

Aus dem Institut für Pharmakologie und der III. Medizinischen Klinik der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Die Bedeutung von Aminosäuretransportern und
endogener Synthese für die Bereitstellung von Arginin in
humanen T-Lymphozyten und chronischen lymphatischen
Leukämiezellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anke Werner

geboren am 29.05.1982
in Lahnstein

Mainz, 2020

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2020

“It doesn’t matter how beautiful your theory is, it doesn’t matter how smart you are. If it doesn’t agree with experiment, it’s wrong”

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	X
Abstract.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Rolle der Aminosäure L-Arginin für die Funktion humaner T-Lymphozyten	1
1.1.1 T-Lymphozyten.....	1
1.1.2 Die Aminosäure L-Arginin und der Argininstoffwechsel.....	3
1.1.3 Die Bedeutung von Arginin für die T-Zellfunktion	5
1.1.4 Arginintransporter	7
1.1.4.1 Die kationischen Aminosäuretransporter	8
1.1.4.2 Die Transporter y^+LAT1 und y^+LAT2	11
1.1.4.3 Der Transporter $b^{0,+}AT$	12
1.1.4.4 Der Transporter $ATB^{0,+}$	13
1.1.5 Die Versorgung humaner T-Lymphozyten mit Arginin durch intrazelluläre Synthese aus der neutralen Aminosäure Citrullin	13
1.2 Arginindepletion als neuer Ansatz für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie	14
1.2.1 Die chronische lymphatische Leukämie	14
1.2.2 Arginindepletion als Strategie für die Krebstherapie.....	16
1.2.3 Canavanin	18
2 Ziel der Arbeit.....	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Laborgeräte.....	22
3.2 Chemikalien	22
3.3 Zellbiologische Methoden	23
3.3.1 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien	23
3.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer Zählkammer	25
3.3.3 Kryokonservierung von Zellen.....	25

3.3.4	Isolation von PBMCs aus humanem Vollblut.....	26
3.3.5	Isolation und Stimulation humaner CLL-Zellen.....	26
3.3.6	Isolation humaner T-Lymphozyten.....	27
3.3.7	Stimulation von humanen T-Lymphozyten	28
3.3.8	Feststellung der Zellproliferation mittels [³ H]Thymidineinbau	29
3.3.9	Nachweis der metabolischen Aktivität mittels MTS	29
3.3.10	Nachweis von Interferon- γ durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ...	29
3.3.11	Durchflusszytometrischer Nachweis von Zytokinen	31
3.3.12	Feststellung der Zellviabilität durch Annexin- und Propidiumiodidfärbung.....	31
3.3.13	Transportstudien mit Zellen	32
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	34
3.4.1	Gewinnung von Proteinen und Bestimmung der Proteinkonzentrationen durch das BCA-Assay	34
3.4.2	Glykosidasebehandlung von Proteinen.....	35
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.4.4	Western Blot-Analysen	37
3.4.5	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	40
3.5	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	41
3.5.1	RNA-Isolation aus Zellen	41
3.5.2	Reverse Transkription.....	41
3.5.3	Quantitative real time-PCR	42
3.5.4	Einbringung einer siRNA in primäre humane T-Lymphozyten mittels Nukleofektion	46
3.5.5	Einbringung einer shRNA in humane immortalisierte Zellen durch lentivirale Transduktion.....	47
3.5.6	Zusammenlagerung von Oligonukleotiden	49
3.5.7	Restriktion von DNA	49
3.5.8	Agarosegelelektrophorese	50
3.5.9	Isolation von DNA aus einem Agarosegel.....	50
3.5.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	51
3.5.11	Hitzeschocktransformation.....	51
3.5.12	Plasmidpräparation.....	52
3.5.13	Plasmid-Linearisierung und <i>in vitro</i> Transkription.....	52
3.6	Transportstudien mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	53
3.6.1	Inkubation und Kollagenasebehandlung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	53
3.6.2	Injektion von cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	54
3.6.3	Transportstudien mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	55
3.7	Ein CLL-Xenograftmodell.....	56

3.8	Statistik	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Für die effiziente Proliferation humaner stimulierter T-Lymphozyten ist der hCAT-1-vermittelte Arginintransport essentiell.....	58
4.1.1	Die Proliferation und IFN- γ -Sekretion humaner T-Lymphozyten sind stark abhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins.....	58
4.1.2	Unter Stimulation ist die Expression des hCAT-1 in humanen T-Lymphozyten, unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration, stark induziert	59
4.1.3	Das Expressionsmuster der Arginintransporter in verschiedenen T-Zell-Subgruppen stimmt mit dem der T-Zell-Gesamtpopulation überein.....	65
4.1.4	Der hCAT-1 ist in stimulierten T-Lymphozyten in der Plasmamembran lokalisiert, unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins	69
4.1.5	In stimulierten T-Lymphozyten ist der CAT-vermittelte Arginintransport stark induziert.....	71
4.1.6	Die Reduktion der hCAT-1-Protein-Expression vermindert die T-Zellproliferation, aber nicht deren Zytokinsekretion	74
4.2	Identifizierung des System L-Transporters LAT1 als hauptverantwortlichen Citrullintransporter in humanen T-Lymphozyten	85
4.2.1	Der Citrullintransport ist argininabhängig in stimulierten T-Lymphozyten induziert ..	86
4.2.2	Citrullin wird in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen in stimulierten T-Lymphozyten zu Arginin metabolisiert.....	88
4.2.3	Ein System L-Transporter ist für den Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich	90
4.2.4	Der System L-Transporter LAT1 ist maßgeblich für den Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich	92
4.2.5	Citrullin wird durch die Transporter LAT1 und LAT2 transportiert.....	93
4.2.6	Die Expression von LAT1 und 4F2hc ist selbst unter Argininmangel in stimulierten T-Lymphozyten induziert.....	95
4.2.7	Die siRNA-vermittelte Reduktion der LAT1-Expression in stimulierten T-Zellen senkt den Citrullintransport auf das Level von unstimulierten Zellen.....	98
4.3	Charakterisierung der Rolle von Arginintransportern in chronischen lymphatischen Leukämiezellen	100
4.3.1	In primären humanen CLL-Zellen sind die Transporter hCAT-1, γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 exprimiert.....	101
4.3.2	Durch Stimulation wird in primären CLL-Zellen die hCAT-1-Expression induziert ..	106
4.3.3	Die Proliferation primärer humaner CLL-Zellen ist abhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins.....	108

4.3.4	Die Argininaufnahme in primären humanen CLL-Zellen ist System y^+ -vermittelt ...	110
4.3.5	Die Arginintransporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 sind in humanen CLL-Zelllinien exprimiert.....	112
4.3.6	Die Viabilität und Proliferation humaner CLL-Zelllinien sind argininabhängig	114
4.3.7	Die Argininaufnahme in CLL-Zellen kann durch NEM und Leucin gehemmt werden	117
4.3.8	Arginin- und Lysinmangel kann in CLL-Zellen durch die Gegenwart von Citrullin und einem Lysintripeptid ausgeglichen werden	120
4.3.9	In humanen HG3-CLL-Zellen wird die ASS erst unter Argininmangel induziert	121
4.3.10	In primären CLL-Zellen ist die ASS nicht exprimiert	123
4.3.11	Die hCAT-1-Expression kann shRNA-vermittelt in CLL-Zellen reduziert werden...	124
4.3.12	Der hCAT-1 knock-out in humanen HG3-Zellen beeinflusst auch die Expression von y^+ L-Transportern.....	125
4.3.13	Die Reduktion der hCAT-1-Expression in HG3-Zellen führt zu einer Senkung der Argininaufnahme und Inhibition der Proliferation.....	127
4.3.14	Herstellung einer HG3-Zelllinie mit einer stabil in das Genom integrierten, Doxyzyklin-induzierbaren shRNA gegen hCAT-1.....	130
4.3.15	Die Reduktion der hCAT-1-Expression führt in einem HG3_hCAT-1_ko-Xenograftmodell zu der Verlangsamung des Tumorwachstums.....	134
4.4	Kann die toxische Wirkung der Hemmung der hCAT-1-Expression auf humane CLL-Zellen durch Canavanin verstärkt werden?	137
4.4.1	Canavanin zeigt unter Argininmangel auch in humanen CLL-Zellen zytotoxische Wirkung	138
5	Diskussion.....	142
5.1	Der kationische Aminosäuretransporter-1 (hCAT-1) ist als Arginin-Importeur für die T-Zell-Proliferation unentbehrlich.....	142
5.2	Identifikation des System L-Transporters LAT1 als Citrullintransporter in primären humanen stimulierten T-Lymphozyten	149
5.3	Identifikation des hCAT-1 als neue Zielstruktur für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie	154
5.4	Ausblick	161
	Literaturverzeichnis.....	164
	Anhang	194
	Teilveröffentlichungen dieser Arbeit	205

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Micromolar
4F2hc	4F2 heavy chain
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of variance
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatsynthetase
AT	Aminosäuretransporter
B2M	β ₂ -Mikroglobulin
BCH	2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptan-2-carboxylat
CAT	kationischer Aminosäuretransporter (Cationic amino acid transporter)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	Zählrate pro Minute (Counts per minute)
cRNA	complementary RNA
CT	Schwellenwert-Zyklus (Cycle threshold)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dpm	Zerfall pro Minute (Decay per minute)
ECL-Reagenz	Enhanced chemiluminescence-Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2α	eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 2α
FBS	fötale Rinderserum (Fetal bovine serum)
g	Gramm
<i>g</i>	gravity
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2-Kinase	General control nonderepressible 2-Kinase

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
hCAT	humaner CAT
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
IC ₅₀	Konzentration eines Hemmstoffs, bei welcher eine 50%ige Inhibition erzielt wird
IFN	Interferon
IL	Interleukin
k.o.	knock-out
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LAT	System L Aminosäuretransporter
LN	Lymphknoten (Lymph node)
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleimid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric oxide)
NOS	NO-Synthasen
NTPs	Nukleosidtriphosphate
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	peripheres Blut
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral blood mononuclear cells)

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbolmyristataacetat
pmol	Picomol
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SLC	Solute carrier
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TGF	Transforming growth factor
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	transfer RNA
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VSV-G	Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus
y ⁺ LAT	System y ⁺ L Aminosäuretransporter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Separation von Blutbestandteilen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	26
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung der Einzelkomponenten des Western Blot-Sandwichs.	38
Abbildung 3: Die Proliferation und Interferon- γ -Sekretion humaner T-Lymphozyten sind argininabhängig.....	59
Abbildung 4: Die hCAT-1-mRNA-Expression ist unter Stimulation in humanen T-Lymphozyten stark induziert.....	61
Abbildung 5: Die hCAT-1-mRNA-Expression in humanen stimulierten T-Lymphozyten ist selbst unter Argininmangel auf einem hohen Level.	62
Abbildung 6: Die hCAT-1-Protein-Expression ist selbst unter Argininmangel in stimulierten T-Lymphozyten stark induziert.....	63
Abbildung 7: Bereits nach 3-stündiger Stimulation ist die hCAT-1-mRNA-Expression in humanen T-Lymphozyten stark induziert.	64
Abbildung 8: Die hCAT-1-Protein-Expression ist bereits nach 4-stündiger Stimulation in humanen T-Lymphozyten stark induziert.	65
Abbildung 9: Die Proliferation und Interferon- γ -Sekretion von CD4 ⁺ -naïven und CD4 ⁺ -Gedächtnis-T-Zellen sind argininabhängig.....	67
Abbildung 10: Die Expressionslevel der Arginintransporter sind vergleichbar in CD4 ⁺ -naïven und CD4 ⁺ -Gedächtnis-T-Zellen.	69
Abbildung 11: Das hCAT-1-Protein ist in stimulierten T-Zellen, unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration, in der Membran lokalisiert.....	71
Abbildung 12: Die Argininaufnahme ist in humanen T-Lymphozyten stimulationsabhängig, aber unbeeinflusst von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins induziert.	72
Abbildung 13: In humanen T-Lymphozyten führt die Verlängerung der Stimulationszeit, unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins, zu der Steigerung der Argininaufnahme.....	73
Abbildung 14: In stimulierten T-Lymphozyten wird die Argininaufnahme durch NEM stark inhibiert.	74
Abbildung 15: In stimulierten T-Lymphozyten kann die hCAT-1-Expression siRNA-vermittelt reduziert werden.	75
Abbildung 16: Die Variation der Elektroporationsparameter führt nicht zu der weiteren Reduktion der hCAT-1-Expression.....	76

Abbildung 17: Die Transfektion der siRNA hCAT1_b in humane T-Lymphozyten reduziert am effizientesten die Expression des hCAT-1.	77
Abbildung 18: 24 Stunden nach siRNA-Transfektion ist die hCAT-1-Protein-Expression vergleichbar mit dieser in unstimulierten T-Lymphozyten.....	79
Abbildung 19: Die Elektroporation humaner T-Lymphozyten in der Abwesenheit einer siRNA hat keinen Einfluss auf die hCAT-1-Expression.	80
Abbildung 20: Durch die Herabregulation der hCAT-1-Protein-Expression wird auch die Argininaufnahme in stimulierten T-Zellen reduziert.	82
Abbildung 21: Die Herabregulation der hCAT-1-Expression resultiert in der Reduktion der T-Zellproliferation.	83
Abbildung 22: Die Herabregulation der hCAT-1-Expression hat keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion stimulierter T-Lymphozyten.	85
Abbildung 23: Der Citrullintransport ist argininabhängig in stimulierten T-Zellen induziert.	88
Abbildung 24: In der Gegenwart von 20 μ M Arginin wird Citrullin in humanen stimulierten T-Zellen intrazellulär zu Arginin metabolisiert, nicht aber unter komplettem Argininmangel.....	89
Abbildung 25: Der Citrullintransport in humanen stimulierten T-Zellen ist mit den Transporteigenschaften des System L vereinbar.....	92
Abbildung 26: Citrullin ist ein Substrat für die System L-Transporter LAT1 und LAT2.	94
Abbildung 27: LAT1- und LAT2-vermittelter [³ H]Leucin-Transport wird durch Citrullin kompetitiv inhibiert.....	95
Abbildung 28: Die LAT1- und 4F2hc-mRNA-Expression ist in humanen T-Lymphozyten bereits nach 6-stündiger Stimulation stark induziert.....	97
Abbildung 29: In stimulierten T-Lymphozyten ist die LAT1- und 4F2hc-Protein-Expression selbst unter absolutem Argininmangel induziert.	98
Abbildung 30: Die siRNA-vermittelte Senkung der LAT1-Expression resultiert in der Reduktion der Citrullin-Aufnahme in stimulierten T-Zellen.	100
Abbildung 31: In primären CLL-Zellen sind die Arginintransporter hCAT-1, γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 exprimiert.....	104
Abbildung 32: Die hCAT-1-, γ^+ LAT1- und γ^+ LAT2-Protein-Expression variiert zwischen CLL-Patienten.....	106
Abbildung 33: In humanen primären CLL-Zellen ist die hCAT-1-mRNA-Expression durch TLR9-Stimulation induzierbar.	107
Abbildung 34: In humanen primären CLL-Zellen ist die hCAT-1-Protein-Expression durch TLR9-Stimulation induzierbar.	108

Abbildung 35: Die Proliferation primärer stimulierter CLL-Zellen ist argininabhängig.....	110
Abbildung 36: Die Argininaufnahme in humanen primären CLL-Zellen ist y^+ -vermittelt. ..	112
Abbildung 37: In CLL-Zelllinien ist die mRNA der Arginintransporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 stark exprimiert.	113
Abbildung 38: In CLL-Zelllinien sind die Arginintransporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 auch auf Proteinebene stark exprimiert.	114
Abbildung 39: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 sind argininabhängig.	115
Abbildung 40: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie MEC1 sind argininabhängig.	116
Abbildung 41: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie JVM-2 sind argininabhängig.	117
Abbildung 42: Der Arginintransport ist in HG3-CLL-Zellen induziert.	118
Abbildung 43: In HG3-Zellen wird der Arginintransport durch NEM und Leucin gehemmt.	119
Abbildung 44: Unter Argininmangel kann die Proliferation humaner HG3-CLL-Zellen durch die Substitution von Citrullin und einem Lysintri-peptid aufrechterhalten werden. ..	121
Abbildung 45: In HG3-Zellen wird die ASS erst unter Argininmangel induziert.	123
Abbildung 46: In primären CLL-Zellen wird die ASS auch unter Argininmangel nicht exprimiert.	124
Abbildung 47: Die hCAT-1-Expression in HG3-Zellen kann durch die lentivirale Transduktion einer hCAT-1-shRNA effizient reduziert werden.	125
Abbildung 48: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu einer Steigerung der y^+ LAT2-mRNA-Expression.	126
Abbildung 49: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu einer schwachen Absenkung der y^+ LAT1-Protein-Expression.	127
Abbildung 50: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu der Senkung des System y^+ -vermittelten Arginintransports in HG3-Zellen.	128
Abbildung 51: Die shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt in HG3-Zellen zu einer kompletten Inhibition der Proliferation und der Senkung der Viabilität.	130
Abbildung 52: Schematische Darstellung des LTR-flankierten Ausschnitts des Vektors pLKO-tet-on mit integrierter shRNA gegen hCAT-1.	131

Abbildung 53: Die Doxyzyklin-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt in HG3-Zellen zu einer kompletten Inhibition der Proliferation und der Senkung der Viabilität.	134
Abbildung 54: Die Doxyzyklin-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt <i>in vivo</i> zu der Verzögerung des Tumorwachstums.....	136
Abbildung 55: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 kann unter Argininmangel durch physiologische Citrullinkonzentrationen nicht aufrechterhalten werden.....	137
Abbildung 56: Canavanin reduziert unter Argininmangel die Viabilität, die metabolische Aktivität und die Proliferation von HG3-Zellen.	140
Abbildung 57: Unter Arginindepletion induziert Canavanin in HG3-Zellen den programmierten Zelltod.	141
Abbildung 58: Der hCAT-1-vermittelte Arginintransport ist eine bedeutende Komponente für die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten.	149
Abbildung 59: In stimulierten T-Lymphozyten wird die Citrullinaufnahme durch den System L-Transporter LAT1 vermittelt.	154
Abbildung 60: Der CAT-1 ist eine neue Zielstruktur für die Therapie der CLL und anderer Arginin-auxotropher Tumore.	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Natrium-Abhängigkeit und Substratprofile der Transportsysteme für neutrale Aminosäuren.	14
Tabelle 2: verwendete Laborgeräte	22
Tabelle 3: Zusammensetzung der genutzten Zellkulturmedien.	23
Tabelle 4: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie HG3.....	24
Tabelle 5: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie MEC1.....	24
Tabelle 6: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie JVM-2.....	25
Tabelle 7: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie HEK293T.....	25
Tabelle 8: Zusammensetzung des für die T-Zellisolation mit dem Pan T cell Isolation Kit II verwendeten Puffers.....	28
Tabelle 9: Für den IFN- γ -ELISA verwendete Puffer.	30
Tabelle 10: Pipettierschema der IFN- γ -Standardreihe für den ELISA.	31
Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer und Aufnahmelösungen für die Transportstudien mit Zellen.	34
Tabelle 12: Zusammensetzung des verwendeten Puffers für den Zellaufschluss für Proteinanalysen.	35
Tabelle 13: Pipettierschema für die BSA-Standardreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
Tabelle 14: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Puffer.....	37
Tabelle 15: Zusammensetzung des zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE.	37
Tabelle 16: Zusammensetzung der für die Western Blot-Analysen verwendeten Puffer.	39
Tabelle 17: Für den Nachweis von Proteinen in Western Blot-Analysen verwendete Primärantikörper	39
Tabelle 18: In Western Blot-Analysen verwendete Sekundärantikörper.....	40
Tabelle 19: Zusammensetzung der für die Biotinylierung der Oberflächenproteine verwendeten Puffer.	41
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	42
Tabelle 21: Programm für die cDNA-Synthese.	42
Tabelle 22: Sequenzen der für die real time-PCR genutzten Oligonukleotide.	44
Tabelle 23: Zusammensetzung des für die quantitative real time-PCR verwendeten Puffers.	44
Tabelle 24: Reaktionsansatz für die quantitative real time-PCR.	45
Tabelle 25: Programmablauf für die quantitative real time-PCR.....	45

Tabelle 26: Für die cRNA-Synthese verwendeten Plasmidkonstrukte sowie die für die Linearisierung dieser Konstrukte eingesetzten Restriktionsenzyme und die Nukleotidanzahl der kodierenden Region.	45
Tabelle 27: Pipettierschema für die cRNA-Verdünnungsreihe für die Quantifizierung der Transporter-mRNA.	46
Tabelle 28: Bezeichnung, Sequenz und Hersteller der verwendeten siRNAs.	47
Tabelle 29: Plasmidkonstrukte für die lentivirale Einschleusung einer konstitutiv exprimierten shRNA gegen hCAT1 und einer non-target-RNA.	48
Tabelle 30: Plasmidkonstrukte für die lentivirale Einschleusung einer induzierbar-exprimierten shRNA gegen hCAT-1 und einer non-target-RNA.	49
Tabelle 31: Zusammensetzung des für die Zusammenlagerung der Oligonukleotide genutzten Puffers.	49
Tabelle 32: Zusammensetzung des für die Agarosegelelektrophorese genutzten Puffers.	50
Tabelle 33: Zusammensetzung der für die Kultivierung von Bakterien verwendeten Medien.	52
Tabelle 34: Für die cRNA-Synthese verwendete Plasmidkonstrukte sowie die für die Linearisierung dieser Konstrukte eingesetzten Restriktionsenzyme.....	53
Tabelle 35: Zusammensetzung des zum Lösen der DNA verwendeten Puffers.	53
Tabelle 36: Zusammensetzung der für die Kultivierung und Kollagenase-Behandlung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten genutzten Puffer und Medien.	54
Tabelle 37: Zusammensetzung der für die Transportstudien mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten verwendeten Aufnahmelösungen und Puffer.	56
Tabelle 38: Natriumabhängigkeit und Substratprofil der Transportsysteme für neutrale Aminosäuren und die Resultate der Citrullintransport-Analysen in stimulierten T-Lymphozyten.....	91
Tabelle 39: Substratprofil der System L-Transporter und die Resultate der Citrullin-Transportstudien mit stimulierten T-Lymphozyten.	93
Tabelle 40: Alter, Monate seit Diagnose, Anzahl der Therapielinien, Leukozytenzahl im peripheren Blut und zytogenetische Auffälligkeiten der CLL-Zellspender.....	102

Zusammenfassung

Die kationische Aminosäure Arginin ist als Proteinbaustein und Vorstufe von Signalmolekülen für alle Zellen in unserem Körper unentbehrlich. In Tumoren oder entzündlichen Geweben herrscht jedoch durch die Akkumulation Arginase-exprimierender myeloider Zellen Argininmangel, weshalb die Proliferation und IFN- γ -Sekretion von T-Lymphozyten in dieser Umgebung stark eingeschränkt ist. Demnach spielt die Aufnahme von Arginin für die adäquate T-Zellfunktion eine unverzichtbare Rolle. Trotzdem war der verantwortliche Transporter bislang unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Identifizierung des kationischen Aminosäuretransporter-1 (hCAT-1) als hauptverantwortlichen Arginintransporter in primären humanen T-Lymphozyten. Transporter-Expressionsanalysen zeigten eine starke Expression des hCAT-1 in anti-CD3/anti-CD28-stimulierten T-Zellen. Zwei weitere Arginin-akzeptierende Transporter waren ebenfalls exprimiert, jedoch stimulationsunabhängig. In aktivierten T-Lymphozyten wurde ein starker CAT-charakteristischer Arginintransport festgestellt. Die signifikant reduzierte Argininaufnahme nach siRNA-vermittelter Hemmung der hCAT-1-Expression bestätigte schließlich diesen Transporter als hauptverantwortlichen Arginintransporter in stimulierten T-Lymphozyten. Vergleichbar mit der Inkubation unter Argininmangel resultierte die Senkung des Argininimports in der ausgeprägten Reduktion der Proliferation dieser Immunzellen. Die hCAT-1-vermittelte Argininaufnahme ist demnach als Schlüsselement für die adäquate T-Zellfunktion zu betrachten. Ergänzend dazu wurde in der Arbeitsgruppe [REDACTED] gezeigt, dass humane T-Lymphozyten, neben der Aufnahme von extrazellulärem Arginin, diese Aminosäure für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation auch intrazellulär über die Harnstoffenzyme Argininosuccinatlyase und Argininosuccinatsynthetase (ASS) aus der neutralen Aminosäure Citrullin synthetisieren können. Voraussetzung dafür ist jedoch die Anwesenheit geringer Mengen extrazellulären Arginins. Ausschließlich unter dieser Bedingung zeigten HPLC-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit die intrazelluläre Zunahme der Aminosäure Arginin nach Inkubation dieser Immunzellen mit 1 mM Citrullin. Erklärt werden können diese Ergebnisse durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe [REDACTED], die in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen, nicht jedoch unter vollständigem Argininmangel, die maximale ASS-Protein-Expression in stimulierten T-Zellen feststellte. Welcher Transporter für die Aufnahme von Citrullin in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist, war unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der System L-Transporter LAT1 als hauptverantwortlicher Citrullintransporter in stimulierten humanen T-Zellen identifiziert. Die Expression dieses Transporters war in aktivierten T-Lymphozyten in der

Gegenwart von 1000 und 20 μM Arginin im Vergleich zu unter vollständigem Argininmangel am stärksten. Dies wurde ebenso für den als System L-spezifisch charakterisierten Citrullinimport festgestellt. Die Reduktion der Citrullinaufnahme nach siRNA-vermittelter Senkung der LAT1-Expression bestätigte diesen Transporter als Haupt-Citrullinimporteureur in humanen T-Lymphozyten. Zusammenfassend wurde demnach im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigt, dass durch die LAT1-vermittelte Citrullinaufnahme die Proliferation humaner T-Zellen auch in Arginin-depletierten Tumorgewebe möglich ist.

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) kann bis heute mit konventionellen Therapieansätzen nicht geheilt werden. Argininmangel wird aktuell als die Achillesferse von Tumorzellen diskutiert. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Proliferation und Viabilität humaner CLL-Zellen argininabhängig sind. In primären CLL-Zellen war die ASS nicht exprimiert, demnach diese Zellen, aufgrund der fehlenden intrazellulären Argininsynthese, im Gegensatz zu humanen T-Lymphozyten, Arginin-auxotroph sind. Durch Transporter-Expressionsanalysen, [^3H]Arginin-Aufnahmestudien und shRNA-vermittelte Reduktion des hCAT-1 wurde dieser Transporter auch in CLL-Zellen als Haupteintrittspforte für Arginin identifiziert. Die shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression resultierte in diesen Leukämiezellen in der vollständigen Inhibition der Proliferation *in vitro* und Verlangsamung des Tumorwachstums in CLL-Xenograftmodellen.

Zusammenfassend ist das Ergebnis dieser Arbeit die Ausarbeitung einer neuen vielversprechenden Therapiestrategie für die CLL und andere Arginin-auxotrophe Tumore. Dieses Konzept beruht auf der Induktion eines intrazellulären Argininmangels durch die gezielte Hemmung des verantwortlichen Arginintransporters hCAT-1 bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Proliferation von Tumor-bekämpfenden T-Lymphozyten durch die intrazelluläre Argininsynthese in der Gegenwart der neutralen Aminosäure Citrullin.

Abstract

The cationic amino acid arginine is a building block of proteins and a precursor of signal molecules and therefore indispensable for every cell in our body. However, due the accumulation of arginase-expressing myeloid cells, tumors and inflammatory tissues are depleted of arginine. Under this condition, T cell proliferation and IFN- γ secretion are strongly restricted. Hence, the uptake of extracellular arginine must be crucial for efficient T cell function. However, the responsible arginine transporter was unknown so far. In this thesis, the human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1) has been identified as mainly responsible for arginine transport in primary human T lymphocytes. Transporter expression analysis showed a strong induction of hCAT-1 in anti-CD3/anti-CD28-stimulated T lymphocytes. Only two other arginine-accepting transporters were expressed, but they were not induced upon stimulation. Activated T cells exhibited strongly increased arginine transport, which was distinguished as characteristic for CATs. The substantially reduced arginine uptake after siRNA-mediated down-regulation of hCAT-1 expression confirmed this transporter as primarily responsible for arginine import in stimulated T lymphocytes. Comparable with arginine starvation, the lowering of arginine import provoked a strong reduction in the proliferation of these immune cells. We can thus conclude, that the hCAT-1-mediated arginine uptake is a key component for efficient T cell function. Additionally, the intracellular synthesis of arginine from the neutral amino acid citrulline via the urea cycle enzymes argininosuccinate lyase and argininosuccinate synthetase (ASS) to maintain T cell proliferation was shown in collaboration with the group of [REDACTED]. The requirement for this is the presence of small quantities of extracellular arginine. Exclusively under this condition, HPLC analyses revealed the enhancement of intracellular arginine in T cells, incubated with 1 mM citrulline. This could be explained by studies, performed by the group of [REDACTED], which showed a maximum of ASS protein expression in the presence of low arginine concentrations, but not upon complete arginine depletion. The transporter, responsible for citrulline import in human T lymphocytes was unknown so far. In this thesis the system L transporter LAT1 was identified as primarily responsible citrulline transporter in stimulated human T cells. LAT1 expressions was strongest in T lymphocytes, incubated in the presence of 1000 and 20 μ M arginine, compared to complete arginine depletion. This was also true for the citrulline transport in these cells, which exhibited system L-specific characteristics. Finally, the lowering of citrulline uptake after siRNA-mediated reduction of LAT1 expression, confirmed this transporter as

primarily responsible for citrulline import in stimulated human T cells. In summary, the second part of this thesis showed the potential of human T cells to proliferate also in arginine-depleted tumor tissues by the means of LAT1-mediated citrulline uptake.

Until today, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is incurable by conventional treatment strategies. Arginine starvation is currently discussed as the Achilles heel of tumor cell growth. In the third part of this thesis, the proliferation and viability of human CLL cells were shown to be dependent on arginine. In primary CLL cells ASS was not expressed, thus intracellular arginine synthesis is not possible in these cells. This defines primary CLL cells, in contrast to human T cells, as arginine auxotrophic. By the analyses of transporter expression, [³H]arginine uptake studies and the shRNA-mediated reduction of hCAT-1 expression, this transporter was identified as the main port of entry for arginine also in human CLL cells. In these leukemia cells the shRNA-mediated reduction of hCAT-1 expression resulted in the complete inhibition of proliferation *in vitro* and the delay of tumor growth in CLL xenograft models.

In summary, this work revealed a new promising target for CLL treatment and other arginine auxotrophic tumors. This concept is based on an induction of intracellular arginine starvation by the selective inhibition of the arginine transporter hCAT-1, and a simultaneous maintenance of tumor fighting T cell proliferation via intracellular arginine synthesis in the presence of the neutral amino acid citrulline.

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der Aminosäure L-Arginin für die Funktion humaner T-Lymphozyten

1.1.1 T-Lymphozyten

Jeden Tag kommen wir durch unsere Umwelt in Kontakt mit Viren, Bakterien und anderen Pathogenen, welche bei Eindringen in unserem Körper gewebeschädigende inflammatorische Reaktionen hervorrufen. Ebenso kommt es regelmäßig zu Mutationen in der DNA körpereigener Zellen, welche zu malignen Veränderungen, wie der unkontrolliert gesteigerten Zellproliferation, führen und in der potentiellen Ausbildung von bösartigen Tumoren münden. Tatsächlich allerdings resultiert nur vergleichsweise selten der Kontakt zu Krankheitserregern in ausgeprägten entzündlichen Reaktionen oder die pathologische Veränderung körpereigener Zellen in der Manifestation von Tumoren. Der Grund dafür ist unser Immunsystem. Dieses ist auf die Erkennung sowohl körperfremder Pathogene als auch pathologisch-veränderter körpereigener Zellen spezialisiert und wehrt diese durch Elimination ab.

T-Lymphozyten (auch: T-Zellen) bilden gemeinsam mit den B-Lymphozyten (auch: B-Zellen) das adaptive Immunsystem unseres Körpers. Die T-Zell-Vorläuferzellen werden, wie andere Hämatozyten, aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet, differenzieren jedoch erst im Thymus durch die Ausstattung mit spezialisierten membranständigen Proteinen, den T-Zellrezeptoren, zu reifen T-Lymphozyten aus. Diese werden schließlich in den Blutkreislauf entlassen und zirkulieren bis zu ihrem ersten Kontakt mit einem spezifischen Antigen zwischen den peripheren Lymphorganen (Murphy, 2009, Kapitel 7). Antigene werden an spezialisierten Glykoproteinen, sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (Major histocompatibility complex, MHC) an der Oberfläche körpereigener Zellen präsentiert und über die bereits erwähnten T-Zellrezeptoren von T-Lymphozyten erkannt. Dies resultiert in der Differenzierung der, bis zu diesem Zeitpunkt als naiv bezeichneten, T-Lymphozyten zu stark proliferierenden und Zytokin-ausschüttenden Effektorzellen. Nach der Erkennung eines Antigens durch den T-Zellrezeptor erfolgt die Signalübertragung in das Zellinnere über den, dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex, welcher aus den Proteinketten γ - und δ -, sowie jeweils zwei ϵ - und ζ -Ketten zusammengesetzt ist (Baniyash, 2004; Murphy, 2009). Neben dem T-Zellrezeptor-vermittelten Signal spielt für die effiziente Stimulation von T-Lymphozyten

ebenso die Bindung der T-Zell-Oberflächenproteine CD4 beziehungsweise CD8 an MHC-Moleküle eine entscheidende Rolle (Murphy, 2009, Kapitel 3).

Je nach Ursprung werden Antigene auf verschiedenen MHC-Molekülen präsentiert und ebenso durch unterschiedliche T-Zellsubgruppen erkannt. Antigene von Erregern, welche durch sogenannte antigenpräsentierende Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen) phagozytiert wurden, werden durch MHC-Klasse-II-Moleküle an deren Oberfläche präsentiert und durch CD4⁺-T-Lymphozyten erkannt. CD4⁺-T-Lymphozyten können sich in zwei verschiedene Effektorzellen differenzieren, T_H1 und T_H2-Zellen. T_H1-Zellen sezernieren vorwiegend die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α und - β (TNF- α/β), Interleukin-3 (IL-3) und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Ihre Hauptaufgabe ist die Initiierung der zellulären Immunantwort über die Aktivierung von Makrophagen durch IFN- γ (Abbas, 1996; Murphy, 2009, Kapitel 8). Hingegen stimulieren T_H2-Zellen durch die Sezernierung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 B-Lymphozyten, welche daraufhin zu Antikörper-bildenden Plasmazellen differenzieren (Abbas, 1996; Zanon, 2017). Dies wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Antigene, welche aus sich intrazellulär vermehrenden Erregern oder aus körpereigenen Tumorzellen stammen, werden über MHC-Klasse-I-Moleküle von CD8⁺-T-Zellen erkannt. Diese entwickeln sich daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen, deren Hauptaufgabe die Elimination Viren- und Bakterien-infizierter oder tumoröser körpereigener Zellen ist (Murphy, 2009, Kapitel 5). Dies bewerkstelligen sie vorwiegend durch die Induktion einer Granzym- oder Fas-Ligand (CD95L)-vermittelten Caspase-induzierten Apoptose in den jeweiligen Zielzellen. Darüber hinaus sezernieren zytotoxische T-Lymphozyten das Zytokin IFN- γ , wodurch es zu der Aktivierung phagozytierender Makrophagen am Infektionsherd kommt (Murphy, 2009, Kapitel 5). Für die Aktivierung naïver T-Zellen sind neben dem T-Zellrezeptor, CD4 und CD8 noch weitere ko-stimulierende Strukturen von Bedeutung. Der bekannteste ko-stimulierende Rezeptor ist das Oberflächenmolekül CD28, welches die Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen erkennt (Murphy, 2009, Kapitel 6).

Nach erfolgreicher Elimination eines Pathogens durch das adaptive Immunsystem kommt es in der Mehrzahl der Effektorzellen zu der Induktion der Apoptose, woraufhin sie durch Makrophagen phagozytiert werden. Einige wenige T-Effektorzellen bleiben allerdings erhalten und bilden so als T-Gedächtniszellen das immunologische Gedächtnis, was eine schnellere Reaktion auf ein bereits bekanntes Antigen ermöglicht (Murphy, 2009, Kapitel 10).

1.1.2 Die Aminosäure L-Arginin und der Argininstoffwechsel

Aminosäuren sind als Bausteine von Proteinen, Vorstufen von Metaboliten und auch als Signalmoleküle in zahlreiche Stoffwechselwege involviert und stellen somit eine bedeutende Klasse von Nährstoffen dar. Demnach sind sie für die effiziente Funktion, die Proliferation und das Überleben jeder Zelle unentbehrlich. Die kationische Aminosäure L-Arginin wurde bereits im Jahr 1886 aus Lupinenkeimlingen isoliert und nur kurze Zeit später als Baustein von Proteinen identifiziert (Wu, 1998). Grundsätzlich unterscheidet man, im Hinblick auf die menschliche Ernährung, essentielle von nicht-essentiellen Aminosäuren. Als essentiell ist eine Aminosäure definiert, wenn diese nicht von unserem Körper synthetisiert werden kann und diesem somit über die Nahrung zugeführt werden muss. Bei L-Arginin (nachfolgend als Arginin bezeichnet) handelt es sich um eine semi-essentielle Aminosäure, da der Plasma-Argininspiegel (80 bis 120 μM (Brosnan, 2004; Lüneburg, 2011; Morris Jr, 2007)) zwar unter physiologischen Bedingungen durch intrazelluläre *de novo* Synthese, sowie autophagischen Proteinabbau aufrecht erhalten werden kann (Morris, 2017; Vissers, 2004; Wu, 1998), dies aber in Stresssituation wie Sepsis, Tumorerkrankungen, nach Transplantationen oder bei Funktionsstörungen der Enzyme des Harnstoffzyklus nicht ausreicht (Brusilow, 1984; Davis, 2011; Kirk, 1990; van Vught, 2013; Zea, 2005). Demnach muss Arginin unter diesen Bedingungen durch die Nahrung supplementiert werden. In Nahrungsmitteln, wie Fleisch und Nüssen ist Arginin in hohen Mengen enthalten, wodurch ein Erwachsener durchschnittlich 4 bis 5 Gramm am Tag zu sich nimmt (Brosnan, 2004). Durch die Nahrung aufgenommenes Arginin wird direkt resorbiert, wobei etwa 60 % in die Blutbahn gelangen, wohingegen die verbleibenden 40 % (hauptsächlich) in der Leber durch Enzyme des Harnstoffzyklus zu Citrullin, Ornithin und Prolin metabolisiert werden (Castillo, 1993; Windmueller, 1976). Die intrazelluläre *de novo* Argininsynthese findet überwiegend über die intestinale-renale Achse aus der neutralen Aminosäure Citrullin, einem Zwischenprodukt des Glutamin-Metabolismus, statt. Bei Erwachsenen entspricht dies 5-15 % des gesamten Plasma-Arginins (Morris, 2017; Phillips, 2013; Wu, 1998). Citrullin ist eine neutrale, nicht-proteinogene Aminosäure und wurde erstmals aus dem Saft der Wassermelone gewonnen, in welcher es in großer Menge enthalten ist (Curis, 2005; Gornall, 1939; Tedesco, 1984). *De novo* synthetisiert wird Citrullin hauptsächlich aus Glutamin und Glutamat in den Enterozyten des Dünndarms (Wu, 1998). Darüber hinaus kann Citrullin aus Arginin a) direkt durch das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase oder b) indirekt durch die Harnstoffzyklus-Enzyme Arginase und Ornithincarbamoyltransferase über Ornithin synthetisiert werden (Morris Jr, 2006). Der physiologische Plasma-Citrullinspiegel liegt bei 20-40 μM (Mandel, 2005). Das im

Blutkreislauf zirkulierende Citrullin wird in Zellen des proximalen Tubulus der Niere durch die Harnstoffzyklus-Enzyme Argininosuccinatsynthetase (ASS) und Argininosuccinatlyase (ASL) zu Arginin metabolisiert (Brosnan, 2004; Morris Jr, 2007; Wakabayashi, 1994; Wu, 1998). Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt reagiert Citrullin, katalysiert durch die ASS, mit Aspartat unter ATP-Verbrauch zu Argininosuccinat (Husson, 2003). Im zweiten Schritt entsteht durch die Abspaltung von Fumarat aus Argininosuccinat Arginin. Dieser wird durch die ASL katalysiert (Husson, 2003). Obwohl der vollständige Harnstoffzyklus vorrangig in der Leber abläuft, werden die Enzyme ASS und ASL auch in den meisten anderen Körperzellen exprimiert (Husson, 2003). Zusammenfassend kann Arginin demnach aus 3 verschiedenen Quellen stammen: der aufgenommenen Nahrung, der endogenen Synthese (10-15 %) oder dem autophagischen Proteinabbau (mindestens 80 %) (Morris, 2017).

Arginin ist in zahlreiche Prozesse des Zellmetabolismus eingebunden, was diese Aminosäure essentiell für die effiziente Funktion jeder Zelle macht. Als proteinogene Aminosäure wird Arginin, katalysiert durch die Arginin-tRNA-Synthetase während der Translation in Proteine eingebaut (Morris Jr, 2006). Darüber hinaus spielt Arginin eine Schlüsselrolle in mehreren Stoffwechselwegen. Die bekannteste Gruppe Arginin-metabolisierender Enzyme sind die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Diese metabolisieren Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin (Förstermann, 2012). Bei NO handelt es sich um ein Signalmolekül mit multiplen Funktionen. Es spielt eine Rolle in der Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen, der Regulation des Gefäßtonus im vaskulären System, der zytotoxischen Wirkung von Makrophagen, sowie allgemein bei der mRNA-Transkription, Proteintranslation und post-translationaler Modifikation von Proteinen (Förstermann, 2012). Darüber hinaus wurde für NO eine protektive Wirkung auf Endothelzellen gegenüber Arteriosklerose beschrieben (Förstermann, 2012). Es sind drei NO-Synthasen-Isoenzyme bekannt, die neuronale (nNOS), endotheliale (eNOS) und die durch bakterielles Lipopolysaccharid und Zytokine (LPS, TNF- α , IL-1 und T_H1-Zytokine) induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche sich hauptsächlich durch ihre differentielle Expression in unterschiedlichen Gewebetypen und ihrer Kalziumabhängigkeit voneinander unterscheiden (Förstermann, 2012). Des Weiteren wird Arginin durch das Enzym Arginase zu Harnstoff, der über die Niere ausgeschieden werden kann und Ornithin verstoffwechselt. Dies dient einerseits der Detoxifikation stickstoffhaltiger Abbauprodukte im Rahmen des Harnstoffzyklus (Rodriguez, 2017), andererseits werden aus Ornithin die Aminosäuren Citrullin, Prolin und Glutamat synthetisiert (Morris Jr, 2006; Wu, 1998). Es gibt 2 Isoformen der Arginase, Arginase I und II, welche jeweils durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden und sich durch ihre subzelluläre Lokalisation und die

differentielle Expression in verschiedenen Geweben voneinander unterscheiden. Arginase I ist im Zytoplasma lokalisiert und konstitutiv in murinen und humanen Leberzellen sowie in humanen Granulozyten exprimiert (Munder, 2005; Wu, 1998). Darüber hinaus ist diese durch die TH₂-Zytokine IL-4 und IL-10 oder LPS induzierbar in murinen Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Louis, 1998; Munder, 1999, 2005). Die Arginase II ist in den Mitochondrien, hauptsächlich in Niere, Prostata, Dünndarm, Gehirn, Pankreas und Brustdrüse sowie LPS-induziert in murinen Makrophagen nachgewiesen worden (Choi, 2012; Louis, 1998; Morris Jr, 1997; Munder, 2009). Die zytoplasmatische Arginase I ist in azurophilen Granula gespeichert, was vermutlich die konstitutive Metabolisierung von Arginin inhibiert (Munder, 2005). Durch die Arginase-vermittelte Metabolisierung von Arginin zu Ornithin ist Arginin auch indirekt über die Ornithindecaboxylase in die Polyaminsynthese involviert, welche für das Zellwachstum und die Proliferation eine Rolle spielt (Pegg, 1982). Ein weiteres Arginin-metabolisierendes Enzym ist die Arginin:Glycin-Aminotransferase, welche in den Mitochondrien, überwiegend in Zellen der Niere und des Pankreas lokalisiert ist und maßgeblich an der Kreatinsynthese beteiligt ist (Wu, 1998).

1.1.3 Die Bedeutung von Arginin für die T-Zellfunktion

Eine Antigen-vermittelte Stimulation induziert in T-Lymphozyten erhebliche metabolische Veränderungen, wodurch diese zu stark proliferierenden Effektorzellen differenzieren (Molinier-Frenkel, 2017). Zwangsläufig geht dies mit einem entsprechend gesteigerten Bedarf an Nährstoffen einher (Molinier-Frenkel, 2017). Neben Glukose spielen dabei Aminosäuren eine sehr bedeutende Rolle. 1990 untersuchten Chuang *et. al.* die Proliferation humaner, mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierter T-Lymphozyten jeweils in Abhängigkeit einer von insgesamt 20 getesteten Aminosäuren. Diese Untersuchungen zeigten, dass Arginin, neben 11 weiteren Aminosäuren, für die Proliferation dieser Immunzellen essentiell ist (Chuang, 1990). Argininmangel wird patho-physiologisch in entzündlichen und tumorös-veränderten Geweben durch das Enzym Arginase induziert. Arginase metabolisiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff (Kapitel 1.1.2) und wird von sogenannten „Myeloid-derived suppressor cells“ (MDSC) (Bronte, 2016), aber auch von konventionellen Granulozyten exprimiert (Munder, 2005). Bei MDSCs handelt es sich um eine heterogene Population inkomplett differenzierter myeloider Zellen, welche während patho-physiologischer Prozesse - wie akuter und chronischer Inflammationen, Tumorwachstum, Transplantat-Abstoßungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen - in den betroffenen Geweben akkumulieren (Bronte, 2005; Gabrilovich, 2009; Rodriguez, 2017). Im Rahmen von Tumorerkrankungen stellen MDSCs

einen Teil des Mechanismus dar, durch welchen sich Tumorzellen der Bekämpfung durch das Immunsystem entziehen, dem sogenannten „Tumor escape“. Induziert wird die Arginase I-Expression in murinen myeloiden Zellen durch die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13, sowie durch den „Transforming growth factor“ (TGF)- β , GM-CSF, Katecholamine und Prostaglandine (Bernard, 2000; Boutard, 1995; Corraliza, 1995; Jost, 2003; Munder, 1998). In humanen Granulozyten ist die Arginase I hingegen konstitutiv exprimiert (Munder, 2005). Arginase-induzierte Arginindepletion führt sowohl in humanen als auch in murinen T-Zellen zu einer kompletten Inhibition der Proliferation (Feldmeyer, 2012; Lange, 2017; Munder, 2009; Rodriguez, 2003). In humanen aktivierten T-Lymphozyten wurde unter Argininmangel die Senkung der Zellzyklus-regulierenden Proteine cdk4 und Cyklin D3 beobachtet, was auf einen Zellzyklusarrest in der G₀-G₁ Phase hinweist (Fletcher, 2015; Rodriguez, 2007). Überraschenderweise geht dies allerdings nicht mit der Induktion der Apoptose einher (Feldmeyer, 2012; Fletcher, 2015; Munder, 2006; Rodriguez, 2007; Zea, 2004). Ebenso kommt es unter Argininmangel zu der Senkung der Sekretion verschiedener T-Zell-Zytokine. Sowohl in anti-CD3/anti-CD28- als auch in Antigen-spezifisch-stimulierten humanen T-Zellen wurde unter Arginin-depletierten Bedingungen eine Reduktion der Expression der Zytokine IFN- γ , IL-5, IL-10 und TNF- β beobachtet, wohingegen die Expressionsstärke der Zytokine IL-2, IL-6 und IL-8 Arginin-unabhängig zu sein scheinen (Feldmeyer, 2012; Munder, 2006; Taheri, 2001; Zea, 2004). Dies kann in humanen anti-CD3/-anti-CD28-stimulierten T-Zellen für IFN- γ , IL-5 und IL-10 auf die reduzierte mRNA-Expression unter Argininmangel zurückgeführt werden, während unter denselben Bedingungen die IL-2-mRNA-Expression unverändert bleibt (Munder, 2006; Zea, 2004). Auch in murinen Antigen-stimulierten T-Zellen wurde nach Arginase-vermittelter Arginindepletion die verminderte Sekretion der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 beobachtet (Munder, 2009). Des Weiteren wurde in anti-CD3-stimulierten humanen T-Zellen unter Arginase-induzierter Arginindepletion die reduzierte Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors CD25 festgestellt, demnach die IL-2-Signaltransduktion unter Argininmangel ebenfalls beeinträchtigt ist (Létourneau, 2009; Munder, 2006). Hingegen ist die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 unabhängig von der Anwesenheit Arginins (Cibrián, 2017; Munder, 2006). Dies weist darauf hin, dass der Effekt des Argininmangels auf die T-Zellstimulationskaskade erst nach Stimulation über mehrere Stunden und demnach verzögert einsetzt. Darüber hinaus wurde in zytotoxischen T-Zellen die Reduktion der Granzym B-Sekretion beschrieben (Munder, 2013). Überraschenderweise wurde trotz der teilweisen Einschränkung der Zytokinsekretion unter Argininmangel kein Effekt auf die Zelltoxizität Antigen-spezifisch-stimulierter zytotoxischer T-Zellen festgestellt (Munder, 2013). Ebenso

scheint auch die durch den chemotaktisch wirkenden „Stromal cell-derived factor 1“ (SDF-1 oder CXCL12)-induzierte Migration humaner T-Lymphozyten unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins zu sein (Munder, 2013).

Erste Ansätze für eine Erklärung der eingeschränkten T-Zellfunktion nach Stimulation unter Argininmangel sind bereits vorhanden. In humanen anti-CD3/anti-CD28- oder Antigen-spezifisch-stimulierten T-Lymphozyten wurde die verstärkte Phosphorylierung des Aktin-bindenden Proteins Cofilin festgestellt (Feldmeyer, 2012). Dies resultiert in der eingeschränkten Ausbildung der immunologischen Synapse, dem Ort der Signalübertragung zwischen Antigen-präsentierender Zelle und T-Lymphozyte (Eibert, 2004). Des Weiteren wurde in anti-CD3/anti-CD28-stimulierten humanen und murinen T-Zellen unter Argininmangel die verminderte Expression der CD3 ζ -Kette beobachtet, welche für die Signalübertragung während der T-Zellrezeptor-abhängigen Stimulation eine bedeutende Rolle spielt (Kapitel 1.1.1, (Munder, 2006; Rodriguez, 2003; Zea, 2004)). Die reduzierte Expression der CD3- ζ -Kette wurde in CD4⁺-, CD8⁺-, naiven und in T-Gedächtniszellen gleichermaßen gezeigt (Zea, 2004). Dabei ist die reduzierte Expression der CD3- ζ -Kette nicht auf eine Reduktion der mRNA-Expression oder -Stabilität zurückzuführen, wohingegen jedoch die Translation der CD3- ζ -Kette unter Argininmangel komplett inhibiert zu sein scheint (Zea, 2004).

Umgekehrt wurde eine gesteigerte Viabilität humaner T-Zellen in der Gegenwart von supraphysiologischen Argininkonzentrationen (4 mM) beobachtet. Interessanterweise ging dies in humanen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mit der Verschiebung der Energiegewinnung von der Glykolyse zur mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung einher (Geiger, 2016). Des Weiteren konnte in murinen T-Zellen *in vivo* unter diesen Bedingungen eine gesteigerte anti-tumorale Aktivität nachgewiesen werden (Geiger, 2016).

Zusammenfassend ist demnach die Proliferation und Funktion muriner und humaner T-Lymphozyten über die Verfügbarkeit der Aminosäure Arginin steuerbar. Bislang war nicht bekannt, welcher Transporter für den Arginintransport in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist. Dies soll in Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

1.1.4 Arginintransporter

Neben der intrazellulären Gewinnung durch Proteinabbau oder Neusynthese aus der neutralen Aminosäure Citrullin, ist die Aufnahme von extrazellulärem Arginin der Hauptweg, um diese Aminosäure in den Zellmetabolismus einzuspeisen. Da die Plasmamembran unserer Zellen für hydrophile Substanzen wie Aminosäuren undurchdringbar ist, sind für die Translokation dieser

Moleküle spezialisierte Transportproteine, sogenannte Aminosäuretransporter, in diese integriert. Der Transport von Arginin wurde bereits ausführlich in verschiedenen Zelltypen und Spezies untersucht. Im Rahmen dessen wurden mittels Transportstudien mit radioaktiv-markierten Aminosäuren bislang vier Transportsysteme identifiziert, welche Arginin als Substrat akzeptieren. Dabei handelt es sich um die Systeme y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$ (Closs, 2002). Entsprechend der „Human Genome Organisation“ (HUGO) sind die molekularen Vertreter dieser Transportsysteme den sogenannten „Solute carrier“ (SLC) zugeordnet, wobei die Vertreter des System y^+ , die kationischen Aminosäuretransporter (Cationic amino acid transporter, CATs) CAT-1 (*SLC7A1*), CAT-2A (*SLC7A2*), CAT-2B (*SLC7A2*) und CAT-3 (*SLC7A3*), die System y^+L -Transporter y^+LAT1 (*SLC7A7*) und y^+LAT2 (*SLC7A6*) und der System $b^{0,+}$ -Transporter $b^{0,+}AT$ (*SLC7A9*) der Familie der „Solute Carrier 7“ (SLC7) und der Transporter $ATB^{0,+}$ des Systems $B^{0,+}$ (*SLC6A14*) der SLC6-Familie zugeordnet wurden (Hediger, 2004). Im Folgenden werden die charakteristischen Merkmale der genannten Transporter im Detail beschrieben.

1.1.4.1 Die kationischen Aminosäuretransporter

Aufgrund der hohen Übereinstimmung (58-59%) der Nukleotidsequenzen wurden die Transporter CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3 zu der Familie der kationischen Aminosäuretransporter zusammengefasst (Closs, 2002; Fotiadis, 2013). Sie sind die Haupteintrittspforte für kationische Aminosäuren in nicht-epithelialen Zellen (Closs, 2006). Die Struktur der kationischen Aminosäuretransporter ist aktuell noch nicht identifiziert, allerdings wurden für alle CATs 14 transmembrane Domänen mit einem im Zytoplasma lokalisierten N- und C- Terminus vorausgesagt (Closs, 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass der murine CAT-1 an zwei Aminosäuren glykosyliert ist (Closs, 2006). Vermutet werden Glykosylierungen ebenfalls an jeweils zwei Aminosäuren des CAT-2A und CAT-2B und einer des CAT-3 (Closs, 2006).

Historisch wurden die kationischen Aminosäuretransporter dem System y^+ zugeordnet. Das System y^+ wurde erstmals 1969 von Christensen und Antonioli in Retikulozyten aus Kaninchen beschrieben (Christensen, 1969). Es ist charakterisiert durch den Natrium- und pH-Wert-unabhängigen Transport der kationischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin. Der y^+ -vermittelte Transport der Aminosäure Histidin wurde ebenfalls beschrieben, allerdings ausschließlich bei niedrigen pH-Werten (Closs, 2002; White, 1985). Des Weiteren wird der y^+ -Transport einer Aminosäure durch die Anwesenheit eines Substrats auf der *Trans*-Seite der Plasmamembran begünstigt. Dies wird als *Trans*-Stimulation bezeichnet (Closs, 2002).

Der CAT-1 wurde ursprünglich nicht als Aminosäuretransporter, sondern als Virusrezeptor identifiziert (Albritton, 1989). Die Funktion als Transporter wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu der Arginin- und Histidin-Permease in *Saccharomyces cerevisiae* vermutet und durch Transportstudien in *Xenopus laevis* Oozyten verifiziert (J. W. Kim, 1991; H. Wang, 1991). Im Vergleich zu den anderen CATs stimmen die Transporteigenschaften des CAT-1 am besten mit den Charakteristika des Systems y^+ überein. CAT-1 transportiert Arginin, Lysin und Ornithin mit hoher Affinität. Dementsprechend liegt der K_M -Wert des humanen CAT-1 (hCAT-1) für Arginin bei 0,11 bis 0,16 mM (Closs, 1997). Darüber hinaus akzeptiert der CAT-1 in der Gegenwart niedriger pH-Werte auch Histidin als Substrat (J. W. Kim, 1991; Vekony, 2001). Grundsätzlich funktioniert der CAT-1 als Aminosäureaustauscher. Jedoch ist der Transport kationischer Aminosäuren durch hohe Aminosäurekonzentrationen auf der *Trans*-Seite stimulierbar. Zudem wurde bei negativem Membranpotential die Begünstigung des Substratinflux beobachtet, wodurch es zu der Netto-Aufnahme kationischer Aminosäuren kommt. Demnach kann der CAT-1 auch als Aminosäure-Importer funktionieren (Closs, 1997, 2006; Kavanaugh, 1993). Mit Ausnahme der Leber und der Tränendrüse ist der CAT-1 ubiquitär exprimiert (Closs, 2006; Jäger, 2009). Allerdings schwankt die Expressionsstärke in Abhängigkeit des Gewebe- und Zelltyps (Verrey, 2004). Homozygote CAT-1-defiziente Mäuse sterben bereits einen Tag nach der Geburt. Hingegen zeigen heterozygote Mäuse keinen auffälligen Phänotyp (Perkins, 1997). Todesursache der CAT-1-knock-out-Mäuse ist eine schwere Anämie. Des Weiteren sind die Mäuse insgesamt um 25 % kleiner als die entsprechenden Wildtyptiere. Die normale Entwicklung der meisten Gewebe der CAT-1-defizienten Mäuse bis hin zur Geburt wird durch die vergleichsweise hohe CAT-3-Expression während dieser Phase erklärt (Nicholson, 1998).

Die CAT-1-Expression kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden. In C6 Glioma-Zellen wird die CAT-1-Expression unter Aminosäuremangel durch die Hochregulation der Transkription, der mRNA-Stabilität und der Translation gesteigert (Hatzoglou, 2004). Unter suffizienter Nährstoffversorgung wird die Translation der CAT-1-mRNA in der humanen Leberzelllinie Huh7 durch die Bindung der leberspezifischen mircoRNA-122 an ihre 3'UTR unterdrückt (Bhattacharyya, 2006). Durch Aminosäuremangel und oxidativem Stress wird dieser Effekt jedoch aufgehoben und der CAT-1 translatiert (Bhattacharyya, 2006). Auch die Funktion des CAT-1 kann in Abhängigkeit äußerer Faktoren variieren. Durch die Phorbolmyristataacetat (PMA)-induzierte Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) kommt es zu der Internalisierung des CAT-1. Dies führt in den betroffenen Zellen zu einer Reduktion des CAT-1-vermittelten Arginintransports (Gräf, 2001; Rotmann, 2004, 2007).

Bei den Transportern CAT-2A und CAT-2B handelt es sich um Spleißvarianten desselben Gens, welche sich zwar lediglich durch 42 Aminosäuren voneinander unterscheiden, aber dennoch deutlich in ihren Expressions- und Transportcharakteristika voneinander differieren (Closs, 1997). CAT-2A kommt vorwiegend in der Leber vor, aber ist ebenfalls in der Skelettmuskulatur, der glatten Gefäßmuskulatur, in Kardiomyozyten und im Pankreas nachgewiesen worden (Bhattacharyya, 2006; Fotiadis, 2013; Verrey, 2004). Der CAT-2B ist in den meisten Zelltypen nur nach Behandlung mit bakteriellem Lipopolysaccharid und/oder proinflammatorischen Zytokinen exprimiert. In glatten Muskelzellen aus Rattenaorten und murinen Makrophagen geht dies mit der Induktion der iNOS-Expression und NO-Synthese einher (Baydoun, 1999; Yeramian, 2006). Die Korrelation zwischen der CAT-2B-Expression und NO-Produktion wurde in Makrophagen aus CAT-2B-depletierten Mäusen bestätigt (Nicholson, 2001). Darüber hinaus zeigen homozygote *Slc7a2*-defiziente Mäuse keinen auffälligen Phänotyp (Nicholson, 2001).

hCAT-2A ist ein Transporter mit vergleichsweise niedriger Affinität zu kationischen Aminosäuren (K_M -Wert für Arginin: 3,36 bis 3,9 mM) und wird nur schwach *trans*-stimuliert, ist aber sensibel auf Änderungen des extrazellulären pH-Wertes im Bereich von 5,5 bis 7,5 (Closs, 2002, 1997). Damit stimmen die Transporteigenschaften des hCAT-2A am wenigsten mit diesen des System y^+ überein (Closs, 2006). Hingegen zeigt der CAT-2B eine vergleichsweise höhere *Trans*-Stimulierbarkeit sowie Affinität zu kationischen Aminosäuren (K_M -Wert für Arginin: 0,32-0,73 mM). Die Sensibilität gegenüber pH-Wert-Schwankungen ist vergleichbar mit der des CAT-2A (Closs, 2002, 1997).

Mit den Eigenschaften des System y^+ übereinstimmend, ist der Transport kationischer Aminosäuren durch den CAT-3 weder Natrium- noch pH-Wert-abhängig, und - wenn auch nur moderat - *trans*-stimulierbar. Die K_M für Arginin liegt bei 40-120 μ M, was den CAT-3 als hoch-affinen Arginintransporter identifiziert (Vekony, 2001). CAT-3 ist während der Embryogenese in Mäusen stark exprimiert und scheint demnach während der frühen Entwicklung eine große Rolle zu spielen (Closs, 2006; Ito, 1997; Nicholson, 1998). In adulten Mäusen wird der CAT-3 hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Closs, 2006). Im adulten Menschen wurde der CAT-3 im Gehirn, Thymus, Uterus, Hoden und der Brustdrüse nachgewiesen (Vekony, 2001). Des Weiteren ist dieser Transporter auch im fötalen Thymus exprimiert. Zu erwähnen ist auch das Vorkommen des CAT-3 in Zellen der akuten lymphatischen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und der Burkitt's Lymphom-Zelllinie Daudi, wohingegen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) und Lymphknoten gesunder Spender kein CAT-3 nachgewiesen wurde (Vekony, 2001).

1.1.4.2 Die Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2

Die Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 sind die molekularen Vertreter des Transportsystems y^+ L. Das System y^+ L wurde erstmals in humanen Erythrozyten identifiziert und ist charakterisiert durch den Natrium-unabhängigen Transport von kationischen, aber die Natrium-gekoppelte Translokation neutraler Aminosäuren (Devés, 1992).

y^+ LAT1 und y^+ LAT2 werden auch als heterodimere oder Glykoprotein-gekoppelte Transporter beschrieben, da sie eng mit dem Glykoprotein 4F2hc (CD98, *SLC3A2*) assoziiert sind (Verrey, 2004). Dabei werden y^+ LAT1 und y^+ LAT2 als leichte Ketten und 4F2hc als die schwere Kette bezeichnet. 4F2hc wurde ursprünglich als ein T-Lymphozyten-aktivierendes Gen identifiziert (Haynes, 1981). Mittlerweile wurde es vorwiegend in stark proliferierenden Zellen, sowie in der basolateralen Membran von Epithelzellen in Niere und Dünndarm nachgewiesen (Verrey, 2004). Bei 4F2hc handelt es sich um ein glykosyliertes Membranprotein mit einem intrazellulären N-Terminus, einer transmembranären Domäne und einem extrazellulär lokalisierten C-Terminus (Fort, 2007; Hemler, 1982; Quackenbush, 1987). 4F2hc ist über eine Disulfidbrücke an die extrazelluläre Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne der leichten Ketten kovalent gebunden und für die Translokation des Transportproteins an die Plasmamembran und somit für dessen effiziente Funktion notwendig (Fotiadis, 2013; Nakamura, 1999; Pfeiffer, 1998). Die Struktur der heterodimeren Aminosäuretransport-Proteine ist bislang noch nicht aufgeklärt. Für sie wurden 12 transmembranäre Domänen vorhergesagt, welche signifikante Ähnlichkeit zu den ersten 12 Transmembrandomänen der CATs aufweisen (Closs, 2006). Im Gegensatz zu den CATs sind y^+ LAT1 und 2 jedoch nicht glykosyliert (Verrey, 2004).

Der Transporter y^+ LAT1 ist am prominentesten in der Niere und im Dünndarm exprimiert, wurde aber auch in geringerem Umfang in Lymphozyten, Lunge, Leber, Gebärmutter, Milz und Hoden nachgewiesen (Bauch, 2003; Torrents, 1998; Wagner, 2001). y^+ LAT1 funktioniert als obligater Aminosäureaustauscher (Verrey, 2004) und vermittelt den Transport kationischer Aminosäuren Natrium-unabhängig, aber ausschließlich gekoppelt an Natrium in der Stöchiometrie von 1:1 die Translokation neutraler Aminosäuren (Kanai, 2000). Darüber hinaus wurde eine *trans*-stimulatorische Wirkung intrazellulärer kationischer Aminosäuren auf den Influx neutraler Aminosäuren gezeigt. Umgekehrt wird auch der Export kationischer Aminosäuren durch extrazelluläre neutrale Aminosäuren begünstigt (Kanai, 2000). Eine Mutation des y^+ LAT1 ist die Ursache der autosomal rezessiv vererbten Erkrankung „Lysinurische Proteinintoleranz“ (LPI). Durch die Mutations-bedingte Beeinträchtigung des y^+ LAT1-vermittelten Transport kationischer Aminosäuren kommt es an der basolateralen

Membran von Niere und Dünndarm zu der Hemmung der (Re)-Absorption dieser Moleküle. Dies zieht die Intoleranz proteinreicher Nahrung nach sich, was sich in heterogenen Symptomen wie Nierenversagen, Osteoporose, Immunschwäche, Milz- und Lebervergrößerungen manifestiert (Rotoli, 2019).

Der Transporter y^+LAT2 zeigt im Gegensatz zu y^+LAT1 ein breiteres Expressionsspektrum und wurde in zahlreichen epithelialen und nicht-epithelialen Zellen nachgewiesen (Verrey, 2004). Neben der Niere und dem Dünndarm, kommt y^+LAT2 in Hoden, Parotis, Herz und Gehirn vor (A. Bröer, 2000). Die Transporteigenschaften des y^+LAT2 ähneln stark den des y^+LAT1 . Der Efflux kationischer Aminosäuren ist durch die Anwesenheit sowohl neutraler als auch kationischer Aminosäuren auf der *Trans*-Seite stimulierbar, wodurch es zu einem Nettoexport kationischer und -import neutraler Aminosäuren kommt (A. Bröer, 2000).

1.1.4.3 Der Transporter $b^{0,+}AT$

Der Transporter $b^{0,+}AT$ ist der bislang einzige identifizierte Vertreter des Transportsystems $b^{0,+}$. Das System $b^{0,+}$ wurde erstmals 1988 in murinen Blastozyten als für neutrale und kationische Aminosäuren stark affines, Natrium- und pH-Wert-unabhängiges Transportsystem beschrieben (Van Winkle, 1988). Bei $b^{0,+}AT$ handelt es sich ebenfalls um einen heterodimeren Transporter, da dieser kovalent an das Glykoprotein rBAT (*SLC3A1*) gebunden ist (Y. Wang, 1995). rBAT ist wie 4F2hc, für die Translokation des Transportproteins an die Plasmamembran verantwortlich (Bauch, 2002). $b^{0,+}AT$ wurde in der apikalen Plasmamembran von polarisierten Zellen in Niere und Dünndarm, sowie in Plazenta und Leber nachgewiesen (Fotiadis, 2013). Neben dem für das System $b^{0,+}$ beschriebenen Transport von kationischen und neutralen Aminosäuren, akzeptiert $b^{0,+}AT$ auch Cystin als Substrat. Unter physiologischen Bedingungen werden dieses und kationische Aminosäuren vorzugsweise im Austausch gegen neutrale Aminosäuren importiert (Fotiadis, 2013). Angetrieben wird dieser Transport durch verschiedene Komponenten: a) die hohe intrazelluläre Konzentration neutraler Aminosäuren b) das negative Membranpotential sowie c) die intrazelluläre Reduktion von Cystin zu Cystein (Fotiadis, 2013). Die Mutation des *SCL7A9* ist die Ursache der autosomal rezessiv vererbten Erkrankung Cystinurie. Dabei kommt es zu der Einschränkung der Reabsorption der Aminosäuren Cystin, Ornithin, Arginin und Lysin aus dem proximalen Tubulus der Niere und des Dünndarms. Aufgrund der dadurch erhöhten Konzentration des schlecht wasserlöslichen Cystins im Urin, kommt es zu der Ausbildung sogenannter Cystinsteine, was zu chronischen Nierenschädigungen und speziell bei Kindern auch zu Nierenversagen führen kann (Sahota, 2019; Saravakos, 2014).

1.1.4.4 Der Transporter ATB^{0,+}

Der Transporter ATB^{0,+} ist der molekulare Vertreter des Systems B^{0,+}. Das System B^{0,+} wurde erstmals in Blastozyten beschrieben (Van Winkle, 1985). Es ist charakterisiert durch den Natrium- und Chlorid-abhängigen Transport eines breiten Spektrums sowohl neutraler als auch basischer Aminosäuren (M. E. Ganapathy, 2005). ATB^{0,+} wurde erstmals von Sloan und Mager im Jahr 1999 in humanem Brustdrüsengewebe identifiziert (Sloan, 1999). Später wurde die mRNA dieses Transporters ebenfalls in Lunge, Speicheldrüsen, Atmungsapparat, Hypophyse, Kolon, okulären Geweben, Uterus, Hoden und Prostata nachgewiesen (S. Bröer, 2008; Hatanaka, 2004; Nakanishi, 2001). Der Transporter ATB^{0,+} besteht wie die Transportproteine der heterodimeren Aminosäuretransporter aus 12 putativen Transmembrandomänen (M. E. Ganapathy, 2005). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten, wurde der ATB^{0,+}, anders als die bisher beschriebenen Transporter als *SLC6A14* der SLC6-Familie zugeordnet (M. E. Ganapathy, 2005). Durch die Einbindung der beiden zelleinwärts gerichteten Ionengradienten in einer Stöchiometrie von 2 Na⁺ : 1 Cl⁻ : 1 Aminosäure handelt es sich bei dem ATB^{0,+} um einen intrazellulär konzentrierenden Transporter (M. E. Ganapathy, 2005; Sloan, 1999).

1.1.5 Die Versorgung humaner T-Lymphozyten mit Arginin durch intrazelluläre Synthese aus der neutralen Aminosäure Citrullin

Neben der Aufnahme extrazellulären Arginins durch spezialisierte Aminosäuretransporter, kann diese Aminosäure auch intrazellulär, katalysiert durch die Harnstoffzyklusenzyme ASS und ASL, aus der neutralen Aminosäure Citrullin synthetisiert und in den Zellmetabolismus eingeschleust werden (Fotiadis, 2013; Husson, 2003). In murinen stimulierten T-Lymphozyten wurde die durch vollständigen Argininmangel induzierte Inhibition der Zellproliferation und Zytokinexpression durch die Supplementation von Citrullin nivelliert (Lange, 2017; Tarasenko, 2015). Dies ist in Übereinstimmung mit der in diesen Zellen, selbst unter komplettem Argininmangel, exprimierten ASS (Fletcher, 2015). Die Versorgung humaner T-Lymphozyten mit Arginin durch die intrazelluläre Synthese aus Citrullin könnte demnach als neue Strategie für die Behandlung ungewollter Immunsuppression eine bedeutende Rolle spielen. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann die Proliferationsinhibition humaner T-Lymphozyten allerdings unter vollständigem Argininmangel durch Citrullin-Supplementation nicht aufgehoben werden (Tarasenko, 2015). Vorversuche der Arbeitsgruppe ████████ zeigten jedoch die Citrullin-abhängige Rekonstitution der T-Zell-Proliferation in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen (20-150 µM). Erklärt werden könnte dies durch noch ausreichend hohe

Citrullin-Importraten unter suboptimaler Argininverfügbarkeit im Kontrast zu dem vollständigen Ausbleiben des Citrullintransports unter kompletten Argininmangel. Bislang war der Aminosäuretransporter für den Import von Citrullin in humanen T-Lymphozyten noch unbekannt. Dieser sollte im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Als Citrullintransporter kommen zahlreiche neutrale Aminosäuretransporter verschiedener Transportsysteme in Frage. In der folgenden Tabelle sind die für diese Transportsysteme bekannten Substratspektren sowie die Natriumabhängigkeit zusammengefasst (Tabelle 1).

Tabelle 1: Die Natrium-Abhängigkeit und Substratprofile der Transportsysteme für neutrale Aminosäuren.

Wenn eine Aminosäure von dem jeweiligen Transportsystem als Substrat erkannt wird, beziehungsweise der Transport neutraler Aminosäuren in Abhängigkeit von Natrium stattfindet, ist dies durch ein Plus (+) gekennzeichnet, falls nicht durch ein Minus (-) oder dies nicht auf alle Transporter des Transportsystems zutrifft durch ein Plus/Minus (\pm). Die in eckigen Klammern aufgeführten Zeichen signalisieren, dass das betroffene Substrat nur ein schlechtes Substrat für das Transportsystem ist. Die dieser Tabelle zu Grunde liegenden Literaturquellen sind dem Kapitel 4.2.3 zu entnehmen.

System	Na ⁺	Arginin	Prolin	Leucin	BCH	Histidin	Glycin
A	+		\pm	-		[+]	[\pm]
ASC	+		-	[+]		-	[+]
asc	-	-	-	[+]	[+]	[+]	+
B ⁰	+	-	\pm	+	+	[\pm]	[\pm]
B ^{0,+}	+	+	+	+	+	+	+
b ^{0,+}	-	+	-	+	-	+	-
L	-	-	-	+	+	\pm	\pm
N	+		-	-		-	[+]
P	-	-	+	-		-	+
T	-	-	-	-	-	-	-
y ⁺ L	+	+	-	+	-	[+]	-

1.2 Arginindepletion als neuer Ansatz für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie

1.2.1 Die chronische lymphatische Leukämie

Bei circa 40 % aller diagnostizierten Leukämien handelt es sich um eine chronische lymphatische Leukämie (CLL). Damit ist diese die häufigste Leukämieform in den westlichen Ländern (Fauci, 2009; Wendtner, 2017). Die Inzidenz der CLL steigt mit höherem Lebensalter. Dies spiegelt sich in dem vergleichbar hohen Diagnosealter von durchschnittlich 72 Jahren wider (Chung, 2014; Wendtner, 2017). Dabei sind Männer im Vergleich zu Frauen prädisponiert (Wendtner, 2017). Bei der CLL handelt es sich um eine B-Zellneoplasie (Herishanu, 2013). Charakteristisch für die Pathogenese ist die klonale Expansion maligner, in ihrer Apoptose inhibierter und dadurch dysreguliert proliferierender, morphologisch reifer B-

Lymphozyten in sogenannten Proliferationszentren oder Pseudofollikeln. Diese Proliferationszentren und Pseudofollikel sind vorwiegend in den peripheren Lymphorganen oder im Knochenmark lokalisiert (Burger, 2013; Chung, 2014; Herishanu, 2013; Wendtner, 2017). Durch Zell-Zell-Kontakte zu oder Zytokine von Stromazellen, Endothelzellen, folliculären dendritischen Zellen, Makrophagen oder T-Lymphozyten werden hier die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen begünstigt (Burger, 2013; Herishanu, 2013). Ein Großteil dieser CLL-Zellen wird in das periphere Blut ausgeschwemmt, wo diese akkumulieren. Die im Blut zirkulierenden Zellen sind jedoch in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert und demnach nicht-proliferativ (Andreeff, 1980; Chung, 2014). Immunphänotypisch können CLL-Zellen durch die Oberflächenmarker CD5, CD19 und CD23 identifiziert werden (Caligaris-Cappio, 1999; Wendtner, 2017). Neben der erhöhten Anzahl der Lymphozyten im Blut ist die CLL klinisch mit dem Voranschreiten der Erkrankung durch die Vergrößerung der Lymphknoten, der Milz und der Leber, sowie der Störung der Blutzellentwicklung im Knochenmark charakterisiert (Wendtner, 2017). Nach aktuellem Stand ist die einzige kurative Behandlung der CLL die allogene Stammzelltransplantation, welche allerdings ausschließlich bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand durchgeführt werden kann (Wendtner, 2017). Die medikamentöse Therapie ermöglicht lediglich die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens der Patienten (Wendtner, 2017). Solange Patienten beschwerdefrei sind, ist allerdings keine Therapie indiziert. Erst nach dem Auftreten von Symptomen wie Anämie, Vergrößerung der Milz und der Lymphknoten, sowie ungewolltem Gewichtsverlust, lang anhaltendem Fieber unklarer Ursache sowie Nachtschweiß wird eine medikamentöse Behandlung empfohlen (Wendtner, 2017). Dabei richtet sich die Wahl der Erstlinientherapie nach dem Mutationsstatus beziehungsweise der Deletion des Gens „Tumor Protein p53“ (*TP53*), welches auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 lokalisiert ist (Sharma, 2019). Es wurde gezeigt, dass Patienten mit mutiertem oder deletiertem *TP53* vergleichsweise schlecht auf Chemo- und Chemoimmuntherapien ansprechen. Dementsprechend wurde ein kürzeres progressionsfreies Überleben für diese Patienten beobachtet (Shustik, 2017; Wendtner, 2017). Bei unmutiertem *TP53* besteht die Erstlinientherapie der Patienten aus der Kombination von zytostatisch wirksamen Substanzen (Cyclophosphamid, Fludarabin, Chlorambucil) und CD20-Antikörpern (Rituximab oder Obinutzumab), wobei die Substanzwahl je nach Allgemeinzustand des Patienten erfolgt. Bei Deletion oder Mutation des *TP53* wird ein Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase (BTK, Ibrutinib), einem Schlüsselmolekül für die B-Zellrezeptor-Signaltransduktionskaskade als Monotherapie eingesetzt (Burger, 2013; Wendtner, 2017). Im Fall einer rezidivierend auftretenden Erkrankung werden neben Ibrutinib

auch der selektive Inhibitor der δ -Isoform der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K δ) Idelalisib eingesetzt. Die PI3K δ ist an der Signalweiterleitung des B-Zellrezeptors und somit der Regulation des Wachstums, Überlebens und Migration der CLL-Zellen beteiligt (Burger, 2013).

Die CLL ist die häufigste Leukämie in der westlichen Welt. Trotz stetiger Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, darunter auch der Eingriff in die B-Zellrezeptor-Signaltransduktionskaskade (Ibrutinib, Idelalisib) sowie die Hemmung des anti-apoptotischen Bcl2 (Venetoclax) gilt diese Leukämieform nach wie vor als nicht heilbar (Sharma, 2019). Demnach ist es von hohem medizinischem Interesse neue Therapieansätze zu entwickeln, die bereits bestehende Therapien ergänzen ohne die Belastung durch unerwünschte Nebenwirkungen zu erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Argininmangel, induziert durch die Hemmung des verantwortlichen Arginintransporters eine effiziente neue Behandlungsmethode für die CLL darstellt.

1.2.2 Arginindepletion als Strategie für die Krebstherapie

In Tumorzellen ist die Proliferation infolge von genetischen und epigenetischen Veränderungen, die Apoptose-Signalwege inhibieren, unkontrolliert gesteigert. Dementsprechend ist die Stoffwechselrate und daraus resultierend auch der Nährstoffbedarf dieser Zellen stark erhöht (Fung, 2017). Wie bereits in Kapitel 1.1.2 dargestellt ist die kationische Aminosäure Arginin für die effiziente Funktion von Zellen unentbehrlich. Insbesondere in Tumorzellen spielt Arginin, nicht nur als Proteinbaustein, sondern auch als Vorprodukt für Polyamine, welche als Wachstumsfaktoren das Tumorwachstum fördern, eine bedeutende Rolle (Appleton, 2002). Arginin kann neben der Aufnahme aus dem extrazellulären Raum auch intrazellulär aus der neutralen Aminosäure Citrullin durch die Enzyme ASS und ASL synthetisiert werden (Kapitel 1.1.2). Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die ASS in den meisten Geweben exprimiert (Husson, 2003). In verschiedenen Tumorzellen kommt es jedoch durch epigenetische Veränderungen zu Variationen des ASS-Expressionslevels (Delage, 2012). Nach derzeitigem Wissensstand sind Tumorzellen in Patienten mit Ovar-, Lungen- und Kolonkarzinomen überwiegend ASS-positiv. Hingegen wurde in der Mehrzahl der Tumoren aus Melanom-, Leberzell- und Prostatakarzinom- sowie AML-Patienten keine Expression der ASS nachgewiesen (Dillon, 2004; Mussai, 2015; Qiu, 2015). Interessanterweise wurde bislang kein Tumor beschrieben, der negativ für das Enzym ASL ist (Fultang, 2016). Aufgrund der Depletion der ASS werden die Tumorzellen gegenüber Arginin auxotroph. Dies wird aktuell als die Achillesferse dieser Zellen diskutiert. Arginin-depletierende Enzyme werden derzeit in

präklinischen und klinischen Studien getestet. Am besten untersucht sind dabei die rekombinanten pegylierten Enzyme Arginase (rh-Arg-1 PEG5000 (BCT-100, BCT International Ltd, Hong Kong, China) und rh-Arg-1 [Co²⁺] PEG5000) und Arginindeiminase (PEG-20000 (ADI-PEG 20, Polaris Pharmaceuticals, CA, USA)). Die Arginindeiminase wurde ursprünglich aus Mykoplasmen isoliert, und katalysiert durch die irreversible Deimination der Guanidingruppe von Arginin die Synthese von Citrullin und Ammoniak (Shirai, 2001). In präklinischen Studien wurde die effiziente Suppression des Tumorwachstums durch Induktion der Apoptose und Autophagie in verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Fung, 2017). *In vitro* wurde die ADI-PEG-induzierte Senkung der Viabilität durch Autophagie- oder Caspase-abhängige Apoptose in der ASS-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB231 (Qiu, 2014), den Prostatakrebszellen CWR22v1 (R. H. Kim, 2009), der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie SK-LC-13 (Kelly, 2012), den Pankreas-Karzinomzelllinien MIA-PaCa-2 und PANC-1 (Bowles, 2008), sowie in Leberzellkarzinom- und Melanomzelllinien (Ensor, 2002) gezeigt. Darüber hinaus wurde auch in primären AML-Zellen die Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose durch ADI-PEG 20 beobachtet (Miraki-Moud, 2015). Die Hemmung des Tumorwachstums konnte ebenso in Xenograftmodellen mit MIA-PaCa-2 (Bowles, 2008) und den Melanomzelllinien SK-mel-2 und SK-mel 28 (Ensor, 2002) beobachtet werden. In AML-Xenograft-Mausmodellen wurde durch die ADI-PEG 20-induzierte Depletion des Plasmaarginins die Reduktion des Tumorwachstums beschrieben (Miraki-Moud, 2015). Klinische Phase I und II Studien zeigten die effiziente Depletion des Plasma-Arginins in Patienten mit Leberzellkarzinomen (Izzo, 2004) und Melanompatienten (Ott, 2013). ADI-PEG 20 wird aktuell in klinischen Phase II Studien in Patienten mit ASS-negativen metastasierenden Melanomen (NCT 01279967), mit kleinzelligen Lungenkarzinomen (NCT 01266018) und Non-Hodgkin's Lymphomen (NCT 01910025) sowie in Phase III Studien in Patienten mit Leberzellkarzinomen (NCT 01287585) getestet (Patil, 2016).

Die Arginase metabolisiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff (Kapitel 1.1.2). PEG-Arginase-induzierter Argininmangel führte *in vitro* und *in vivo* zu der Reduktion der Proliferation und Viabilität der aus T-Zellen stammenden akuten lymphatischen Leukämie (ALL)-Zelllinien CCRF-CEM, Molt-3, Molt-4 und Jurkat (Hernandez, 2010; Morrow, 2013), der Leberzellkarzinomzellen Hep3B und HepG2 (Cheng, 2007; Glazer, 2011), der Melanomzellen A375 und B16 (Lam, 2011), der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 (Glazer, 2011) und den AML-Zelllinien HL-60, K562, U937 und KGIA8 (Mussai, 2015). Letzteres wurde auch mit primären AML-Blasten bestätigt (Mussai, 2015). Darüber hinaus wurde die Wirkung

klassischer zytostatischer Medikamente durch die parallele Behandlung mit der pegylierten Arginase potenziert. In Kombination mit dem Zytostatika Ara-C führte die Behandlung von T-ALL-Zellen-injizierter Mäuse mit peg-Arg I zu einem verlängerten Überleben, welches mit einer verringerten Proliferationsrate, reduzierter Cyklin D3-Expression und der Steigerung der Apoptose-Induktion in den Tumorzellen einherging (Hernandez, 2010). Ebenso wurde die zytotoxische Wirkung von Cytarabin auf AML-Blasten durch die pegylierte rekombinante Arginase BCT-100 gesteigert (Mussai, 2015). Momentan wird peg-rhArg in klinischen Studien der Stufe 1 und 2 in Arginin-auxotrophen Leberzellkarzinomen getestet (Fultang, 2016; Yau, 2013).

Argininmangel ist demnach ein effizienter Weg um das Wachstum von Tumoren zu inhibieren. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob Argininmangel, induziert durch die Inhibition des Argininimports, ein neuer Ansatz für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie sein könnte. Momentan steht kein spezifischer Inhibitor für Arginintransporter zur Verfügung. Allerdings führte die siRNA-vermittelte Senkung der CAT-1-Expression in Kolon- und Brustkarzinomzelllinien zu der Inhibition der Proliferation und Reduktion der Zellviabilität (Abdelmagid, 2011; Lu, 2013). Es soll untersucht werden, ob die Hemmung der CAT-1-vermittelten Argininaufnahme auch die Proliferation und Viabilität von CLL-Zellen beeinflusst.

1.2.3 Canavanin

Canavanin wurde erstmals bereits im Jahr 1929 aus dem Samen der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) isoliert, in welcher es, genau wie in anderen Leguminosen, in großen Mengen vorkommt (Bence, 2003). In diesen Pflanzen dient Canavanin einerseits durch den hohen Anteil an Stickstoff als Stickstoffreservoir (Rosenthal, 1977) andererseits ist es, aufgrund seiner zelltoxischen Wirkung, ein Teil eines chemischen Abwehrsystems gegenüber Fressfeinden (Rosenthal, 1988). Canavanin ist das δ -Oxo-Analogon der kationischen Aminosäure Arginin und unterscheidet sich von dieser lediglich durch den Ersatz der Guanidinogruppe durch eine Oxoguanidinogruppe. Canavanin wird während der Translation von Arginyl-tRNAs gebunden und anstatt Arginin in Proteine eingebaut (Allende, 1964; Redman, 1983). Die zelltoxische Wirkung des Canavanins beruht auf den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Guanidino- und der Oxoguanidinogruppe. Während die Guanidinogruppe in Arginin einen pK_a -Wert von 12,48 aufweist, liegt dieser Wert bei der Oxoguanidinogruppe im Canavanin nur bei 7,01 (Boyar, 1982). Daraus resultiert, dass Canavanin unter physiologischen pH-Wert im Gegensatz zum kationischen Arginin hauptsächlich ungeladen vorkommt. Folglich kommt es

durch diesen Unterschied der chemischen Eigenschaften nach dem Einbau von Canavanin in Proteine zu Fehlfaltungen, was die Dysfunktion und den Abbau dieser Proteine nach sich zieht (Prouty, 1975; Rosenthal, 1989). Die Zelltoxizität des Canavanins wurde in zahlreichen Tumorzelllinien demonstriert. *In vitro* wurde die Senkung der Viabilität und der Proliferation in verschiedenen Tumorzelllinien, darunter auch die humane Leukämie-Zelllinie K562, gezeigt. Jedoch wurde diese zelltoxische Wirkung jeweils nur in der Gegenwart sehr hoher Canavanin-Konzentrationen (1-4 mM) beobachtet (Ding, 1999; Green, 1983; Worthen, 1998). In MIA PaCa-2-Zellen wurde allerdings gezeigt, dass die zelltoxische Wirkung des Canavanins durch Argininmangel enorm gesteigert werden kann. Während in der Gegenwart von 400 μ M Arginin eine IC_{50} von 2 mM für Canavanin festgestellt wurde, lag diese unter Argininmangel lediglich bei 10 μ M (Swaffar, 1994). Dies konnte mit weiteren Zelllinien bestätigt werden. Unter Argininmangel war die Viabilität von A431-Epidermiskarzinom-, A549-Lungenkarzinom- sowie HepG2-Leberzellkarzinomzellen bereits in der Gegenwart von 100 μ M Canavanin signifikant reduziert (Vynnytska, 2011). Auch *in vivo* wurde das Wachstum von Kolonkarzinomen in Ratten durch Canavanin verlangsamt, sowie die Lebensdauer von leukämischen Mäusen verlängert (Green, 1980; Thomas, 1986). Darüber hinaus wurden synergistische anti-tumorale Effekte in Kombination mit Chemotherapeutika und γ -Bestrahlung festgestellt. In Ratten-Kolonkarzinommodellen konnte die zelltoxische Wirkung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil durch die parallele Gabe von Canavanin verstärkt werden (Swaffar, 1995). Ähnliche Effekte wurden in Kombination mit Doxorubicin in Hela- und CaCo-2-Zellen, sowie mit Cisplatin in den Pankreaskarzinomzellen MIA PaCa-2 und BxPc-3-Zellen beobachtet (Nurchayanti, 2016). Ebenfalls konnte die Sensibilität der Kolonkarzinomzelllinien HAT-29, HCT-116 und HAT-29 gegenüber Röntgenstrahlung durch Canavanin gesteigert werden (Kurlishchuk, 2016; Vynnytska-Myronovska, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit sollte beantwortet werden, ob die zelltoxische Wirkung des Canavanins auch die Viabilität und Proliferation von CLL-Zellen negativ beeinflusst und so als therapeutische Substanz für die Behandlung der CLL eingesetzt werden könnte.

2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Transport der kationischen Aminosäure Arginin und ihrer Vorläufer-Aminosäure Citrullin in humanen T-Lymphozyten und chronisch lymphatischen Leukämiezellen. Beide Zelltypen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus und sind daher besonders auf die Zufuhr von Nährstoffen angewiesen. Die Transportproteine, die diese Zufuhr vermitteln, stellen daher potentielle Zielstrukturen zur Manipulation dieser Zellen dar. Bezogen auf das Tumormikromilieu, ist eine Stärkung von T-Zellen und eine Schwächung von Tumorzellen durch vermehrte beziehungsweise verringerte Zufuhr von Arginin anstrebenswert.

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Arginin für die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten unentbehrlich ist. Bislang war jedoch unbekannt, welcher Transporter für den Import von Arginin in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist. Das erste Ziel dieser Arbeit war dies aufzuklären und darüber hinaus die Rolle von Arginintransportern für die Modulation der Funktion humaner T-Lymphozyten als wichtige Komponenten des adaptiven Immunsystems zu erforschen.

In Tumoren oder entzündlichen Geweben herrscht durch die Akkumulation Arginase-exprimierender myeloider Zellen Argininmangel, aufgrund dessen die T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Sekretion in dieser Umgebung stark beeinträchtigt ist. Eine Rekonstitution der T-Zellfunktion in diesem Arginin-depletierten Tumorgewebe ist eine vielversprechende Strategie, um die anti-tumorale Immunantwort zu steigern. Bei Argininmangel können T-Lymphozyten, im Gegensatz zu einigen Tumorentitäten, Arginin auch intrazellulär über die Enzyme des Harnstoffzyklus Argininosuccinatsynthetase und Argininosuccinatlyase aus der neutralen Aminosäure Citrullin synthetisieren. Die Voraussetzung für diese intrazelluläre Argininsynthese ist jedoch die Bereitstellung und Aufnahme Citrullins in ausreichenden Mengen. Das zweite Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung des Citrullinimports sowie die Identifizierung des dafür verantwortlichen Transporters in humanen T-Lymphozyten.

Die Schwächung von Tumorzellen durch systemischen, Enzym-induzierten Argininmangel wird aktuell in klinischen Studien für die Behandlung von Melanomen und Leberzellkarzinomen mit vielversprechenden Ergebnissen getestet. Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die am häufigsten diagnostizierte Leukämie in den

westlichen Industrieländern. Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Behandlungsmethoden ist diese Erkrankung bis heute nicht heilbar. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob auch das Wachstum von CLL-Zellen durch extrazellulären Argininmangel gestoppt werden kann. Darüber hinaus sollte der bislang unbekannte Arginintransporter in diesen Zellen identifiziert und die Auswirkung der gezielten Hemmung dieses Transporters auf die Proliferation und Viabilität der CLL-Zellen untersucht und als neue Behandlungsstrategie für diese Leukämie beurteilt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Tabelle 2: verwendete Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Binokular	Leica GZ6	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Dispergiergerät	ULTRA-TURRAX®	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Horizontal-Gelelektrophoresekammer	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Mikroinjektor	Transjektor 5246	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Nukleofektionsgerät	Amaxa Nucleofector™ I	Lonza Group (Basel, Schweiz)
PCR-Gerät	MyCycler	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Photometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Proteintransferkammer	TransBlot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Plattenlesegerät	Sunrise™	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Real time-PCR System	StepONE Plus	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Sicherheitswerkbank	HERASAFE®	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Szintillationszähler	Tri-Carb® 2810 TR	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Vertikal-Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue™ Twin ExW S	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)

3.2 Chemikalien

Alle zum Ansetzen von Puffern und Lösungen genutzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Immortalisierte Zelllinien wurden konstant bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, fanden die Arbeiten mit Zelllinien ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank statt. Das dafür gebrauchte Material sowie alle Medien, Lösungen und Puffer wurden steril bezogen oder steril filtriert. Alle verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der genutzten Zellkulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
RPMI-Vollmedium	RPMI-1640 Medium (#R8758, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
DMEM-Vollmedium	DMEM, high Glucose (#11960044, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
IMDM-Vollmedium	IMDM (#12440053, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Argininfreies RPMI-Medium	RPMI-1640 with glutamine, without arginine, leucine, lysine and phenol red (#R1780, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 % dialysiertes FBS (Hitze-inaktiviert, #F0392, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 µM Lysin 400 µM Leucin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Argininfreies IMDM-Medium	IMDM for SILAC (#88367, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % dialysiertes FBS (Hitze-inaktiviert, #F0392, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 200 µM Lysin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

Suspensionszellen wurden stets in einem Volumen von 20 ml kultiviert. Für das Passagieren dieser Zellen wurde die für die weitere Kultivierung gewünschte Zellzahl bei 490 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine neue Zellkulturfläche überführt. Adhärenente Zellen wurden für das Passagieren zunächst mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die an der Adhäsionsfläche der Zellkulturflasche heftenden Zellen durch die Inkubation mit 1 ml Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für eine Minute bei 37 °C abgelöst und in 9 ml frischem Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Zelllinien HG3, MEC1, JVM-2 und HEK293T gearbeitet. Die Herkunft, Morphologie und Kultivierung dieser Zellen sind den Tabellen 4 bis 7 zu entnehmen.

Tabelle 4: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie HG3.

HG3 (DSMZ # 765)	
Spezies:	human
Zelltyp:	Chronische B-Zell-Leukämie
Herkunft:	etabliert im Jahr 1998 aus leukämischen B-Zellen eines 70-jährigen, an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Mannes; zur Verfügung gestellt von ██████████ (Linköping University, Linköping, Schweden)
Morphologie:	runde, teilweise in Aggregaten in Suspension-wachsende Zellen, schwach adhärenent
Medium:	RPMI-Vollmedium
Kultivierung:	2 x pro Woche 1:10 splitten

Tabelle 5: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie MEC1.

MEC1 (DSMZ # ACC 497)	
Spezies:	human
Zelltyp:	Chronische B-Zell-Leukämie
Herkunft:	etabliert im Jahr 1993 aus peripherem Blut eines 61-jährigen, an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Mannes; zur Verfügung gestellt von ██████████, Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg
Morphologie:	runde bis polymorphe, teilweise in kleinen Aggregaten in Suspension-wachsende Zellen
Medium:	IMDM-Vollmedium
Kultivierung:	2 x pro Woche 1:20 splitten

Tabelle 6: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie JVM-2.

JVM-2 (DSMZ # ACC 12)	
Spezies:	human
Zelltyp:	Chronische B-Zell-Leukämie
Herkunft:	etabliert aus peripherem Blut einer 63-jährigen, an einem Mantelzelllymphom erkrankten Frau; zur Verfügung gestellt von ██████████, Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg
Morphologie:	runde, überwiegend in Trauben in Suspension-wachsende Zellen
Medium:	RPMI-Vollmedium
Kultivierung:	2 x pro Woche 1:4 splitten

Tabelle 7: Herkunft, Morphologie und Kultivierung der Zelllinie HEK293T.

HEK293T (ATCC®CRL-3216™)	
Spezies:	human
Zelltyp:	embryonale Nierenzellen
Herkunft:	zur Verfügung gestellt von ██████████, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Morphologie:	einschichtig-wachsende adhärente Zellen
Medium:	DMEM-Vollmedium
Kultivierung:	2 x pro Woche 1:5 splitten

3.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Die Bestimmung der Lebendzellzahl geschah mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Dafür wurden Zellen im Verhältnis 1:1 mit 0,1%iger Trypanblaulösung vermischt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, während es die Membran lebender Zellen nicht passieren kann. PBMCs wurden vor der Trypanblaufärbung, um Erythrozyten zu zerstören, zusätzlich mit 4%iger Essigsäure 1:1 vermischt. Die Stege der Neubauer Zählkammer wurden angefeuchtet und das Deckgläschen aufgedrückt bis Schnürringe entstanden. Auf diese Weise war eine Schichtdicke der Zellsuspension von 0,1 Millimeter zwischen Deckgläschen und Zählkammer gewährleistet. Die Zellen wurden in die Neubauer Zählkammer eingeführt und unter dem Mikroskop gezählt. Dies geschah durch die Auszählung von 3 mal 16 Kleinquadraten der Zählkammer. Die gezählte Anzahl der lebenden Zellen (N) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (V) und der Kammerkonstanten (10^4) ergab schließlich die Anzahl der Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 =$ Zellzahl/ml).

3.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Die langfristige Konservierung von Zellen geschah in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Dafür wurden die Zellen zunächst in 10 ml 1 x PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 490 g und

Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Milliliter fötalem Kälberserum (FBS) plus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Die Kühlung erfolgte stufenweise über $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis schließlich die dauerhafte Inkubation im flüssigen Stickstoff stattfand.

3.3.4 Isolation von PBMCs aus humanem Vollblut

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank. Die Isolation humaner peripherer mononukleärer Zellen (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gesunder Spender. Dazu wurden 25 ml Vollblut mit 10 ml 1 x PBS plus 2 mM EDTA verdünnt, über 15 ml Ficoll (LSM 1077 Lymphocyte, Dichte: 1,077 g/ml, PAA) geschichtet und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 g ohne Bremse aufgetrennt. Anschließend wurden die mononukleären Zellen, welche sich in der Interphase befanden (Abbildung 1), abgenommen und dreimal durch die Resuspension in 1 x PBS plus 2 mM EDTA und Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 490 g gewaschen.

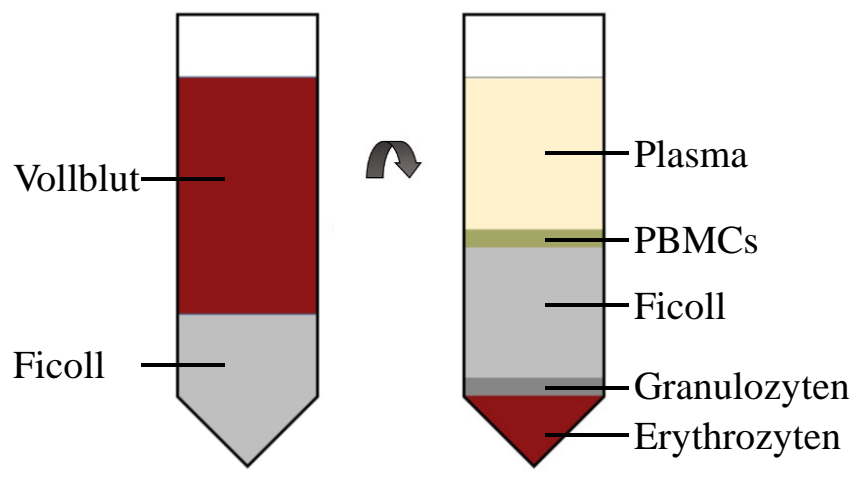


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Separation von Blutbestandteilen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Modifiziert nach <https://www.cellapplications.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmc/mnc-pb>.

Stand 15.01.2020

3.3.5 Isolation und Stimulation humaner CLL-Zellen

Humane CLL-Zellen wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Vollblut von CLL-Patienten, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, isoliert. Die CLL-Zellen befanden sich nach dem Zentrifugieren in der Interphase (PBMC-Schicht, Abbildung 1) und wurden durch die Aufnahme in 1 x PBS plus 2 mM EDTA und Zentrifugation bei 490 g und 4

°C für 5 Minuten zweimal gewaschen. Die Fraktion der CLL-Zellen wurde durchflusszytometrisch im klinischen Labor der 3. Medizinischen Klinik festgestellt und betrug in allen Proben über 95 %. Die Stimulation der CLL-Zellen erfolgte durch einen „Toll like receptor“ (TLR)9-Agonisten. Dafür wurden jeweils 6×10^6 Zellen mit $7,5 \mu\text{g/ml}$ TLR9-Agonist ODN2006 (#tlrl-2006, InvivoGen, San Diego, CA, USA) in 1 ml RPMI-Vollmedium oder argininfreiem RPMI-Medium in einer Vertiefung einer 12-Lochplatte inkubiert. Die Inkubationszeit variierte je nach Versuchsansatz und betrug 24 bis 48 Stunden.

3.3.6 Isolation humaner T-Lymphozyten

Die Isolation der T-Lymphozyten-Gesamtpopulation erfolgte aus PBMCs mit dem „Pan T Cell Isolation Kit II“ (#130-091-156, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) oder dem „Easy Sep™ Human T Cell Enrichment Kit“ (#19051, Stem Cell Technology, Köln, Deutschland). Humane CD4^+ -naïve oder -Gedächtniszellen wurden durch das „Human naïve CD4^+ T Cell Enrichment Kit“ (#19155, Stem cell Technology, Köln, Deutschland) und das „Human memory CD4^+ T Cell Enrichment Kit“ (#19157, Stem cell Technology, Köln, Deutschland) isoliert. Die verwendeten Kits funktionieren jeweils nach dem Prinzip der Negativselektion. Dafür wurden im ersten Schritt die ungewollten Zellen durch einen Biotin-gekoppelten Antikörper markiert. Für die Isolation der CD3^+ -T-Lymphozyten wurden demnach die in den PBMCs enthaltenen Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen sowie eventuell vorhandene Erythrozyten durch CD14- , CD15- , CD16- , CD19- , CD34- , CD36- , CD56- und CD123- Antikörper gebunden. Im nächsten Schritt erfolgte die Kopplung der Biotin-Antikörper-gebundenen Zellen an Anti-Biotin-gekoppelte magnetische Partikel. Durch das Einbringen dieser Antikörperkomplex-gebundenen Zellen in ein magnetisches Feld konnten nun die ungewollten mononukleären Zellen von den CD3^+ -T-Lymphozyten abgetrennt werden. Die T-Zellen verblieben unberührt im Puffer. Die Isolation der T-Zellen durch die von der Firma Stem Cell bezogenen Kits erfolgte exakt nach den Anweisungen des Herstellers. Die T-Zellisolation durch das Kit der Firma Miltenyi wurde modifiziert und wird deshalb im Folgenden ausführlich beschrieben. Es wurden jeweils 10×10^6 PBMCs in $43 \mu\text{l}$ MACS-Puffer (Tabelle 8) aufgenommen und mit $7 \mu\text{l}$ der Biotin-gekoppelten Antikörper (Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden zu diesem Biotin-Antikörper-Zellgemisch $36 \mu\text{l}$ MACS-Puffer und $14 \mu\text{l}$ anti-Biotin-gekoppelte magnetische Partikel (Pan T Cell MicroBead Cocktail) gegeben und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Zell-Antikörpersuspension mit dem 10-fachen Volumen MACS-Puffer aufgefüllt und bei 4°C und 490 g für 10 Minuten zentrifugiert.

Die magnetische Separation der Zellen erfolgte mit Hilfe von in Magnete gespannten LS-Säulen (#130042401, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Vor Gebrauch wurden diese mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert. Bis zu 100×10^6 Antikörper-Komplex-gebundene PBMCs wurden in 500 μ l MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Durchfluss, welcher aufgefangen wurde, befanden sich die T-Lymphozyten, welche nach Zentrifugation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 490 g in RPMI-Vollmedium in einer Dichte von 3×10^6 Zellen pro ml bis zum Start des Experiments bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Die Reinheit der T-Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung CD3-positiver Zellen festgestellt. Dafür wurden 3×10^5 Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 3 μ l des Antikörpers „PE mouse anti-human CD3“ (#555333, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers auszuschließen, wurden ebenfalls Zellen mit dem Antikörper „PE mouse IgG1 κ Isotype Control“ (#555749, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und für die Analyse in 300 μ l 1 x PBS plus 1 mM EDTA und 1 % Paraformaldehyd fixiert. Zusätzlich wurden auch unbehandelte Zellen analysiert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des für die T-Zellisolation mit dem Pan T cell Isolation Kit II verwendeten Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
MACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA in 1 x PBS, pH 7,2

3.3.7 Stimulation von humanen T-Lymphozyten

Humane T-Lymphozyten wurden durch anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte magnetische Partikeln stimuliert (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation, #11132D, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hierbei handelt es sich um ein gut etabliertes *in vitro* Modell der Aktivierung humaner T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen *in vivo*. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank. T-Lymphozyten wurden zunächst durch die Zentrifugation bei 490 g und Raumtemperatur für 5 Minuten pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde durch die wiederholte Aufnahme in 1 x PBS und Zentrifugation dreimal gewaschen. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 1×10^6 T-Zellen in 200 μ l Medium inkubiert. Je nach Versuchsansatz erfolgte die Kultivierung in RPMI-Vollmedium oder argininfreien RPMI-Medium $\pm 150 \mu$ M

Arginin. Je 1×10^6 T-Lymphozyten wurden $5 \mu\text{l}$ anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte magnetische Partikeln eingesetzt. Diese wurden zuvor mit einem Milliliter $1 \times \text{PBS}$ gewaschen. Die Inkubationsdauer variierte je nach Versuchsansatz und betrug 6 bis 96 Stunden.

3.3.8 Feststellung der Zellproliferation mittels [^3H]Thymidineinbau

Die Proliferationsraten von Zellen wurden durch den Einbau des [^3H]-markierten DNA-Bausteins Thymidin festgestellt. Dafür wurden 3×10^5 primäre T-Lymphozyten, 1×10^6 primäre CLL-Zellen oder 5×10^4 Zellen einer immortalisierten Zelllinie in $200 \mu\text{l}$ Medium in einer Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte inkubiert. Es wurden pro Bedingung Triplets angesetzt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden in jede der Vertiefungen jeweils $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]Thymidin (#NET027E005MC, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gegeben. Nach 16 bis 18 Stunden wurden die Zellen jeweils in ein $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und bei 490 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml kaltem $1 \times \text{PBS}$ plus 2% FBS aufgenommen und bei 490 g für 5 Minuten und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet durch die Zugabe von $200 \mu\text{l}$ 2% Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) lysiert. Nach Zugabe von 3 ml Rotiszint[®] eco plus (#0016.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde die Szintillation durch den Tri-Carb[®] 2810 TR (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen.

3.3.9 Nachweis der metabolischen Aktivität mittels MTS

Der Nachweis der metabolischen Aktivität erfolgte durch das „CellTiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)“ (#G3580, Promega, Madison, WI, USA). Dafür wurden pro Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte 5×10^4 Zellen einer immortalisierten Zelllinie in $100 \mu\text{l}$ Medium inkubiert. Es wurden pro Bedingung Triplets angesetzt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden $20 \mu\text{l}$ der „CellTiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution“ zu den Zellen gegeben. Nach ein- bis vierstündiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 erfolgte die Auswertung durch die photometrische Messung der Absorption bei 530 nm . Medium ohne Zellen diente als Leerwert, welcher von allen erhobenen Werten subtrahiert wurde.

3.3.10 Nachweis von Interferon- γ durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die IFN- γ -Konzentration in T-Zellkultur-Überständen wurde durch das „BD OptEIA[™] Human IFN- γ ELISA Set“ (#555142, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) festgestellt. Im ersten

Schritt wurden dafür die Wände der Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen IFN- γ beladen. Zu diesem Zweck wurden 50 μ l des 1:250 mit Coating Puffer (Tabelle 9) verdünnten „Human IFN- γ Capture Antibody“ in jede Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde jede Vertiefung der 96-Lochplatte mit Waschpuffer (Tabelle 9) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blocken wurden anschließend in jede Vertiefung 200 μ l 1 x PBS plus 10 % FBS pipettiert. Während der einstündigen Inkubationszeit wurden die zu untersuchenden Zellkulturüberstände mit 1 x PBS plus 10 % FBS 1:3 oder 1:5 verdünnt sowie eine IFN- γ -Standardreihe (Tabelle 10), anhand welcher die Konzentrationsbestimmung stattfand, pipettiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden jeweils 50 μ l der verdünnten Proben oder Standards in die Vertiefungen der Lochplatte pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung des im Überstand enthaltenen INF- γ an den immobilisierten Antikörper gegen dieses zu gewährleisten. Die Standards wurden doppelt, die unbekannt Proben dreifach bestimmt. Anschließend wurde die Platte fünf Mal mit 1 x PBS plus 10 % FBS gewaschen. Dann wurden 50 μ l des Detektionsreagenz, bestehend aus einem biotinylierten IFN- γ -Antikörper und einer Streptavidin-gebundenen Peroxidase, welche jeweils 1:250 mit 1 x PBS plus 10 % FBS verdünnt wurden, in die Vertiefungen gegeben. Nach einer Stunde wurde die 96-Lochbodenplatte sieben Mal mit Waschpuffer gespült. Das „TMB-Substrat“ A und B wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100 μ l in jede Vertiefung der 96-Lochplatte gegeben. Während der 30-minütigen Inkubationszeit wurde das Substrat durch die an das INF- γ gebundene Peroxidase metabolisiert. Dies führte zu der Blaufärbung der Lösung, deren Intensität direkt proportional zu der Menge des enthaltenen INF- γ war. Die Reaktion wurde schließlich mit 50 μ l 2 N Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption photometrisch bei 450 nm festgestellt.

Tabelle 9: Für den IFN- γ -ELISA verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coating Puffer	7,13 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ pH 9,5 ad 1 L
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in 1 x PBS

Tabelle 10: Pipettierschema der IFN- γ -Standardreihe für den ELISA.

Standard	IFN- γ -Endkonzentration (pg/ml)	IFN- γ	1 x PBS plus 10 % FBS (μ l)
1	3000	10,8 μ l einer 100 ng/ μ l IFN- γ -Lösung	349
2	1000	120 μ l des Standards 1	240
3	333	120 μ l des Standards 2	240
4	111	115 μ l des Standards 3	230
5	37	110 μ l des Standards 4	220
6	12,3	100 μ l des Standards 5	200
7	4,1	75 μ l des Standards 6	150
8	-	-	200

3.3.11 Durchflusszytometrischer Nachweis von Zytokinen

Die Quantifizierung der T-Zellzytokine Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumornekrosefaktor (TNF) und IFN- γ erfolgte in Überständen von T-Zellkulturen durchflusszytometrisch durch das „Human Th1/Th2 Cytokine Kit II“ (#551809, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Die zu analysierenden Zellkulturüberstände wurden im Verhältnis 1:7 verdünnt. Es wurde exakt nach den Anweisungen des Herstellers gearbeitet. Die Analyse erfolgte durch das FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

3.3.12 Feststellung der Zellviabilität durch Annexin- und Propidiumiodidfärbung

Die Viabilität von Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Detektion von Annexin- und Propidiumiodid-positiver Zellen mittels des „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I“ (#556547, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) festgestellt. Annexin bindet kalziumabhängig an das in die Plasmamembran eingelagerte Phospholipid Phosphatidylserin. In nicht-apoptotischen Zellen ist dieses intrazellulär lokalisiert und für extrazelluläres Annexin nicht zugänglich. Während der frühen Apoptose wird dieses jedoch von intrazellulär in den Extrazellulärraum geklappt, wodurch die Bindung durch Annexin möglich wird. Annexin-positive-Zellen sind demnach ein Marker für Zellen, welche sich in der frühen Apoptose befinden. Propidiumiodid hingegen kann ausschließlich die poröse Zellmembran bereits toter Zellen überwinden.

Für die Analysen wurden 1×10^6 primäre Zellen oder $0,5 \times 10^6$ Zellen einer immortalisierten Zelllinie eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst für 5 Minuten bei 490 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um das Zellkulturmedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde durch die Aufnahme

in einem Milliliter 1 x Annexin-Bindepuffer (Bestandteil des Kits) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Für die Annexin-Färbung wurden die Zellen in 100 µl Annexin-Bindepuffer plus 4 µl FITC-Annexin aufgenommen und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Milliliter Annexin-Bindepuffer gewaschen und für die Analyse in 300 µl Annexin-Bindepuffer aufgenommen. Für die Färbung mit Propidiumiodid wurde das Zellpellet in 300 µl 1 x PBS aufgenommen. Unmittelbar vor der Analyse wurden 3 µl Propidiumiodid in die Zellsuspension pipettiert. Die Messung erfolgte mittels des FACS Canto II. Die ermittelten Daten wurden mit der Software Flowjo (Version 10.1) ausgewertet.

3.3.13 Transportstudien mit Zellen

Für die Transportstudien mit radioaktiv-markierten Aminosäuren wurden pro Ansatz $0,5 \times 10^6$ Zellen einer immortalisierten Zelllinie oder $2,5 \times 10^6$ primäre Zellen eingesetzt. Diese wurden zunächst durch abwechselndes Zentrifugieren (490 g, 5 Minuten) und Resuspendieren in 1 x Locke's Lösung (LL, Tabelle 11) zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl 1 x LL aufgenommen und über 10 Minuten auf 37 °C erwärmt. Falls angegeben, wurden der 1 x LL während dieser Inkubation 200 µM des CAT-Inhibitors N-Ethylmaleimid (NEM) zugefügt. Dann wurde die Zellsuspension mit 100 µl einer ebenfalls auf 37 °C erwärmten 2x Aufnahmelösung vermischt. Die Aufnahme der radioaktiv-markierten Aminosäuren erfolgte über 5, 15, 30, 60 oder 120 Sekunden und wurde durch die Zugabe von einem Milliliter eiskalter 1 x LL terminiert. Die während dieser Zeit nicht aufgenommenen radioaktiv-markierten Aminosäuren wurden durch dreimaliges Waschen mit eiskalter 1 x LL entfernt. Abschließend wurden die Zellen in 200 µl 2 % SDS für 15 Minuten auf dem Schüttler lysiert. Die Szintillation wurde in 3 ml Irga-Safe Plus mit dem Tri-Carb[®] 2810 TR (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen. Pro Bedingung wurden jeweils Triplikate analysiert. Die Zusammensetzungen der Aufnahmelösungen sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Falls erforderlich wurde die Aufnahmelösung mit 2 mM einer kompetitiven Aminosäure supplementiert. Für die Feststellung der Aminosäureaufnahme in der Abwesenheit von Natrium wurde die 1 x LL bei allen Schritten durch Natrium-freie 1 x LL ersetzt. Die [³H]Arginin-Aufnahmeversuche mit primären T-Zellen wurden mit argininfreiem RPMI-Medium anstatt 1 x LL durchgeführt. Die von dem Szintillationszähler kalkulierte Szintillation in dpm wurden wie folgt in pmol der aufgenommenen Aminosäure umgerechnet:

Arginin:

Es wurden 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]Arginin und 100 μM Arginin eingesetzt.

Demnach gilt: 1 μCi [^3H]Arginin / 10 μM Arginin

$$1 \mu\text{Ci} \cong 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$$

$$2,22 \times 10^6 \text{ dpm} / 10 \mu\text{M Arginin}$$

$$222 \text{ dpm} / \text{pmol Arginin}$$

Citrullin:

Die spezifische Aktivität des [^{14}C]Citrullin betrug 55 mCi/mmol Citrullin. Daraus ergibt sich:

$$1 \mu\text{Ci} / 20 \text{ nmol Citrullin}$$

$$1 \mu\text{Ci} \cong 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$$

$$2,22 \times 10^6 \text{ dpm} / 20 \text{ nmol Citrullin}$$

$$111 \text{ dpm} / \text{pmol Citrullin}$$

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer und Aufnahmelösungen für die Transportstudien mit Zellen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x Locke's Lösung (LL)	154 mM NaCl 5,6 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES 3,6 mM NaHCO ₃ 2 mM CaCl ₂ 5,6 mM Glukose 2 % BSA pH 7,4
1 x Natrium-freie LL	154 mM Cholinchlorid 5,6 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES 2 mM CaCl ₂ 5,6 mM Glukose 2 % BSA pH 7,4
2 x [³ H]Arginin-Aufnahmelösung	200 µM Arginin 20 µCi/ml [³ H]Arginin (spezifische Aktivität: 43 Ci/mmol, #20069E, MD Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 2 % BSA in 1 x LL
2 x [¹⁴ C]Citruillin-Aufnahmelösung	2 µCi/ml L-[ureido- ¹⁴ C]Citruillin (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol, # ARC0508, Hartmann Analytics, Braunschweig, Deutschland) 2 % BSA in 1 x LL

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Gewinnung von Proteinen und Bestimmung der Proteinkonzentrationen durch das BCA-Assay

Für den Zellaufschluss zur Gewinnung von Proteinen wurden Zellen zunächst durch Zentrifugation bei 490 g für 5 Minuten pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend in 200 µl „Radioimmunoprecipitation Assay“ (RIPA)-Puffer plus Protease- und Phosphatase-Inhibitor aufgenommen. Dafür wurden zuvor 10 ml RIPA-Puffer (Tabelle 12) mit jeweils einer Tablette Phosphatase- und Proteinase-Inhibitor supplementiert (PhosSTOP, #04906837001; complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, #11836170001, jeweils Roche). Der Zellaufschluss geschah durch 15-sekündiges Vortexen in einem Intervall von 10 Minuten unter ständiger Eiskühlung über insgesamt 30 Minuten. Durch das anschließende Zentrifugieren bei 16200 g und 4°C für 15 Minuten wurde die Proteinlösung von Zelltrümmern befreit.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (#23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dabei handelt es sich um eine colorimetrische Methode, welche auf dem bereits 1951 beschriebenen Lowry-Test basiert (Lowry, 1951). In alkalischen Lösungen reduzieren die in Proteinen enthaltenen Cystein-, Tyrosin- und Tryptophanreste Cu^{++} -Ionen zu Cu^+ -Ionen. Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit Cu^+ -Ionen einen blau-violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Intensität der blau-violetten Färbung ist dabei äquivalent zu der vorhandenen Proteinkonzentration. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer BSA-Standardreihe (Tabelle 13). Für die Konzentrationsbestimmung wurden die zu testenden Proben 1:5 oder 1:10 verdünnt und jeweils 25 μl dieser Verdünnung in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte überführt. Darauf wurden 200 μl der frisch angesetzten Versuchslösung, bestehend aus den Reagenzien A (BCA in alkalischer Lösung) und B (4 % Kupfersulfat), im Verhältnis 50:1, gegeben. Es erfolgte jeweils die Doppelbestimmung der Standardpunkte und zu testenden Proben. Die Absorptionsmessung erfolgte im Plattenlesegerät bei 562 nm.

Tabelle 12: Zusammensetzung des verwendeten Puffers für den Zellaufschluss für Proteinanalysen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Radio Immunoprecipitation Assay-(RIPA)-Puffer	150 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM Tris 1 % Triton X 100 1 % Deoxycholat 0,1 % SDS

Tabelle 13: Pipettierschema für die BSA-Standardreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung.

Standard	BSA-Endkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	deionisiertes Wasser (μl)	BSA
A	2000	0	300 μl der 2 mg/ml Stocklösung
B	1500	125	375 μl der 2 mg/ml Stocklösung
C	1000	325	325 μl der 2 mg/ml Stocklösung
D	750	175	175 μl des Standards B
E	500	325	325 μl des Standards C
F	250	325	325 μl des Standards E
G	125	325	325 μl des Standards F
H	25	400	100 μl des Standards G
I	0	400	-

3.4.2 Glykosidasebehandlung von Proteinen

In vivo liegen CATs an einer oder mehreren Stellen glykosyliert vor. Dies verändert die Laufeigenschaften dieser Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel: Einerseits erscheinen diese

nach Auftrennung als undefinierte Schmierbände, andererseits weit oberhalb der berechneten Molekülgröße. Für die Darstellung der CATs als definierte Bände wurden die Zuckerreste vor der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel von den Proteinen entfernt. Dafür wurden jeweils 30 µg des Proteinlysats in der Gegenwart von 1 Unit N-Glykosidase F (Roche, Mannheim) über 45 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine eines Proteingemisches in einem elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dafür wurden die Proteine zunächst durch die Aufnahme in SDS-Probenpuffer (Tabelle 14) in einem Volumenverhältnis von 1:1 und Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten denaturiert. Die Protein-denaturierende Wirkung des SDS-Probenpuffers beruht auf den Komponenten Natriumdodecylsulfat (SDS), Harnstoff und β -Mercaptoethanol. Bei SDS handelt es sich um ein Detergens, welches nicht-kovalente Bindungen in Proteinen löst. Da es selbst stark negativ geladen ist, maskiert es nach Bindung der Proteine deren individuelle Ladung. Harnstoff löst Wasserstoffbrückenbindungen, während β -Mercaptoethanol als starkes Reduktionsmittel Disulfid-Bindungen löst. Ein SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel zusammen. Das großporige Sammelgel lässt eine weitgehend ungehinderte Wanderung der Proteine zu. Da die Poren des Trenngels kleiner sind und dies die Migration der Proteine verlangsamt, kommt es zu der vorübergehenden Konzentration der Proteine am Übergang von Sammelgel zu Trenngel. Nach Eintritt in das Trenngel werden die Proteine schließlich anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Gele ist der Tabelle 15 zu entnehmen. Die zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgele wurden stets frisch hergestellt und nach dem vollständigen Auspolymerisieren in eine Vertikal-Gelelektrophoresekammer überführt und mit 1 x SDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 14) überdeckt. Die zu untersuchenden Proben sowie ein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, #26616, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für die folgende Abschätzung der Proteingrößen wurden in die Geltaschen gefüllt. Durch Verbindung mit einer Gleichstromquelle entstand ein elektrisches Feld, in welchem die durch die SDS-Bindung negativ geladenen Proteine vom Minuspol zum Pluspol wanderten. Die Migrationsgeschwindigkeit war proportional zu der jeweiligen Proteingröße. Um ein gleichmäßiges Einlaufen der Proben zu gewährleisten, wurden zunächst für 10 min 200 V, danach 120 V angelegt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-Elektrophorese-Puffer, 10 x	240 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS
SDS-Probenpuffer	125 mM Tris 20 % Glycerol 5 % SDS 8 M Harnstoff 0,001 % Bromphenolblau 2 % β -Mercaptoethanol

Tabelle 15: Zusammensetzung des zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE.

Substanz	Sammelgel 6 %	Trenngel 10 %
deionisiertes Wasser	6,1 ml	9,0 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	-	5,6 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	2,5	-
10 % SDS	100 μ l	225 μ l
Acrylamid 4 K-Lösung (30%) Mix 37,5:1	2,3 ml	7,5 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	66 μ l	150 μ l
TEMED	14 μ l	15 μ l

3.4.4 Western Blot-Analysen

Durch Western Blot-Analysen werden mit Hilfe von Antikörpern bestimmte Proteine eines Proteingemisches detektiert. Dies wird durch die elektrische Übertragung der Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran ermöglicht. Durch Anheftung spezifischer Primärantikörper sowie Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper kann so ein bestimmtes Protein mit Hilfe einer „Enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reagenz auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Alle für die Western Blot-Analysen verwendeten Puffer und Lösungen sind der Tabelle 16 zu entnehmen. Für den Transfer der nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran wurde das SDS-Polyacrylamidgel, unmittelbar nach dem Beenden der SDS-PAGE (Kapitel 3.4.3) für 10 Minuten in Elektroblothingpuffer inkubiert. Mit den übrigen Komponenten des Western Blot-Sandwichs - der Nitrozellulose-Membran, dem Whatmanpapier und den Schwämmen - wurde gleichermaßen verfahren. Anschließend wurden die Komponenten wie in Abbildung 2 dargestellt gestapelt. Der Proteintransfer erfolgte bei 200 mA je nach Proteingröße für 16 bis 20 Stunden.

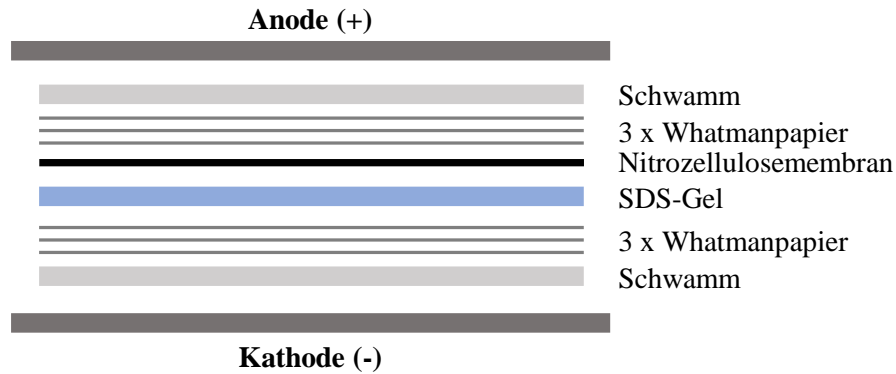


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung der Einzelkomponenten des Western Blot-Sandwichs.

Für die elektrische Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran werden die Komponenten des Western Blot-Sandwichs (2 Schwämme, 6 Whatmanpapiere, die Nitrozellulosemembran und das SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Gel)) wie dargestellt gestapelt.

Nach der elektrischen Übertragung wurden die auf der Nitrozellulosemembran heftenden Proteine mit Ponceau S-Lösung angefärbt um die Transfereffizienz zu ermitteln. Nach Auswertung wurde der Farbstoff mit Wasser entfernt und die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in Blotto plus 5 % Ziegen Serum (#CL1200-500, Cedarlane, Burlington, Kanada) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dies diente der Blockung freier Enden auf der Nitrozellulose-Membran und sollte das unspezifische Binden der eingesetzten Immunglobuline verhindern. Im Anschluss wurde die Membran bei 4 °C über Nacht in einer spezifischen Primärantikörperlösung inkubiert. Dies gewährleistete die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zwischen Protein und Primärantikörper. Darauf folgte das dreimalige Waschen der Membran mit Blotto um unspezifische Bindungen zu lösen. Anschließend wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben. Abschließend erfolgten das dreimalige Waschen der Membran mit 1 x TBS plus 0,05 % Tween 20 und die Inkubation in 1 x TBS. Die nachzuweisenden Proteine konnten mit Hilfe von Western Lightning, einem ECL-Reagenz, auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. In diesem enthaltenes Luminol wird von den Peroxidasen der Sekundärantikörper unter Abgabe von Wasserstoffperoxid oxidiert. Die freigesetzte Energie wird in Form von Licht der Wellenlänge 425 nm abgegeben. Dies kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die benötigte Belichtungszeit variierte nach Proteinmenge und -größe, sowie der Qualität des eingesetzten Primärantikörpers. Die quantitative Auswertung der Western Blot-Analysen erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Detektor ChemiDocTM XRS und dem Programm Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Die für die Western Blot-Analysen verwendeten Puffer und Lösungen sind der Tabelle 16 zu entnehmen. Die genutzten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 17 und 18 aufgelistet.

Tabelle 16: Zusammensetzung der für die Western Blot-Analysen verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antikörperverdünnungspuffer	1 % BSA 0,1 % Tween in 1 x PBS
Blotto	50 mM Tris, pH 8 2 mM CaCl ₂ 0,01 % Antifoam 0,05 % Tween 20 5 % Milchpulver
Elektroblottingpuffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol
PBS, 10 x	17,6 mM KH ₂ PO ₄ 26,8 mM KCl 1,4 M NaCl 101 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O pH 7,4
Ponceau S-Lösung	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig
TBS, 10 x	100 mM Tris 1,5 M NaCl

Tabelle 17: Für den Nachweis von Proteinen in Western Blot-Analysen verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verdünnung
anti-ASS	Kaninchen	Sigma Aldrich (# HPA020896)	1:1000 in Antikörperverdünnungspuffer
anti-GAPDH	Kaninchen	Cell signaling (14C10, #2118)	1:10000 in Blotto
anti-hCAT-1 (IPR 04.02.10)	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG [REDACTED]	1:10000 in Antikörperverdünnungspuffer
anti-hCAT-3	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG [REDACTED]	1:10000 in Antikörperverdünnungspuffer
anti-LAT1	Kaninchen	Cell signalling (#5347)	1:5000 in Antikörperverdünnungspuffer
anti-β-Tubulin	Maus	Sigma Aldrich (#T4026)	1:10000 in Blotto
anti-y ⁺ LAT1 (aff.pur. EP82, 22.08.12 run 1)	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG [REDACTED]	1:3000 in Antikörperverdünnungspuffer
anti-y ⁺ LAT2 (PP6 SA7667, 27.11.2014)	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG [REDACTED]	1:10000 in Antikörperverdünnungspuffer

Tabelle 18: In Western Blot-Analysen verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse IgG	Kaninchen	Sigma Aldrich (# 9044)	1:15000 in Blotto
anti-rabbit IgG	Esel	Calbiochem (#401393)	1:15000 in Blotto

3.4.5 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Die Inkubation intakter Zellen mit nicht-membrangängigem Hydroxysulfosuccimid (NHS)-Biotin, führt zu der Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den NHS-Estern des Biotins und den extrazellulär liegenden freien Aminogruppen von Membranproteinen. Demnach werden auf diese Weise Oberflächenproteine dauerhaft an Biotin gebunden und können durch eine Kopplung an immobilisiertes Avidin von intrazellulären Proteinen getrennt werden. Für die Markierung der T-Zell-Oberflächenproteine mit Biotin wurden zunächst 30×10^6 T-Zellen bei $490 g$ und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Milliliter eiskaltem $1 \times$ PBS resuspendiert, in ein $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in $0,5\text{ mg}$ EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (#21331, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), welches in einem Milliliter $1 \times$ PBS gelöst wurde, aufgenommen und für 15 Minuten bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit $1 \times$ PBS gewaschen und schließlich in $100\text{ }\mu\text{l}$ RIPA plus Protease- und Phosphatase-Inhibitor lysiert.

Für die Kopplung der Biotin-markierten Proteine an Avidin wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ NeutrAvidin®UltraLink®Resin (#53150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 15 Minuten bei $16200 g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Auf das immobilisierte Avidin wurden $100\text{ }\mu\text{g}$ der Biotin-markierten Proteine gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben für 15 Minuten bei $16200 g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Avidin-Protein-Gemisch wurde zweimal mit $400\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II (Tabelle 19) gewaschen. Abschließend wurde das Avidin-Proteinsediment in $30\text{ }\mu\text{l}$ SDS-Probenpuffer (Tabelle 14) aufgenommen.

Tabelle 19: Zusammensetzung der für die Biotinylierung der Oberflächenproteine verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer I	50 mM Tris 500 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 % Triton X 100 0,1 % SDS
Waschpuffer II	50 mM Tris 1 mM EDTA 0,5 % Triton X 100 0,1 % SDS

3.5 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mittels „QIAzol Lysis Reagent“ (#79306, QIAGEN, Hilden, Deutschland). Dafür wurden Zellen zunächst bei 490 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Milliliter „QIAzol Lysis Reagent“ aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die RNA-Lösung wurden 200 µl Chloroform gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Sekunden, bis dieser sich vollständig milchig-trüb darstellte, kräftig durchmischt. Es folgte die Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und die anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 16200 g. Dabei wurde der Ansatz in 3 Phasen aufgetrennt, wobei die untere Phase das Phenol, Chloroform und die DNA, die Interphase die Proteine und die obere Phase die RNA enthielt. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 16200 g und 4 °C pelletiert und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die RNA für 15 Minuten getrocknet und in 30 µl Nuklease-freies Wasser (#129114, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.5.2 Reverse Transkription

Die komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA)-Synthese aus RNA erfolgte mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (#4368813, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in der Lage ist aus RNA cDNA zu synthetisieren. Die entstandene cDNA

kann anschließend für weiterführende Analysen, wie die quantitative real time-PCR, verwendet werden. Für den Reaktionsansatz wurde die eingesetzte RNA auf 50 ng/μl verdünnt. Der Reaktionsansatz der Reversen Transkription ist der Tabelle 20 zu entnehmen. Das Programm für die Reverse Transkription wird in Tabelle 21 beschrieben.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Substanz	1 x Ansatz (μl)
10 x RT-Puffer	2
25 x dNTP-Mix	0,8
10 x RT Random Primer	2
Reverse Transkriptase	0,5
RNA (50 ng/μl)	10
Nuklease-freies Wasser	4,7

Tabelle 21: Programm für die cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
Anlagerung der Primer an RNA	25	20
Reverse Transkription	37	120
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	85	5
Kühlung	4	∞

3.5.3 Quantitative real time-PCR

Allgemein dient die Polymerasekettenreaktion (PCR) der Amplifikation gewünschter Nukleotidsequenzen. Hierzu werden ein Matrizenstrang, zwei passende Oligonukleotidprimer, eine DNA-Polymerase und Desoxynukleotide benötigt. Die Reaktion verläuft in 3 Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA-Matrize denaturiert. Darauf folgt die Anlagerung der Primer und schließlich die Elongation durch die DNA-Polymerase. Die quantitative real time-PCR funktioniert nach dem Prinzip der allgemeinen PCR, ermöglicht aber darüber hinaus die Quantifizierung der zu einem spezifischen Zeitpunkt in Zellen oder Geweben stattfindenden mRNA-Expression. Sie erfolgte nach dem Taqman-Prinzip. Dabei befinden sich auf einem zusätzlichen Oligonukleotid, der sogenannten Sonde, zwei Fluorophore, der Reporter (6-Carboxyfluorescein (FAM)) und der Quencher (Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)). Die Sonde bindet zu Beginn der real time-PCR-Analyse an die komplementären Sequenzen der cDNA. Wird der Reporter von einer Lichtquelle angeregt, emittiert dieser Energie in Form von Licht. Dieses wird vom Quencher durch seine räumliche Nähe zum Reporter absorbiert. Sobald die Polymerase, die zusätzlich mit einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität ausgestattet ist, über die cDNA wandert, spaltet sie die Sonden ab. Quencher und Reporter entfernen sich voneinander

und das vom Reporter emittierte Licht kann nun von Sensoren im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Software: StepOne Software v2.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) detektiert werden. Man kann von der Menge der detektierten Energie auf die vorhandene Menge der cDNA des entsprechenden Gens schließen. Die Taq-Polymerase wurde in der Arbeitsgruppe [REDACTED] (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz) hergestellt und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Quantifizierung der ermittelten Werte erfolgte nach der $2^{-\Delta C_T}$ -Methode (Livak, 2001). Die C_T -Werte der untersuchten Gene wurden jeweils gegen die C_T -Werte des Haushaltsgen normalisiert. In den Tabellen 22, 23 und 24 sind die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden, der Reaktionsansatz sowie das Programm der quantitativen real time-PCR aufgelistet.

Tabelle 22: Sequenzen der für die real time-PCR genutzten Oligonukleotide.

Gen	Sequenz (5'-3')	
hCAT-1	Sense: Antisense: Sonde:	CTT CAT CAC CGG CTG GAA CT GGG TCT GCCC TAT CAG CTC GT AAT CCT CTC CTA CAT CGG TAC TTC AAG CGT
hCAT-2A	Sense: Antisense: Sonde:	TTC TCT CTG CGC CTT GTC AA TCT AAA CAG TAA GCC ATC CCG G TCT GGG CTC TAT GTT TCC TTT ACC CCG AA
hCAT-2B	Sense: Antisense Sonde	TCC TCT CTG CGC CTT GTC AA CCA TCC TCC GCC ATA GCA TA TGG ATC CAT TTT CCC AAT GCC TCG
hCAT-3	Sense: Antisense: Sonde:	CTC TGT GCT CTT TCT ACC AGC C CAG AGA CCA CGG TGG CTA TGA T ATC CAC ACC GGC ACA CGC ACC
B2M	Sense: Antisense: Sonde:	AGC GTA CTC CAA AGA TTC AGG TT ATG ATG CTG CTT ACA TGT CTC GAT TCC ATC CGA CAT TGA AGT TGA CTT ACT
y⁺LAT1	Sense: Antisense: Sonde:	ATT GTG GCT GCT TCA AGG C GGT GTG AAC CGC TCA ACA TG CCA TCT CCC TGA TGC CAT CTG CAT G
y⁺LAT2	Sense: Antisense: Sonde:	CAC GTT CAC TTA CGC CAA GGT TCA GAG TGT CCC TGG CAC AGT TGC CAT CAT TGT CAT GGG CCT TGT TA
b⁰⁺AT	Sense: Antisense: Sonde:	CGC TGG GTG CCC TGT G AGG CCT CCA TCA GGT AGG GA TTG CGG AGC TTG GCA CAA TGA TCA
LAT1	Sense: Antisense: Sonde:	GAA GGG TGA TGT GTC CAA TCT A TTC TGT AGG GGT TGA TCA TTT C CAA CTT CTC ATT TGA AGG CAC CAA ACT G
LAT2	Sense: Antisense: Sonde:	TGA CTT CAT TGA GCT GCT AAC CC GTC CTC ATT AGC CTC CTC TGT CC TGA GCC AGA AGA TGT GTG TGG TCG TGT AC
4F2hc	Sense: Antisense: Sonde:	CTC AGG CAA GGC TCC TGA CT GGC AGG GTG AAG AGC ATC A TGC CGG CTC AAC TTC TTC GAC TCT AC
ATB⁰⁺	Sense: Antisense: Sonde:	ACT CAG GCT GGA ATT TAC TGG GT CAA CTA GCT CCA GTA TAG CTG CAA TTA A TCT GAT TGA CCA CTT CTG TGC TGG ATG G

Tabelle 23: Zusammensetzung des für die quantitative real time-PCR verwendeten Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
2 x Taq-Puffer	40 mM Tris HCl, pH 8,7 20 mM NH ₄ SO ₄ 8 mM MgCl ₂ 20 mM KCl

Tabelle 24: Reaktionsansatz für die quantitative real time-PCR.

Substanz	1 x Ansatz (µl)
2 x Taq-Puffer	12,5
dNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP, je 10 mM)	1
Primer sense (10 pmol/µl)	2
Primer antisense (10 pmol/µl)	2
Sonde	1
Taq-Polymerase	0,5
Nuklease-freies Wasser	4
cDNA	2

Tabelle 25: Programmablauf für die quantitative real time-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Minuten	1
Denaturierung	94	15 Sekunden	45
Anlagerung/Elongation	60	60 Sekunden	45
Kühlung	4	∞	1

Für die absolute Quantifizierung der mRNA wurden die Molekülzahlen der untersuchten Transporter mittels einer mit *in vitro* transkribierter cRNA erstellten Standardreihe festgestellt. Die Linearisierung der Plasmide sowie die *in vitro* Transkription der cRNAs wurden von [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] in der AG [REDACTED] durchgeführt.

Die dafür genutzten Plasmide und Restriktionsenzyme sind der Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Für die cRNA-Synthese verwendeten Plasmidkonstrukte sowie die für die Linearisierung dieser Konstrukte eingesetzten Restriktionsenzyme und die Nukleotidanzahl der kodierenden Region.

Transporter	Plasmid	Restriktionsenzym für die Linearisierung	Nukleotidanzahl der kodierenden Region
hCAT-1	pSPhCAT1-AB1C	SalI	2138
hCAT-2A	hCAT2A-pSP64T	BamHI	2242
hCAT-2B	hCAT2B-pSP64T	SalI	2233
hCAT-3	HC3.pSP64T	SalI	2126
y ⁺ LAT1	y ⁺ LAT1_pSGEM	NheI	1985
y ⁺ LAT2	y ⁺ LAT2_pSGEM	NheI	1980
b ^{0,+} AT	b ^{0,+} AT_pGEM	NotI	1845
ATB ^{0,+}	ATB ^{0,+} _pSPORT	NotI	2150

Basierend auf der Länge der kodierenden Nukleotidsequenz der zu untersuchenden Transporter und des Molekulargewichts eines Ribonukleotids wurde die Molekülzahl wie folgt berechnet:

$$1 \text{ Mol} = 2138 \text{ bp} \times 340 \text{ Da} = 726920 \text{ g} = 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle}$$

$$1 \text{ g} = 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle} / 726920 \text{ g} = 8,29 \times 10^{17} \text{ Moleküle}$$

Darauf basierend wurde eine Verdünnungsreihe für die absolute Quantifizierung der mRNA erstellt (Tabelle 27). Die Ansätze wurden wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben in die cDNA-Synthese eingesetzt.

Tabelle 27: Pipettierschema für die cRNA-Verdünnungsreihe für die Quantifizierung der Transporter-mRNA.

SD: Standard

SD	cRNA-Endkonzentration (pg)	berechnete Molekülnzahlen	cRNA	tRNA (50 ng/μl)
1	1000	$8,29 \times 10^8$	1 ng cRNA in 50 ng/μl tRNA	-
2	100	$8,29 \times 10^7$	5 μl des Standards 1	45 μl
3	10	$8,29 \times 10^6$	5 μl des Standards 2	45 μl
4	1	$8,29 \times 10^5$	5 μl des Standards 3	45 μl
5	0,1	$8,29 \times 10^4$	5 μl des Standards 4	45 μl
6	0,01	$8,29 \times 10^3$	5 μl des Standards 5	45 μl

3.5.4 Einbringung einer siRNA in primäre humane T-Lymphozyten mittels Nukleofektion

Die transiente Senkung der hCAT-1- und LAT1-Expression in primären humanen T-Lymphozyten erfolgte jeweils durch die Einbringung einer siRNA mittels Nukleofektion. Dafür wurden der NucleofectorTM I und das „Human T Cell NucleofectorTM Kit“ (#VPA-1002, Lonza, Basel, Schweiz) genutzt. Vor dem Versuchsstart wurde die im Kit enthaltene „Nucleofector Solution“ mit dem „Supplement“ vollständig vermischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurden 5×10^6 unstimulierte T-Zellen bei 490 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit einem Milliliter 1 x PBS gewaschen und anschließend in 100 μl „Nucleofector Solution plus Supplement“ aufgenommen. 2 μg siRNA oder non-target RNA wurden an die Innenwand der Küvette pipettiert. Schließlich wurden die Zellen ebenfalls in die Küvette eingebracht und mit der siRNA vermischt. Die Nukleofektion erfolgte mit dem NucleofectorTM I Programm U 14 oder V 14. Unmittelbar nach der Nukleofektion wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette aus der Küvette in 3 ml vorgewärmtes AIM VTM-Medium (#12055, Gibco), supplementiert mit 10 % FBS, überführt und für 5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben. Die Bezeichnung, die Sequenzen und Hersteller der verwendeten siRNAs sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Bezeichnung, Sequenz und Hersteller der verwendeten siRNAs.

Bezeichnung	Sequenz/Hersteller
sihCAT-1_a	Sequenz (5'-3'): CCA GCC UUA UAG CUG UUC U99, Eurogentec (Lüttich, Belgien) im Auftrag der AG [REDACTED]
sihCAT-1_b	Sequenz (5'-3'): GCA UCU UCG UGA ACG UCU A99, Eurogentec (Lüttich, Belgien) im Auftrag der AG [REDACTED]
ON-TARGETplusSMARTpool, Human SLC7A1 siRNA	#L-007610-01-0005, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
LAT1-siRNA	Sequenz (5'-3'): CUC UUU GCC UAU GGA GGA U[dT], #SASI_Hs02 0335760, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
non-target RNA	#SR-CL000-005, Eurogentec (Lüttich, Belgien)

3.5.5 Einbringung einer shRNA in humane immortalisierte Zellen durch lentivirale Transduktion

Die Reduktion der hCAT-1-Expression in HG3-Zellen erfolgte durch die lentivirale Transduktion einer gegen hCAT-1 gerichteten shRNA. Für die Produktion der shRNA-tragenden Viruspartikel wurden die Virus-kodierenden Plasmide in HEK293T-Zellen transfiziert. Die verwendeten Plasmide sind in den Tabellen 29 und 30 aufgelistet. Für die Transfektion wurden 2×10^6 HEK293T-Zellen in einer 10 cm Schale in 10 ml Medium ausgesät. Am nächsten Morgen wurde 2 Stunden vor Transfektion das Kulturmedium der HEK293T-Zellen abgesaugt und durch 8 ml frisches Medium ersetzt. Für den Transfektionsansatz wurden 35 μ l Fugene 6 (#E2692, Promega, Madison, WI, USA) in serumfreies DMEM-Medium pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 μ g der beiden Verpackungsplasmide und 10 μ g des shRNA-kodierenden Plasmids hinzugegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor der Transfektionsansatz tropfenweise auf die HEK293T-Zellen gegeben wurde. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium der HEK293T-Zellen durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Nach 24 Stunden wurde der Viruspartikel-enthaltende Zellkulturüberstand der HEK293T-Zellen für 10 Minuten bei 490 g zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45 μ M-Filter gegeben, um eventuell verbliebene HEK293T-Zellen vollständig zu entfernen. Es wurden 1×10^6 HG3-Zellen in 500 μ l RPMI-Vollmedium in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte überführt. Darauf wurden 2 ml Virusüberstand, supplementiert mit 5 μ g/ml Polybrene, gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die transduzierten HG3-Zellen durch RPMI-Vollmedium, supplementiert mit 5 μ g/ml Puromycin für 72 Stunden selektioniert. Um die Proliferation der Zellen, trotz des durch die Reduktion der hCAT-1-Expression potentiell induzierten Argininmangels zu gewährleisten, wurde das RPMI-Vollmedium zusätzlich mit 1 mM Citrullin und 67 μ M Lysintriptid (#L8901, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

supplementiert. Nach der Selektion wurden funktionelle Tests sowie Genexpressionsanalysen gestartet. Die verwendeten shRNA-Sequenzen sind Bestandteil der „RNAi Consortium (TRC) shRNA library“ (Moffat, 2006) und verfügbar unter https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/gene/search_clones (Stand 14.02.20).

Tabelle 29: Plasmidkonstrukte für die lentivirale Einschleusung einer konstitutiv exprimierten shRNA gegen hCAT1 und einer non-target-RNA.

Plasmidbezeichnung	Beschreibung
pLKO.1-puro_SLC7A1.1	lentiviraler Plasmid für die Expression einer shRNA gegen hCAT-1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCAGAGATGTTCTCTTTGAAA (TRCN0000042963); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Cell Biology Unit, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pLKO.1-puro_SLC7A1.2	lentiviraler Plasmid für die Expression einer shRNA gegen hCAT-1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCTCTCATTTAAGGTTCCCTT (TRCN0000042964); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Cell Biology Unit, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pLKO.1-puro_SLC7A1.3	lentiviraler Plasmid für die Expression einer shRNA gegen hCAT-1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CCTACATCATCGGTACTTCAA (TRCN0000042965); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Cell Biology Unit, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pLKO.1-puro_SLC7A1.4	lentiviraler Plasmid für die Expression einer shRNA gegen hCAT-1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CTGGGCTAATTGTGAACATTT (TRCN0000042966); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Cell Biology Unit, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pLKO.1-puro_SLC7A1.5	lentiviraler Plasmid für die Expression einer shRNA gegen hCAT-1; shRNA-Sequenz (5'-3'): GCTGAGGATGGACTGCTATTT (TRCN0000042967); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Cell Biology Unit, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pLKO.1-puro_SHC002	lentiviraler Plasmid für die Expression einer non-target-RNA (#SHC002, Sigma Aldrich)
pCMVΔR8.9	lentiviraler Verpackungsplasmid: HIV-1-Kapsidproteine (<i>gag</i>), HIV-1-Reverse Transkriptase und Protease (<i>pol</i>); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pCMV-VSV-G	lentiviraler Verpackungsplasmid: Glykoprotein der Virushülle des „Vesicular stomatitis virus“ (VSV-G); Zur Verfügung gestellt von [REDACTED] (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

Tabelle 30: Plasmidkonstrukte für die lentivirale Einschleusung einer induzierbar-exprimierten shRNA gegen hCAT-1 und einer non-target-RNA.

Plasmidbezeichnung	Beschreibung
Tet-pLKO-puro-sh_hCAT1	lentiviraler Plasmid für die induzierbare Expression einer shRNA gegen hCAT-1; Backbone Tet-pLKO-puro (#21915, Addgene); integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCTGAGGATGGACTGCTATTT
Tet-pLKO-puro-scr	Lentiviraler Plasmid für die induzierbare Expression einer non-target RNA; Zur Verfügung gestellt von ██████████ (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsplasmid: HIV-1 gag, HIV-1 pol (#12260, Addgene); Zur Verfügung gestellt von ██████████ (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)
pMD2.G	Lentiviraler Verpackungsplasmid: VSV-G (#12259, Addgene); Zur Verfügung gestellt von ██████████ (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz)

3.5.6 Zusammenlagerung von Oligonukleotiden

Für die Zusammenlagerung (Annealing) zweier Oligonukleotide wurden diese zunächst mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt. Anschließend wurden 11,25 μl beider Oligonukleotide mit 2,5 μl 10 x Annealing Puffer (Tabelle 31) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Dann wurde der Reaktionsansatz auf einem Schwimmer in einem Becherglas mit kochendem Wasser platziert. Das Becherglas wurde von der Heizplatte genommen. Nachdem das Wasser nach etwa 2,5 Stunden eine Temperatur von 30 °C erreicht hatte, wurde der Reaktionsansatz entnommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 31: Zusammensetzung des für die Zusammenlagerung der Oligonukleotide genutzten Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x Annealing Puffer	1 M NaCl 100 mM Tris pH 7,4

3.5.7 Restriktion von DNA

Um Sequenzen gezielt und reproduzierbar aus Nukleinsäuren zu entfernen oder ringförmige DNA zu linearisieren wurden Restriktionsenzyme genutzt. Dafür wurden 0,5 bis 5 μg Vektor-DNA, 1 bis 2 μl Restriktionsendonukleasen und 1 μl 10 x Puffer zusammengefügt und auf 10 μl mit Nuklease-freiem-Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Die genutzten Restriktionsenzyme und entsprechenden Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

3.5.8 Agarosegelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese eignet sich für die einfache und schnelle Auftrennung von DNA-Fragmenten. DNA bewegt sich im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung vom Minuspol zum Pluspol. Um ein Agarosegel herzustellen, wurden eine entsprechende Menge Agarose mit 1 x TAE-Puffer (Tabelle 32) gemischt und in einer Mikrowelle aufgeköcht bis die Lösung homogen erschien. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde der Lösung 0,01 % „PegGREEN DNA/RNA binding dye“ (#37-5000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) zugefügt. PegGreen interkaliert in die DNA und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Mit der aufgeköchten Agarose-Lösung wurde ein Gel in einer Gießvorrichtung gegossen, welches nach dem Aushärten in eine Horizontal-Elektrophoresekammer überführt und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt wurde. Die DNA-Proben wurden jeweils in 6 x DNA-Ladepuffer (Gel Loading Dye (6x), #B7025, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) aufgenommen und in die Taschen des Agarosegels überführt. Zusätzlich wurde, um die DNA-Fragmentgröße festzustellen, ein Größenmarker aufgetragen (Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder, #N0552 oder Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, #N0551, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland). Je nach erwarteter Größe des Fragments wurde die Porengröße des Agarosegels variiert. Um die Größe größerer DNA-Fragmente festzustellen, wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, wohingegen für kleinere Stücke eine Konzentration von 2 % gewählt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V über 45 Minuten.

Tabelle 32: Zusammensetzung des für die Agarosegelelektrophorese genutzten Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
50 x TAE	2 M Tris 50 mM EDTA 5,7 % Eisessig

3.5.9 Isolation von DNA aus einem Agarosegel

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit dem „QIAquick PCR purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) exakt nach dem „QIAquick PCR Purification Kit“-Protokoll des „QIAquick Spin Handbook“. Die isolierte DNA wurde in 30 µl des im Kit enthaltenen EB-Puffer aufgenommen.

3.5.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligase ist in der Lage zwei oder mehrere Nukleinsäurefragmente unter ATP-Verbrauch miteinander zu verbinden. Dies nutzt man, um spezifische Sequenzen in ein bekanntes Vektorgerüst zu integrieren. Für die Ligation wurde das „Quick Ligation™ Kit“ (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) genutzt. Dafür wurden stets das zu integrierende Fragment und der linearisierte Vektor im Verhältnis 3:1 vermischt. Zu den Nukleinsäuren wurden 1 µl „Quick T4 DNA-Ligase“ sowie 1 µl 10 x Ligationspuffer gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert.

3.5.11 Hitzeschocktransformation

Das Einschleusen von Fremd-DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Als Wirtszellen dienten während dieser Arbeit der kompetente *Escherichia coli* Stamm Stbl3 (One Shot™ Stbl3™, #C737303, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Dieser wurde bei -80 °C gelagert und zu Beginn des Experiments auf Eis aufgetaut. Die verwendeten Vektoren waren mit einer Ampicillinresistenz ausgestattet. Dies erlaubte im weiteren Versuchsablauf die Selektion, da ausschließlich Bakterienzellen mit integriertem Plasmid in der Lage waren auf dem Ampicillin-haltigen Agar zu wachsen. Die Transformation erfolgte in vier Schritten: Anlagerung, Hitzeschock, Ausprägung und Ausplattierung. Im ersten Schritt wurden 4 µl Ligationsansatz oder 10-50 ng Plasmid-DNA mit den Stbl3-Bakterienzellen vermischt und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Der Hitzeschock fand anschließend bei 42 °C für 40 Sekunden statt. Danach wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis gelagert. Für die Ausprägung der Ampicillinresistenz wurden die Zellen in 500 µl SOC Medium (Tabelle 33) aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 280 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Danach folgte das sterile Ausplattieren von 200 µl des Ansatzes auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (Tabelle 33). Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tabelle 33: Zusammensetzung der für die Kultivierung von Bakterien verwendeten Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	25 g LB-Medium (#X968.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 1 L mit deionisiertem Wasser auffüllen autoklavieren
LB-Agar-Ampicillin-Platten	12,5 g LB-Medium (#X968.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 10 g Agar-Agar auf 500 ml mit deionisiertem Wasser auffüllen autoklavieren nach dem Abkühlen auf 50 °C: 100 µg/ml Ampicillin zugeben
SOC-Medium	2 % Pepton 0,05 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt 2,5 mM KCl autoklavieren 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose

3.5.12 Plasmidpräparation

Plasmid-DNA-Minipräparationen erfolgten durch das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (#27106, Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers. Dafür wurde eine Einzelzell-Kolonie der transformierten Bakterien in 5 ml LB-Medium (Tabelle 33) plus 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler bei 280 UpM inkubiert. Plasmid-DNA-Maxipräparationen erfolgten durch das „EndoFree® Plasmid Maxi Kit“ (#12362, Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers. Dafür wurde eine Einzelzell-Kolonie der transformierten Bakterien in 100 ml LB-Medium plus 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler bei 280 UpM inkubiert.

3.5.13 Plasmid-Linearisierung und *in vitro* Transkription

Für die Injektion von Aminosäuretransporter-RNA in *Xenopus laevis* Oozyten wurde diese *in vitro* transkribiert. Dafür wurden die Transporter-RNA-kodierenden Plasmide mittels eines Restriktionsenzym unmittelbar hinter der Transporter-kodierenden Region geschnitten. Dies diente der Terminierung der Transkription. Dafür wurden 20 µg Plasmid-DNA, 5 µl Restriktionsenzym und 40 µl des entsprechenden Puffers in einem 400 µl Reaktionsansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Plasmidkonstrukte und Restriktionsenzyme sind der Tabelle 34 zu entnehmen. Zur Kontrolle der erfolgten Linearisierung wurde 1 µl des Ansatzes durch ein 1 % Agarosegel in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Kapitel 3.5.8). Der

übrige Ansatz wurde aufgereinigt. Dazu wurde das linearisierte Plasmid mit 400 µl Tris-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und für 5 Minuten bei 4 °C und 16200 g zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 25 µl 4 M NaCl und einem Milliliter Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt. Der Ansatz wurde anschließend bei 16200 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 15 µl 1 x TE-Puffer (Tabelle 35) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Die *in vitro* Transkription erfolgte mittels des „mMessage mMachine® High Yield Capped RNA Transcription T7 Kit“ (Ambion, Austin, Texas, USA) nach den Anweisungen des Herstellers. Dieser Kit fügt der transkribierten RNA am 5'-Ende eine 7'-Methylguanosi-Kappe an, welche für die Translation in der Oozyte benötigt wird. Die cRNA wurde in 10 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch die Auftrennung eines Milliliters der *in vitro* transkribierten cRNA durch ein 1 % Agarosegel. Die Konzentration wurde photometrisch festgestellt.

Tabelle 34: Für die cRNA-Synthese verwendete Plasmidkonstrukte sowie die für die Linearisierung dieser Konstrukte eingesetzten Restriktionsenzyme.

Plasmid	Herkunft	Restriktionsenzym zur Linearisierung
hLAT1pSGEM	AG [REDACTED]	PacI
hLAT2pSGEM	AG [REDACTED]	NheI
h4F2hcpGHJsC2	[REDACTED], Australian National University, Canberra, Australien	AccI

Tabelle 35: Zusammensetzung des zum Lösen der DNA verwendeten Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-EDTA (TE) Puffer	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA

3.6 Transportstudien mit *Xenopus laevis* Oozyten

3.6.1 Inkubation und Kollagenasebehandlung von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Entnahme der Oozyten aus Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) erfolgte durch [REDACTED] oder [REDACTED] der Arbeitsgruppe [REDACTED]. Für die weitere Bearbeitung wurden etwa 3 ml der Oozytenverbände mit einer Schere in etwa 2 bis 3 cm lange Stücke aufgetrennt und in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Durch die Behandlung mit Kollagenase wurden die Oozyten vollständig aus den Verbänden gelöst. Dafür wurden die Oozyten zunächst dreimal

mit Ca^{2+} -freiem-Puffer gewaschen um das vorhandene Kalzium zu entfernen, da dies die Wirkung der Kollagenase potenziert. Anschließend wurden 2 mM Kollagenase in 10 ml Ca^{2+} -freiem-Puffer auf die Oozyten gegeben und diese unter sanften Schwenken etwa 30 Minuten inkubiert bis die Mehrheit der Oozyten aus dem Verbund gelöst war. Anschließend wurden die Oozyten zehn Mal mit kaltem Ca^{2+} -freiem-Puffer und fünf Mal mit Ca^{2+} -haltigem-Puffer gewaschen, um die Kollagenase vollständig zu entfernen. Vor der Aufnahme in Oozyten-Kulturmedium und Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden beschädigte Oozyten entfernt. Die Zusammensetzung der für die Kultivierung und Kollagenase-Behandlung der Oozyten verwendeten Puffer und Medien sind der Tabelle 36 zu entnehmen.

Tabelle 36: Zusammensetzung der für die Kultivierung und Kollagenase-Behandlung der *Xenopus laevis* Oozyten genutzten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x Ca^{2+} -freier Puffer	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl_2 5 mM HEPES pH 7,5
1 x Ca^{2+} -haltiger Puffer	1 x Ca^{2+} -freier Puffer 1,8 M CaCl_2
Oozyten-Kulturmedium	50 % (v/v) Leibovitz L15-Medium (PAA) 15 mM HEPES 0,1 mg/ml Gentamycin

3.6.2 Injektion von cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Arbeiten mit Oozyten fanden unter keimarmen Bedingungen statt. Oozyten werden nach Dumont (1972) in sechs Stadien eingeteilt. Die Aufnahmestudien wurden ausschließlich mit Oozyten der Stadien V und VI durchgeführt. Während dieser Stadien ist die animale Hemisphäre, welche Mitochondrien- und Ribosomen-reiches Zytoplasma enthält schwarz-braun gefärbt. Die vegetative Hemisphäre enthält überwiegend Dotterproteine und hat eine weiß-gelbe Farbe. Die Injektion von 20 ng LAT1- oder LAT2-cRNA sowie 10 ng 4F2hc-cRNA erfolgte über den vegetativen Pol mittels einer in einen Mikroinjektor eingespannten Mikrokapillare. Dafür wurden die Oozyten auf einem Kunststoffnetz in einer mit Ca^{2+} -haltigem Puffer gefüllten Petrischale unter dem Binokular platziert. Die zu injizierenden RNA-Lösungen wurden gemischt und mit steril-filtrierte Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 und 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Je Oozyte wurden, Mikroinjektor-gesteuert, 20 nl RNA-Lösung injiziert. Anschließend wurden die Oozyten in Oozyten-Kulturmedium für 48 Stunden bei 18 °C inkubiert.

3.6.3 Transportstudien mit *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Transportstudien wurden die Oozyten dreimal mit kaltem NaAP (Tabelle 37) gewaschen. Dieser wurde für die Aufnahmeversuche mit [³H]Leucin mit 20 µM Leucin und für die Studien mit [¹⁴C]Citruillin mit 20 µM Citruillin supplementiert. Anschließend wurden die Oozyten für 15 Minuten bei 21 °C in 200 µl der entsprechenden Aufnahmelösung (Tabelle 37) inkubiert. Danach wurden die Oozyten fünfmal mit eiskaltem NaAP gewaschen, bevor diese vereinzelt wurden und jeweils mit 200 µl 2 % SDS für 30 Minuten lysiert wurden. Die Szintillation wurde nach der Zugabe von 3 ml Irga-Safe Plus mit dem Tri-Carb® 2810 TR (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen. Die vom Szintillationszähler kalkulierte Szintillation in dpm pro Oozyte wurde wie folgt in pmol der aufgenommenen Aminosäure je Oozyte umgerechnet:

Leucin:

Es wurden 10 µCi/ml [4,5-³H]Leucin und 10 µM Leucin eingesetzt.

Demnach gilt: 1 µCi [4,5-³H]Leucin / 1 µM Leucin
 1 µCi \cong 2,22 x 10⁶ dpm
 2,22 x 10⁶ dpm / 1 µM Leucin
 2220 dpm / pmol Leucin

Citruillin:

Die spezifische Aktivität des [¹⁴C]Citruillin betrug 55 mCi/mmol Citruillin. Daraus ergibt sich:

1 µCi / 20 nmol
 1 µCi \cong 2,22 x 10⁶ dpm
 2,22 x 10⁶ dpm / 20 nmol Citruillin
 111 dpm / pmol Citruillin

Tabelle 37: Zusammensetzung der für die Transportstudien mit *Xenopus laevis* Oozyten verwendeten Aufnahmelösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
[³ H]Leucin-Aufnahmelösung	10 µM Leucin 10 µCi/ml [4,5- ³ H]Leucin (spezifische Aktivität: 40-60 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) in Na-AP
[¹⁴ C]Citruillin-Aufnahmelösung	1 µCi/ml L-[ureido- ¹⁴ C]Citruillin (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol, Hartmann Analytics, Braunschweig, Deutschland) in Na-AP
1 x Na ⁺ -Aufnahmepuffer (Na-AP)	100 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES 5 mM Tris, pH 7,4

3.7 Ein CLL-Xenograftmodell

Um die Rolle des hCAT-1 in der CLL aufzuklären wurde ein CLL-Xenograftmodell genutzt. Dafür wurde der Mausstamm NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgt^{m1Wjl}/SzJ, besser bekannt unter dem Markenname NOD scid gamma (NSGTM), genutzt. Bei diesen Mäusen ist das Gen, welches für den DNA-Reparatur Komplex PRKDC kodiert, mutiert. PRKDC spielt während der V(D)J-Rekombination in der B- und T-Lymphozyten-Entwicklung eine entscheidende Rolle. Die Mutation dieses Gens resultiert demnach in einem Mangel an reifen B- und T-Zellen. Des Weiteren ist in diesen Mäusen durch die Deletion des *IL2rg*-Gens, welches für die IL2-Rezeptor- γ -Kette kodiert, die Signaltransduktion verschiedener Interleukine verhindert, was zu einem Mangel an funktionellen NK-Zellen führt. Aufgrund des daraus resultierenden Fehlens eines funktionalen adaptiven Immunsystems, eignet sich dieser Mausstamm sehr gut für Xenograftmodelle (The Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/005557>, Stand 15.10.2019). Für die Generierung des CLL-Xenografts wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ HG3-Tet-pLKO-puro oder HG3-Tet-pLKO-puro-scr-Zellen (Kapitel 4.3.14) subkutan in die linke Flanke einer NSGTM-Maus injiziert. Die Expression der shRNA gegen hCAT-1 wurde durch die Gabe von 1 mg/ml Doxyzyklin und 2 % Sucrose im Trinkwasser induziert. Kontrolltiere erhielten Wasser ohne Zusätze. Das Tumorwachstum wurde 2 bis 3 Mal pro Woche mit Hilfe eines Messschiebers festgestellt. Das Tumolvolumen errechnete sich durch die Höhe x Breite². Sobald die Tumorgöße 1500 mm³ überschritten hatte, wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme des Tumorgewebes für Genexpressionsanalysen.

3.8 Statistik

Für die statistische Auswertung der Experimente wurde das Programm GraphPad Prism 6 genutzt. Erhaltene Messwerte wurden zunächst mit one-way oder two-way ANOVA (Analysis of variance) und anschließend mit dem Tukey-Test analysiert. Alternativ wurde ein *t*-Test durchgeführt. Dabei wurden p-Werte mit $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde überwiegend mit der CD3⁺-Gesamtpopulation humaner T-Lymphozyten gearbeitet. Wenn die Analysen mit T-Zelluntergruppen durchgeführt wurden, ist dies entsprechend aufgeführt.

4.1 Für die effiziente Proliferation humaner stimulierter T-Lymphozyten ist der hCAT-1-vermittelte Arginintransport essentiell

Die Funktion humaner T-Lymphozyten hängt stark von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins ab. Unter Arginindefizienz sind sowohl die T-Zell-Proliferation als auch die Zytokinsekretion erheblich eingeschränkt. Dies führt zu einem Mangel an effizient funktionierenden T-Effektorzellen in den betroffenen Arealen (Rodriguez, 2007; Zea, 2005). Allerdings hängt die suffiziente Argininversorgung einer Zelle nicht ausschließlich von dessen lokaler Verfügbarkeit ab, vielmehr ist auch die Expression membranständiger Transportproteine Voraussetzung für den effektiven Aminosäure-Import. Während die Expression von Arginintransportern bereits in verschiedenen eukaryotischen Zellen ausführlich untersucht wurde, war darüber in humanen Immunzellen bislang nur wenig bekannt (Fotiadis, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Transporter identifiziert werden, der für den Arginintransport in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist.

4.1.1 Die Proliferation und IFN- γ -Sekretion humaner T-Lymphozyten sind stark abhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins

Um in humanen T-Lymphozyten die Expression von Arginintransportern in direkter Korrelation mit der T-Zellfunktion zu analysieren, wurden initial die Proliferation sowie die Interferon (IFN)- γ -Sekretion dieser Zellen unter argininsuffizienten und -defizienten Bedingungen untersucht. Dazu wurden T-Lymphozyten über Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert. Anschließend wurden diese über 48 Stunden in Medium mit oder ohne 1 mM Arginin durch anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Im Anschluss wurde der Einbau von 1 μ Ci [³H]Thymidin über 16 Stunden als Maß für die T-Zellproliferation ermittelt, sowie der IFN- γ -Gehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA analysiert.

T-Zellen, welche unter Substitution von Arginin stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zu ruhenden Zellen, eine signifikant gesteigerte Proliferation. Unter Argininmangel hingegen wurde, verglichen mit den unstimulierten T-Zellen, kein vermehrter Einbau von [³H]Thymidin beobachtet (Abbildung 3 A).

Auch die IFN- γ -Sekretion war in stimulierten T-Lymphozyten unter Arginin-suffizienten Bedingungen beträchtlich induziert: Sie produzierten 116-fach mehr IFN- γ als nicht-aktivierte T-Zellen. Unter Argininmangel war die IFN- γ -Konzentration in den Zellüberständen jedoch stark eingeschränkt und um $86,5 \pm 17,0$ % geringer als in T-Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden (Abbildung 3 B).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse die erfolgreiche Etablierung der Isolation und Stimulation primärer humaner T-Lymphozyten und verifizierten darüber hinaus bereits veröffentlichte Daten, welche die argininabhängige T-Zellproliferation und IFN- γ -Sekretion beschreiben (Munder, 2006; Rodriguez, 2007).

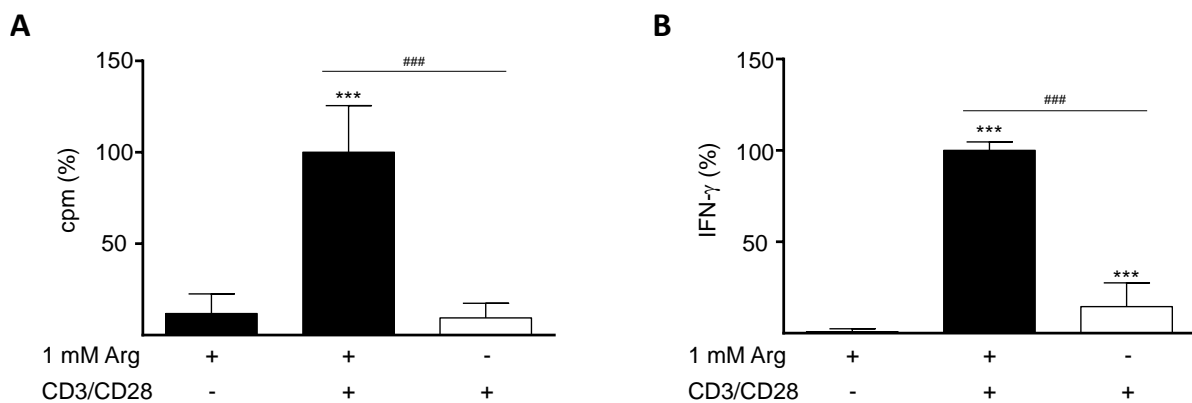


Abbildung 3: Die Proliferation und Interferon- γ -Sekretion humaner T-Lymphozyten sind argininabhängig.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert (CD3/CD28) oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden A) der Einbau von 1 μ Ci [³H]Thymidin über 16 Stunden (n=15 von 5 unabhängigen Spendern) und B) der IFN- γ -Gehalt der Zellkulturüberstände mittels ELISA (n=10-12 von 4 unabhängigen Spendern) gemessen. Die Werte sind jeweils in Prozent der in argininhaltigem Medium stimulierten Zellen dargestellt ([³H]Thymidineinbau (Mittelwert): 15039 ± 17238 cpm, IFN- γ -Gehalt (Mittelwert): 3437 ± 2442 pg/ml). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die in der An- oder Abwesenheit von Arginin stimulierten Zellen mit unstimulierten Zellen (***: $p \leq 0,001$) und die stimulierten T-Zellen untereinander verglichen (###: $p \leq 0,001$).

4.1.2 Unter Stimulation ist die Expression des hCAT-1 in humanen T-Lymphozyten, unabhängig von der extrazellulären Arginkonzentration, stark induziert

Arginin wird von den System γ^+ -Transportern hCAT1, hCAT-2A, hCAT-2B und hCAT-3, den System γ^+ L-Transportern γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2, dem System $b^{0,+}$ -Transporter $b^{0,+}$ AT sowie

dem Natrium-abhängigen System $B^{0,+}$ -Transporter $ATB^{0,+}$ als Substrat akzeptiert (Fotiadis, 2013; Sloan, 1999). Um den Transporter zu identifizieren, welcher für den Arginintransport in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist, wurde die mRNA-Expression der aufgeführten Arginintransporter mittels quantitativer real time-PCR untersucht. Dazu wurden T-Lymphozyten über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen.

In unstimulierten T-Lymphozyten wurde lediglich eine moderate Expression der Transporter y^+ LAT2 und $ATB^{0,+}$ detektiert. Die Transporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y^+ LAT1 und $b^{0,+}$ AT waren nur marginal exprimiert oder gar nicht nachweisbar. Im starken Kontrast dazu war unter Stimulation der T-Lymphozyten eine ausgeprägte Induktion der mRNA-Expression des hCAT-1-Transporters zu beobachten, welche deutlich die Expressionsstärke der anderen Transporter sowohl in ruhenden als auch in aktivierten T-Zellen überschritt. Ebenfalls war die Expression des Transporters hCAT-3 in T-Zellen nach 48-stündiger Stimulation leicht induziert. Jedoch war diese verglichen mit dem hCAT-1 nur schwach. Die Expression des Transporters y^+ LAT2 war gegenüber unstimulierten T-Lymphozyten nicht gesteigert. Die Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, y^+ LAT1, $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ wurden auch in aktivierten T-Zellen nicht oder nur schwach detektiert. Durch die Stimulation der T-Lymphozyten in der Abwesenheit von Arginin wurde die hCAT-1-mRNA-Expression verglichen mit dieser in T-Zellen, welche in der Gegenwart von Arginin aktiviert wurden, 2,5-fach gesteigert. Hingegen wurde die mRNA-Expression der übrigen Transporter durch das Fehlen von Arginin nicht beeinflusst (Abbildung 4).

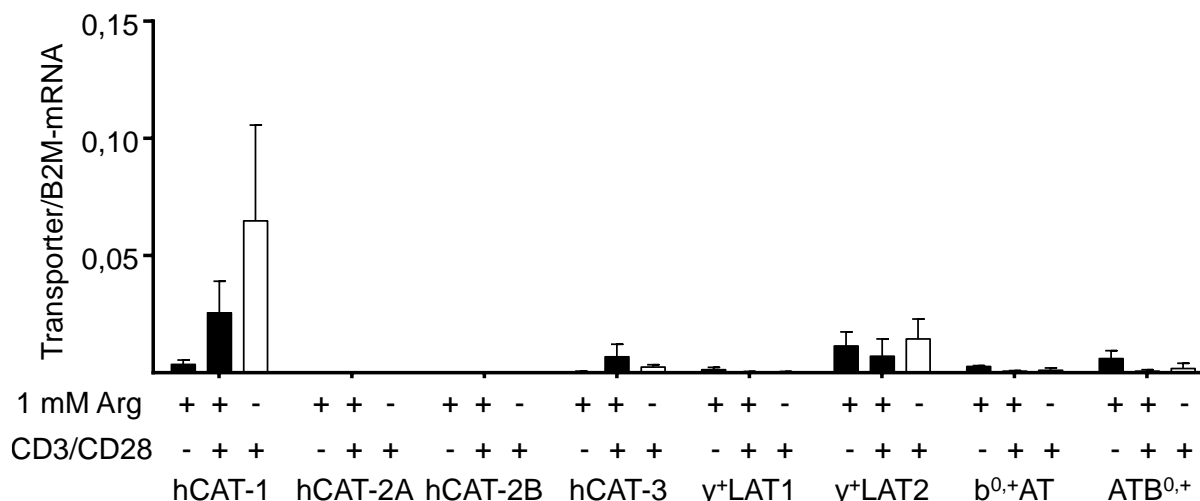


Abbildung 4: Die hCAT-1-mRNA-Expression ist unter Stimulation in humanen T-Lymphozyten stark induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert (CD3/CD28) oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die mRNA-Expression der aufgeführten Arginintransporter mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt sind die mRNA-Expression der jeweiligen Transporter in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=3-6 unabhängige Spender).

Die ausgeprägte stimulations- und argininabhängige Induktion der hCAT-1-mRNA-Expression in humanen T-Lymphozyten deutete darauf hin, dass dieser Transporter eine bedeutende Rolle für die Funktion dieser Immunzellen spielen könnte. Deshalb wurde in den folgenden Untersuchungen auf diesen Transporter fokussiert und zunächst die Abhängigkeit der hCAT-1-mRNA-Expression zum einen von der Stimulationsdauer und zum anderen von der Anwesenheit extrazellulären Arginins im Detail untersucht. Dazu wurden T-Lymphozyten über 6, 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die hCAT-1-mRNA-Expression mittels quantitativer real time-PCR ermittelt.

Auch diese Analysen zeigten nur eine marginale Expression der hCAT-1-mRNA in unstimulierten T-Lymphozyten. Demgegenüber konnte jedoch, unabhängig von der gegenwärtigen Arginkonzentration, bereits nach 6-stündiger Aktivierung eine starke Induktion der hCAT-1-mRNA-Expression beobachtet werden. Mit der Verlängerung der Stimulationszeit auf 24 Stunden sank diese jedoch in der Anwesenheit von Arginin um $73,4 \pm 5,1$ % ab, war jedoch verglichen mit der Expressionsstärke in unstimulierten T-Lymphozyten noch um das 5,6-fache gesteigert. Im Gegensatz dazu verringerte sich das hCAT-1-mRNA-Level unter Arginin-defizienten Bedingungen durch die Verlängerung der Stimulationszeit bis zu 48 Stunden nicht im Vergleich zum 6 Stunden-Wert (Abbildung 5). Diese Daten wurden von

██████████ (medizinische Doktorandin, Arbeitsgruppe ██████████) und ██████████ (technische Assistentin, Arbeitsgruppe ██████████) generiert.

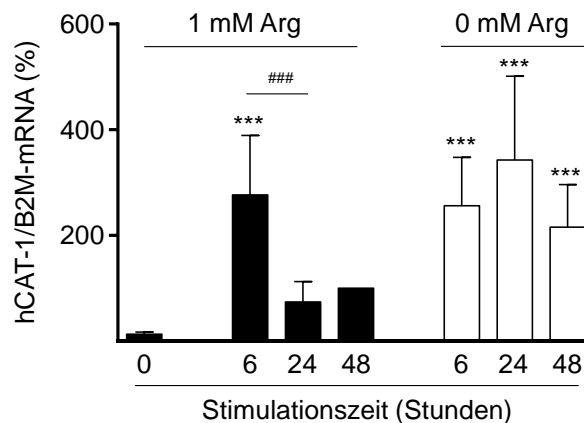


Abbildung 5: Die hCAT-1-mRNA-Expression in humanen stimulierten T-Lymphozyten ist selbst unter Argininmangel auf einem hohen Level.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die mRNA-Expression des hCAT-1 mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist jeweils die hCAT-1- in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression in Prozent der über 48 Stunden mit 1 mM Arginin stimulierten T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=5 unabhängige Spender). Die statistische Auswertung erfolgte mit Two-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die stimulierten Zellen mit unstimulierten Zellen (***: $p \leq 0,001$) und die stimulierten T-Zellen innerhalb der unterschiedlichen Argininbedingungen untereinander verglichen (###: $p \leq 0,001$). Die Durchführung dieser Experimente erfolgte durch ██████████ (technische Assistentin, Arbeitsgruppe ██████████) und ██████████ (medizinische Doktorandin, Arbeitsgruppe ██████████).

Die hCAT-1-mRNA-Expression war demnach in humanen T-Lymphozyten bereits nach 6 Stunden stark induziert, fiel jedoch in der Gegenwart von Arginin mit Verlängerung der Stimulationszeit deutlich ab, wohingegen die Expressionsstärke unter Argininmangel im untersuchten Stimulationszeitraum über 48 Stunden konstant blieb. Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob ebenfalls die hCAT-1-Expression auf Proteinebene diesem Muster folgt und nach Induktion in stimulierten T-Zellen in Abhängigkeit der extrazellulären Argininverfügbarkeit variiert. Dafür wurde die hCAT-1-Protein-Expression in unstimulierten oder über 6, 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von Arginin stimulierten T-Zellen mittels Western Blot-Analysen untersucht.

In unstimulierten T-Zellen war, in Übereinstimmung mit der mRNA-Expression, nur wenig hCAT-1-Protein detektierbar. Nach 6-stündiger Stimulation konnte jedoch, unabhängig von der extrazellulären Arginkonzentration, eine deutliche Induktion der Expression dieses Transporters beobachtet werden, welche sich zusätzlich in über 24 Stunden stimulierten T-Lymphozyten steigerte. Durch die weitere Verlängerung der Stimulationszeit auf 48 Stunden stieg die hCAT-1-Protein-Expression allerdings nicht mehr weiter an (Abbildung 6).

Es ist besonders hervorzuheben, dass die Induktion der hCAT-1-Protein-Expression gleichermaßen unter Argininsuffizienz und -defizienz passierte. Dies unterstrich weiterhin die Bedeutung dieses Transporters für die effiziente Funktion von T-Lymphozyten, sogar unter Argininmangel-Bedingungen.

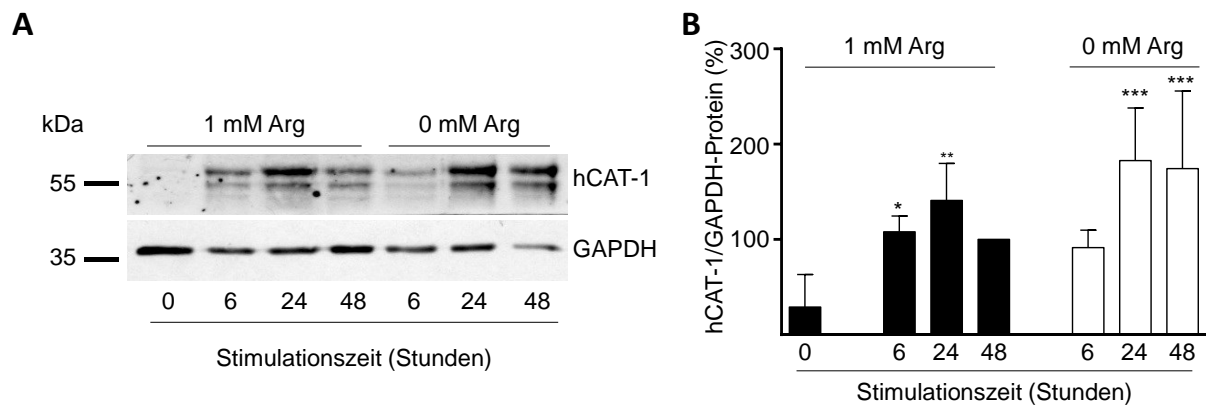


Abbildung 6: Die hCAT-1-Protein-Expression ist selbst unter Argininmangel in stimulierten T-Lymphozyten stark induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Protein-Expression des hCAT-1 und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind A) ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und B) die quantitative Auswertung dieser Blots. Dargestellt ist die hCAT-1- relativ zu GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der über 48 Stunden in 1 mM Arginin stimulierten T-Zellen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n=3 unterschiedliche Spender). Die statistische Auswertung erfolgte mit Two-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die stimulierten mit unstimulierten Zellen verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

Parallel zu dieser Dissertation wurden in unserer Arbeitsgruppe die genregulatorischen Mechanismen, welche der in der Gegenwart von Arginin transienten, stimulationsabhängigen Induktion der hCAT-1-mRNA-Expression zugrunde liegen, untersucht (Dissertation [REDACTED], 2017). Für diese Analysen wurde die Zeitkinetik der hCAT-1-mRNA-Expression engmaschig untersucht. Da die hCAT-1-mRNA-Expression unter Argininsupplementation in humanen T-Zellen bereits nach 6-stündiger Stimulation sehr hoch war, jedoch schon nach 24 Stunden wieder stark sank, wurde in diesen Experimenten auf die ersten 24 Stunden der Stimulationszeit fokussiert. Dafür wurde die hCAT-1-mRNA-Stärke in T-Lymphozyten während der ersten 6 Stunden Stimulation in der Gegenwart von 1 mM Arginin stündlich mittels quantitativer real time-PCR detektiert. Zum Vergleich wurde die hCAT-1-mRNA-Expression in unstimulierten und in 24-stündig-stimulierten T-Zellen analysiert.

Dies zeigte, dass in T-Lymphozyten bereits nach dreistündiger Stimulation die hCAT-1-mRNA-Expression vergleichbar mit dieser nach 6 Stunden war (Abbildung 7 A).

Auch die Zeitkinetik der Reduktion der hCAT-1-mRNA-Expression in T-Zellen über 6 bis 24 Stunden Stimulation, wurde im Folgenden detaillierter untersucht. Dafür wurde die hCAT-1-Expression in T-Lymphozyten, welche über 6 bis 24 Stunden stimuliert wurden, in 4-stündigen Intervallen mittels quantitativer real time-PCR detektiert. Zum Vergleich wurde die hCAT-1-Expression in unstimulierten T-Zellen gemessen.

Diese Analysen zeigten, dass die hCAT-1-mRNA-Expression in humanen T-Zellen kontinuierlich zwischen 6- bis 18-stündiger Aktivierung absank. Ab diesem Zeitpunkt war die hCAT-1-mRNA-Expressionsstärke mit dieser nach 24-stündiger Aktivierung vergleichbar (Abbildung 7 B).

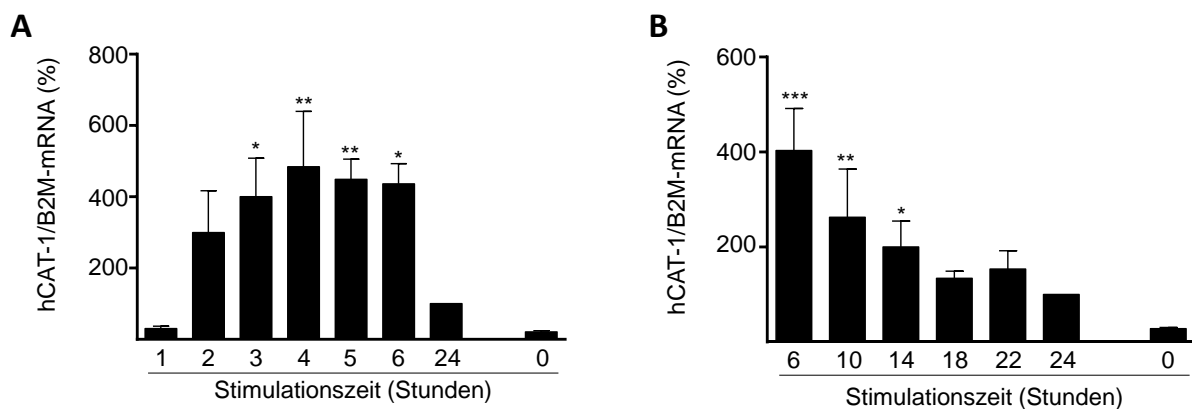


Abbildung 7: Bereits nach 3-stündiger Stimulation ist die hCAT-1-mRNA-Expression in humanen T-Lymphozyten stark induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über A) 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden (n=3-4 unabhängige Spender) oder B) 6, 10, 14, 18, 22 und 24 Stunden (n=3 unabhängige Spender) in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Expression der hCAT-1-mRNA mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt sind jeweils die hCAT-1- in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression in Prozent der über 24 Stunden stimulierten T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde jeweils die Expression in unstimulierten Zellen mit der in stimulierten Zellen verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

Auch die hCAT-1-Protein-Expression wurde detaillierter untersucht, um zu untersuchen, ob diese parallel zu dieser der mRNA erfolgt oder die hCAT-1-Translation post-transkriptionell reguliert wird. Dafür wurden T-Lymphozyten über 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden in 1 mM Arginin-haltigem Medium stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die hCAT-1-Expression mittels Western Blot-Analysen detektiert.

Bereits nach 4-stündiger Stimulation der T-Zellen wurde eine signifikant gesteigerte hCAT-1-Protein-Expression, welche weiterhin bis 6 und 24 Stunden zunahm, im Vergleich zu unstimulierten T-Lymphozyten beobachtet (Abbildung 8). Dies ist im Unterschied zu dem Verlauf der mRNA-Expression, welche bereits nach 4-stündiger Stimulation ihr Maximum

erreichte und nach 6 Stunden wieder sank. Demnach könnten durchaus post-transkriptionelle regulatorische Effekte für die hCAT-1-Translation eine Rolle spielen.

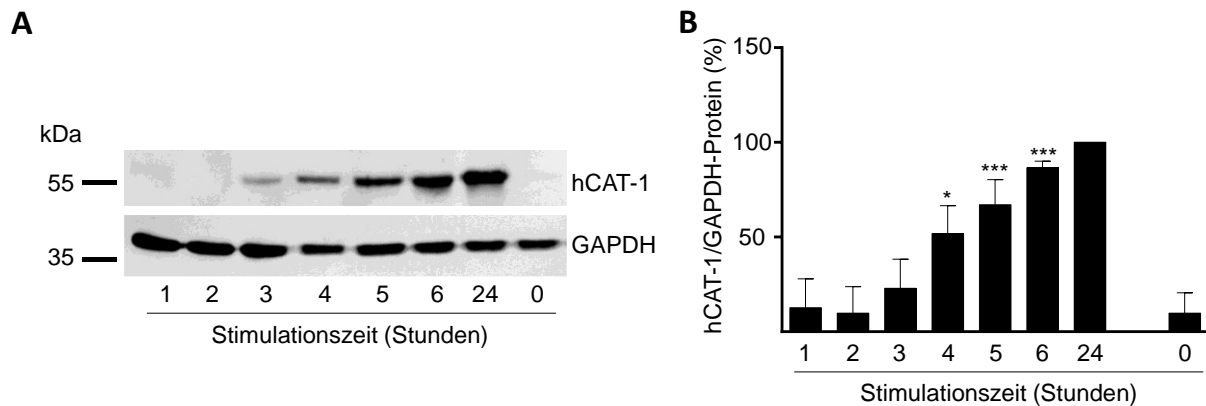


Abbildung 8: Die hCAT-1-Protein-Expression ist bereits nach 4-stündiger Stimulation in humanen T-Lymphozyten stark induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden in An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Protein-Expression des hCAT-1 und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind A) ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und B) die quantitative Auswertung aller Blots. Dargestellt ist die hCAT-1- relativ zu GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der über 24 Stunden stimulierten T-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die stimulierten mit den unstimulierten Zellen verglichen (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$).

4.1.3 Das Expressionsmuster der Arginintransporter in verschiedenen T-Zell-Subgruppen stimmt mit dem der T-Zell-Gesamtpopulation überein

Die $CD3^+$ -T-Lymphozyten sind eine heterogene Zellpopulation und setzen sich aus mehreren Subgruppen zusammen, die sich in ihren jeweiligen Funktionen innerhalb des Immunsystems unterscheiden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Aufgaben ist nicht auszuschließen, dass auch die Nährstoffansprüche und somit auch das Expressionsmuster der Arginintransporter variieren. Deshalb wurde im Folgenden die argininabhängige Funktion und die Expression der bereits in Kapitel 4.1.2 analysierten Arginintransporter in $CD4^+$ -naïven ($CD4^+$, $CD45RA^+$, $CD45RO^-$) und $CD4^+$ -Gedächtnis-T-Zellen ($CD4^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$) untersucht. Bei $CD4^+$ -T-Zellen handelt es sich allgemein um sogenannte T-Helferzellen. Sie modellieren die Immunantwort durch Sekretion bestimmter Zytokine, was in der Aktivierung anderer Immunzellen resultiert (Kapitel 1.1.1). Die $CD4^+$ -Gedächtnis-T-Zellen sind eine kleine Population von T-Effektorzellen, die nach der Immunantwort nicht durch Apoptose zugrunde gehen und somit weiterhin im Blut zirkulieren. Sie bilden das immunologische Gedächtnis. Naïve $CD4^+$ -Zellen hingegen hatten niemals zuvor Kontakt mit aktivierenden Antigenen.

Um zu untersuchen, ob die Funktion humaner CD4⁺-naïver und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen ebenfalls von der Argininverfügbarkeit abhängig ist, wurden diese mittels Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden die Proliferation festgestellt und im Zellkulturüberstand der IFN- γ -Gehalt mittels ELISA gemessen.

Sowohl die Proliferation der CD4⁺-naïven T-Lymphozyten als auch der CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen war unter Stimulation in der Gegenwart von Arginin stark induziert, während in der Abwesenheit von Arginin keine Steigerung des [³H]Thymidineinbaus zu beobachten war (Abbildung 9 A und C). Auch die IFN- γ -Sekretion war in beiden T-Zellsubpopulationen massiv gesteigert, wenn die Stimulation in der Anwesenheit von Arginin passierte. Unter Argininmangel jedoch wurde IFN- γ nur marginal sezerniert, was dem Level der unstimulierten T-Zellpopulationen entsprach. Bemerkenswert war jedoch, dass die IFN- γ -Produktion in den stimulierten CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen, verglichen mit den naïven T-Zellen, um den Faktor 400 gesteigert war (Abbildung 9 B und D).

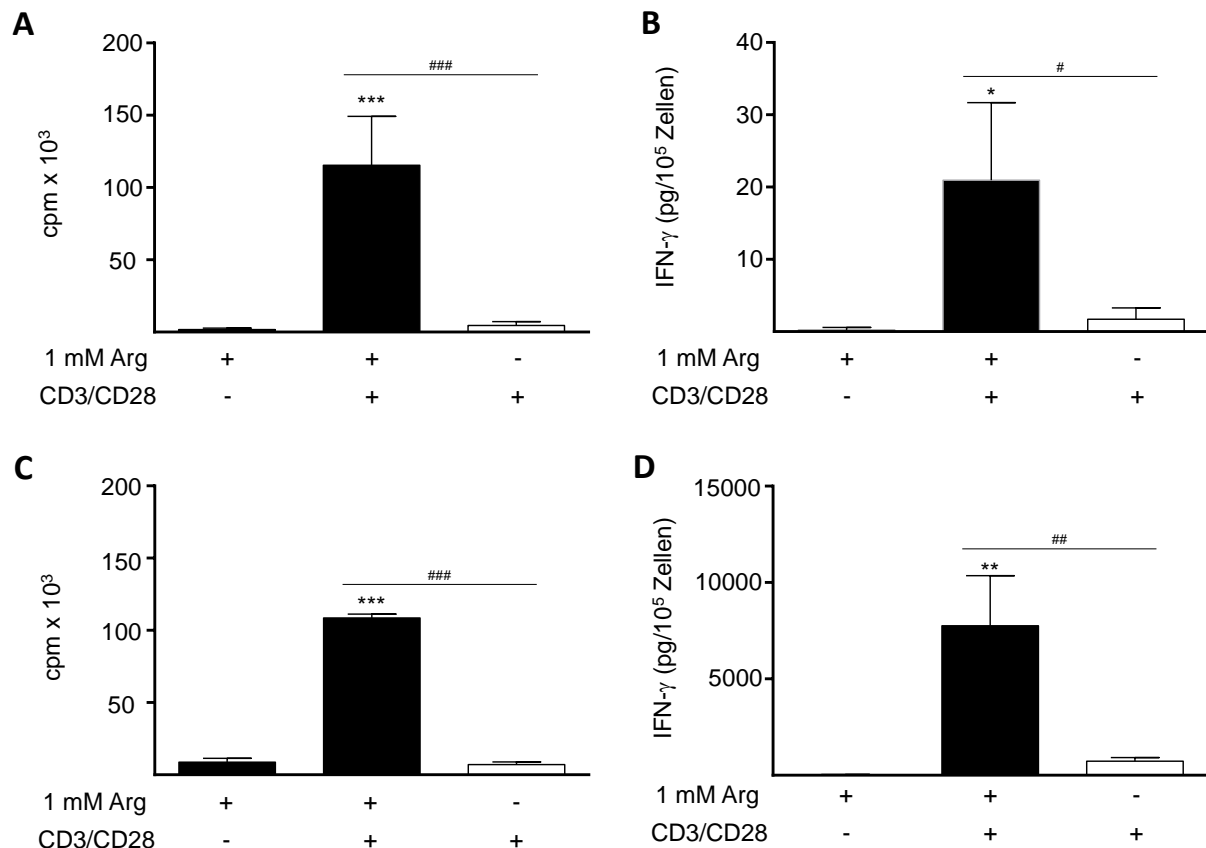


Abbildung 9: Die Proliferation und Interferon- γ -Sekretion von CD4⁺-naïven und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen sind argininabhängig.

CD4⁺-naïve (A, B) und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen (C, D) wurden durch Negativelektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert (CD3/CD28) oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden A, C) der Einbau von 1 μ Ci [³H]Thymidin über 16 Stunden und B, D) der Interferon- γ -gehalt in den Zellkulturüberständen mittels ELISA detektiert. In jedem Versuchsansatz wurden pro Bedingung jeweils Triplets analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden die stimulierten mit unstimulierten (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$) und die stimulierten T-Lymphozyten untereinander verglichen (###: $p \leq 0,001$; #: $p \leq 0,01$; #: $p \leq 0,05$) (A: $n=4$ unabhängige Spender; B, C, D: $n=3$ unabhängige Spender).

Ebenso wie in der CD3⁺-T-Zell-Gesamtpopulation wurde auch in den CD4⁺-naïven und CD4⁺-Gedächtnis-T-Lymphozyten die Expression der Arginintransporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, y⁺LAT2, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden CD4⁺-naïve und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen über 6, 24 und 48 Stunden in der Gegenwart von Arginin mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Transporter-Expressionen mittels quantitativer real time-PCR ermittelt.

In unstimulierten naïven T-Zellen konnte die prominente Expression des heterodimeren Transporters y⁺LAT2 detektiert werden. Ebenfalls war eine marginale hCAT-1-Expression zu beobachten. Die Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} waren nicht nachweisbar. Unter Stimulation wurde bereits nach 6 Stunden die starke Induktion

der hCAT-1-Expression beobachtet, welche jedoch mit Verlängerung der Stimulationszeit über 24 bis 48 Stunden sank. Die Expression des γ^+ LAT2-Transporters war bereits nach 6-stündiger Stimulation gegenüber unstimulierten T-Zellen vermindert und fiel weiterhin bis 48 Stunden kontinuierlich ab. Die Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, γ^+ LAT1, $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ waren, wie auch in unstimulierten T-Zellen, unter Aktivierung nicht oder nur marginal detektierbar (Abbildung 10 A).

In $CD4^+$ -Gedächtnis-T-Zellen wurden für die Transporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, γ^+ LAT1, $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ vergleichbare Transporter-mRNA-Expressionsmuster beobachtet. Lediglich die Expression des γ^+ LAT2 unterschied sich von dieser in naïven T-Zellen und war in unstimulierten und stimulierten Gedächtnis-T-Zellen vergleichbar hoch (Abbildung 10 B).

Insgesamt spiegelten diese Ergebnisse das Transporter-Expressionsmuster in der $CD3^+$ -T-Zell-Gesamtpopulation wider (Abbildung 4). Demnach scheinen sowohl die beobachtete argininabhängige T-Zell-Proliferation und $IFN-\gamma$ -Produktion als auch die Transporter-Expressionsmuster homogen zwischen den T-Zell-Subpopulationen zu sein. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich mit der $CD3^+$ -T-Zell-Gesamtpopulation gearbeitet.

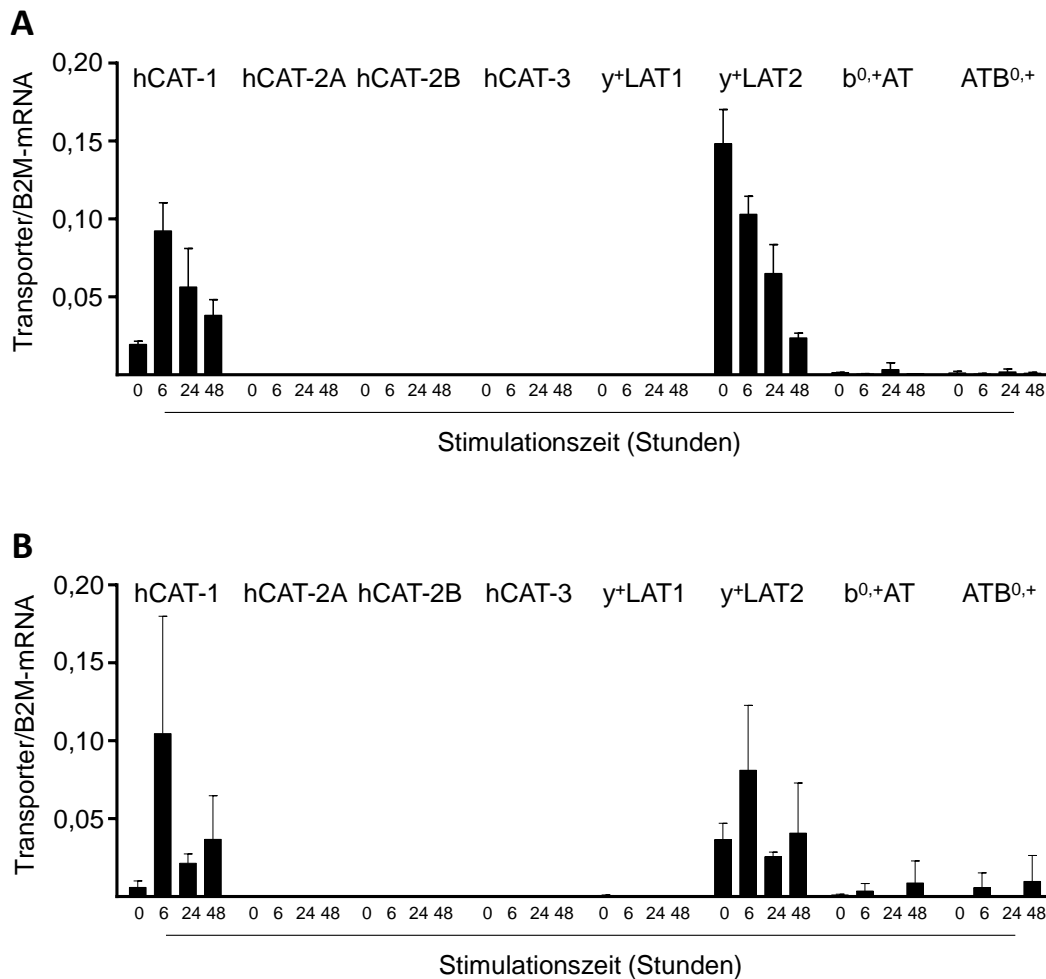


Abbildung 10: Die Expressionslevel der Arginintransporter sind vergleichbar in CD4⁺-naiven und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen.

CD4⁺-naive (A) und CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen (B) wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden in 1 mM Arginin-haltigem Medium mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die mRNA-Expression der aufgeführten Arginintransporter mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist jeweils die Transporter- in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (A: n=2-4 unabhängige Spender; B: n=2-3 unabhängige Spender).

4.1.4 Der hCAT-1 ist in stimulierten T-Lymphozyten in der Plasmamembran lokalisiert, unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins

Nicht allein die Expression von Aminosäuretransportern, sondern auch deren Lokalisation in der Plasmamembran ist die Voraussetzung für den effizienten Import von extrazellulären Aminosäuren. Die bisherigen Analysen zeigten, dass in stimulierten T-Lymphozyten der Transporter hCAT-1 auf Proteinebene, selbst unter Argininmangel exprimiert wurde. Dies ist allerdings noch kein Beweis für die Lokalisation dieses Transporters in der Plasmamembran unter den jeweiligen Bedingungen. Dies sollte im Folgenden geklärt werden. Dafür wurden humane T-Lymphozyten zunächst über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von Arginin stimuliert. Anschließend wurden die freien Aminogruppen der Membranproteine dieser Zellen

biotinyliert, die Proteine isoliert und die biotinylierten Membranproteine durch Avidin-gekoppelte Sepharosepartikel separiert. Die hCAT-1-Protein-Expression wurde jeweils in den Membranfraktionen und in den unfraktionierten Zellvollysaten mittels Western Blot festgestellt. Als Kontrolle, ob es sich bei den über die Avidinpartikel separierten Proteine tatsächlich ausschließlich um Membranproteine handelte, wurde β -Tubulin, was ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist, detektiert. Dies diente gleichzeitig der Ladekontrolle der unfraktionierten Lysate. Die Abwesenheit von β -Tubulin in der Membranfraktion war die Voraussetzung für den Einbezug der Einzelversuche in die Gesamtauswertung.

Wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen beobachtet wurde, war das hCAT-1-Protein in unstimulierten T-Zellen nur marginal exprimiert. Dies konnte sowohl für die Membranfraktion als auch für das Zell-Gesamtprotein beobachtet werden. Ebenso wurde der hCAT-1 nach 48-stündiger Stimulation, unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration, sowohl im Zellvollysate als auch in der Plasmamembran detektiert (Abbildung 11). Auffällig bei diesen Versuchen war allerdings die Steigerung der hCAT-1-Protein-Expression unter Argininmangel, die in vorangegangenen Versuchen nicht detektiert wurde, und eventuell auf Schwankungen zwischen den Spenderzellen zurückzuführen war (Abbildung 6 und 11).

Es konnte demnach sowohl unter Argininmangel als auch in der Gegenwart von 1 mM Arginin die Lokalisation des hCAT-1-Transporters in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Somit erfüllt dieser, selbst unter Mangelbedingungen, die Voraussetzung für einen effizienten Arginintransport in stimulierten T-Lymphozyten.

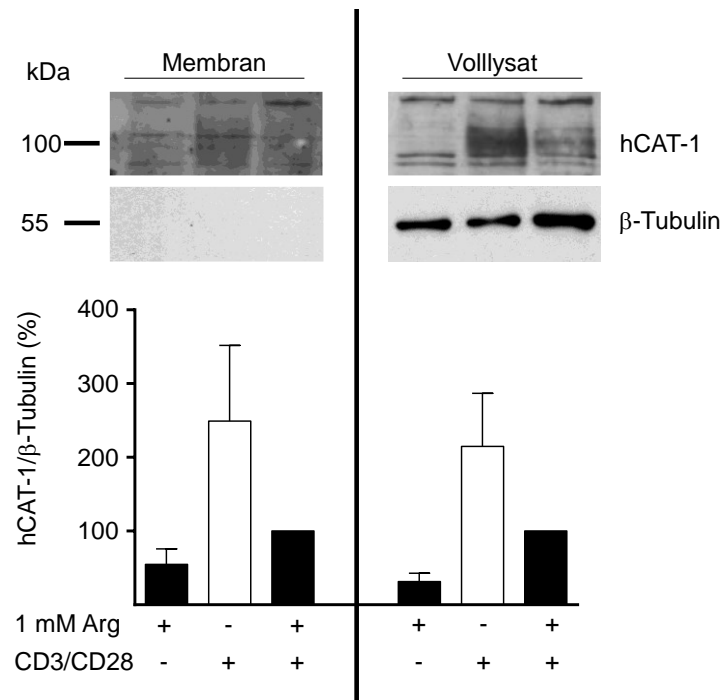


Abbildung 11: Das hCAT-1-Protein ist in stimulierten T-Zellen, unabhängig von der extrazellulären Arginkonzentration, in der Membran lokalisiert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert (CD3/CD28) oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die extrazellulär gelegenen Aminogruppen der Membranproteine biotinyliert. Nach der Zellyse wurden die biotinylierten Proteine durch Avidin-beschichtete Partikel separiert. In Western Blot-Analysen wurde die Expression des hCAT-1-Proteins in den Membranfraktionen (links) und im Zellvolllysat (rechts) untersucht. β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Zudem bestätigte die Abwesenheit β-Tubulins die erfolgreiche Separation der Membranproteine. Gezeigt sind ein repräsentativer von insgesamt 4 Western Blots und die quantitative Auswertung aller Blots. Dargestellt ist die hCAT-1-Expression der Membranfraktion und der Zellvolllyssate relativ zu der β-Tubulin-Expression, welche in den Zellvolllyssaten detektiert wurde, jeweils in Prozent der in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimulierten T-Zellen (Mittelwerte ± Standardabweichungen).

4.1.5 In stimulierten T-Lymphozyten ist der CAT-vermittelte Arginintransport stark induziert

Die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten ist stark abhängig von der Anwesenheit der Aminosäure Arginin. Dabei spielt nicht nur die räumliche Verfügbarkeit Arginins eine Rolle, sondern auch die Expression und die effiziente Funktion Arginin-transportierender Membranproteine. In den bisherigen Untersuchungen wurde der hCAT-1 als prominent exprimierter Arginintransporter in stimulierten T-Zellen identifiziert. Um weiterhin zu analysieren, ob die gesteigerte Expression dieses Transporters in stimulierten T-Lymphozyten auch mit der Steigerung des Arginintransports einhergeht, wurde im Folgenden die Aufnahme dieser Aminosäure in diesen Zellen genauer charakterisiert. Dazu wurde zunächst die Zeitkinetik der Aufnahme von 100 μM [³H]Arginin über 5 bis 60 Sekunden in unstimulierten T-Zellen, oder T-Lymphozyten, welche zuvor über 48 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden, ermittelt.

Die Analysen zeigten in stimulierten T-Lymphozyten die zeitabhängige Zunahme des importierten [^3H]Arginins. Dies konnte jedoch nicht in unstimulierten T-Zellen beobachtet werden. In diesen Zellen wurde selbst nach 60-sekündiger Inkubation mit [^3H]Arginin nicht das Level der Argininaufnahme erreicht, welches in den stimulierten T-Zellen bereits nach 5 Sekunden detektiert wurde (Abbildung 12 A).

Nach der Inkubation der T-Zellen in der Abwesenheit von Arginin wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ vergleichbare Ergebnisse beobachtet (Abbildung 12 B).

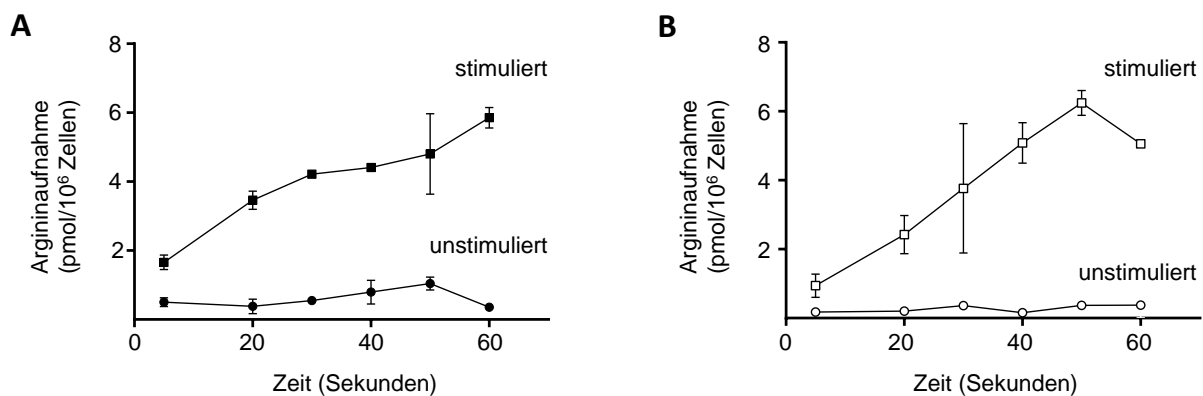


Abbildung 12: Die Argininaufnahme ist in humanen T-Lymphozyten stimulationsabhängig, aber unbeeinflusst von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden in A) 1 mM Arginin-haltigem oder B) argininfreiem Medium mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen mit argininfreiem Medium gewaschen und über 5, 20, 30, 40, 50 und 60 Sekunden in der Gegenwart von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Die Menge des importierten [^3H]Arginins wurde nach Lyse der Zellen mit 2 % SDS durch Szintillationsmessung festgestellt. Für jede Bedingung wurden Triplikate analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt 3 Experimenten, welche mit T-Zellen, isoliert aus 3 verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die hCAT-1-Expression in humanen T-Lymphozyten bis 24 Stunden nach Stimulationsbeginn kontinuierlich ansteigt. Die weitere Verlängerung der Stimulationszeit auf 48 Stunden resultierte jedoch nicht mehr in der zusätzlichen Steigerung der hCAT-1-Protein-Expression. In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob auch die Argininaufnahme dieser Zeitkinetik folgt.

Dafür wurden T-Lymphozyten zunächst über 6, 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin stimuliert. Anschließend wurde die Aufnahme von [^3H]Arginin über 25 Sekunden festgestellt.

Die Aufnahme von [^3H]Arginin in T-Zellen war nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zum 6-Stunden-Wert signifikant gesteigert, sowohl in der Gegenwart als auch unter Mangel von Arginin. Der Vergleich der Argininaufnahme in T-Lymphozyten nach 24- und 48-stündiger Stimulationszeit zeigte jedoch keinen Unterschied (Abbildung 13).

Zusammenfassend scheint also die hCAT-1-Protein-Expression mit der Argininaufnahme in T-Zellen zu korrelieren.

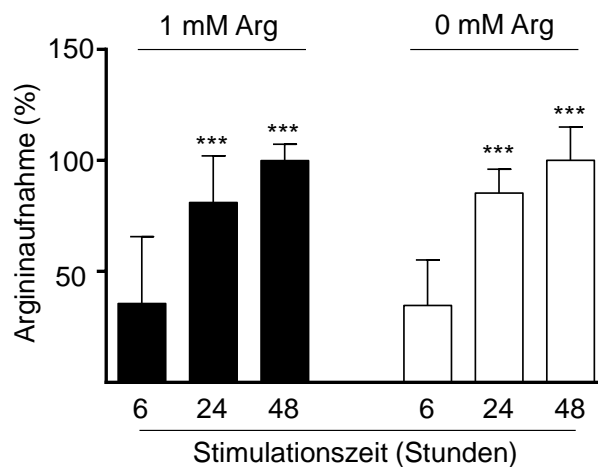


Abbildung 13: In humanen T-Lymphozyten führt die Verlängerung der Stimulationszeit, unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins, zu der Steigerung der Argininaufnahme.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden in An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit argininfreiem Medium gewaschen und über 25 Sekunden in der Gegenwart von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Die Menge des importierten [^3H]Arginins wurde nach Lyse der Zellen mit 2 % SDS durch Szintillationsmessung festgestellt. Für jede Bedingung wurden Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen, jeweils in Prozent der über 48 Stunden stimulierten Zellen (1 mM Arginin (Mittelwert): $25,3 \pm 15,0$ pmol/ 10^6 Zellen, 0 mM Arginin (Mittelwert): $13,8 \pm 5,4$ pmol/ 10^6 Zellen, $n=9$ von 3 unabhängigen Spendern). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die 6 Stunden-Stimulationswerte mit der Aufnahme nach 24 und 48 Stunden Stimulation verglichen (***: $p \leq 0,001$).

N-Ethylmaleimid (NEM) inhibiert durch irreversible Bindung an Cysteinreste die Funktion aller kationischen Aminosäuretransporter (hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3). Um die Hypothese zu untermauern, dass der hCAT-1 für die Argininaufnahme in stimulierten T-Zellen verantwortlich ist, wurde die Aufnahme von [^3H]Arginin in der Gegenwart NEMs untersucht. Dafür wurden T-Lymphozyten in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin über 48 Stunden stimuliert und anschließend für 10 Minuten mit oder ohne 200 μM NEM inkubiert. Nachfolgend wurde die Aufnahme von [^3H]Arginin über 25 Sekunden gemessen.

Die Analysen zeigten, dass die Argininaufnahme in der Gegenwart von NEM in T-Zellen, welche zuvor mit 1 mM Arginin vorstimuliert wurden, um $71,6 \pm 13,9$ % und in T-Lymphozyten, welche ohne Arginin stimuliert wurden, um $73,3 \pm 5,3$ % sank (Abbildung 14). Dies implizierte deutlich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Argininaufnahme in stimulierten T-Zellen durch kationische Aminosäuretransporter vermittelt zu werden scheint, unabhängig von der extrazellulären Arginkonzentration während der Stimulation.

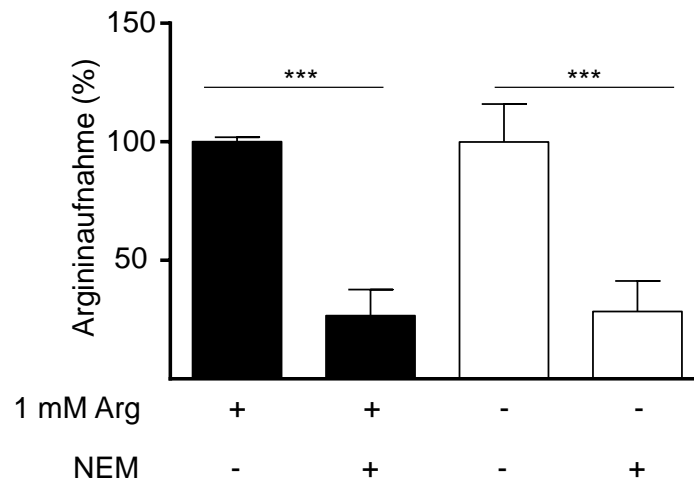


Abbildung 14: In stimulierten T-Lymphozyten wird die Argininaufnahme durch NEM stark inhibiert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 48 Stunden mit oder ohne 1 mM Arginin (Arg) durch anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte Partikel stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit argininfreiem Medium gewaschen und für 10 Minuten bei 37 °C in der An- oder Abwesenheit von 200 µM des System γ^+ -Inhibitors N-Ethylmaleimid (NEM) vorinkubiert. Die Aufnahme von 100 µM [3 H]Arginin (10 µCi/ml) wurde über 25 Sekunden gemessen. Die Menge des importierten [3 H]Arginins wurde nach Lyse der Zellen mit 2 % SDS durch Szintillationsmessung festgestellt. Für jede Bedingung wurden Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen jeweils in Prozent der Aufnahme ohne NEM (1 mM Arginin (Mittelwert): $29,5 \pm 14,2$ pmol/ 10^6 Zellen, 0 mM Arginin (Mittelwert): $15,8 \pm 3,5$ pmol/ 10^6 Zellen, n=6-9 von 2-3 unabhängigen Spendern). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde die Bedingung plus NEM mit dieser ohne Inhibitor jeweils in der An- oder Abwesenheit von Arginin verglichen (***: $p \leq 0,001$).

4.1.6 Die Reduktion der hCAT-1-Protein-Expression vermindert die T-Zellproliferation, aber nicht deren Zytokinsekretion

Die bislang beschriebenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Transporter hCAT-1 maßgeblich für den Arginintransport in humanen stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich zu sein scheint. Funktionelle Tests mit T-Zellen, welche den hCAT-1 nicht oder nur gering exprimieren, sollten endgültig die Aufklärung der Rolle dieses Transporters für diese Zellen ermöglichen. Aus diesem Grund sollte eine siRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression in stimulierten T-Lymphozyten etabliert werden. Generell gelten primäre T-Lymphozyten als schwer zu transfizierende Zellen, warum die Einschleusung der siRNA in diese Zellen mittels der, speziell für diesen Zweck entwickelten, Amaxa-Nukleofektionstechnik (Lonza, Basel, Schweiz) durchgeführt wurde. Einleitend wurde durch Variation der eingesetzten siRNA, der siRNA-Menge und des genutzten Nukleofektionsprogramms die Reduktion der hCAT-1-Expression optimiert.

Zu diesem Zweck wurden T-Lymphozyten zunächst in der Gegenwart von 2 bis 5 µg der aus 4 verschiedenen siRNA-Sequenzen zusammengesetzten ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA (Fermentas, Waltham, MA, USA) gegen hCAT-1 elektroporiert. Dafür wurde das Nukleofektionsprogramm U14 des Nucleofector™ I genutzt. Neben den hCAT-1-siRNA-

transfizierten Zellen, wurden auch T-Lymphozyten in der Gegenwart von non-target-RNA elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden stimuliert. Als Kontrolle wurden ebenfalls stimulierte und unstimulierte, nicht-transfizierte T-Zellen parallel inkubiert. Die hCAT-1-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real time-PCR festgestellt.

Die hCAT-1-mRNA-Expression wurde durch die Transfektion von 2 μg siRNA um $66,3 \pm 5,0$ %, von 3 μg um $42,3 \pm 20,16$ %, von 4 μg um $64,0 \pm 1,8$ % und von 5 μg um 66,2 % reduziert (Abbildung 15). Da demnach die Steigerung der eingesetzten siRNA-Menge keine weitere Reduktion der hCAT-1-Expression zur Folge hatte, wurden in den folgenden Experimenten jeweils 2 μg siRNA eingesetzt.

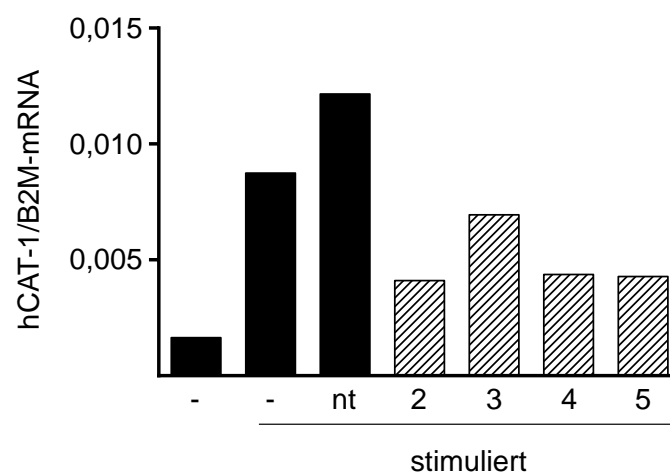


Abbildung 15: In stimulierten T-Lymphozyten kann die hCAT-1-Expression siRNA-vermittelt reduziert werden.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit non-target-RNA (nt), 2 (2), 3 (3), 4 (4) oder 5 (5) μg ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA gegen hCAT-1 transfiziert. Dafür wurde das Amaxa-Programm U14 des Nucleofector™ I genutzt. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin durch anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte Partikel stimuliert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-transfizierte Zellen (-) dienten als Kontrollen. Anschließend wurde die hCAT-1-mRNA-Expression mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist die hCAT-1- in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=2$ aus 2 unabhängigen Spendern).

Die Amaxa-Nukleofektionstechnologie ermöglicht durch verschiedene, auf einen Zelltyp spezialisierte Programme, die Variation der Elektroporationsparameter und somit die Optimierung der Transfektionseffizienz. Deshalb wurde im nächsten Schritt anstatt des Programms U14, das Programm V24 für die Elektroporation verwendet, welches laut Herstellerinformationen zwar die Transfektionsrate steigern, allerdings die Zellviabilität senken sollte.

Unter diesen Versuchsbedingungen konnte jedoch kein nennenswerter Unterschied der hCAT-1-mRNA-Expression nach siRNA-Transfektion gegenüber den non-target-RNA-elektroporierten Zellen festgestellt werden (Abbildung 16). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen ausschließlich mit dem Programm U14 gearbeitet.

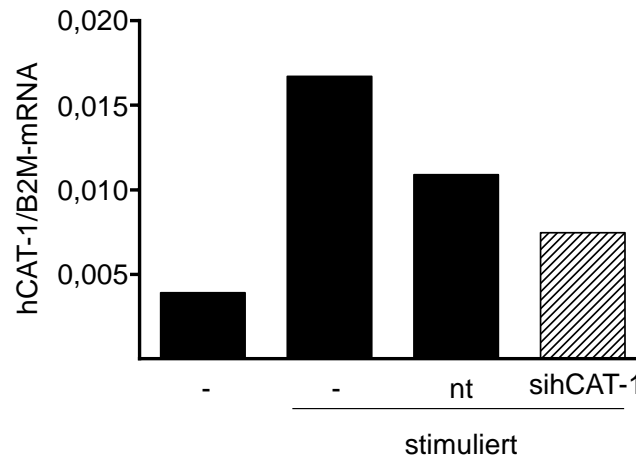


Abbildung 16: Die Variation der Elektroporationsparameter führt nicht zu der weiteren Reduktion der hCAT-1-Expression.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit non-target-RNA (nt) oder 2 µg ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA gegen hCAT-1 (sihCAT-1) elektroporiert. Dafür wurde das Amaxa-Nukleofektionsprogramm V24 genutzt. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin durch anti-CD3/anti-CD28-gekoppelte Partikel stimuliert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrollen (-). Die hCAT-1-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist die hCAT-1- in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=1-2 aus einem Spender).

Des Weiteren wurden verschiedene siRNAs gegen hCAT-1 getestet. Dafür wurden jeweils 2 µg siRNA insgesamt für die Transfektion der T-Lymphozyten eingesetzt. Validiert wurden entweder separat oder in Kombination die von Eurogentec (Lüttich, Belgien) synthetisierten siRNAs hCAT-1_a und hCAT-1_b, sowie die ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA (Fermentas, Waltham, MA, USA) (Tabelle 28). Nach der Transfektion wurden die T-Zellen über 24 Stunden stimuliert. Im Anschluss wurde die hCAT-1-mRNA-Expression durch quantitative real time-PCR ermittelt. Parallel erfolgte die Analyse von non-target-RNA-transfizierten, sowie unstimulierten und stimulierten, nicht elektroporierten Zellen.

Das Experiment zeigte eine Reduktion der hCAT-1-mRNA-Expression, jeweils im Vergleich mit non-target-RNA-transfizierten Zellen, mit sihCAT1_a um $30,4 \pm 43,3$ %, mit sihCAT1_b um $66,6 \pm 0,3$ %, mit sihCAT1_a, kombiniert mit sihCAT1_b um $64,7 \pm 2,0$ %, mit ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA um $32,5 \pm 6,5$ %, mit der ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA, kombiniert mit sihCAT1_a um $37,0 \pm 4,7$ %, mit ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA, kombiniert mit sihCAT1_b um $59,8 \pm 4,0$ %, sowie um $61,1 \pm 7,2$ % nach Transfektion mit ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA, kombiniert mit sihCAT1_a und sihCAT1_b. Es ist auffällig, dass die Bedingungen, in welchen die siRNA sihCAT_b eingesetzt wurde, die effizienteste Reduktion der hCAT-1-Expression zeigte, allerdings die Kombination dieser siRNA mit anderen keine weitere Senkung der hCAT-1-mRNA-Expression zur Folge hatte

(Abbildung 17). Deshalb wurde in den weiteren Experimenten ausschließlich die sihCAT1_b eingesetzt.

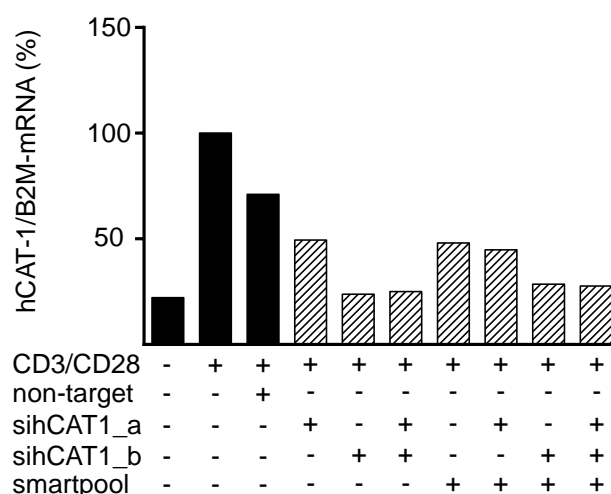


Abbildung 17: Die Transfektion der siRNA hCAT1_b in humane T-Lymphozyten reduziert am effizientesten die Expression des hCAT-1.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit non-target-RNA (non-target) oder siRNA gegen hCAT-1 transfiziert. Es wurden die siRNAs sihCAT1_a, sihCAT1_b und die ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA gegen hCAT-1 separat oder in Kombination in der Gesamtkonzentration von 2 µg eingesetzt. Anschließend wurden die T-Zellen über 24 Stunden in 1 mM Arginin-haltigem Medium mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln (CD3/CD28) stimuliert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrollen. Anschließend wurde die hCAT-1-mRNA-Expression mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist die hCAT-1- in Relation zu β₂-Mikroglobulin (B2M)-mRNA-Expression (n=1).

Die Effizienz der siRNA-vermittelten Reduktion der hCAT-1-Expression wurde bislang ausschließlich auf transkriptioneller Ebene festgestellt. Für funktionellen Tests, um die Rolle des hCAT-1 für humane T-Zellen zu untersuchen, spielt jedoch in erster Linie die Herabregulation des hCAT-1-Proteins eine Rolle. Deswegen wurde im Folgenden die hCAT-1-Protein-Expression in siRNA-transfizierten T-Lymphozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen mit siRNA gegen hCAT-1 oder non-target RNA transfiziert und über 24 und 48 Stunden stimuliert. Um einen potentiellen Effekt von extrazellulärem Arginin auf die Effizienz der Expressionsreduktion zu untersuchen, erfolgte die Stimulation jeweils in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte, unstimulierte und stimulierte T-Lymphozyten analysiert. Die hCAT-1-Protein-Expression wurde mittels Western Blot-Analysen festgestellt.

Einleitend ist anzumerken, dass die hCAT-1-Protein-Expression in stimulierten T-Lymphozyten nach Transfektion mit non-target RNA, vergleichbar mit dieser in untransfizierten, stimulierten T-Zellen war und demnach die eingesetzte non-target RNA keine unspezifischen Effekte auf die hCAT-1-Protein-Expression zeigte. In T-Lymphozyten, welche nach Transfektion von hCAT-1-siRNA über 24 Stunden unter Argininmangel stimuliert

wurden, sank die hCAT-1-Protein-Expression im Vergleich zu non-target-RNA-elektroporierten Zellen um $78,6 \pm 14,4$ %. Nach Aktivierung in Anwesenheit von Arginin war die hCAT-1-Expression um $85,3 \pm 10,9$ % reduziert. Damit war die detektierte residuale hCAT-1-Proteinmenge unter beiden Bedingungen quantitativ ähnlich zu der hCAT-1-Proteinmenge, welche in unstimulierten Zellen festgestellt wurde. Nach 48-stündiger Stimulation war unter Argininmangel die Senkung der hCAT-1-Protein-Expression um $89,4 \pm 13,1$ % und in der Gegenwart von Arginin um $57,2 \pm 24,4$ % zu beobachten. Demnach war die Hemmung der hCAT-1-Expression nach 48-stündiger Stimulation in der Gegenwart von Arginin am geringsten (Abbildung 18).

Die folgenden funktionellen Tests sollten unter Argininsubstitution durchgeführt werden, um den Effekt der Reduktion der hCAT-1-Expression auf T-Lymphozyten im Vergleich zu diesem durch extrazellulären Argininmangel zu untersuchen. Da die Reduktion der hCAT-1-Expression in T-Zellen, welche über 48 Stunden in der Gegenwart von Arginin stimuliert wurden, nicht signifikant von dieser in non-target-RNA-transfizierten Zellen verschieden war, wurden die funktionellen Analysen bereits nach 24 Stunden durchgeführt, um eine möglichst effiziente Herabregulation des hCAT-1-Proteins zu gewährleisten (Abbildung 18).

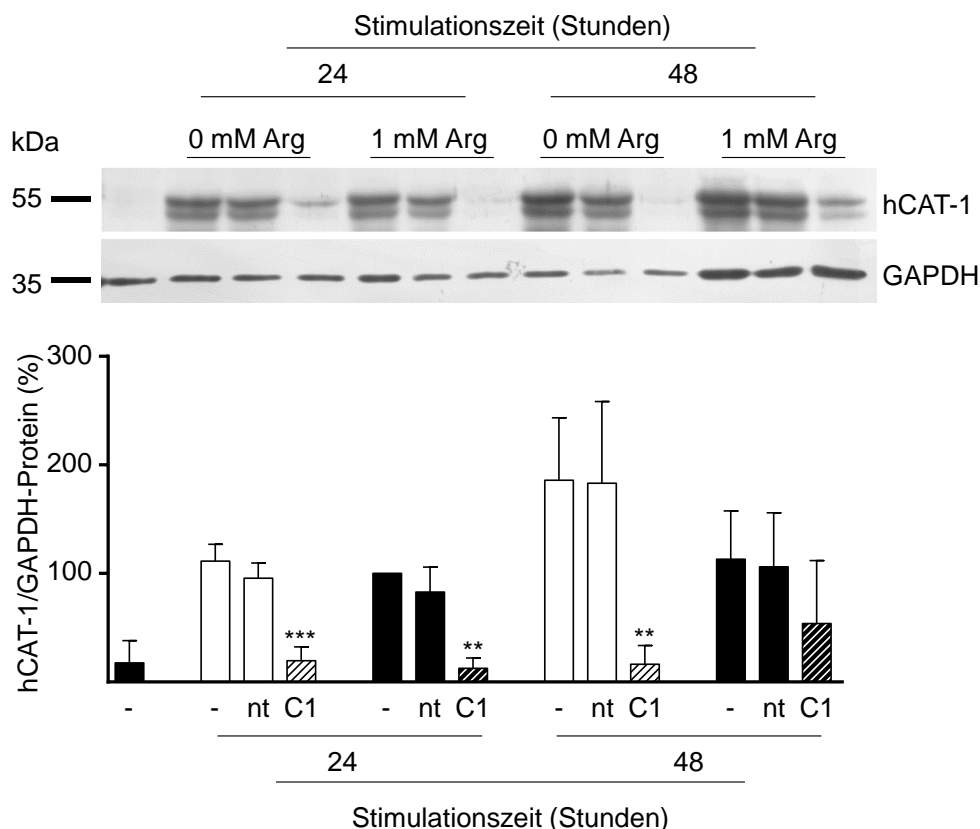


Abbildung 18: 24 Stunden nach siRNA-Transfektion ist die hCAT-1-Protein-Expression vergleichbar mit dieser in unstimulierten T-Lymphozyten.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit jeweils 2 µg non-target RNA (nt) oder siRNA gegen hCAT-1 (C1) transfiziert. Anschließend wurden die T-Zellen über 24 und 48 Stunden in An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils untransfizierte Zellen dienten als Kontrollen (-). Anschließend wurde die Protein-Expression des hCAT-1 und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind ein repräsentativer von insgesamt 4 Western Blots und die quantitative Auswertung aller Blots. Dargestellt ist die hCAT-1- relativ zu GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der über 24 Stunden in der Gegenwart von Arginin stimulierten, nicht elektroporierten T-Zellen (Mittelwerte ± Standardabweichungen). Die statistische Auswertung erfolgte mit Two-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche mit siRNA gegen hCAT-1 elektroporiert wurden mit den non-target-RNA-transfizierten Zellen derselben Bedingung verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$).

Vor dem Start der funktionellen Tests, wurde als weitere Kontrolle auch der Effekt der Elektroporation selbst, ohne siRNA, auf die hCAT-1-Expression in stimulierten T-Zellen untersucht. Dafür wurden T-Lymphozyten nicht nur mit non-target-RNA oder siRNA gegen hCAT-1 transfiziert, sondern auch in der Abwesenheit einer RNA elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden stimuliert. Die hCAT-1-Protein-Expression wurde mittels Western Blot festgestellt. Zum Vergleich wurden parallel jeweils untransfizierte, unstimulierte oder stimulierte Zellen analysiert.

In diesen Experimenten konnte keine Differenz der hCAT-1-Protein-Expression in T-Zellen, welche ohne siRNA transfiziert wurden, zu nicht-transfizierten, stimulierten Zellen oder zu non-target-RNA-transfizierten, stimulierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 19).

Demnach schien die Elektroporation selbst keinen Einfluss auf die hCAT-1-Expression in stimulierten T-Zellen zu haben.

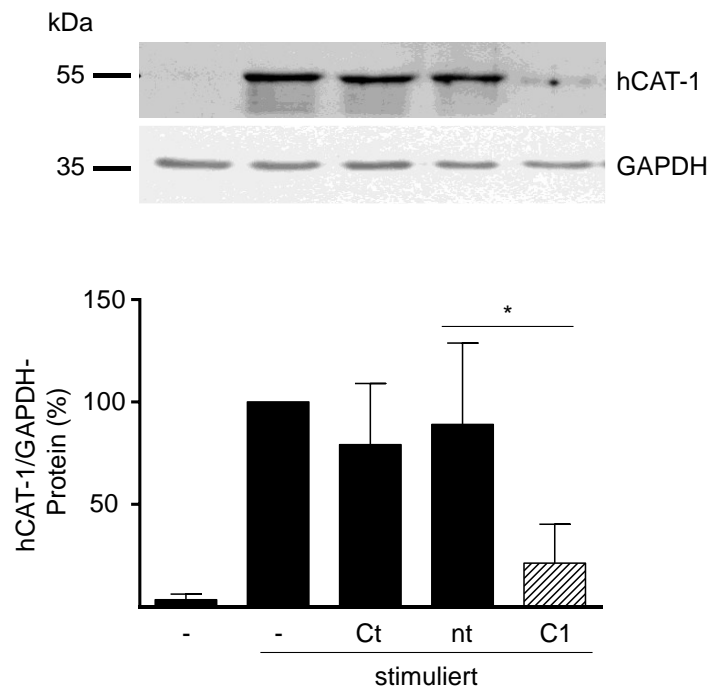


Abbildung 19: Die Elektroporation humaner T-Lymphozyten in der Abwesenheit einer siRNA hat keinen Einfluss auf die hCAT-1-Expression.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit jeweils 2 µg non-target-RNA (nt) oder siRNA gegen hCAT-1 (C1) transfiziert oder in der Abwesenheit einer siRNA (control transfected, (Ct)) elektroporiert. Anschließend wurden die T-Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln aktiviert. Unstimulierte und stimuliert, jeweils nicht-elektroporierte Zellen dienten als Kontrollen (-). Anschließend wurde die Protein-Expression des hCAT-1 und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und die quantitative Auswertung aller Blots. Dargestellt ist die hCAT-1- relativ zu GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der stimulierten, nicht elektroporierten T-Zellen (Mittelwerte ± Standardabweichungen). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test (*: $p \leq 0,05$).

Nachdem die siRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression in stimulierten T-Lymphozyten erfolgreich etabliert worden war, sollte nun durch funktionelle Tests die Rolle des hCAT-1 in diesen Zellen charakterisiert werden.

Die bislang beschriebenen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass der Transporter hCAT-1 maßgeblich für den Arginintransport in stimulierten humanen T-Lymphozyten verantwortlich zu sein scheint. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Aufnahme [^3H]Arginins (10 µCi/ml) über 25 Sekunden in T-Zellen gemessen, welche zuvor mit siRNA gegen hCAT-1 transfiziert und anschließend über 24 Stunden stimuliert worden waren. Als Kontrollen dienten nicht-transfizierte unstimulierte und stimuliert, sowie ohne oder mit non-target RNA transfizierte stimuliert T-Lymphozyten.

Das Experiment zeigte eine Reduktion der [³H]Argininaufnahme um $63,8 \pm 9,5$ % in T-Zellen, welche mit siRNA gegen hCAT-1 transfiziert wurden, im Vergleich zu non-target-RNA-transfizierten Zellen. Damit unterschied sich die Argininaufnahme in diesen Zellen nicht mehr signifikant von dem Level in unstimulierten T-Zellen. Des Weiteren wurde keine Differenz der Argininaufnahme in T-Zellen, welche ohne siRNA elektroporiert worden waren, zu den nicht-elektroporierten stimulierten Zellen beobachtet, womit ein unspezifischer Effekt der Elektroporation auf den Argininimport dieser Zellen ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 20 A). Demnach resultiert die siRNA-vermittelte Senkung der hCAT-1-Expression in stimulierten T-Lymphozyten in der ausgeprägten Reduktion der Argininaufnahme, folglich der hCAT-1 maßgeblich für den Argininimport in diesen Immunzellen verantwortlich zu sein scheint.

Um zu überprüfen, ob die Senkung der hCAT-1-vermittelten Argininaufnahme auch die Reduktion der intrazellulären Arginkonzentration nach sich zieht, wurde diese in T-Lymphozyten, welche mit non-target-RNA oder siRNA gegen hCAT-1 transfiziert und über 24 Stunden stimuliert worden waren, mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Die Analysen erfolgten durch [REDACTED] [REDACTED] (technische Assistentin, Arbeitsgruppe [REDACTED]).

Überraschenderweise war in sihCAT-1-transfizierten T-Lymphozyten, verglichen mit den Kontrollzellen, lediglich die Reduktion der intrazellulären Arginkonzentration um $30,3 \pm 0,6$ % zu beobachten (Abbildung 20 B). Demnach scheint die residuale Argininaufnahme in sihCAT1-Zellen auszureichen, um den intrazellulären Argininspiegel auf vergleichbar hohem Level zu halten.

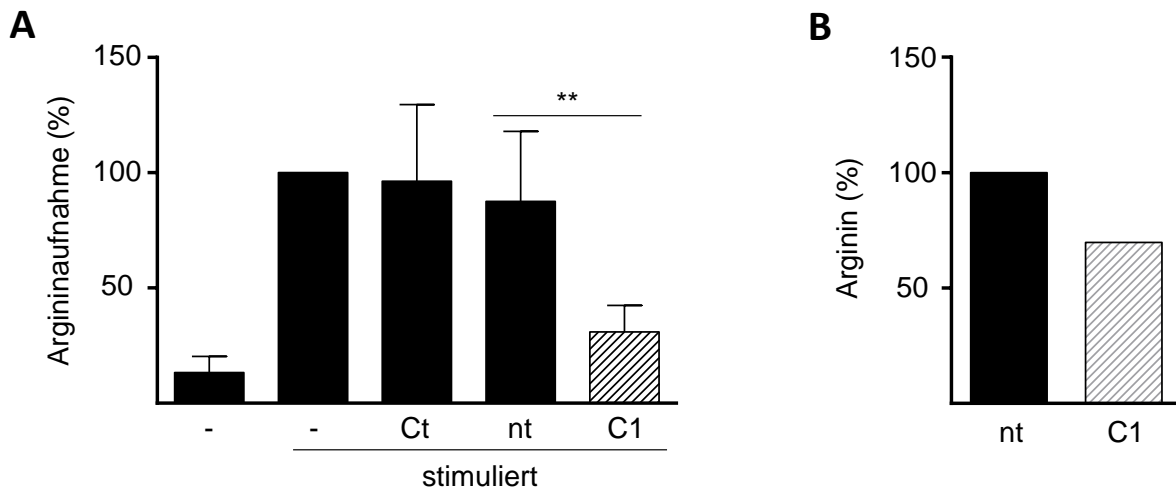


Abbildung 20: Durch die Herabregulation der hCAT-1-Protein-Expression wird auch die Argininaufnahme in stimulierten T-Zellen reduziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit jeweils 2 µg non-target RNA (nt) oder siRNA gegen hCAT-1 (C1) transfiziert, sowie in der Abwesenheit einer siRNA elektroporiert (control transfected, Ct). Anschließend wurden die T-Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln aktiviert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-elektroporierte Zellen dienten als Kontrollen (-). A) Anschließend wurde die Aufnahme von 100 µM [³H]Arginin (10 µCi/ml) über 25 Sekunden gemessen. Pro Bedingungen wurden Triplicate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der Aufnahme in stimulierte Kontrollzellen (Mittelwert: 14,5 ± 6,9 pmol/ 10⁶ Zellen). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test (**: p ≤ 0,01, n=2-5 unabhängige Spender). B) Die intrazelluläre Argininkonzentration wurde mittels HPLC festgestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent der Argininkonzentration in non-target-RNA-transfizierten Zellen (Mittelwert: 1180 ± 296 µM Arginin pro Zelle, n=2 aus 2 unabhängigen Spendern).

Bislang konnte gezeigt werden, dass die Argininaufnahme in stimulierten T-Lymphozyten maßgeblich durch den hCAT-1 vermittelt wird. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Reduktion der hCAT-1-vermittelten Argininaufnahme auch die T-Zell-Proliferation und -Viabilität einschränkt.

Dafür wurden T-Lymphozyten mit siRNA gegen hCAT-1 oder non-target RNA transfiziert und außerdem ohne siRNA elektroporiert. Nach 24-stündiger Stimulation wurde die Zellviabilität durch die durchflusszytometrische Detektion Propidiumiodid-positiver Zellen untersucht, sowie die Zellproliferation durch den Einbau von [³H]Thymidin über weitere 16 Stunden determiniert. Als Kontrolle wurden ebenfalls jeweils nicht-elektroporierte, unstimulierte oder stimulierte T-Zellen analysiert.

Die Experimente zeigten die Reduktion der T-Zellproliferation in sihCAT-1-transfizierten Zellen um 57,4 ± 19,7 % im Vergleich zu non-target-RNA-transfizierten Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Argininaufnahme in stimulierten T-Zellen auch einschränkend auf deren Proliferation wirkt. Jedoch wurde auch beobachtet, dass die Proliferation bereits in den ohne siRNA elektroporierten T-Lymphozyten im Vergleich zu nicht-elektroporierten, stimulierten T-Zellen stark beeinflusst und um 66,2 ± 20,8 % gefallen

war. Dies entsprach ebenfalls ungefähr dem Level der non-target-RNA transfizierten T-Lymphozyten (Abbildung 21 A). Im Gegensatz zu der Argininaufnahme scheint demnach die T-Zellproliferation stark durch die Elektroporation beeinträchtigt zu werden. Die Viabilität hingegen war in den elektroporierten Kontrollzellen lediglich um 9,3 % und in sihCAT-1-transfizierten Zellen um 11,8 % gesunken (Abbildung 21 B). Somit schien die Elektroporation selbst zwar die Proliferation der Zellen, nicht aber deren Viabilität zu verschlechtern. Darüber hinaus zeigte dieses Experiment, dass die beobachtete Reduktion der T-Zellproliferation in sihCAT-1-transfizierten Zellen nicht auf einen Zelltod zurückzuführen war.

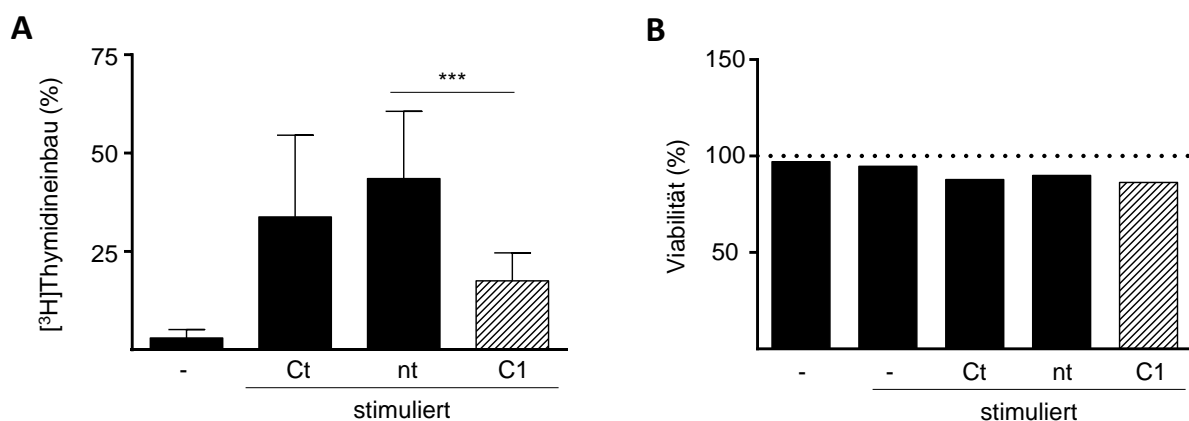


Abbildung 21: Die Herabregulation der hCAT-1-Expression resultiert in der Reduktion der T-Zellproliferation.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit jeweils 2 µg non-target-RNA (nt) oder siRNA gegen hCAT-1 (C1) transfiziert, sowie in der Abwesenheit einer siRNA elektroporiert (control transfected, Ct)). Anschließend wurden die T-Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln aktiviert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-elektroporierte Zellen dienten als Kontrollen (-). A) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von 1 µCi [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Für jede Bedingung wurden Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der stimulierten, nicht-elektroporierten Zellen (Bedingung nicht gezeigt, Mittelwert: 32154 ± 11098 cpm). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***: p ≤ 0,001, n=3-6 unabhängige Spender). B) Die Zell-Viabilität in Prozent wurde mittels durchflusszytometrischer Detektion Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen bestimmt (n=1).

Nach Stimulation von T-Helferzellen modulieren diese die Aktivität anderer Zellen des Immunsystems durch Sekretion bestimmter Botenstoffen, sogenannter Zytokine. Dabei unterscheidet man anhand der sekretierten Zytokine T_H1- und T_H2-Zellen. Während T_H1-Zellen die Zytokine IFN-γ, IL-2 und TNF-α produzieren, sind IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 für T_H2-Zellen charakteristisch. In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Herabregulation der hCAT-1-Expression sowohl die Reduktion der Argininaufnahme als auch der Zellproliferation nach sich zog. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die verminderte hCAT-1-Expression auch die Zytokinausschüttung von T-Lymphozyten beeinflusst. Dafür wurden T-Zellen mit non-target-RNA oder siRNA gegen hCAT-1 transfiziert und über 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde mittels des „Human Th1/Th2 Cytokine

Kit II“ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchflusszytometrisch die Konzentration der T_H1 -Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 und des T_H2 -Zytokins IL-6 in den Zellkulturüberständen gemessen. Als Kontrollen wurden jeweils nicht-elektroporierte, unstimulierte oder stimulierte Zellen parallel analysiert.

Bei keinem der untersuchten Zytokine war die Konzentration in Zellkulturüberständen von sihCAT-1-transfizierten Zellen im Vergleich zu non-target-RNA-transfizierten Zellen reduziert (Abbildung 22). Jedoch kam es jeweils bereits durch Elektroporation der Zellen mit non-target-RNA zu einer ausgeprägten Senkung der Zytokinausschüttung im Vergleich zu nicht-elektroporierten, stimulierten Zellen. Im Fall des IFN- γ kam es zu einer Reduktion um $70,8 \pm 20,7$ % (Abbildung 22 A). Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls durch einen ELISA ermittelt, weshalb ein Fehler in der Methode auszuschließen war (Daten nicht gezeigt). Die Sekretion des T_H2 -Zytokin IL-6 wurde vergleichbar stark durch die Elektroporation beeinflusst (Abbildung 22 D). Hingegen war der Effekt bei den T_H1 -Zytokinen TNF- α und IL-2 mit der Reduktion um $31,5 \pm 36,1$ % und $34,9 \pm 51,6$ %, verglichen mit nicht-elektroporierten, stimulierten Zellen, nicht so stark ausgeprägt (Abbildung 22 B und C). Demzufolge blieb die Zytokinausschüttung in stimulierten T-Lymphozyten durch die Reduktion der hCAT-1-vermittelten Argininaufnahme unbeeinträchtigt. Dies könnte teilweise auf die residuale hCAT-1-Expression und die nur schwach gesenkte intrazelluläre Argininkonzentration in sihCAT-1- im Vergleich zu non-target-RNA-transfizierten Zellen zurückzuführen sein.

Nichtsdestotrotz wurde der hCAT-1, aufgrund der nach der siRNA-vermittelten Expressionshemmung auftretenden deutlichen Senkung der Argininaufnahme sowie der daraus resultierenden starken Proliferationsinhibition, als Schlüsselement der T-Zellproliferation identifiziert und könnte demnach als pharmakologisches Zielmolekül genutzt werden, um die T-Zellfunktion zu manipulieren.

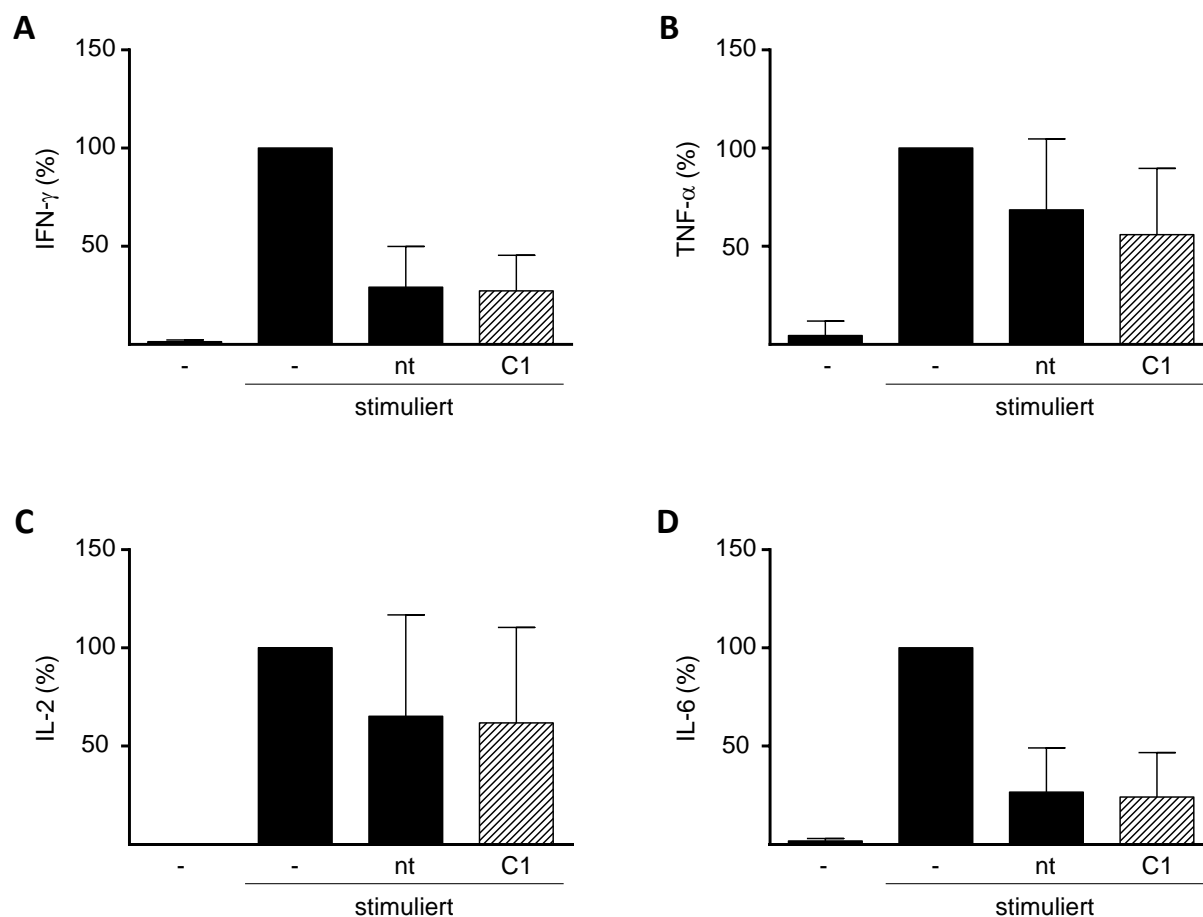


Abbildung 22: Die Herabregulation der hCAT-1-Expression hat keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion stimulierter T-Lymphozyten.

T-Zellen wurden durch Negativelektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit jeweils 2 μ g non-target-RNA (nt) oder siRNA gegen hCAT-1 (C1) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln aktiviert. Unstimulierte und stimulierte, jeweils nicht-elektroporierte Zellen dienten als Kontrollen (-). Die Konzentration der Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der Interleukine 2 und 6 (IL-2 und IL-6) wurden in den Zellkulturüberständen mittels des „Human Th1/Th2 Cytokine Kit II“ durchflusszytometrisch festgestellt (n=7 unabhängige Spender). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der stimulierten, nicht-elektroporierten Zellen (-). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test.

4.2 Identifizierung des System L-Transporters LAT1 als hauptverantwortlichen Citrullintransporter in humanen T-Lymphozyten

Die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten hängt stark von der Verfügbarkeit der semi-essentiellen Aminosäure Arginin ab. Aber auch viele Tumorentitäten sind auf die Zufuhr extrazellulären Arginins angewiesen, demzufolge die Induktion von Argininmangel eine neue potentielle Strategie für die Tumorbehandlung darstellt. Die pegylierte Arginindeiminase metabolisiert Arginin zu der neutralen Aminosäure Citrullin und Ammoniak und wird derzeit in klinischen Phase I und II Studien erfolgreich in der Behandlung von Melanomen,

Leberzellkarzinomen, sowie akuter myeloischer Leukämie getestet (Glazer, 2010; Miraki-Moud, 2015; Ott, 2013). Die Voraussetzung für den Erfolg dieser Therapie ist jedoch die fehlende Expression der Enzyme Argininosuccinatsynthetase (ASS) und/oder Argininosuccinatlase (ASL) in Tumorzellen und demnach die Fähigkeit Arginin intrazellulär aus der neutralen Aminosäure Citrullin zu synthetisieren. Hingegen wäre es für die optimale Tumorthherapie vorteilhaft, wenn die Tumor-bekämpfenden T-Lymphozyten unter Argininmangel durch die Supplementation von Citrullin ihre effiziente Funktion aufrechterhalten könnten. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe [REDACTED] konnten wir zeigen, dass die durch Argininmangel induzierte eingeschränkte T-Zellfunktion durch die Supplementation von extrazellulärem Citrullin wiederhergestellt werden kann. Dies wurde allerdings nicht unter komplettem Argininmangel beobachtet, sondern ausschließlich in der Gegenwart geringer Arginkonzentrationen (20-100 μM), welche jedoch allein, ohne die Zugabe von Citrullin, nicht für das Aufrechterhalten der T-Zellproliferation ausreichen. Das Fehlen der Rekonstitution der Citrullin-abhängigen Zellproliferation unter vollständigem Argininmangel ist wahrscheinlich teilweise durch die differentielle Induktion der ASS-Expression in diesen Zellen unter diesen Bedingungen zu erklären (Kapitel 1.1.5). Allerdings hängt die intrazelluläre Synthese von Arginin nicht allein von der Expression Citrullin-metabolisierender Enzyme ab, sondern ebenso von der Expression Citrullin-importierender Transporter in der Plasmamembran. Das Fehlen der Expression des verantwortlichen Citrullintransporters könnte demnach ebenso der Grund für das Ausbleiben der T-Zellproliferation in der Gegenwart von Citrullin unter Argininmangel sein. Bislang war nicht bekannt welche Transporter für den Citrullinimport in humanen T-Lymphozyten verantwortlich sind. Deswegen sollte im Rahmen dieser Dissertation der Citrullintransport in humanen T-Zellen charakterisiert und somit der verantwortliche Citrullintransporter in diesen Zellen identifiziert werden.

4.2.1 Der Citrullintransport ist argininabhängig in stimulierten T-Lymphozyten induziert

Um den Transporter, welcher für die Citrullinaufnahme in primären humanen T-Zellen verantwortlich ist, zu identifizieren, wurde initial der Import dieser Aminosäure in diese Immunzellen genauer charakterisiert.

Im ersten Schritt sollte untersucht werden, ob der Transport von Citrullin stimulationsabhängig in humanen T-Lymphozyten induziert wird. Dafür wurde die Zeitkinetik der Aufnahme von [^{14}C]Citrullin (1 $\mu\text{Ci/ml}$) über 5 bis 60 Sekunden in humanen T-Zellen, welche entweder

unstimuliert belassen oder zuvor über 24 Stunden in der Gegenwart von 20 μM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln stimuliert worden waren, ermittelt. Die Argininkonzentration von 20 μM wurde gewählt, da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe XXXXXXXXXX ausschließlich unter diesen Bedingungen die Citrullin-abhängige Proliferation stimulierter T-Lymphozyten, verbunden mit einer starken ASS-Expression, beobachtet wurde. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass unter den gewählten Konditionen auch die Aufnahme von Citrullin stattfinden sollte.

Die Analysen zeigten, dass in stimulierten T-Lymphozyten die Menge an detektiertem intrazellulärem [^{14}C]Citrullin kontinuierlich über 5, 30 bis 60 Sekunden anstieg. Hingegen konnte dies in unstimulierten T-Lymphozyten nicht beobachtet werden. Hier war bis zu 60 Sekunden nur eine marginale Citrullinaufnahme feststellbar, die zudem noch unter dem Level, welches in stimulierten T-Zellen nach 5 Sekunden beobachtet wurde, lag (Abbildung 23 A).

Des Weiteren wurde getestet, ob der Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten in Abhängigkeit der extrazellulären Argininkonzentration während der Stimulationszeit variiert. Dafür wurden T-Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1000 μM , 20 μM Arginin oder ohne Arginin stimuliert. Anschließend wurde die Aufnahme von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]Citrullin über 30 Sekunden gemessen.

Die Experimente zeigten in T-Lymphozyten, welche in der Gegenwart von 1000 oder 20 μM Arginin stimuliert wurden, eine vergleichbar ausgeprägte Citrullinaufnahme. Demgegenüber war die Aufnahme dieser Aminosäure in T-Lymphozyten, welche zuvor in der Abwesenheit von Arginin stimuliert wurden, signifikant um $60,2 \pm 15,5$ % reduziert (Abbildung 23 B).

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass ausschließlich stimulierte T-Lymphozyten einen nennenswerten Citrullintransport aufweisen. Darüber hinaus war dieser Transport von der extrazellulären Argininkonzentration während der Stimulation beeinflusst und unter absolutem Argininmangel vermindert.

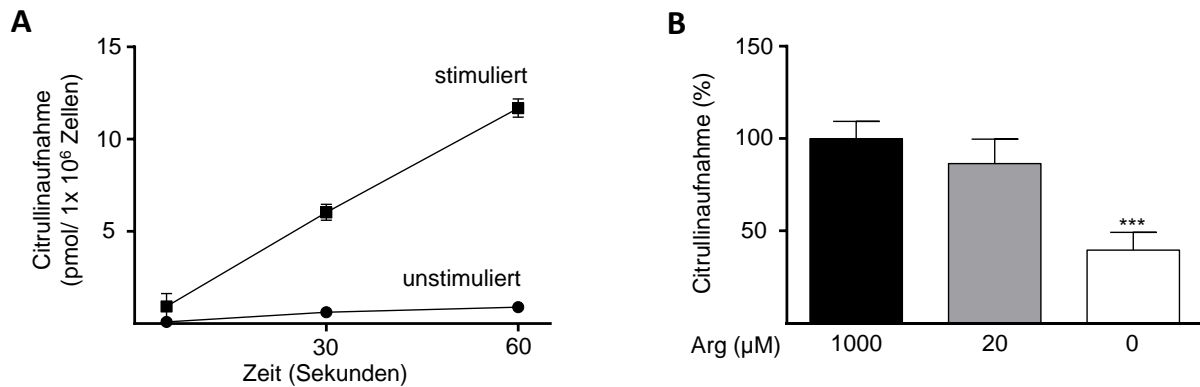


Abbildung 23: Der Citrullintransport ist argininabhängig in stimulierten T-Zellen induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert. A) T-Lymphozyten wurden über 24 Stunden in 20 µM Arginin-haltigem Medium mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Aufnahme von 20 µM [¹⁴C]Citrullin (1 µCi/ml) über 5, 30 und 60 Sekunden gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt 4 Experimenten. Innerhalb eines Experiments wurden für jede Bedingung Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. B) T-Lymphozyten wurden über 24 Stunden in der Gegenwart von 1000, 20 µM oder ohne Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurde die Aufnahme von [¹⁴C]Citrullin (1 µCi/ml) über 30 Sekunden gemessen. Innerhalb eines Experiments wurden für jede Bedingung Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der in 1000 µM Arginin stimulierten Zellen (Mittelwert: 10,2 ± 8,4 pmol/10⁶ Zellen, n=8-9 aus 3 unabhängigen Spendern). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche in 1000 µM Arginin stimuliert wurden mit den anderen Bedingungen verglichen (***: p ≤ 0,001).

4.2.2 Citrullin wird in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen in stimulierten T-Lymphozyten zu Arginin metabolisiert

Die bislang durchgeführten Experimente zeigten, dass die neutrale Aminosäure Citrullin in der Tat in humane stimulierte T-Zellen transportiert wird. Dies passierte allerdings unter vollständigem Argininmangel nur im eingeschränkten Ausmaß (Abbildung 23). Im Folgenden wurde untersucht, ob die ausbleibende Rekonstitution der T-Zellproliferation durch Citrullin unter kompletten Argininmangel (Daten Arbeitsgruppe ██████, Kapitel 1.1.5) durch einen geringeren Citrullinimport und daraus resultierenden intrazellulären Citrullinmangel unter diesen Bedingungen zu erklären sein könnte. Dafür wurden primäre humane T-Zellen in der Gegenwart von 20 µM Arginin oder ohne Arginin stimuliert und anschließend für eine oder vier Stunde(n) in der Anwesenheit von 1 mM Citrullin inkubiert. Als Kontrolle wurde das Citrullin von Zellen, welche unter denselben Bedingungen vorstimuliert worden waren, unmittelbar nach Zugabe entfernt. Anschließend wurde die intrazelluläre Konzentration von Citrullin von ██████ (technische Assistentin, Arbeitsgruppe ██████) durch HPLC ermittelt. Darüber hinaus wurden ebenso die intrazelluläre Konzentration von Argininosuccinat, dem Intermediat der intrazellulären Argininsynthese, und Arginin

determiniert, um die Metabolisierung von Citrullin zu Arginin, in Abhängigkeit der extrazellulären Argininkonzentration zu untersuchen.

Nach Inkubation der stimulierten T-Lymphozyten in der Gegenwart von 1 mM Citrullin war die intrazelluläre Citrullinmenge, unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration während der Stimulationszeit, vergleichbar hoch im Bereich mehrerer mM. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich unter beiden Bedingungen um einen konzentrierenden Citrullintransport handelt (Abbildung 24 A). Hingegen schien sich der Citrullinmetabolismus stark zwischen den untersuchten Bedingungen zu unterscheiden. Während in T-Zellen, welche in der Gegenwart von 20 μ M Arginin stimuliert worden waren, nach Citrullinexposition ein Anstieg sowohl des intrazellulären Argininosuccinats als auch des Arginins zu beobachten war, blieben die intrazellulären Konzentrationen dieser Aminosäuren in T-Zellen, welche unter vollständigem Argininmangel stimuliert wurden, unverändert auf sehr geringem Level (Abbildung 24). Dieses Ergebnis stimmte perfekt mit der beobachteten ASS-Expression in humanen stimulierten T-Zellen unter diesen Bedingungen überein, in welchen in der Gegenwart von 20 μ M Arginin die maximale ASS-Expression detektiert wurde, wohingegen unter komplettem Argininmangel das Enzym nur schwach exprimiert war (Daten Arbeitsgruppe [REDACTED]).

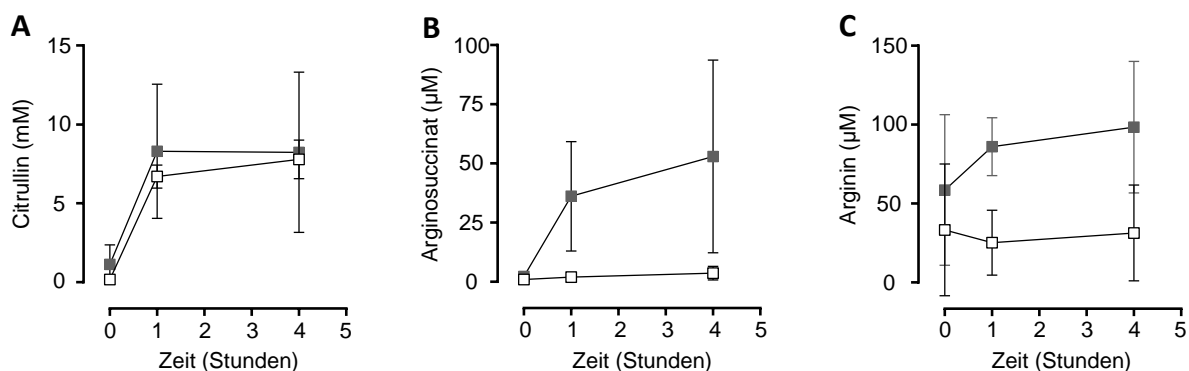


Abbildung 24: In der Gegenwart von 20 μ M Arginin wird Citrullin in humanen stimulierten T-Zellen intrazellulär zu Arginin metabolisiert, nicht aber unter komplettem Argininmangel.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 96 Stunden in 20 μ M Arginin-haltigem Medium (graue Kästchen) oder ohne Arginin (weiße Kästchen) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in der Gegenwart von 1 mM Citrullin für eine oder vier Stunden inkubiert. Von Kontrollzellen (Zeitpunkt 0 Stunden) wurde das Citrullin unmittelbar nach Zugabe entfernt. Die Zellen wurden mit 70 % Ethanol aufgeschlossen und die intrazelluläre Konzentration von A) Citrullin, B) Argininosuccinat und C) Arginin durch HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n=3$ von 3 unabhängigen Spendern). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test.

4.2.3 Ein System L-Transporter ist für den Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich

Bis heute sind 11 Aminosäuretransport-Systeme bekannt, die neutrale Aminosäuren als Substrat akzeptieren, System A, asc, ASC, B⁰, b^{0,+}, B^{0,+}, L, N, PAT, T und y^{+L}. Um das Transportsystem, welches für die Aufnahme von Citrullin in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich ist, zu identifizieren wurde untersucht, ob die für die jeweiligen Transportsysteme beschriebenen Substrate den Citrullintransport in stimulierten T-Zellen kompetitiv hemmen. Die Inhibition der Citrullinaufnahme unter diesen Bedingungen würde bedeuten, dass die Transporter des Transportsystems auch Citrullin als Substrat akzeptieren und demnach als Citrullintransporter in T-Zellen in Frage kommen. Darüber hinaus sollte auch die Natriumabhängigkeit des Citrullintransports in stimulierten T-Zellen als weiterer Hinweis auf den verantwortlichen Citrullintransporter festgestellt werden. Für diese Experimente wurden T-Lymphozyten über 24 Stunden in der Anwesenheit von 20 µM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert, da unter diesen Bedingungen die bestmögliche Rekonstitution der T-Zellproliferation unter Mangelbedingungen gezeigt worden war (Daten Arbeitsgruppe ████████). Anschließend wurde die Aufnahme von [¹⁴C]Citrullin jeweils in der An- oder Abwesenheit von Natrium oder jeweils 1 mM der Aminosäuren Arginin, Prolin, Leucin, 2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptan-2-carboxylat (BCH), Histidin oder Glycin über 30 Sekunden gemessen. In Tabelle 38 sind die Natriumabhängigkeit und die Substratspektren der neutralen Aminosäuretransporter-Systeme, sowie die Ergebnisse der Transportstudien mit stimulierten T-Lymphozyten zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 38: Natriumabhängigkeit und Substratprofil der Transportsysteme für neutrale Aminosäuren und die Resultate der Citrullintransport-Analysen in stimulierten T-Lymphozyten.

Wenn eine Aminosäure von dem jeweiligen Transportsystem als Substrat erkannt wird, beziehungsweise der Transport neutraler Aminosäuren in Abhängigkeit von Natrium stattfindet, ist dies durch ein Plus (+) gekennzeichnet, falls nicht durch ein Minus (-) oder dies nicht auf alle Transporter des Transportsystems zutrifft durch ein Plus/Minus (\pm). Ein in eckigen Klammern aufgeführtes Zeichen signalisiert, dass das betroffene Substrat nur ein schlechtes Substrat für das jeweilige Transportsystem ist.

System	Na ⁺	Arginin	Prolin	Leucin	BCH	Histidin	Glycin
A	+		\pm	-		[+]	[\pm]
ASC	+		-	[+]		-	[+]
asc	-	-	-	[+]	[+]	[+]	+
B ⁰	+	-	\pm	+	+	[\pm]	[\pm]
B ^{0,+}	+	+	+	+	+	+	+
b ^{0,+}	-	+	-	+	-	+	-
L	-	-	-	+	+	\pm	\pm
N	+		-	-		-	[+]
P	-	-	+	-		-	+
T	-	-	-	-	-	-	-
y ⁺ L	+	+	-	+	-	[+]	-
T-Zellen	-	-	-	+	+	+	[+]

Der Citrullintransport in humanen stimulierten T-Lymphozyten war unabhängig von der Anwesenheit von Natrium. Zudem wurde dieser stark durch Leucin, BCH und Histidin gehemmt. Hingegen schienen Arginin, Prolin und Glycin kein oder nur ein schlechtes Substrat für den verantwortlichen Citrullintransporter zu sein (Abbildung 25).

Aufgrund der Natrium-unabhängigen Aufnahme von Citrullin in stimulierten T-Zellen konnten die Transportsysteme A, ASC, B⁰, B^{0,+}, N und y⁺L, welche neutrale Aminosäuren ausschließlich natriumabhängig transportieren, ausgeschlossen werden (Abbildung 25 A) (Arriza, 1993; Baird, 2004; A. Bröer, 2000, 2006; Chairoungdua, 1999; Pfeiffer, 1999; Utsunomiya-Tate, 1996; Varoqui, 2000). Darüber hinaus sind Leucin und Histidin, welche in stimulierten T-Zellen den Citrullintransport stark hemmen, für die Systeme A und N kein oder nur ein schlechtes Substrat, was diese beiden Systeme zusätzlich für den Citrullintransport in diesen Zellen disqualifiziert (Baird, 2004; Varoqui, 2000). Auch die natriumabhängigen Systeme ASC, B⁰ und y⁺L konnten zusätzlich, da sie Histidin nicht oder nur schlecht als Substrat akzeptieren, ausgeschlossen werden (Arriza, 1993; A. Bröer, 2000, 2006; Pfeiffer, 1999; Utsunomiya-Tate, 1996). Die y⁺L-Transporter sowie die Transporter der Systeme B^{0,+} und b^{0,+} transportieren mit hoher Affinität Arginin, welches allerdings nicht auf den Citrullintransporter in T-Zellen zutrifft (A. Bröer, 2000; Chairoungdua, 1999; Pfeiffer, 1999; Sloan, 1999). Das für das System P namensgebende Prolin wurde durch den T-Zell-Citrullintransporter nicht akzeptiert, womit dieses System auch ausgeschlossen werden konnte

(Boll, 2002). Die Hauptsubstrate für das System T sind Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Dieses System transportiert allerdings nicht die für den Citrullintransporter in T-Zellen charakteristischen Aminosäuren Leucin, Histidin und BCH (D. K. Kim, 2001). Auch für das System asc sind dies nur sehr schlechte Substrate, darüber hinaus transportieren die asc-Transporter Glycin mit hoher Affinität, welches für den gesuchten Citrullintransporter nicht der Fall zu sein schien (Fukasawa, 2000). Jedoch ist der Natrium-unabhängige Transport von Leucin und BCH charakteristisch für die Transporter des System L. Woraus geschlossen werden konnte, dass der Citrullintransport in humanen T-Zellen durch einen dieser Transporter vermittelt zu werden scheint (Abbildung 25) (Babu, 2003; Bodoy, 2005; A. Bröer, 2006; Pineda, 1999).

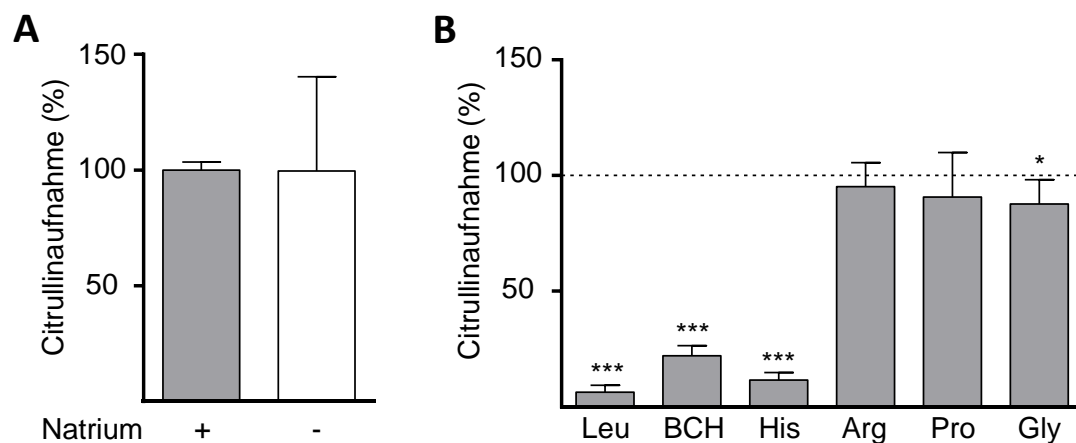


Abbildung 25: Der Citrullintransport in humanen stimulierten T-Zellen ist mit den Transporteigenschaften des System L vereinbar.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 24 Stunden in 20 μ M Arginin-haltigem Medium mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurde die Aufnahme von 20 μ M [14 C]Citrullin (1 μ Ci/ml) in der An- oder Abwesenheit von A) Natrium oder B) jeweils 1 mM Leucin (Leu), 2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptan-2-carboxylat (BCH), Histidin (His), Arginin (Arg), Prolin (Pro) oder Glycin (Gly) über 30 Sekunden gemessen. Innerhalb eines Experiments wurden für jede Bedingung Triplikate analysiert (n=9-12 von 3-4 unabhängigen Spendern). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der jeweiligen Kontrollzellen, in welchen die Citrullin-Aufnahme in der Anwesenheit von Natrium und ohne kompetitive Aminosäure determiniert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test, jeweils im Vergleich zu den Kontrollzellen (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$).

4.2.4 Der System L-Transporter LAT1 ist maßgeblich für den Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich

System L-Transporter transportieren Natrium-unabhängig ein breites Spektrum von neutralen Aminosäuren in einer Vielzahl von menschlichen Zelltypen. Die Modellsubstrate für dieses System sind Leucin und BCH. Bislang sind 4 verschiedene System L-Transporter bekannt: LAT1, LAT2, LAT3 und LAT4 (Babu, 2003; Bodoy, 2005; Pineda, 1999). Diese unterscheiden sich in ihren Substrataffinitäten, aber auch in ihren Substratspektren. Während LAT1 Leucin

mit einer hohen Affinität ($K_M = 32 \mu\text{M}$) transportiert, ist die K_M dieser Aminosäure für den LAT2-Transporter mit $220 \mu\text{M}$ beschrieben. Darüber hinaus transportiert LAT2, anders als die weiteren Mitglieder der System L-Transporter auch kleine neutrale Aminosäuren wie Glycin und Alanin (Pineda, 1999).

Im Folgenden sollte der System L-Transporter, welcher für den Citrullintransport in humanen T-Lymphozyten verantwortlich ist, identifiziert werden. Dies erfolgte ebenfalls, wie bereits in Kapitel 4.2.3 beschrieben, durch den Vergleich der Substratspektren der System L-Transporter mit den Resultaten der Citrullin-Transportstudien mit stimulierten T-Lymphozyten. In Tabelle 39 ist dies zusammengefasst. Wie bereits in Kapitel 4.2.3 beschrieben, wurde der Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten durch Leucin, BCH und Histidin annähernd vollständig inhibiert, wohingegen die Transporthemmung durch Glycin nur marginal war (Abbildung 25). Die Aminosäuren Leucin und BCH werden von jedem der vier System L-Transporter als Substrat akzeptiert. Hingegen wird Histidin nur durch die Transporter LAT1 und LAT2 aufgenommen, womit LAT3 und LAT4 als potentielle Citrullintransporter in humanen T-Lymphozyten ausgeschlossen werden konnten (Babu, 2003; Bodoy, 2005). Weiterhin wird Glycin nur von dem Transporter LAT2, nicht aber von den anderen System L-Transportern als Substrat akzeptiert (Pineda, 1999). In Citrullin-Transportversuchen mit stimulierten T-Zellen konnte eine zwar signifikante, aber dennoch geringe Hemmung der Citrullinaufnahme durch Glycin beobachtet werden (Abbildung 25 B). Dies ließ lediglich eine geringe Beteiligung des LAT2 am Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten vermuten. Hauptsächlich schien hingegen der Transporter LAT1 dafür verantwortlich zu sein.

Tabelle 39: Substratprofil der System L-Transporter und die Resultate der Citrullin-Transportstudien mit stimulierten T-Lymphozyten.

Wenn eine Aminosäure von einem der Transporter als Substrat erkannt wird, ist dies durch ein Plus (+) gekennzeichnet, falls nicht durch ein Minus (-).

Transporter	Leucin	BCH	Histidin	Glycin
LAT1	+	+	+	-
LAT2	+	+	+	+
LAT3	+	+	-	-
LAT4	+	+	-	-
T-Zellen	+	+	+	gering

4.2.5 Citrullin wird durch die Transporter LAT1 und LAT2 transportiert

Aufgrund der Resultate der Citrullin-Transportanalysen war die Rolle des System L-Transporters LAT1 als hauptverantwortlicher Citrullintransporter in humanen stimulierten T-

Lymphozyten sehr wahrscheinlich. Allerdings wurde auch eine geringe Beteiligung des LAT2-Transporters vermutet. Im Folgenden sollten durch Transportstudien mit *Xenopus laevis* Oozyten verifiziert werden, ob die Transporter LAT1 und LAT2 Citrullin grundsätzlich als Substrat akzeptieren.

Jeder der System L Transporter ist mit dem Glykoprotein 4F2hc assoziiert, welches für die Translokation der Transporter in die Plasmamembran und somit für deren effiziente Funktion verantwortlich ist (Wagner, 2001). Für die Transportstudien wurde deswegen neben einer cRNA, welche für den LAT1 oder LAT2 kodiert, auch 4F2hc-kodierende cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Zwei Tage nach Injektion wurde die Aufnahme von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]Citrullin über 15 Minuten gemessen. Als Kontrolle wurde auch die Citrullinaufnahme in mit Wasser-injizierten Oozyten analysiert.

Diese Analysen zeigten sowohl in LAT1/4F2hc- als auch in LAT2/4F2hc-Oozyten eine signifikant höhere Aufnahme von [^{14}C]Citrullin im Vergleich zu Wasser-injizierten Oozyten. Somit akzeptieren beide Transporter Citrullin als Substrat. Es fiel jedoch auf, dass quantitativ mehr Citrullin in LAT2/4F2hc-Oozyten ($51,5 \pm 21,9$ pmol/Oozyte) als in LAT1/4F2hc-Oozyten ($11,0 \pm 3,9$ pmol/Oozyte) importiert wurde (Abbildung 26), demzufolge Citrullin im Vergleich ein besseres Substrat für den LAT2 als für den LAT1 zu sein scheint.

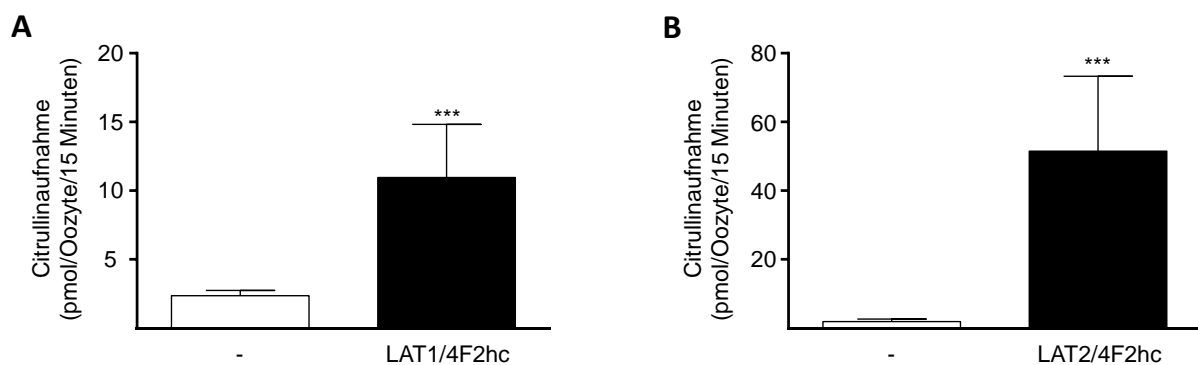


Abbildung 26: Citrullin ist ein Substrat für die System L-Transporter LAT1 und LAT2.

Xenopus laevis Oozyten wurden mit cRNA, kodierend für A) LAT1 und 4F2hc (LAT1/4F2hc, n=11) oder B) LAT2 und 4F2hc (LAT2/4F2hc, n=17) injiziert. Nach zwei Tagen Expressionszeit erfolgte die Determination der Aufnahme von [^{14}C]Citrullin (1 $\mu\text{Ci/ml}$) über 15 Minuten. Als Kontrolle wurde die Citrullinaufnahme in nur mit Wasser-injizierten Oozyten gemessen (-). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test (***: $p \leq 0,001$).

Des Weiteren wurde der Transport von Citrullin durch LAT1 und LAT2 im Vergleich zu dem Modellsubstrat Leucin untersucht. Dafür wurde die Aufnahme von [^3H]Leucin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) in LAT1/4F2hc- oder LAT2/4F2hc-injizierte Oozyten in der An- oder Abwesenheit von 2 mM unmarkiertem Leucin oder Citrullin über 15 Minuten gemessen.

In LAT1/4F2hc-Oozyten wurde die Aufnahme von [^3H]Leucin durch unmarkiertes Leucin um $93,2 \pm 4,7$ % gesenkt. Durch Citrullin konnte jedoch nur eine Hemmung um $54,9 \pm 25,6$ % festgestellt werden (Abbildung 27 A). In LAT2/4F2hc-Oozyten wurde der Transport von [^3H]Leucin durch unmarkiertes Leucin um $75,3 \pm 13,9$ % und vergleichbar stark durch Citrullin um $69,0 \pm 17,6$ % gesenkt (Abbildung 27 B). Demzufolge scheint Citrullin für den LAT2 ein mit Leucin qualitativ vergleichbares Substrat zu sein, während der LAT1 Leucin, verglichen mit Citrullin, mit einer höheren Effizienz transportierte.

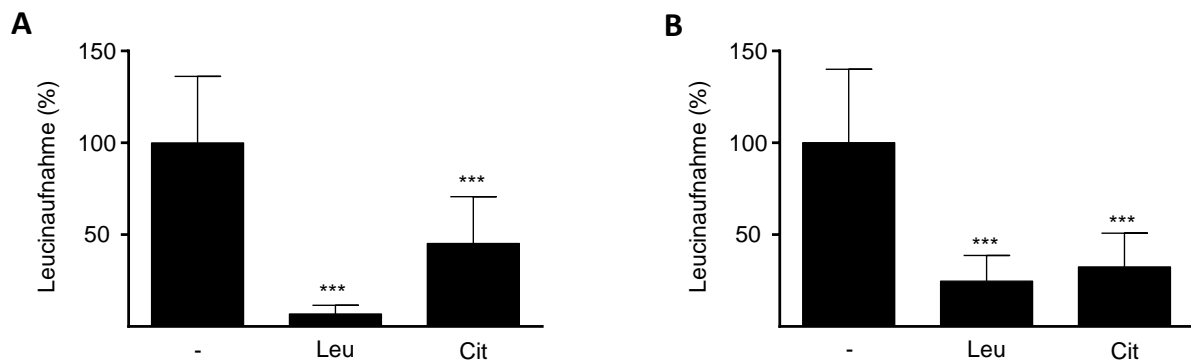


Abbildung 27: LAT1- und LAT2-vermittelter [^3H]Leucin-Transport wird durch Citrullin kompetitiv inhibiert.

Xenopus laevis Oozyten wurden mit cRNA, kodierend für A) LAT1 und 4F2hc (n=15-20) oder B) LAT2 und 4F2hc (n=19-20) injiziert. Nach zwei Tagen Expressionszeit erfolgte die Determination der Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ [^3H]Leucin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) in Anwesenheit von 2 mM unmarkiertem Leucin (Leu), Citrullin (Cit) oder ohne kompetitive Aminosäure (-) über 15 Minuten. Von allen Messwerten wurde jeweils die basale Aufnahme in Wasser-injizierte Oozyten abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Aufnahme ohne kompetitive Aminosäure (LAT1 (Mittelwert): $18,3 \pm 7,0$ pmol/Oozyte; LAT2 (Mittelwert): $8,6 \pm 2,9$ pmol/Oozyte). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde jeweils die Aufnahme in Gegenwart von Leucin oder Citrullin mit der ohne kompetitive Aminosäure verglichen (***: $p \leq 0,001$).

4.2.6 Die Expression von LAT1 und 4F2hc ist selbst unter Argininmangel in stimulierten T-Lymphozyten induziert

Aufgrund der Resultate der Citrullintransport-Studien mit humanen stimulierten T-Lymphozyten wurde vermutet, dass der System L Transporter LAT1 hauptsächlich für den Citrullintransport in diesen Zellen verantwortlich ist. Die geringe, aber dennoch signifikante Hemmung der Citrullinaufnahme durch Glycin, welches von LAT2 als Substrat akzeptiert wird, ließ jedoch auch auf eine Beteiligung dieses Transporters vermuten (Abbildung 25). Dem zugrunde liegend sollte die Expression der Transporter LAT1 und LAT2 sowie des assoziierten Glykoproteins 4F2hc in T-Lymphozyten untersucht werden. Da bereits die Citrullinaufnahme in diesen Zellen argininabhängig variierte (Abbildung 23 B), sollte auch die Transporterexpression in Abhängigkeit von Arginin untersucht werden. Dafür wurden T-Lymphozyten über 6, 24 und 48 Stunden in der Gegenwart von 1000 oder $20 \mu\text{M}$ Arginin, sowie unter komplettem Argininmangel mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln

stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Transporter LAT1 und LAT2, sowie des 4F2hc mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Diese Analysen zeigten in unstimulierten T-Lymphozyten lediglich eine marginale LAT1-Expression. Im Kontrast dazu war dieser Transporter bereits nach 6-stündiger Stimulation, unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration, stark exprimiert. Allerdings sank der LAT1-mRNA-Level in Gegenwart von 1000 μM Arginin sowie unter komplettem Argininmangel nach Verlängerung der Stimulationszeit auf 24 und 48 Stunden, blieb aber noch deutlich über dem Niveau, welches in unstimulierten T-Lymphozyten detektiert wurde. In Zellen, welche in der Anwesenheit von 20 μM Arginin aktiviert wurden, nahm die LAT1-mRNA-Expression mit Verlängerung der Stimulationszeit auf 24 und 48 Stunden nicht ab (Abbildung 28 A). Der LAT2 war im Gegensatz zu LAT1 bereits in unstimulierten T-Lymphozyten auf mRNA-Ebene exprimiert. Eine Steigerung der Expression unter Stimulation konnte hier nicht beobachtet werden. Vergleichbar mit dem LAT1 sank auch der LAT2-mRNA-Level in T-Zellen, welche in der Gegenwart von 1000 μM Arginin oder unter Argininmangel über 48 Stunden stimuliert wurden (Abbildung 28 B).

Um die Einzelexperimente, trotz spenderabhängiger Schwankungen der Absolutwerte miteinander vergleichen zu können, wurden die LAT1- und LAT2-mRNA-Expression relativ zu β_2 -Mikroglobulin (B2M) jeweils auf die Expression nach 48-stündiger Stimulation in der Gegenwart von 1000 μM Arginin bezogen. Betrachtete man allerdings die Absolutwerte der LAT1- und LAT2-mRNA-Expression relativ zu B2M, fiel auf, dass LAT2 insgesamt nur marginal im Vergleich zu LAT1 exprimiert war. Um dies zu verdeutlichen ist in Abbildung 28 C die LAT1- und LAT2-mRNA-Expression relativ zu B2M in unstimulierten sowie in Anwesenheit von 1 mM Arginin über 6, 24 und 48 Stunden stimulierten T-Lymphozyten eines repräsentativen Spenders dargestellt (LAT1/B2M-mRNA-Expression: 0,126; LAT2/B2M-mRNA-Expression: 0,006, jeweils nach 6-stündiger Stimulation in der Gegenwart von 1 mM Arginin).

Die mRNA des 4F2hc war in unstimulierten T-Lymphozyten, vergleichbar mit der LAT1-mRNA, nur sehr gering exprimiert. Der mRNA-Level stieg jedoch unter Aktivierung signifikant an, fiel aber durch die Verlängerung der Stimulation auf 48 Stunden in der Gegenwart von 1000 μM Arginin stark ab. Im Gegensatz zu der mRNA-Expression von LAT1 und LAT2 blieb die 4F2hc-Expression unter Argininmangel konstant auf einem hohen Level. Auch nach Stimulation in der Gegenwart von 20 μM Arginin war der 4F2hc konstant stark exprimiert (Abbildung 28 D).

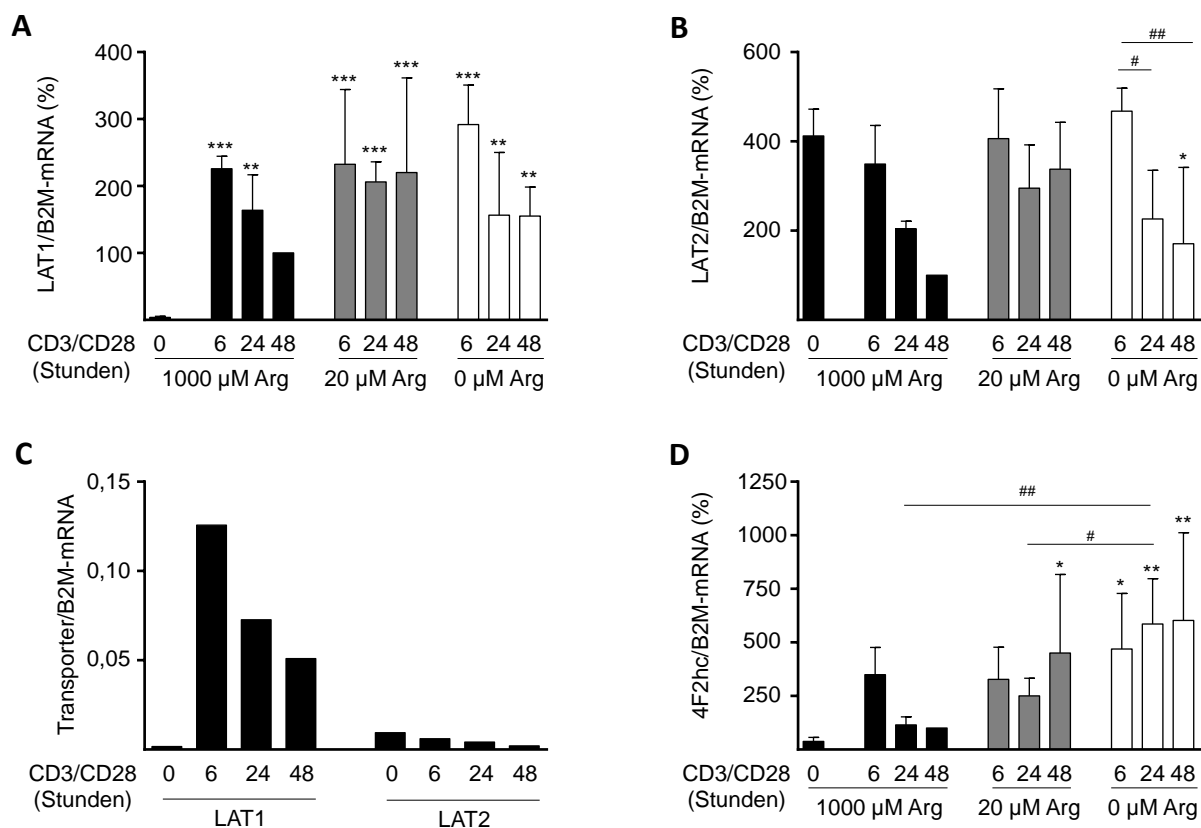


Abbildung 28: Die LAT1- und 4F2hc-mRNA-Expression ist in humanen T-Lymphozyten bereits nach 6-stündiger Stimulation stark induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden mit 1000 µM, 20 µM oder ohne Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen (CD3/CD28). Anschließend wurde die mRNA-Expression von LAT1 (A, n=5 unabhängige Spender), LAT2 (B, n=4 unabhängige Spender) und 4F2hc (D, n=4 unabhängige Spender) mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt sind die LAT1-, LAT2- und 4F2hc-mRNA-Expression jeweils in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M) in Prozent der über 48 Stunden in 1 mM Arginin stimulierten T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Two-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde die Expression der stimulierten Zellen in den verschiedenen Arginin-Gruppen (##: $p \leq 0,01$; #: $p \leq 0,05$), sowie die Expression in stimulierten und unstimulierten T-Zellen verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$). C) Vergleich der LAT1- und LAT2- relativ zu β_2 -Mikroglobulin (B2M)-Expression eines repräsentativen Experiments in über 6, 24 und 48 Stunden in der Gegenwart von 1000 µM Arginin stimulierten oder unstimuliert belassenen T-Zellen.

Vergleichbar mit der mRNA-Expression, war auch auf Proteinebene weder der Transporter LAT1 noch das assoziierte Glykoprotein 4F2hc detektierbar. Allerdings konnte auch hier die starke Induktion der Expression bereits nach 6-stündiger Stimulation beobachtet werden, welche mit Verlängerung der Stimulationszeit, unabhängig von der angebotenen Arginkonzentration kontinuierlich anstieg. Jedoch war die Expression beider Proteine unter kompletter Arginindepletion signifikant reduziert im Vergleich zu T-Zellen, welche in der Gegenwart von 1000 µM oder 20 µM Arginin stimuliert wurden (Abbildung 29). Dies spiegelte die Ergebnisse des Citrullintransports in T-Zellen unter diesen Bedingungen wider (Abbildung 23 B) und verstärkte weiterhin die Hypothese, dass der LAT1 hauptsächlich für den Transport

von Citrullin in humanen T-Zellen verantwortlich zu sein scheint. Die Expression von LAT2 konnte aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers nicht untersucht werden.

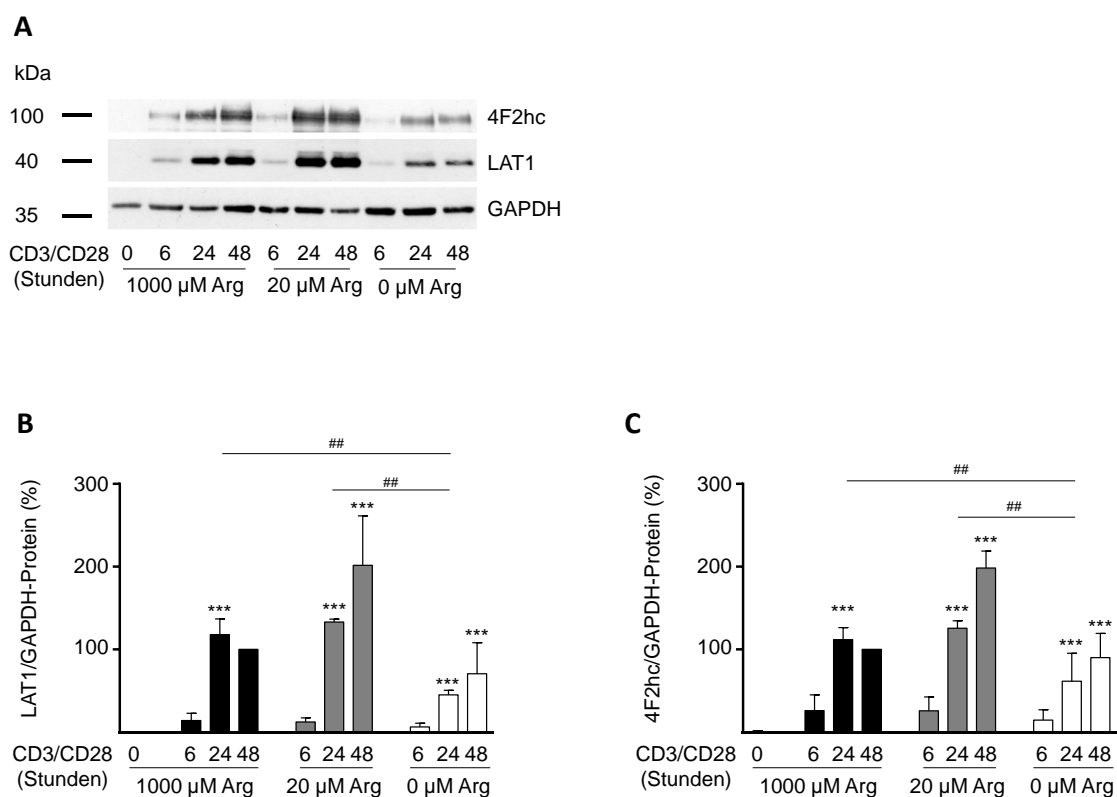


Abbildung 29: In stimulierten T-Lymphozyten ist die LAT1- und 4F2hc-Protein-Expression selbst unter absolutem Argininmangel induziert.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und über 6, 24 und 48 Stunden mit 1000 µM, 20 µM oder ohne Arginin (Arg) mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert oder unstimuliert belassen (CD3/CD28). Anschließend wurde die Expression von LAT1, 4F2hc und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Gezeigt sind A) ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und die quantitative Auswertung B) der LAT1-Protein-Expression und C) der 4F2hc-Protein-Expression aller Blots. Gezeigt ist die Transporter- relativ zur GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der über 48 Stunden in 1000 µM Arginin stimulierten T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Two-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde die Expression der stimulierten Zellen in den verschiedenen Arginin-Gruppen ($\#\#$: $p \leq 0,01$), sowie die Expression in stimulierten und unstimulierten T-Zellen verglichen ($\#\#\#$: $p \leq 0,001$).

4.2.7 Die siRNA-vermittelte Reduktion der LAT1-Expression in stimulierten T-Zellen senkt den Citrullintransport auf das Level von unstimulierten Zellen

Die bislang beschriebenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Transporter LAT1 maßgeblich für den Citrullintransport in humanen stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich zu sein scheint. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde der LAT1-Transporter siRNA-vermittelt in diesen Zellen gesenkt und anschließend die Aufnahme von [14 C]Citrullin analysiert. Dafür wurden T-Lymphozyten mit siRNA gegen LAT1 oder non-target RNA transfiziert sowie in Abwesenheit einer RNA elektroporiert. Anschließend wurden die T-Zellen

mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln über 24 Stunden stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte, nicht-transfizierte Zellen.

Zunächst wurde durch die Detektion des LAT1 mittels Western Blot-Analysen die Reduktion der LAT-1-Protein-Expression überprüft: In T-Zellen, welche mit siRNA gegen LAT1 transfiziert wurden, war die LAT1-Protein-Expression um $79,0 \pm 7,3$ % im Vergleich zu non-target-RNA-transfizierten Zellen reduziert. Jedoch wurde auch, verglichen mit nicht-elektroporierten, stimulierten Zellen, eine ausgeprägte Senkung der LAT1-Protein-Expression sowohl in non-target-RNA-transfizierten (um $57,63 \pm 8,5$ %) als auch in Abwesenheit von RNA elektroporierten (um $59,84 \pm 13,6$ %) Zellen beobachtet. Demnach schien die Elektroporation allein schon einen starken Effekt auf die LAT1-Expression in T-Zellen zu haben. Nichtsdestotrotz war durch die Transfektion mit LAT1-siRNA eine deutliche Reduktion der LAT-1-Expression detektierbar, die sich im Unterschied zu in non-target-RNA-transfizierten und ohne RNA elektroporierten Zellen nicht mehr signifikant von der LAT1-Expression in unstimulierten Zellen unterschied (Abbildung 30 A und B).

Die Aufnahme von [^{14}C]Citrullin war in Zellen, welche mit siRNA gegen LAT1 transfiziert wurden, verglichen mit non-target-RNA-transfizierten Zellen um $43,8 \pm 9,4$ % reduziert (Abbildung 30 C). Damit war diese nicht mehr signifikant verschieden zu der Citrullinaufnahme in unstimulierten Zellen. Allerdings war auch in diesen Analysen ein ausgeprägter Effekt der Elektroporation in non-target-RNA-transfizierten und in Abwesenheit von RNA elektroporierten Zellen zu beobachten, wobei sich die determinierte Citrullinaufnahme in diesen Zellen noch signifikant, im Gegensatz zu den LAT1-siRNA-transfizierten Zellen, von unstimulierten Zellen unterschied (Abbildung 30 C).

Zusammenfassend wurde durch diese Versuche abschließend bestätigt, dass der System L-Transporter LAT1 maßgeblich für den Citrullintransport in stimulierten T-Lymphozyten verantwortlich ist.

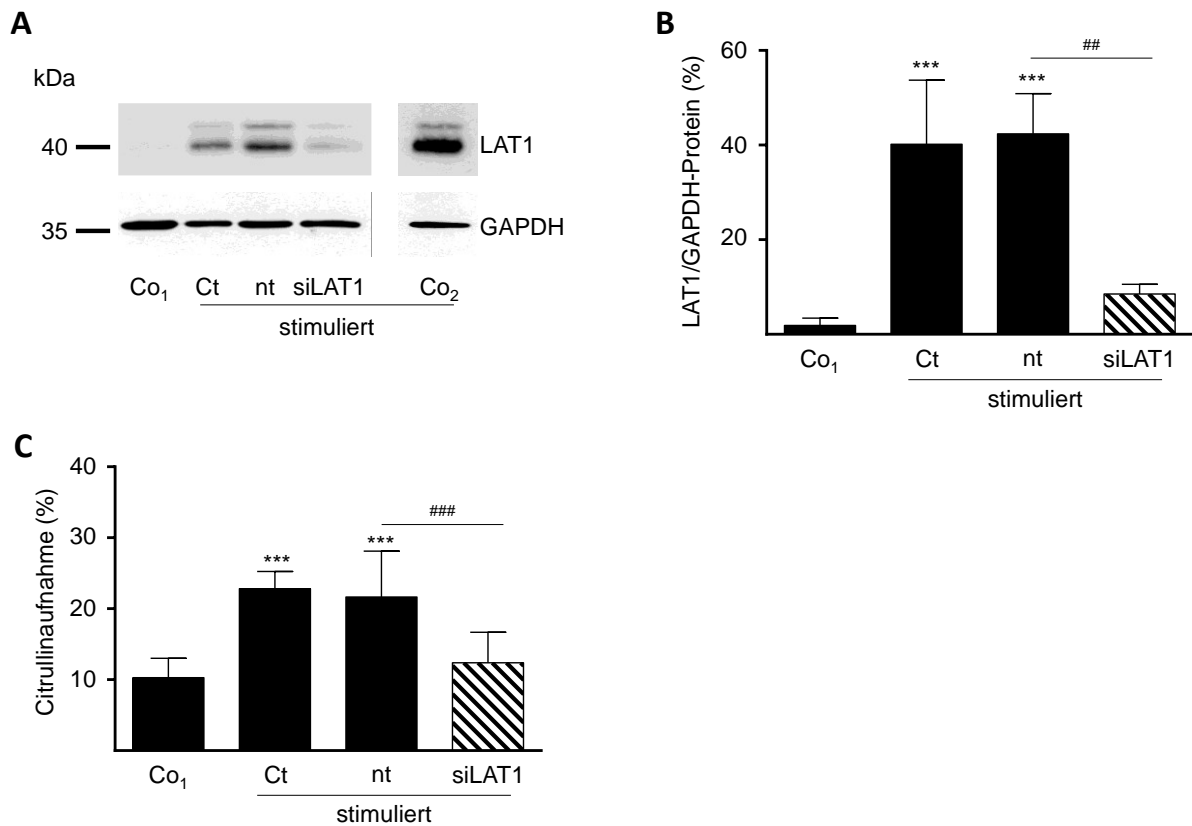


Abbildung 30: Die siRNA-vermittelte Senkung der LAT1-Expression resultiert in der Reduktion der Citrullin-Aufnahme in stimulierten T-Zellen.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit 2 µg non-target RNA (nt) oder siRNA gegen LAT1 (siLAT1) transfiziert sowie in Abwesenheit einer siRNA elektroporiert (Ct). Anschließend wurden die T-Zellen über 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Unstimulierte (Co₁) und stimulierte (Co₂), jeweils nicht-transfizierte Zellen dienten als Kontrollen. A, B) Anschließend wurde die Protein-Expression von LAT1 und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Gezeigt sind A) ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und B) die quantitative Auswertung aller Blots. Dargestellt ist die LAT1- relativ zu GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der stimulierten, nicht-elektroporierten T-Zellen (Bedingung nicht gezeigt). C) Unter denselben Bedingungen wurde die Aufnahme von 20 µM [¹⁴C]Citrullin (1 µCi/ml) über 30 Sekunden gemessen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der stimulierten, nicht-elektroporierten T-Zellen (Bedingung nicht gezeigt, Mittelwert: 17,3 ± 10,6 pmol/ 10⁶ Zellen). Innerhalb eines Experiments wurden für alle Bedingungen Triplikate analysiert (n=8-12 von 4 unabhängigen Spendern). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden jeweils die Zellen, welche mit siRNA gegen LAT1 elektroporiert wurden mit den non-target-RNA-transfizierten Zellen (##: p ≤ 0,01; ###: p ≤ 0,001) sowie die unstimulierten, nicht-elektroporierten Zellen mit den übrigen Bedingungen verglichen (***: p ≤ 0,001).

4.3 Charakterisierung der Rolle von Arginintransportern in chronischen lymphatischen Leukämiezellen

Tumorzellen sind hoch-proliferativ. Daraus resultierend haben sie einen hohen Bedarf an Nährstoffen und damit auch an Aminosäuren. Die Behandlung von Tumoren durch Aminosäuremangel ist demnach ein vielversprechender Ansatz. Die systemische Arginindepletion durch die pegylierte Arginindeiminase wird derzeit in klinischen Phase I und II Studien für die Behandlung von Melanomen, Leberzellkarzinomen, sowie akuter myeloischer Leukämie getestet (Glazer, 2010; Miraki-Moud, 2015; Ott, 2013). Die Versorgung

von Zellen mit Arginin ist allerdings nicht ausschließlich von der lokalen Verfügbarkeit dieser Aminosäure abhängig, sondern ebenfalls von der Expression Arginin-transportierender Membranproteine. Ein alternativer Ansatz für die Therapie von Tumorerkrankungen könnte demnach auch eine intrazelluläre Arginindepletion durch die gezielte Ausschaltung Arginin-importierender Proteine sein.

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die am häufigsten vorkommende Leukämieform bei Erwachsenen in Mitteleuropa. Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob CLL-Zellen auf die Zufuhr von extrazellulärem Arginin angewiesen sind und somit Argininmangel generell für die Behandlung der CLL erfolgreich sein könnte. Zudem sollte der Transporter, welcher für die Argininaufnahme in diesen Zellen verantwortlich ist, als möglicher Angriffspunkt für die pharmakologische Tumortherapie, identifiziert werden.

4.3.1 In primären humanen CLL-Zellen sind die Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 exprimiert

Um zu klären, welcher Transporter für den Argininimport in humanen CLL-Zellen verantwortlich ist, wurde zunächst die Expression aller bekannten Arginin-transportierenden Membranproteine (hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, y⁺LAT2, b^{0,+}AT und ATB^{0,+}) in diesen Zellen untersucht.

Die Isolation der CLL-Zellen erfolgte aus peripherem Blut von CLL-Patienten. In der folgenden Tabelle sind das Alter, die Monate seit Diagnose, die Anzahl der Therapielinien, die Leukozytenzahl im peripheren Blut sowie zytogenetische Auffälligkeiten aller CLL-Zellspender aufgeführt. Welche Zellen für die Analysen eingesetzt wurden, ist jeweils der Abbildungsunterschrift zu entnehmen.

Tabelle 40: Alter, Monate seit Diagnose, Anzahl der Therapielinien, Leukozytenzahl im peripheren Blut und zytogenetische Auffälligkeiten der CLL-Zellspender.

Patient	Alter (Jahren)	Monate seit Diagnose	Therapielinien	Leukozyten pro μ l Blut	Zytogenetik
1	86	52	0	62.000	nicht untersucht
2	62	114	2	65.000	komplex aberrant
3	71	60	1	40.000	del 17p, Trisomie 12
4	69	182	8	80.000	nicht untersucht
5	67	0	0	40.000	del 13q, del 6q, del 17p
6	75	55	1	200.000	del 13q
7	75	42	0	150.000	nicht untersucht
8	70	0	0	23.000	nicht untersucht
9	58	0	0	9.000	del 13q, del 11q, del 6q, +8q
10	76	180	8	70.000	nicht untersucht
11	70	0	0	50.000	normal
12	70	106	1	100.000	del 11q, del 13q
13	66	98	0	160.000	del 13q
14	66	0	0	60.000	del 17p
15	69	138	2	100.000	del 13q
16	77	190	0	92.000	nicht untersucht
17	80	54	0	74.000	nicht untersucht
18	83	49	0	140.000	nicht untersucht
19	59	0	0	390.000	del 6q
20	61	0	0	200.000	del 6q
21	44	0	0	106.000	del 11q
22	66	67	0	105.000	unverändert
23	70	111	1	120.000	del 11q, del 13q
24	86	0	0	400.000	nicht untersucht
25	56	0	0	29.000	Trisomie 12
26	48	144	1	181.000	del 6q, del 11q, del 13q

Unmittelbar nach der Isolation der CLL-Zellen wurden die RNA und Proteine extrahiert und die Arginintransporter-Expression mittels quantitativer real time-PCR- und Western Blot-Analysen festgestellt.

Auf mRNA-Ebene war der Transporter y^+ LAT1 in der Mehrzahl der analysierten Proben stark exprimiert. Demgegenüber konnte die Expression von y^+ LAT2 auf moderatem Level detektiert werden. Der Transporter hCAT-1 war ebenfalls in manchen Proben moderat, aber meist schwach exprimiert. Hingegen schienen die Transporter hCAT-2A, hCAT-2B und hCAT-3, sowie der Natrium-abhängige Transporter ATB^{0,+} nicht und der b^{0,+}AT nur in wenigen Proben marginal exprimiert zu sein (Abbildung 31).

Demnach konnte zusammenfassend in primären CLL-Zellen die mRNA-Expression der Transporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 beobachtet werden. Allerdings war der

Expressionslevel dieser Transporter in den analysierten Proben nicht homogen. Deswegen wurde die Expression der einzelnen Transporter im Folgenden detaillierter betrachtet.

Der Transporter hCAT-1 war in den Patienten 6 und 10 mit 880 und 1592 Kopien pro ng Gesamt-RNA vergleichsweise hoch exprimiert, wohingegen die Expression dieses Transporters in den Patienten 1, 12, 15 und 18 mit 200 bis 250 Kopien pro ng Gesamt-RNA vergleichsweise schwach war. Der hCAT-1-Expressionslevel in den weiteren Proben war moderat und lag durchschnittlich bei 350 bis 600 Kopien pro ng Gesamt-RNA. Auch der heterodimere Transporter y^+ LAT1 zeigte kein homogenes Expressionsmuster. Besonders stark war dieser im Patienten 6 exprimiert (9024 Kopien pro ng Gesamt-RNA), aber auch in den Patienten 2, 3, 14 und 15 konnte ein hohes mRNA-Level mit 4550 bis 6480 Kopien pro ng Gesamt-RNA nachgewiesen werden. Hingegen war dieser Transporter in den Patienten 1, 8, 12, 16, 17 und 18 mit 596 bis 1354 Kopien pro ng Gesamt-RNA schwächer exprimiert. Dabei lag die Kopienzahl der y^+ LAT1-schwach-exprimierenden Zellen allerdings noch immer auf dem Level der hCAT-1-stark-exprimierenden Proben.

Die mRNA-Expression des Transporters y^+ LAT2 war im Vergleich zu y^+ LAT1 insgesamt auf einem geringeren Level. Die Kopienzahlen lagen hier in den schwächer-exprimierenden Patienten 1, 8, 12, 16, 17 und 18 zwischen 353 und 654 Kopien pro ng Gesamt-RNA. In den verbleibenden Probanden wurde eine moderate y^+ LAT2-Expression von 760 bis 2118 Kopien pro ng Gesamt-RNA gemessen.

Bei den Proben 1, 8, 12, 17 und 18 fiel auf, dass sowohl der hCAT-1 als auch y^+ LAT1 und y^+ LAT2 nur schwach exprimiert waren. Interessanterweise verlief die Expression von hCAT-1 und y^+ LAT1 in den Patienten 13, 14 und 15 gegenläufig. Bei den Patienten 2, 3, 4 und 5 war dies auch zu beobachten. Bei hoher y^+ LAT1 Expression, konnte jeweils nur ein geringes hCAT-1-Expressionslevel festgestellt werden (Abbildung 31).

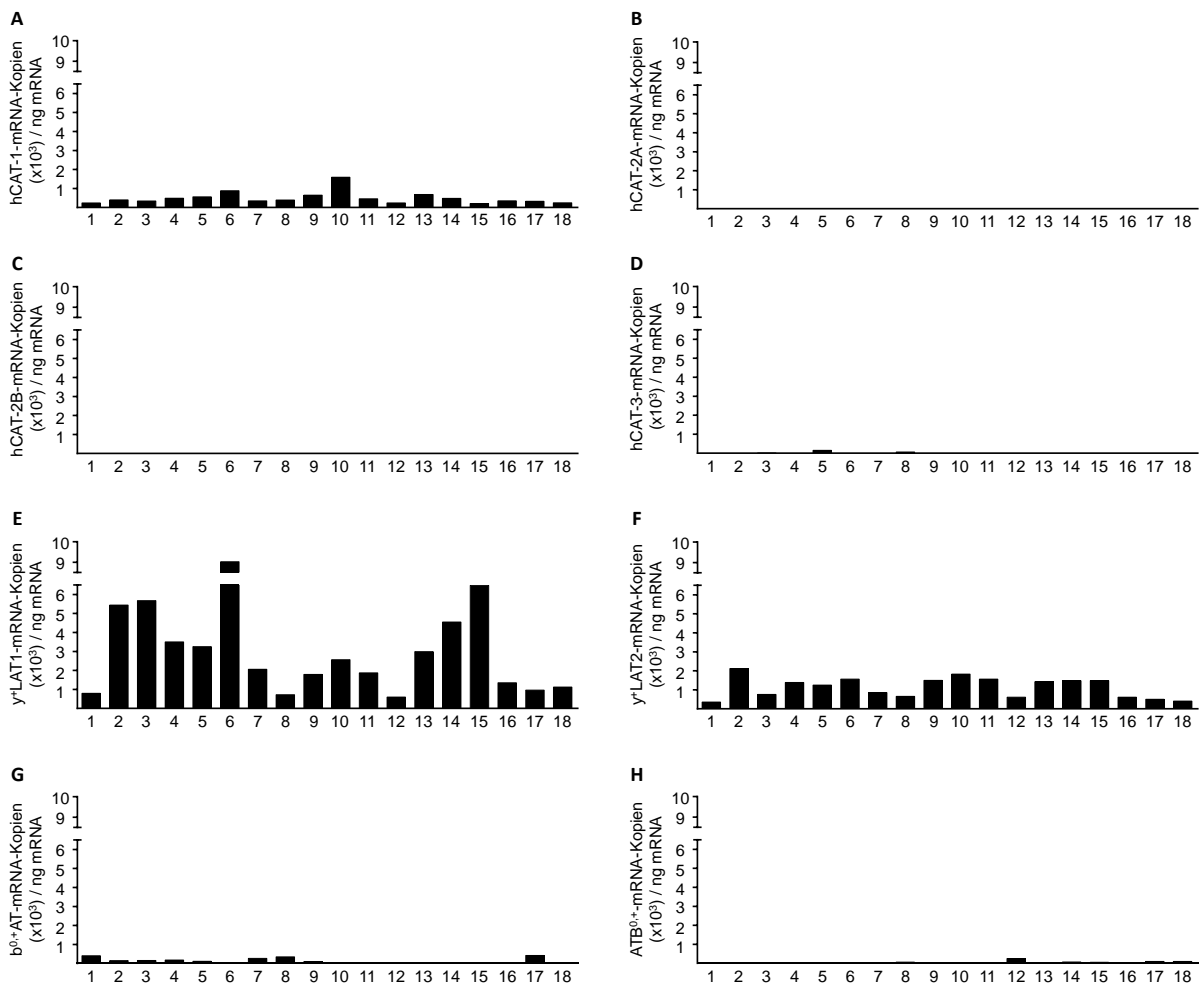


Abbildung 31: In primären CLL-Zellen sind die Arginintransporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 exprimiert.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von 18 CLL-Patienten isoliert (Tabelle 40: Patienten 1 bis 18). Anschließend wurde die mRNA-Expression der Transporter A) hCAT-1, B) hCAT-2A, C) hCAT-2B, D) hCAT-3, E) y⁺LAT1, F) y⁺LAT2, G) b^{0,+}AT und H) ATB^{0,+} mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Dargestellt sind die mRNA-Kopienzahlen pro ng Gesamt-RNA.

Auf Proteinebene wurde die Expression der Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 mittels Western Blot untersucht. Aufgrund der fehlenden Expression von hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} auf mRNA-Ebene, wurde die Expression dieser Membranproteine auf translationaler Ebene ausgeschlossen und auf die Analyse durch Western Blot verzichtet.

Auch die Protein-Expression der Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 variierte zwischen den Probanden (Abbildung 32). Die Patienten 2 und 6 fielen durch eine besonders prominente Expression sowohl von hCAT-1, als auch der beiden System y⁺L-Transporter auf (Abbildung 32). Der hCAT-1 war in den Proben 1, 3, 4, 5, 7 und 15 am geringsten exprimiert. In den anderen Patienten war eine moderate Expression zu beobachten (Abbildung 32 A und B). y⁺LAT1 war in den Patienten 8, 12, 16, 17 und 18 nur schwach detektierbar, in allen anderen Patienten war dieser deutlich exprimiert (Abbildung 32 A und C). Es fiel auf, dass die hCAT-1-Expression teilweise negativ mit der von y⁺LAT1 korrelierte. Beispielsweise war der hCAT-1 in den

Patienten 3, 4 und 5 relativ schwach detektierbar, aber es konnte eine starke y^+ LAT1-Expression beobachtet werden, umgekehrt war es bei den Patienten 16, 17 und 18. Hier wurde eine hohe hCAT-1-Expression detektiert, hingegen war der y^+ LAT1 nur schwach exprimiert (Abbildung 32 A, B und C). Der Transporter y^+ LAT2 war in den Patienten 2 und 6 hoch, in allen weiteren Probanden moderat bis schwach exprimiert (Abbildung 32 A und D).

Generell war die Protein-Expression der untersuchten Transporter weitestgehend mit der Expression auf mRNA-Ebene vergleichbar. In den Patienten 1 und 15 wurde auf mRNA- und Proteinebene jeweils nur eine schwache hCAT-1-Expression festgestellt. In den Probanden 6 und 10 spiegelte sich die starke hCAT-1-mRNA-Expression auf Proteinebene wider. Überraschend hingegen war die hohe hCAT-1-Expression auf Proteinebene in Patient 2, bei nur moderater mRNA-Expression (Abbildung 31 A und 32 A und B).

Die y^+ LAT1-Protein-Expression stimmte perfekt mit der korrespondierenden mRNA überein. Es war jeweils eine starke Expression in den Proben 2 bis 6 sowie 13 bis 15 zu beobachten und eine vergleichbar schwache bei den Patienten 8, 12 sowie 18. In den Proben 9, 10 und 11 konnte ein moderater Proteinlevel beobachtet werden (Abbildung 31 E und 32 A und C).

Bei dem Transporter y^+ LAT2 war die auf mRNA-Ebene detektierte überwiegend schwach bis moderate Expression auch auf Proteinebene zu beobachten. Auffällig war jedoch die besonders hohe y^+ LAT2-Protein-Expression in den Patienten 2 und 6 im Vergleich zu der nur moderaten Expression dieses Transporters auf mRNA-Ebene (Abbildung 31 F und 32 A und D).

Zusammenfassend konnte demnach die Expression der Transporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 in primären CLL-Zellen beobachtet werden, jedoch mit deutlichen Schwankungen des Expressionslevels der Transporter in den untersuchten Patienten. Dabei konnte keine Korrelation der Transporterexpression zu dem Alter der Patienten, der Anzahl der erhaltenen Therapielinien oder charakteristischen genetischen Aberrationen beobachtet werden (Tabelle 40).

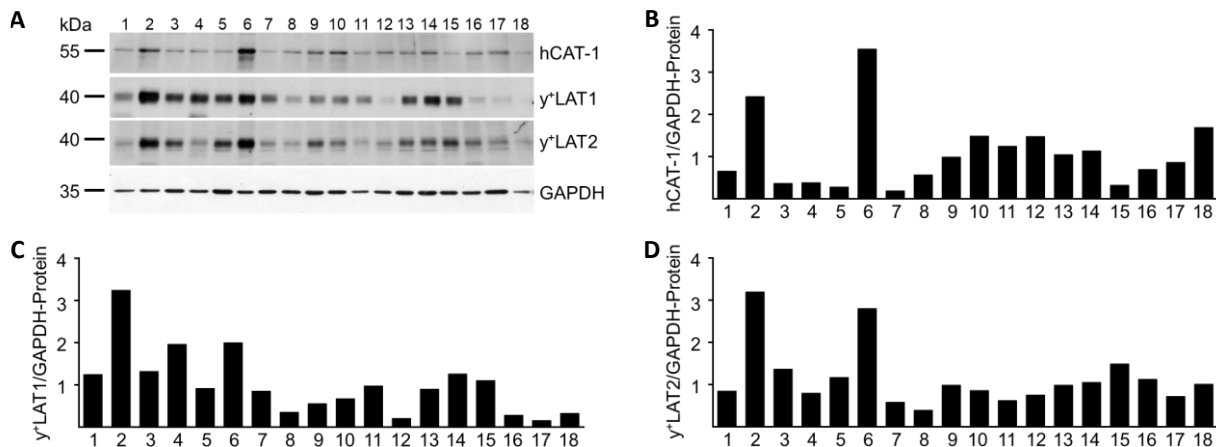


Abbildung 32: Die hCAT-1-, y⁺LAT1- und y⁺LAT2-Protein-Expression variiert zwischen CLL-Patienten.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von CLL-Patienten isoliert (Tabelle 40: Patienten 1 bis 18). Anschließend wurde mittels Western Blot-Analysen die Protein-Expression der Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 sowie der GAPDH als Ladekontrolle untersucht. Vor der Analyse wurden die Zelllysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind A) der Western Blot sowie die quantitative Auswertung der B) hCAT-1-, C) y⁺LAT1- und D) y⁺LAT2-Expression in Bezug auf GAPDH.

4.3.2 Durch Stimulation wird in primären CLL-Zellen die hCAT-1-Expression induziert

Die CLL ist charakterisiert durch die Akkumulation monoklonaler, reif-erscheinender, aber nicht-funktioneller B-Zellen im peripheren Blut, Knochenmark und in sekundären Lymphorganen (Caligaris-Cappio, 1999; Herishanu, 2011). Abhängig von ihrer Lokalisation unterscheiden sich diese Zellen jedoch in ihrem Proliferationsstatus. 99,5 % der CLL-Zellen, welche aus peripheren Blut isoliert wurden, sind in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert und somit nicht proliferativ (Andreeff, 1980). Ausschließlich in sogenannten Proliferationszentren oder Pseudofollikeln, welche vorwiegend in Lymphknoten, aber auch im Knochenmark lokalisiert sind, wurden bislang proliferierende CLL-Zellen nachgewiesen (Burger, 2013). In frisch aus dem peripheren Blut isolierten, nicht-proliferativen CLL-Zellen war der hCAT-1 schwach, der y⁺LAT1 sehr stark und der y⁺LAT2 moderat exprimiert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Transporterexpression in CLL-Zellen, welche zur Proliferation stimuliert wurden, von der in ruhenden Zellen unterscheidet.

Dafür wurden CLL-Zellen, welche aus dem peripheren Blut vier verschiedener Patienten isoliert wurden, über 48 Stunden über den Toll-ähnlichen Rezeptor 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen unstimuliert belassen. Anschließend wurde mittels quantitativer real time-PCR die mRNA-Expression der Transporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, y⁺LAT2, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} untersucht.

In jeder der vier untersuchten CLL-Proben war eine deutliche Induktion der hCAT-1-Expression nach Aktivierung der Zellen über den TLR9 zu beobachten. Jedoch variierte die

hCAT-1-Expressionsstärke spenderabhängig. Die Expression des γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 schien im Gegensatz zum hCAT-1 nach Stimulation tendenziell zu sinken. Die Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ waren nicht exprimiert (Abbildung 33).

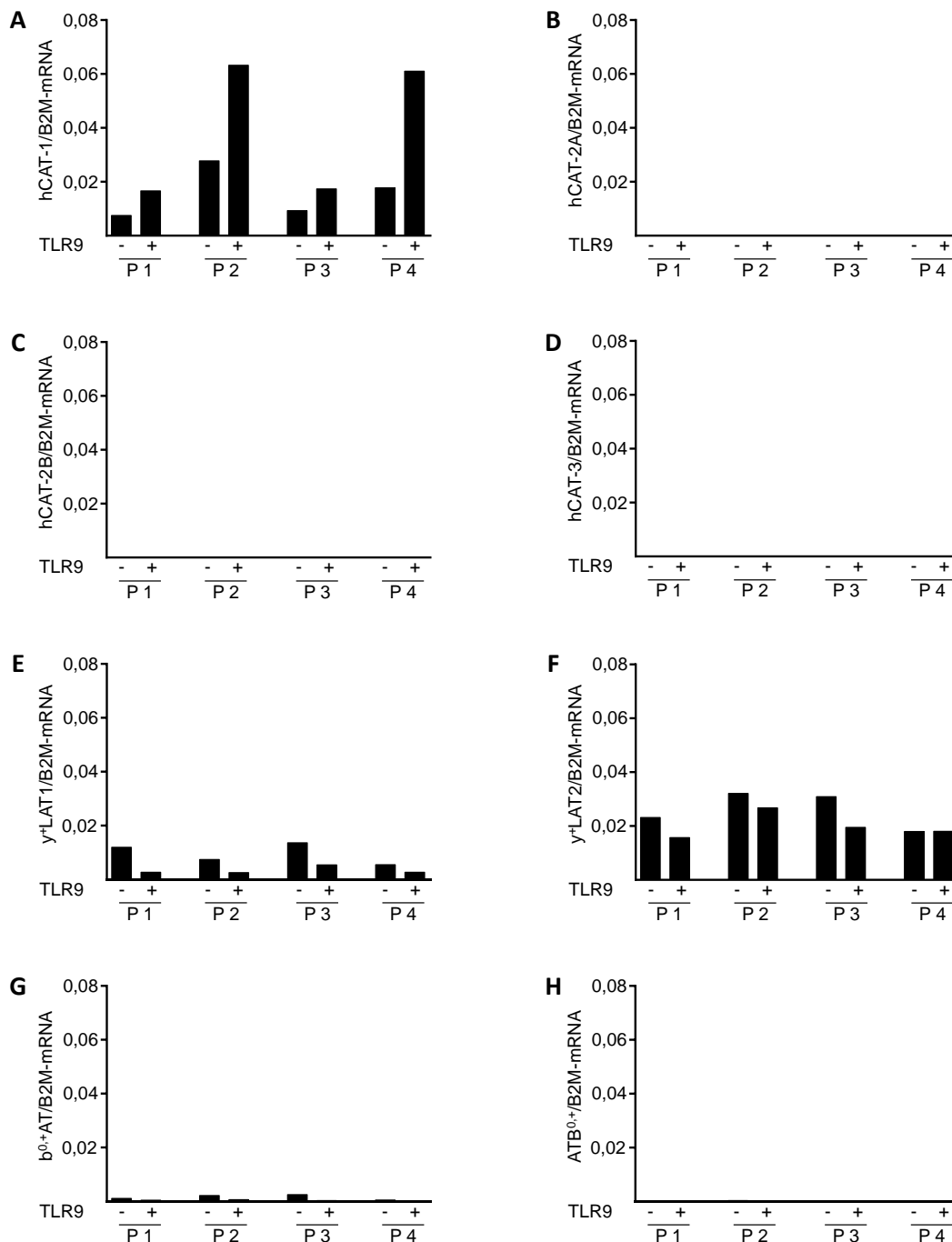


Abbildung 33: In humanen primären CLL-Zellen ist die hCAT-1-mRNA-Expression durch TLR9-Stimulation induzierbar.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von 4 CLL-Patienten (P1-P4, Tabelle 40: Patienten 19, 20, 21 und 22) isoliert und für 48 Stunden durch einen TLR9-Agonisten ($7,5 \mu\text{g/ml}$ ODN 2006) stimuliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Transporter A) hCAT-1, B) hCAT-2A, C) hCAT-2B, D) hCAT-3, E) γ^+ LAT1, F) γ^+ LAT2, G) $b^{0,+}$ AT und H) $ATB^{0,+}$ mittels quantitativer real time-PCR. Gezeigt ist die mRNA-Expression der Transporter jeweils in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M).

Die Expression der Transporter hCAT-1, γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 wurde unter denselben Bedingungen auch auf Proteinebene mittels Western Blot-Analysen untersucht.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen auf Transkriptionsebene wurde ebenfalls die stimulationsabhängige Induktion der hCAT-1-Protein-Expression beobachtet, wohingegen die γ^+ LAT1-Expression unter diesen Bedingungen gesenkt war. Generell variierte die Intensität der γ^+ LAT1-Protein-Expression stark zwischen den Probanden. Im Gegensatz zu der mRNA-Expression schien die Protein-Expression von γ^+ LAT2 unter Stimulation leicht induziert zu sein (Abbildung 34).

Zusammenfassend konnte demnach in stimulierten primären humanen CLL-Zellen eine starke Induktion der hCAT-1-Expression beobachtet werden. Dies ließ auf eine entscheidende Rolle dieses Transporters für die Proliferation von CLL-Zellen und somit für das Tumorstadium vermuten.

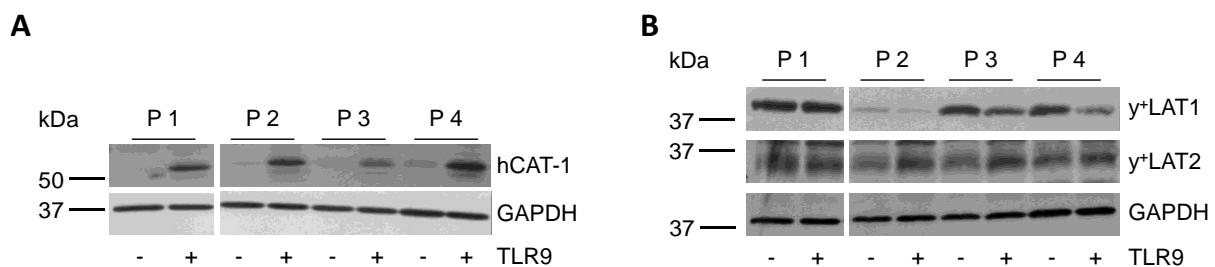


Abbildung 34: In humanen primären CLL-Zellen ist die hCAT-1-Protein-Expression durch TLR9-Stimulation induzierbar.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von 4 CLL-Patienten (P1 bis P4, Tabelle 40: Patienten 19, 20, 21 und 22) isoliert und für 48 Stunden durch einen TLR9-Agonisten (7,5 μ g/ml ODN 2006) stimuliert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Protein-Expression der Transporter A) hCAT-1 sowie B) γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 untersucht. Als Ladekontrolle wurde jeweils die GAPDH detektiert. Vor der Analyse wurden die Zelllysate mit N-Glykosidase behandelt.

4.3.3 Die Proliferation primärer humaner CLL-Zellen ist abhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins

Die Effizienz eines durch Arginin-metabolisierende Enzyme induzierten, systemischen Argininmangels als anti-tumorale Therapie wurde bereits für verschiedene Tumorentitäten gezeigt (Glazer, 2010; Miraki-Moud, 2015; Ott, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die anti-tumorale Wirksamkeit eines durch die Inhibition des Arginintransports induzierten Argininmangels in humanen CLL-Zellen untersucht werden. Voraussetzung für diesen Ansatz war jedoch die generelle Abhängigkeit der Proliferation und Viabilität dieser Tumorzellen von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins. Um dies zu testen wurden humane primäre CLL-Zellen in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin über 48 Stunden über den TLR9 stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Proliferation durch den Einbau

von [³H]Thymidin über 16 Stunden und die Viabilität durch die durchflusszytometrische Detektion Annexin- und Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt. Annexin bindet kalziumabhängig an das in die Plasmamembran eingelagerte Phospholipid Phosphatidylserin. In nicht-apoptotischen Zellen ist dieses intrazellulär lokalisiert und für extrazelluläres Annexin nicht zugänglich. Während der frühen Apoptose wird dieses von intrazellulär in den Extrazellulärraum geklappt, wodurch die Bindung durch Annexin möglich wird. Annexin-positiv-Zellen sind demnach ein Marker für Zellen, welche sich in der frühen Apoptose befinden. Hingegen kann Propidiumiodid ausschließlich die Zellmembran bereits toter Zellen überwinden (Kapitel 3.3.12).

CLL-Zellen, welche unter Substitution von Arginin stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zu unstimulierten CLL-Zellen, eine signifikant gesteigerte Proliferation um $71,7 \pm 11,2$ %. Hingegen wurde nach Stimulation der Leukämiezellen unter Argininmangel, verglichen mit unstimulierten Zellen, keine vermehrte Inkorporation von [³H]Thymidin beobachtet (Abbildung 35 A). Demnach ist die Proliferation humaner primärer CLL-Zellen stark von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins abhängig und somit Argininmangel eine potentielle Strategie um die Proliferation von CLL-Zellen zu inhibieren.

Hingegen schien die Viabilität der humanen primären CLL-Zellen unabhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins zu sein. Vergleichbar mit den Ergebnissen unter Arginin-suffizienten Bedingungen (PI-positive Zellen: unstimuliert: $25,3 \pm 8,7$ %; stimuliert: $19,9 \pm 11,0$ %), wurden in der Abwesenheit von Arginin in unstimulierten CLL-Zellen lediglich $29,4 \pm 10,1$ % und nach Stimulation $28,7 \pm 11,5$ % Propidiumiodid-positiv Zellen detektiert (Abbildung 35 B). Auffällig war allerdings in allen untersuchten Bedingungen der hohe Anteil Annexin-positiv Zellen. Bereits in der Gegenwart von Arginin wurden in unstimulierten CLL-Zellen $61,2 \pm 14,8$ % und nach Stimulation $51,4 \pm 17,3$ % früh-apoptotische Zellen beobachtet. Unter Argininmangel wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt (unstimuliert: $66,0 \pm 13,8$ %; stimuliert: $62,4 \pm 12,2$ %), demnach der Eintritt in die frühe Apoptose Arginin-unabhängig stattfand (Abbildung 35 C). Insgesamt steht dies im Widerspruch zu der deutlichen Induktion der Proliferation stimulierter CLL-Zellen in der Gegenwart von Arginin (Abbildung 35 A), stimmt aber mit bereits publizierten Beobachtungen überein, wonach primäre humane CLL-Zellen *ex vivo*, aufgrund der fehlenden Signale assoziierter Zellen, die Apoptose einleiten (Herishanu, 2013).

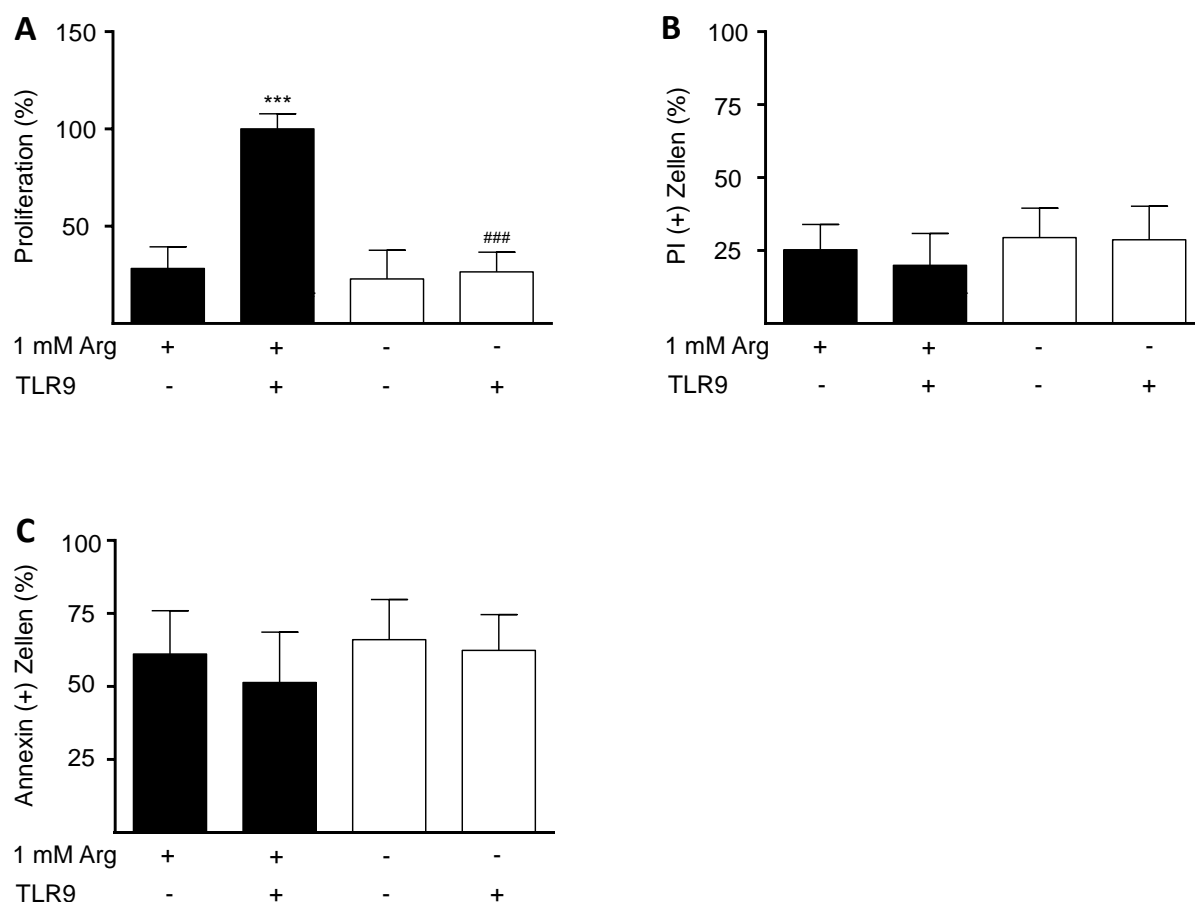


Abbildung 35: Die Proliferation primärer stimulierter CLL-Zellen ist argininabhängig.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von CLL-Patienten isoliert und für 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin durch einen TLR9-Agonisten (7,5 µg/ml ODN 2006) stimuliert. A) Anschließend wurde die Zellproliferation durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden (Mittelwert: 5291 ± 2668 cpm, n=20-21 von 7 unabhängigen Patienten, Tabelle 40: Patienten 9, 14, 15, 19, 20, 24 und 25). B, C) Die Zellviabilität wurde durch die durchflusszytometrische Detektion von B) Propidiumiodid (PI)- oder C) Annexin-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=6-8 unabhängige Patienten, Tabelle 40: Patienten 9, 14, 15, 19, 20, 24, 25 und 26). Die statistische Auswertung erfolgte durch One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimulierte mit unstimulierten Zellen verglichen (***: p ≤ 0,001), sowie die stimulierten Zellen in der An- und Abwesenheit von Arginin (###: p ≤ 0,001).

4.3.4 Die Argininaufnahme in primären humanen CLL-Zellen ist System γ^+ -vermittelt

Die Expression des System γ^+ -Transporters hCAT-1 wird durch Stimulation in primären humanen CLL-Zellen stark induziert (Abbildung 33 und 34). Dies deutete auf eine entscheidende Rolle dieses Transportproteins für die Proliferation und somit für das Tumorwachstum hin. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dieser Transporter auch für den Arginintransport in humanen CLL-Zellen verantwortlich ist und somit als eine mögliche Zielstruktur für die Therapie von CLL in Frage kommt. Um dies zu klären, wurde einleitend

zunächst die Zeitkinetik der Aufnahme [³H]Arginins über 5 bis 120 Sekunden in primären unstimulierten CLL-Zellen ermittelt.

Dies zeigte den kontinuierlichen Anstieg des aufgenommenen [³H]Arginins bis 120 Sekunden, was auf den Transport dieser Aminosäure in diesen Zellen schließen ließ (Abbildung 36 A).

Durch Stimulation wird in primären humanen CLL-Zellen die hCAT-1-Expression induziert. Um zu untersuchen, ob auch die Argininaufnahme in CLL-Zellen stimulationsabhängig induziert wird, wurde die Aufnahme von 100 µM [³H]Arginin über 30 Sekunden in primären unstimulierten oder über 48 Stunden stimulierten CLL-Zellen gemessen. Transporter-Expressionsstudien zeigten neben hCAT-1 auch die Expression der System y⁺L-Transporter y⁺LAT1 und y⁺LAT2. Um in den folgenden Experimenten ausschließlich den System y⁺-vermittelten Arginintransport betrachten zu können, wurde die Aktivität der System y⁺L-Transporter während der Versuchsdurchführung durch die Anwesenheit von 1 mM Leucin kompetitiv gehemmt.

Unter diesen Versuchsbedingungen wurde in stimulierten CLL-Zellen die Steigerung des Arginintransports um $82,5 \pm 7,2$ % gegenüber unstimulierten Zellen beobachtet (Abbildung 36 B).

Um zu klären, ob dieser stimulationsinduzierte Arginintransport durch einen kationischen Aminosäuretransporter katalysiert wird, wurde die Aufnahme von [³H]Arginin über 30 Sekunden in primären unstimulierten oder 48-stündig über den TLR9 stimulierten CLL-Zellen auch in der An- oder Abwesenheit des System y⁺-Inhibitors NEM untersucht. Dies resultierte in der Reduktion des Arginintransports in stimulierten CLL-Zellen in der Gegenwart des Hemmstoffs um $69,6 \pm 19,3$ %, annähernd auf den Level unstimulierter Zellen. Demnach scheint der Hauptanteil des Arginintransports in stimulierten CLL-Zellen, unter den gewählten Versuchsbedingungen y⁺-vermittelt zu sein (Abbildung 36 B).

Zusammenfassend weisen die bislang erfassten Daten darauf hin, dass der hCAT-1 eine entscheidende Rolle für den Arginintransport und somit für die Proliferation humaner CLL-Zellen spielt. Um dies letztendlich zu beweisen, müsste die hCAT-1-Expression in diesen Zellen inhibiert werden. Durch die schlechte Viabilität primärer CLL-Zellen *in vitro* war dies jedoch technisch nicht möglich, weshalb im Folgenden die Expression der Arginintransporter, die Argininabhängigkeit der Proliferation und Viabilität sowie die Eigenschaften des Arginintransports in immortalisierten CLL-Zelllinien untersucht wurden.

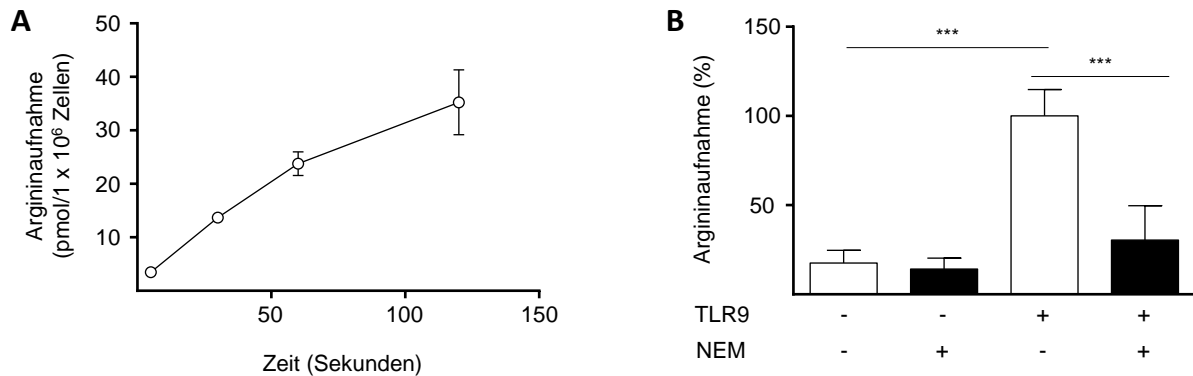


Abbildung 36: Die Argininaufnahme in humanen primären CLL-Zellen ist γ^+ -vermittelt.

CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Blut von CLL-Patienten isoliert. A) Anschließend wurde die Aufnahme von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) über 5, 30, 60 und 120 Sekunden festgestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt 4 Experimenten (Tabelle 40: gezeigt Patient 15, weitere Experimente: Patient 16, 18 und 23). Innerhalb eines Experiments wurden für jede Bedingung Triplikate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. B) CLL-Zellen wurden für 48 Stunden durch einen TLR9-Agonisten (7,5 $\mu\text{g/ml}$ ODN 2006) stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde die Aufnahme von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) über 30 Sekunden in der Gegenwart von 1 mM Leucin und der An- oder Abwesenheit von 200 μM NEM gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der stimulierten CLL-Zellen, in welchen die Argininaufnahme ohne Inhibitor festgestellt wurde (Mittelwert: $7,4 \pm 1,4$ pmol/ 10^6 Zellen; n=8-9 aus 3 unabhängigen Patienten, Tabelle 40: Patient 9, 19 und 20). Innerhalb eines Experiments wurden für jede Bedingung Triplikate analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte durch One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***: $p \leq 0,001$).

4.3.5 Die Arginintransporter hCAT-1, γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 sind in humanen CLL-Zelllinien exprimiert

Im Folgendem wurde untersucht, ob das Transporter-Expressionsmuster in humanen CLL-Zelllinien mit dem in primären CLL-Zellen übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression der Transporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, $b^{0,+}$ AT sowie $ATB^{0,+}$ in Zellen der CLL-Zelllinien HG3, MEC1 und JVM-2 mittels quantitativer real time-PCR festgestellt.

In jeder der drei untersuchten Zelllinien waren der System γ^+ -Transporter hCAT-1, sowie die beiden System γ^+ L-Transporter γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 prominent exprimiert. Die mRNAs der anderen Transporter waren nicht oder nur marginal detektierbar (Abbildung 37). Allerdings variierten die Expressionslevel der Transportproteine zwischen den Zelllinien. In HG3-Zellen war der γ^+ LAT1 im Vergleich am stärksten exprimiert, während der mRNA-Level des hCAT-1 und γ^+ LAT2 um etwa 60 % geringer waren. Darüber hinaus war eine marginale Expression des $b^{0,+}$ AT in diesen Zellen zu beobachten (Abbildung 37 A).

Hingegen war in den MEC1-Zellen die Expression des hCAT-1 und γ^+ LAT-2 am ausgeprägtesten. Der Transporter γ^+ LAT1 war im Vergleich etwa 60 % geringer exprimiert (Abbildung 37 B).

In JVM-2 Zellen waren die Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 in etwa gleich stark exprimiert, wohingegen die hCAT-1-Expression circa 30 % geringer zu sein schien (Abbildung 37 C).

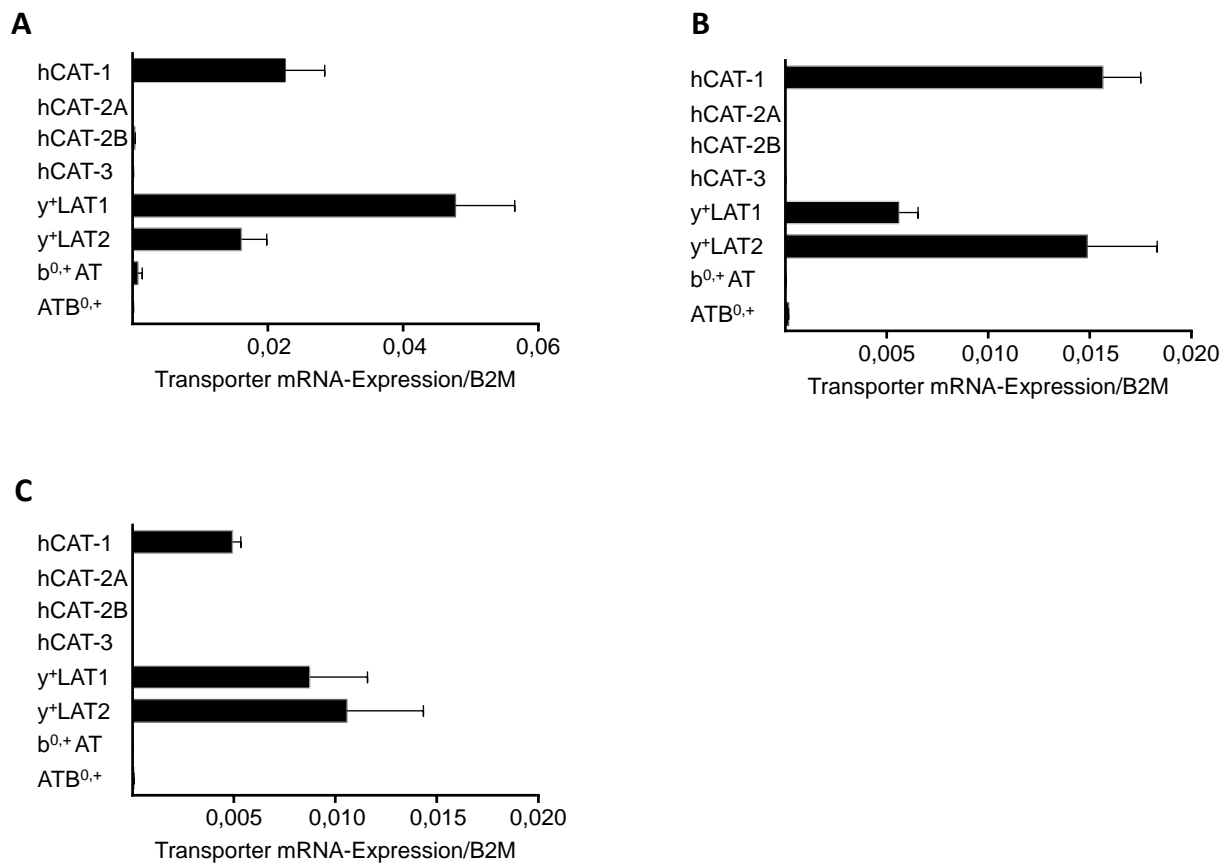


Abbildung 37: In CLL-Zelllinien ist die mRNA der Arginintransporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 stark exprimiert.

Dargestellt ist die Quantifizierung der mRNA-Expression der Arginintransporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y^+ LAT1, y^+ LAT2, $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ in A) HG3, B) MEC1 und C) JVM-2 Zellen mittels quantitativer real time-PCR. Gezeigt ist die mRNA-Expression der jeweiligen Transporter in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=3).

Die Expression der Transporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 wurde in allen drei Zelllinien ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Auch hier waren alle drei Transporter in jeder der Zelllinien exprimiert. Allerdings unterschieden sich die Zelllinien im Expressionslevel der Transporter. Der Transporter hCAT-1 war im Vergleich der drei Zelllinien in den MEC1-Zellen stark und in den HG3- und JVM-2-Zellen moderat exprimiert. Hingegen war in den MEC1-Zellen eine schwächere Expression des y^+ LAT1-Transporters im Vergleich zu den HG3- und JVM-2-Zellen zu beobachten. Der Transporter y^+ LAT2 schien in allen 3 Zelllinien etwa auf demselben Level exprimiert zu sein (Abbildung 38).

Demnach waren die Transporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den CLL-Zelllinien HG3, MEC1 und JVM-2 exprimiert. Dies entsprach dem Arginintransporter-Expressionsmuster in primären humanen CLL-Zellen.

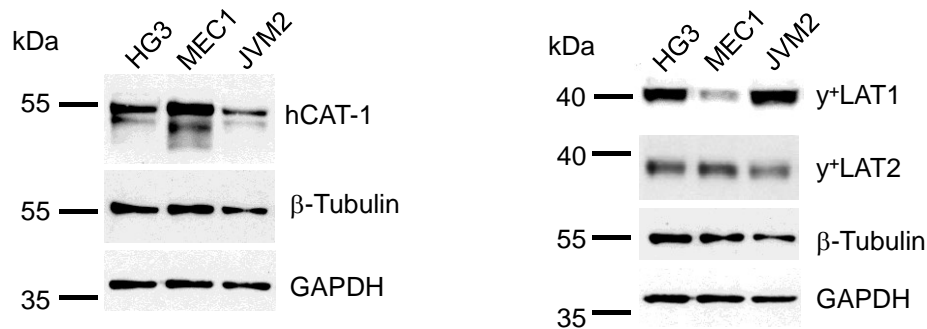


Abbildung 38: In CLL-Zelllinien sind die Arginintransporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 auch auf Proteinebene stark exprimiert.

In HG3-, MEC1- und JVM2-Zellen wurde die Protein-Expression der Arginintransporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 sowie GAPDH und β -Tubulin als Ladekontrollen mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zelllysate mit N-Glykosidase behandelt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von insgesamt 3.

4.3.6 Die Viabilität und Proliferation humaner CLL-Zelllinien sind argininabhängig

Die Proliferation primärer CLL-Zellen ist stark von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins abhängig, wohingegen kein Effekt dieser Aminosäure auf die Viabilität dieser Zellen *in vitro* festgestellt werden konnte. Um zu untersuchen, ob die Viabilität und Proliferation humaner CLL-Zelllinien auf die Zufuhr extrazellulären Arginins angewiesen sind, wurden HG3-, MEC1- und JVM2-Zellen über 48 und 96 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin inkubiert. Anschließend wurden die Viabilität dieser CLL-Zelllinien durch die durchflusszytometrische Detektion von Annexin- und Propidiumiodid-positiver Zellen und die Proliferation durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden analysiert.

Die Experimente zeigten, dass die Viabilität der Zelllinien HG3 und MEC1 nur schwach durch den Entzug der Aminosäure Arginin beeinträchtigt war. So wurden in HG3-Zellen nach 48-stündigem Argininmangel lediglich $31,8 \pm 0,2$ % Annexin-positiv und $14,9 \pm 0,9$ % Propidiumiodid-positiv Zellen detektiert, welches auch nach 96-stündigem Argininmangel nicht zusätzlich gesteigert war (Annexin-positiv Zellen: $37,3 \pm 1,0$ % und Propidiumiodid-positiv Zellen $10,2 \pm 1,2$ %, Abbildung 39 A, B, D, E). Ähnliche Resultate wurden auch in der Zelllinie MEC1 beobachtet. Hier wurden nach 48-stündigem Argininmangel $20,7 \pm 1,0$ % früh-apoptotische und $8,5 \pm 1,9$ % apoptotische Zellen detektiert. Auch nach 96-stündiger Inkubation der Zellen in der Abwesenheit von Arginin wurde keine wesentliche Verschlechterung der Zellviabilität beobachtet (Abbildung 40 A, B, D, E). Hingegen schien die Viabilität der Zelllinie JVM2 stärker durch die Inkubation unter Argininmangel beeinflusst zu sein, da nach 48-stündigem Argininmangel $54,2 \pm 9,6$ % Annexin-positiv Zellen detektiert wurden. Allerdings wurden auch in dieser Zelllinie lediglich $16,3 \pm 4,2$ % Propidiumiodid-positiv Zellen

festgestellt, welches auch nach 96 Stunden unter Argininmangel nicht zusätzlich gesteigert war (Abbildung 41 A, B, D, E). Im Kontrast dazu wurde in der Abwesenheit von Arginin in jeder der 3 CLL-Zelllinien die annähernd komplette Inhibition der Zellproliferation beobachtet (Abbildung 39, 40, 41 jeweils C und F). Bereits nach 48-stündiger Inkubation unter Argininmangel wurde die Senkung der Proliferation in den HG3-Zellen um $94,9 \pm 2,0 \%$, in den MEC1-Zellen um $89,10 \pm 4,51 \%$ und in den JVM-2-Zellen um $95,9 \pm 5,4 \%$ festgestellt (Abbildung 39, 40, 41, jeweils C).

Zusammenfassend zeigten diese Experimente die deutliche Abhängigkeit der CLL-Zelllinien HG3, MEC1 und JVM-2 von der Gegenwart extrazellulären Arginins. Dabei war generell die Proliferation der Zellen sensibler gegenüber absolutem Argininmangel. Die Viabilität hingegen schien nur schwach bis moderat beeinträchtigt zu sein. Diese Ergebnisse stimmten mit diesen in den primären stimulierten CLL-Zellen überein.

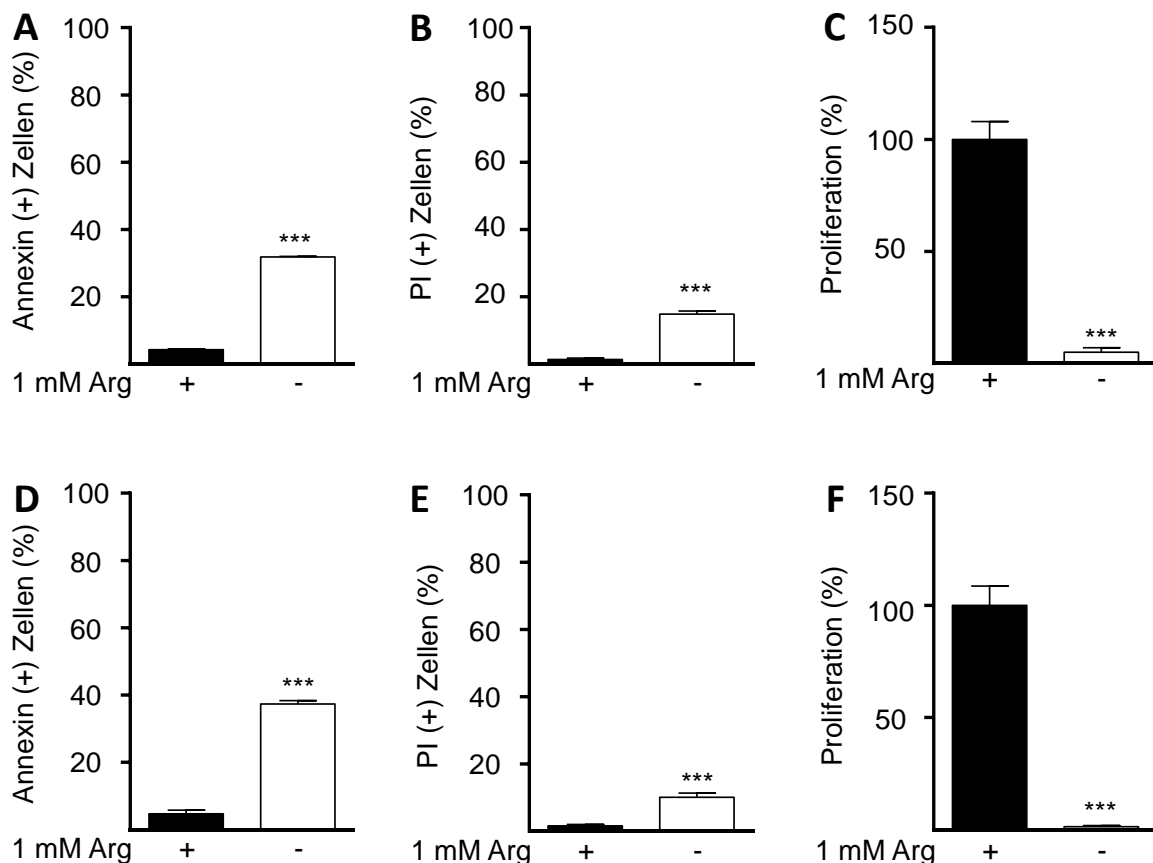


Abbildung 39: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 sind argininabhängig.

HG3-Zellen wurden über A, B, C) 48 und D, E, F) 96 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin (Arg) oder ohne Arginin inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität durch die durchflusszytometrische Detektion A, D) Annexin- oder B, E) Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (jeweils $n=3$). C, F) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von $[^3\text{H}]$ Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden (48 h (Mittelwert): 65402 ± 52269 cpm, 96 h (Mittelwert): 86262 ± 30048 , $n=8-11$). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t -Test (***: $p \leq 0,001$).

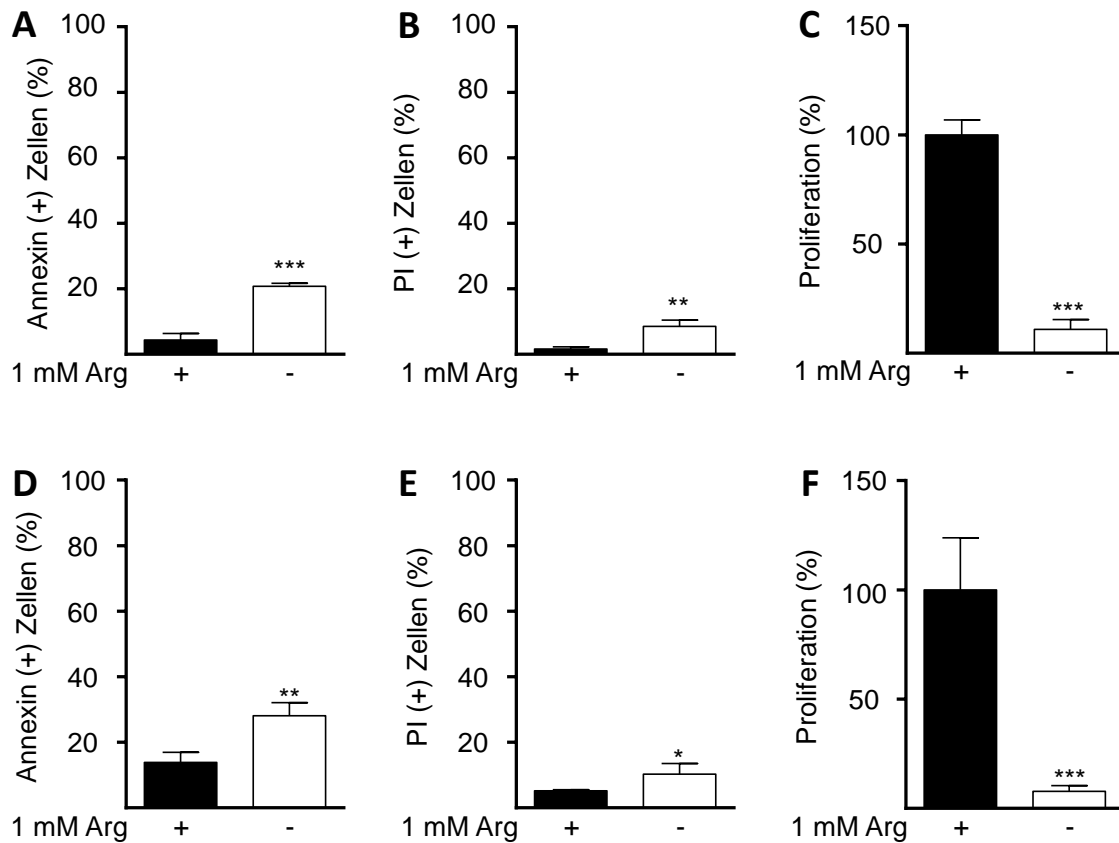


Abbildung 40: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie MEC1 sind argininabhängig.

MEC1-Zellen wurden über A, B, C) 48 und D, E, F) 96 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin (Arg) oder ohne Arginin inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität durch die durchflusszytometrische Detektion A, D) Annexin- oder B, E) Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (jeweils $n=3$). C, F) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [3 H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden (48 h (Mittelwert): 53999 ± 29148 cpm, 96 h (Mittelwert): 29299 ± 10418 cpm, $n=9-11$). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

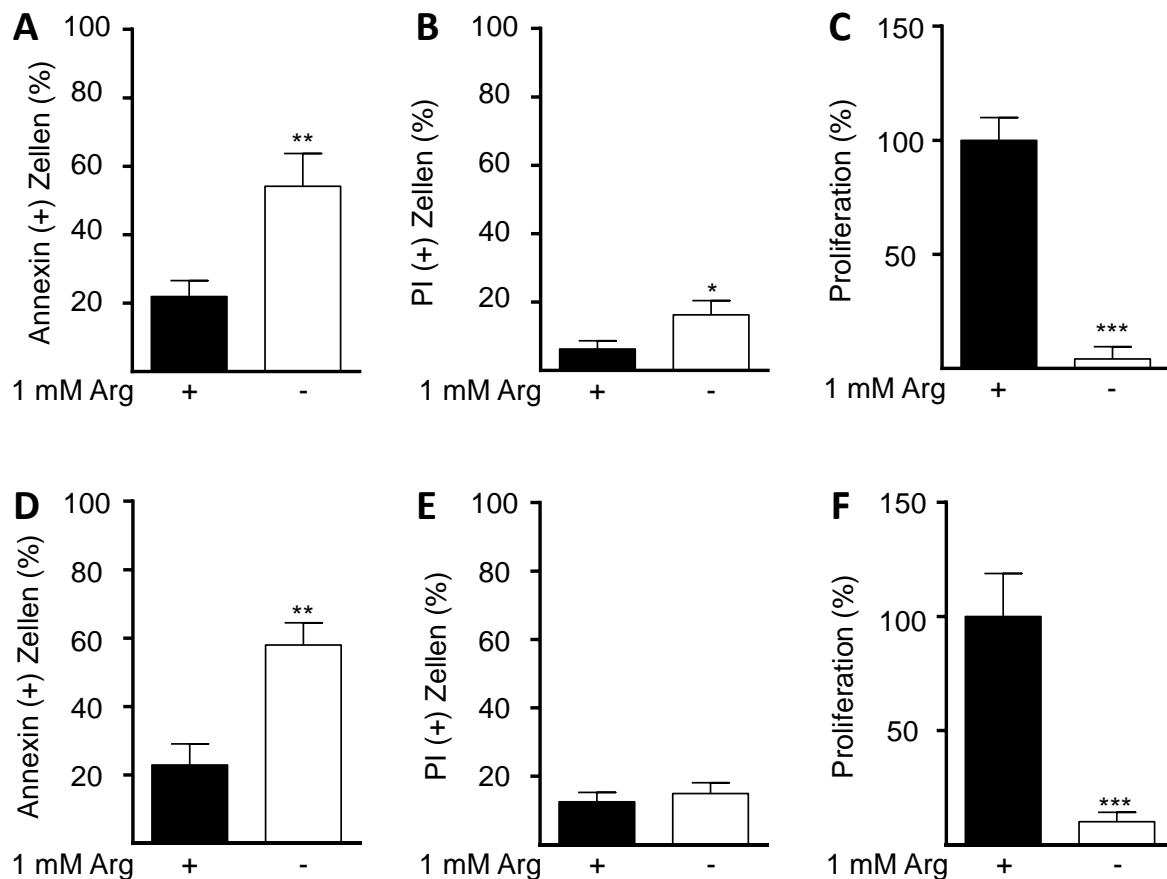


Abbildung 41: Die Viabilität und Proliferation der CLL-Zelllinie JVM-2 sind argininabhängig.

JVM-2-Zellen wurden über A, B, C) 48 und D, E, F) 96 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin (Arg) oder ohne Arginin inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität durch die durchflusszytometrische Detektion A, D) Annexin- oder B, E) Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (jeweils $n=3$). C, F) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [3 H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin stimuliert wurden (48 h (Mittelwert): 48237 ± 36221 cpm, 96 h (Mittelwert): 8161 ± 2818 cpm, $n=8-9$). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t -Test (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

4.3.7 Die Argininaufnahme in CLL-Zellen kann durch NEM und Leucin gehemmt werden

Die Proliferation sowohl primärer humaner CLL-Zellen als auch humaner CLL-Zelllinien ist stark von der Verfügbarkeit extrazellulären Arginins abhängig. Transporter-Expressionsanalysen in den CLL-Zelllinien HG3, MEC1 und JVM-2 zeigten, übereinstimmend mit den Untersuchungen in primären stimulierten CLL-Zellen, die Expression der Transporter hCAT-1, y^+ LAT1 und y^+ LAT2. Um zu untersuchen, welcher dieser Transporter für die Argininaufnahme in humanen CLL-Zelllinien verantwortlich ist, wurde im Folgenden der Arginintransport in der CLL-Zelllinie HG3 charakterisiert. Dazu wurde zunächst die Zeitkinetik der Aufnahme [3 H]Arginins über 5 bis 120 Sekunden in diesen Zellen ermittelt.

Dies zeigte über den gesamten Untersuchungszeitrahmen die kontinuierliche Zunahme der importierten [^3H]Argininmenge, demnach die Argininaufnahme in HG3-Zellen stark induziert zu sein schien (Abbildung 42).

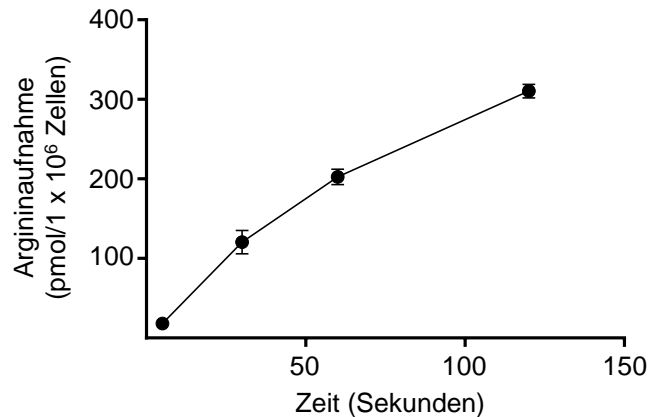


Abbildung 42: Der Arginintransport ist in HG3-CLL-Zellen induziert.

Dargestellt ist die Aufnahme von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) über 5, 30, 60 und 120 Sekunden in HG3-Zellen. Innerhalb eines Experiments wurden Triplikate für jede Bedingung analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von insgesamt 3 Experimenten (Mittelwerte \pm Standardabweichungen).

Für den Arginintransport in primären stimulierten CLL-Zellen scheinen System y^+ -Transporter eine entscheidende Rolle zu spielen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch in humanen CLL-Zelllinien kationische Aminosäuretransporter für den Arginintransport eine Rolle spielen.

Basierend auf den in Kapitel 1.1.4 beschriebenen Transporteigenschaften der Arginintransportierenden Systeme y^+L , $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$ sollte im Folgenden der Arginintransport in HG3-Zellen untersucht werden. Dafür wurde die Aufnahme von [^3H]Arginin in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Leucin, 1 mM Cystin oder Natrium über 30 Sekunden gemessen. Zusätzlich wurde auch der Effekt von 200 μM des System y^+ -Inhibitors NEM untersucht.

In der Gegenwart von NEM war die Aufnahme von [^3H]Arginin in HG3-Zellen um $75,8 \pm 4,4$ % reduziert (Abbildung 43 A). Demnach wird in diesen Zellen der Arginintransport überwiegend durch das System y^+ vermittelt. Allerdings wurde der Arginintransport auch durch Leucin, einem Substrat für die Transporter der Systeme y^+L , $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$ um $53,1 \pm 7,8$ % gesenkt, was auf die Beteiligung wenigstens eines dieser Systeme hinwies (Abbildung 43 B). In der Gegenwart von NEM und Leucin konnte die Aufnahme von Arginin in HG3-Zellen komplett gehemmt werden (Abbildung 43 C). Hingegen war in der Abwesenheit von Natrium die Argininaufnahme nicht gegenüber der in Kontrollzellen verändert, womit der Transporter $ATB^{0,+}$, welcher sowohl kationische als auch neutrale Aminosäuren ausschließlich in Abhängigkeit von Natrium transportiert, als Arginintransporter in diesen Zellen ausgeschlossen

werden konnte (Abbildung 43 D). Die Abwesenheit von Natrium hob die Inhibition des Arginintransports durch 1 mM Leucin komplett auf (Abbildung 43 E). Dies zeigte die Beteiligung der System y^+L -Transporter, welche zwar kationische Aminosäuren unabhängig, aber neutrale Aminosäuren ausschließlich in Abhängigkeit von Natrium transportieren. Cystin, welches als Substrat für den $b^{0,+}AT$ -Transporter bekannt ist, hemmte den Arginintransport in der humanen CLL-Zelllinie HG3 lediglich um $11,06 \pm 7,27 \%$, aufgrund dessen nur eine geringe Rolle dieses Transporters für die Argininaufnahme in dieser CLL-Zelllinie vermutet wurde (Abbildung 43 F).

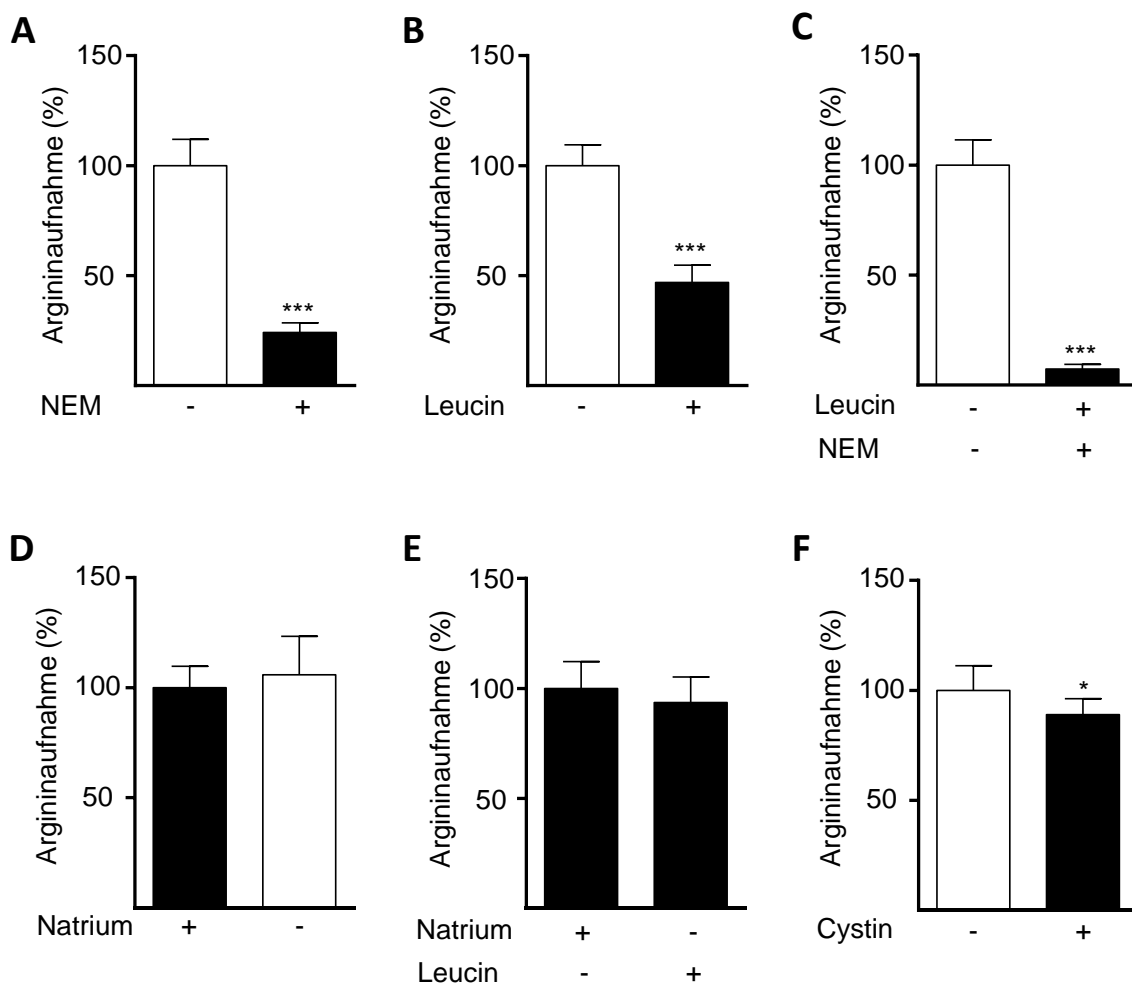


Abbildung 43: In HG3-Zellen wird der Arginintransport durch NEM und Leucin gehemmt.

Dargestellt ist die Aufnahme von $100 \mu\text{M}$ [^3H]Arginin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) in HG3-Zellen über 30 Sekunden in An- oder Abwesenheit von A) $200 \mu\text{M}$ NEM ($n=12$), B) 1 mM Leucin ($n=12$), C) $200 \mu\text{M}$ NEM und 1 mM Leucin ($n=9$), D) Natrium ($n=15$), E) Natrium und 1 mM Leucin ($n=6$) und F) 1 mM Cystin ($n=9$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen in welchen die Argininaufnahme in Anwesenheit von Natrium und ohne kompetitive Aminosäure oder Inhibitor determiniert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t -Test (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$).

Zusammenfassend wiesen diese Experimente auf die Mitwirkung sowohl von kationischen Aminosäuretransportern als auch der System y^+L Transporter hin. Für den Transporter $b^{0,+}AT$

wurde ebenfalls eine geringe Rolle vermutet. Hingegen wurde der natriumabhängige Transporter $ATB^{0,+}$ als Arginintransporter in HG3-Zellen ausgeschlossen.

4.3.8 Arginin- und Lysinmangel kann in CLL-Zellen durch die Gegenwart von Citrullin und einem Lysintripeptid ausgeglichen werden

Die Arginintransporter hCAT-1, y^+LAT1 und y^+LAT2 sind in CLL-Zellen stark exprimiert. Argininaufnahme-Studien in HG3-Zellen zeigten, dass CATs maßgeblich für den Arginintransport in diesen Zellen verantwortlich zu sein scheinen. Jedoch konnte auch die Beteiligung der System y^+L -Transporter nicht ausgeschlossen werden. Allerdings sind y^+L -Transporter unter physiologischen Bedingungen, in der Gegenwart hoher Konzentrationen neutraler Aminosäuren, hauptsächlich Argininexporter. Demnach wurde vermutet, dass der y^+ -Transporter hCAT-1 hauptsächlich für die Argininaufnahme in humanen CLL-Zellen verantwortlich ist. Dies sollte im Folgenden bestätigt werden.

Der Transporter hCAT-1 ist in vielen humanen Zellen für den Transport kationischer Aminosäuren, wie Arginin und Lysin, verantwortlich. Um die Bedeutung dieses Transporters für die Proliferation und Viabilität von CLL-Zellen zu untersuchen, sollte dieser in HG3-Zellen durch Transduktion shRNA-kodierender Viren ausgeschaltet werden. Für nachfolgende funktionelle Tests sollten die Zellen, in welchen die hCAT-1-Expression erfolgreich reduziert worden war, expandiert werden. In RPMI-Vollmedium, welches in der Standardzusammensetzung 1 mM Arginin und 300 μ M Lysin enthielt, gelang dies jedoch nicht, höchstwahrscheinlich aufgrund des durch die Reduktion der hCAT-1-Expression induzierten intrazellulären Arginin- und Lysinmangels.

Zellen, welche die Enzyme ASS und ASL exprimieren sind in der Lage Arginin intrazellulär aus der neutralen Aminosäure Citrullin zu synthetisieren. Bislang ist nicht bekannt, ob CLL-Zellen diese Enzyme exprimieren. Deshalb sollte zunächst getestet werden, ob die Proliferation von CLL-Zellen unter Argininmangel durch die Substitution von Citrullin aufrechterhalten werden kann. Der nach hCAT-1-Expressionshemmung potentiell auftretende Lysinmangel sollte durch das Angebot eines Lysintripeptids, welches über spezialisierte Peptidtransporter in Zellen importiert wird, ausgeglichen werden.

Für diese Versuche wurden HG3-Zellen über 96 Stunden a) mit 1000 μ M Arginin und 200 μ M Lysin, b) ohne diese beiden Aminosäuren oder Substituenten, c) mit 1 mM Arginin, d) mit 1 mM Citrullin, e) mit 67 μ M Lysintripeptid oder f) mit 1 mM Citrullin und 67 μ M Lysintripeptid inkubiert. Anschließend wurde über 16 Stunden der Einbau von [3 H]Thymidin festgestellt.

Wie erwartet, kam die Proliferation der HG3-Zellen unter Arginin- und Lysinmangel komplett zum Erliegen. Aber auch die Gegenwart von Arginin unter Lysinmangel bewirkte nicht die Aufrechterhaltung der Zellproliferation. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit Citrullin in der Abwesenheit von Lysin beobachtet werden. Damit wurde erstmals gezeigt, dass auch die Aminosäure Lysin essentiell für die Proliferation von Tumorzellen ist. Umgekehrt kam es auch durch das Angebot des Lysintripectids unter Argininmangel zu keiner Steigerung der Zellproliferation. Im Kontrast dazu konnte in Zellen unter Substitution von Citrullin und des Lysintripectids ein mit der Gegenwart von Arginin und Lysin vergleichbarer Proliferationslevel beobachtet werden (Abbildung 44).

Demnach konnte in HG3-Zellen Arginin- und Lysinmangel durch das Angebot von Citrullin und einem Lysintripectid ausgeglichen werden.

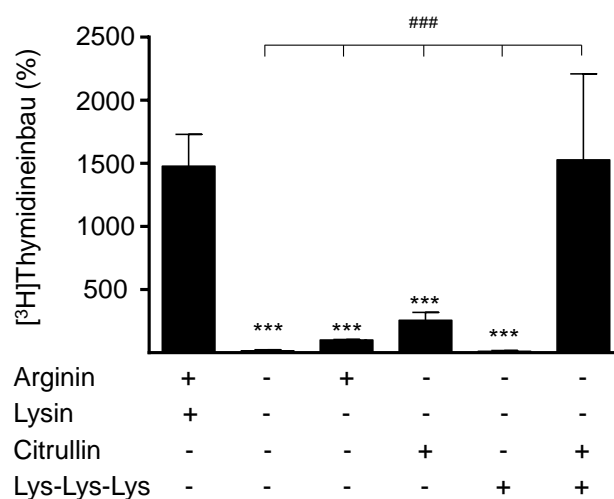


Abbildung 44: Unter Argininmangel kann die Proliferation humaner HG3-CLL-Zellen durch die Substitution von Citrullin und einem Lysintripectid aufrechterhalten werden.

HG3-Zellen wurden in der An- oder Abwesenheit von 1000 μ M Arginin und 200 μ M Lysin, sowie jeweils unter Arginin- und Lysinmangel, in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und/oder 67 μ M eines Lysintripectids (Lys-Lys-Lys) über 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von [3 H]Thymidin über 16 Stunden determiniert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Anwesenheit von 1 mM Arginin kultiviert wurden (n=3-6). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Jede Bedingung wurde mit den Zellen, welche in Gegenwart von Arginin und Lysin (***) oder Citrullin und dem Lysintripectid (###: $p \leq 0,001$) inkubiert wurden, verglichen.

4.3.9 In humanen HG3-CLL-Zellen wird die ASS erst unter Argininmangel induziert

Durch die Gegenwart von 1 mM Citrullin wird die Proliferation von HG3-Zellen unter Argininmangel aufrechterhalten. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass in diesen Zellen das Enzym ASS als Voraussetzung für die intrazelluläre Synthese von Arginin aus Citrullin exprimiert wird. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde die ASS-Protein-Expression im

Folgenden in HG3-Zellen untersucht. Dafür wurden Zellen zunächst über 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin inkubiert. Auf eine über 48 Stunden hinaus verlängerte Inkubationsphase wurde verzichtet, da bereits zu diesem Zeitpunkt die komplette Inhibition der Zellproliferation unter Argininmangel in dieser Zelllinie zu beobachten war (Abbildung 39). Zusätzlich wurden die Zellen in der Gegenwart von 1 mM Citrullin unter kompletter Arginindepletion inkubiert, um zu untersuchen, ob die Anwesenheit des Substrats der ASS die Expression dieses Enzyms beeinflusst. Die Expression der ASS wurde mittels Western Blot-Analysen festgestellt. Als Kontrolle wurde die ASS-Expression ebenfalls in EA.hy926-Zellen detektiert, für welche in unserer Arbeitsgruppe eine starke Expression der ASS nachgewiesen wurde.

In der Gegenwart von 1 mM Arginin wurde in HG3-Zellen keine ASS-Expression festgestellt. Unter Argininmangel jedoch war bereits nach 24 Stunden eine tendenzielle Steigerung der ASS-Expression detektierbar. In Zellen, welche über 48 Stunden unter Arginindepletion inkubiert wurden, kam es zu der deutlichen Induktion der ASS. Die ASS-Expression in HG3-Zellen, welche über 24 Stunden unter Argininmangel, aber in der Gegenwart von 1 mM Citrullin inkubiert wurden, war vergleichbar mit der Expression unter Argininmangel. Nach 48 Stunden war diese jedoch weiter gesteigert und signifikant verschieden zu dem Expressionslevel nach 24 Stunden. Insgesamt erreichte die ASS-Expression allerdings auch unter diesen Bedingungen nur $51,8 \pm 18,2$ % der ASS-Expression in EA.hy926 Zellen (Abbildung 45).

Zusammenfassend kann demnach die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 unter Argininmangel in der Gegenwart von 1 mM Citrullin, (vermutlich) durch die intrazelluläre Argininsynthese aus Citrullin nach Induktion der ASS unter diesen Bedingungen, aufrechterhalten werden (Abbildung 44 und 45). Folglich sollte die Expansion der HG3-Zellen nach shRNA-induzierter Reduktion der hCAT-1-Expression gelingen.

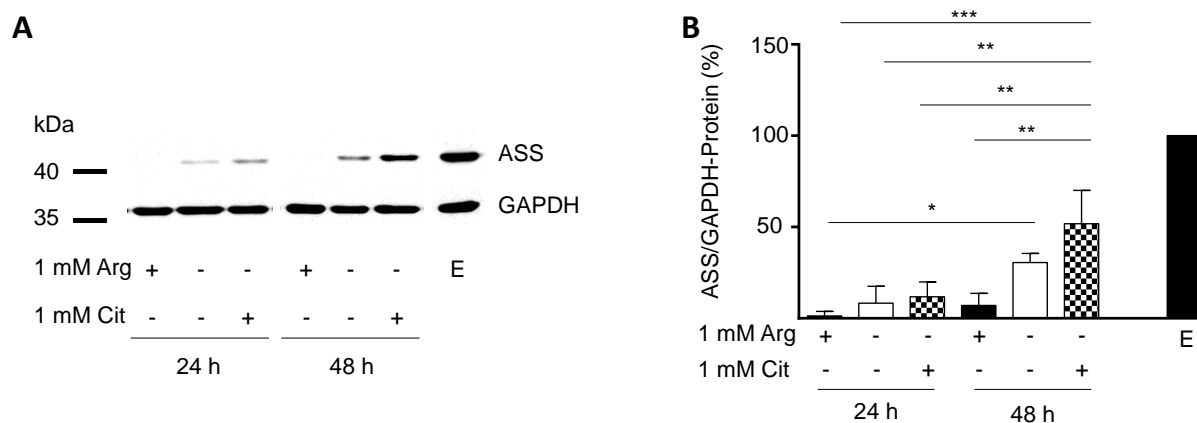


Abbildung 45: In HG3-Zellen wird die ASS erst unter Argininmangel induziert.

HG3-Zellen wurden über 24 und 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin oder 1 mM Citrullin bei gleichzeitigem Argininmangel inkubiert. Anschließend wurde die Protein-Expression der ASS und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Als Positivkontrolle wurde auch die Expression der Proteine in EA.hy926-Zellen (E) ermittelt. Gezeigt sind A) ein repräsentativer von insgesamt 3 Western Blots und B) die quantitative Auswertung. Dargestellt ist die ASS-relativ zur GAPDH-Expression der jeweiligen Proben in Prozent der Expression in EA.hy926-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurden alle Bedingungen miteinander verglichen (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

4.3.10 In primären CLL-Zellen ist die ASS nicht exprimiert

In HG3-Zellen ist die ASS durch Argininmangel induzierbar exprimiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob auch in primären CLL-Zellen die ASS exprimiert ist. Dafür wurde die ASS-Protein-Expression zunächst in primären, frisch isolierten CLL-Zellen mittels Western Blot-Analysen untersucht.

Diese Experimente zeigten, dass mit Ausnahme der Probe 14, alle untersuchten CLL-Proben negativ für die ASS-Expression waren, demnach CLL-Zellen, welche im peripheren Blut von CLL-Patienten zirkulieren, überwiegend ASS-negativ zu sein schienen (Abbildung 46 A). Bei diesen im Blut zirkulierenden CLL-Zellen handelt es sich um im Zellzyklus arretierte CLL-Blasten, welche jedoch aus stark proliferierenden Zellen, welche in sogenannten Proliferationszentren lokalisiert sind, hervorkommen. Für die Therapie der CLL ist es deswegen sinnvoll die Funktion dieser sich teilenden Zellen zu beeinflussen. Darum wurde im nächsten Schritt ebenfalls die ASS-Protein-Expression in über 48 Stunden über den TLR9 stimulierten CLL-Zellen untersucht. Da in der CLL-Zelllinie HG3 die ASS-Expression erst durch Argininmangel induziert wurde, wurde diese auch unter diesen Bedingungen in stimulierten CLL-Zellen untersucht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus unbehandelten Patientenproben, wurde auch in stimulierten CLL-Zellen in der An- oder Abwesenheit von Arginin keine ASS-Expression festgestellt (Abbildung 46 B).

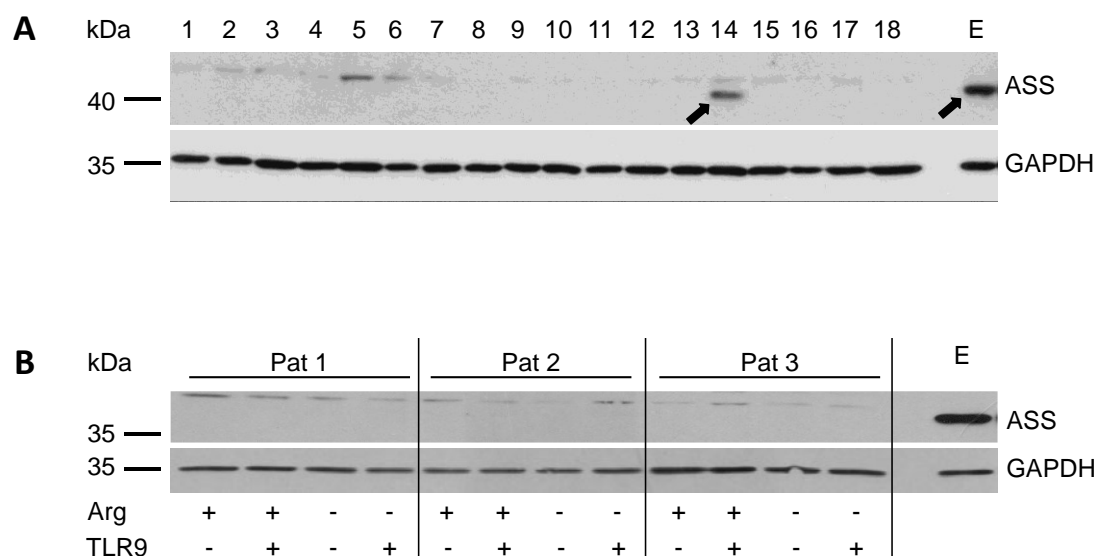


Abbildung 46: In primären CLL-Zellen wird die ASS auch unter Argininmangel nicht exprimiert.

A) CLL-Zellen wurden über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut von 18 verschiedenen CLL-Patienten (1-18) isoliert (Tabelle 40: Patient 1 bis 18). B) CLL-Zellen aus peripherem Blut von 3 verschiedenen CLL-Patienten (Pat 1, 2, 3, Tabelle 40: Patient 19, 20 und 22) wurden über 48 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 1 mM Arginin (Arg) über einen TLR9-Agonisten (7,5 µg/ml ODN 2006, TLR9) stimuliert oder unstimuliert belassen. Mittels Western Blot-Analysen wurde die Protein-Expression der Argininosuccinat-Synthetase (ASS) sowie der GAPDH als Ladekontrolle untersucht. Als Positivkontrolle wurde auch die Expression der Proteine in EA.hy926-Zellen (E) ermittelt.

4.3.11 Die hCAT-1-Expression kann shRNA-vermittelt in CLL-Zellen reduziert werden

Um abschließend die Rolle des hCAT-1 in humanen CLL-Zellen zu untersuchen, sollte die Expression dieses Transporters in der humanen CLL-Zelllinie HG3 durch Transduktion shRNA-kodierender Lentiviren reduziert werden.

Initial wurden 5 Viren mit jeweils sich unterscheidenden shRNA-Sequenzen gegen hCAT-1 produziert. Für die Virusproduktion wurden HEK293T-Zellen ko-transfiziert mit jeweils einem der lentiviralen Plasmide pLKO.1-puro_SLC7A1.1 bis pLKO.1-puro_SLC7A1.5, welche jeweils für eine von fünf verschiedenen shRNAs gegen hCAT-1 kodierte, sowie den Plasmiden pCMV-VSV-G und pCMVΔR8.9, welche die Sequenzen für die Virushülle des vesikulären Stomatitusvirus (VSV-G), sowie für das Kapsid und die Reverse Transkriptase des humanen Immundefizienz Virus (HIV) enthielten (Kapitel 3.5.5, Tabelle 29). 24 Stunden nach der Transduktion erfolgte die 72-stündige Selektion transduzierter HG3-Zellen mit 5 µg/ml Puromycin in RPMI-Vollmedium. Um die Proliferation und Viabilität der HG3-Zellen, trotz der konstitutiven shRNA-vermittelten Reduktion der hCAT-1-Expression und daraus folgendem potentiellen intrazellulären Argininmangels zu gewährleisten, wurde das Inkubationsmedium zusätzlich mit 1 mM Citrullin sowie 67 µM Lysintriptyd supplementiert.

Anschließend wurde mittels Western Blot-Analysen die hCAT-1-Expression in diesen Proben detektiert. Zum Vergleich wurden auch Proben nicht-transduzierter HG3-Zellen analysiert. Die Experimente zeigten die effektive Reduktion der hCAT-1-Expression in HG3-Zellen, welche mit dem SLC7A1.5-Virus transduziert wurden (Abbildung 47 A). Hier konnte eine durchschnittliche Senkung der hCAT-1-Expression um $83,6 \pm 6,6$ % festgestellt werden (Abbildung 47 B). Auch mit dem Virus SLC7A1.1 wurde die hCAT-1-Expression teilweise unterdrückt. Hingegen wurde nur ein schwacher Effekt mit den Viren SLC7A1.2, SLC7A1.3 und SLC7A1.4 beobachtet (Abbildung 47 A). Demnach konnte die hCAT-1-Expression in HG3-Zellen erfolgreich durch die lentivirale Transduktion einer shRNA reduziert werden.

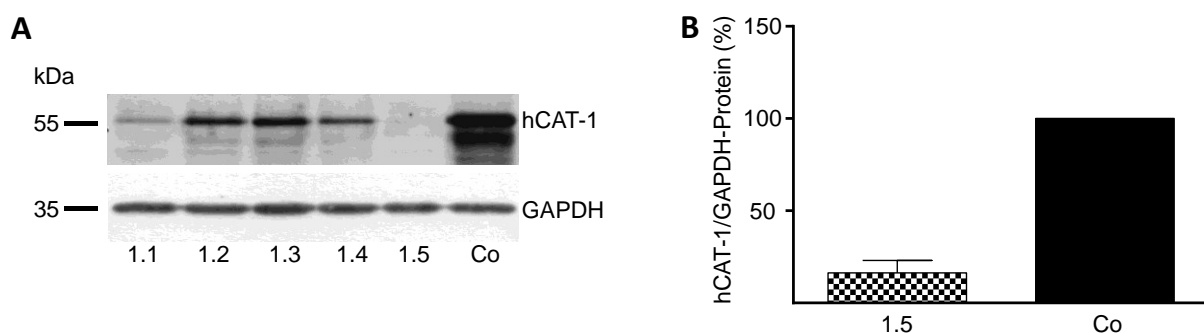


Abbildung 47: Die hCAT-1-Expression in HG3-Zellen kann durch die lentivirale Transduktion einer hCAT-1-shRNA effizient reduziert werden.

HG3-Zellen wurden jeweils mit 5 verschiedenen Lentiviren, welche für eine shRNA gegen hCAT-1 kodieren, transduziert (SLC7A1.1 bis SLC7A1.5 entsprechend 1.1 bis 1.5). Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen durch 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 μM Lysintriptid für 72 Stunden selektiert. Anschließend wurde die Protein-Expression von hCAT-1 sowie der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte HG3-Zellen ebenfalls analysiert (Co). Vor der Analyse wurden die Zelllysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind A) ein repräsentativer Western Blot und B) die quantitative Auswertung ($n=2-5$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Kontrollzellen (Co).

4.3.12 Der hCAT-1 knock-out in humanen HG3-Zellen beeinflusst auch die Expression von y^+ L-Transportern

In HG3-Zellen kann die hCAT-1-Expression durch eine lentiviral eingebrachte shRNA effizient inhibiert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die reduzierte hCAT-1-Expression in diesen Zellen die Expression anderer Arginin-akzeptierender Transporter beeinflusst, um den potentiell fehlenden hCAT-1-vermittelten Arginintransport zu kompensieren. Dafür wurden HG3-Zellen mit dem SLC7A1.5-Virus oder dem Kontrollvirus SHC002 transduziert. Nach 72-stündiger Selektion durch 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 μM Lysintriptid wurde die Expression des hCAT-1, sowie die Expression der Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y^+ LAT1, y^+ LAT2, b^{0+} AT und

ATB^{0,+} auf transkriptioneller Ebene durch quantitative real time-PCR und translationaler Ebene durch Western Blot-Analysen festgestellt.

Auf mRNA-Ebene wurde nach effizienter Reduktion der hCAT-1-Expression keine Veränderung der Expressionslevel der Transporter hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} beobachtet (Abbildung 48). Jedoch war die mRNA-Expression des y⁺LAT2 signifikant gesteigert (Abbildung 48 F). Dies konnte allerdings nicht auf Proteinebene bestätigt werden. Hier war keine Veränderung der y⁺LAT2-Expression nach effizienter Inhibition der hCAT-1-Expression (Reduktion gegenüber der Kontrollzellen um 90,5 ± 2,3 %) zu beobachten (Abbildung 49 A, B und D). Allerdings wurde stattdessen die Reduktion der y⁺LAT1-Expression um 29,6 ± 22,3 % festgestellt (Abbildung 49 A und C). Möglicherweise ist dies auf eine durch Nährstoffmangel induzierte allgemeine Translationsinhibition zurück zu führen.

eine durch Nährstoffmangel induzierte allgemeine Translationsinhibition zurück zu führen.

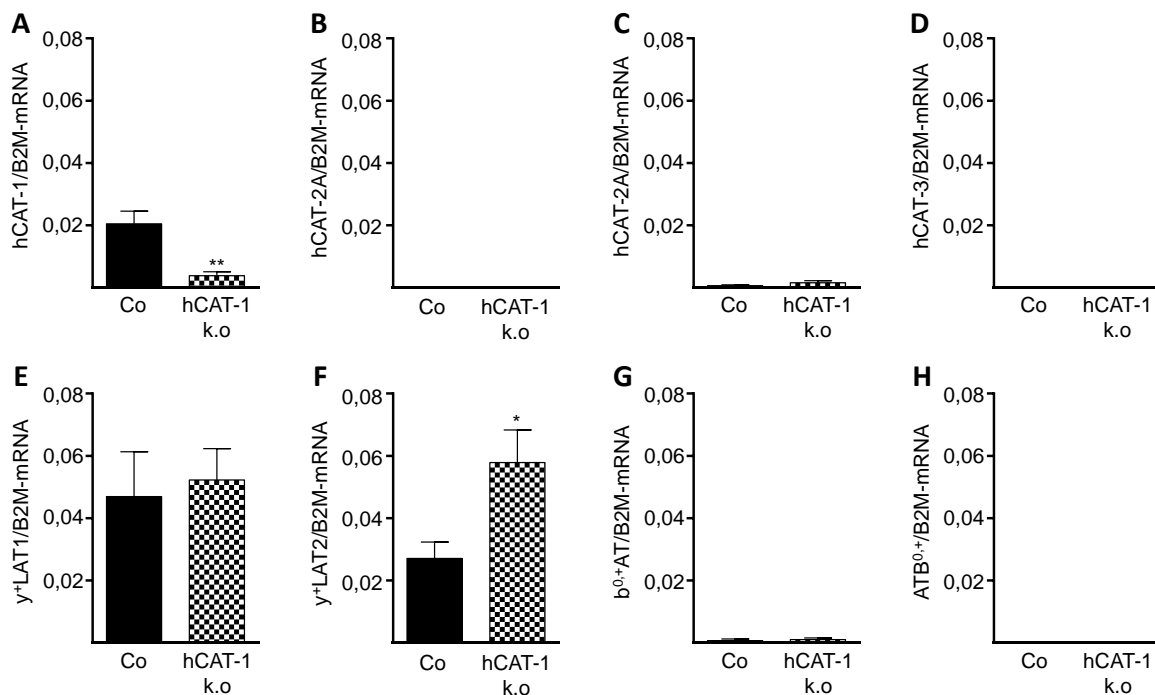


Abbildung 48: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu einer Steigerung der y⁺LAT2-mRNA-Expression.

HG3-Zellen wurden mit dem SLC7A1.5-Lentivirus (hCAT-1 k.o.) oder einem Kontrollvirus (Co) transduziert. Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen durch 5 µg/ml Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 µM Lysintri-peptid für 48 Stunden selektiert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von A) hCAT-1, B) hCAT-2A, C) hCAT-2B, D) hCAT-3, E) y⁺LAT1, F) y⁺LAT2, G) b^{0,+}AT und H) ATB^{0,+} mittels quantitativer real time-PCR festgestellt. Gezeigt ist die mRNA-Expression der Transporter jeweils in Relation zu β₂-Mikroglobulin (B2M). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (A-H: n=4).

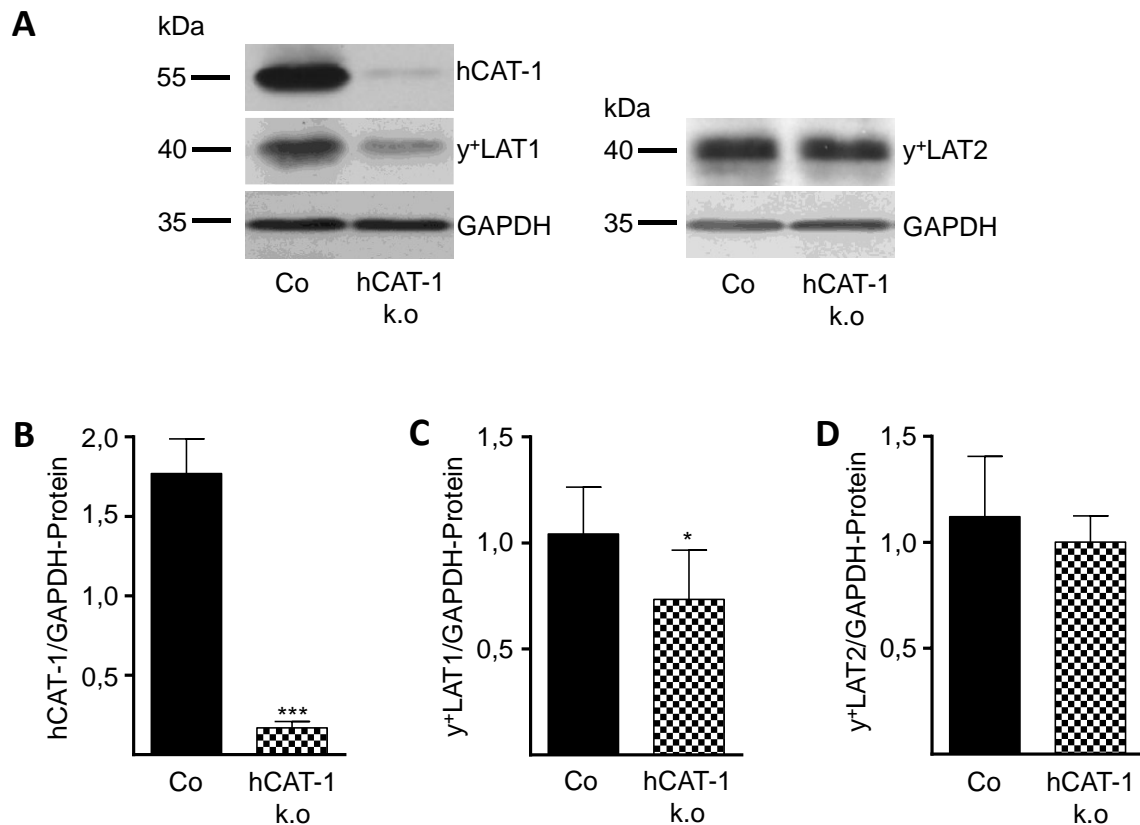


Abbildung 49: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu einer schwachen Absenkung der y⁺LAT1-Protein-Expression.

HG3-Zellen wurden mit dem SLC7A1.5-Lentivirus (hCAT-1 k.o.) oder einem Kontrollvirus (Co) transduziert. Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen durch 5 µg/ml Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 µM Lysintriptid für 48 Stunden selektiert. Anschließend wurde die Protein-Expression von hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 sowie der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. Gezeigt sind A) ein repräsentativer Western Blot von insgesamt 4 und die quantitative Auswertung der B) hCAT-1- C) y⁺LAT1- und D) y⁺LAT2-Expression, jeweils in Bezug auf GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$).

4.3.13 Die Reduktion der hCAT-1-Expression in HG3-Zellen führt zu einer Senkung der Argininaufnahme und Inhibition der Proliferation

In HG3-Zellen kann die hCAT-1-Expression durch eine lentiviral eingebrachte shRNA effizient inhibiert werden. Dies ermöglichte in diesen CLL-Zellen die Analyse der Rolle des hCAT-1 für die Argininaufnahme, Viabilität und Proliferation. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Reduktion der hCAT-1-Expression im gewählten Versuchsaufbau nach 72-stündiger Selektion durch Puromycin (Tag 4 nach Transduktion) effizient war (Abbildung 47) und für weitere 7 Tage stabil blieb. Anschließend kam es jedoch zu einer Re-Induktion der hCAT-1-Expression. Aus diesem Grund wurden die folgenden funktionellen Analysen am Tag 5 nach Selektionsstart (Tag 6 nach Transduktion) durchgeführt.

Zunächst wurde die Aufnahme von [³H]Arginin über 30 Sekunden in HG3-Zellen, welche mit dem Kontrollvirus SHC002 oder dem SLC7A1.5-Virus transduziert worden waren, gemessen.

Um den System y^+L -vermittelten Transport zu hemmen, wurde die Argininaufnahme in der Gegenwart von 1 mM Leucin festgestellt.

Diese Experimente zeigten in HG3-Zellen nach Reduktion der hCAT-1-Expression eine signifikante Senkung der Argininaufnahme um $48,5 \pm 22,9$ % im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 50).

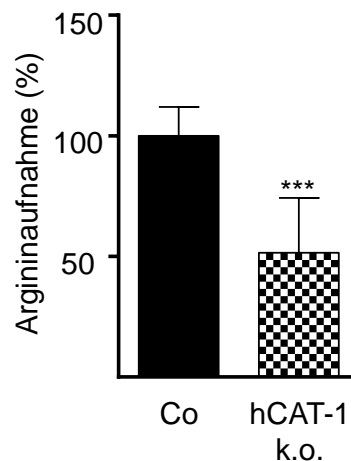


Abbildung 50: Die lentiviral-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt zu der Senkung des System y^+ -vermittelten Arginintransports in HG3-Zellen.

HG3-Zellen wurden mit dem SLC7A1.5-Lentivirus (hCAT-1 k.o.) oder einem Kontrollvirus (Co) transduziert. Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen durch 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 μM Lysin-Tripeptid für 5 Tage selektiert. Anschließend wurde die Aufnahme von 100 μM [^3H]Arginin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) über 30 Sekunden in der Gegenwart von 1 mM Leucin ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Kontrollzellen (Mittelwert: $37,9 \pm 11,9$ pmol/ 10^6 Zellen, $n=15$). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t -Test (***: $p \leq 0,001$).

Für die Analyse der Viabilität und Proliferation der HG3-Zellen nach shRNA-vermittelter Reduktion der hCAT-1-Expression wurden die transduzierten HG3-Zellen zunächst für 72 Stunden in der Gegenwart von 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin, sowie 1 mM Citrullin und 67 μM Lysintri-peptid expandiert. Anschließend wurden die Zellen für die Untersuchungen weitere 48 oder 96 Stunden in RPMI-Vollmedium plus Puromycin, aber ohne die Supplementation von Citrullin und Lysintri-peptid inkubiert. Die Viabilität der hCAT-1-defizienten HG3-Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Detektion Annexin- und Propidiumiodid-positiver Zellen ermittelt.

Bereits nach 48-stündiger Inkubation ohne die Supplementation von Citrullin und des Lysintri-peptids wurden $79,4 \pm 6,0$ Annexin-positive und $20,9 \pm 8,0$ % tote, Propidiumiodid-positiv detektiert (Abbildung 51 A und B). Nach 96 h Stunden wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet: $75,6 \pm 8,6$ % früh- und $14,6 \pm 10,0$ % apoptotische Zellen (Abbildung 51 D und E). Demnach ist die Viabilität dieser Zellen nach der Inhibition der hCAT-1-Expression stärker beeinträchtigt als unter Argininmangel (Abbildung 39 und 51). Dies könnte auf den

zusätzlichen Mangel der essentiellen, kationischen Aminosäure Lysin, welche ebenfalls über den hCAT-1 in Zellen transportiert wird, zurückgeführt werden.

Die Proliferation der SLC7A1.5-Virus-transduzierten HG3-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (SHC002-Virus) wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt.

Dies zeigte die annähernd komplette Inhibition der Proliferation der HG3-Zellen, in welchen die hCAT-1-Expression reduziert war (Abbildung 51 C und F).

Zusammenfassend führte demnach die Senkung der hCAT-1-Expression in der humanen CLL-Zelllinie HG3 zu einer signifikanten Reduktion der Argininaufnahme, der kompletten Inhibition der Proliferation, sowie zu der deutlichen Beeinträchtigung der Viabilität. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der durch den hCAT-1-vermittelte Arginintransport in diesen Zellen essentiell für deren Funktion ist. Dies eröffnet die Möglichkeit den Transporter hCAT-1 als neue pharmakologische Zielstruktur für die Manipulation der CLL-Zellproliferation zu nutzen und bietet somit einen neuen Ansatz für die CLL-Therapie.

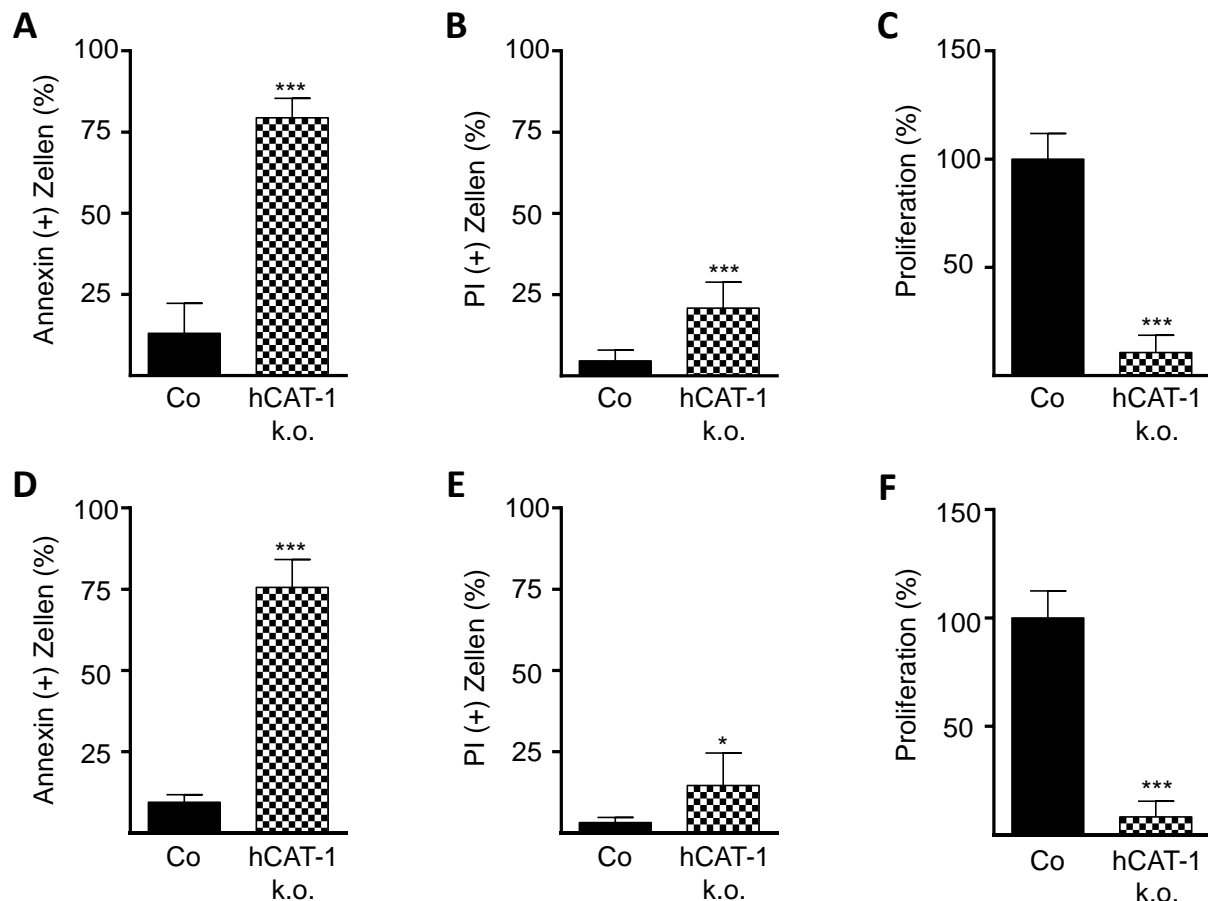


Abbildung 51: Die shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt in HG3-Zellen zu einer kompletten Inhibition der Proliferation und der Senkung der Viabilität.

HG3-Zellen wurden mit dem SLC7A1.5 Lentivirus (hCAT-1 k.o.) oder einem Kontrollvirus (Co) transduziert. Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen durch 5 µg/ml Puromycin in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 µM Lysintriptid für 72 Stunden selektiert. Anschließend wurden die Zellen A, B, C) für 48 oder D, E, F) 96 Stunden in RPMI-Vollmedium mit Puromycin, jedoch ohne die Substitution von Citrullin oder des Lysintriptids inkubiert. A, B, D, E) Die Zellviabilität wurde durch die durchflusszytometrische Detektion von A, D) Annexin- oder B, E) Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=3-7). C,F) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche mit dem Kontrollvirus transduziert wurden (48 h (Mittelwert): 46501 ± 23722 cpm, 96 h (Mittelwert): 52932 ± 21649 cpm, n=12-18). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$).

4.3.14 Herstellung einer HG3-Zelllinie mit einer stabil in das Genom integrierten, Doxyzyklin-induzierbaren shRNA gegen hCAT-1

In vitro führte die shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression in der CLL-Zelllinie HG3 zu der signifikanten Verringerung der Argininaufnahme, welches zu der kompletten Inhibition der Zellproliferation sowie der Induktion der Apoptose in diesen Zellen resultierte. Im Folgenden sollte der Effekt der Hemmung der hCAT-1-Expression in HG3-Zellen *in vivo* untersucht werden. Bislang wurden die Versuche zur Inhibition der hCAT-1-Expression mit Viren, welche für konstitutiv exprimierte shRNAs kodieren durchgeführt. Für die Mausmodelle sollte eine HG3-Zelllinie mit einer Doxyzyklin-induzierbaren shRNA gegen hCAT-1 nach

Wiederschein *et. al.* hergestellt werden (Wiederschain, 2009). Dafür wurde zunächst die hCAT-1-shRNA 5' GCTGAGGATGGACTGCTATTT 3' in das lentivirale Plasmid Tet-pLKO-puro (Addgene Plasmid # 21915) integriert. Um dies zu bewerkstelligen wurde das Plasmid Tet-pLKO-puro mit den Restriktionsenzymen EcoRI und AgeI geschnitten. Parallel erfolgte die Zusammenlagerung der Oligonukleotide hCAT-1_shRNA_sense: 5' CCGGGCTGAGGATGGACTGCTATTTCTCGAGAAATAGCAGTCCATCCTCAGCTTTT 3' und hCAT-1-shRNA_anti-sense: 5' AATTA AAAAGCTGAGGATGGATGGACTGCTATTT TCTCGAGAAATAGCAGTCCATCCTCAGC 3', welche jeweils aus der shRNA gegen hCAT-1 in *sense*- und *antisense*-Orientierung (kursiv), getrennt durch eine, die Restriktionsschnittstelle XhoI enthaltende Schleife, zusammengesetzt und durch die Restriktionsschnittstellenfragmente AgeI und EcoRI flankiert war. Anschließend erfolgte durch Ligation die Integration des doppelsträngigen Oligonukleotids in den AgeI- und EcoRI-restringierten Plasmid Tet-pLKO-puro, woraus das Plasmid Tet-pLKO-puro-sh_hCAT1 entstand. Die Integration der shRNA wurde durch die Restriktion des Tet-pLKO-puro-sh_hCAT1 mit dem Restriktionsenzym XhoI geprüft. Bei korrekter Integration der shRNA waren nach Auftrennung des Restriktionsprodukts durch ein Agarosegel im elektrischen Feld zwei Fragmente unterhalb von 200 Basenpaaren zu beobachten. Die Integration der shRNA wurde ebenfalls durch Sequenzierung (StarSEQ GmbH, Mainz) bestätigt. In Abbildung 52 ist das in das Virus-kodierende Plasmid integrierte Fragment schematisch dargestellt.

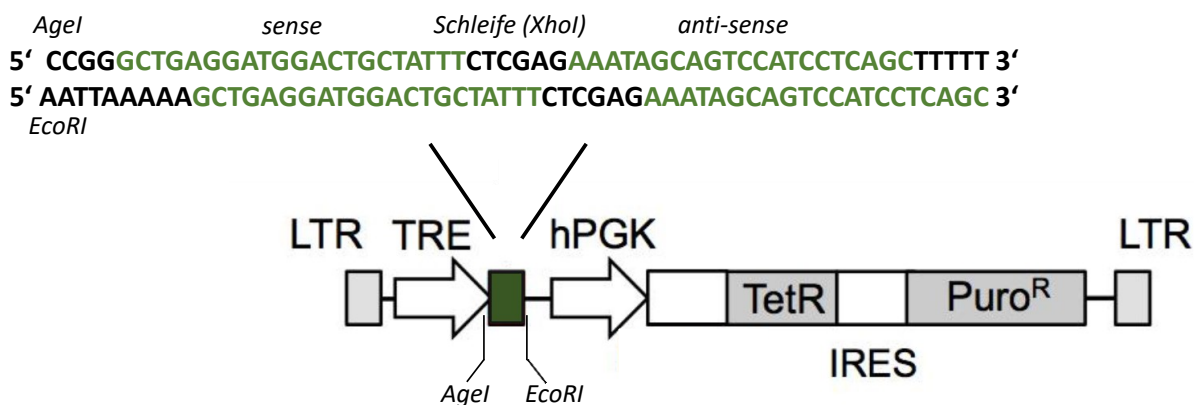


Abbildung 52: Schematische Darstellung des LTR-flankierten Ausschnitts des Vektors pLKO-tet-on mit integrierter shRNA gegen hCAT-1.

Schematische Teildarstellung des Vektors Tet-pLKO-puro. Gezeigt ist das in das Virus-kodierende Plasmid integrierte Fragment mit den Restriktionsschnittstellen AgeI und EcoRI. LTR: Long Terminal Repeat, TRE: Tet Responsive Element, hPGK: humaner Phosphoglyceratkinase-Promotor, TetR: Tet Repressor, IRES: Internal Ribosomal Entry Site, PuroR: Puromycinresistenz. Die Darstellung wurde modifiziert nach Wiederschain *et. al.*: Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation, *Cell cycle*. 8:498-504, 2009.

Die Virusproduktion erfolgte durch Ko-Transfektion der HEK293T-Zellen mit den Plasmiden Tet-pLKO-puro-sh_hCAT-1, psPAX2 und pMD2.G, wobei letztere für die Virushülle des VSV-G, sowie für das Kapsid und die Reverse Transkriptase des HIV kodieren (Tabelle 30). Nach 14-tägiger Selektion der transduzierten HG3-Zellen durch 5 µg/ml Puromycin, erfolgte die FACS-basierte Vereinzelung der Zellen in 96-Lochplatten in jeweils 200 µl „konditioniertem“ RPMI-Vollmedium plus 20 % FBS (50 % frisches RPMI-Vollmedium plus 50 % RPMI-Vollmedium nach 3-tägiger Inkubation mit HG3-Zellen) durch [REDACTED] und [REDACTED] (Forschungszentrum für Immuntherapie (FZI), Universitätsklinikum der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz). Auf diese Weise entstanden 18 monoklonale Zelllinien, welche kryokonserviert wurden. In fünf dieser Zelllinien wurde die Effizienz der induzierbaren shRNA gegen hCAT-1 überprüft. Dafür wurden HG3_hCAT-1_ko-Zellen jeweils in der Abwesenheit oder Anwesenheit von 1 µg/ml Doxyzyklin über 4, 6, 12 und 21 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Level der hCAT-1-Protein-Expression mittels Western Blot untersucht. Um die Viabilität dieser Zellen, trotz potentiell reduzierter hCAT-1-Expression über diesen Zeitraum aufrechtzuerhalten erfolgte die Kultivierung stets in der Gegenwart von RPMI-Vollmedium, in welchem 1 mM Citrullin sowie 67 µM Lysintriptid supplementiert wurden (Abbildung 44). Darüber hinaus wurde, um die Effizienz der Doxyzyklin-abhängigen Induktion der shRNA-Expression zu gewährleisten, jeweils nach 48 Stunden ein Mediumswechsel durchgeführt und die Zellzahl auf eine Millionen Zellen in jeweils drei Milliliter Kulturmedium eingestellt.

Die Untersuchungen zeigten in HG3_hCAT-1_ko-Zellen, welche in der Abwesenheit von 1 µg/ml Doxyzyklin inkubiert worden waren, weiterhin eine starke Expression des hCAT-1. Hingegen war die Protein-Expression dieses Transporters in einer der getesteten monoklonalen Zelllinien -16F6 - bereits nach 4-tägiger Inkubation in der Gegenwart von 1 µg/ml Doxyzyklin im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche ohne Doxyzyklin inkubiert wurden, stark reduziert und blieb konstant auf einem sehr geringen Level über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen (Abbildung 53 A). Damit wurde die Effizienz der shRNA gegen hCAT-1, die Induzierbarkeit dieser shRNA durch Doxyzyklin sowie die Stabilität der Reduktion der hCAT-1-Expression in diesen Zellen gezeigt. Aufgrund dessen wurde diese Zelllinie auch für die weiteren Experimente verwendet und im Folgenden als HG3_hCAT-1_ko-Zellen bezeichnet. Kontrollzellen mit integrierter non-target-shRNA wurden durch die Transduktion eines Virus, welches mit dem Plasmid Tet-pLKO-puro-scr (Arbeitsgruppe [REDACTED], 3. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz) hergestellt wurde, generiert und werden im Folgenden als

HG3_Control-Zellen bezeichnet. In diesem Fall wurde die Zellgesamtpopulation für die Experimente eingesetzt.

Zunächst sollte der Effekt der Induktion der hCAT-1-shRNA-Expression auf die Viabilität und Proliferation der HG3_hCAT-1_ko-Zellen untersucht werden. Dafür wurden HG3_hCAT-1_ko- oder HG3_Control-Zellen über 6 Tage in RPMI-Vollmedium, welches mit 1 mM Citrullin und 67 μ M Lysintriptid supplementiert wurde, in der An- oder Abwesenheit von 1 μ g/ml Doxyzyklin inkubiert. Auch hier erfolgte jeweils nach 48 Stunden ein Mediumswechsel sowie die Einstellung der Zellzahl auf eine Millionen Zellen in drei Milliliter Medium. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden ohne die Supplementation von Citrullin und des Lysintriptids inkubiert und die Viabilität wurde durch die durchflusszytometrische Detektion Annexin- und Propidiumiodid-positiver Zellen sowie die Proliferation durch die Inkorporation von [3 H]Thymidin festgestellt.

In HG3_hCAT-1_ko-Zellen wurden nach Induktion der hCAT-1-shRNA 75,7 \pm 3,5 % Annexin- sowie 20,3 \pm 0,1 % Propidiumiodid-positiv Zellen und damit eine starke Induktion der Apoptose festgestellt (Abbildung 53 B und C). Damit einhergehend war auch die Proliferation der HG3_hCAT-1_ko-Zellen unter diesen Bedingungen um 71,0 \pm 15,6 % reduziert (Abbildung 53 D). Hingegen war die Viabilität und Proliferation der HG3_Control-Zellen durch die Induktion der shRNA-Expression nicht beeinträchtigt (Abbildung 53 D).

Zusammenfassend konnten demnach die anti-proliferativen und Apoptose-induzierenden Effekte, welche in der humanen CLL-Zelllinie HG3 nach Reduktion der hCAT-1-Expression durch die konstitutiv-exprimierte shRNA beobachtet wurden (Kapitel 4.3.13), auch in HG3_hCAT-1_ko-Zellen nach Induktion der hCAT-1-shRNA-Expression reproduziert und bestätigt werden.

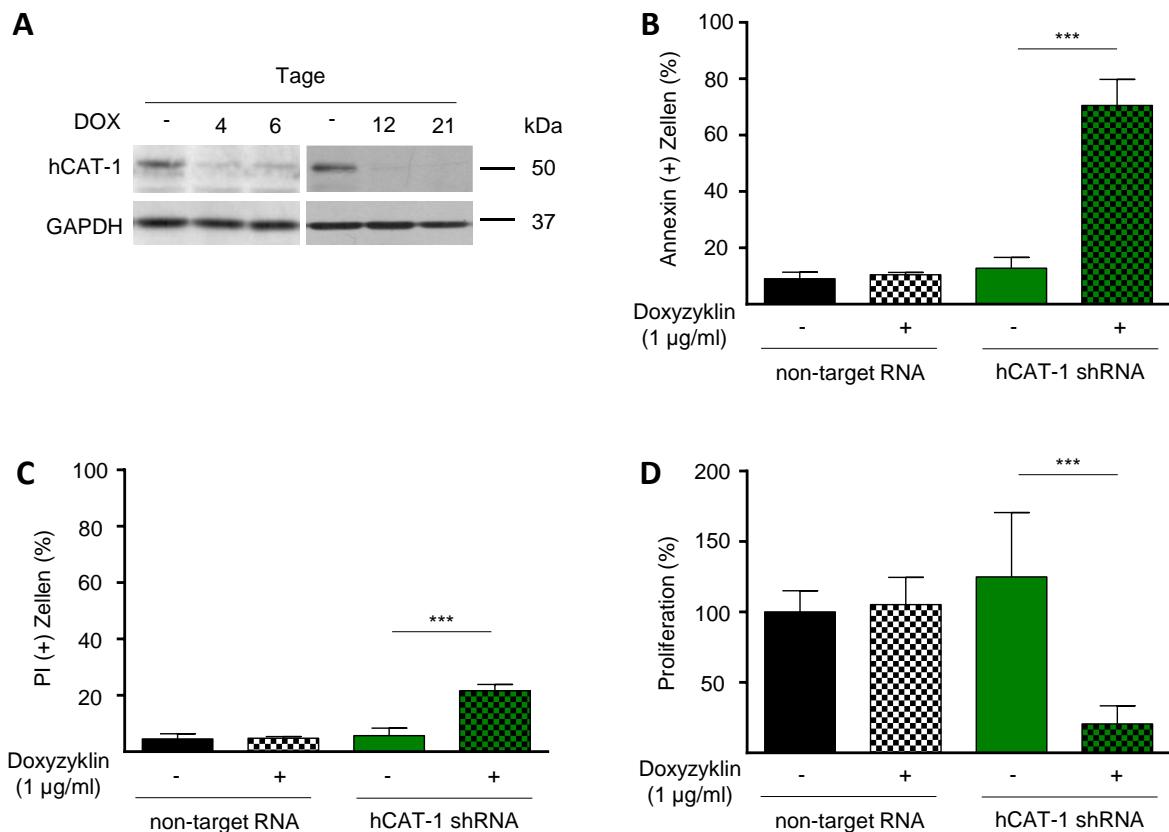


Abbildung 53: Die Doxyzyklin-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt in HG3-Zellen zu einer kompletten Inhibition der Proliferation und der Senkung der Viabilität.

A) HG3_hCAT-1_ko-Zellen wurden über 4, 6, 12 und 21 Tage in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 µg/ml Doxyzyklin (DOX) und in der Gegenwart von 1 mM Citrullin sowie 67 µM Lysintriptid inkubiert. Anschließend wurde die Protein-Expression des hCAT-1 und der GAPDH als Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen untersucht. Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt. B-D) HG3_hCAT-1_ko- (hCAT-1 shRNA) oder HG3_Control-Zellen (non-target RNA) wurden jeweils über 6 Tage in der Gegenwart von 1 mM Citrullin und 67 µM Lysintriptid sowie der Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 1 µg/ml Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne die Supplementation von Citrullin und des Lysintriptids für weitere 48 Stunden kultiviert. B,C) Die Zellviabilität wurde durch die durchflusszytometrische Detektion B) Annexin- oder C) Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=3). D) Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent der HG3_Control-Zellen, welche ohne Doxyzyklin inkubiert wurden (Mittelwert: 165043 ± 36096 cpm, n=9). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test (***: p ≤ 0,001).

4.3.15 Die Reduktion der hCAT-1-Expression führt in einem HG3_hCAT-1_ko-Xenograftmodell zu der Verlangsamung des Tumorwachstums

Nach der erfolgreichen Etablierung der Doxyzyklin-induzierbaren Reduktion der hCAT-1-Expression in der humanen CLL-Zelllinie HG3 sollte die Rolle des hCAT-1 für diese Zellen auch *in vivo* durch ein Xenograftmodell untersucht werden. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ HG3_hCAT-1_ko- oder HG3_Control-Zellen subkutan in die linke Flanke von NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgt^{m1Wjl}/SzJ (NSGTM)-Mäusen injiziert. NSG-Mäuse sind defizient für B- und T-Lymphozyten sowie für funktionelle NK-Zellen. Aufgrund dieser Insuffizienz des adaptiven Immunsystems eignen sich diese Mäuse hervorragend für die Einbringung humaner

Tumorzellen. Die shRNA-Expression wurde durch 1 mg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser *ad libitum* induziert. Kontrollmäusen wurde Trinkwasser ohne Doxyzyklin angeboten. Das Tumorstadium wurde 2 bis 3 Mal pro Woche mit Hilfe eines Messschiebers festgestellt. Das Tumorstadium errechnete sich durch die Höhe x Breite². Sobald die Tumorstadiumgröße 1500 mm³ überschritten hatte wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme des Tumorgewebes für die Untersuchung der hCAT-1-Protein-Expression durch einen Western Blot.

Das Experiment zeigte ein deutlich verzögertes Wachstum von Tumoren aus HG3_hCAT-1_ko-Zellen nach Induktion der hCAT-1-shRNA-Expression im Vergleich zu Tumoren aus HG3_hCAT-1_ko-Zellen ohne Induktion der shRNA-Expression oder HG3_Control-Zellen mit und ohne Doxyzyklin-Behandlung (Abbildung 54 A). Durchschnittlich erreichten die HG3_hCAT-1_ko-Tumoren erst nach $26,2 \pm 1,1$ Tagen eine Größe von 1500 mm³, während die Tumore ohne Doxyzyklin dieses Volumen bereits nach $19,4 \pm 1,3$ Tagen erreichten. Letzteres war vergleichbar mit den Tumoren, welche aus HG3_Control-Zellen gebildet wurden. Nach Induktion der non-target-shRNA in diesen Zellen erreichten die Tumoren die Größe von 1500 mm³ nach $16,2 \pm 0,4$ und ohne shRNA nach $18,0 \pm 1,9$ Tagen (Abbildung 54 A). Demnach resultierte die Reduktion der hCAT-1-Expression in der deutlichen Verzögerung des Tumorstadiumwachstums in HG3-Xenograftmodellen.

Jedoch konnte das Tumorstadiumwachstum nicht vollständig unterdrückt werden: Bis zum Tag 20 nach Zellinokulation wurde die komplette Repression des Wachstums der HG3_hCAT-1_ko-Zellen beobachtet. Nach diesem Zeitpunkt wurde allerdings eine mit den Kontrollgruppen vergleichbar steile Wachstumskurve festgestellt. Dies lässt einen, von der Tumorzelle unter Arginin- und Lysinmangel entwickelten Rettungsmechanismus, vermuten. Um auszuschließen, dass dieser auf der Re-Expression des hCAT-1 in diesen Tumoren basierte, wurde die hCAT-1-Expression in explantierten HG3_hCAT-1_ko-Tumoren nach oder ohne shRNA-Induktion mittels Western Blot-Analysen untersucht. Dies bestätigte die stabile Reduktion der hCAT-1-Expression nach Induktion der shRNA gegen hCAT-1, wohingegen HG3_hCAT-1_ko-Tumoren ohne Doxyzyklin-Behandlung nach wie vor eine hohe hCAT-1-Expression aufwiesen (Abbildung 54 C).

Arginin kann intrazellulär über die Enzyme ASL und ASS aus der neutralen Aminosäure Citrullin synthetisiert werden. Somit wären auch nach suffizienter hCAT-1-Expressionssenkung bei ausreichender Citrullinsubstitution genügend hohe intrazelluläre Argininkonzentrationen für die Re-Induktion der Zellteilung zu erwarten. In HG3-Zellen wurde die Induktion der ASS-Expression unter Argininmangel gezeigt (Abbildung 45). Im Folgendem

wurde untersucht, ob in explantierten HG3_hCAT-1_ko-Tumoren mit oder ohne Doxyzyklin-induzierter shRNA-vermittelter hCAT-1-Suppression die ASS exprimiert ist.

Tatsächlich konnten vergleichbar hohe Mengen ASS-Protein sowohl in Tumoren nach hCAT-1-Expressionssenkung als auch in den Tumoren ohne Doxyzyklin-induzierter shRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 54 C).

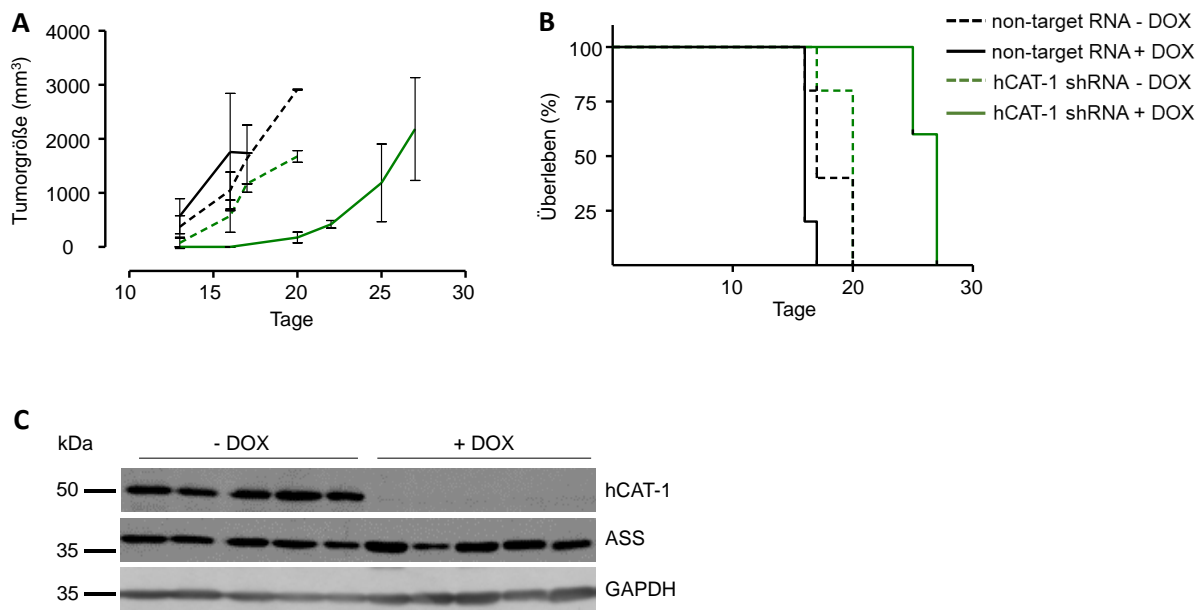


Abbildung 54: Die Doxyzyklin-induzierte, shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression führt *in vivo* zu der Verzögerung des Tumorwachstums.

2,5 x 10⁶ HG3_hCAT-1_k.o.- (hCAT-1 shRNA, grün) oder HG3_Control-Zellen (non-target RNA, schwarz) wurden subkutan in die linke Flanke von NSG-Mäusen injiziert. Anschließend wurde die shRNA-Expression durch die Gabe von 1 mg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser ad libitum induziert (+ DOX, durchgezogene Linie). Die Kontrollgruppen erhielten Doxyzyklin-freies Wasser (-DOX, gestrichelte Linie). (A) Die Tumorgröße und (B) das Überleben wurden beobachtet (n=5). (C) Die Expression von hCAT-1, ASS und der GAPDH als Ladekontrolle wurde in den nach dem Töten der Tiere isolierten Tumoren mittels Western Blot-Analysen untersucht (n=5). Vor der Analyse wurden die Zellysate mit N-Glykosidase behandelt.

Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 kann unter Argininmangel *in vitro* durch die Gegenwart von 1 mM Citrullin aufrechterhalten werden. *In vivo* stehen den ASS-positiven HG3_hCAT-1_ko-Tumoren jedoch lediglich geringe Citrullinmengen von 40-60 µM im murinen Blutplasma zur Verfügung (Jones, 2015; Sailer, 2013). Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob diese geringen Citrullinmengen für die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 ausreichend sind und demnach die intrazelluläre Argininsynthese durch die Induktion der ASS-Expression als Rettungsmechanismus in dem hier genutzten Xenograftmodell in Frage kommt. Dafür wurden HG3-Zellen in der Gegenwart von 1000 µM Arginin oder ohne Arginin in der Anwesenheit von 1000, 500, 150, 75, 38,5, 19 oder 0 µM Citrullin für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation durch den Einbau von [³H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt.

Die Untersuchungen zeigten, wie bereits in Abbildung 44 dargestellt, dass unter Argininmangel durch die Gegenwart von 1000 μM Citrullin die Proliferation von HG3-Zellen aufrechterhalten werden kann. Dies bestätigte sich ebenfalls in der Anwesenheit von nur 500 μM Citrullin. Jedoch war die Proliferation dieser Zellen nach 48-stündiger Inkubation in der Gegenwart von nur 150 μM Citrullin bereits um $49,3 \pm 25,6 \%$ gegenüber dieser mit 1000 μM Citrullin gesunken und war in der Gegenwart physiologischer Citrullinkonzentrationen (40-60 μM) fast vollständig inhibiert (Abbildung 55).

Zusammenfassend ist, diesen Daten zufolge, die intrazelluläre Argininsynthese aus Citrullin als Rettungsmechanismus der HG3_hCAT-1_ko-Tumoren sehr unwahrscheinlich. Demnach kommt Argininmangel, induziert durch die Inhibition des verantwortlichen Arginintransporters hCAT-1, in der Gegenwart physiologischer Citrullinkonzentrationen für die Therapie auch ASS-positiver CLLs in Frage.

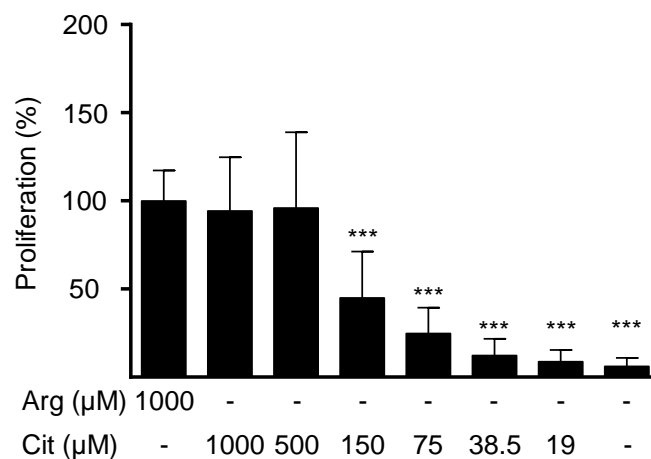


Abbildung 55: Die Proliferation der CLL-Zelllinie HG3 kann unter Argininmangel durch physiologische Citrullinkonzentrationen nicht aufrechterhalten werden.

HG3-Zellen wurden über 48 Stunden in der Gegenwart von 1000 μM Arginin (Arg) oder ohne Arginin in der Anwesenheit von 1000, 500, 150, 75, 38,5, 19 oder 0 μM Citrullin (Cit) inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation durch den Einbau von [^3H]Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von 1000 μM Arginin inkubiert wurden ($n=9$). Die statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Es wurde die Proliferation der Zellen in der Gegenwart unterschiedlicher Citrullinkonzentrationen mit der in Zellen, welche in der Anwesenheit von 1000 μM Citrullin inkubiert wurden, verglichen (***: $p \leq 0,001$).

4.4 Kann die toxische Wirkung der Hemmung der hCAT-1-Expression auf humane CLL-Zellen durch Canavanin verstärkt werden?

Die Inhibition des Arginintransports durch die Reduktion der hCAT-1-Expression resultierte in humanen CLL-Zellen *in vitro* in der vollständigen Hemmung der Zellproliferation sowie der Induktion der Apoptose. Hingegen konnte *in vivo* unter den aktuellen Versuchsbedingungen lediglich eine Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden.

Die zellschädigende Wirkung des Argininanalogons Canavanins wurde bereits für verschiedene Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* demonstriert. Canavanin wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Arginin während der Translation in Proteine eingebaut, was in der Fehlfaltung und Dysfunktion dieser Moleküle resultiert und die Induktion des Zelltods zur Folge hat. Der Einbau von Canavanin in Proteine erfolgt stets kompetitiv zu Arginin, demnach die zelltoxische Wirkung unter Arginindefizienz am ausgeprägtesten ist (Bence, 2003). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob der zytotoxische Effekt des durch hCAT-1-Suppression induzierten Argininmangels auf CLL-Zellen durch die zusätzliche Behandlung mit Canavanin verstärkt werden kann.

4.4.1 Canavanin zeigt unter Argininmangel auch in humanen CLL-Zellen zytotoxische Wirkung

Um die zelltoxische Wirkung Canavanins auf Zellen der humanen CLL-Zelllinie HG3 zu testen, wurden diese über 48 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin oder unter Argininmangel in der An- oder Abwesenheit von 100 μ M Canavanin inkubiert. Da in HG3-Zellen aufgrund der Induktion der ASS-Expression in der Abwesenheit von Arginin die Zellproliferation durch die intrazelluläre Synthese von Arginin aus Citrullin aufrechterhalten werden kann (Abbildung 45 und 55), wurden diese Zellen zusätzlich in der Gegenwart von 1 mM Citrullin mit oder ohne 100 μ M Canavanin inkubiert. Die Viabilität wurde durch die durchflusszytometrische Detektion Propidiumiodid-positiver Zellen, die metabolische Aktivität mittels MTS-Assay und die Proliferation durch die Inkorporation von [3 H]Thymidin über 16 Stunden festgestellt.

In Arginin-depletierten HG3-Zellen resultierte die 48-stündige Inkubation der Zellen in der Gegenwart von Canavanin in der starken Reduktion der Zellviabilität um $83,6 \pm 10,0$ % verglichen mit den Zellen, welche ohne Canavanin inkubiert worden waren. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt die Zellviabilität unter Arginindefizienz allein bereits auf $68,7 \pm 10,0$ % der Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM Arginin inkubiert worden waren, reduziert. Die toxische Wirkung Canavanins konnte unter Argininmangel durch die Anwesenheit von Citrullin nicht aufgehoben werden. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Reduktion der Zellviabilität um $85,78 \pm 7,8$ % gegenüber Kontrollzellen beobachtet (Abbildung 56 A).

Der Metabolismus der HG3-Zellen war bereits unter Arginindepletion allein um $61,9 \pm 13,6$ % im Vergleich zu Zellen, welche in der Gegenwart von Arginin kultiviert wurden, reduziert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Inkubation dieser Zellen in Arginin-freiem Medium, nach Supplementation mit 1 mM Citrullin beobachtet. In der Anwesenheit von Canavanin unter

Argininmangel war die Stoffwechselaktivität der HG3-Zellen nur noch marginal detektierbar. (Abbildung 56 B). Demnach schien der Effekt des Argininanalogons auf den Stoffwechsel stärker zu sein als auf die Viabilität. Auch die Proliferation der HG3-Zellen war schon durch die Abwesenheit von Arginin stark eingeschränkt und um $95,5 \pm 1,0$ % im Vergleich zu den Kontrollzellen (1mM Arginin) reduziert. Damit war der Effekt des Argininmangels auf die Proliferation sogar noch deutlicher als auf den Zellmetabolismus. Allerdings konnte unter Substitution von Citrullin eine Steigerung der Proliferation um $32,2 \pm 8,6$ % im Vergleich zu der Argininmangel-Bedingung detektiert werden. Die Proliferation nach Inkubation der Zellen in der Anwesenheit von Canavanin unter Argininmangel war vergleichbar mit dieser unter Arginindepletion allein. Allerdings konnte die Rekonstitution der Proliferation in der Anwesenheit von 1 mM Citrullin in Kombination mit Canavanin nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, unter dieser Bedingung war die Zellproliferation ebenfalls komplett zum Erliegen gekommen (Abbildung 56 C). Bemerkenswert war jedoch, dass die Viabilität, der Metabolismus sowie die Proliferation der Zellen in der Gegenwart von 1 mM Arginin durch Canavanin nicht beeinflusst wurden (Abbildung 56).

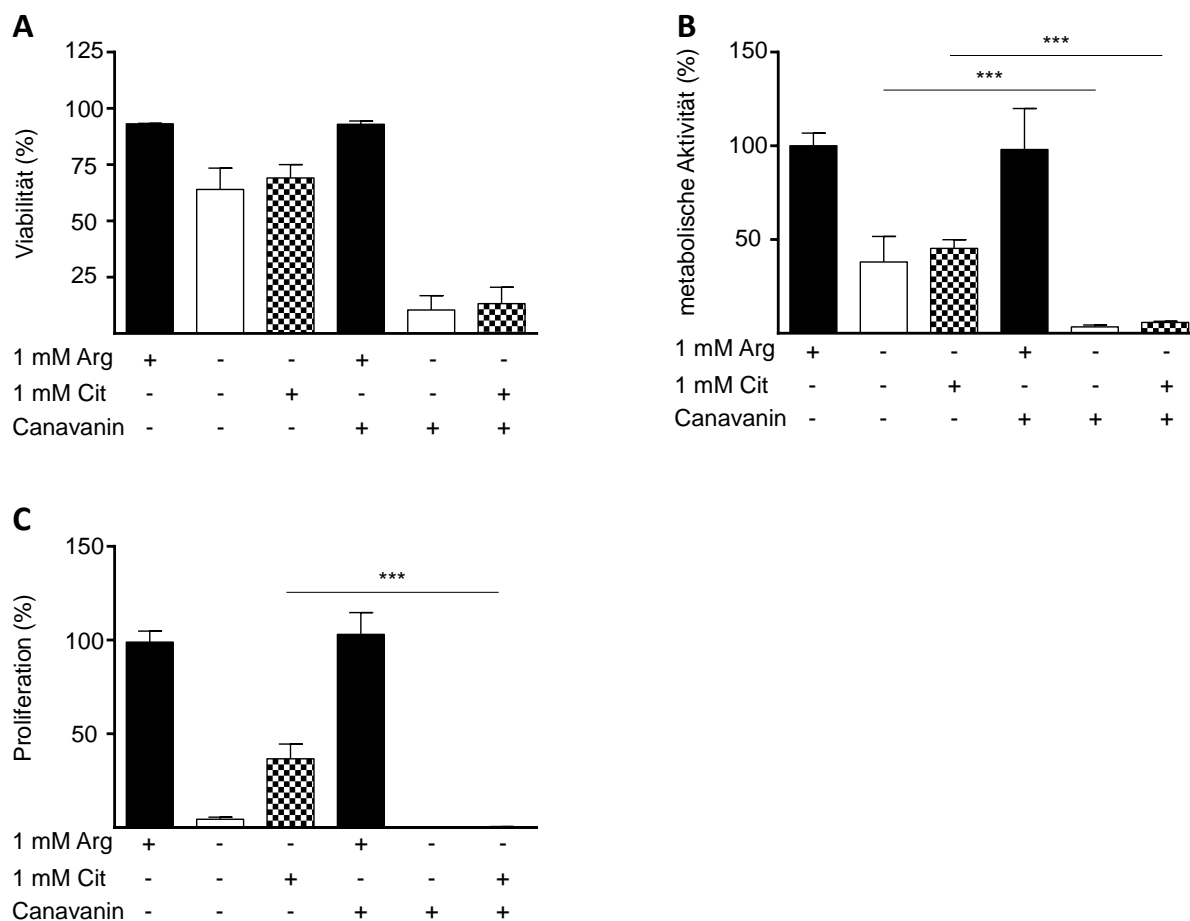


Abbildung 56: Canavanin reduziert unter Argininmangel die Viabilität, die metabolische Aktivität und die Proliferation von HG3-Zellen.

HG3-Zellen wurden über 48 Stunden in der Anwesenheit von 1 mM Arginin, unter Argininmangel oder in der Gegenwart von 1 mM Citrullin, jeweils mit oder ohne 100 μ M Canavanin inkubiert. A) Die Viabilität der Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Detektion Propidiumiodid-positiver Zellen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent (n=2). B) Die metabolische Aktivität wurde mittels MTS-Assay analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in der Gegenwart von Arginin ohne Canavanin inkubiert wurden (n=6). C) Die Proliferation der Zellen wurde durch die Inkorporation von [3 H]Thymidin über 16 Stunden analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent der Zellen, welche in Gegenwart von Arginin ohne Canavanin inkubiert wurden (n=6). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen One-way ANOVA und anschließendem Tukey-Test. Innerhalb einer Arginin-/Citrullinbedingung wurden die ermittelten Daten mit und ohne Canavanin miteinander verglichen (***: p \leq 0,001).

Während der Induktion der Apoptose wird das Proenzym der Caspase 3 (35 kDa) schrittweise über ein 19 kDa-Protein zu der aktiven Form, mit der Größe von 17 kDa gespalten. Die Detektion der gespaltenen Caspase 3 ist demnach eine zu der FACS-basierten Ermittlung Propidiumiodid-gefärbter Zellen alternative Methode zur Bestimmung der Apoptoserate. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob die Spaltung der Caspase 3 nach Inkubation humaner CLL-Zellen in der Gegenwart von Canavanin induziert wird. Dafür wurden HG3-Zellen über 6, 12 und 24 Stunden in der Gegenwart von 1 mM Arginin oder unter Argininmangel in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 μ M Canavanin inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot-Analysen die Caspase 3 untersucht.

Die Untersuchungen zeigten die Spaltung der Caspase 3 in HG3-Zellen nach Inkubation unter Arginindepletion in der Gegenwart von Canavanin (Abbildung 57). Während die Menge des detektierten Proenzym unter dieser Bedingung über 12 und 24 Stunden abnahm, konnte im selben Zeitraum die aktive Form der Caspase im hohen Maß detektiert werden (Abbildung 57 A, B und D). Das 19 kDa-Übergangsprotein war nach 6 und 12 Stunden feststellbar (Abbildung 57 A und C).

Zusammenfassend wurde demnach gezeigt, dass Canavanin auch auf CLL-Zellen unter Argininmangel zelltoxische Wirkung zeigt. Dies wurde durch die starke Reduktion der Viabilität, der metabolischen Aktivität und der Zellproliferation sowie dem Nachweis der aktiven Form der Caspase 3 nach Canavanin-Exposition unter Argininmangel demonstriert. Demnach könnte die Induktion eines intrazellulären Argininmangels durch die Hemmung des verantwortlichen Arginintransporters hCAT-1 in Kombination mit Canavanin als Therapie für die CLL in Erwägung gezogen werden.

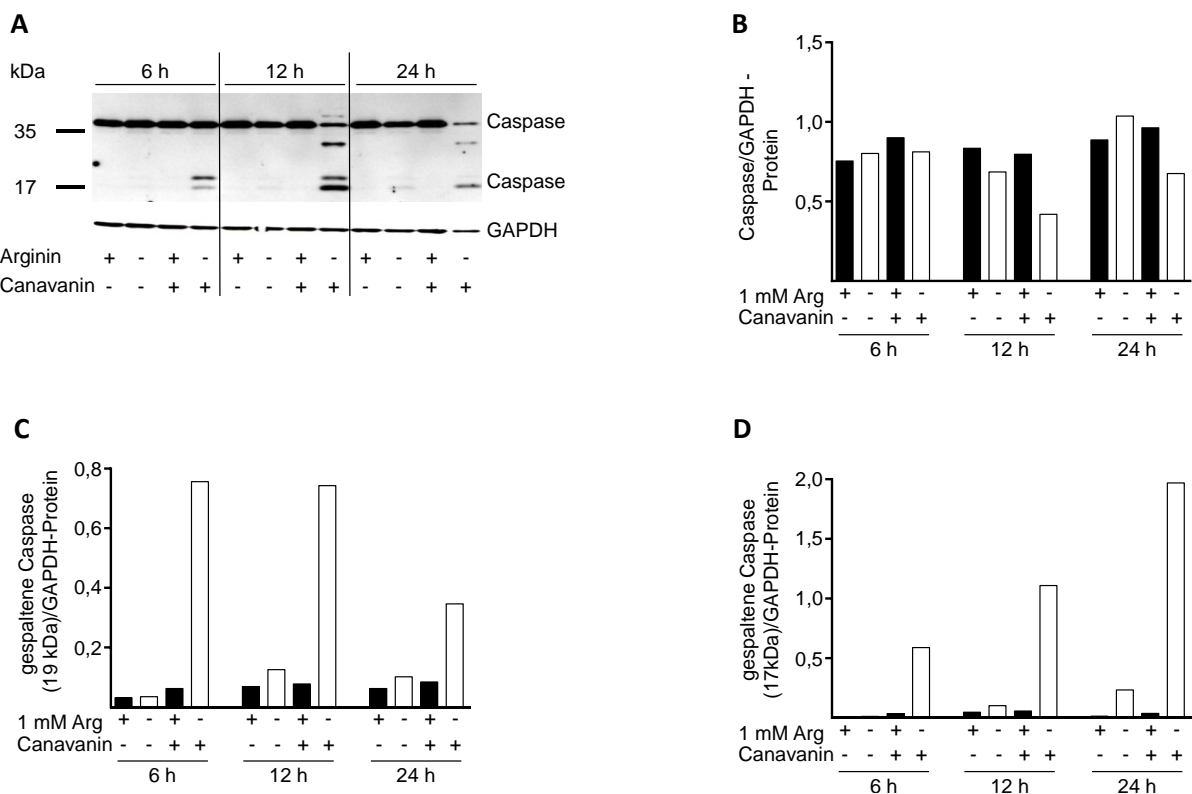


Abbildung 57: Unter Arginindepletion induziert Canavanin in HG3-Zellen den programmierten Zelltod.

HG3-Zellen wurden über 6, 12 und 24 Stunden (h) in der Anwesenheit von 1 mM Arginin oder unter Argininmangel jeweils mit oder ohne 100 μ M Canavanin inkubiert. Anschließend wurde mittels Western Blot die Protein-Expression der Caspase 3 sowie der GAPDH als Ladekontrolle untersucht. Dargestellt ist A) der Western Blot und die quantitative Auswertung der Expression B) des Caspase 3-Proenzym, C) des 19 kDa-Caspase-Proteins und D) des aktiven 17 kDa-umfassenden Caspase 3-Proteins jeweils in Relation zu GAPDH (n=1).

5 Diskussion

Die Verfügbarkeit der kationischen Aminosäure Arginin ist für die effiziente Funktion, die Proliferation und das Überleben jeder Zelle unentbehrlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Argininverfügbarkeit sowohl für Tumor-bekämpfende T-Lymphozyten als auch für chronisch lymphatische Leukämiezellen untersucht. Es gelang die Identifizierung des verantwortlichen Arginintransporters in beiden untersuchten Zelltypen. Zusammenfassend bilden die Ergebnisse dieser Analysen die Basis für die Entwicklung einer neuen Behandlungsstrategie der CLL und werden im Folgendem ausführlich diskutiert.

5.1 Der kationische Aminosäuretransporter-1 (hCAT-1) ist als Arginin-Importeur für die T-Zell-Proliferation unentbehrlich

Durch die Antigen-vermittelte Stimulation differenzieren T-Lymphozyten zu stark proliferierenden Effektorzellen, deren Funktion an die ausreichende Verfügbarkeit von Nährstoffen geknüpft ist (Molinier-Frenkel, 2017). In den letzten Jahren wurde neben der Rolle von Glukose auch die Bedeutung neutraler Aminosäuren für T-Lymphozyten ausführlich untersucht (Johnson, 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die stimulationsabhängige Expression des humanen kationischen Aminosäuretransporters 1 (hCAT-1) und der über diesen Transporter vermittelte Import der kationischen Aminosäure Arginin als bedeutende Komponente für die effiziente Proliferation humaner T-Lymphozyten identifiziert. Damit wurde erstmals die Rolle eines kationischen Aminosäuretransporters für die Funktion humaner T-Zellen beschrieben. Dies ergänzt bereits publizierte Erkenntnisse betreffend der Rolle neutraler Aminosäuretransporter in diesen Immunzellen: In anti-CD3/anti-CD28-ko-aktivierten, murinen T-Zellen wurde die Steigerung der Glutaminaufnahme korrespondierend mit der induzierten Expression der neutralen Aminosäuretransport-Proteine SNAT1, SNAT2 (Carr, 2010) sowie ASCT2 (Nakaya, 2014) beschrieben. Darüber hinaus korreliert die Differenzierung muriner, naïver T-Lymphozyten zu IFN- γ -produzierenden T_H1- und IL-17-produzierenden T_H17-CD4⁺-T-Zellen direkt mit der Expression von ASCT2 (Nakaya, 2014). Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls für den System L Transporter LAT1 in Antigen-aktivierten, murinen T-Zellen beobachtet werden (Sinclair, 2013). Auch die Expression dieses Transporters und die damit verbundene Aufnahme neutraler Aminosäuren wurde als stimulationsabhängig sowohl in murinen als auch in humanen T-Lymphozyten beschrieben (Hayashi, 2013; Sinclair, 2013).

Generell führt der Mangel jeder essentiellen Aminosäure zu der Einschränkung der T-Zellaktivierung und -proliferation (Carr, 2010; Cobbold, 2009; Rodriguez, 2007). Am häufigsten wurde jedoch ein Defizit der kationischen Aminosäure Arginin beschrieben, warum der Effekt von Argininmangel auf diese Immunzellen bislang am ausführlichsten untersucht wurde: Die Verfügbarkeit von Arginin kann unter (patho)-physiologischen Bedingungen, vermittelt durch die Freisetzung der Arginin-depletierenden Enzyme Arginase 1 und NO-Synthase durch sogenannte „Myeloid-derived suppressor cells“ (MDSCs), reguliert werden (Bronte, 2005). Bei MDSCs handelt es sich um eine heterogene Population inkomplett differenzierter myeloider Zellen (Gabrilovich and Nagaraj 2010). Murine MDSCs wurden ursprünglich durch die Ko-Expression der Oberflächenmarker CD11b und Gr-1 identifiziert. Mittlerweile weiß man, dass diese Zellen in monozytische und polymorphkernige MDSCs (M-MDSC und PMN-MDSCs) unterteilt werden können, welche jeweils durch die Oberflächenmarker $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$ und $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$ charakterisiert sind (Bronte, 2016). Im Menschen ist die Identifizierung komplexer. Humane PMN-MDSCs sind durch die Oberflächenmarker $CD11b^+CD14^-CD15^+$ oder $CD11b^+CD14^-CD66b^+$ und die M-MDSCs durch $CD11b^+CD14^+HLA-DR^{-/low}CD15^-$ definiert (Bronte et al. 2016). Die Akkumulation von MDSC wurde während der folgenden Ereignisse beschrieben: akute und chronische Inflammation, Tumorwachstum, Transplantat-Abstoßungsreaktionen, Chemotherapie, Autoimmunerkrankungen und Immunstress (Bronte, 2005; Rodriguez, 2017). Im Tumormilieu wurde die immun-inhibitorische Arginindepletion, induziert durch MDSC-Arginase als einer der wichtigsten Komponenten des sogenannten „Tumor immune escape“-Mechanismus identifiziert (Draghiciu, 2015). Demnach ist die Versorgung von T-Zellen mit Arginin für deren Funktion elementar und macht Arginintransporter zu potentiellen regulatorischen Elementen der adaptiven Immunantwort. Erste Daten bezüglich der Charakterisierung des Arginintransports in T-Zellen wurden bereits vor über 25 Jahren bekannt. Im Jahr 1992 wurde die gesteigerte Expression des murinen CAT-1 in Concanavalin A-, Phorbolmyristataacetat (PMA)- oder Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Splenozyten und Thymozyten beschrieben (Yoshimoto, 1992). Im selben Jahr wurde die Induktion des System y^+ -vermittelten Aminosäuretransportes in Phytohämagglutinin (PHA)-aktivierten humanen T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen bekannt (Boyd, 1992). Darüber hinaus wurde in murinen Concanavalin A-aktivierten T-Zellen die Expression des CAT-2B nachgewiesen (MacLeod, 1990). Trotz dieser frühen Erkenntnisse blieb die Identifizierung des verantwortlichen Arginintransport-Proteins in humanen T-Lymphozyten bislang aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Thema wieder aufgegriffen. Es wurde die Induktion des

System γ^+ -vermittelten Arginintransports in primären humanen anti-CD3/anti-CD28-stimulierten T-Zellen (Abbildung 12, 13 und 14) sowie die Stimulations-induzierte Expression des hCAT-1 in diesen Immunzellen gezeigt (Abbildung 5 und 6). Darüber hinaus wurde eine marginale Expressionssteigerung des hCAT-3 festgestellt (Abbildung 4). Jedoch kann eine nennenswerte Beteiligung dieses Transporters am System γ^+ -vermittelten Arginintransport in humanen T-Lymphozyten aufgrund der vergleichsweise schwachen Expression ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu in murinen T-Zellen (MacLeod, 1990) konnte keine Expression des Transporters CAT-2B nachgewiesen werden (Abbildung 4). Die siRNA-vermittelte Senkung der hCAT-1-Expression in humanen T-Zellen resultierte in einer quantitativ vergleichbaren Reduktion des Arginintransports (Abbildung 20), was den hCAT-1 als hauptverantwortlichen Arginintransporter in stimulierten humanen T-Zellen identifizierte und gleichzeitig weitere CAT-Transporter für diese Rolle ausschloss. Die siRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression in stimulierten T-Zellen resultierte, selbst in der Gegenwart von suffizienten Mengen an Arginin (1,14 mM, Endkonzentrationen im RPMI-Vollmedium), in einer signifikanten Inhibition der Zellproliferation (Abbildung 21). Dies war erstaunlich, da trotz verminderter Argininaufnahme um $63,8 \pm 9,5$ % in diesen Zellen die intrazelluläre Argininkonzentration lediglich um $30,3 \pm 0,6$ % reduziert war (Abbildung 20). Dies lässt auf den Bedarf hoher Arginin-Importraten zur Aufrechterhaltung der suffizienten T-Zell-Proliferation schließen. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass im Gegensatz zu der mRNA- die Protein-Expression des System γ^+ L-Transporters γ^+ LAT2 in stimulierten T-Zellen induziert war. Jedoch ist der Beitrag dieses Transporters zum Argininimport unwahrscheinlich, da es sich bei γ^+ LAT2 unter physiologischen Bedingungen um einen Argininexporter handelt (A. Bröer, 2000; Verrey, 2004). Dementsprechend führte die Senkung der γ^+ LAT2-Expression in K562-Zellen zu einer Steigerung der intrazellulären Argininkonzentration (Rotoli, 2009). Kationische Aminosäuretransporter transportieren neben Arginin auch die essentielle Aminosäure Lysin (Closs, 2006). Demnach sollte es nach Reduktion der hCAT-1-Expression intrazellulär, neben der verminderten Argininkonzentration, auch zu der Senkung des Lysinlevels kommen, was die verstärkte anti-proliferative Wirkung der hCAT-1-Expressionsinhibition, trotz der nur um 30 %-gesenkten intrazellulären Argininkonzentration, erklären könnte.

Die argininabhängige Sekretion bestimmter T-Zell-Zytokine ist schon seit einigen Jahren bekannt. Neben der Inhibition der IFN- γ -Sekretion (Abbildung 3) (Feldmeyer, 2012; Munder, 2006) werden in stimulierten T-Lymphozyten unter Argininmangel auch die Ausschüttung der Zytokine IL-10 und TNF- β supprimiert, wohingegen IL-2, IL-6 und IL-8 Arginin-unabhängig

translatiert werden (Feldmeyer, 2012; Munder, 2006). Unabhängig von der Argininverfügbarkeit sekretieren naive T-Zellen nach Stimulation nur 1/400 der IFN- γ -Menge von Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 9). Diese Feststellung ist in Übereinstimmung mit der generell geringeren Kalzium-Freisetzung und damit verbundenen schwächeren Aktivierung des T-Zellrezeptors in naiven T-Lymphozyten, verglichen mit zuvor bereits aktivierten T-Zellen (Ericsson, 1996; Robinson, 1993). Durch die siRNA-vermittelte Herabregulation der hCAT-1-Expression in aktivierten T-Zellen wurde überraschenderweise weder die Sekretion Arginin-abhängiger noch -unabhängiger T-Zellzytokine beeinflusst (Abbildung 22). Die IFN- γ -Sekretion in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulationen war in der Gegenwart von lediglich 20 μ M Arginin noch weitgehend uneingeschränkt, wohingegen die Zellproliferation unter diesen Bedingungen bereits komplett inhibiert war (Werner, 2016). Dies lässt vermuten, dass die Zytokinsynthese in T-Zellen im Vergleich zu der Zellproliferation weniger sensibel auf Argininmangel-Situationen ist und die residualen intrazellulären Argininlevel nach hCAT-1-Expressionsinhibition (Abbildung 20 B), zwar nicht mehr für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation wohl aber für die Zytokinsynthese ausreichte. Darüber hinaus könnte die Zytokinausschüttung in humanen T-Lymphozyten im Gegensatz zu deren Proliferation unsensibel gegenüber dem potentiell auftretenden Defizit an Lysin sein. Der Mangel der neutralen Aminosäure Glutamin führte in murinen T-Zellen zu einer starken Reduktion der Sekretion von IFN- γ und IL-2 (Carr, 2010). Der Transport neutraler Aminosäuren über den System L-Transporter LAT1 scheint essentiell für die Zytokinsekretion sowohl humaner als auch muriner T-Lymphozyten zu sein (Hayashi, 2013; Sinclair, 2013). Demnach ist die Zytokinproduktion möglicherweise sensitiver gegenüber dem Mangel an neutralen im Vergleich zu kationischen Aminosäuren. Auch die Differenzierung von T-Zellen scheint durch Aminosäurebereitstellung beeinflusst zu werden: So ist die Differenzierung LAT^{-/-}-T-Zellen zu TH1- und TH17-T-Zellen gehemmt, wohingegen die Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen unbeeinflusst bleibt (Sinclair, 2013). Der Einfluss von Argininmangel auf die Differenzierungsfähigkeit von T-Lymphozyten ist bislang ungeklärt. Jedoch ist bekannt, dass die Gegenwart supraphysiologischer Argininkonzentrationen (4 mM) die Differenzierung zu Gedächtnis-T-Zellen begünstigt (Geiger, 2016).

Nur teilweise bekannt ist der Effekt von Argininmangel auf intrazelluläre Sensoren und die Signalweiterleitung in T-Zellen. Die Expression der ζ -Kette des T-Zellrezeptors ist unter Argininmangel überproportional reduziert, was zu Einschränkungen der T-Zellrezeptor-abhängigen Signaltransduktion beitragen könnte (Munder, 2006; Zea, 2005). Allerdings kommt es unter Argininmangel auch zu einer Einschränkung der T-Zellproliferation, wenn diese Zellen

unabhängig vom T-Zellrezeptor durch PMA und Ionomycin stimuliert werden (Munder, 2006). Deshalb muss auch ein T-Zellrezeptor-unabhängiger Signalweg in Betracht gezogen werden. Aminosäuremangel führt durch die Akkumulation unbeladener tRNAs zu der Induktion der „General control nonderepressible 2“- (GCN2)-Kinaseaktivität, welche durch die Phosphorylierung des eukaryotischen Translation-Initiationsfaktors 2α (eIF2 α) eine Inhibition der Translation der meisten mRNAs bewirkt (Van de Velde, 2016). Die Rolle der GCN2 wird in T-Zellen aktuell kontrovers diskutiert. Unter Tryptophanmangel wurde in murinen T-Zellen, parallel zu der Inhibition der Proliferation die Aktivierung der GCN2 nachgewiesen (Munn, 2005). Der GCN2-knock-out resultierte in der Desensibilisierung der Proliferation muriner anti-CD3-aktivierter CD8⁺-T-Zellen sowie Ovalbumin I-aktivierter CD8⁺-OT-I-T-Zellen gegenüber Tryptophanmangel über einen Untersuchungszeitraum von drei Tagen (Munn, 2005). Ebenfalls konnte in murinen anti-CD3/anti-CD28-stimulierten T-Lymphozyten eine Aufhebung der Proliferationsinhibition unter Argininmangel nach Hemmung der GCN2-Expression gezeigt werden (Rodriguez, 2007). Im Widerspruch zu diesen Daten konnten Van de Velde *et. al.*, allerdings zu einem späteren Analysezeitpunkt nach 6 Tagen, durchaus eine Suppression der Proliferation in GCN2-depletierten, murinen T-Zellen unter Arginin-, Lysin-, Leucin- und Tryptophanmangel nachweisen (Van de Velde, 2016). Fraglich ist, ob die GCN2 ebenfalls in humanen T-Zellen das Signal eines Argininmangels vermittelt und ob die Hemmung dieser Kinase auch hier zu einer Re-Induktion der Proliferation unter Argininmangel führt. Bislang ist für humane T-Lymphozyten lediglich die Phosphorylierung der GCN2-Kinase unter Arginindepletion bekannt (Oberlies, 2009). Trotz stark reduzierter Argininaufnahme und inhibierter Proliferation konnte in humanen T-Zellen nach siRNA-vermittelter Hemmung der hCAT-1-Expression keine Aktivierung der GCN2 nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, Arbeitsgruppe █████). Dies könnte durch die vergleichsweise schwach reduzierte (circa 30%) intrazelluläre Argininkonzentration unter diesen Bedingungen erklärt werden (Abbildung 20 B). Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass die Senkung der Proliferation unter diesen Bedingungen durch einen anderen, bislang noch unbekanntem Signalweg vermittelt wird. Dabei könnte es sich durchaus um die durch den hCAT-1-vermittelten Argininaufnahmeraten selbst handeln. Die Rezeptor/Signalfunktion von Aminosäuretransportern wurde bereits ausführlich für Transportproteine in Hefen und *Drosophila* beschrieben (Hundal, 2009; Kriel, 2011). In MCF-7-Zellen wurde die Aktivierung des mTOR-Signalweges, trotz der pharmakologischen Funktionshemmung des SNAT2 und daraus resultierenden intrazellulären Aminosäuremangels, nachgewiesen (Pinilla, 2011). Dies weist darauf hin, dass nicht nur die intrazelluläre Aminosäurekonzentration für die Aktivierung dieses Signalweges verantwortlich ist, sondern

auch die Bindung eines bestimmten Substrates an ein Transportprotein, welches die Initiation der Signalweiterleitung vermittelt (Pinilla, 2011). In humanen T-Lymphozyten kann nach aktuellem Wissenstand jedoch die Beteiligung des hCAT-1 an der Aktivierung von mTOR ausgeschlossen werden, da trotz der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten persistierenden hCAT-1-Expression unter Argininmangel (Abbildung 6), mTOR unter diesen Bedingungen dephosphoryliert vorliegt (Garcia-Navas, 2012). Die Aktivierung der mTOR-vorgelagerten Serin-Threonin-Kinase AKT scheint jedoch Voraussetzung für die hCAT-1-Expression in stimulierten T-Zellen zu sein (Diplomarbeit [REDACTED], 2012, Arbeitsgruppe [REDACTED]). Die Hyperphosphorylierung der AKT-Kinase in T-Zellen unter Argininmangel (Masterarbeit [REDACTED], 2012, Arbeitsgruppe [REDACTED]) könnte für die uneingeschränkte hCAT-1-Protein-Expression unter dieser Bedingung, in welcher die Senkung der Synthese der meisten Proteine beobachtet wird (Grohmann, 2010), verantwortlich sein. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten nach Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) in U373-Gliomazellen die Translokation des hCAT-1 aus der Plasmamembran in intrazelluläre Kompartimente (Rotmann, 2004). Arginindefizienz resultierte in stimulierten T-Zellen jedoch nicht in der Variation des Anteils dieses Transportproteins in der Plasmamembran (Abbildung 11). Dies wurde weiterhin durch vergleichbare Arginintransportraten in T-Zellen, welche in der An- oder Abwesenheit von Arginin stimuliert wurden, bestätigt (Abbildung 13). Demnach scheint extrazellulärer Argininmangel keine Auswirkungen auf den Arginintransport in humanen T-Lymphozyten zu haben. Im Gegensatz dazu ist der Glukosetransport sowie die Expression des Glukosetransporters Glut 1 durch Arginase-induzierten Argininmangel in murinen T-Zellen stark reduziert (Fletcher, 2015). Auch in der Gegenwart supraphysiologischer Argininkonzentrationen (4 mM) kommt es zu erheblichen Veränderungen im Glukosemetabolismus: Während T-Zellen in der Gegenwart von 1 mM Arginin die Energiegewinnung aus Glukose hauptsächlich über Glykolyse bewerkstelligen, passiert die Glukosemetabolisierung in der Gegenwart hoher Argininkonzentrationen hauptsächlich über die oxidative Phosphorylierung (Geiger, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der hCAT-1 als verantwortlicher Arginintransporter in humanen T-Lymphozyten identifiziert werden. Damit unterscheiden sich diese Immunzellen deutlich von myeloiden Zellen. Sowohl in ruhenden als auch in IFN- γ -aktivierten humanen Monozyten (Rotoli, 2004), sowie in ruhenden und LPS- und IFN- γ -aktivierten humanen Makrophagen (Rotoli, 2007) verläuft die Argininaufnahme vorwiegend γ^+L vermittelt, insbesondere durch den Transporter γ^+LAT1 . In murinen myeloiden und Mikroglia-Zellen wurde nach Aktivierung die Induktion der CAT-2B-Expression beobachtet, wohingegen die

CAT1-Expression unverändert oder reduziert vorlag (Closs, 2000; Kawahara, 2001; Rodriguez, 2004; Yeramian, 2006).

Die Regulation der CAT-1-Expression ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Am ausführlichsten wurde die gesteigerte CAT-1-Expression unter Hungerbedingungen in Gliomazellen der Ratte (Hatzoglou, 2004) sowie in humanen Leberzellen (Bhattacharyya, 2006) beschrieben und wird durch verstärkte Transkription und Translation, sowie durch erhöhte mRNA-Stabilität vermittelt (Bhattacharyya, 2006; Huang, 2010; Majumder, 2009). Es wäre interessant, die genregulatorischen Mechanismen, die der Induktion der hCAT-1-Expression in humanen, aktivierten T-Zellen unter Argininmangel und außerhalb der Hungersituation zu Grunde liegen, zu untersuchen. Erste Hinweise konnten bereits in unserer Arbeitsgruppe gesammelt werden: Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid zog die komplette Inhibition der hCAT-1-mRNA-Expression in stimulierten T-Zellen nach sich. Demnach müssen neu-translatierte Proteine nach Aktivierung der T-Lymphozyten für die Induktion der Expression des hCAT-1 in stimulierten T-Zellen eine Rolle spielen. Erste Versuche weisen auf eine transkriptionelle Regulation hin, wobei der Transkriptionsfaktor NFκB, zu mindestens teilweise involviert zu sein scheint, da es durch seine Hemmung zu einer partiellen Senkung der hCAT-1-mRNA-Expression kam. Es ist allerdings noch unklar, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Regulation handelt (Dissertation ██████████, 2017).

Zusammenfassend kann der kationische Aminosäuretransporter hCAT-1 als ein Schlüsselement der Aktivierung humaner T-Lymphozyten gesehen werden. Durch Manipulation der Funktion oder Expression dieses Transportes ist die gezielte Steuerung der Argininverfügbarkeit und somit die Proliferation dieser Immunzellen möglich. Dies identifiziert den hCAT-1 als eine mögliche Zielstruktur für Immuntherapien im Kontext der spezifischen Regulation der T-Zellfunktion (Abbildung 58).

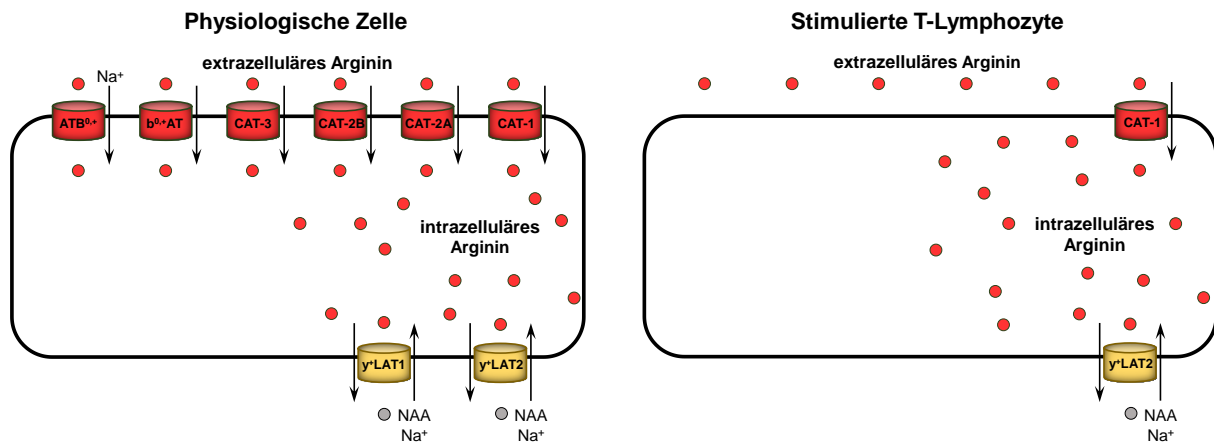


Abbildung 58: Der hCAT-1-vermittelte Arginintransport ist eine bedeutende Komponente für die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten.

In physiologischen Zellen kann der Import der kationischen Aminosäure Arginin (rote Kugeln) durch die Transporter (in rot) CAT-1, CAT-2A, CAT-2B, CAT-3, b⁰⁺AT oder ATB⁰⁺ vermittelt werden. Die Expression dieser Transporter variiert zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben, sodass die 6 aufgelisteten Transporter wahrscheinlich nicht gleichzeitig in einer Zelle exprimiert werden. Die Transporter y⁺LAT1 und y⁺LAT2 (gelb) sind obligatorische Aminosäureaustauscher, die vorwiegend den Natrium (Na⁺)-gekoppelten Import neutraler Aminosäuren (NAA, graue Kugeln) gegen den Export von kationischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) katalysieren. In humanen stimulierten T-Lymphozyten wird der Import von Arginin hauptsächlich durch den CAT-1 vermittelt, was diesen Transporter als eine bedeutende Komponente für die effiziente Funktion humaner T-Lymphozyten identifiziert.

5.2 Identifikation des System L-Transporters LAT1 als Citrullintransporter in primären humanen stimulierten T-Lymphozyten

In inflammatorischen Geweben und Tumoren führt MDSC-Arginase-vermittelter Argininmangel zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Proliferation und Funktion von T-Lymphozyten (Bronte, 2005). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass diese durch Argininmangel induzierte Hemmung der T-Zellproliferation durch die Substitution der neutralen Aminosäure Citrullin in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen (optimal: 20 µM) nivelliert werden kann (Werner 2017). Allerdings war bislang unbekannt wie Citrullin in humane T-Lymphozyten transportiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies durch die Identifikation des System L-Transporters LAT1 als verantwortlichen Citrullintransporter in humanen stimulierten T-Zellen aufgeklärt werden. LAT1 (*SLC7A5*) gehört zu der SLC7-Transporterfamilie und funktioniert als Natrium-unabhängiger Aminosäureaustauscher, der große, neutrale, verzweigt-kettige oder aromatische Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin, Methionin, Valin und Tyrosin als Substrat akzeptiert (Fotiadis, 2013). Die K_M-Werte für diese Aminosäuren liegen für den LAT-1 jeweils im mikromolaren Bereich, was für eine hohe Affinität des Transporters gegenüber diesen Substraten spricht (Pineda, 1999; Wagner, 2001). Für den LAT1 wurden 12 Transmembran-

Domänen mit einem intrazellulär gelegenen C- und N-Terminus vorausgesagt (Wagner, 2001). Dies wurde erst kürzlich durch die Aufklärung der Kristallstruktur des BasC, dem bakteriellen Homolog des LAT1 (Homologie: 26-28 %), bestätigt (Errasti-Murugarren, 2019). Wie bei den Transportern y^+ LAT1 und y^+ LAT2 ist auch die Translokation des LAT1 in die Plasmamembran an das Glykoprotein 4F2hc gebunden (Kanai, 1998; Segawa, 1999). LAT1 wurde in einer Vielzahl von nicht-epithelialen Geweben nachgewiesen, wie beispielsweise in Zellen der Niere, Plazenta, Leber, Thymus, Gehirn und Milz. In Testis und im Kolon ist der LAT1 schwächer exprimiert (Kanai, 1998; Verrey, 2000; Wagner, 2001). Darüber hinaus wurde eine starke LAT1-Expression auch in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Diaz, 1997; Fotiadis, 2013; Sinclair, 2013; Wagner, 2001). In kleinzelligen Lungen, Mamma- und Prostatakarzinomen ist eine hohe LAT1-Expression ein negativer prognostischer Faktor für die Heilungschancen der Erkrankung (Fotiadis, 2013).

Die Aufnahme von Citrullin wurde bereits in anderen Zelltypen untersucht. In murinen neuronalen Zellen ist der Transport von Citrullin Natrium-unabhängig und durch Histidin inhibierbar, was ebenfalls auf eine Beteiligung des LAT1 hinweist (Schmidlin, 2000). In anderen Zellen und Geweben zeigte sich jedoch, dass diese Aminosäure auch von Transportern anderer neutraler Aminosäuretransport-Systeme als Substrat akzeptiert wird: In der humanen kolorektalen Tumorzelllinie Caco-2 ist der Citrullintransport teilweise Natrium-abhängig und wird auch durch kationische Aminosäuren gehemmt. Demnach kommen für die Zellen dieser Tumorzelllinie mehrere Systeme für den Citrullintransport in Frage: das System y^+ L, $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$ (Bahri, 2008). In glatten Muskelzellen der Aorta findet der Citrullintransport neben dem System L auch über das System N statt (Wileman, 2003). In porzinen pulmonalen Endothelzellen wird Citrullin ebenfalls System N-vermittelt über den Natrium-abhängigen Transporter SNAT1 transportiert (Dikalova, 2014). Frühere Daten unserer Arbeitsgruppe suggerieren in Endothelzellen die Möglichkeit des Citrullintransports durch den System N Transporter SN1 (SNAT3 oder *SLC38A3*) (Simon, 2003). Die Beteiligung dieser in anderen Zellen beschriebenen Transporter am Citrullintransport in humanen T-Zellen konnte jedoch aufgrund der durch Expressionsanalysen und Transportstudien ermittelten Daten ausgeschlossen werden: Die Transporter $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ waren in humanen T-Lymphozyten nicht oder nur sehr gering exprimiert (Abbildung 4), aufgrund dessen diese Transporter als Citrullinimporter nicht in Frage kamen. Obwohl der SNAT1 auch in aktivierten humanen T-Lymphozyten exprimiert ist (Matheson, 2015), scheint er für den Citrullintransport in diesen Zellen keine Rolle zu spielen, da hier ein Natrium-unabhängiger Transport von Citrullin festgestellt wurde, der darüber hinaus nur gering durch das SNAT1-Substrat Glycin gehemmt

werden konnte (Abbildung 25, Tabelle 38). Der Transporter SNAT3 wurde bislang in humanen T-Zellen nicht nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die stimulationsabhängige Induktion der Expression des System L-Transporters LAT1 sowie des diesem assoziierten Glykoproteins 4F2hc in humanen T-Lymphozyten gezeigt (Abbildung 28 und 29). Dies bestätigt bereits publizierte Daten (Hayashi, 2013). Unter Mangel der neutralen Aminosäure Tryptophan wurde in stimulierten humanen T-Lymphozyten die Reduktion der LAT1-Protein-Expression festgestellt (Timosenko, 2016). Trotz unveränderter LAT1-mRNA-Level wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Argininmangel die reduzierte Protein-Expression in anti-CD3/anti-CD28-stimulierten humanen T-Zellen beobachtet (Abbildung 29). Ebenso wurde die Senkung der 4F2hc-Protein-Expression unter diesen Bedingungen gezeigt (Abbildung 29). Wahrscheinlich ist dies auf die generelle Einschränkung der Proteintranslation unter Nährstoffmangel zurückzuführen. Interessanterweise scheinen jedoch 20 μM Arginin für die Aufrechterhaltung der LAT1- und 4F2hc-Proteintranslation ausreichend zu sein (Abbildung 29). In Übereinstimmung mit der LAT1- und 4F2hc-Expression war auch die Citrullinaufnahme unter Argininmangel um etwa 50 % gesenkt, wohingegen die Transportraten in T-Zellen, welche in der Gegenwart von 1 mM und 20 μM Arginin aktiviert wurden, vergleichbar waren (Abbildung 23 B). Deswegen überrascht es, dass die intrazelluläre Citrullinkonzentration in unter absolutem Argininmangel und in der Anwesenheit von 20 μM Arginin stimulierten T-Zellen vergleichbar war (Abbildung 24 A). Jedoch weisen die sehr hohen intrazellulären Citrullinkonzentrationen (0 μM Arginin: 7,8 mM; 20 μM Arginin: 8,2 mM) bei einem extrazellulären Angebot von 1 mM dieser Aminosäure über eine Stunde auf einen konzentrierenden Transport hin (Abbildung 24 A), demnach auch eine geringere LAT1-Expression für das Erreichen großer intrazellulärer Citrullinmengen ausreichend zu sein scheint. Erklärt werden könnte dies durch die funktionelle Kopplung des LAT1 an einen anderen neutralen Aminosäuretransporter. Bei LAT1 handelt es sich um einen obligaten Aminosäureaustauscher (Verrey, 2003). In Tumorzellen ist die LAT1-vermittelte Leucinaufnahme an den Export der intrazellulären neutralen Aminosäure Glutamin gebunden. Glutamin wird in diesen Zellen durch den Transporter ASCT2 importiert. Demnach sind die Transporter LAT1 und ASCT2 in diesen Zellen funktionell gekoppelt (Nicklin, 2009). Dies könnte auch in humanen T-Lymphozyten der Fall sein. Eine mögliche Verflechtung der LAT1-vermittelten Citrullinaufnahme mit der Funktion von anderen Transportproteinen ist bislang allerdings nicht beschrieben. In murinen T-Lymphozyten wurde jedoch die funktionelle Verknüpfung des Glutamintransports durch ASCT2 mit dem Glukosetransporter Glut1 beschrieben (Nakaya, 2014).

Durch Citrullin-Aufnahmestudien wurde in unserer Arbeitsgruppe die Affinität des LAT1 gegenüber Citrullin ermittelt. Mit einer K_M von $0,8 \pm 0,1$ mM zeigt LAT1 eine eher geringere Affinität zu Citrullin (Masterarbeit [REDACTED], 2015). In humanen stimulierten T-Lymphozyten wird dies vermutlich durch die sehr starke Expression dieses Transporters ausgeglichen (Abbildung 28 A sowie 29 A und B). Für den Transporter LAT2 hingegen schien Citrullin ein besseres Substrat zu sein, da die Leucinaufnahme in LAT2-exprimierenden Oozyten gleichermaßen durch die Gegenwart der 200-fachen Menge Citrullin und Leucin gehemmt wurde (Abbildung 27 B). Jedoch wurden nur marginale Mengen der LAT2-mRNA in humanen T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 28 B und C), was eine Rolle des LAT2 als Citrullintransporter in diesen Zellen ausschloss.

Die Proliferation humaner T-Lymphozyten wird durch die Substitution von Citrullin in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen, nicht aber unter vollständigem Argininmangel aufrechterhalten (Werner, 2017). Aufgrund der hier festgestellten hohen intrazellulären Citrullinkonzentrationen nach Substitution von Citrullin unter Argininmangel (Abbildung 24) wurde der Citrullintransport selbst als limitierenden Faktor und Grund für die fehlende Rekonstitution der T-Zellproliferation unter absolutem Argininmangel ausgeschlossen. Wie kommt es zu der selektiven Rekonstitution der T-Zellproliferation in Abhängigkeit spezifischer Argininkonzentrationen? Arginin kann intrazellulär durch die Enzyme ASS und ASL über das Intermediat Argininosuccinat aus Citrullin metabolisiert werden. In stimulierten humanen T-Zellen wurde in der Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ Arginin, aber nicht unter vollständigem Argininmangel oder suffizienter Argininversorgung die Induktion der ASS-Expression nachgewiesen (Werner, 2017). Damit übereinstimmend wurde in T-Lymphozyten, welche in der Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ Arginin stimuliert wurden, nach der Inkubation mit 1 mM Citrullin eine Steigerung der intrazellulären Argininosuccinat- und Argininkonzentration beobachtet (Abbildung 24 B und C). Nach Stimulation unter komplettem Argininmangel wurde dies jedoch nicht festgestellt (Abbildung 24 B und C). Demzufolge kann die selektive Rekonstitution der humanen T-Zellproliferation durch die stimulations- und argininabhängige Induktion der ASS-Expression erklärt werden. Im Gegensatz zu den Daten in humanen T-Zellen, wurde in murinen T-Lymphozyten, selbst unter absolutem Argininmangel die Induktion der ASS-Expression beobachtet (Fletcher, 2015). Dies wurde ebenfalls für die leukämischen T-Zelllinie Jurkat beschrieben (Bansal, 2004). Die Expression der ASL hingegen war in humanen T-Zellen unabhängig von Stimulation und Argininverfügbarkeit, demnach die Proliferationsinhibition auch unter absolutem Argininmangel durch Argininosuccinat aufgehoben werden konnte (Werner, 2017). Welcher Transporter für den Import von Argininosuccinat in humanen T-

Lymphozyten verantwortlich ist, ist noch ungeklärt. Ebenfalls noch unbekannt ist, ob die Aufrechterhaltung der Proliferation unter Arginin-limitierten Bedingungen allein auf der intrazellulären Argininsynthese aus Citrullin durch die ASS und ASL basiert. Zusätzlich könnte auch die vermehrte Einschleusung des ASL-Produkts Fumarat in den Citratzyklus, als intermediäres Stoffwechselprodukt und Energielieferant, eine Rolle spielen (Murray, 2016).

Das Mikromilieu in Tumoren ist charakterisiert durch den ausgeprägten Austausch von Aminosäuren, Zellen und Lymphflüssigkeit, weshalb eine komplette Arginase-vermittelte Arginindepletion vergleichsweise unwahrscheinlich ist (Oberlies, 2009). Demnach ist eine lediglich suboptimale Argininkonzentration und damit verbundene Einschränkung der T-Zellfunktion (Werner et al. 2017) eher eine klinisch relevante Bedingung. Eine Citrullin-basierte Rekonstitution der T-Zellproliferation ist somit ein vielversprechender Ansatz, der potentiell helfen könnte, die insuffiziente T-Zellfunktion in entzündlichen Geweben und Tumoren aufzuheben. In verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien wurde der Effekt einer oralen oder parentalen Arginin-Supplementation auf verschiedene Parameter des Immunsystems getestet. Zusammenfassend konnte kein eindeutiger, reproduzierbarer Vorteil für die Immunfunktion und den klinischen Verlauf beobachtet werden (Nieves Jr, 2002; Rodriguez, 2017), demnach nach jetzigem Kenntnisstand die orale oder parentale Supplementation von Arginin keine effiziente Strategie für die Modulation der Funktion von Immunzellen zu sein scheint. Im Gegensatz dazu steigerte die Supplementation von Citrullin die argininabhängige NO-Synthese und damit assoziierte Organdurchblutung nach Arginase-vermittelter Arginindepletion in einem murinen Modell (Wijnands, 2015). Ebenso konnte die Arginase-induzierte Proliferationshemmung muriner T-Zellen *in vivo* durch Citrullin aufgehoben werden, was in direkter Korrelation mit der ASS-Expression in diesen Zellen stand (Fletcher, 2015). Die Pharmakokinetik von Citrullin wurde bereits im Menschen untersucht (Curis, 2005; Cynober, 2010). Besonders nennenswert ist in diesem Kontext eine doppelblind, Placebo-kontrollierte Studie, in welcher der signifikante Anstieg des Plasma-Argininspiegels durch die orale Gabe von Citrullin gezeigt wurde (Schwedhelm, 2008).

Zusammenfassend ist der LAT1-vermittelte Citrullintransport eine neue wichtige Komponente für die Rekonstitution der T-Zellproliferation in der Gegenwart geringer Argininkonzentrationen. Durch die potentielle ASS- und ASL-vermittelte intrazelluläre Synthese von Arginin aus Citrullin könnte eine Aufhebung ungewollter Immunsuppression in inflammatorischen Geweben und Tumoren gelingen (Abbildung 59).

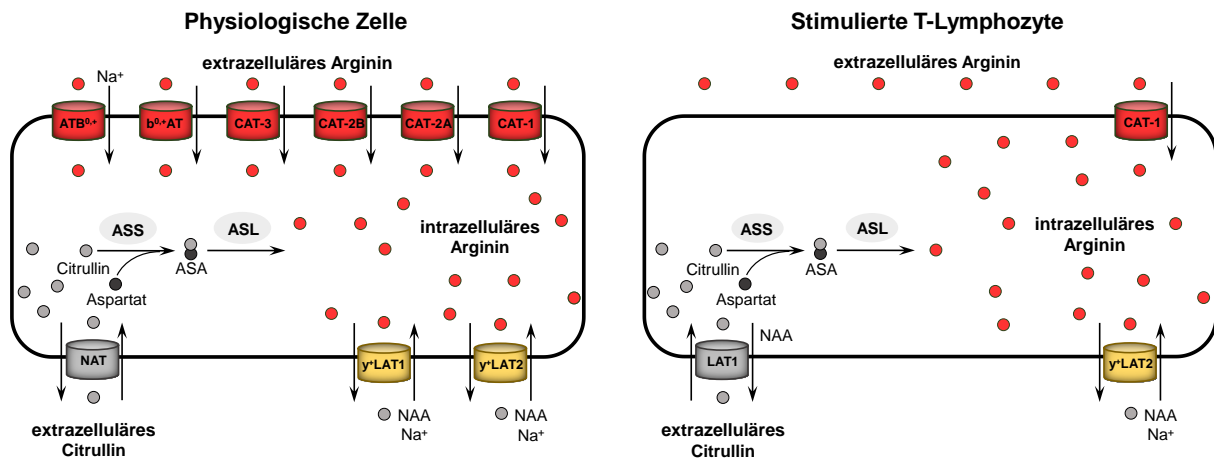


Abbildung 59: In stimulierten T-Lymphozyten wird die Citrullinaufnahme durch den System L-Transporter LAT1 vermittelt.

Neben dem CAT-1-vermittelten Arginintransport, kann Arginin (rote Kugeln) in stimulierten T-Lymphozyten und den meisten physiologischen Zellen und Geweben intrazellulär durch die beiden Enzyme ASS und ASL aus der neutralen Aminosäure Citrullin synthetisiert werden. Für den Import neutraler Aminosäuren (graue Kugeln) sind multiple Transportsysteme bekannt (grau, NAT: neutrale Aminosäuretransporter). In stimulierten T-Lymphozyten wird die Citrullinaufnahme durch den System L-Transporter LAT1 (grau) vermittelt. ASA: Argininosuccinat, NAA: neutrale Aminosäuren.

5.3 Identifikation des hCAT-1 als neue Zielstruktur für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie

Tumorzellen sind durch multiple Änderungen des Zellmetabolismus zugunsten des beschleunigten und ungehemmten Wachstums und damit assoziierten gesteigerten Nährstoff- und Energiebedarfs charakterisiert (Hanahan, 2011). Der bereits in den 1920ern beobachtete Warbureffekt beschreibt die bevorzugte Energiegewinnung von Krebszellen durch Glykolyse, anstatt durch die oxidative Phosphorylierung (Warburg, 1956). Dies ist nur ein Beispiel für die Abwandlung von Stoffwechselwegen in diesen Zellen (Hanahan, 2011; Villalba, 2013). Neben Glukose haben Tumorzellen ebenfalls einen gesteigerten Bedarf an Aminosäuren (Hosios, 2016). Demnach ist es naheliegend, die Expression beziehungsweise Funktion von Aminosäuretransportern als erste Instanz für die Bereitstellung von Aminosäuren für den Tumorzellmetabolismus zu untersuchen und diese als neue potentielle Zielstrukturen für die Krebstherapie in Betracht zu ziehen (Bhutia, 2015; McCracken, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der kationische Aminosäuretransporter hCAT-1 als der verantwortliche Arginintransporter in CLL-Zellen identifiziert, was diesen Transporter als mögliches Ziel für künftige CLL-Therapiestrategien qualifiziert.

In vielen Geweben unseres Körpers kann Arginin konstitutiv oder induzierbar aus der neutralen Aminosäure Citrullin über die beiden Harnstoffzyklusenzyme ASS und ASL synthetisiert werden (Husson, 2003; Werner, 2017). In primären CLL-Zellen hingegen wurde die ASS-Expression, selbst unter Argininmangel nicht nachgewiesen (Abbildung 46), was diese Zellen

als Arginin-auxotroph identifiziert und die Voraussetzung dafür schafft, dass Arginindepletion als neue Strategie für die CLL-Therapie in Frage kommt. Die Arginin-Auxotrophie teilen CLL-Zellen mit anderen Leukämieformen, wie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (De Santo, 2018) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Mussai, 2015), aber auch mit verschiedenen soliden Tumoren (Phillips, 2013). Als Grund für die fehlende oder gesenkte Expression der ASS in Tumorgeweben wird eine Steigerung der intrazellulären Verfügbarkeit des ASS-Substrats Aspartat vermutet, welches für die Nukleotidbiosynthese benötigt wird (Rabinovich, 2015). Die Regulation der ASS-Expression ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch scheinen die Transkriptionsfaktoren c-Myc und Sp4 positiv und HIF-1 α negativ in die Regulation der ASS-Expression involviert zu sein (Haines, 2011).

Die Proliferation und daraus resultierend auch der Nährstoffanspruch humaner CLL-Zellen ist stark von den umgebenen Zellen, Geweben und Signalstoffen abhängig. Mehr als 99 Prozent der im peripheren Blut lokalisierten CLL-Zellen (PB-CLL-Zellen) sind im Zellzyklus arretiert und somit nicht proliferativ (Andreeff, 1980). Ausschließlich in sogenannten Proliferationszentren, welche in peripheren Lymphorganen lokalisiert sind, wurden bislang proliferierende CLL-Zellen (LN-CLL-Zellen) nachgewiesen (Burger, 2013). LN-CLL-Zellen sind durch die gesteigerte Expression von B-Zellrezeptor-assoziierten Genen charakterisiert (Herishanu, 2011). Durch Stimulation mittels eines IgM-Antikörpers konnte in PB-CLL-Zellen ein mit LN-CLL-Zellen vergleichbares Genexpressionsprofil beobachtet werden (Herishanu, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden CLL-Zellen aus peripherem Blut durch einen TLR9-Agonisten zur Proliferation stimuliert (Abbildung 35 A). Diese Stimulations-induzierte Zellteilung war jedoch unter Argininmangel komplett inhibiert (Abbildung 35 A). Demnach ist die Proliferation primärer CLL-Zellen nicht allein von einem stimulierenden Signal, sondern auch von der ausreichenden Verfügbarkeit der Aminosäure Arginin abhängig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transporter- und ASS-Expression, die Viabilität und Proliferation primärer CLL-Zellen ausschließlich über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum (48 Stunden) betrachtet, da die Viabilität dieser Zellen bei Kultivierung über diesen Zeitraum hinaus stark beeinträchtigt war. Eine Möglichkeit diesen Untersuchungszeitraum zu verlängern ist die Nachahmung der Bedingungen in den sogenannten Proliferationszentren in Lymphknoten, zum Beispiel durch Ko-Kultivierung mit Stromazellen, Monozyten-stämmigen „Nurse-like cells“ oder CD40-Ligand-exprimierenden Fibroblasten (Ten Hacken, 2014).

Der Transport kationischer Aminosäuren wurde in CLL-Zellen bereits vor über 30 Jahren beschrieben. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt der verantwortliche Transporter noch nicht bekannt (Segel, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hCAT-1 als alleiniger

Argininimporter, sowohl in der CLL-Zelllinie HG3 als auch in primären CLL-Zellen identifiziert. In letzteren war die Expression dieses Transporters nach Aktivierung durch einen TLR9-Agonisten stark induziert. Hingegen war der hCAT-1 in primären unstimulierten CLL-Zellen nur marginal exprimiert (Abbildung 33 und 34). Diese Ergebnisse wurden untermauert durch die parallel zu dieser Arbeit veröffentlichten Daten einer Genexpressionsanalyse, in welcher die Induktion der Genexpression von Aminosäuretransportern, inklusive des hCAT-1, gleichermaßen in LN-CLL und TLR9-stimulierten CLL-Zellen beschrieben wurde (Yeomans, 2016).

Der Transporter hCAT-1 ist ubiquitär in gesunden Geweben exprimiert (Closs, 2004) und insbesondere für die Proliferation humaner T-Lymphozyten sehr bedeutend. Jedoch war bislang nur vergleichsweise wenig über die Rolle der hCAT-1-Expression und des durch diesen Transporter vermittelten Arginintransport in Krebszellen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der CLL-Zelllinie HG3 nach hCAT-1-Expressionssenkung die Reduktion des CAT-vermittelten Arginintransports (Abbildung 50), die komplette Inhibition der Proliferation (Abbildung 51 C und F), die Induktion des Zelltods *in vitro* (Abbildung 51 A, B, D und E) sowie die Verlangsamung des Tumorwachstums in HG3-Xenograftmodellen (Abbildung 54 A) gezeigt. Ergänzend zu diesen Daten wurde die Expression des hCAT-1 auch in AML- und ALL-Zellen beschrieben (De Santo, 2018; Mussai, 2015). Die shRNA-vermittelte Senkung der hCAT-1-Expression resultierte in den humanen Brustzelllinien MCF-7 und T47D sowie in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 in einer Induktion der Apoptose (Abdelmagid, 2011; Lu, 2013). Demnach ist die zelltoxische Wirkung der Senkung der hCAT-1-vermittelten Argininaufnahme nicht ausschließlich auf CLL-Zellen beschränkt, sondern auch auf andere Tumorentitäten übertragbar. Ebenfalls wurde der Effekt der Hemmung neutraler Aminosäuretransporter in Krebszellen untersucht. Die Transporter LAT1, ASCT2 und ATB^{0,+} sind im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Geweben häufig überexprimiert (Fuchs, 2005; V. Ganapathy, 2009). Für Multiple Myelom- und Neuroblastompatienten ist eine gesteigerte LAT1- beziehungsweise ASCT2-Expression jeweils mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf assoziiert (Isoda, 2014; Ren, 2015). Vergleichbar mit der Reduktion der hCAT-1-Expression resultierte die pharmakologische oder shRNA-vermittelte Hemmung dieser Transporter in einer Inhibition des Tumorwachstums in Xenograftmodellen. Bislang konnte dies für den LAT1 in Kolonkarzinom- und T-ALL-Zellen, für den ASCT2 für Neuroblastom-, Brustkrebs- und AML-Zellen und für ATB^{0,+} in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden (Coothankandaswamy, 2016; Oda, 2010; Ren, 2015; Rosilio, 2015; van Geldermalsen, 2016).

In HG3-Zellen führte die shRNA-vermittelte Senkung der hCAT-1-Expression zu einer Inhibition der Zellproliferation *in vitro* und der Verlangsamung des Tumorwachstums in HG3-Xenograftmodellen ohne eine kompensatorische Steigerung der Expression anderer Arginin-akzeptierender Transporter oder Re-Expression des hCAT-1 (Abbildung 48, 49 und 54). Nach einer Initialphase der Wachstumshemmung wurde jedoch die Induktion des Tumorwachstums beobachtet (Abbildung 54 A). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In Melanom-Xenograftmodellen wurde nach induzierten systemischen Argininmangel durch ADI-PEG 20 die Induktion der ASS im Tumorgewebe beobachtet und als möglicher Rettungsmechanismus dieser Tumorzellen identifiziert (Phillips, 2013). Auch in den hier verwendeten HG3-Xenograftmodellen wurde die ASS-Expression beobachtet, jedoch unabhängig von der Induktion der shRNA-Expression unter allen Versuchsbedingungen (Abbildung 54 C). Im Gegensatz zu den Konditionen unter ADI-PEG20-Behandlung, unter welchen supraphysiologische Serum-Citrullinkonzentrationen von etwa 1 mM beobachtet wurden (Marini, 2015), liegt die Citrullinkonzentration unter physiologischen Bedingungen im murinen Serum lediglich bei 40 bis 60 μ M (Jones, 2015; Sailer, 2013). In Vorversuchen wurde gezeigt, dass HG3-Zellen unter Argininmangel erst in der Gegenwart von 500 μ M Citrullin, nicht aber bei geringeren Citrullinkonzentrationen proliferieren (Abbildung 55), demnach die suffiziente intrazelluläre Argininsynthese, trotz der Induktion der ASS-Expression, in den HG3-Xenograftmodellen ohne die Substitution von ausreichenden Citrullinmengen unwahrscheinlich ist. Die Hochregulation der intrazellulären Citrullinsynthese durch die Induktion der Expression der Ornithin-metabolisierenden Enzyme Carbamoylphosphatsynthase (CPS1) und Ornithintranscarbamylase (OTC) ist ebenfalls unwahrscheinlich, da diese Enzyme vorrangig in den Enterozyten des Dünndarms sowie in Leberzellen vorkommen (Marini, 2016). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die OTC in ALL-Zellen nicht exprimiert wird (De Santo, 2018).

Nichtsdestotrotz wurde, im Gegensatz zu dem hier gewählten HG3-Xenograftmodell keine ASS (mit Ausnahme eines Patienten) in primären PB-CLL-Zellen festgestellt (Abbildung 46 A). Darüber hinaus wurde die Expression dieses Enzyms weder durch TLR9-Stimulation noch durch Argininmangel induziert (Abbildung 46 B). Demnach scheint die ASS-Expression in CLL-Patienten als Rettungsmechanismus der Tumorzellen keine Rolle zu spielen.

Ungeklärt ist ebenfalls wie die HG3-Tumoren nach Reduktion der hCAT-1-Expression mit der proteinogenen Aminosäure Lysin, welche ebenfalls durch den hCAT-1 aufgenommen wird, versorgt wurden. Bei Lysin handelt es sich um eine essentielle Aminosäure, welche nach aktuellem Kenntnisstand nicht intrazellulär gebildet werden kann und demnach strikt über die

Nahrung dem Organismus zugeführt werden muss. Eine Substitution dieser Aminosäure durch autophagischen Proteinabbau ist unwahrscheinlich, da gesteigerte Autophagie über längere Zeiträume in Apoptose mündet (Song, 2017) und die CLL-Tumoren in dem gewählten Xenograftmodell nach einer initialen Verzögerungsphase stark wuchsen (Abbildung 54 A).

Ebenfalls ungeklärt ist der intrazelluläre Mechanismus, welcher unter Argininmangel für die Inhibition der CLL-Zellproliferation und Induktion der Apoptose verantwortlich ist. In ASS-negativen Prostata- und Brustkrebszellen leitet ein Defizit an Arginin den mit mitochondrialer Dysfunktion-assoziierten autophagischen Zelltod ein (Roci, 2019). Darüber hinaus wurde in Brustkrebszellen gezeigt, dass Arginin als Vorläufermolekül von Ornithin für die Polyaminsynthese und somit für die Nukleotidsynthese unabdingbar ist (Roci, 2019). Ob in CLL-Zellen das Enzym Arginase, welches Arginin zu Ornithin und Harnstoff metabolisiert, exprimiert wird, ist zum heutigen Zeitpunkt jedoch nicht bekannt. In den ASS-negativen Sarkomzelllinien SKLMS1, SKUT1 und der Melanomzelllinie SKMEL2 passiert die Energiegewinnung aus Glukose unter Arginin-depletierten Bedingungen vorzugweise über die oxidative Phosphorylierung und nicht, wie überwiegend für Tumorzellen beschrieben, über die Glykolyse (Kremer, 2017). Demnach führt Argininmangel in diesen Zellen zu der Umkehrung des Warbureffekts. Ebenso wurde die verstärkte Abhängigkeit dieser Tumorzellen von der neutralen Aminosäure Glutamin gezeigt. Unter Argininmangel resultierte die Behandlung von Tumorzellen mit einem Glutaminaseinhibitor in einer gesteigerten Induktion des Zelltods, verglichen mit der Wirkung des Glutaminase-Inhibitors allein (Kremer, 2017). Dementsprechend ist in CLL-Zellen nach Reduktion der hCAT-1-Expression und gleichzeitiger Restriktion der Glutaminverfügbarkeit ebenfalls eine synergistische Wirkung zu erwarten. Zusätzlich könnte durch die verstärkte Induktion des Zelltods der Ausbildung von „Tumor immune escape“-Mechanismen vorgebeugt werden. Die Einschränkung der Glutaminverfügbarkeit könnte dabei auch durch die Inhibition der Glutaminaufnahme erreicht werden (Jeon, 2015; Oda, 2010; van Geldermalsen, 2016; Willems, 2013; Zhao, 2015).

In hämatologischen Tumorerkrankungen wurde bereits ein synergistischer Effekt einer systemischen Arginindepletion mit bereits etablierten Therapien gezeigt. In AML-Zellen resultierte die Kombination aus Arginase- oder ADI-PEG 20-induziertem Argininmangel und Cytarabin in einer gesteigerten Induktion des Zelltods (Miraki-Moud, 2015; Mussai, 2015). Ähnliche Effekte konnten in ALL-Zellen mit Dexamethason unter ADI-PEG 20-vermittelter Arginindepletion beobachtet werden (De Santo, 2018). Demnach ist auch ein synergistischer Effekt eines durch die Reduktion der hCAT-1-Expression-induzierten Argininmangels in Kombination mit etablierten Therapien in CLL-Zellen zu erwarten.

Bereits ausführlich beschrieben ist die toxische Wirkung des Argininanalogons Canavanin auf verschiedene Tumorzellen unter Arginin-depletierten Bedingungen (Vynnytska, 2011). Auch in den HG3-CLL-Zellen wurde nach 48-stündiger Inkubation unter Argininmangel in der Gegenwart von Canavanin die Induktion des Zelltods, einhergehend mit der vollständigen Hemmung der Proliferation und des Zellmetabolismus beobachtet (Abbildung 56 und 57). Trotz der Induktion der ASS-Expression in HG3-Zellen unter Argininmangel (Abbildung 45) und Rekonstitution der Proliferation in der Gegenwart von 1 mM Citrullin (Abbildung 55 und 56) konnte die toxische Wirkung des Canavanins überraschenderweise nicht durch die Substitution dieser neutralen Aminosäure aufgehoben werden (Abbildung 56). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch nicht geklärt. Vermutlich wird aufgrund der Induktion der Apoptose die *de novo* Synthese der ASS gehemmt, so dass Arginin nicht mehr intrazellulär synthetisiert werden kann. Eine Verstärkung der toxischen Wirkung Canavanins wird ebenso nach der shRNA-vermittelten Reduktion der hCAT-1-Expression erwartet. Experimente um dies zu verifizieren stehen allerdings bislang noch aus.

In diesem Teilprojekt dieser Arbeit wurde demnach zusammenfassend folgendes gezeigt: i) Die Proliferation primärer und immortalisierter CLL-Zellen ist abhängig von der Verfügbarkeit der kationischen Aminosäure Arginin, ii) in primären CLL-Zellen ist die intrazelluläre Argininsynthese aufgrund der Abwesenheit der ASS nicht möglich, was diese Zellen im Gegensatz zu humanen T-Lymphozyten als Arginin-auxotroph definiert, iii) hCAT-1 ist der hauptverantwortliche Arginintransporter in humanen CLL-Zellen und iv) die shRNA-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression resultiert in CLL-Zellen in einer vollständigen Inhibition der Proliferation *in vitro* und Verlangsamung des Tumorwachstums in CLL-Xenograftmodellen. Zusammen bilden diese Ergebnisse die Grundlage für die Ausarbeitung einer neuen vielversprechenden Behandlungsstrategie für die CLL. Diese Therapie basiert auf der Hemmung des Tumorwachstums durch die Induktion eines intrazellulären Argininmangels mittels der gezielten Inhibition des verantwortlichen Arginintransporters hCAT-1. Durch die parallele Supplementation ausreichend hoher Mengen Citrullin könnte die Aufrechterhaltung der Proliferation und Funktion Tumor-bekämpfender T-Lymphozyten durch intrazelluläre Argininsynthese gelingen (Abbildung 60). Die Inhibition eines Aminosäuretransporters als neue potentielle Tumorthherapie durch sogenannte „small molecules“ wurde bereits für die Transporter ASCT2 (Q. Wang, 2015), LAT1 (Oda, 2010) und ATB^{0,+} (Karunakaran, 2011) beschrieben. Demzufolge ist der nächste Schritt die Entwicklung eines pharmakologischen Inhibitors gegen hCAT-1, welcher potentiell für die Therapie der CLL oder anderen Arginin-

auxotrophen Tumorentitäten, welche Arginin hauptsächlich über den hCAT-1 aufnehmen, eingesetzt werden kann.

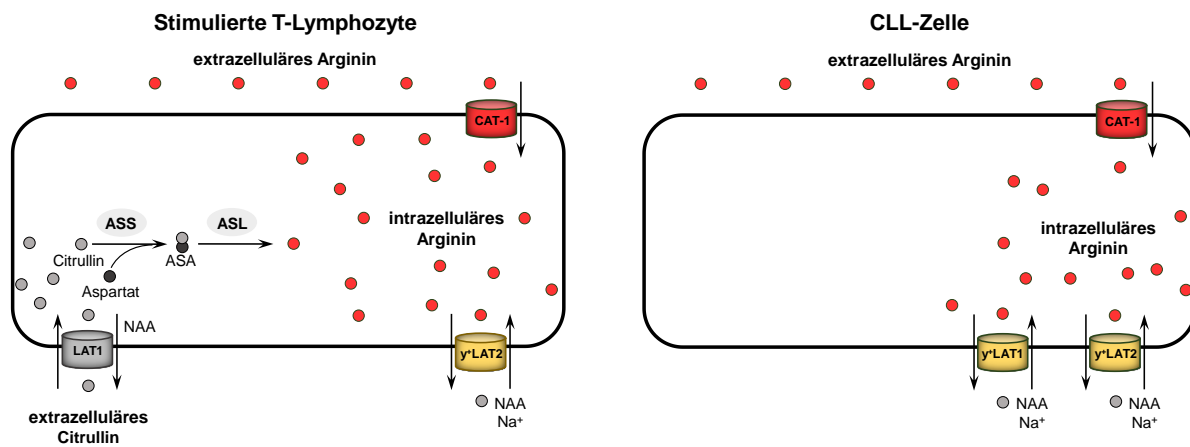


Abbildung 60: Der CAT-1 ist eine neue Zielstruktur für die Therapie der CLL und anderer Arginin-auxotropher Tumore.

Obwohl sowohl CLL-Zellen als auch stimulierte T-Lymphozyten (und wahrscheinlich viele andere sich schnell teilenden Zellen) hauptsächlich über CAT-1 mit Arginin versorgt werden, stellt die Hemmung dieses Transporters eine neue potentielle Therapiestrategie zur Behandlung der CLL dar. Dies ist mit der endogenen Synthese von Arginin zu erklären, die in T-Lymphozyten (und den meisten anderen physiologischen Zellen), nicht aber in CLL-Zellen, erfolgen kann. Sie passiert durch die beiden Enzyme ASS und ASL aus der neutralen Aminosäure Citrullin. Die Citrullinaufnahme wird in stimulierten T-Lymphozyten durch den System L-Transporter LAT1 vermittelt. CLL-Zellen sind dagegen auf die CAT-1-vermittelte Aufnahme von Arginin angewiesen. Die Hemmung des CAT-1 ist demnach ein vielversprechender Ansatz für eine neue Therapiestrategie für die CLL und andere Arginin-auxotrophe Tumore. ASA: Argininosuccinat, NAA: neutrale Aminosäuren.

5.4 Ausblick

Zusammenfassend ist das Ergebnis dieser Arbeit die Ausarbeitung einer neuen vielversprechenden Therapiestrategie für die CLL und andere Arginin-auxotrophe Tumore. Diese beruht auf der Induktion eines intrazellulären Argininmangels durch die gezielte Hemmung des verantwortlichen Arginintransporters hCAT-1 bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Proliferation von Tumor-bekämpfenden T-Lymphozyten durch intrazelluläre Argininsynthese in der Gegenwart der neutralen Aminosäure Citrullin.

Systemischer Argininmangel, induziert durch Arginin-metabolisierende Enzyme, ist Gegenstand aktueller klinischer Studien (Riess, 2018). Sehr vielversprechend und aufgrund dessen auch am besten untersucht ist in diesem Kontext das Enzym Arginindeiminase (ADI-PEG 20, Polaris Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA), welches Arginin zu Citrullin und Ammoniak metabolisiert (Fultang, 2016; Riess, 2018). Die Behandlung mit ADI-PEG 20 führte in 25 % der Melanom- und 47 % der Patienten mit Leberzellkarzinomen zu einer Verlängerung des progressionsfreien Krankheitsverlaufs und des Überlebens. Im HG3-CLL-Xenograftmodell sollte daher eruiert werden, inwieweit ein durch Inhibition der hCAT-1-Expression induzierter intrazellulärer Argininmangel das Tumorstadium effizienter hemmen kann als die Enzym-induzierte systemische Arginindepletion.

Patienten zeigten unter Behandlung mit ADI-PEG 20 nur milde bis moderate unerwünschte Nebenwirkungen wie lokale Injektionsreaktionen, Hautausschlag und erhöhte Blut-Harnsäurewerte (Riess, 2018). Welche Konsequenzen eine temporäre Organismus-weite hCAT-1-Hemmung nach sich zieht, ist bislang unbekannt. Homozygote CAT-1-defiziente Mäuse sterben bereits einen Tag nach der Geburt, aufgrund der Hemmung der Ausreifung von Erythrozyten, an einer Anämie (Perkins, 1997). Die normale Entwicklung der meisten Gewebe der CAT-1-defizienten Mäuse bis hin zur Geburt wird durch die vergleichsweise hohe CAT-3-Expression während dieser Phase erklärt (Nicholson, 1998). Im HG3-Xenograftmodell kommt es bei stabiler Suppression der hCAT-1-Expression auch nach 4-wöchigem Tumorstadium nicht zu einer kompensatorischen Hochregulation anderer Arginin-transportierender Proteine in den CLL-Zellen. Die Entwicklung und Etablierung einer induzierbaren CAT-1-k.o.-Maus, beispielweise basierend auf einem induzierbaren Cre/loxP-System, würde die Analyse der Konsequenzen einer systemischen hCAT-1-Deletion, inklusive einer potentiellen kompensatorischen Variation der Expression Arginin-akzeptierender Aminosäuretransporter, ermöglichen. Ein Fokus sollte dabei auf der Untersuchung der Funktion Tumor-bekämpfender T-Lymphozyten liegen. *In vitro* führt die Reduktion der hCAT-1-Expression in diesen Immunzellen zu der Inhibition der Proliferation. In der Gegenwart geringer

Argininkonzentrationen wird die Proliferation von T-Zellen durch intrazelluläre Argininsynthese, vermittelt durch die Enzyme ASS und ASL aus der neutralen Aminosäure Citrullin aufrechterhalten. Die orale oder parenterale Applikation von Citrullin, könnte die Aufrechterhaltung der Funktion von T-Lymphozyten, aber auch anderer Zellen und Gewebe in CAT-1-k.o.-Mäusen ermöglichen. Die Verträglichkeit von Citrullin wurde im Menschen bereits getestet: Nach oraler Gabe von bis zu 15 g Citrullin am Tag, wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen bei den Probanden festgestellt (Moinard, 2008). Demnach scheint die Verabreichung von Citrullin, selbst in hohen Dosen, unbedenklich zu sein.

Die Reduktion der hCAT-1-Expression in dem hier verwendeten CLL-Xenograftmodell resultierte in einer Verlangsamung, jedoch nicht vollständigen Inhibition des Tumorwachstums. Nach einer Initialphase der Wachstumshemmung wurde die Re-Induktion des Tumorwachstums beobachtet (Abbildung 54 A). Die Aufklärung des zugrunde liegende Resistenzmechanismus steht noch aus. Die intrazelluläre Argininsynthese durch die Induktion der ASS-Expression, wurde aufgrund der geringen Citrullinmengen im Mausserum (40-60 μM (Jones, 2015; Sailer, 2013)) als alleiniger Resistenzmechanismus ausgeschlossen. Jedoch sollte für die Bereitstellung von Citrullin auch die intrazelluläre Synthese dieser Aminosäure aus Glutamin über die Enzyme Carbamoylphosphatsynthase (CPS1) und Ornithintranscarbamylase (OTC) in Erwägung gezogen werden (Cynober, 2010). Transkriptom- und Proteom-Analysen der Resistenz-ausbildenden HG3-CLL-Tumoren könnten zur Klärung dieser Fragestellung grundlegend beitragen.

Eine Steigerung der zelltoxischen Wirkung der hCAT-1-Hemmung durch Kombination mit etablierten CLL-Therapien könnte der Ausbildung von Resistenzmechanismen möglicherweise entgegenwirken. In hämatologischen Tumorerkrankungen wurde bereits ein synergistischer Effekt einer systemischen Arginindepletion mit etablierten Therapien gezeigt: In AML-Zellen resultierte die Kombination aus Arginase- oder ADI-PEG 20-induziertem Argininmangel und Cytarabin in einer gesteigerten Induktion des Zelltods (Miraki-Moud, 2015; Mussai, 2015). Ähnliche Effekte konnten in ALL-Zellen mit Dexamethason unter ADI-PEG 20-vermittelter Arginindepletion beobachtet werden (De Santo, 2018). Die ersten Experimente unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Behandlung von immortalisierten CLL-Zellen durch die Kombination aus induziertem Argininmangel durch hCAT-1 k.o. und B-Zellrezeptorsignal-Inhibitor Ibrutinib waren sehr vielversprechend und sollten Gegenstand der zukünftigen Forschung sein. Ebenso zeigte das Argininanalogon Canavanin unter Argininmangel stark toxische Wirkung auf HG3-CLL-Zellen, demnach auch eine Reduktion der Zellviabilität durch Canavanin in Kombination mit der Inhibition der hCAT-1-Expression zu erwarten ist.

In Melanomzellen steigerte Argininmangel die Induktion des Zelltods durch einen Glutaminaseinhibitor, verglichen mit der Wirkung des Glutaminaseinhibitors allein (Kremer, 2017). Demnach ist eine Steigerung der Zelltoxizität nach Reduktion der hCAT-1-Expression bei gleichzeitiger Restriktion der Glutaminverfügbarkeit nicht unwahrscheinlich und sollte in zukünftigen Experimenten getestet werden. Die Einschränkung der Glutaminverfügbarkeit könnte dabei, neben der Inkubation in Glutamin-freiem Medium, auch durch die Inhibition der Glutaminaufnahme erreicht werden (Jeon, 2015; Oda, 2010; van Geldermalsen, 2016; Willems, 2013; Zhao, 2015). Der verantwortliche Glutamintransporter in humanen CLL-Zellen ist jedoch bislang noch unbekannt und sollte durch Transporter-Expressionsanalysen sowie der Charakterisierung des Glutamintransports mittels radioaktiv-markiertem Glutamin identifiziert werden.

Eine wichtige Weiterführung meines Projekts wäre schließlich die Entwicklung eines pharmakologischen Inhibitors gegen hCAT-1, welcher potentiell in CLL oder anderen Arginin-auxotrophen Tumorentitäten, welche Arginin hauptsächlich über hCAT-1 aufnehmen, eingesetzt werden kann. Die Inhibition eines Aminosäuretransporters als neue potentielle Tumorthherapie durch sogenannte „small molecules“ wurde bereits für die Transporter ASCT2 (Q. Wang, 2015), LAT1 (Oda, 2010) und ATB^{0,+} (Karunakaran, 2011) beschrieben. Die Hemmung des hCAT-1-vermittelten Arginintransports könnte auf einer direkten Inhibition der Transporterfunktion basieren, beispielsweise durch entsprechende Aminosäure-Analoga, aber auch durch eine gezielte Manipulation der für die hCAT-1-Expression verantwortlichen Signaltransduktionskaskaden erzielt werden. Welche Signalwege in die Genexpression des hCAT-1 in CLL-Zellen involviert sind, ist bislang jedoch noch unbekannt. Dies sollte in zukünftigen Projekten durch die gezielte Hemmung einzelner Signalwege mittels etablierter Inhibitoren untersucht werden. Erste Untersuchungen weisen auf eine Rolle des PI3K/AKT-Signalweges und eine Beteiligung des B-Zellrezeptors hin (unveröffentlichte Daten, ██████████, medizinischer Doktorand, Arbeitsgruppe ██████████).

Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, *383*(6603), 787–793. <https://doi.org/10.1038/383787a0>
- Abdelmagid, S. A., Rickard, J. A., McDonald, W. J., Thomas, L. N., & Too, C. K. L. (2011). CAT-1-Mediated Arginine Uptake and Regulation of Nitric Oxide Synthases for the Survival of Human Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(4), 1084–1092. <https://doi.org/10.1002/jcb.23022>
- Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D., & Cunningham, J. M. (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*, *57*(4), 659–666. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90134-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90134-7)
- Allende, C. C., & Allende, J. E. (1964). Purification and Substrate Specificity of Arginyl-Ribonucleic Acid Synthetase from Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, *239*(4), 1102–1107.
- Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P.-E., Torbett, B. E., Wang, C. X., Negre, D., Cosset, F.-L., & Verhoeyen, E. (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood*, *123*(9), 1422–1424. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-540641>
- Andreeff, M., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T. K., Clarkson, B. D., & Melamed, M. R. (1980). Discrimination of Human Leukemia Subtypes by Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA and RNA. *Blood*, *55*(2), 282–293.
- Appleton, J. (2002). Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino acid. *Alternative Medicine Review*, *7*(6), 512–522.
- Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y.-N., Murdoch, G. H., North, A. R., & Amara, S. G. (1993). Cloning and Expression of a Human Neutral Amino Acid Transporter with Structural Similarity to the Glutamate Transporter Gene Family. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(21), 15329–15332.
- Babu, E., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Iribe, Y., Tangtrongsup, S., Jutabha, P., Li, Y., Ahmed, N., Sakamoto, S., Anzai, N., Nagamori, S., & Endou, H. (2003). Identification of a Novel System L Amino Acid Transporter Structurally Distinct from Heterodimeric Amino Acid Transporters. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43838–43845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305221200>
- Bahri, S., Curis, E., El Wafi, F.-Z., Aussel, C., Chaumeil, J.-C., Cynober, L., & Zerrouk, N.

-
- (2008). Mechanisms and kinetics of citrulline uptake in a model of human intestinal epithelial cells. *Clinical Nutrition*, 27(6), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.08.003>
- Baird, F. E., Beattie, K. J., Hyde, A. R., Ganapathy, V., Rennie, M. J., & Taylor, P. M. (2004). Bidirectional substrate fluxes through the system N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. *The Journal of Physiology*, 559(Pt 2), 367–381. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.060293>
- Baniyash, M. (2004). TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature Reviews Immunology*, 4(9), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nri1434>
- Bansal, V., Rodriguez, P., Wu, G., Eichler, D. C., Zabaleta, J., Taheri, F., & Ochoa, J. B. (2004). Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3 zeta chain under conditions of low arginine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(6), 423–430. <https://doi.org/10.1177/0148607104028006423>
- Bauch, C., Forster, N., Loffing-Cueni, D., Summa, V., & Verrey, F. (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1316–1322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210449200>
- Bauch, C., & Verrey, F. (2002). Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 283(1), F181-9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00212.2001>
- Baydoun, A. R., Wileman, S. M., Wheeler-Jones, C. P. D., Marber, M. S., Mann, G. E., Pearson, J. D., & Closs, E. I. (1999). Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal*, 344(Pt 1), 265–272.
- Bence, A. K., & Crooks, P. A. (2003). The mechanism of L-canavanine cytotoxicity: arginyl tRNA synthetase as a novel target for anticancer drug discovery. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18(5), 383–394. <https://doi.org/10.1080/1475636031000152277>
- Bernard, A. C., Fitzpatrick, E. A., Maley, M. E., Gellin, G. L., Tsuei, B. J., Arden, W. A., Boulanger, B. R., Kearney, P. A., & Ochoa, J. B. (2000). Beta adrenoceptor regulation of macrophage arginase activity. *Surgery*, 127(4), 412–418. <https://doi.org/10.1067/msy.2000.104115>
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006).

-
- Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell*, 125(6), 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>
- Bhutia, Y. D., Babu, E., Ramachandran, S., & Ganapathy, V. (2015). Amino acid transporters in cancer and their relevance to “glutamine addiction”: novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Research*, 75(9), 1782–1788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>
- Bodoy, S., Martin, L., Zorzano, A., Palacin, M., Estevez, R., & Bertran, J. (2005). Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 12002–12011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408638200>
- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Kottra, G., & Daniel, H. (2002). Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22966–22973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200374200>
- Boutard, V., Havouis, R., Fouqueray, B., Philippe, C., Moulinoux, J.-P., & Baud, L. (1995). Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 155(4), 2077–2084.
- Bowles, T. L., Kim, R., Galante, J., Parsons, C. M., Virudachalam, S., Kung, H.-J., & Bold, R. J. (2008). Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. *International Journal of Cancer*, 123(8), 1950–1955. <https://doi.org/10.1002/ijc.23723>
- Boyar, A., & Marsh, R. E. (1982). l-Canavanine, a paradigm for the structures of substituted guanidines. *Journal of the American Chemical Society*, 104(7), 1995–1998. <https://doi.org/10.1021/ja00371a033>
- Boyd, C. A. R., & Crawford, D. H. (1992). Activation of cationic amino acid transport through system y⁺ correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 422(1), 87–89. <https://doi.org/10.1007/BF00381518>
- Bröer, A., Tietze, N., Kowalczyk, S., Chubb, S., Munzinger, M., Bak, L. K., & Bröer, S. (2006). The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2). *The Biochemical Journal*, 393(Pt1), 421–430. <https://doi.org/10.1042/BJ20051273>
- Bröer, A., Wagner, C. A., Lang, F., & Bröer, S. (2000). The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y⁺LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *The*

-
- Biochemical Journal*, 349(Pt 3), 787–795. <https://doi.org/10.1042/bj3490787>
- Bröer, S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1), 249–286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>
- Bronte, V., & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 641–654. <https://doi.org/10.1038/nri1668>
- Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2004). Renal arginine metabolism. *The Journal of Nutrition*, 134(10 Suppl), 2791S-2795S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2791S>
- Brusilow, S. W. (1984). Arginine, an indispensable amino acid for patients with inborn errors of urea synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, 74(6), 2144–2148. <https://doi.org/10.1172/JCI111640>
- Burger, J. A., & Montserrat, E. (2013). Coming full circle : 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood*, 121(9), 1501–1509. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-452607>
- Caligaris-Cappio, F., & Hamblin, T. J. (1999). B-cell chronic lymphocytic leukemia: A bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1), 399–408. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.1.399>
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A. M., & Frauwirth, K. A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, 185(2), 1037–1044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903586>
- Castillo, L., Chapman, T. E., Yu, Y.-M., Ajami, A., Burke, J. F., & Young, V. R. (1993). Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 265(4 Pt 1), E532-539.
- Cavalieri, S., Cazzaniga, S., Geuna, M., Magnani, Z., Bordignon, C., Naldini, L., & Bonini, C. (2003). Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood*, 102(2), 497–505. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0297>
- Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J. Y., Miyamoto, K., Haga, H., Fukui, Y., Mizoguchi, K., Ito, H., Takeda, E., Endou, H., & Kanai, Y. (1999). Identification of an amino acid

-
- transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28845–28848. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.28845>
- Cheng, P. N.-M., Lam, T.-L., Lam, W.-M., Tsui, S.-M., Cheng, A. W.-M., Lo, W.-H., & Leung, Y.-C. (2007). Pegylated recombinant human arginase (rhArg-peg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Research*, 67(1), 309–317. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1945>
- Choi, S., Park, C., Ahn, M., Lee, J. H., & Shin, T. (2012). Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats. *Acta Histochemica*, 114(5), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.09.002>
- Christensen, H. N., & Antonioli, J. A. (1969). Cationic amino acid transport in the rabbit Reticulocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(6), 1497–1504.
- Chuang, J. C., Yu, C. L., & Wang, S. R. (1990). Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. *Clinical Experimental Immunology*, 81(1), 173–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05310.x>
- Chung, C., & Lee, R. (2014). Ibrutinib, Obinutuzumab, Idelalisib, and Beyond: Review of Novel and Evolving Therapies for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pharmacotherapy*, 34(12), 1298–1316. <https://doi.org/10.1002/phar.1509>
- Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*, 47(6), 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
- Closs, E. I. (2002). Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(1), 99–107. <https://doi.org/10.1097/00041552-200201000-00015>
- Closs, E. I., Boissel, J.-P., Habermeier, A., & Rotmann, A. (2006). Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *Journal of Membrane Biology*, 213(2), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>
- Closs, E. I., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J. M., & Förstermann, U. (1997). Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: Three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry*, 36(21), 6462–6468. <https://doi.org/10.1021/bi962829p>
- Closs, E. I., Scheld, J.-S., Sharafi, M., & Förstermann, U. (2000). Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: Role of cationic amino acid

-
- transporters. *Molecular Pharmacology*, 57(1), 68–74.
- Closs, E. I., Simon, A., Vékony, N., & Rotmann, A. (2004). Plasma Membrane Transporters for Arginine. *The Journal of Nutrition*, 134(10), 2752S-2759S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2752s>
- Cobbold, S. P., Adams, E., Farquhar, C. A., Nolan, K. F., Howie, D., Lui, K. O., Fairchild, P. J., Mellor, A. L., Ron, D., & Waldmann, H. (2009). Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 12055–12060. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903919106>
- Coothankandaswamy, V., Cao, S., Xu, Y., Prasad, P. D., Singh, P. K., Reynolds, C. P., Yang, S., Ogura, J., Ganapathy, V., & Bhutia, Y. D. (2016). Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 173(23), 3292–3306. <https://doi.org/10.1111/bph.13616>
- Cornetta, K., & Anderson, W. F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated implications for human gene therapy. *Journal of Virological Methods*, 23(2), 187–194. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(89\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(89)90132-8)
- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K., & Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(2), 667–673. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1094>
- Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S., & Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*, 29(3), 177–205. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0235-4>
- Cynober, L., Moinard, C., & De Bandt, J.-P. (2010). The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: A new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game? *Clinical Nutrition*, 29(5), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.07.006>
- Davis, J. S., & Anstey, N. M. (2011). Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine*, 39(2), 380–385. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181ffd9f7>
- De Santo, C., Booth, S., Vardon, A., Cousins, A., Tubb, V., Perry, T., Noyvert, B., Beggs, A., Ng, M., Halsey, C., Kearns, P., Cheng, P., & Mussai, F. (2018). The arginine metabolome in acute lymphoblastic leukemia can be targeted by the pegylated-recombinant arginase I BCT-100. *International Journal of Cancer*, 142(7), 1490–1502. <https://doi.org/10.1002/ijc.31170>
- Delage, B., Luong, P., Maharaj, L., O’Riain, C., Syed, N., Crook, T., Hatzimichael, E.,

-
- Papoudou-Bai, A., Mitchell, T. J., Whittaker, S. J., Cerio, R., Gribben, J., Lemoine, N., Bomalaski, J., Li, C.-F., Joel, S., Fitzgibbon, J., Chen, L.-T., & Szlosarek, P. W. (2012). Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis. *Cell Death and Disease*, 3(e342). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.83>
- Devés, R., Chavez, P., & Boyd, C. A. (1992). Identification of a new transport system (y+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *The Journal of Physiology*, 454, 491–501. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019275>
- Diaz, L. A. J., Friedman, A. W., He, X., Kuick, R. D., Hanash, S. M., & Fox, D. A. (1997). Monocyte-dependent regulation of T lymphocyte activation through CD98. *International Immunology*, 9(9), 1221–1231. <https://doi.org/10.1093/intimm/9.9.1221>
- Dikalova, A., Fagian, A., Aschner, J. L., Aschner, M., Summar, M., & Fike, C. D. (2014). Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 (SNAT1) modulates L-citrulline transport and nitric oxide (NO) signaling in piglet pulmonary arterial endothelial cells. *PLoS ONE*, 9(1), e85730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085730>
- Dillon, B. J., Prieto, V. G., Curley, S. A., Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S., & Clark, M. A. (2004). Incidence and Distribution of Argininosuccinate Synthetase Deficiency in Human Cancers: A Method for Identifying Cancers Sensitive to Arginine Deprivation. *Cancer*, 100(4), 826–833. <https://doi.org/10.1002/cncr.20057>
- Ding, Y., Matsukawa, Y., Ohtani-Fujita, N., Kato, D., Dao, S., Fujii, T., Naito, Y., Yoshikawa, T., Sakai, T., & Rosenthal, G. A. (1999). Growth inhibition of A549 human lung adenocarcinoma cells by L-canavanine is associated with p21/WAF1 induction. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 90(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00667.x>
- Draghiciu, O., Lubbers, J., Nijman, H. W., & Daemen, T. (2015). Myeloid derived suppressor cells - An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *OncImmunology*, 4(1), e954829. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.954829>
- Eibert, S. M., Lee, K.-H., Pipkorn, R., Sester, U., Wabnitz, G. H., Giese, T., Meuer, S. C., & Samstag, Y. (2004). Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 1957–1962. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308282100>
- Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S., & Clark, M. A. (2002). Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 62(19), 5443–5450.

-
- Ericsson, P.-O., Orchansky, P. L., Carlow, D. A., & Teh, H.-S. (1996). Differential activation of phospholipase C-gamma 1 and mitogen-activated protein kinase in naive and antigen-primed CD4 T cells by the peptide/MHC ligand. *The Journal of Immunology*, *156*(6), 2045–2053.
- Errasti-Murugarren, E., Fort, J., Bartoccioni, P., Díaz, L., Pardon, E., Carpena, X., Espino-Guarch, M., Zorzano, A., Ziegler, C., Steyaert, J., Fernández-Recio, J., Fita, I., & Palacín, M. (2019). L amino acid transporter structure and molecular bases for the asymmetry of substrate interaction. *Nature Communications*, *10*(1), 1807. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09837-z>
- Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, & Loscalzo. (2009). *Harrisons Innere Medizin* (17.Auflage).
- Feldmeyer, N., Wabnitz, G., Leicht, S., Luckner-Minden, C., Schiller, M., Franz, T., Conradi, R., Kropf, P., Müller, I., Ho, A. D., Samstag, Y., & Munder, M. (2012). Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *International Immunology*, *24*(5), 303–313. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs004>
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(18), 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>
- Fletcher, M., Ramirez, M. E., Sierra, R. A., Raber, P., Thevenot, P., Al-Khami, A. A., Sanchez-Pino, D., Hernandez, C., Wyczechowska, D. D., Ochoa, A. C., & Rodriguez, P. C. (2015). L-Arginine Depletion Blunts Antitumor T-cell Responses by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, *75*(2), 275–283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1491>
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, *33*(7), 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fort, J., De La Ballina, L. R., Burghardt, H. E., Ferrer-Costa, C., Turnay, J., Ferrer-Orta, C., Usón, I., Zorzano, A., Fernández-Recio, J., Orozco, M., Lizarbe, M. A., Fita, I., & Palacín, M. (2007). The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(43), 31444–31452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704524200>
- Fotiadis, D., Kanai, Y., & Palacin, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>

-
- Frecha, C., Lévy, C., Cosset, F.-L., & Verhoeven, E. (2010). Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy. *Molecular Therapy*, *18*(10), 1748–1757. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.178>
- Fuchs, B. C., & Bode, B. P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? *Seminars in Cancer Biology*, *15*(4), 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.005>
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Cha, S. H., Endou, H., & Kanai, Y. (2000). Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(13), 9690–9698. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9690>
- Fultang, L., Vardon, A., De Santo, C., & Mussai, F. (2016). Molecular basis and current strategies of therapeutic arginine depletion for cancer. *International Journal of Cancer*, *139*(3), 501–509. <https://doi.org/10.1002/ijc.30051>
- Fung, M. K. L., & Chan, G. C.-F. (2017). Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, *10*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0509-9>
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *9*(3), 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Ganapathy, M. E., & Ganapathy, V. (2005). Amino Acid Transporter ATB_{0,+} as a delivery system for drugs and prodrugs. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, *5*(4), 357–364. <https://doi.org/10.2174/156800805774912953>
- Ganapathy, V., Thangaraju, M., & Prasad, P. D. (2009). Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology and Therapeutics*, *121*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.005>
- Garcia-Navas, R., Munder, M., & Mollinedo, F. (2012). Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy*, *8*(11), 1557–1576. <https://doi.org/10.4161/auto.21315>
- Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., Zamboni, N., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*, *167*(3), 829–842.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>
- Glazer, E. S., Piccirillo, M., Albino, V., Di Giacomo, R., Palaia, R., Mastro, A. A., Beneduce,

-
- G., Castello, G., De Rosa, V., Petrillo, A., Ascierio, P. A., Curley, S. A., & Izzo, F. (2010). Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(13), 2220–2226. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7765>
- Glazer, E. S., Stone, E. M., Zhu, C., Massey, K. L., Hamir, A. N., & Curley, S. A. (2011). Bioengineered human arginase I with enhanced activity and stability controls hepatocellular and pancreatic carcinoma xenografts. *Translational Oncology*, *4*(3), 138–146. <https://doi.org/10.1593/tlo.10265>
- Gornall, A. G., & Hunter, A. (1939). L-(+)citrulline. *Biochemical Journal*, *33*(2), 170–172. <https://doi.org/10.1042/bj0330170>
- Gräf, P., Förstermann, U., & Closs, E. I. (2001). The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology*, *132*(6), 1193–1200. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703921>
- Green, M. H., Brooks, T. L., Mendelsohn, J., & Howell, S. B. (1980). Antitumor Activity of L-Canavanine against L1210 Murine Leukemia. *Cancer Research*, *40*(3), 535–537.
- Green, M. H., & Ward, J. F. (1983). Enhancement of human tumor cell killing by L-canavanine in combination with gamma-radiation. *Cancer Research*, *43*(9), 4180–4182.
- Grohmann, U., & Bronte, V. (2010). Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunological Reviews*, *236*, 243–264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00915.x>
- Haines, R. J., Pendleton, L. C., & Eichler, D. C. (2011). Argininosuccinate synthase: At the center of arginine metabolism. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *2*(1), 8–23.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hatanaka, T., Haramura, M., Fei, Y.-J., Miyauchi, S., Bridges, C. C., Ganapathy, P. S., Smith, S. B., Ganapathy, V., & Ganapathy, M. E. (2004). Transport of amino acid-based prodrugs by the Na⁺- and Cl⁻-coupled amino acid transporter ATB^{0,+} and expression of the transporter in tissues amenable for drug delivery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *308*(3), 1138–1147. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.057109>
- Hatzoglou, M., Fernandez, J., Yaman, I., & Closs, E. (2004). Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annual Review of Nutrition*, *24*, 377–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120>
- Hayashi, K., Jutabha, P., Endou, H., Sagara, H., & Anzai, N. (2013). LAT1 is a critical

-
- transporter of essential amino acids for immune reactions in activated human T cells. *The Journal of Immunology*, *191*(8), 4080–4085. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300923>
- Haynes, B. F., Hemler, M. E., Mann, D. L., Eisenbarth, G. S., Shelhamer, J., Mostowski, H. S., Thomas, C. A., Strominger, J. L., & Fauci, A. S. (1981). Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *126*(4), 1409–1414.
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., & Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *447*(5), 465–468. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1192-y>
- Hemler, M. E., & Strominger, J. L. (1982). Characterization of antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines. *The Journal of Immunology*, *129*(2), 623–628.
- Herishanu, Y., Katz, B.-Z., Lipsky, A., & Wiestner, A. (2013). Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *27*(2), 173–206. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.01.002>
- Herishanu, Y., Perez-Galan, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., Raghavachari, N., Liu, P., McCoy, J. P., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Sherry, R., Arthur, D. C., Maric, I., ... Wiestner, A. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *117*(2), 563–574. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284984>
- Hernandez, C. P., Morrow, K., Lopez-Barcons, L. A., Zabaleta, J., Sierra, R., Velasco, C., Cole, J., & Rodriguez, P. C. (2010). Pegylated arginase I: a potential therapeutic approach in T-ALL. *Blood*, *115*(25), 5214–5221. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258822>
- Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhauser, M. L., Manalis, S. R., & Vander Heiden, M. G. (2016). Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells. *Developmental Cell*, *36*(5), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.012>
- Huang, C. C., Li, Y., Lopez, A. B., Chiang, C.-M., Kaufman, R. J., Snider, M. D., & Hatzoglou, M. (2010). Temporal regulation of Cat-1 (cationic amino acid transporter-1) gene transcription during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical Journal*, *429*(1), 215–224. <https://doi.org/10.1042/BJ20100286>

-
- Hundal, H. S., & Taylor, P. M. (2009). Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(4), E603-13. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91002.2008>
- Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S., & Lavoinne, A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *European Journal of Biochemistry*, 270(9), 1887–1899. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03559.x>
- Isoda, A., Kaira, K., Iwashina, M., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Oyama, T., Asao, T., Matsumoto, M., & Sawamura, M. (2014). Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Science*, 105(11), 1496–1502. <https://doi.org/10.1111/cas.12529>
- Ito, K., & Groudine, M. (1997). A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26780–26786. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26780>
- Izzo, F., Marra, P., Beneduce, G., Castello, G., Vallone, P., De Rosa, V., Cremona, F., Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S., Clark, M. A., Ng, C., & Curley, S. A. (2004). Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: Results from phase I/II studies. *Journal of Clinical Oncology*, 22(10), 1815–1822. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.120>
- Jäger, K., Bönisch, U., Risch, M., Worlitzsch, D., & Paulsen, F. (2009). Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(3), 1112–1121. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2368>
- Jeon, Y. J., Khelifa, S., Ratnikow, B., Scott, D. A., Feng, Y., Parisi, F., Ruller, C., Lau, E., Kim, H., Brill, L. M., Jiang, T., Rimm, D., Cardiff, R. D., Mills, G. B., Smith, J. W., Osterman, A. L., Kluger, Y., & Ronai, Z. A. (2015). Regulation of glutamine carrier proteins by RNF5 determines breast cancer response to ER stress-inducing chemotherapies. *Cancer Cell*, 27(3), 354–369. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.006>
- Johnson, M. O., Siska, P. J., Contreras, D. C., & Rathmell, J. C. (2016). Nutrients and the microenvironment to feed a T cell army. *Seminars in Immunology*, 28(5), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.09.003>
- Jones, J. W., Tudor, G., Li, F., Tong, Y., Katz, B., Farese, A. M., MacVittie, T. J., Booth, C., & Kane, M. A. (2015). Citrulline as a Biomarker in the Murine Total-Body Irradiation

-
- Model: Correlation of Circulating and Tissue Citrulline to Small Intestine Epithelial Histopathology. *Health Physics*, 109(5), 452–465. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000346>
- Jost, M. M., Ninci, E., Meder, B., Kempf, C., Van Royen, N., Hua, J., Berger, B., Hofer, I., Modolell, M., & Buschmann, I. (2003). Divergent effects of GM-CSF and TGFβ1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis. *The FASEB Journal*, 17(15), 2281–2283. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0071fje>
- Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S. H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Kim, J. Y., Miyamoto, K., Takeda, E., & Endou, H. (2000). Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20787–20793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000634200>
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E., & Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *The Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23629–23632. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23629>
- Karunakaran, S., Ramachandran, S., Coothankandaswamy, V., Elangovan, S., Babu, E., Periyasamy-Thandavan, S., Gurav, A., Gnanaprakasam, J. P., Singh, N., Schoenlein, P. V., Prasad, P. D., Thangaraju, M., & Ganapathy, V. (2011). SLC6A14 (ATB^{0,+}) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31830–31838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229518>
- Kavanaugh, M. P. (1993). Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry*, 32(22), 5781–5785. <https://doi.org/10.1021/bi00073a009>
- Kawahara, K., Gotoh, T., Oyadomari, S., Kajizono, M., Kuniyasu, A., Ohsawa, K., Imai, Y., Kohsaka, S., Nakayama, H., & Mori, M. (2001). Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Molecular Brain Research*, 90(2), 165–173. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00100-0)
- Kelly, M. P., Jungbluth, A. A., Wu, B. W., Bomalaski, J., Old, L. J., & Ritter, G. (2012). Arginine deiminase PEG20 inhibits growth of small cell lung cancers lacking expression of argininosuccinate synthetase. *British Journal of Cancer*, 106(2), 324–332. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.524>

-
- Kim, D. K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S. H., & Endou, H. (2001). Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17221–17228. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009462200>
- Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M., & Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*, 352(6337), 725–728. <https://doi.org/10.1038/352725a0>
- Kim, R. H., Coates, J. M., Bowles, T. L., McNerney, G. P., Sutcliffe, J., Jung, J. U., Gandour-Edwards, R., Chuang, F. Y. S., Bold, R. J., & Kung, H.-J. (2009). Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Research*, 69(2), 700–708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3157>
- Kirk, S. J., & Barbul, A. (1990). Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14(5 Suppl), 226S–229S. <https://doi.org/10.1177/014860719001400514>
- Kremer, J. C., Prudner, B. C., Lange, S. E. S., Bean, R., Schultze, M. B., Brashears, C. B., Radyk, M. D., Redlich, N., Tzeng, S.-C., Kami, K., Shelton, L., Li, A., Morgan, Z., Bomalaski, J. S., Tsukamoto, T., McConathy, J., Michel, L. S., Held, J. M., & Van Tine, B. A. (2017). Arginine Deprivation Inhibits the Warburg Effect and Upregulates Glutamine Anaplerosis and Serine Biosynthesis in ASS1-Deficient Cancers. *Cell Reports*, 18(4), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.077>
- Kriel, J., Haesendonckx, S., Rubio-Teixeira, M., Van Zeebroeck, G., & Thevelein, J. M. (2011). From transporter to transceptor: Signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls. *BioEssays*, 33(11), 870–879. <https://doi.org/10.1002/bies.201100100>
- Kurlishchuk, Y., Vynnytska-Myronovska, B., Grosse-Gehling, P., Bobak, Y., Manig, F., Chen, O., Merker, S. R., Henle, T., Löck, S., Stange, D. E., Stasyk, O., & Kunz-Schughart, L. A. (2016). Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. *Oncotarget*, 7(45), 73292–73308. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12320>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lam, T.-L., Wong, G. K. Y., Chow, H.-Y., Chong, H.-C., Chow, T.-L., Kwok, S.-Y., Cheng, P. N. M., Wheatley, D. N., Lo, W.-H., & Leung, Y.-C. (2011). Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell

-
- cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(2), 366–376. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00798.x>
- Lange, S. M., McKell, M. C., Schmidt, S. M., Hossfeld, A. P., Chaturvedi, V., Kinder, J. M., McAlees, J. W., Lewkowich, I. P., Way, S. S., Turner, J., & Qualls, J. E. (2017). L-Citrulline Metabolism in Mice Augments CD4+ T Cell Proliferation and Cytokine Production In Vitro, and Accumulation in the Mycobacteria-Infected Lung. *Frontiers in Immunology*, 8, 1561. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01561>
- Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., & Boyman, O. (2009). IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(4), 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.011>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Louis, C. A., Reichner, J. S., Henry, W. L., Mastrofrancesco, B., Gotoh, T., Mori, M., & Albina, J. E. (1998). Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *American Journal of Physiology*, 274(3), R775–R782. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.3.r775>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lu, Y., Wang, W., Wang, J., Yang, C., Mao, H., Fu, X., Wu, Y., Cai, J., Han, J., Xu, Z., Zhuang, Z., Liu, Z., Hu, H., & Chen, B. (2013). Overexpression of arginine transporter CAT-1 is associated with accumulation of L-arginine and cell growth in human colorectal cancer tissue. *PLoS ONE*, 8(9), e73866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073866>
- Lüneburg, N., Xanthakis, V., Schwedhelm, E., Sullivan, L. M., Maas, R., Anderssohn, M., Riederer, U., Glazer, N. L., Vasani, R. S., & Böger, R. H. (2011). Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort. *The Journal of Nutrition*, 141(12), 2186–2190. <https://doi.org/10.3945/jn.111.148197>
- MacLeod, C. L., Finley, K., Kakadu, D., Kozak, C. A., & Wilkinson, M. F. (1990). Activated T cells express a novel gene on chromosome 8 that is closely related to the murine ecotropic retroviral receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 10(7), 3663–3674. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.7.3663>
- Majumder, M., Yaman, I., Gaccioli, F., Zeenko, V. V., Wang, C., Caprara, M. G., Venema, R. C., Komar, A. A., Snider, M. D., & Hatzoglou, M. (2009). The hnRNA-binding proteins

-
- hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 Arginine/Lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2899–2912. <https://doi.org/10.1128/MCB.01774-08>
- Mandel, H., Levy, N., Izkovitch, S., & Korman, S. H. (2005). Elevated plasma citrulline and arginine due to consumption of *Citrullus vulgaris* (watermelon). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(4), 467–472. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-0467-1>
- Marini, J. C. (2016). Interrelationships between glutamine and citrulline metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(1), 62–66. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000233>
- Marini, J. C., & Didelija, I. C. (2015). Arginine depletion by arginine deiminase does not affect whole protein metabolism or muscle fractional protein synthesis rate in mice. *PLoS ONE*, 10(3), e0119801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119801>
- Matheson, N. J., Sumner, J., Wals, K., Rapiteanu, R., Weekes, M. P., Vigan, R., Weinelt, J., Schindler, M., Antrobus, R., Costa, A. S. H., Frezza, C., Clish, C. B., Neil, S. J. D., & Lehner, P. J. (2015). Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host and Microbe*, 18(4), 409–423. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.003>
- McCracken, A. N., & Edinger, A. L. (2013). Nutrient transporters: The Achilles' heel of anabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(4), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.002>
- Miraki-Moud, F., Ghazaly, E., Ariza-McNaughton, L., Hodby, K. A., Clear, A., Anjos-Afonso, F., Liapis, K., Grantham, M., Sohrabi, F., Cavenagh, J., Bomalaski, J. S., Gribben, J. G., Szlosarek, P. W., Bonnet, D., & Taussig, D. C. (2015). Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood*, 125(26), 4060–4068. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-608133>
- Moffat, J., Grueneberg, D. A., Yang, X., Kim, S. Y., Kloepfer, A. M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T. M., Luo, B., Grenier, J. K., Carpenter, A. E., Foo, S. Y., Stewart, S. A., Stockwell, B. R., Hacohen, N., Hahn, W. C., Lander, E. S., Sabatini, D. M., & Root, D. E. (2006). A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell*, 124(6), 1283–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.040>
- Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Bénazeth, S., & Cynober, L. (2008). Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: The Citrudose pharmacokinetic study. *British Journal of Nutrition*,

99(4), 855–862. <https://doi.org/10.1017/S0007114507841110>

- Molinier-Frenkel, V., & Castellano, F. (2017). Immunosuppressive enzymes in the tumor microenvironment. *FEBS Letters*, *591*(19), 3135–3157. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12784>
- Morris, C. R., Hamilton-Reeves, J., Martindale, R. G., Sarav, M., & Ochoa Gautier, J. B. (2017). Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. *Nutrition in Clinical Practice*, *32*(1_suppl), 30S-47S. <https://doi.org/10.1177/0884533617691250>
- Morris Jr, S. M. (2006). Arginine: Beyond protein. *American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(2), 508S-512S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.508S>
- Morris Jr, S. M. (2007). Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *The Journal of Nutrition*, *137*(6 Suppl 2), 1602S-1609S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S>
- Morris Jr, S. M., Bhamidipati, D., & Kepka-Lenhart, D. (1997). Human type II arginase: Sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*, *193*(2), 157–161. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00099-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00099-1)
- Morrow, K., Hernandez, C. P., Raber, P., Del Valle, L., Wilk, A. M., Majumdar, S., Wyczechowska, D., Reiss, K., & Rodriguez, P. C. (2013). Anti-leukemic mechanisms of pegylated arginase I in acute lymphoblastic T-cell leukemia. *Leukemia*, *27*(3), 569–577. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.247>
- Munder, M. (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*, *158*(3), 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
- Munder, M., Choi, B.-S., Rogers, M., & Kropf, P. (2009). L-Arginine deprivation impairs *Leishmania* major-specific T-cell responses. *European Journal of Immunology*, *39*(8), 2161–2172. <https://doi.org/10.1002/eji.200839041>
- Munder, M., Eichmann, K., & Modolell, M. (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *The Journal of Immunology*, *160*(11), 5347–5354.
- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G., & Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *The Journal of Immunology*, *163*(7), 3771–3777.
- Munder, M., Engelhardt, M., Knies, D., Medenhoff, S., Wabnitz, G., Luckner-Minden, C., Feldmeyer, N., Voss, R.-H., Kropf, P., Müller, I., Conradi, R., Samstag, Y., Theobald, M.,

-
- Ho, A. D., Goldschmidt, H., & Hundemer, M. (2013). Cytotoxicity of Tumor Antigen Specific Human T Cells Is Unimpaired by Arginine Depletion. *PLoS ONE*, *8*(5), e63521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063521>
- Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamagnere, C., Fuentes, J. M., Luckner, C., Doschko, G., Soler, G., Eichmann, K., Müller, F.-M., Ho, A. D., Goerner, M., & Modolell, M. (2005). Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, *105*(6), 2549–2556. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2521>
- Munder, M., Schneider, H., Luckner, C., Giese, T., Langhans, C.-D., Fuentes, J. M., Kropf, P., Mueller, I., Kolb, A., Modolell, M., & Ho, A. D. (2006). Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, *108*(5), 1627–1634. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-010389>
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., & Mellor, A. L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, *22*(5), 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.013>
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (7. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag.
- Murray, P. J. (2016). Amino acid auxotrophy as a system of immunological control nodes. *Nature Immunology*, *17*(2), 132–139. <https://doi.org/10.1038/ni.3323>
- Mussai, F., Egan, S., Higginbotham-Jones, J., Perry, T., Beggs, A., Odintsova, E., Loke, J., Pratt, G., U, K. P., Lo, A., Ng, M., Kearns, P., Cheng, P., & De Santo, C. (2015). Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood*, *125*(15), 2386–2396. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-600643>
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K., & Minato, N. (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(5), 3009–3016. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.3009>
- Nakanishi, T., Hatanaka, T., Huang, W., Prasad, P. D., Leibach, F. H., Ganapathy, M. E., & Ganapathy, V. (2001). Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+)₁ from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, *532*(Pt 2), 297–304. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0297f.x>

-
- Nakaya, M., Xiao, Y., Zhou, X., Chang, J.-H., Chang, M., Cheng, X., Blonska, M., Lin, X., & Sun, S.-C. (2014). Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. *Immunity*, *40*(5), 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.007>
- Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J., & MacLeod, C. L. (2001). Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(19), 15881–15885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010030200>
- Nicholson, B., Sawamura, T., Masaki, T., & MacLeod, C. L. (1998). Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(24), 14663–14666. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14663>
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., & Murphy, L. O. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, *136*(3), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>
- Nieves Jr, C., & Langkamp-Henken, B. (2002). Arginine and immunity: A unique perspective. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *56*(10), 471–482. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00291-3](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00291-3)
- Nurchayanti, A. D. R., & Wink, M. (2016). L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ*, *4*, e1542. <https://doi.org/10.7717/peerj.1542>
- Oberlies, J., Watzl, C., Giese, T., Luckner, C., Kropf, P., Müller, I., Ho, A. D., & Munder, M. (2009). Regulation of NK Cell Function by Human Granulocyte Arginase. *The Journal of Immunology*, *182*(9), 5259–5267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803523>
- Oda, K., Hosoda, N., Endo, H., Saito, K., Tsujihara, K., Yamamura, M., Sakata, T., Anzai, N., Wempe, M. F., Kanai, Y., & Endou, H. (2010). L-Type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Science*, *101*(1), 173–179. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01386.x>
- Ott, P. A., Carvajal, R. D., Pandit-Taskar, N., Jungbluth, A. A., Hoffman, E. W., Wu, B.-W., Bomalaski, J. S., Venhaus, R., Pan, L., & Old, L. J. (2013). Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Investigational New Drugs*, *31*(2), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9862-2>
- Patil, M. D., Bhaumik, J., Babykutty, S., Banerjee, U. C., & Fukumura, D. (2016). Arginine

-
- dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*, 35(38), 4957–4972. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.37>
- Pegg, A. E., & McCann, P. P. (1982). Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology*, 243(5), C212–221. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1982.243.5.C212>
- Perkins, C. P., Mar, V., Shutter, J. R., del Castillo, J., Danilenko, D. M., Medlock, E. S., Ponting, I. L., Graham, M., Stark, K. L., Zuo, Y., Cunningham, J. M., & Bosselman, R. A. (1997). Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes and Development*, 11(7), 914–925. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.914>
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kühn, L., & Verrey, F. (1999). Amino acid transport of y+L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO Journal*, 18(1), 49–57. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.49>
- Pfeiffer, R., Spindler, B., Loffing, J., Skelly, P. J., Shoemaker, C. B., & Verrey, F. (1998). Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Letters*, 439(1–2), 157–162. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01359-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01359-3)
- Phillips, M. M., Sheaff, M. T., & Szlosarek, P. W. (2013). Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: Opportunities and challenges. *Cancer Research and Treatment*, 45(4), 251–262. <https://doi.org/10.4143/crt.2013.45.4.251>
- Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., & Palacín, M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19738–19744. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19738>
- Pinilla, J., Aledo, J. C., Cwiklinski, E., Hyde, R., Taylor, P. M., & Hundal, H. S. (2011). SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation? *Frontiers in Bioscience*, 3, 1289–1299. <https://doi.org/10.2741/e332>
- Prouty, W. F., Karnovsky, M. J., & Goldberg, A. L. (1975). Degradation of Abnormal Proteins in Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(3), 1112–1122.
- Qiu, F., Chen, Y.-R., Liu, X., Cheng-Ying, C., Shen, L.-J., Xu, J., Gaur, S., Forman, H. J., Zhang, H., Zheng, S., Yen, Y., Huang, J., Kung, H.-J., & Ann, D. K. (2014). Arginine starvation impairs mitochondrial respiratory function in ASS1-deficient breast cancer cells. *Science Signaling*, 7(319), ra31. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004761>

-
- Qiu, F., Huang, J., & Sui, M. (2015). Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers. *Cancer Letters*, 364(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.020>
- Quackenbush, E., Clabby, M., Gottesdiener, K. M., Barbosa, J., Jones, N. H., Strominger, J. L., Speck, S., & Leiden, J. M. (1987). Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: A type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18), 6526–6530. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.18.6526>
- Rabinovich, S., Adler, L., Yizhak, K., Sarver, A., Silberman, A., Agron, S., Stettner, N., Sun, Q., Brandis, A., Helbling, D., Korman, S., Itzkovitz, S., Dimmrock, D., Ulitsky, I., Nagamani, S. C. S., Ruppin, E., & Erez, A. (2015). Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*, 527(7578), 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature15529>
- Redman, C. M., Avellino, G., & Yu, S. (1983). Secretion of proalbumin by canavanine-treated Hep-G2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(6), 3446–3452.
- Ren, P., Yue, M., Xiao, D., Xiu, R., Gan, L., Liu, H., & Qing, G. (2015). ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. *Journal of Pathology*, 235(1), 90–100. <https://doi.org/10.1002/path.4429>
- Riess, C., Shokraie, F., Classen, C. F., Kreikemeyer, B., Fiedler, T., Junghanss, C., & Maletzki, C. (2018). Arginine-Depleting Enzymes – An Increasingly Recognized Treatment Strategy for Therapy-Refractory Malignancies. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(2), 854–870. <https://doi.org/10.1159/000495382>
- Robinson, A. T., Miller, N., & Alexander, D. R. (1993). CD3 antigen-mediated calcium signals and protein kinase C activation are higher in CD45R0+ than in CD45RA+ human T lymphocyte subsets. *European Journal of Immunology*, 23(1), 61–68. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230111>
- Roci, I., Watrous, J. D., Lagerborg, K. A., Lafranchi, L., Lindqvist, A., Jain, M., & Nilsson, R. (2019). Mapping Metabolic Events in the Cancer Cell Cycle Reveals Arginine Catabolism in the Committed SG2M Phase. *Cell Reports*, 26(7), 1691-1700.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.059>
- Rodriguez, P. C., Ochoa, A. C., & Al-Khami, A. A. (2017). Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, 8, 93.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093>

- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., & Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, *109*(4), 1568–1573. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-031856>
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuolo, M. B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E. M., Antonia, S., Ochoa, J. B., & Ochoa, A. C. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research*, *64*(16), 5839–5849. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0465>
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., DeSalvo, J., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Quiceno, D. G., Ochoa, J. B., & Ochoa, A. C. (2003). L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *Journal of Immunology*, *171*(3), 1232–1239. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1232>
- Rosenthal, G. A. (1977). The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *The Quarterly Review of Biology*, *52*(2), 155–178. <https://doi.org/10.1086/409853>
- Rosenthal, G. A. (1988). The protective action of a higher plant toxic product. *Bioscience*, *38*(2), 104–109. <https://doi.org/10.2307/1310616>
- Rosenthal, G. A., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1989). L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(23), 13693–13696.
- Rosilio, C., Nebout, M., Imbert, V., Griessinger, E., Neffati, Z., Benadiba, J., Hagenbeek, T., Spits, H., Reverso, J., Ambrosetti, D., Michiels, J.-F., Bailly-Maitre, B., Endou, H., Wempe, M. F., & Peyron, J.-F. (2015). L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): a therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *29*(6), 1253–1266. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.338>
- Rotmann, A., Simon, A., Martiné, U., Habermeier, A., & Closs, E. I. (2007). Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y⁺L. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *292*(6), C2259–68. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00323.2006>
- Rotmann, A., Strand, D., Martiné, U., & Closs, E. I. (2004). Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54185–54192.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M409556200>

- Rotoli, B. M., Barilli, A., Ingoglia, F., Visigalli, R., Bianchi, M. G., Ferrari, F., Martinelli, D., Dionisi-Vici, C., & Dall'Asta, V. (2019). Analysis of LPI-causing mutations on y+LAT1 function and localization. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *14*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1028-2>
- Rotoli, B. M., Bussolati, O., Sala, R., Barilli, A., Talarico, E., Gazzola, G. C., & Dall'Asta, V. (2004). INFgamma stimulates arginine transport through system y+L in human monocytes. *FEBS Letters*, *571*(1–3), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.086>
- Rotoli, B. M., Closs, E. I., Barilli, A., Visigalli, R., Simon, A., Habermeier, A., Bianchi, N., Gambari, R., Gazzola, G. C., Bussolati, O., & Dall'Asta, V. (2009). Arginine transport in human erythroid cells: Discrimination of CAT1 and 4F2hc/y+LAT2 roles. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *458*(6), 1163–1173. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0692-9>
- Rotoli, B. M., Dall'Asta, V., Barilli, A., D'Ippolito, R., Tipa, A., Olivieri, D., Gazzola, G. C., & Bussolati, O. (2007). Alveolar macrophages from normal subjects lack the NOS-related system y+ for arginine transport. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *37*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0262OC>
- Sahota, A., Tischfield, J. A., Goldfarb, D. S., Ward, M. D., & Hu, L. (2019). Cystinuria: genetic aspects, mouse models, and a new approach to therapy. *Urolithiasis*, *47*(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s00240-018-1101-7>
- Sailer, M., Dahlhoff, C., Giesbertz, P., Eidens, M. K., de Wit, N., Rubio-Aliaga, I., Boekschoten, M. V., Müller, M., & Daniel, H. (2013). Increased Plasma Citrulline in Mice Marks Diet-Induced Obesity and May Predict the Development of the Metabolic Syndrome. *PLoS ONE*, *8*(5), e63950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063950>
- Saravakos, P., Kokkinou, V., & Giannatos, E. (2014). Cystinuria: Current diagnosis and management. *Urology*, *83*(4), 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2013.10.013>
- Schmidlin, A., Fischer, S., & Wiesinger, H. (2000). Transport of L-citrulline in neural cell cultures. *Developmental Neuroscience*, *22*(5–6), 393–398. <https://doi.org/10.1159/000017468>
- Schwedhelm, E., Maas, R., Freese, R., Jung, D., Lukacs, Z., Jambrecina, A., Spickler, W., Schulze, F., & Böger, R. H. (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *65*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x>

-
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., & Kanai, Y. (1999). Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(28), 19745–19751. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19745>
- Segel, G. B., Tometsko, A. M., & Lichtman, M. A. (1985). Y⁺- and L-system amino acid transport in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes: photoinhibition by fluoronitrophenylazide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *242*(2), 347–354. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90219-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90219-x)
- Sharma, S., & Rai, K. R. (2019). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer*, *125*(9), 1432–1440. <https://doi.org/10.1002/cncr.31931>
- Shirai, H., Blundell, T. L., & Mizuguchi, K. (2001). A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(8), 465–468. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01906-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01906-5)
- Shustik, C., Bence-Bruckler, I., Delage, R., Owen, C. J., Toze, C. L., & Coutre, S. (2017). Advances in the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, *96*(7), 1185–1196. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-2982-1>
- Simon, A., Plies, L., Habermeier, A., Martiné, U., Reining, M., & Closs, E. I. (2003). Role of Neutral Amino Acid Transport and Protein Breakdown for Substrate Supply of Nitric Oxide Synthase in Human Endothelial Cells. *Circulation Research*, *93*(9), 813–820. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097761.19223.0D>
- Sinclair, L. V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y.-B., Taylor, P. M., & Cantrell, D. A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature Immunology*, *14*(5), 500–508. <https://doi.org/10.1038/ni.2556>
- Sloan, J. L., & Mager, S. (1999). Cloning and functional expression of a human Na⁽⁺⁾ and Cl⁽⁻⁾-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁽⁰⁺⁾. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(34), 23740–23745. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23740>
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., & Zhang, Q. (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(11), 2977–2984. <https://doi.org/10.1002/jcp.25785>
- Swaffar, D. S., Ang, C. Y., Desai, P. B., & Rosenthal, G. A. (1994). Inhibition of the growth of human pancreatic cancer cells by the arginine antimetabolite L-canavanine. *Cancer Research*, *54*(23), 6045–6048.

-
- Swaffar, D. S., Ang, C. Y., Desai, P. B., Rosenthal, G. A., Thomas, D. A., Crooks, P. A., & John, W. J. (1995). Combination Therapy With 5-fluorouracil and L-canavanine: In Vitro and in Vivo Studies. *Anti-Cancer Drugs*, 6(4), 586–593. <https://doi.org/10.1097/00001813-199508000-00012>
- Taheri, F., Ochoa, J. B., Faghiri, Z., Culotta, K., Park, H. J., Lan, M. S., Zea, A. H., & Ochoa, A. C. (2001). L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clinical Cancer Research*, 7(3 Suppl), 958s-965s.
- Tarasenko, T. N., Gomez-Rodriguez, J., & McGuire, P. J. (2015). Impaired T cell function in argininosuccinate synthetase deficiency. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(2), 273–278. <https://doi.org/10.1189/jlb.1AB0714-365R>
- Tedesco, T. A., Benford, S. A., Foster, R. C., & Barness, L. A. (1984). Free amino acids in *Citrullus vulgaris* (watermelon). *Pediatrics*, 73(6), 879.
- Ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2014). Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology and Therapeutics*, 144(3), 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.07.003>
- Thomas, D. A., Rosenthal, G. A., Gold, D. V., & Dickey, K. (1986). Growth inhibition of a rat colon tumor by L-canavanine. *Cancer Research*, 46(6), 2898–2903.
- Timosenko, E., Ghadbane, H., Silk, J. D., Shepherd, D., Gileadi, U., Howson, L. J., Laynes, R., Zhao, Q., Strausberg, R. L., Olsen, L. R., Taylor, S., Buffa, F. M., Boyd, R., & Cerundolo, V. (2016). Nutritional Stress Induced by Tryptophan-Degrading Enzymes Results in ATF4-Dependent Reprogramming of the Amino Acid Transporter Profile in Tumor Cells. *Cancer Research*, 76(21), 6193–6204. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3502>
- Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y.-B., Zorzano, A., & Palacín, M. (1998). Identification and Characterization of a Membrane Protein (γ +L Amino Acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the Amino Acid Transport Activity γ +L. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32437–32445. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32437>
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H., & Kanai, Y. (1996). Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 14883–14890. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.14883>
- Van de Velde, L. A., Guo, X.-Z. J., Barbaric, L., Smith, A. M., Oguin III, T. H., Thomas, P. G., & Murray, P. J. (2016). Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Reports*, 17(9), 2247–2258. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.079>

-
- van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A. D., Thoeng, A., Gao, D., Ritchie, W., Feng, Y., Bailey, C. G., Deng, N., Harvey, K., Beith, J. M., Selinger, C. I., O'Toole, S. A., Rasko, J. E. J., & Holst, J. (2016). ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-Like Breast Cancer. *Oncogene*, *35*(24), 3201–3208. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.381>
- van Vught, A. J. A. H., Dagnelie, P. C., Arts, I. C. W., Froberg, K., Andersen, L. B., El-Naaman, B., Bugge, A., Nielsen, B. M., & Heitman, B. L. (2013). Dietary arginine and linear growth: the Copenhagen School Child Intervention Study. *The British Journal of Nutrition*, *109*(6), 1031–1039. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002942>
- Van Winkle, L. J., Campione, A. L., & Gorman, J. M. (1988). Na⁺-independent Transport of Basic and Zwitterionic Amino Acids in Mouse Blastocysts by a shared System and by Processes which distinguish between these substances. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(7), 3150–3163.
- Van Winkle, L. J., Christensen, H. N., & Campiones, A. L. (1985). Na⁺-dependent Transport of Basic, Zwitterionic, and Bicyclic Amino Acids by a broad-scope System in Mouse Blastocysts. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(22), 12118–12123.
- Varoqui, H., Zhu, H., Yao, D., Ming, H., & Erickson, J. D. (2000). Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(6), 4049–4054. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4049>
- Vekony, N., Wolf, S., Boissel, J.-P., Gnauert, K., & Closs, E. I. (2001). Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*, *40*(41), 12387–12394. <https://doi.org/10.1021/bi011345c>
- Verrey, F. (2003). System L: Heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *445*(5), 529–533. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0973-z>
- Verrey, F., Closs, E. I., Wagner, C. A., Palacin, M., Endou, H., & Kanai, Y. (2004). CATs and HATs: The SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *447*(5), 532–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1086-z>
- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., & Kühn, L. C. (2000). Glycoprotein-associated amino acid exchangers: Broadening the range of transport specificity. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *440*(4), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s004240000274>
- Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., & Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *45*(1), 106–113.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.024>

- Visser, Y. L. J., Debats, I. B. J. G., Luiking, Y. C., Jalan, R., van der Hulst, R. R. W. J., Dejong, C. H. C., & Deutz, N. E. P. (2004). Pros and cons of L-arginine supplementation in disease. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2), 193–210. <https://doi.org/10.1079/NRR200490>
- Vynnytska-Myronovska, B., Bobak, Y., Garbe, Y., Dittfeld, C., Stasyk, O., & Kunz-Schughart, L. A. (2012). Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. *International Journal of Cancer*, *130*(9), 2164–2175. <https://doi.org/10.1002/ijc.26221>
- Vynnytska, B. O., Mayevska, O. M., Kurlishchuk, Y. V., Bobak, Y. P., & Stasyk, O. V. (2011). Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, *22*(2), 148–157. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32833e0334>
- Wagner, C. A., Lang, F., & Bröer, S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *281*(4), C1077–C1093. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.4.c1077>
- Wakabayashi, Y., Yamada, E., Yoshida, T., & Takahashi, H. (1994). Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(51), 32667–32671.
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, A. R., & Kabat, D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*, *352*(6337), 729–731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/352729a0>
- Wang, Q., Hardie, R.-A., Hoy, A. J., Van Geldermalsen, M., Gao, D., Fazli, L., Sadowski, M. C., Balaban, S., Schreuder, M., Nagarajah, R., Wong, J. J.-L., Metierre, C., Pinello, N., Otte, N. J., Lehman, M. L., Gleave, M., Nelson, C. C., Bailey, C. G., Ritchie, W., ... Holst, J. (2015). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *The Journal of Pathology*, *236*(3), 278–289. <https://doi.org/10.1002/path.4518>
- Wang, Y., & Tate, S. S. (1995). Oligomeric structure of a renal cystine transporter: implications in cystinuria. *FEBS Letters*, *368*(2), 389–392. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00685-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00685-3)
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, *123*(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Wendtner, C.-M., Dreger, P., Gregor, M., Greil, R., Knauf, W. U., Pritzkeleit, R., Schetelig, J., Steurer, M., & Stilgenbauer, S. (2017). Chronische Lymphatische Leukämie (CLL).

- Werner, A., Amann, E., Schnitzius, V., Habermeier, A., Luckner-Minden, C., Leuchtner, N., Rupp, J., Closs, E. I., & Munder, M. (2016). Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, *46*(1), 92–103. <https://doi.org/10.1002/eji.201546047>
- Werner, A., Koschke, M., Leuchtner, N., Luckner-Minden, C., Habermeier, A., Rupp, J., Heinrich, C., Conradi, R., Closs, E. I., & Munder, M. (2017). 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*, *8*, 864. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00864>
- White, M. F. (1985). The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *822*(3–4), 355–374. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90015-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90015-2)
- Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., Chen, Y., Caponigro, G., Yao, Y.-M., Lengauer, C., Sellers, W. R., & Benson, J. D. (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle*, *8*(3), 498–504. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7701>
- Wijnands, K. A. P., Meesters, D. M., van Barneveld, K. W. Y., Visschers, R. G. J., Briedé, J. J., Vandendriessche, B., van Eijk, H. M. H., Bessems, B. A. F. M., van den Hoven, N., von Wintersdorff, C. J. H., Brouckaert, P., Bouvy, N. D., Lamers, W. H., Cauwels, A., & Poeze, M. (2015). Citrulline supplementation improves organ perfusion and arginine availability under conditions with enhanced arginase activity. *Nutrients*, *7*(7), 5217–5238. <https://doi.org/10.3390/nu7075217>
- Wileman, S. M., Mann, G. E., Pearson, J. D., & Baydoun, A. R. (2003). Role of L-citrulline transport in nitric oxide synthesis in rat aortic smooth muscle cells activated with LPS and interferon-gamma. *British Journal of Pharmacology*, *140*(1), 179–185. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705407>
- Willems, L., Jacque, N., Jacquél, A., Neveux, N., Maciel, T. T., Lambert, M., Schmitt, A., Poulain, L., Green, A. S., Uzunov, M., Kosmider, O., Radford-Weiss, I., Moura, I. C., Auberger, P., Ifrah, N., Bardet, V., Chapuis, N., Lacombe, C., Mayeux, P., ... Bouscary, D. (2013). Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*, *122*(20), 3521–3532. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-493163>

-
- Windmueller, H. G., & Spaeth, A. E. (1976). Metabolism of absorbed aspartate, asparagine, and arginine by rat small intestine in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *175*(2), 670–676. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90558-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90558-0)
- Worthen, D. R., Chien, L., Tsuboi, C. P., Mu, X. Y., Bartik, M. M., & Crooks, P. A. (1998). L-Canavanine Modulates Cellular Growth, Chemosensitivity and P-glycoprotein Substrate Accumulation in Cultured Human Tumor Cell Lines. *Cancer Letters*, *132*(1–2), 229–239. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(98\)00233-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(98)00233-x)
- Wu, G., & Morris Jr, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical Journal*, *336*(Pt 1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>
- Yau, T., Cheng, P. N., Chan, P., Chan, W., Chen, L., Yuen, J., Pang, R., Fan, S. T., & Poon, R. T. (2013). A phase 1 dose-escalating study of pegylated recombinant human arginase 1 (Peg-rhArg1) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Investigational New Drugs*, *31*(1), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9807-9>
- Yeomans, A., Thirdborough, S. M., Valle-Argos, B., Linley, A., Krysov, S., Sanchez Hidalgo, M., Leonard, E., Ishfaq, M., Wagner, S. D., Willis, A. E., Steele, A. J., Stevenson, F. K., Forconi, F., Coldwell, M. J., & Packham, G. (2016). Engagement of the B-cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood*, *127*(4), 449–458. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-660969>
- Yeremian, A., Martin, L., Arpa, L., Bertran, J., Soler, C., McLeod, C., Modolell, M., Palacín, M., Lloberas, J., & Celada, A. (2006). Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *European Journal of Immunology*, *36*(6), 1516–1526. <https://doi.org/10.1002/eji.200535694>
- Yeremian, A., Martin, L., Serrat, N., Arpa, L., Soler, C., Bertran, J., McLeod, C., Palacin, M., Modolell, M., Lloberas, J., & Celada, A. (2006). Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *The Journal of Immunology*, *176*(10), 5918–5924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.5918>
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, E., & Meruelo, D. (1992). Enhanced gene expression of the murine ecotropic retroviral receptor and its human homolog in proliferating cells. *Journal of Virology*, *66*(7), 4377–4381.
- Zanon, V., & Lugli, E. (2017). Differentiation of diverse progenies of memory T cells from naïve CD8+ T cell precursors. *Methods in Molecular Biology*, *1514*, 103–110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6548-9_8
- Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Atkins, M. B., Hernandez, C. P., Signoretti, S., Zabaleta, J.,

-
- McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A. O., Mier, J., & Ochoa, C. A. (2005). Arginase-Producing Myeloid Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Patients: A Mechanism of Tumor Evasion. *Cancer Research*, 65(8), 3044–3048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-4505>
- Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Culotta, K. S., Hernandez, C. P., DeSalvo, J., Ochoa, J. B., Park, H.-J., Zabaleta, J., & Ochoa, A. C. (2004). L-Arginine modulates CD3 ζ expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cellular Immunology*, 232(1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.01.004>
- Zhao, Y., Wang, L., & Pan, J. (2015). The role of L-type amino acid transporter 1 in human tumors. *Intractable & Rare Diseases Research*, 4(4), 165–169. <https://doi.org/10.5582/irdr.2015.01024>

Anhang

Etablierungsversuch der lentiviralen Transduktion zum Ausschalten der hCAT-1-Expression in humanen T-Lymphozyten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels siRNA, welche durch Nukleofektion in das Zellinnere eingeschleust wurde, transient die hCAT-1-Expression in stimulierten T-Lymphozyten gesenkt werden. Dies ging jedoch mit einer erheblichen, nicht durch die hCAT-1-Suppression begründeten, Einschränkung der T-Zellfunktion einher.

Die lentivirale Transduktion ermöglicht die dauerhafte Integration von Transgenen in das Genom von Zielzellen. Im Folgenden wird der Versuch der Etablierung der Herabregulation der hCAT-1-Expression mittels einer durch lentivirale Transduktion in humane T-Lymphozyten eingebrachte shRNA beschrieben. Neben der dauerhaften Suppression des hCAT-1, was die Analyse der Rolle dieses Transporters für stimulierte T-Lymphozyten über längere Zeiträume ermöglichen sollte, wurde auch mit einer geringeren Methoden-begründeten Zelltoxizität gerechnet.

In den folgenden Versuchen wurde mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-basierten pGIPZ-Vektoren (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) gearbeitet. Diese Plasmide enthalten mikro-RNA (miRNA)-30-adaptierte shRNA-Sequenzen für die spezifische Abschaltung von Genen. Diese setzen sich aus der sense- und antisense-Sequenz einer siRNA, welche durch eine Schleife der miRNA-30 voneinander getrennt und über dies hinaus von den Nukleotiden des Haarnadelschleifenstamm der miRNA-30 flankiert werden, zusammen. Dadurch werden diese modifizierten shRNAs (nach Integration in das Genom der Zielzelle und Transkription) wie eine mikro-RNA prozessiert. Die resultierende einsträngige shRNA inhibiert durch Bindung an komplementäre mRNA-Sequenzen die Genexpression der Zielgene. Über die shRNA-Sequenzen hinaus enthält der pGIPZ-Plasmid auch die Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) für die durchflusszytometrische, quantitative Determination der Transduktionsrate und die Möglichkeit des Sortierens transduzierter Zellen. Des Weiteren ist eine Sequenz, welche für eine Puromycin-Resistenz kodiert, für die Selektion transduzierter Zellen enthalten. Flankiert werden alle diese Elemente durch sogenannte lange terminale Wiederholungssequenzen (Long terminal repeats, LTRs), wobei in der 5'-LTR das Verpackungssignal (Ψ) inkludiert ist und die 3'-LTR selbstinaktivierend ist.

Zur Abschaltung der hCAT-1-Expression sollten die Sequenzen der bereits erfolgreich eingesetzten siRNA sihCAT-1_b (sense: 5' GCATCTTCGTGAACGTCTATCT 3' und antisense: 5' AGATAGACGTTACGAAGATGC 3') in den pGIPZ-Vektor integriert werden.

Dafür wurde uns der Plasmid pGIPZ_shKSRP von [REDACTED] [REDACTED] (Institut für Pharmakologie) zur Verfügung gestellt. In diesen war bereits die miRNA-adaptierte shRNA-Sequenz gegen das RNA-Bindeprotein „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP) integriert. Um die hCAT-1-Expression in Zellen herabzuregulieren sollte nun die shRNA-Sequenz gegen KSRP in diesem Plasmid gegen die hCAT-1-shRNA ausgetauscht werden. Dazu wurde der pGIPZ_KSRP mit den Restriktionsenzymen XhoI, dessen Schnittstelle in der 3'miRNA-30-Haarnadelstamm-Sequenz liegt und dem MluI, welches *downstream* des 3'miRNA-30-Haarnadelstamms in der pGIPZ-Vektor-Sequenz schneidet, geschnitten. Parallel wurde genau dieses zwischen den beiden Restriktionsenzymen liegende Fragment, nur anstatt mit der shRNA-Sequenz gegen KSRP mit dieser gegen hCAT-1, von der Firma Eurofins Scientific (Luxemburg) synthetisiert und in den pEX-2A Klonierungsvektor integriert. Dieser wurde nun ebenfalls mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI geschnitten und das Integrat aus dem pEX2A-Vektor mit dem pGIPZ-Vektorhintergrund ligiert. Für die Prüfung der Integration der hCAT-1-shRNA wurde zwischen dem 3'miRNA-30-Haarnadelstamm und der MluI-Schnittstelle noch zusätzlich die Restriktionsstelle für das Enzym PmeI eingefügt. Der Plasmid pGIPZ_shCAT-1 enthielt somit neben der im Vektorhintergrund enthaltenden PmeI-Schnittstelle noch eine weitere (Abbildung A1). Als Kontrolle wurden die Plasmide pGIPZ_shKSRP und pGIPZ_shCAT-1 durch PmeI restringiert und anschließend in einem Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Wie erwartet wurde das Plasmid pGIPZ_KSRP durch PmeI lediglich linearisiert und trat als eine klare Bande mit der Größe von 11776 Basenpaaren (Bp) auf, wohingegen der pGIPZ_shCAT-1 an zwei verschiedenen Positionen verdaut wurde, was in 2 Fragmenten mit den Größen von 1143 und 10633 Bp resultierte (Abbildung A2). Zusätzlich wurde die Integration der shRNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung verifiziert (GENterprise GmbH, Mainz, Deutschland)

Für die Etablierung der Herabregulation der hCAT-1-Expression in humanen T-Lymphozyten durch Transduktion von shRNA-kodierenden Lentiviren, wurde die Effizienz der hCAT-1-Reduktion initial in DLD-1-Zellen analysiert. Diese Zellen wurden als Testsystem gewählt, da sie hCAT-1 auf hohem Level exprimieren und des Weiteren bereits erfolgreich in der AG [REDACTED] (Institut für Pharmakologie) mit Lentiviren transduziert worden waren.

Die Produktion der Lentiviren erfolgte durch HEK293T-Zellen, nachdem diese mit dem pGIPZ_shCAT1 und den akzessorischen Hilfsplasmiden pCMVΔR8.9 und pCMV-VSV-G kotransfiziert wurden. Parallel wurde durch Transfektion des Plasmids pGIPZ_Co, welcher keine shRNA-Sequenz enthält, ein Kontrollvirus produziert. 24 Stunden nach Transduktion der DLD-1-Zellen erfolgte jeweils der Selektionsstart der positiv-transduzierten Zellen durch 5

µg/ml Puromycin. Am Tag 4, 7 und 21 nach Transduktion wurde durch durchflusszytometrische Detektion von GFP die Transduktionseffizienz ermittelt. Zudem wurden Proteinlysate für die Quantifizierung der hCAT-1-Protein-Expression gewonnen.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten bereits am Tag 4 nach Transduktion mit dem Kontrollvirus 71,5 % GFP-positive Zellen, was sich weiterhin bis zum Tag 21 auf 99,7 % steigerte. Mit dem Virus zur Abschaltung der hCAT-1-Expression (pGIPZshCAT-1) wurden initial geringere Transduktionseffizienzen von nur 37 % an Tag 4 nach Transduktion beobachtet. Allerdings konnte auch mit diesem Virus, nach weiterem Selektionieren, am Tag 21 nach Transduktion in 98,5 % der Zellen GFP detektiert werden (Abbildung A3 A). Demnach konnte angenommen werden, dass am Tag 21 nach Virusexposition fast ausschließlich transduzierte Zellen, welche die viralen Sequenzen in das zelleigene Genom integriert hatten, vorlagen. Im Kontrast zu den hohen Transduktionsraten, zeigten jedoch die Western Blot-Analysen an Tag 4 und 7 nach Transduktion mit dem shCAT-1-Virus nur eine leichte Reduktion der hCAT-1-Protein-Expression, welche darüber hinaus bis zum Tag 21 wieder auf den Level der Kontrollzellen anstieg (Abbildung A3 B).

Zusammenfassend konnte, aufgrund der GFP-Expression in fast 100 % der Zellen auf die Integration der Virussequenzen in das Genom der DLD-1-Zellen geschlossen werden, jedoch zeigte die verwendete shRNA-Sequenz in diesen Zellen keinen Effekt auf die hCAT-1-Expression.

Auch die Wiederholung dieses Versuchs mit der epithelialen Zelllinie EA.hy926, welche im Vergleich zu DLD-1 den hCAT-1 nur auf moderatem Level exprimiert (Rotmann, 2007), zeigte vergleichbare Ergebnisse betreffend der Transduktionseffizienz und des ausbleibenden Effekts auf die hCAT-1-Expression. Demnach wurde darauf geschlossen, dass die verwendete shRNA-Sequenz zur Abschaltung der hCAT-1-Expression in dem genutzten Vektorsystem, unabhängig von dem verwendeten Zelltyp, unwirksam war.

Humane T-Lymphozyten gelten generell als schwer zu transduzierende Zellen. Vergleichsweise selten konnte in den letzten Jahren die erfolgreiche Integration von Transgenen in das Genom humaner T-Lymphozyten durch Nutzung von VSV-pseudotypisierten Lentiviren beschrieben werden (Cavalieri, 2003; Frecha, 2010). Im Folgenden sollte getestet werden, ob sich das Protokoll für die erfolgreiche Integration des pGIPZ_Co-Kontrollvirus in das Genom von DLD-1- und EA.hy926-Zellen ebenso auf humane T-Zellen übertragen ließ.

Lentiviren können, im Unterschied zu anderen Retroviren, auch in das Genom ruhender Zellen integrieren. Deshalb wurde initial die Transduktion in nicht-stimulierte T-Lymphozyten

versucht. Die Virusproduktion erfolgte, wie bereits beschrieben, nach Ko-Transfektion des pGIPZ_Co und den akzessorischen Plasmiden pCMV Δ 8.91 und pCMV-VSV-G in HEK293T-Zellen. Als Kontrolle wurden parallel zu den unstimulierten T-Zellen auch DLD-1-Zellen transduziert.

24 Stunden nach Transduktion der Zellen wurde durchflusszytometrisch die Expression von GFP als Maß für die Transfektionseffizienz detektiert. Diese Analysen zeigten ausschließlich GFP-negative T-Lymphozyten (Abbildung A4 A). In den DLD-1 hingegen konnte eine Transduktionsrate von 53,7 % beobachtet werden, was die Infektiösität des produzierten Virus bestätigte und Fehler im Versuchsverlauf ausschloss (Abbildung A4 B).

Aufgrund der erfolglosen Transduktion in ruhenden T-Zellen wurden die Immunzellen im folgenden Experiment unter verschiedenen Bedingungen vorinkubiert. Die T-Lymphozyten wurden a) unstimuliert belassen, b) 6 Tage mit 600 U/ml IL-2 c) 6 Tage mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln und d) 24 Stunden mit 600 U/ml IL-2 und 5 Tage mit 600 U/ml IL-2 plus anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln stimuliert. 24 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen aller Bedingungen mit anti-CD3/anti-CD28 gekoppelten Partikeln unter Selektion durch Puromycin weitere 5 Tage stimuliert. Danach erfolgte die Detektion GFP-positiver Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie.

Das Experiment zeigte, dass unter keiner der Bedingungen GFP in den T-Zellen exprimiert wurde (Abbildung A5). Demnach war die Transduktion auch nach Vorstimulation der T-Lymphozyten nicht erfolgreich. Parallel zu den T-Zellen wurden, um die Infektiösität des Virus zu beweisen auch DLD-1-Zellen analysiert, die ebenso 24 Stunden nach Transduktion über 5 Tage in der Gegenwart von Puromycin selektiert wurden. Im Kontrast zu den T-Lymphozyten konnte in 90,3 % dieser Zellen GFP detektiert werden (nicht gezeigt), welches die effiziente Virusproduktion bewies.

Da die Transduktion humaner T-Lymphozyten auch nach Variation der Vorinkubation dieser Immunzellen erfolglos geblieben war, wurde versucht durch das rekombinante Fibronektin-Fragment Retronektion (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) die räumliche Distanz zwischen T-Zellen und Viruspartikeln zu minimalisieren und dadurch die Transduktionseffizienz zu erhöhen. Retronektin ist aus 3 verschiedenen Domänen zusammengesetzt, wobei eine dieser Domänen die Viruspartikel und die beiden weiteren die Zellen bindet. Die Virusproduktion erfolgte nach dem gewohnten Protokoll. Vor der Transduktion wurden die T-Lymphozyten über 3 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend erfolgte die Virustransduktion über 4 Tage auf Retronektin-überzogenen Zellkulturplatten ohne weitere Stimuli. Im Anschluss wurden die T-Zellen über weitere 48 Stunden mit anti-CD3/anti-CD28-

gekoppelten Partikeln aktiviert. Die Validierung der Transduktionseffizienz erfolgte durch die durchflusszytometrische Detektion von GFP. Als Kontrolle wurden ebenso behandelte, aber nicht-transduzierte T-Zellen analysiert.

In diesem Experiment konnte in den Virus-transfizierten T-Lymphozyten eine Transduktionsrate von 12,1 % detektiert werden (Abbildung A6). Dabei handelte es sich zwar um eine relativ geringe Transduktionseffizienz im Vergleich zu DLD-1- oder EA.hy926-Zellen, jedoch war dies bislang mit den humanen T-Lymphozyten die erfolgreichste Transduktion. Im Rahmen dieser Dissertation konnte die Virus-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Expression leider nicht weiter optimiert werden.

Obwohl VSV-G-pseudotypisierte Lentiviren grundsätzlich den Transfer von Fremd-DNA in ruhende Zellen ermöglichen, war dies bislang in humanen B- und T-Lymphozyten nicht erfolgreich (Amirache, 2014). In 2013 identifizierten Finkelshtein *et.al.* den LDL-Rezeptor als die bislang unbekannte Eingangspforte für VSV-G-pseudotypisierte Lentiviren in humane und murine Zellen (Finkelshtein, 2013). Dies erklärte einerseits den breiten Tropismus dieses Virus, da der LDL-Rezeptor annähernd ubiquitär in menschlichen Zellen exprimiert ist. Andererseits konnte so der Grund für den Misserfolg der Transduktion ruhender B- und T-Zellen identifiziert werden, da bereits im folgenden Jahr das Fehlen des LDL-Rezeptors für ruhende B- und T-Zellen publiziert wurde (Amirache, 2014). Hingegen konnten T-Zellen, welche mit den Zytokinen IL-2, IL-7 und IL-17 stimuliert oder durch den anti-CD3 Antikörper OKT-3 allein oder kreuzvernetzt mit anti-CD3/anti-CD28 und IL-2 aktiviert wurden, erfolgreich durch einen VSV-G-pseudotypisierten Lentivirus transduziert werden (Amirache, 2014; Cavalieri, 2003). In Übereinstimmung damit konnte unter diesen Bedingungen auch die Induktion des LDL-Rezeptors beobachtet werden (Amirache, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Integration von Fremd-DNA in das Genom von T-Lymphozyten, auch nach Aktivierung, leider nicht (Abbildung A5). Cornetta und Anderson zeigten die Steigerung der Transduktionseffizienz um das 2,5-fache durch die Erhöhung der Endkonzentration des Polykations Protaminsulfat von 1 µg/ml auf 10 µg/ml (Cornetta, 1989). In den bisherigen Versuchen wurden jeweils 4 µg/ml Protaminsulfat eingesetzt, somit die Steigerung der Konzentration möglicherweise eine Verbesserung der Transduktionseffizienz nach sich ziehen könnte. Des Weiteren konnten ruhende, humane T-Lymphozyten erfolgreich durch einen mit dem Glykoprotein H und F des Masernvirus pseudotypisierten Lentivirus transduziert werden (Frecha, 2010), was demnach eine weitere Möglichkeit zur Vertiefung dieser Methode darstellt.

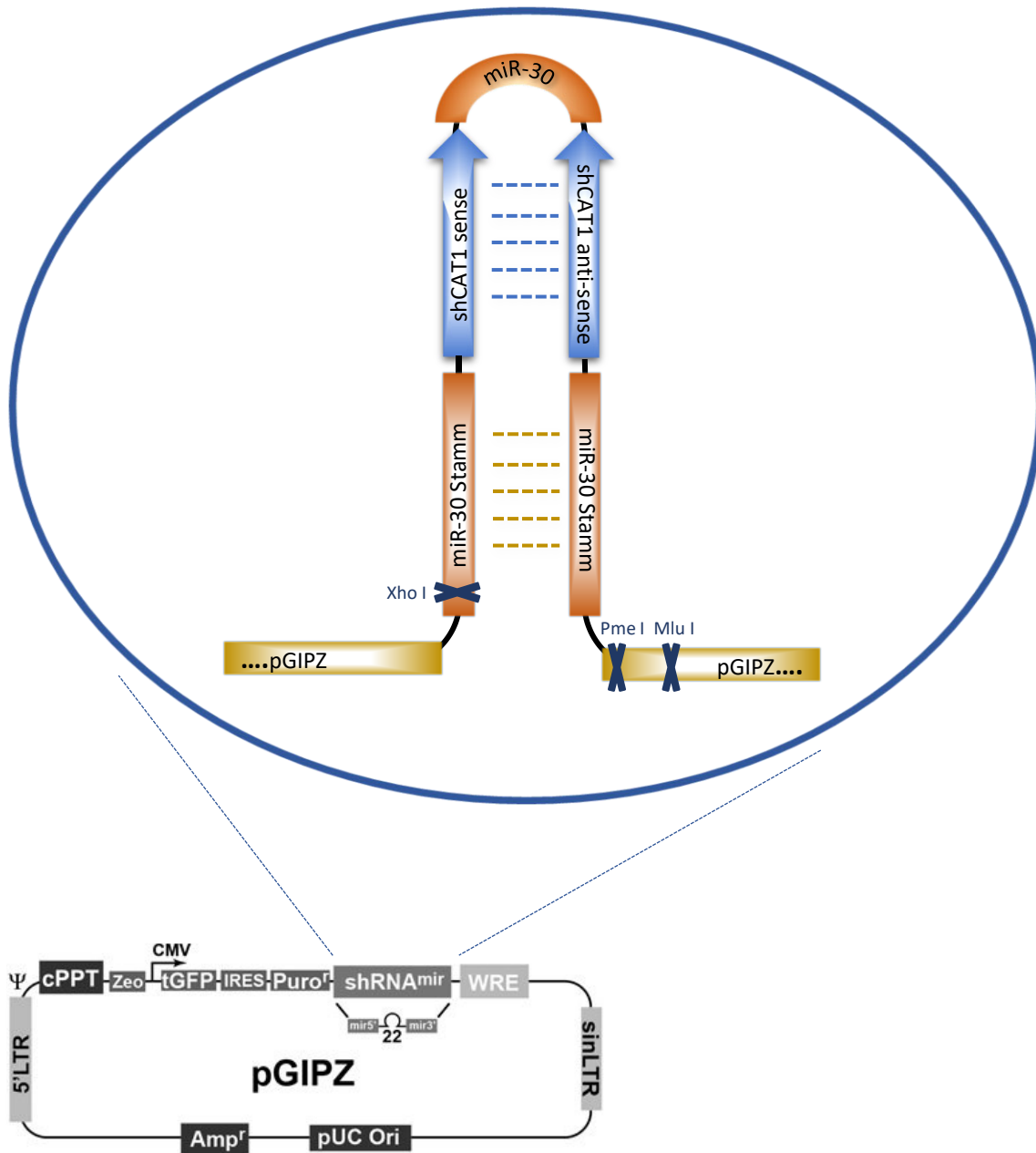


Abbildung A1: Schematische Darstellung des in den pGIPZ-Vektor integrierten hCAT-1-shRNA-Fragments.

Gezeigt sind die Vektorkarte des pGIPZ-Vektors (modifiziert nach http://cgap.nci.nih.gov/RNAi/pGIPZ_Vector_Map, 26.02.2016) sowie die schematische Darstellung des hCAT-1-shRNA-Fragments gegen hCAT-1, bestehend aus dem mikro-RNA-30 Haarnadelschleifenstamm (miR-30 Stamm), der siRNA-Sequenz gegen hCAT-1 in sense- und antisense-Orientierung (shCAT1 sense, shCAT1 anti-sense), welche durch eine mikro-RNA-30-Schleife miteinander verbunden sind (miR-30) sowie Fragmenten des ursprünglichen pGIPZ-Vektors (pGIPZ). Des Weiteren sind auch die Positionen der Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme XhoI, PmeI und MluI schematisch aufgeführt.

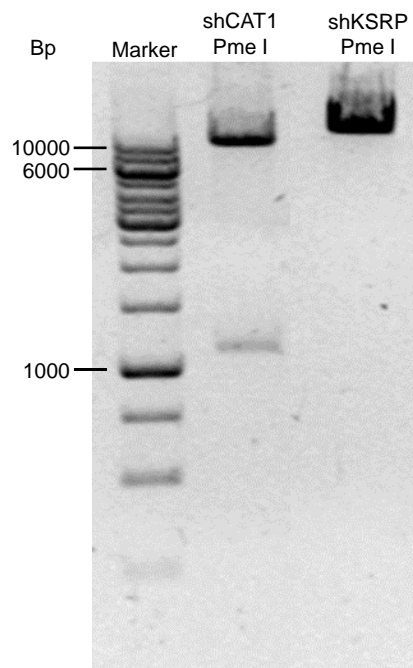


Abbildung A2: Die shRNA gegen hCAT-1 wurde erfolgreich in den pGIPZ-Plasmid integriert.

Um die erfolgreiche Integration des hCAT-1-shRNA-Fragments in den pGIPZ-Plasmid zu überprüfen, wurde dieser (shCAT1) und der pGIPZ_shKSRP (shKSRP) durch Pme I restringiert und durch ein 1%iges Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Es wurden für den pGIPZ_shCAT-1 zwei Fragmente mit dem Umfang von 1143 und 10633 Basenpaaren (Bp) und für den pGIPZ_shKSRP eine Bande mit der Größe von 11776 Bp erwartet. Die Größenkontrolle erfolgte durch den GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Marker, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

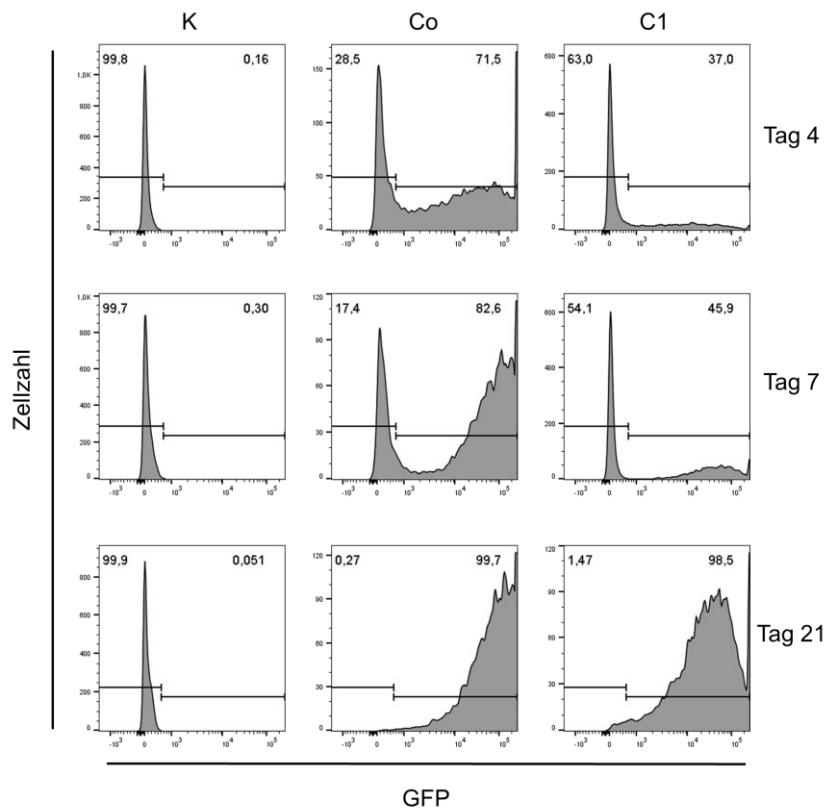
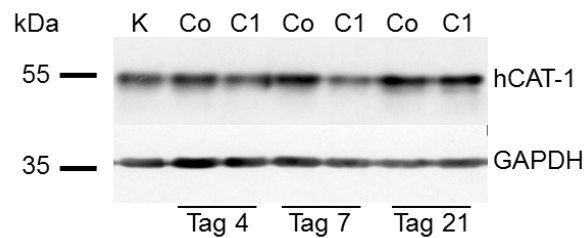
A**B**

Abbildung A3: Die Transduktion von DLD-1-Zellen mit dem pGIPZ_shCAT-1-Virus führt nicht zu der Reduktion der hCAT-1-Expression.

Zu 80 % konfluente DLD-1-Zellen wurden mit pGIPZ_Co (Co)- oder pGIPZ_shCAT-1 (C1)-Virus transduziert. Ab 24 Stunden nach Transduktion wurden transduzierte Zellen durch 5 µg/ml Puromycin selektiert. 4, 7 und 21 Tage nach Transduktion erfolgte A) die durchflusszytometrische Detektion GFP-positiver Zellen (Angaben in %) und B) die Analyse der hCAT-1- und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Expression mittels Western Blot. Zum Vergleich wurden ebenfalls untransduzierte Zellen analysiert (K, n=1). Vor der Analyse wurden die Zelllysate mit N-Glykosidase behandelt.

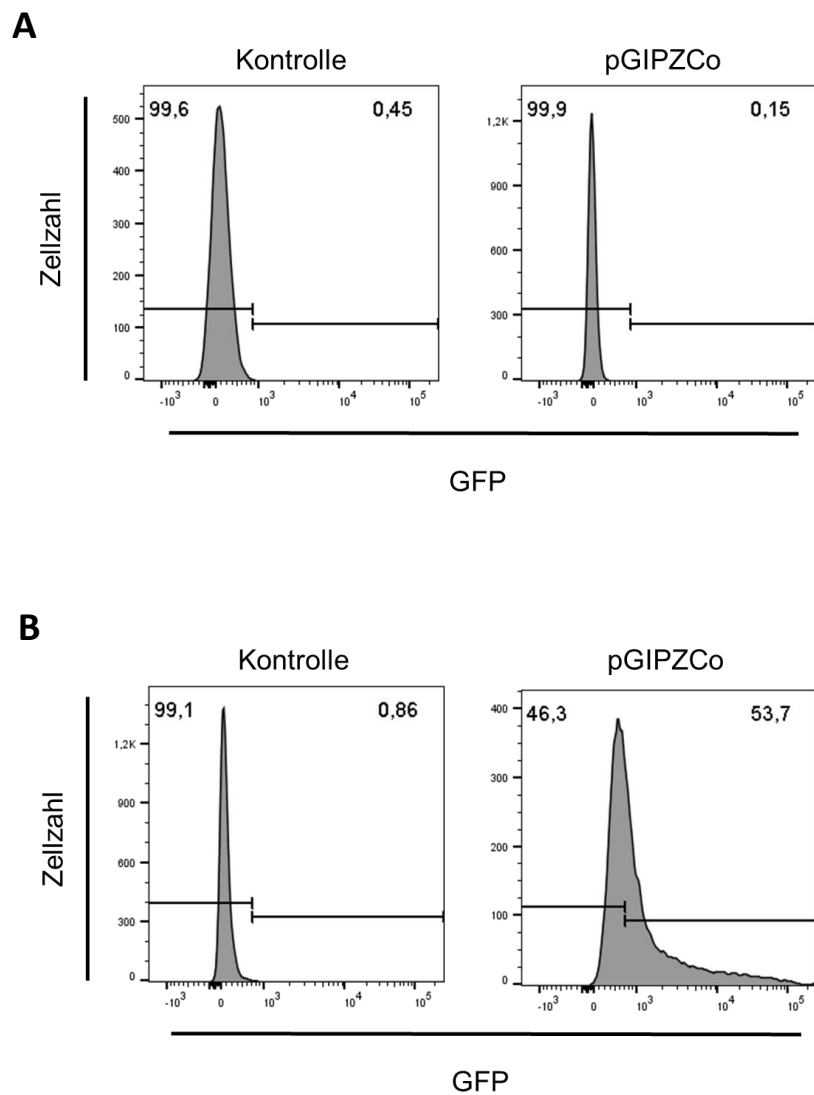


Abbildung A4: Die Transduktion des pGIPZ_Co-Virus gelingt nicht in unstimulierten T-Lymphozyten.

A) T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und mit einem pGIPZ_Co Virus transduziert (pGIPZCo). B) Parallel wurden zu 80 % konfluente DLD-1-Zellen mit demselben Virus transduziert. 24 Stunden nach Transduktion wurde durchflusszytometrisch der Prozentsatz GFP-positiver Zellen als Surrogat für die Transduktionseffizienz ermittelt (Angaben in %). Zum Vergleich erfolgte die Analyse auch jeweils mit untransduzierten Zellen (Kontrolle, n=1).

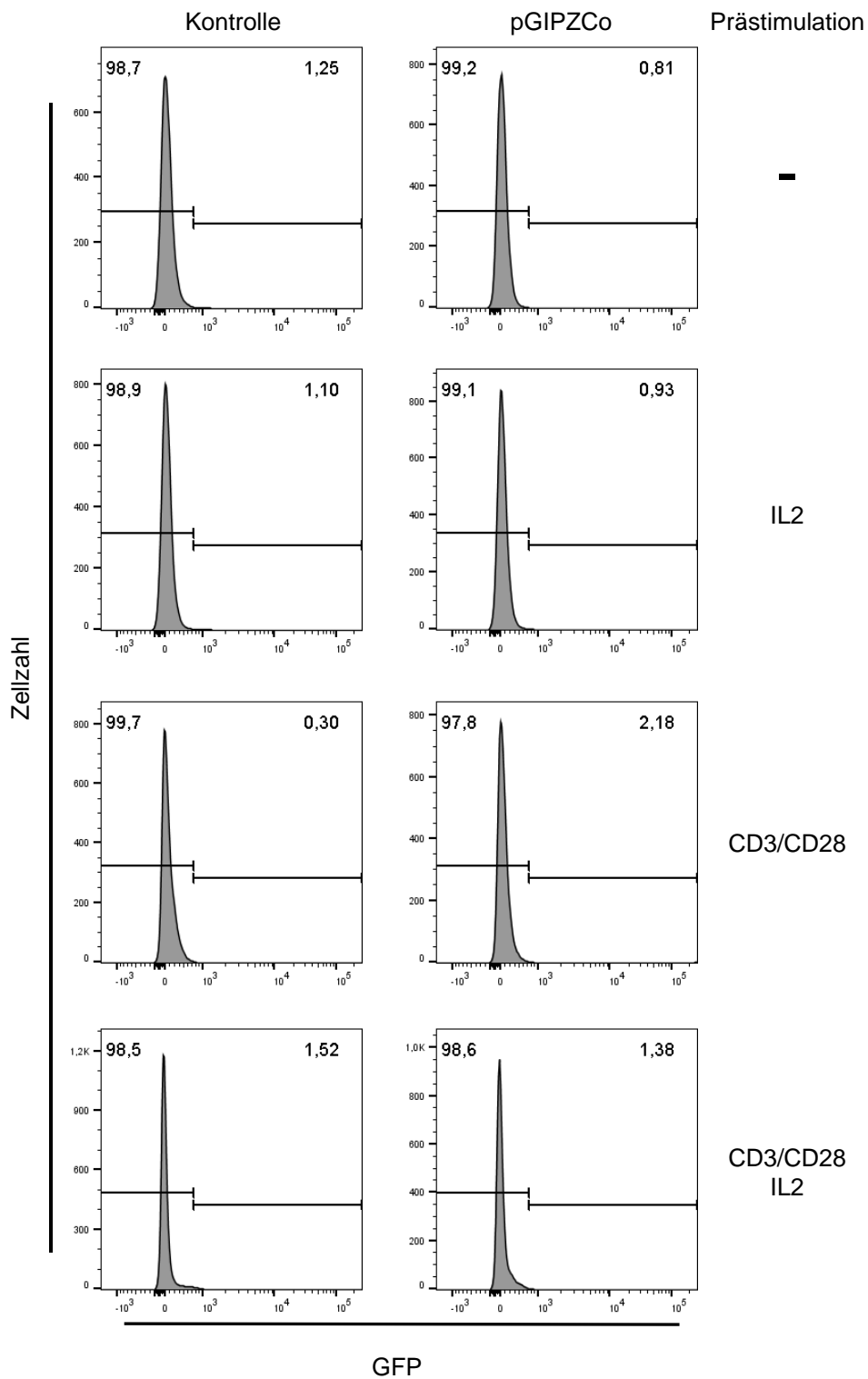


Abbildung A5: Die Transduktion des pGIPZ_Co-Virus gelingt ebenfalls nicht in vorstimulierten T-Lymphozyten.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert. Anschließend wurden unstimulierte T-Zellen (-), 3 Tage mit 600 U/ml IL-2 (IL-2), anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln (CD3/CD28) oder mit 600 U/ml IL-2 und anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimulierten Zellen mit einem pGIPZ_Co-Virus transduziert. 24 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen für 5 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch der Prozentsatz GFP-positiver Zellen als Surrogat für die Transduktionseffizienz ermittelt (Angaben in %, n=1).

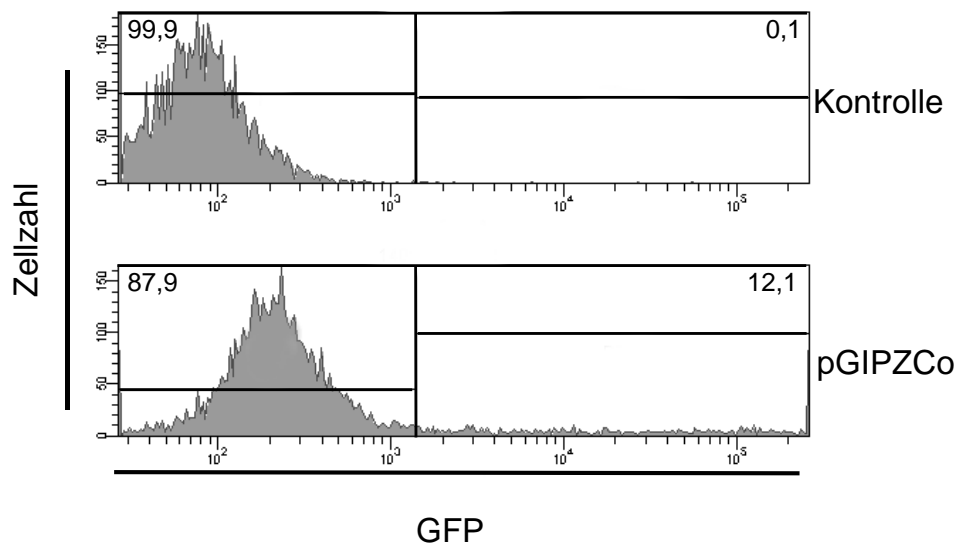


Abbildung A6: Durch Retroectin war die Transduktion des pGIPZ_Co-Virus in vorstimulierte T-Lymphozyten teilweise erfolgreich.

T-Zellen wurden durch Negativselektion aus Blut gesunder Spender isoliert und 3 Tage mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit einem pGIPZ_Co-Virus auf Retroectin-beschichteten Platten über 4 Tage transduziert (pGIPZCo) und im Anschluss für zwei weitere Tage mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Partikeln stimuliert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Detektion GFP-positiver Zellen als Surrogat für die Transduktionseffizienz (Angaben in %). Zum Vergleich wurden untransduzierte Zellen analysiert (Kontrolle, n=1).

Teilveröffentlichungen dieser Arbeit

Publikationen in Fachzeitschriften

Anke Werner, Eva Amann, Vanessa Schnitzius, Alice Habermeier, Claudia Luckner-Minden, Nadine Leuchtner, Johanna Rupp, Ellen I. Closs, Markus Munder (2016): **Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation.** European Journal of Immunology, 46 (1), 92-103.

Anke Werner, Miriam Koschke, Nadine Leuchtner, Claudia Luckner-Minden, Alice Habermeier, Johanna Rupp, Christin Heinrich, Roland Conradi, Ellen I. Closs, Markus Munder (2017): **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, 8, 864.

Anke Werner, Daniel Pieh, Hakim Echchannaoui, Johanna Rupp, Krishnaraj Rajalingam, Matthias Theobald, Ellen I. Closs, Markus Munder (2019): **Cationic amino acid transporter-1-mediated arginine uptake is essential for CLL cell proliferation and viability.** Frontiers in Oncology, 9, 1268.

Vorträge

Anke Werner, Vanessa Schnitzius, Alice Habermeier, Jean-Paul Boissel, Markus Munder, Ellen Closs: **The human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1) is essential for the function of human T lymphocytes**, 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Mainz, 13.-15. März 2014.

Anke Werner, Vanessa Schnitzius, Alice Habermeier, Jean-Paul Boissel, Ellen I. Closs: **The human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1) is crucial for efficient T-cell function**, 12. Jahrestagung der Association of Cancer Immunotherapy, Mainz, 6.-8. Mai 2014

Anke Werner, Miriam Knab, Alice Habermeier, Nadine Leuchtner, Johanna Rupp, Roland Conradi, Markus Munder, Ellen Closs: **Differential usage of citrulline by T cells and tumor cells as a salvage pathway under arginine starvation: Identification of transporters responsible for citrulline transport**, 14th International congress on amino acids, Wien. 3.-7. August 2015.

Anke Werner, Nadine Leuchtner, Alice Habermeier, Johanna Rupp, Krishnaraj Rajalingam, Markus Munder, Ellen I. Closs: **Arginine transporters in human CLL cells: A novel therapeutic target?**, 2nd German Pharm-Tox Summit, Heidelberg, 6.-9. März 2017.

Anke Werner, Alice Habermeier, Johanna Rupp, Ellen I. Closs, Markus Munder: **The human cationic amino acid transporter-1 (hCAT-1): A new potential target for CLL therapy**, Greifswalder Transportage 2018, Greifswald, 7.-9. September 2018.

Anke Werner, Alice Habermeier, Johanna Rupp, Hakim Echchannaoui, Matthias Theobald, Ellen Closs, Markus Munder: **Der humane kationische Aminosäure Transporter-1 (hCAT-1): Eine neue potenzielle Zielstruktur für die CLL-Therapie**, Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Wien, 28. September - 2. Oktober 2018.

Poster

Anke Werner, Alice Habermeier, Claudia Luckner-Minden, Markus Munder, Ellen Closs: **Analysis of the functional role of hCAT-1 in human T cells**, 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Halle (Saale), 5.-7. März 2013.

Anke Werner, Vanessa Schnitzius, Alice Habermeier, Jean-Paul Boissel, Claudia Luckner-Minden, Markus Munder, Ellen Closs: **Analysis of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 in human T lymphocytes**, Kongress der International Union of physiological Sciences (IUPS), Birmingham, UK, 21-26. Juli 2013.

Anke Werner, Alice Habermeier, Vanessa Schnitzius, Markus Munder, Ellen Closs: **The human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1) is essential for activation-induced arginine uptake and function of human T lymphocytes**", 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Mainz, 11.-14. September 2013.

Anke Werner, Vanessa Schnitzius, Alice Habermeier, Jean-Paul Boissel, Markus Munder, Ellen Closs: **The efficient function of human T lymphocytes is dependent on the human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1)**, 9. Transporter Kolloquium, Rauschholzhausen, 8.-9. Mai 2014.