abb. 17: Vermehrte Ubiquitinierung von Proteinen nach Kombination von Arginindepletion und Canavanin-Zugabe. U266 Zellen wurden für 24 h oder 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Den Zellen mit und ohne Arginin wurden für 3 h und 6h Canavanin zugefügt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE wurde mittels Western Blot die Protein-Ubiquitinierung analysiert. Als Positiv-Kontrolle dient der Proteasomeninhibitor Bortezomib (RPMI-Medium, finale Konzentration 10 nM, Inkubationszeit 6 h). Als Ladekontrolle dient GAPDH. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Zellen (U266) wurden für 24 h und 48 h in Arginin-haltigem oder Arginin-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Den Zellen wurden anschließend für 3 h und 6 h Canavanin (100 μ M finale Konzentration) zugefügt. Als Positivkontrolle diente Bortezomib (RPMI-Medium, finale Konzentration 10 nM, Inkubationszeit 6 h).

Im Vergleich zu Zellen, die in Arginin-haltigem Medium (Kontrolle) kultiviert wurden, gelingt nach Behandlung der Zellen durch Bortezomib ein verstärkter Nachweis von ubiquitinierten Proteinen, bedingt durch deren gestörten Abbau im Proteasom. Argininmangel alleine führt – insbesondere bei längerer Dauer (48h) – zu keiner verstärkten Expression ubiquitiniertes Proteine. Bei Zugabe von Canavanin ist auch bei Zellen, welche unter Arginin-suffizienten Bedingungen kultiviert wurden, eine verstärkte Ubiquitinierung nachweisbar. Besonders deutlich ist dieser Effekt aber bei Arginindepletion über 24 h und v.a. nach 48 h und nachfolgender Canavaninzugabe zu sehen (Abb. 17).

5.6 Patientenproben

Die Wirkung der Kombination von Arginindepletion und Canavaninapplikation wurde nicht nur in Zelllinien untersucht, sondern auch in primären Tumorzellen von Patienten mit Multiplem Myelom oder einer Plasmazelleukämie. Hierzu wurde mit zwei verschiedenen Kits Knochenmarkblut aufgereinigt. Bei dem EasySep-Kit handelt es sich um eine Positivselektion der CD138-exprimierenden Zellen, bei dem Rosette-Kit um eine Negativselektion aller Zellen, welche Antigene exprimieren, die auf Plasmazellen bzw. Myelomzellen nicht vorhanden sind. Um zu kontrollieren, ob die Aufreinigung erfolgreich war, wurden die Zellen mit einem CD138-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. CD138 ist ein Transmembranprotein, welches stark auf gesunden Plasmazellen, aber auch auf malignen Plasmazellpopulationen exprimiert wird. Insgesamt wurden aufgereinigte Plasmazellproben von 5 unterschiedlichen Patienten analysiert.

5.6.1 Reinheitskontrolle

Die Patientenprobe der Isolation der Myelomzellen des ersten Patienten wurde geteilt, die Aufreinigung erfolgte mit beiden Kits, um den Erfolg der Aufreinigung besser vergleichen zu können. Zwei der nachfolgenden Patienten wurden mit EasySep aufgereinigt (Patient 3 und 5), die anderen zwei Patientenproben mit Rosette (Patient 2 und 4).

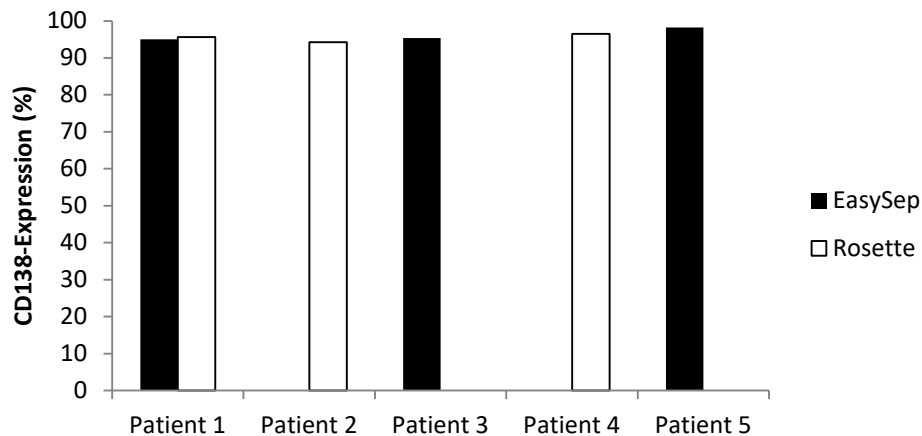
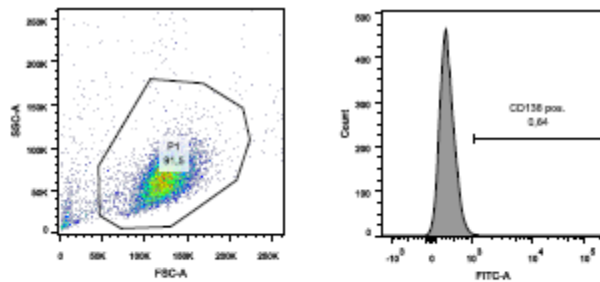
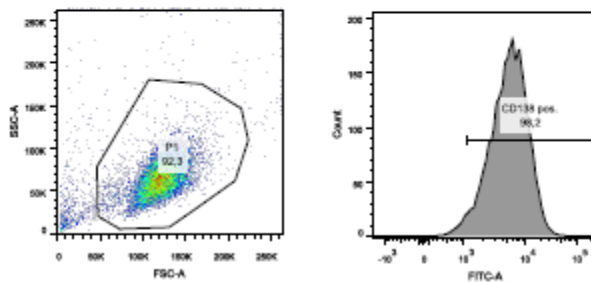


Abb. 18: Bestimmung der Frequenz von CD138-exprimierenden Zellen in den aufgereinigten Knochenmarkproben der Patienten mit Plasmazellerkrankung. Die Zellen wurden nach Aufreinigung mit dem jeweils dargestellten Aufreinigungs-Kit mit einem CD138-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anhand einer Färbung mit einem Isotyp-Kontrollantikörper wurden die Analyse-Gates definiert.

Nach Bestimmung der CD138-Expression ist zu erkennen, dass bei allen 5 Patientenproben (Patient 1-4 Multiples Myelom; Patient 5: Plasmazell-Leukämie) die Aufreinigung erfolgreich war. Die Frequenz von CD138-exprimierenden Myelomzellen lag nach allen Aufreinigungen bei etwa 95% (Abb. 18). In Abbildung 19 ist beispielhaft die durchflusszytometrisch gemessene Patientenprobe von Patient 5 dargestellt. Anhand einer Färbung mit einem Isotyp-Kontrollantikörper wurden die Analyse-Gates definiert.



Isotypkontrolle



CD138-Expression Patient 5

Abb. 19: Beispielhafte Darstellung der Frequenz von CD138-exprimierenden Zellen in der mit dem EasySep-aufgereinigten Knochenmarkprobe des Myelompatienten 5. Die Zellen wurden nach Aufreinigung mit einem CD138-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anhand einer Färbung mit einem Isotyp-Kontrollantikörper wurden die Analyse-Gates definiert.

5.6.2 ASS1-Expression

Um ADI-PEG 20 und Canavanin zur Behandlung von Patienten sinnvoll einsetzen zu können, sollten die Tumorzellen keine ASS1 exprimieren, da die Tumorzellen sonst in der Lage sind, aus Citrullin Arginin selbst zu synthetisieren.

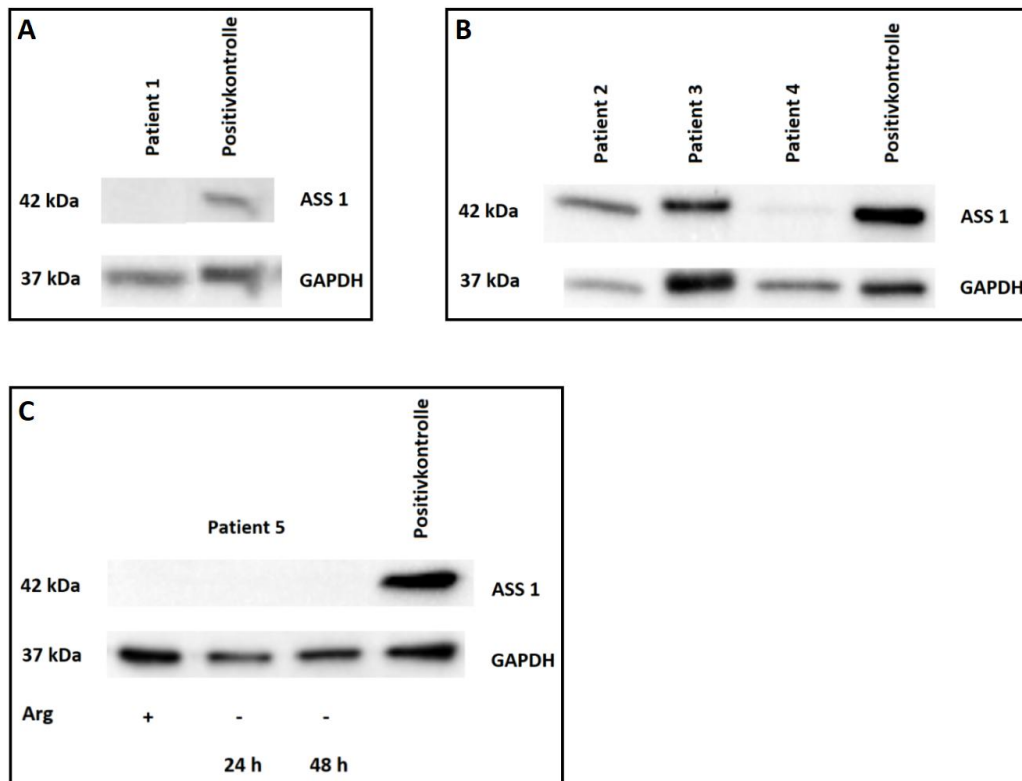


Abb. 20: ASS1-Expression der aufgereinigten primären Myelomzellen (Patienten 1-5). Die aufgereinigten CD138+ Patientenproben wurden mittels Western Blot auf ASS1-Expression untersucht. Als Ladekontrolle diente GAPDH, als Positivkontrolle die Myelom-Zelllinie RPMI-8226. **A:** Lysiert wurden Proben von beiden Aufreinigungs-Kits im Vergleich. **B:** Patienten 2-4. **C:** Getestet wurde neben der Expression der ASS1 direkt nach Aufreinigung ferner eine mögliche Induktion durch Kultivierung der aufgereinigten Zellen für 24 h oder 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium.

In den Lysaten der aufgereinigten Myelom-Zellproben der Patienten wurde jeweils die ASS1-Expression mittels Western Blot analysiert. Da zum Teil nur wenige Zellen für die Zelllysate zur Verfügung standen, konnten die Taschen im Western Blot Gel nicht immer mit gleicher Proteinmenge beladen werden. Dennoch können Aussagen zur ASS1-Expression in den Patientenproben getroffen werden. Als Positivkontrolle diente die stark ASS1-positive Zelllinie RPMI-8226 (siehe Abschnitt 4.1.3).

Es zeigte sich, dass die aufgereinigten Zellen von Patient 1 und 4 keine ASS1 exprimieren. Auch die Zellen von Patient 5 exprimieren keine ASS1. Bei der Aufreinigung der Probe von Patient 5 konnten so viele Zellen aufgereinigt werden, dass genug für eine weitergehende Analyse einer möglichen ASS1-Expression unter Arginindepletion vorhanden waren. Die Zellen wurden für 24 h und 48 h in Arginin-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Im anschließenden Western Blot ist zu sehen,

dass es unter Argininmangel nicht zu einer Induktion der ASS1-Expression kommt. Die aufgereinigten Myelomzellen von Patient 2 und 3 exprimieren ASS1 (Abb. 20).

5.6.3 Viabilität

Um den Effekt der Kombination von Arginindepletion und Canavanin auf primäre Myelomzellen zu testen, wurden die aufgereinigten CD138+ Zellen nach den entsprechenden Inkubationsbedingungen (+/- Arginin, jeweils +/- Canavanin) durchflusszytometrisch mittels Annexin-PI-Assay untersucht. Der Bahndlungszeitraum betrug bei vier der Proben bei simultaner Behandlung zwischen 18 h und 24 h. Bei Patient 4 wurden die Zellen für 13 h mit bzw. ohne Arginin vorbehandelt und für weitere 9 h mit bzw. ohne Canavanin weiter inkubiert.

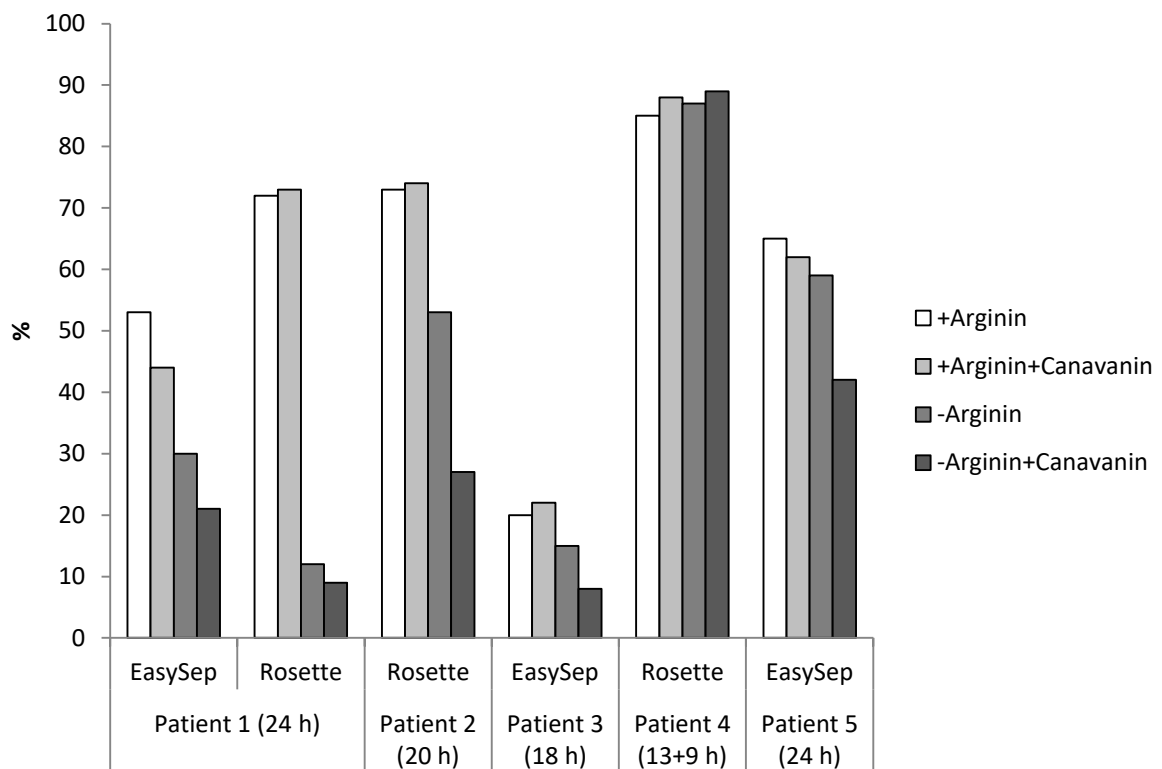


Abb. 21: Viabilität primärer humaner Myelomzellen: Heterogene Beeinflussung durch Arginindepletion und Canavaninsupplementation. Nach Aufreinigung (Verfahren wie angegeben) aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten wurden die primären Myelomzellen mit und ohne Arginin sowie mit und ohne Zugabe von Canavanin (100 μ M) behandelt. Der Behandlungszeitraum betrug 18 h (Patient 3), 20 h (Patient 2), 24 h (Patient 1 und 5). Bei Patient 4 wurden die Zellen für 13 h mit und ohne Arginin vorbehandelt und für weitere 9 h mit und ohne Canavanin weiter behandelt. Die Zellen wurden mit Annexin und PI gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Zellen, die nicht Annexin positiv waren, in % aller Zellen in der Probe, jeweils n=1.

Die Analyse von allen fünf Patientenproben bestätigt die Beobachtung in den Zelllinien, dass die Behandlung mit Canavanin keinen Effekt auf die Viabilität hat, solange den Zellen genügend Arginin zur Verfügung steht (Abb. 21).

Werden die Zellen unter Argininmangel gesetzt, zeigt sich eine heterogene Reaktion: ein Rückgang der Viabilität ist insbesondere bei den Myelomzellen aus Patient 1 und 2 zu sehen, während bei den anderen drei Proben (Patient 3-5) keine wesentliche Inhibition der Viabilität messbar ist. Wird zusätzlich zur Arginindepletion Canavanin hinzugefügt, kommt es zu einer quantitativ unterschiedlich ausgeprägten weiteren Abnahme der Viabilität (Abb. 21, Patient 1, 2, 3, 5). In den Myelomzellen aus Patient 4 ließ sich durch die sequentielle Behandlung mit Argininmangel und Canavaninapplikation kein Zelltod auslösen.

Die primären Myelomzellen zeigen teilweise auch unter Arginin-suffizienten Zellkulturbedingungen bereits nach 24 h *in vitro* eine relativ niedrige Viabilität. Eine Messung der Viabilität direkt nach der Aufreinigung ist nicht erfolgt, so dass nicht abzuschätzen ist, wie sehr die Viabilität der Myelomzellen unter der Zellkultivierung *in vitro* beeinflusst wurde. Werden die Zellen dann unter Argininmangel gesetzt und mit Canavanin behandelt, sind nur noch kleine Veränderungen in Bezug auf die Viabilität zu beobachten (siehe Patient 3). Die erniedrigte Viabilität lässt sich möglicherweise zum Teil dadurch erklären, dass die Proben nicht direkt nach Knochenmarkaspiration aufgereinigt wurden, sondern bei Zimmertemperatur unterschiedlich lange bis zur Abholung gelagert wurden. Grundsätzlich ist allerdings für primäre Myelomzellen bekannt, dass deren Viabilität in normaler Zellkultur (ohne komplexe Stroma- bzw. Feeder-Zellen) relativ schnell abnimmt.

6. Diskussion

6.1 Argininauxotrophie

Arginin, eine semi-essentielle Aminosäure, spielt für das Wachstum von malignen Tumoren eine wichtige Rolle. In vielen Tumorentitäten wird das Enzym ASS1 herunterreguliert, was zu einer Argininauxotrophie führt. Als therapeutische Strategie wurde daher Arginin Deiminase (ADI-PEG 20) entwickelt, welche das zirkulierende Arginin vermindert. Verschiedene Phase I/II-Studien haben einen begrenzten klinischen Vorteil sowie eine geringe Toxizität gezeigt (22).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Arginindepletion unter Laborbedingungen auf die Proliferation und Viabilität von humanen Zelllinien des Multiplen Myeloms sowie einer Plasmazelleukämie auswirkt. Ebenso wurde dies an primären Patientenproben untersucht.

Um einen therapeutischen Nutzen durch eine systemische Arginindepletion zu erzielen, ist es wichtig, den ASS1 Status des zu behandelnden Tumors zu erheben. Der Tumor sollte Arginin-uxotroph sein.

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie U266 exprimiert, wie im Western Blot gezeigt, keine ASS1. Die Expression dieses Enzyms ist auch unter Zellstress durch Argininmangel nicht zu induzieren (80). Im Gegensatz dazu exprimiert die Zelllinie RPMI-8226 deutlich ASS1. Die anderen untersuchten Zelllinien exprimieren ASS1 nur in geringem Maße. Werden die Zelllinien unter Stress durch Argininmangel gesetzt, kommt es in der Zelllinie KMS-12-BM zu einer Induktion der ASS1 (80). Dies könnte auch durch Überwachung bedingten Nährstoffmangel unter Zellkulturbedingungen erklärt sein.

Dillon et al. haben verschiedene Tumorentitäten auf die Expression von ASS1 untersucht, um ein mögliches Ansprechen auf eine therapeutische Arginindepletion zu untersuchen. Sie konnten feststellen, dass Melanomzellen, das Hepatocelluläre Karzinom und das Prostatakarzinom in der Regel keine ASS1 exprimieren. Es gibt aber auch Tumorentitäten, wie das Lungenkarzinom und Mammakarzinom, die in ihrer Untersuchung ASS1 deutlich exprimieren und somit wahrscheinlich nicht für eine therapeutische Arginindepletion geeignet sind (82).

Ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt wäre, die Expression von ASS1 in ASS1-positiven Tumoren zu supprimieren, um die Tumore dann für die Behandlung zum Beispiel mit ADI-PEG zu sensibilisieren. Tomomura et al. haben in ihrer Arbeit zeigen

können, dass bestimmte langkettige Fettsäuren die Expression von ASS1 supprimieren können. Dies wurde in Hepatozyten untersucht, eine weitere Untersuchung in Tumorzelllinien wäre wünschenswert (83).

In der Behandlung der Akuten Lymphatischen Leukämie wird die Depletion einer Aminosäure, nämlich von Asparagin, durch das Enzym Asparaginase bereits erfolgreich eingesetzt (2). Gong et al. haben in ihrer Studie den Effekt der Arginin Deiminase auf Zelllinien einer T- und B-lymphatischen Leukämie untersucht. Sie konnten zeigen, dass es nach Behandlung mit Arginin Deiminase und somit Arginindepletion zu einer Hemmung der Proliferation kommt. Diese war in ihrer Studie stärker als durch die Behandlung mit Asparaginase (84).

So könnte auch die Arginindepletion beim Arginin-auxotrophen Multiplen Myelom eine interessante neue Therapieoption sein. Hierzu müssten die Zellen der erkrankten Patienten zuvor auf den ASS1-Status überprüft werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben zeigte sich bezüglich des ASS1-Status, dass 3 von 5 Patientenproben keine ASS1 exprimieren und somit geeignet für eine therapeutische Arginindepletion sein sollten. Limitation dieser Arbeit ist, dass nur eine geringe Anzahl an Patientenproben untersucht wurde. Eine ausreichende Aussagekräftigkeit bezüglich des ASS1-Status in primären Zellen von Plasmazellerkrankungen zu treffen ist daher nicht möglich. Zudem war nur eine geringe Zahl an aufgereinigten Zellen vorhanden, um weitere Untersuchungen zu ermöglichen. Interessant wäre hier zum Beispiel zu untersuchen, ob eine Induktion des Enzyms ASS1 unter Argininmangelbedingungen zu beobachten ist. Dies wurde lediglich bei einer der 5 Patientenproben untersucht (Abb. 20C). Eine Induktion von ASS1 unter Argininmangel konnte bei diesem Patienten in vitro nicht gezeigt werden. In einer anderen Arbeit dieser Arbeitsgruppe wurde die Induktion des Enzyms ASS1 durch Argininmangel in den verschiedenen Myelom-Zelllinien untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel in der Zelllinie KMS-12-BM eine Induktion von ASS1 unter Argininmangel besteht (80). Bereits andere Arbeiten konnten zeigen, dass es sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Resistenz gegenüber einer therapeutischen Arginindepletion kommen kann. Die Expression von ASS1 kann unter Argininmangelbedingungen induziert werden. Tsai et al. konnten dies für verschiedene Melanom-Zelllinien zeigen (85). Diese in vitro-Daten konnten in den Phase I/II-Studien beim Melanom bestätigt werden. Ein Teil der Patienten sprach zu Beginn der Studie an, entwickelte im Verlauf aber einen Progress. Durch Erhöhen

der Dosis von ADI-PEG 20 konnte der Progress teilweise aufgehalten werden (39). Eine weitere Möglichkeit der Resistenzentwicklung gegenüber einem therapeutischen Agens ist eine Antikörperbildung gegen dieses. Weder Ascierto et al. (Malignes Melanom) noch Izzo et al. (Hepatozelluläres Karzinom) konnten in ihren Phase I/II-Studien eine Antikörperproduktion gegen ADI-PEG 20 nachweisen (41, 86).

Canavanin, eine nicht-proteinogene Aminosäure und ein Argininanalogon, wurde in verschiedenen Studien auf seine Anti-Tumor-Aktivität untersucht. So konnten schon Thomas et al. 1986 eine Reduktion der Größe von Kolon-Karzinomen zeigen. Die Autoren injizierten männlichen Ratten mit einem Kolon-Karzinom subkutan Canavanin sowie der Kontrollgruppe NaCl 0,9%. Das Ansprechen auf Canavanin wurde durch Messen der Tumorgröße vor und nach Behandlung beurteilt. Allerdings bestand bei einer effektiven tumorreduzierenden Dosis eine hohe generelle Toxizität auch auf gesunde Gewebe (87).

Auch Green et al. haben in einem Mausmodell einen Antitumor Effekt von Canavanin zeigen können. Die Autoren verwendeten CS7BL/6 x DBA/2 F1 Hybrid-Mäuse. Diese wurden mit einer L1210 Leukämieinie intraperitoneal inokuliert. Anschließend wurde Canavanin (100 mg/ml) subkutan über einen Katheter per Dauerinfusion appliziert. Der Effekt des Canavanins wurde mittels Messung der DNA-Synthese von Aszites-Flüssigkeit der Mäuse untersucht. Untersucht wurde unter anderem der Zusammenhang zwischen der Dosis des kontinuierlich applizierten Canavanins sowie der Zunahme der Lebensspanne in Prozent. Die Autoren konnten mit einer Dosis von 18 g/kg/d die Lebensspanne der Mäuse um 44 % verlängern. Sie konnten anhand des Verhältnisses von Dosis zu Zunahme der Lebensspanne auch die geringe therapeutische Breite des Canavanins zeigen. Eine Dosis von 24 g/kg/d führte zum Tod der Mäuse (88).

Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass Canavanin kompetitiv anstatt Arginin auf die Arginyl-tRNA geladen wird (89). Um dies zu zeigen, wurde zum Beispiel sowohl Canavanin als auch Arginin radioaktiv markiert (90). Laszlo et al. konnten zeigen, dass Canavanin nicht nur anstatt Arginin auf tRNA geladen werden kann, sondern auch an Stelle von Arginin in Proteine inkorporiert wird (91). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass der Einbau von Canavanin in Proteine anstatt Arginin in

eine veränderte Proteinkonformation resultiert (92), sowie in eine veränderte Proteinfunktion (93).

Anhand der Daten dieser Arbeit (siehe folgende Abschnitte bezüglich Proliferation und Viabilität) konnte die Annahme, dass Canavanin anstatt Arginin in Proteine inkorporiert wird und somit dann Viabilität und Funktion hemmt, unterstützt werden. Ob Canavanin tatsächlich anstatt Arginin in Proteine eingebaut wird, wurde in dieser Arbeit nicht direkt untersucht. Es konnte nur der indirekte Nachweis des Einbaus in Proteine gezeigt werden, z.B. durch eine verstärkte Ubiquitinierung der Zellen nach Canavanin-Behandlung.

6.2 Einfluss von Arginindepletion und Canavanin auf die Zellproliferation

Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Proliferation von Myelomzellen unter Arginindepletion und Zugabe von Canavanin. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien unter Argininmangelbedingungen eine verminderte Proliferation zeigen. Wird unter diesen Bedingungen Canavanin zugefügt, ist die Proliferation fast vollständig gehemmt. Unter Arginin-suffizienten Bedingungen zeigt die in dieser Arbeit ausgewählte Dosis des Canavanins keinen Effekt auf die verwendeten Zellen.

Die Zelllinie RPMI-8226 exprimiert ASS1 stark. Unter Zugabe von Citrullin unter Argininmangelbedingungen sollten die Zellen daher genügend Arginin endogen herstellen können, um die Proliferationshemmung zu umgehen. Die Zugabe von Canavanin zeigt daher vermutlich keine Proliferationshemmung, da genügend Arginin vorhanden ist.

Die Zelllinie KMS-12-BM exprimiert ASS1 ebenfalls, wenn auch weniger stark (Methodik: Western Blot) als RPMI-8226. Wird bei der Zelllinie KMS-12-BM Arginin in der Zellkultur depletiert, kommt es zu einer Induktion der bereits konstitutiv nachweisbaren ASS1 (80). Diese Induktion lässt sich funktionell im MTS-Assay bestätigen: nach Zugabe von Citrullin lässt sich eine signifikante Zunahme der Proliferation beobachten.

Auch Bobak et al. konnten, allerdings in Zelllinien solider Tumore, zeigen, dass Zellen in argininarmem Milieu die ASS1 hochregulieren und so unter Zugabe von Citrullin den zuvor induzierten ER-Stress abmildern können (94).

Allerdings zeigte sich zum Beispiel in der Zelllinie U266 auch unter Arginin-suffizienten Bedingungen nach Zugabe von Canavanin eine leichte Einschränkung

der Proliferation im MTS-Assay (siehe Abb. 3A). Zur genaueren Betrachtung wurde ein weiterer Proliferationsassay, der CFSE-Assay durchgeführt. Hier konnte keine Einschränkung der Proliferation unter Zugabe von Canavanin unter Arginin-suffizienten Bedingungen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch starke Zellproliferation und entsprechendem Argininverbrauch ein diskreter Argininmangel im Verlauf der Zellkultur entsteht. Im MTS-Assay wurden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 96-well Platte ausgesät. In der Durchführung des CFSE-Assays wurden 24-well Platten verwendet. Somit war für die untersuchten Zellen mehr Medium als Nährstoffangebot sowie mehr Platz zum Wachsen vorhanden. So könnte es sein, dass im Verhältnis zur Konzentration von Canavanin von $100 \mu\text{M}$ bereits kompetitiv niedrige Argininspiegel in der 96 well Zellkultur bestehen.

Die Zelllinie NCI-H929 zeigt nur eine moderate ASS1 Protein-Expression (Abb. 5). Es kommt bei Zugabe von Citrullin im Proliferationstest nicht zu einer Zunahme der Proliferation unter Argininmangel (Abb. 3A). Unklar bleibt, ob die mäßige ASS1 Expression für eine suffiziente, vom Citrullin ausgehende Argininversorgung, funktionell nicht ausreicht. Alternativ könnte dieses Phänomen dadurch erklärt werden, dass für die Argininsynthese aus Citrullin nicht nur das Enzym ASS1 notwendig ist, sondern auch ASL. Die Expression dieses Enzyms wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. So ist es durchaus möglich, dass in den NCI-H929 Zellen die Aktivität der ASL gering ist und sich dadurch die fehlende Induktion der Proliferation durch Citrullin-Gabe erklären lässt.

6.3 Einfluss von Arginindepletion und Canavanin auf die Viabilität

Die Viabilität der Zelllinien wurde in dieser Arbeit mittels durchflusszytometrischen Messungen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Arginindepletion zu einer Zunahme der nicht-viablen Zellen führt. Wird bei Argininmangel noch Canavanin zugeführt, konnte in allen Zelllinien der synergistische Effekt zwischen Arginindepletion und Canavaninbehandlung mit vermehrtem Zelltod gezeigt werden. Unter Arginin-suffizienten Bedingungen (Arginin: 1 mM) zeigt sich kein Effekt von Canavanin ($100 \mu\text{M}$) auf die Viabilität.

Vynnytska et al. haben den synergistischen Effekt von Arginindepletion und Canavanin auf die Zelllinien A431 (epidermoides Karzinom), A549 (Adenokarzinom der Lunge), HeLa (Cervix Karzinom), MIA PaCa-2 und PANC1 (Pankreaskarzinome),

MCF7 (Adenokarzinom der Mamma) und HEK293 (embryonales Nierenzellkarzinom) untersucht. Somit wurden lediglich solide Tumore untersucht und keine hämatologischen Neoplasien, anders als in dieser Arbeit. Als gesunde Zellen dienten Lungen (WI-38)- und Hautfibroblasten (N1) sowie die embryonale Nierenzelllinie HEK293. Gesunde Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Dies wäre in weiterführenden Experimenten eine Möglichkeit, die Hypothese zu untermauern, dass Arginindepletion und Kombination mit Canavanin keinen Effekt auf gesunde Zellen hat. Vynnytska et al. untersuchten die Viabilität der Zellen *in vitro* und bestimmten die Canavanin-Dosis, welche benötigt wurde, um 50 % der Zellen zu töten (IC50). Hierzu wurde ein Trypan-Blau Ausschluss Test verwendet. Die Zellviabilität in dieser Arbeit wurde mittels durchflusszytometrischen Messungen getestet. Vynnytska et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die IC50-Dosis des Canavanins in den Tumorzelllinien, welche in Argininfreiem Medium kultiviert wurden, erheblich geringer war im Vergleich zu gesunden Zellen, welche in Argininfreiem Medium kultiviert wurden. Um zu zeigen, dass ein Teil des zytotoxischen Effekts des Canavanins durch Inkorporation in Proteine hervorgerufen wird, wurden die Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese behandelt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Behandlung mit Cycloheximid die Zellen vor dem zytotoxischen Effekt des Canavanins schützt. Ein Aspekt, der von Vynnytska et al. in ihrer Arbeit nicht erwähnt wurde, ist der ASS1-Status der untersuchten Tumore (38). In dieser Arbeit wurden alle Annexin V-positiven Zellen zusammengefasst, da es in den Analysen keine relevante Menge an Annexin-positiven, PI-negativen und somit apoptotischen, noch viablen Zellen gab. Dieses wäre ein weiterer Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen.

Beispielsweise könnte ein weiteres Experiment wie folgt durchgeführt werden: die Zugabe von Arginin-reichem Medium nach Behandlung unter Argininmangelbedingungen und Zugabe von Canavanin. Hier könnte dargestellt werden, ob sich noch viable, apoptotische Zellen durch Arginin-suffiziente Bedingungen wieder erholen können.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten García-Navas et al. in ihrer Arbeit an T-Lymphozyten. Experimentell konnten sie zeigen, dass T-Lymphozyten unter Arginindepletion in Autophagie übergehen. Dieser Prozess ist reversibel, wenn die Zellen erneut unter Arginin-suffizienten Bedingungen kultiviert werden. Wird Autophagie inhibiert, gehen die Zellen in Apoptose über (51).

6.4 Unfolded Protein Response

Um den Signalweg IRE1 der UPR zu untersuchen, wurde mittels durchflusszytometrischer Messung die Menge an gespleißtem Xbp1 gemessen. Als Positivkontrolle diente der UPR-Induktor Tunicamycin. Durch die Behandlung der Zelllinie U266 mit Tunicamycin konnte eine vermehrte Expression von Xbp1s nachgewiesen werden. Unter Behandlung mit 24 h-Argininmangelbedingungen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der intrazellulären Xbp1s-Expression. Unter 48 h-Argininmangelbedingungen zeigte sich ein Rückgang der Xbp1s-Expression im Vergleich zu 24 h-Argininmangelbedingungen. Durch Zugabe von Canavanin zu den unter Argininmangel vorbehandelten Zellen zeigte sich eine persistierend hohe Xbp1s-Expression (siehe Abb. 13, 14).

Eine mögliche Erklärung für den Rückgang der Xbp1s-Expression nach 48 h-Argininmangelbedingungen im Vergleich zu 24 h-Argininmangelbedingungen wäre, dass sich diese Signalkaskade der UPR früh aktiviert, sich aber auch durch positive Rückkopplung schnell wieder abschwächen lässt (49). Dieser Rückkopplungseffekt scheint durch die Zugabe von Canavanin aufgehalten zu werden.

Eine Hypothese dieser Promotionsarbeit ist, dass durch den synergistischen Effekt von Arginindepletion und Canavanin die UPR, und durch prolongierte Aktivierung der UPR der Zelltod aktiviert wird. Die UPR ist zunächst ein Selbstschutzmechanismus der Zelle. Hält der Zellstress allerdings zu lange an oder ist er zu hoch, kann die UPR auch den Zelltod initiieren (49).

Zur Untersuchung des PERK-Signalwegs wurde mittels eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers im Western Blot die Phosphorylierung von eIF2 α untersucht. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ließ sich eine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α nach einer Arginindepletion über 48 h in der Zelllinie U266 nachweisen. Nach Zugabe von Canavanin ließ sich keine Verstärkung dieser induzierten Phosphorylierung nachweisen (siehe Abb. 15).

Mimura et al. haben in ihrer Arbeit das Spleißen von Xbp1 durch den Endoribonuklease-Domäne-Inhibitor MKC-3946 in Myelomzellen inhibiert und konnten in vivo zeigen, dass es so zu einer Inhibition des Wachstums von Myelomzellen kommt. Die Hypothese von Mimura et al. ist, dass durch Inhibieren des Spleißens von Xbp1 die terminale UPR und somit Zelltod schneller eintritt. Insbesondere wurde dies in der Kombination von MKC-3946 mit Bortezomib gezeigt. Mimura et al. konnten zudem zeigen, dass durch die Behandlung von MM-Zellen mit

MKC-3946 eine vermehrte Aktivierung des PERK-Weges besteht. Durch die Blockierung des IRE1-Weges entstehe noch mehr ER-Stress, was zu einer Aktivierung der terminalen UPR und Apoptose führe. Auch der IRE1-Signalweg führt durch eine JNK-Aktivierung zu einer terminalen UPR. Die Annahme von Mimura et al. ist, dass dieser Weg durch das Inhibieren des Spleißens von Xbp1 nicht blockiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich das Spleißen von Xbp1 untersucht, nicht die anderen Signalkaskaden des IRE1-Weges (95).

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass ein Inhibitor der Aktivierung von Xbp1 zu einem vermehrten Zelltod der untersuchten Vorläufer-B-ALL-Zellen führt (96).

Auf der anderen Seite konnten Leung-Hagesteijn et al. in ihrer Arbeit zeigen, dass Xbp1s negative Tumor-B-Zellen resistent gegenüber Proteasomeninhibitoren sind (97). Auch Ling et al. konnten zeigen, dass verminderte Xbp1-Level sowie Herunterregulieren von ATF6 zu einer Bortezomib-Resistenz in der Therapie des Multiplen Myeloms führen (98).

Harnoss et al. haben in ihrer Arbeit MM-Zelllinien mit Doxycyclin behandelt und dadurch die Menge von IRE1 α reduziert. Hierdurch konnten sie eine verminderte Proliferation der Zelllinien KMS-11, OPM-2 und RPMI-8226 induzieren. So konnten sie eine signifikante Abhängigkeit der drei Tumorzelllinien von IRE1 α für das 3D-Wachstum zeigen. Ebenso konnten Harnoss et al. in vivo in einem Mausmodell die Abhängigkeit des Tumorwachstums vom IRE1 α -Xbp1s-Weg zeigen (99).

In den Versuchen dieser Arbeit bezüglich Proliferation und Viabilität zeigte sich durch die Arginindepletion sowie zusätzliche Behandlung mit Canavanin ein starker Effekt mit stark eingeschränkter Proliferation und vermehrtem Zelltod. Die UPR ist zunächst ein Kompensationsmechanismus der Zelle, mit vermehrtem Stress, wie beispielsweise fehlgefalteten Proteinen, umzugehen. So kann die vermehrte Phosphorylierung nach Arginindepletion über 48 h durch vermehrten ER-Stress erklärt werden. Da es allerdings nicht zu einer zusätzlichen vermehrten Phosphorylierung, sondern eher zu einer verminderten Phosphorylierung durch die Zugabe von Canavanin kommt, scheinen für den hierdurch induzierten Zelltod andere Signalwege ursächlich zu sein.

Schewe et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass die Inhibierung der Dephosphorylierung von eIF2 α die Effektivität von Bortezomib erhöht. Sie konnten darstellen, dass ein Teil der mit Bortezomib behandelten Zellen in einen G₀-G₁-Zellzyklus-Arrest übergeht. Zudem konnten sie zeigen, dass ruhig gestellte Bortezomib-behandelte

Zellen die eIF2 α -Phosphorylierung sowie die Induktion von GADD153 abschwächen. Die Autoren konnten zeigen, dass Strategien, die zu einer verminderten Dephosphorylierung von eIF2 α führen, die Bortezomib-induzierte Apoptose maximieren können (100).

Bobak et al. wiesen nach, dass durch Tunicamycin in verschiedenen soliden Tumorzelllinien eine vermehrte Phosphorylierung von PERK stattfindet. Durch Arginindepletion konnte allerdings sowohl eine verminderte PERK-Phosphorylierung, als auch ein vermindertes PERK-Expressionsniveau gezeigt werden. Darüber hinaus konnten sie feststellen, dass die Phosphorylierung von eIF2 α unter Argininmangelbedingungen abhängig von der Dauer der Arginindepletion ist. So konnten sie in der Zelllinie HCT-116 eine verstärkte Phosphorylierung nach Arginindepletion über eine Stunde nachweisen. Diese war nach 24 h aber nicht mehr nachweisbar (94). In dieser Arbeit wurden nur die Zeitpunkte über 24 und 48 h untersucht. Darüber hinaus wäre es interessant gewesen, weitere Zeiträume der Zellkultivierung in argininfreiem Medium zu untersuchen. Ebenso hätten weitere Teilaspekte der UPR-Signalwege untersucht werden können.

6.5 Apoptose/CHOP/Caspase 3

Um die Signalkaskade der terminalen UPR, insbesondere der Apoptose zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit Caspase 3 untersucht. Mittels Western Blot wurde eine vermehrte Spaltung der Caspase 3 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit einer alleinigen Arginindepletion behandelt wurden, nicht verstärkt Caspase 3 spalten. Unter Zugabe von Canavanin über 3 h kam es zu einer zunehmenden Spaltung, bei Zugabe von Canavanin über 6 h zeigte sich die Menge an gespaltener Caspase 3 noch weiter verstärkt. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MM-Zellen unter Arginindepletion in Kombination mit Canavanin verstärkt in Apoptose übergehen (siehe Abb. 16). Vynnytska et al. haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass die durch Arginindepletion induzierte Apoptose durch Behandlung mit niedrig dosiertem Canavanin verstärkt werden kann. Hierzu wurden unter anderem mittels Western Blot Apoptose-Marker, wie die aktivierte Effektor-Caspase 3 untersucht. Zudem wurde zusätzlich, anders als in dieser Arbeit, ein DNA-Fragmentations-Versuch durchgeführt. In der Zelllinie A431 konnten die Autoren zeigen, dass nach 12 h unter Argininmangelbedingungen Caspase 9 und somit der intrinsische Apoptose-Weg durch Argininmangel aktiviert wird. Die Autoren

untersuchten zudem die Kombination von Arginindepletion und Canavanin. Die Zellen unter argininfreien Bedingungen kultiviert unter Zugabe von Canavanin (100 $\mu\text{mol/l}$) für 6 h - 72 h. Sie konnten zeigen, dass die Caspase-Aktivierung zu einem früheren Zeitpunkt eintritt als durch Arginindepletion alleine (38). Zur Untermauerung der Hypothese dieser Promotionsarbeit, dass MM-Zellen unter Arginindepletion in Kombination mit Canavanin verstärkt in Apoptose übergehen, könnten also noch andere Caspasen, wie Caspase 7 oder 9 untersucht werden.

Andere Signalkaskaden der Apoptose, wie GADD153/CHOP, sollten Teil weiterer Untersuchungen sein. So konnten Obeng et al. zum Beispiel zeigen, dass MM-Zelllinien unter Behandlung mit Bortezomib vermehrt GADD153 exprimieren (61). Eine weiterführende Untersuchung diesbezüglich unter Arginindepletion und Canavaninzugabe wäre sicherlich ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Bobak et al. haben den Effekt von Arginindepletion in Kombination mit Canavanin auf die Zelllinien HCT-166, HT29 (Kolonkarzinome), U251 MG (Glioblastom) und SKOV3 (Ovarialkarzinom) untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Behandlung dieser Zelllinien unter Argininmangelbedingungen zwar zu einer vermehrten Hochregulierung von CHOP mRNA führten, nicht jedoch zu einer massiven Apoptose. Allerdings konnte durch Zugabe von Canavanin zu arginindepletierten Zellen die Apoptose verstärkt werden. Bobak et al. konnten zeigen, dass durch Kombination von Arginindepletion mit Canavanin das Protein CHOP hochreguliert wird und die Zahl der viablen Zellen abnimmt (getestet im Annexin-PI-FACS) (94).

6.6 Ubiquitin-Proteasomen-System

Zur Untersuchung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems wurden die Zellen mittels Ubiquitin-spezifischem Antikörper im Western Blot untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung der Zellen mit Bortezomib eine verstärkte Ubiquitinierung stattfindet im Vergleich zu Zellen, die in Arginin-haltigem Medium (Kontrolle) kultiviert wurden. Bei Zugabe von Canavanin zu Zellen, welche unter Arginin-suffizienten Bedingungen kultiviert wurden, zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Ubiquitinierung, ebenso nach Arginindepletion über 24 h. Anders ist es bei Arginindepletion über 48 h, hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle keine verstärkte Ubiquitinierung. Wird diesen Zellen zusätzlich Canavanin zugefügt, wird die Ubiquitinierung dagegen deutlich verstärkt (siehe Abb. 17).

Best et al. haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass das Molekül TAK-243 das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 inhibiert und so ER-Stress und UPR induziert. Dies wurde in CLL-Zellen getestet. Nach Behandlung dieser Zellen mit TAK-243 konnte eine starke Apoptose der CLL-Zellen hervorgerufen werden. Zudem führte TAK-243 zu einer Reduktion von poly-ubiquitinierten Proteinen. Außerdem führte eine Behandlung der Zellen mit TAK-243 zu verstärktem ER-Stress, was die Autoren durch eine verstärkte Phosphorylierung von eIF2 α und Hochregulieren von CHOP und GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34) zeigten (101). Die fehlgefalteten Proteine können durch Behandlung mit TAK-243 nicht zur Degradierung gekennzeichnet werden, es kommt zu vermehrtem ER-Stress und die terminale UPR wird eingeleitet. Daher scheint sich der Mechanismus des verstärkten Zelltods durch Arginindepletion und Canavaninsubstitution von dem, wie er in der Arbeit von Best et al. beschrieben wurde, zu unterscheiden: in der vorliegenden Arbeit konnte durch sequentielle Behandlung der Zellen mit Arginindepletion und Canavanin eine verstärkte Ubiquitinierung gezeigt werden.

Auch Zhunag et al. haben in ihrer Arbeit den E1-Inhibitor TAK-243 getestet. Sie konnten zeigen, dass TAK-243 das Wachstum von Myelom-Zelllinien vermindert, Apoptose induziert und Caspasen aktiviert, während es die Menge der Ubiquitin-Protein-Verbindungen vermindert. Zudem konnten Aktivierungen aller drei Wege der UPR nachgewiesen werden. Zhuang et al. konnten zeigen, dass TAK-243 eine Resistenz von Myelomzellen gegenüber Medikamenten, zum Beispiel Bortezomib, überwinden kann (102).

6.7 Patientenproben

In dieser Arbeit wurden insgesamt 5 Patientenproben analysiert. Wünschenswert wären weiterführende Untersuchungen mit mehreren Patientenproben gewesen. Dies konnte auf Grund mangelnder Proben im Forschungszeitraum nicht umgesetzt werden. Insbesondere wäre dies interessant gewesen, um eine statistische Auswertung vorzunehmen. Insgesamt standen nach der Aufreinigung mit den 2 verschiedenen Aufreinigungskits, wie zu erwarten, nur eine limitierte Menge hochreiner CD138+ Myelomzellen zur weiteren Untersuchung zur Verfügung. Weitergehende Untersuchungen am Primärmaterial, insbesondere im Hinblick auf die an Myelomlinien vorab untersuchte UPR, wären interessant gewesen.

Die aufgereinigten Zellen wurden hinsichtlich ihres ASS1-Status untersucht. Drei der fünf aufgereinigten Myelomzellen exprimieren ASS1 (siehe Abb. 20). Bezüglich des Viabilitätsverlusts unter Argininmangel bzw. der Kombination mit Canavanin zeigten sich im untersuchten Patientenmaterial heterogene Ergebnisse. Zudem ist eine Viabilitätstestung direkt nach Aufreinigung leider nicht erfolgt. Aufgrund der geringen Patientenzahl ist keine Aussage bezüglich der Projektion auf ein größeres Patientenkollektiv nicht zu treffen.

Darüber hinaus ist die Vergleichbarkeit von in vitro untersuchtem Patientenmaterial mit den physiologischen Gegebenheiten in vivo kritisch zu hinterfragen. Die Bedingungen der Zellkultur können nicht adäquat das Milieu des menschlichen Körpers, im Speziellen die Knochenmarknische von Myelomzellen, widerspiegeln. Zudem wurden die Proben teilweise nicht direkt nach Knochenmarkaspiration aufgereinigt, teilweise lagen zwischen Knochenmarkaspiration und Aufreinigung mehrere Stunden. Dies sollte bei der weiteren Untersuchung von primären Patientenproben minimiert werden. Zudem zeigte sich eine erniedrigte Viabilität nach Aufreinigung mit dem EasySep-Kit im Vergleich zum Rosette-Kit. Daher sollten weitere Aufreinigungen eher mit dem Rosette-Kit vorgenommen werden. Auch sollte in zukünftigen Experimenten eine Viabilitätstestung direkt nach Aufreinigung erfolgen, um abschätzen zu können, wie sehr die Kultivierung der aufgereinigten Zellen schon unter optimalen Zellkulturbedingungen (1 mM Arginin) in vitro Einfluss auf die Viabilität hat.

In Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Depletion von Arginin zu einer Induktion von ASS1 führen kann, dies kann zu einer Resistenz gegenüber einer Behandlung zum Beispiel mit ADI-PEG führen (103). Dies wurde bisher noch nicht mit primären Patientenproben von MM-Patienten untersucht. Möglich ist, dass diese Resistenzentwicklung durch die Zugabe von Canavanin vermieden werden kann. Dies sollte Teil weiterer Experimente sein.

Desweiteren wäre es interessant, den ASS1-positiven Patientenproben Citrullin zuzufügen, um zu analysieren, ob die aufgereinigten Proben resistent gegenüber einer gleichzeitigen Canavaninapplikation bei Argininmangel sind.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue innovative Therapiestrategie zur Behandlung des Multiplen Myeloms getestet. In vitro erfolgte die Kombination von Arginindepletion mit dem Argininanalogon Canavanin. Hintergrund dieser Kombination ist die Annahme, dass Canavanin bei reduziertem Argininangebot kompetitiv an Stelle von Arginin in Proteine eingebaut wird und dies zu einem massiven Anfall von fehlgefalteten Proteinen mit Induktion von Zellstress und letztlich zur Apoptose der Myelomzellen führt.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Arginindepletion eine signifikante Abnahme der Proliferation sowie der Viabilität in den untersuchten Zelllinien zu induzieren ist. Wird den Zellen zusätzlich Canavanin zugefügt, kommt es zu einer weiteren sehr starken und signifikanten Abnahme von Proliferation und Viabilität.

Im weiteren Teil der Arbeit wurde untersucht, ob durch die Kombination von Arginindepletion mit Canavanin Signalkaskaden der UPR induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Arginindepletion in der Myelom-Zelllinie U266 die Menge an Xbp1s, einem zentralen UPR Protein, passager ansteigt. Bei Zugabe von Canavanin zu den arginindepletierten Zellen bleibt die Menge des gespleißten Xbp1 dagegen nach Induktion persistierend hoch. Ebenso wurde die Phosphorylierung von eIF2 α untersucht. Hier zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung nach Arginindepletion, was durch Canavanin nicht weiter verstärkt wurde. Als Effektormolekül der Apoptose wurde die Spaltung von Caspase 3 im Western Blot untersucht. Während Arginindepletion alleine hier keinen wesentlichen proapoptotischen Effekt hatte, zeigte sich bei Canavanin Ko-Applikation eine vermehrte Spaltung von Caspase 3 und damit korrespondierend eine verstärkte Apoptose. Eine theoretisch unter Canavaninapplikation bei Argininmangel zu erwartende vermehrte Proteinefehlfaltung wurde indirekt durch eine verstärkte Protein-Ubiquitinierung unter diesen Bedingungen nachgewiesen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit somit funktionelle und biochemische Daten generiert, welche die antitumorale Effizienz einer Applikation von Canavanin bei induziertem Argininmangel in Myelomzellen unterstreichen.

Eine systemische Arginin-Depletion durch rekombinante Enzyme ist bereits in der klinischen Entwicklung. Hier sollten nun optimale Kombinationsstrategien einer

induzierten Arginin-Verarmung mit unterschiedlichen Arten der Canavanin-Applikation in relevanten in vivo Modellen untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

1. (Destatis) SB. Todesursachen in Deutschland 2017. Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html;jsessionid=3C802D7EA691EB37D86D017BCB45BD93.internet8721#sprg234240.
2. Muller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1998;28(2):97-113.
3. Feun LG, Kuo MT, Savaraj N. Arginine deprivation in cancer therapy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2015;18(1):78-82.
4. Abou-Alfa GK, Qin S, Ryou BY, Lu SN, Yen CJ, Feng YH, et al. Phase III randomized study of second line ADI-PEG 20 plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2018;29(6):1402-8.
5. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(8):585-98.
6. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in oncology*. 2016;43(6):676-81.
7. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(11):1046-60.
8. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(10):3456-63.
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2004;351(18):1860-73.
10. Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet (London, England)*. 2015;385(9983):2197-208.
11. Lu SX. Modern treatments and future directions for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Best practice & research Clinical haematology*. 2020;33(1):101151.
12. Kunacheewa C, Manasanch EE. High-risk smoldering myeloma versus early detection of multiple myeloma: Current models, goals of therapy, and clinical implications. *Best practice & research Clinical haematology*. 2020;33(1):101152.
13. Atrash S, Bano K, Harrison B, Abdallah AO. CAR-T treatment for hematological malignancies. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2020.

14. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020;34(4):985-1005.
15. Gao S, Wang S, Song Y. Novel immunomodulatory drugs and neo-substrates. *Biomarker research*. 2020;8:2.
16. Tamura H, Ishibashi M, Sunakawa M, Inokuchi K. Immunotherapy for Multiple Myeloma. *Cancers*. 2019;11(12).
17. Rosenthal MD, Carrott PW, Patel J, Kiraly L, Martindale RG. Parenteral or Enteral Arginine Supplementation Safety and Efficacy. *The Journal of nutrition*. 2016;146(12):2594s-600s.
18. Wijnands KA, Castermans TM, Hommen MP, Meesters DM, Poeze M. Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients*. 2015;7(3):1426-63.
19. van Vught AJ, Dagnelie PC, Arts IC, Froberg K, Andersen LB, El-Naaman B, et al. Dietary arginine and linear growth: the Copenhagen School Child Intervention Study. *The British journal of nutrition*. 2013;109(6):1031-9.
20. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*. 1990;108(2):331-6; discussion 6-7.
21. de Betue CT, Deutz NE. Changes in arginine metabolism during sepsis and critical illness in children. *Nestle Nutrition Institute workshop series*. 2013;77:17-28.
22. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR, Crook T, et al. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(12):2762-72.
23. Grillo MA, Colombatto S. Arginine revisited: minireview article. *Amino acids*. 2004;26(4):345-51.
24. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoine A. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem*. 2003;270(9):1887-99.
25. Morris SM, Jr. Enzymes of arginine metabolism. *The Journal of nutrition*. 2004;134(10 Suppl):2743S-7S; discussion 65S-67S.
26. Schimke RT. ENZYMES OF ARGININE METABOLISM IN MAMMALIAN CELL CULTURE. I. REPRESSION OF ARGININOSUCCINATE SYNTHETASE AND ARGININOSUCCINASE. *The Journal of biological chemistry*. 1964;239:136-45.
27. Jackson MJ, Allen SJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Metabolite regulation of argininosuccinate synthetase in cultured human cells. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(31):16388-94.

28. Werner A, Koschke M, Leuchtner N, Luckner-Minden C, Habermeier A, Rupp J, et al. 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. *Frontiers in immunology*. 2017;8:864.
29. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4843-8.
30. Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, et al. Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(43):30424-32.
31. Werner A, Pieh D, Echchannaoui H, Rupp J, Rajalingam K, Theobald M, et al. Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1268.
32. Eagle H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*. 1955;102(1):37-48.
33. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(8):641-54.
34. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*. 2005;105(6):2549-56.
35. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*. 2006;108(5):1627-34.
36. Miraki-Moud F, Ghazaly E, Ariza-McNaughton L, Hodby KA, Clear A, Anjos-Afonso F, et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood*. 2015;125(26):4060-8.
37. Rabinovich S, Adler L, Yizhak K, Sarver A, Silberman A, Agron S, et al. Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*. 2015;527(7578):379-83.
38. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk YV, Bobak YP, Stasyk OV. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2011;22(2):148-57.
39. Feun L, Savaraj N. Pegylated arginine deiminase: a novel anticancer enzyme agent. *Expert opinion on investigational drugs*. 2006;15(7):815-22.

40. Kim RH, Coates JM, Bowles TL, McNerney GP, Sutcliffe J, Jung JU, et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.* 2009;69(2):700-8.
41. Ascierto PA, Scala S, Castello G, Daponte A, Simeone E, Ottaiano A, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(30):7660-8.
42. Ott PA, Carvajal RD, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Hoffman EW, Wu BW, et al. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Investigational new drugs.* 2013;31(2):425-34.
43. Stasyk OV, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics. *Cell biology international.* 2015;39(3):246-52.
44. Nurcahyanti AD, Wink M. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ.* 2016;4:e1542.
45. Myung Ho Jang DYJ, Seok Woo Rue, Kyu Hyun Han, Wan Park, and Young Ho Kim. Arginine antimetabolite L-canavanine induces apoptotic cell death in human Jurkat T cells via caspase-3 activation regulated by Bcl-2 or Bcl-xL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;295(2):283-8.
46. Bence AK, Crooks PA. The mechanism of L-canavanine cytotoxicity: arginyl tRNA synthetase as a novel target for anticancer drug discovery. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2003;18(5):383-94.
47. Green MH, Ward JF. Enhancement of human tumor cell killing by L-canavanine in combination with gamma-radiation. *Cancer Res.* 1983;43(9):4180-2.
48. Gorman AM, Healy SJ, Jager R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & therapeutics.* 2012;134(3):306-16.
49. Tsai YC, Weissman AM. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer.* 2010;1(7):764-78.
50. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 2016;529(7586):326-35.
51. Garcia-Navas R, Munder M, Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy.* 2012;8(11):1557-76.
52. White-Gilbertson S, Hua Y, Liu B. The role of endoplasmic reticulum stress in maintaining and targeting multiple myeloma: a double-edged sword of adaptation and apoptosis. *Front Genet.* 2013;4:109.

53. Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*. 2009;138(3):562-75.
54. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Frontiers in immunology*. 2018;9:3083.
55. Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, et al. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell*. 2009;33(6):679-91.
56. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of cell biology*. 2006;172(4):565-75.
57. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16(11):1345-55.
58. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.
59. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:575-99.
60. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001;21(4):1249-59.
61. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107(12):4907-16.
62. Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res*. 2007;67(4):1783-92.
63. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 2003;22(53):8608-18.
64. Yen JH, Wu PS, Chen SF, Wu MJ. Fisetin Protects PC12 Cells from Tunicamycin-Mediated Cell Death via Reactive Oxygen Species Scavenging and Modulation of Nrf2-Driven Gene Expression, SIRT1 and MAPK Signaling in PC12 Cells. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
65. Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*. 1979;18(11):2186-92.

66. Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(12):944-57.
67. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):741-52.
68. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12.
69. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):381-9.
70. Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol.* 1996;16(4):1479-89.
71. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer discovery.* 2015;5(5):475-87.
72. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-89.
73. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290(5497):1717-21.
74. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et biophysica acta.* 2004;1695(1-3):19-31.
75. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal.* 2000;19(1):94-102.
76. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry.* 2001;70:503-33.
77. Lub S, Maes K, Menu E, De Bruyne E, Vanderkerken K, Van Valckenborgh E. Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016;7(6):6521-37.
78. Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Mechanism of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological basis of synergy in multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics.* 2011;10(11):2034-42.
79. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, et al. 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.* 2011;38(3):643-54.

80. Jacobi B. Interferenz mit dem Argininstoffwechsel als neue Therapiestrategie beim Multiplen Myelom [Dissertation]: Johannes-Gutenberg Universität Mainz; 2019.
81. Ghosh R, Wang L, Wang ES, Perera BG, Igbaria A, Morita S, et al. Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*. 2014;158(3):534-48.
82. Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, et al. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer*. 2004;100(4):826-33.
83. Tomomura M, Tomomura A, Dewan MA, Saheki T. Long-chain fatty acids suppress the induction of urea cycle enzyme genes by glucocorticoid action. *FEBS letters*. 1996;399(3):310-2.
84. Gong H, Zolzer F, von Recklinghausen G, Havers W, Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*. 2000;14(5):826-9.
85. Tsai WB, Aiba I, Lee SY, Feun L, Savaraj N, Kuo MT. Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1alpha/Sp4. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(12):3223-33.
86. Izzo F, Marra P, Beneduce G, Castello G, Vallone P, De Rosa V, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(10):1815-22.
87. Thomas DA, Rosenthal GA, Gold DV, Dickey K. Growth inhibition of a rat colon tumor by L-canavanine. *Cancer Res*. 1986;46(6):2898-903.
88. Green MH, Brooks TL, Mendelsohn J, Howell SB. Antitumor activity of L-canavanine against L1210 murine leukemia. *Cancer Res*. 1980;40(3):535-7.
89. Allende CC, Allende JE. PURIFICATION AND SUBSTRATE SPECIFICITY OF ARGINYL-RIBONUCLEIC ACID SYNTHETASE FROM RAT LIVER. *The Journal of biological chemistry*. 1964;239:1102-6.
90. Lesinger T, Haas D, Hegarty MP. Indospicine as an arginine antagonist in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et biophysica acta*. 1972;262(2):214-9.
91. Laszlo A, Li GC. Effect of amino acid analogs on the development of thermotolerance and on thermotolerant cells. *Journal of cellular physiology*. 1993;154(2):419-32.
92. Rosenthal GA, Reichhart JM, Hoffmann JA. L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(23):13693-6.

93. Redman CM, Avellino G, Yu S. Secretion of proalbumin by canavanine-treated Hep-G2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(6):3446-52.
94. Bobak Y, Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grydzuk O, Shuvayeva G, Redowicz MJ, et al. Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2016;70:29-38.
95. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(24):5772-81.
96. Kharabi Masouleh B, Geng H, Hurtz C, Chan LN, Logan AC, Chang MS, et al. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(21):E2219-28.
97. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013;24(3):289-304.
98. Ling SC, Lau EK, Al-Shabeeb A, Nikolic A, Catalano A, Iland H, et al. Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica*. 2012;97(1):64-72.
99. Harnoss JM, Le Thomas A, Shemorry A, Marsters SA, Lawrence DA, Lu M, et al. Disruption of IRE1alpha through its kinase domain attenuates multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(33):16420-9.
100. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res*. 2009;69(4):1545-52.
101. Best S, Liu T, Bruss N, Kittai A, Berger A, Danilov AV. Pharmacologic inhibition of the ubiquitin-activating enzyme induces ER stress and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and ibrutinib-resistant mantle cell lymphoma cells. *Leukemia & lymphoma*. 2019:1-5.
102. Zhuang J, Shirazi F, Singh RK, Kuitse I, Wang H, Lee HC, et al. Ubiquitin-activating enzyme inhibition induces an unfolded protein response and overcomes drug resistance in myeloma. *Blood*. 2019;133(14):1572-84.
103. Feun L, You M, Wu CJ, Kuo MT, Wangpaichitr M, Spector S, et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer. *Curr Pharm Des*. 2008;14(11):1049-57.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich bei der Durchführung und dem Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater für die Überlassung des interessanten Themas und für seine hervorragende Unterstützung während der Laborarbeit und beim Anfertigen dieser Dissertation.

Zudem bedanke ich mich bei dem Direktor der III. Medizinischen Klinik für die Möglichkeit, meine Promotion in der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn meinem Betreuer, der die Entstehung dieser Arbeit durch kompetentes Anleiten, Erklären und zusätzliche Ideen unterstützt hat.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, das regelmäßige Feedback und die Hilfsbereitschaft.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt haben und meinem lieben Ehemann, der mich stets motiviert hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.