

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

Canavanin-induzierte Zytotoxizität in Myelomzellen: Untersuchungen zu
Wirkmechanismen unter Arginindepletion

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

Vorgelegt von

Lilli Sophie Sester
aus Mannheim-Neckarau

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1. Multiples Myelom	3
2.1.1. B-Zellen und Plasmazellen	3
2.1.2. Definition	3
2.1.3. Epidemiologie	4
2.1.4. Pathophysiologie	4
2.1.5. Diagnostik	4
2.1.6. Derzeitige Behandlungsstrategien.....	5
2.2. Kanzerogenese	6
2.3. Apoptose	7
2.4. Die Aminosäure Arginin	7
2.5. Die Aminosäure Canavanin	9
2.6. Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	10
2.6.1. UPS im Multiplen Myelom.....	10
2.7. Autophagie	11
2.7.1. Autophagiemonitoring	13
2.7.2. Autophagie im Multiplen Myelom.....	14
2.7.3. Autophagieinhibitoren.....	14
2.7.4. Aggresomen	15
2.8. Endoplasmatisches Retikulum (ER)	15
2.8.1. ER-Stress.....	16
2.8.2. ER-Stress im Multiplen Myelom	17
2.8.3. ER-Stress-Induktor Tunicamycin.....	18
2.9. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	18
2.9.1. ROS im Multiplen Myelom	18
3. Material	20
3.1. Allgemeine Substanzen	20
3.2. Allgemeine Materialien	21
3.3. Kits	22
3.4. Medien und Zusätze	22

3.5. Geräte.....	23
3.6. Zelllinien	24
3.7. Lösungen und Puffer	24
3.8. Antikörper für Western Blot	25
4. Methoden	27
4.1. Methoden der Zellkultur	27
4.1.1. Kultivierung der Zellen	27
4.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	27
4.1.3. Zellzahlbestimmung	27
4.1.4. Ansetzen der Versuchsbedingungen	28
4.2. Methoden der Proteinanalytik.....	29
4.2.1. Probenvorbereitung	29
4.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	29
4.2.3. SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>).....	30
4.2.4. Western Blot.....	31
4.3. Durchflusszytometrie.....	32
4.3.1. Funktionsweise der Durchflusszytometrie	32
4.3.2. FACS-Messung von Propidiumiodid	32
4.3.3. FACS-Messung von CM-H ₂ DCFDA.....	33
4.4. Statistik und verwendete Programme.....	33
5. Ergebnisse.....	34
5.1. Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität.....	34
5.2. Apoptoseinduktion durch Canavaninsupplementation	38
5.3. Autophagie als potenzieller Zytotoxizitäts- oder Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation	41
5.3.1. Monitoring der Autophagie.....	41
5.3.2. Inhibierung der <i>late-stage</i> -Autophagie	47
5.3.3. Inhibierung der Autophagieinduktion	53
5.3.4. Synergismustest mit Ricolinostat.....	58
5.4. ER-Stress als potenzieller Zytotoxizitäts- oder Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation	59
5.4.1. Induktion der UPR	59
5.4.2. ER-Stress-Induktion mit Tunicamycin.....	61
5.5. ROS-Entstehung als potenzieller Zytotoxizitäts-/ Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation	70
5.5.1. Synergismustest mit N-Acetylcystein	72
6. Diskussion	74
6.1. Canavaninsupplementation führt unter Argininepletion zu raschem Zelltod.....	74
6.2. Einleitung der Apoptose	75
6.3. Inhibierung der Autophagie	76
6.4. Gleichzeitige Autophagieinhibierung und Apoptoseinduktion	78

6.5. Keine Erhöhung der Zytotoxizität durch <i>late-stage</i> -Autophagieinhibitoren	79
6.6. Wirksynergismus mit Wortmannin	80
6.7. Keine Erhöhung der Zytotoxizität durch Ricolinostat.....	81
6.8. ATF4-Induktion	82
6.9. Wirkantagonismus mit Tunicamycin.....	84
6.10. Kein Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies	87
7. Zusammenfassung.....	89
8. Literaturverzeichnis.....	91
Danksagung.....	IX
Aktueller Lebenslauf.....	X

Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
ADI	Arginindeiminase
ADI-PEG20	Pegylierte Arginindeiminase
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASL	Argininosuccinat-Lysase
ASS	Argininosuccinat-Synthase
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATG	<i>autophagy-related genes</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bafi	Bafilomycin A1
BAG3	<i>BCL-2-associated athanogene 3</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Can	Canavanin
Chloro	Chloroquin
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
dH2O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPBST	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit 0,1% Tween-20</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Reagenz</i>

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
H ⁺	Wasserstoffion
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HDAC	Histondeacetylase
HSP	Hitzeschockprotein
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
kDa	Kilodalton
LC3-I/II	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
Mio.	Millionen
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
ml	Milliliter
NAC	N-Acetylcystein
NaF	Natriumfluorid
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
p-eIF2 α	Phosphorylierter eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 Untereinheit 1
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PERK	<i>PKR-like ER Kinase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3	Phosphoinositid-3
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	<i>sideward scatter</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween-20
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TOR	<i>target of rapamycin</i>
Tunica	Tunicamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
Wn	Wortmannin
XBP1	<i>X-Box Binding Protein 1</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1) CRAB-Kriterien	5
Tabelle 2) Verwendete allgemeine Substanzen.....	21
Tabelle 3) Verwendete allgemeine Materialien.....	21
Tabelle 4) Verwendete Kits.....	22
Tabelle 5) Verwendete Medien und Zusätze.....	23
Tabelle 6) Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 7) Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 8) Verwendete Lösungen und Puffer.....	25
Tabelle 9) Verwendete Primärantikörper	25
Tabelle 10) Verwendete Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 11) Zusammensetzung Argininmangelmedium.....	28
Tabelle 12) Konzentrationen der Zusätze.....	29
Tabelle 13) Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel	30
Tabelle 14) P-Werte und dazugehörige Symbole.....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1) Übersicht über die 3 Autophagieformen in Eukaryoten	12
Abbildung 2) Übersicht über die Makroautophagie	13
Abbildung 3) Übersicht über UPR und ERAD	17
Abbildung 4) Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität der NCI-A2: 24 h Inkubation.....	35
Abbildung 5) Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität der NCI-A2: 8 h Inkubation.....	37
Abbildung 6) Caspase 3- und cleaved Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2.....	40
Abbildung 7) LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2 Zellen.....	42
Abbildung 8) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2.....	44
Abbildung 9) p62-Expression in den NCI-A2 Zellen	46
Abbildung 10) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2	48
Abbildung 11) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: Caspase 3- und cleaved Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2.....	50
Abbildung 12) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Bafilomycin A1: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2.....	52
Abbildung 13) Zusätzliche Hemmung der frühen Autophagie durch Wortmannin: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2.....	54
Abbildung 14) Hemmung der frühen Autophagie durch Wortmannin: Caspase 3- und cleaved Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2 Zellen.....	55
Abbildung 15) Einfluss einer PI3K-Inhibierung mittels Wortmannin auf die LC3-I/II-Expression in den NCI-A2 Zellen	57
Abbildung 16) Zusätzliche Hemmung der Aggresomenbildung: Auswirkung von Ricolinostat auf die Zellviabilität der NCI-A2 Zellen	59
Abbildung 17) ATF4-Expression in den NCI-A2 Zellen.....	60
Abbildung 18) Zusätzliche UPR-Induktion mit Tunicamycin: ATF4-Nachweis in den NCI-A2 Zellen.....	62
Abbildung 19) Zusätzliche UPR- Induktion: Auswirkung von Tunicamycin auf die Zellviabilität in den NCI-A2 Zellen	63
Abbildung 20) Induktion der UPR durch Tunicamycin: Reduktion der Caspase 3-Spaltung in den NCI-A2 Zellen	65
Abbildung 21) Zusätzliche UPR- Induktion mit Tunicamycin: LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2	67
Abbildung 22) Zusätzliche UPR-Induktion mit Tunicamycin: BAG3-Nachweis in den NCI-A2 Zellen.....	69

Abbildung 23) ROS-Messung in den NCI-A2 Zellen.....	71
Abbildung 24) Zusätzliche Gabe eines Antioxidans: Auswirkung von N-Acetylcystein auf die Zellviabilität der NCI-A2	73
Abbildung 25) Canavaninsupplementation unter Arginindepletion: Potenzielle Zytotoxizitätsmechanismen	86

1. Einleitung

Nichtübertragbare Krankheiten sind im globalen Kontext gegenwärtig die häufigsten Todesursachen. Dabei zählen Tumorerkrankungen zu den führenden Ursachen für eine verkürzte Lebenserwartung im 21. Jahrhundert (1). Trotz intensiver Forschung und einem sich verbessernden Verständnis in den letzten Jahrzehnten, steigt die Inzidenz für die meisten Krebsarten weltweit an (2). Chemotherapie, Radiotherapie und chirurgische Interventionen sind die am meisten eingesetzten Behandlungsmethoden. Diese wurden im letzten Jahrhundert eingeführt und bilden auch heute noch die Hauptpfeiler der Therapie vieler Krebserkrankungen. In den letzten Jahrzehnten hat sich die Immuntherapie als neue Behandlungsmethode in vielen Tumorentitäten etabliert. Sie versucht mithilfe von Bestandteilen des Immunsystems die Tumorzellen spezifischer anzugreifen. Weitere, sich derzeit schnell entwickelnde, vielversprechende Therapieansätze sind unter anderem die Nanotechnologie und die Gentherapie (3). Trotz der therapeutischen Fortschritte sind die meisten Krebserkrankungen weiterhin nicht heilbar (4), was auch für das Multiple Myelom gilt. Das Multiple Myelom ist eine bösartige hämatologische Erkrankung, bei der es zu einer Entartung der Plasmazellen im blutbildenden Knochenmark kommt. Sie macht etwa 1% aller Krebserkrankungen und 13% aller hämatologischen Neoplasien aus. Durch die Proliferation der entarteten Plasmazellen und deren Interaktion mit den tumorumgebenden Zellen kann es zu einer ausgeprägten Knochenbrüchigkeit, einer Anämie und einer Hyperkalzämie kommen (5). Weiterhin treten durch die von den Tumorzellen sezernierten Antikörper bzw. Immunglobulin-Leichtketten häufig sekundäre Organschädigungen auf. Besonders häufig ist hierbei die Niere betroffen. Dies kann zum klinischen Bild der Niereninsuffizienz führen (6). Durch erhebliche Fortschritte in der Myelomtherapie im Verlauf der vergangenen 20 Jahre konnte die Überlebensdauer der Patienten im Mittel von 3 auf 6 Jahre gesteigert werden. Dies ist unter anderem auf die neu eingeführte Therapie mit Proteasomeninhibitoren und Immunmodulatoren sowie zuletzt auch therapeutischen Antikörpern zurückzuführen (7). Dennoch ist die Erkrankung weiterhin nicht heilbar, weshalb dringend neue Therapieansätze benötigt werden. Insbesondere sollten Therapiemethoden erforscht werden, welche die Tumorzellen effektiv töten, die gesunden Zellen hingegen unversehrt lassen.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich insbesondere mit dem Aminosäurestoffwechsel in Immun- sowie in Tumorzellen. Insbesondere wurde der Fokus in den letzten Jahren auf die

proteinogenen Aminosäure Arginin und die nicht-proteinogene Aminosäure Canavanin gelegt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Arginindepletion in Myelomzellen zu einer Apoptoseinduktion führt (Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Aus präklinischen und klinischen Studien zum hepatozellulären Karzinom ist bekannt, dass eine alleinige Arginindepletion zwar zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt, jedoch tiefe Remissionen meist nicht erreicht werden. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe nach potenziellen Kombinationstherapien gesucht: Der Einsatz des Argininanalogon Canavanin zeigte sich unter Arginindepletion in der Behandlung des Multiplen Myeloms im Mausmodell hocheffektiv. Hierbei konnte die bereits erzielte antitumorale Zytotoxizität durch die Arginindeprivation durch die Zugabe von Canavanin drastisch gesteigert werden (8). Aufgrund der Immunglobulinsynthese sind Myelomzellen bereits unter normalen Bedingungen einer erhöhten Rate an fehlgefalteten Proteinen ausgesetzt. Eine Steigerung des Proteinstress kann eine Erhöhung des Zelltods in Myelomzellen bewirken. Biochemische Regulationsprozesse, wie die ungefaltete Proteinantwort (*unfolded protein response*, UPR) und die Autophagie, spielen bei der Anpassung der Zelle an den Proteinstress eine entscheidende Rolle (9,10). Die Therapie mit Canavanin unter Arginindepletion kann über eine Erhöhung des Proteinstress wirken: Zellen inkorporieren bei Argininmangel Canavanin an Stelle von Arginin in neu translatierte Polypeptidketten, da die humane Arginyl-tRNA Synthetase nicht zwischen Arginin und seinem Struktur analogon Canavanin unterscheiden kann (11). Im Rahmen dieser Arbeit sollten mögliche biochemische Mechanismen des induzierten Zelltods in der Kombinationstherapie aus Argininmangel und Canavaninsupplementation in Myelomzellen untersucht werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen zu potenziellen Überlebensmechanismen erfolgen. Ein besseres Verständnis der involvierten zellbiologischen Prozesse sollte weitere Anhaltspunkte zur Modulation sowie einer möglichen Kombinationstherapie ergeben.

2. Literaturdiskussion

2.1. Multiples Myelom

2.1.1. B-Zellen und Plasmazellen

B-Zellen entwickeln sich, wie alle Blutzellen, aus Vorläuferzellen. Die Entwicklung der B-Zellen aus den hämatopoetischen Stammzellen findet im Knochenmark statt. In den frühen Phasen der Entwicklung der B-Zelle kommt es zur Präsentation eines Antikörpers auf der Oberfläche der Zelle, der für die Erkennung von Antigenen zuständig ist (12). Von den noch unreifen B-Zellen verlassen einige das Knochenmark, gelangen so in die periphere Zirkulation und können über die peripheren Arteriolen in die Milz eintreten (13). Diese sogenannte Übergangs-B-Zelle kann sich, abhängig von ihrer B-Zell-Rezeptorspezifität, in zwei verschiedene Entitäten, die Marginalzonen B-Zelle oder die folliculäre B-Zelle, umwandeln. Die Marginalzonen B-Zellen wandeln sich bei Antigenkontakt in kurzlebige Plasmazellen um, wohingegen sich die folliculären B-Zellen vor allem in Gedächtnis B-Zellen sowie in langlebige Plasmazellen umwandeln (12). Die Transformation der folliculären B-Zellen in Plasmazellen und Gedächtniszellen geschieht mit Hilfe der T-Helferzellen in Keimzentren, einem temporären Ort proliferierender B-Zellen (14). In den Keimzentren selektierte B-Lymphozyten mit einer hohen Antigenaffinität differenzieren zu langlebigen Plasmazellen (15). Plasmazellen sind Zellen, welche Antikörper produzieren und keine weiteren Zellzyklen durchlaufen. Ihre Organellen sind der Sekretion der Antikörper angepasst: Sie enthalten einen gut ausgebildeten sekretorischen Apparat und große Endoplasmatische Retikula. Kurzlebige Plasmazellen dienen vor allem der akuten Infektabwehr, wohingegen langlebige Plasmazellen insbesondere für das protektive humorale Gedächtnis zuständig sind (16). Einige der Plasmazellvorläufer wandern ins Knochenmark, wo sie sich im Stroma eine Nische suchen und hier zu immobilen langlebigen Plasmazellen differenzieren. Hier können sie für Jahre überleben und auch in Abwesenheit des Antigens weiterhin Antikörper in die Blutbahn abgeben. Sie produzieren einen großen Anteil, der sich im Blut befindenden Antikörper und schützen so den Körper vor einer Reinfektion mit Bakterien und Viren (15).

2.1.2. Definition

Das Multiple Myelom ist eine Tumorerkrankung, bei der es zur malignen Entartung von Plasmazellen kommt. Es findet eine klonale Vermehrung dieser entarteten Zellen im Knochenmark statt. Die Mikroumgebung im Knochenmark trägt entscheidend zur Pathogenese

dieser Erkrankung bei (17). Die Folge ist eine meist erhöhte Sekretion monoklonaler Immunglobuline oder der Leichtketten des Immunglobulins (7). Die aktuelle WHO-Klassifikation zählt das Multiple Myelom zu den reifzelligen B-Zell-Neoplasien (18). Die am häufigsten bei den Patienten auftretenden Symptome sind Knochenschmerzen, wiederkehrende Infektionen und Müdigkeit (19). Die Diagnose eines behandlungsbedürftigen Multiplen Myeloms wird gestellt, wenn es zu Endorganschäden in Folge der Plasmazellproliferation gekommen ist bzw. wenn die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sich Endorganschäden entwickeln werden (20).

2.1.3. Epidemiologie

Die Inzidenz des Multiplen Myeloms beträgt in der westlichen Welt etwa 5 von 100 000. Die Erkrankung macht 1% aller Krebserkrankungen aus und ist nach Lymphomen, die zweithäufigste hämatologische Neoplasie. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung beträgt 66-70 Jahre. 37% der Patienten sind unter 65 Jahre alt (21).

2.1.4. Pathophysiologie

Eine Vorstufe des Multiplen Myeloms ist die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Diese Vorstufe bezeichnet das Vorhandensein einer limitierten Anzahl von monoklonalen Plasmazellen. Die Patienten haben weder Symptome, noch finden sich Endorganschäden (19). Nahezu jeder Patient mit Multiplem Myelom hat diese asymptomatische Erkrankungsphase durchlaufen. Etwa 1% bis 2% der Menschen mit MGUS erhalten pro Jahr die Diagnose eines Multiplen Myeloms (22). Genetische Veränderungen sind für Plasmazellen des MGUS und des Multiplen Myeloms charakteristisch. Es können chromosomale Veränderungen, wie Translokationen oder Trisomien, in den transformierten Zellen nachgewiesen werden. Die auftretenden Translokationen betreffen häufig Genabschnitte, die für Immunglobuline kodieren. Geht ein MGUS in ein Multiples Myelom über, können oft weitere sekundäre Translokationen und genetische Veränderungen nachgewiesen werden (5). Zusätzlich zu den molekularen Veränderungen, kommt es zu einer veränderten Interaktion mit umgebenden Zellen im Knochenmark. Die Tumorumgebung, in der Bindegewebs- und Immunzellen angesiedelt sind, kann zur Tumorprogression und Resistenzentwicklung des Multiplen Myeloms beitragen (23).

2.1.5. Diagnostik

Die Diagnostik beinhaltet die histologische Untersuchung einer Biopsie des Knochenmarks mit

der Bestätigung des Vorhandenseins eines Plasmazellklons, sowie der Differenzierung zwischen solitärem Plasmozytom oder systemischem Befall des Knochenmarks. Während die auf einen Ort begrenzte Erkrankung als Plasmozytom bezeichnet wird, handelt es sich beim Multiplen Myelom um eine systemische Knochenmarksinfiltration. Der Anteil der Plasmazellen an den Gesamtzellen im Knochenmark beträgt beim Multiplen Myelom über 10% (24). Zu den weiteren Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms gehören der Nachweis von monoklonalem Protein in Urin und/oder Serum, sowie Endorganschäden. Zur Diagnostik der Endorganschäden finden die CRAB-Kriterien Anwendung. Die von der *International Myeloma Working Group* (IMWG) aufgestellten CRAB-Kriterien sind in Tabelle 1 dargestellt. Zu den Kriterien zählen die Komplikationen Hyperkalzämie, Nierenversagen, Anämie und Knochenläsionen (25). Die SLIM-Kriterien erfassen Patienten mit einem hohen Risiko für einen Übergang in ein Multiples Myelom mit Endorganschäden. Mithilfe dieser Kriterien wird eine Therapieeinleitung bereits vor Eintreten von Endorganschäden ermöglicht (26). Ist das Knochenmark zwar befallen, der Anteil der entarteten sekretorischen Tumorzellen beträgt jedoch unter 10%, handelt es sich um eine MGUS. Die weiteren Diagnosekriterien beinhalten eine Konzentration von Leichtketten im Serum unter 30 g/l bzw. im Urin unter 500 mg/d. Des Weiteren dürfen keine Endorganschäden vorhanden sein (25).

Akronym	Bedeutung	Grenzwerte
C	<i>Hypercalcemia</i>	Serumkalzium entweder > 0,25 mmol/l oberhalb der oberen Norm oder > 2,75 mmol/l
R	<i>Renal insufficiency</i>	Kreatininclearance < 40 ml/min oder Serumkreatinin > 2 mg/dl
A	<i>Anemia</i>	Hämoglobin > 2 g/dl unterhalb der Norm oder < 10 g/dl
B	<i>Bone lesions</i>	mindestens 1 Osteolyse in der Computertomographie, der Positronenemissionstomographie-Computertomographie oder der Skelettröntgenuntersuchung

Tabelle 1) CRAB-Kriterien (25)

2.1.6. Derzeitige Behandlungsstrategien

Ogleich sich die Behandlungsansätze in den letzten Jahren stetig weiterentwickelten, gibt es immer noch keine kurative Therapieoption für das Multiple Myelom. Die Therapieform wird individuell und in Abhängigkeit von speziellen Patientenmerkmalen gewählt (27). Die Indikation zur Behandlung ist gestellt, wenn eine Endorganschädigung zu befürchten ist bzw. bereits besteht. Die Entscheidung für ein passendes Therapieschema wird abhängig von der Eignung des Patienten für eine Hochdosismotherapie mit autologer Stammzelltransplantation getroffen. Für Patienten, für die ein derartiges Verfahren wegen Alter

oder Komorbidität nicht möglich ist, stehen mittlerweile verschiedene Kombinationstherapiemöglichkeiten in der Erstlinie zur Verfügung. Diese bestehen z.B. aus dem anti-CD38 Antikörper Daratumumab und entweder Lenalidomid und Dexamethason (DRD) oder dem Proteasomeninhibitor Bortezomib, Mephalan und Prednison (D-VMP). Für Patienten, die im Verlauf eine Melphalan-Hochdosistherapie erhalten können, werden ebenfalls zunächst mit Kombinationstherapien zur Tumorreduktion behandelt, in Europa typischerweise mit Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD). Ab der zweiten Therapielinie stehen zahlreiche weitere neue Therapiekombinationen mit Substanzen aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen zur Verfügung (28). Therapieschemata und Dosierungen werden je nach Komorbiditäten, Alter und Präferenz des Patienten angepasst (7).

2.2. Kanzerogenese

Krebs ist eine komplexe Erkrankung, bei der das Auftreten von Mutationen in der Erbanlage eine entscheidende Rolle spielt. Laut dem vor einigen Jahren von Vogelstein und Kinzler entwickelten *Multi-Hit-Modell* der Karzinogenese, kommt es nicht durch eine solitäre, sondern erst durch die Akkumulation von mehreren Mutationen, zur malignen Transformation der Zelle. Während die überwiegende Mehrzahl der genetischen Erkrankungen des Menschen durch Keimbahnmutationen verursacht werden, handelt es sich bei der Krebserkrankung meist um Mutationen somatischen Ursprungs (29). Viele dieser somatischen Gene sind an der Regulation des Zellwachstums und des Zelltodes beteiligt (30). Durch Mutationen erlangen Krebszellen gewisse Eigenschaften, die charakteristisch für ihre Malignität sind. Dazu zählen insbesondere die Generation intrinsischer mitogener Signale, die Umgehung der Apoptose, die grenzenlose Proliferation, die Fähigkeit zur Angiogenese-Induktion, die Resistenz gegen extrazelluläre, das Wachstum hemmende Signale und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (31). In den letzten Jahren wurden noch zwei weitere gemeinsame Charakteristika der malignen Zellen gefunden: Sie reprogrammieren ihren Energiemetabolismus und sie umgehen einer Destruktion durch das Immunsystem. In Anbetracht der Komplexität der Kanzerogenese, wäre es unzureichend ausschließlich genetische Veränderungen zu untersuchen. Vielmehr stellen Tumore eine Art komplexes Organsystem dar, dessen Entstehung und Ausbreitung nur durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren erklärt werden kann (32).

2.3. Apoptose

Unter dem Begriff Apoptose versteht man die regulierte Form des Zelltodes. Der Prozess des kontrollierten Zelltodes kann für Lebewesen sowohl bei der Kontrolle der Zellzahl, als auch bei der Ausschaltung von Gefahren hilfreich sein (33). Apoptose kann sowohl intrinsisch als auch extrinsisch eingeleitet werden. Der intrinsische Signalweg wird vor allem durch DNA-Schäden, chemotherapeutische Substanzen, Nährstoffmangel im Serum und UV-Radiation aktiviert. Diese Form des programmierten Zelltodes wird auch mitochondrialer Signalweg genannt: Durch Aktivierung proapoptotischer Proteine gelangen Moleküle aus dem Mitochondrium ins Zytosol, was die Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen und somit den kontrollierten Zelltod zur Folge hat (34). Die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs erfolgt hauptsächlich durch eine Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung nachgeschalteter proapoptotischer Signalwege. Passende Liganden werden unter anderem auf speziellen Immunzellen exprimiert (35). Morphologische Veränderungen, welche die Zelle während der Apoptose durchläuft, werden durch spezielle Cysteinproteasen, sogenannte Caspasen, ausgelöst. Eine Reihe von Caspasen werden während der Apoptose durch intrinsische und extrinsische Signale aktiviert, was zu der Aktivierung von speziellen Effektorcaspasen führt. Zu den Effektorcaspasen zählen die Caspasen 3, 6 und 7. Sie sind dafür zuständig, dass die für den Eintritt des Zelltodes wichtigen Abläufe ausgeführt werden (36). Multizelluläre Organismen haben Prozesse entwickelt, um Zellen, von denen eine Gefahr ausgeht, zu eliminieren und den Körper dadurch vor der Tumorentstehung zu schützen. Zu diesen Prozessen zählt auch der kontrollierte Zelltod. Viele Krebszellen akquirieren jedoch während der neoplastischen Transformation eine Resistenz gegen intrinsische als auch gegen extrinsische apoptotische Signale. Dies ermöglicht dem Tumor eine weitere Zellproliferation (37).

2.4. Die Aminosäure Arginin

Die Aminosäure Arginin spielt bei vielen metabolischen Funktionen und Signalwegen eine essenzielle Rolle. Arginin fungiert als Stickstoffquelle für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), welches von Endothelzellen zur Vasodilatation und von Immunzellen als Abwehrmechanismus gegen Mikroben genutzt wird. Arginin ist außerdem ein Baustein von Kreatinin, das von Muskeln als Kraftstoff genutzt wird. Darüber hinaus ist die Aminosäure Teil des Harnstoffzyklus und hilft so, die Stickstoffbalance im Körper zu regulieren. Zusätzlich

stimuliert sie die Proteintranslation und die Polyaminsynthese. Dies sind beides Faktoren, die für anabole und proliferative Prozesse der Zellen wichtig sind (38). Freies Arginin wird im Körper entweder durch die Ernährung, durch Neusynthese oder durch den Abbau von Proteinen bereitgestellt. Da der Körper die Aminosäure selbst synthetisieren kann, die körpereigene Synthese jedoch in einigen Situationen, wie zum Beispiel im Falle einer Infektion, nicht ausreicht, wird die Aminosäure auch als semi-essenziell bezeichnet (39). Die intrazelluläre *De-novo*-Synthese von Arginin kann aus der Aminosäure Citrullin erfolgen. Dieser Prozess ist zweischrittig. Er erfolgt mithilfe der Enzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS) und Argininosuccinat-Lyase (ASL). Zunächst reagiert Citrullin mit Aspartat zu Argininosuccinat. Argininosuccinat wird in einer zweiten enzymatischen Reaktion in Fumarat und Arginin aufgespalten (40). Auch in der Tumorentstehung, Tumorausbreitung und in der Abwehr von Tumorzellen spielt die Aminosäure Arginin eine wichtige Rolle. Die Tumoralabwehr von in Zellmedium kultivierten T-Zellen ist bei einer hohen Konzentration von Arginin effektiver. Eine Arginindeprivation scheint die T-Zellproliferation einzuschränken. Dieser Effekt wird aufgehoben, wenn dem Serum die Aminosäure Citrullin hinzugegeben wird: Durch die *De-novo*-Synthese aus Citrullin kann der intrazelluläre Argininpool wieder aufgefüllt werden (41). Aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate sind Krebszellen besonders auf die Aminosäure Arginin angewiesen. Eine charakteristische Eigenschaft von malignen Erkrankungen ist die Veränderung des Argininmetabolismus: Einige Krebsarten reduzieren die endogene *De-novo*-Argininsynthese, indem sie das Enzym ASS herunterregulieren. Die Tumorzellen werden abhängig von einer extrazellulären Argininzufuhr. Sie werden als argininauxotroph bezeichnet. So erreichen sie die größtmögliche Wachstumsrate bei möglichst niedrigem Energieverbrauch (40). Vor dem Hintergrund, dass diese Tumorzellen auf einen Import von Arginin angewiesen sind und der Entzug von Arginin zur Wachstumsinhibierung und zum Zelltod der Tumorzellen führen kann, scheint es sinnvoll einen selektiven Argininentzug als Ansatz für eine Tumorthherapie zu nutzen (42). In einigen ASS-negativen Tumor-Entitäten konnte gezeigt werden, dass der exogene Argininentzug Zellstress auslöst. Dies hat häufig den kontrollierten Zelltod der Tumorzelle zur Folge (38). Es gibt bereits sowohl im experimentellen als auch im klinischen *Setting* in Entwicklung befindliche Enzyme, mit denen Arginin systemisch depletiert werden kann. Eines der therapeutisch vielversprechendsten Enzyme ist die bakterielle Arginin-Deiminase (ADI), die das Arginin in Ammoniak und Citrullin spaltet. Eine häufig eingesetzte Arginindeiminase stammt aus Mykoplasmen. Deren Wirkdauer im Organismus wird durch Pegylierung deutlich verlängert und die Substanz (ADI-PEG20) befindet sich in einem bereits fortgeschrittenen klinischen Entwicklungsprogramm für argininauxotrophe Tumore. Während die Viabilität physiologischer Zellen durch deren

endogene Arginin-Synthesekapazität nicht signifikant durch ADI-PEG20 eingeschränkt wird, führt die Behandlung von argininauxotrophen Tumorzellen nachweislich zu deren Apoptose (40).

2.5. Die Aminosäure Canavanin

Canavanin wurde erstmals im Jahr 1929 aus der indonesischen Jackbohne, *Canavalia ensiformis*, isoliert. Die Aminosäure ist hauptsächlich in Leguminosen zu finden. Sie dient in diesen Pflanzen als Stickstoffspeicher und der Abwehr vor Insekten und anderen Herbivoren (11). Während beim Menschen nur 20 Aminosäuren in Proteine eingebaut werden, die sogenannten kanonischen proteinogenen Aminosäuren, kommen in der Natur insgesamt mindestens 700 Aminosäuren vor (43). Die pflanzliche Aminosäure Canavanin ist dem Arginin in ihrer Strukturformel sehr ähnlich. Im Gegensatz zu Arginin, das eine Methylenuntereinheit besitzt, ist an dieser Stelle im Canavanin ein Sauerstoffmolekül zu finden. Canavanin ist ein Antimetabolit von Arginin (43). Während der Proteinbiosynthese kann die für Arginin relevante Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht zwischen Arginin und Canavanin unterscheiden. Dies führt dazu, dass Canavanin an der Stelle von Arginin bei *De-novo*-Translation in Proteine eingebaut wird. In der Folge entstehen, aufgrund der im Vergleich zu Arginin anderen physikochemischen Eigenschaften von Canavanin vermehrt fehlgefaltete Proteine. Die Strukturveränderung hat häufig den Funktionsverlust der Proteine zur Folge. Die Zellen werden anfälliger gegenüber Strahlung, Hitze und anderen Stressoren. Des Weiteren kann Canavanin andere wichtige Zellfunktionen wie die DNA-Replikation, die Histon- und Hitzeschockproteinfunktion, die RNA-Synthese sowie die RNA-Translation stören (44). Vor über 50 Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass Canavanin *in vitro* zytotoxisch auf entartete Zellen wirkt und somit eine potenzielle antitumorale Therapiemethode darstellt. In darauffolgenden experimentellen Studien konnte diese Beobachtung bestätigt und erweitert werden. Während Canavanin fast alle entarteten Zellen schädigte, blieben die gesunden Zellen in ihrer Viabilität unbeeinträchtigt. Dies kann vor allem auf eine erhöhte Proteinsyntheserate und auf veränderte Oberflächenproteine in entarteten Zellen zurückgeführt werden. Auch *in vivo* zeigte sich die Therapie mittels Canavanin effektiv. Es konnten sowohl überlebensverlängernde Effekte, als auch eine Verkleinerung von Tumoren gezeigt werden (11). Insbesondere eine Kombination mit arginindepletierenden Verfahren stellt eine vielversprechende Behandlungsoption dar: Durch die zusätzliche Gabe von Canavanin, kann die antitumorale Wirkung der Arginindepletion erhöht werden. Dies kann auf den Fehleinbau von Canavanin an Stelle von Arginin

zurückzuführen sein. Es kommt zu Fehlfaltungen und Fehlfunktionen von Proteinen. Infolgedessen kann die Zellhomöostase nicht aufrecht erhalten werden (45).

2.6. Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Eukaryoten haben zwei Hauptproteindegradierungssysteme. Das lysosomale Degradierungssystem baut mithilfe des Lysosoms sowohl Proteine von extrazellulär als auch von intrazellulär ab. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist hingegen hauptsächlich für den Abbau der intrazellulären kurzlebigen Proteine mithilfe von Proteasomen zuständig (46). Es verhindert die Akkumulation von fehlgefalteten und schädlichen Proteinen und spielt somit eine zentrale Rolle in der Zellhomöostase (47). Mithilfe des Moleküls Ubiquitin werden vor allem gezielt intrazelluläre Proteine für den Abbau markiert. Das Ubiquitinmolekül bindet kovalent an die abzubauenen Proteine. Anschließend werden die markierten Proteine zum Proteasom transportiert und hier unter Energieverbrauch in kurze Aminosäureketten aufgespalten (48). In einem weiteren Schritt werden die Aminosäureketten durch spezialisierte Enzyme, die Amino- und Carboxypeptidasen, in einzelne Aminosäuren gespalten, die dann von der Zelle wiederverwertet werden können. Darüber hinaus spielt das Proteasom auch eine entscheidende Rolle beim Abbau von Signalmolekülen: Es ist ein entscheidender Regulator der Apoptose, des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Antigenpräsentation (47). Des Weiteren übernimmt das Proteasom eine wichtige Funktion bei akutem Aminosäuremangel: Durch die Degradierung älterer Proteine und einer daraus folgenden Erhöhung des intrazellulären Aminosäurepools, kann mithilfe des Proteasoms die Fortführung der Translation gewährleistet werden (49).

2.6.1. UPS im Multiplen Myelom

Das Proteasom ist in nahezu jeden zellulären Prozess eingebunden: Es ist auch in der Karzinogenese involviert (50). Viele Krebszellen sind in besonderem Maße auf das Proteasom angewiesen: Während der Krebsentwicklung, fällt durch genetische Mutationen, aberrantes RNA-Splicing, beschleunigte Proteinbiosynthese und durch ein verändertes Redoxpotential ein besonderes Ausmaß an fehlgefalteten Proteinen an (51). Zusätzlich kann das Proteasom von der Krebszelle genutzt werden um gezielt in Regulationsprozesse einzugreifen. Es können beispielsweise Wachstumsfaktoren vermindert abgebaut werden. Proapoptotische Signalmoleküle können dagegen selektiv degradiert werden (52). So stellt die Inhibierung des

UPS eine vielversprechende Behandlungsstrategie für die medikamentöse Therapie von Tumorerkrankungen dar (47).

Die Zellen des Multiplen Myeloms synthetisieren in einem gesteigerten Umfang Immunglobuline. Dies hat eine erhöhte Entstehungsrate an fehlgefalteten Proteinen zur Folge. Dadurch erklärt sich ihre Abhängigkeit von einem funktionierenden Protein-Degradierungssystem. Die Hemmung des Proteasoms führt zu einer Erhöhung der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen: Es resultiert der Zelltod der Myelomzelle (53). Der erste, in der Klinik eingesetzte Proteasomeninhibitor, war der reversible Proteasomeninhibitor Bortezomib. Dieser Wirkstoff wird heute erfolgreich in der Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms sowie bei Rezidiven eingesetzt (47). Ein Resistenzmechanismus der Myelomzellen unter der Behandlung mit Proteasomeninhibitoren ist die Aktivierung eines alternativen Degradierungssystems, des Autophagosom-Lysosom-Systems (54).

2.7. Autophagie

Alle Lebewesen befinden sich in einem ständigen Wandlungsprozess. Dies trifft auch auf die einzelnen Zellen und deren Bestandteile im menschlichen Körper zu. Diese werden ständig ab- und aufgebaut und zu einem großen Teil werden biochemische Bausteine recycelt. Ältere, dysfunktionale Bestandteile werden durch neue, qualitativ bessere ersetzt. Die für den Abbau bestimmter Substrate, wie fehlgefaltete Proteine oder dysfunktionale Organellen, können für den Aufbau neuer Proteine oder als direkte Energielieferanten der Zellen genutzt werden (55). Extrazelluläre, zu verdauende Materialien, werden durch Endozytose oder Phagozytose dem Lysosom zugeführt, wohingegen das intrazelluläre abzubauen Material hauptsächlich mithilfe der Autophagie degradiert wird. Die Autophagie kann in drei große Untergruppen unterteilt werden: Die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (Abbildung 1). Diese drei Vorgänge unterscheiden sich in ihren Funktionsweisen und Aufgaben (46). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden fehlgefaltete oder gealterte Proteine mithilfe des Hitzeschockproteins 73 (HSP73 = HSPA8) zum Lysosom transportiert (56). Da diese Proteine insbesondere unter Hitzestress hochreguliert werden, wurde ihnen dieser Name zugewiesen (57). Die Mikroautophagie bezeichnet einen Prozess, bei dem lysosomale Vesikel mit elektronendichten zytoplasmatischen Substanzen in das Lysosom aufgenommen werden. Bei der Makroautophagie werden hingegen ganze Organellen oder zytoplasmatische Bestandteile mit Autophagosomen zum Lysosom transportiert. Die gemeinsame Endstrecke aller 3 Formen der Autophagie ist die Degradierung der angelieferten

Substanzen durch Hydrolasen im Lysosom (58).

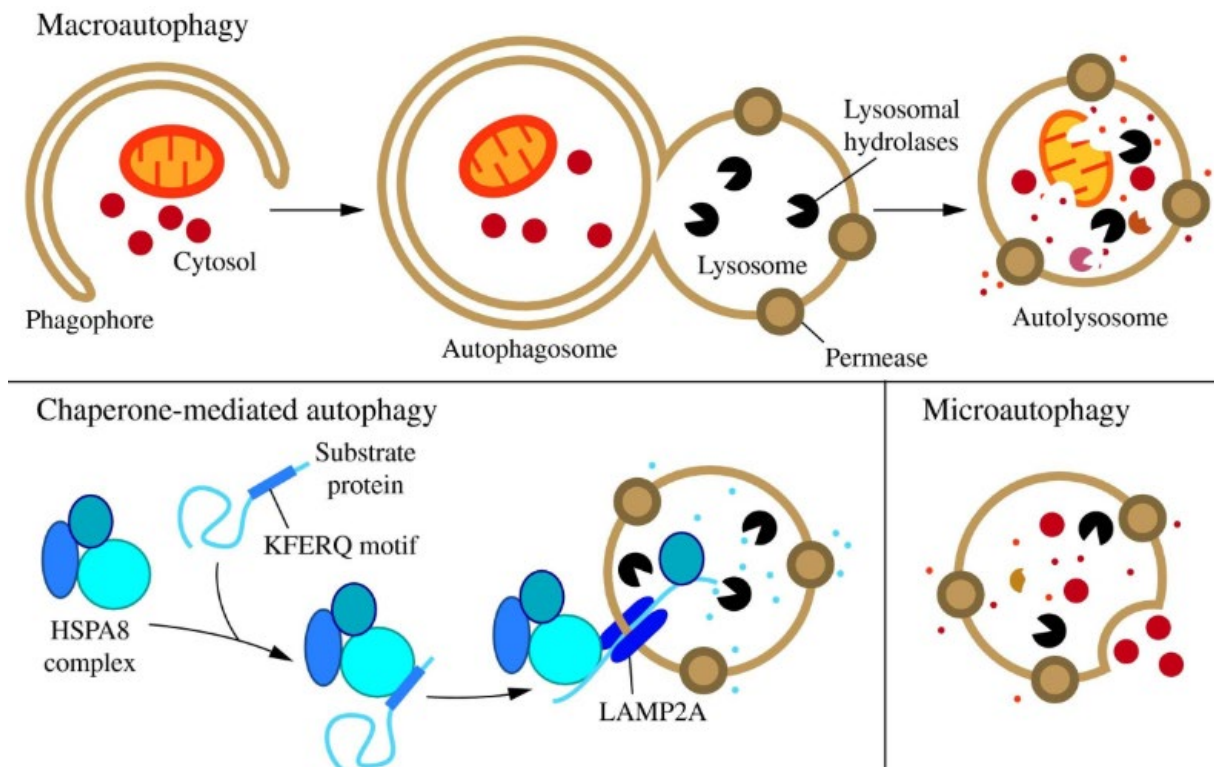


Abbildung 1) Übersicht über die 3 Autophagieformen in Eukaryoten

Hauptsächlich wird die Autophagie in die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie unterteilt. Die gemeinsame Endstrecke ist die lysosomale Degradierung der zu verdauenden Substanzen. In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff Autophagie auf die Makroautophagie. Abbildung aus (59). Details: siehe Text.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Autophagie für den Vorgang der Makroautophagie stehen (Abbildung 2). Die zu degradierenden Substrate werden mittels Ubiquitin markiert, zur autophagischen Vakuole transportiert und hier an das Membranmolekül *Microtubule-associated protein 1-light chain 3* (LC3) gebunden (60). Als Bindeglied zwischen polyubiquitinierten, für den Abbau bestimmten Proteinen und dem LC3, kann das Adaptorprotein p62/SQSTM1 fungieren (61). Bei der selektiven Auswahl der zu degradierenden fehlgefalteten Proteine spielen Hitzeschockproteine der Familie HSP70 eine entscheidende Rolle. Diese spezialisierten Proteine können veränderte Proteine detektieren. Das Ko-Chaperon *BCL-2-associated athanogene 3* (BAG3) ist ein wichtiger Mediator der selektiven Autophagie: Es vermittelt die Interaktion zwischen dem HSP70 und dem Adaptorprotein p62 (57). LC3 kann in der Zelle in zwei verschiedenen Formen vorliegen. LC3-I wird während dem Prozess der Autophagie in LC3-II umgewandelt: Das zytosolische, wasserlösliche LC3-I wird mit Phosphatidylethanolamin versehen, wodurch es an der Autophagosommembran binden kann. Diese membrangebundene Form wird nun als LC3-II bezeichnet (62). Die Membran, die auch Phagophore genannt wird, schließt das zu verdauende

zytoplasmatische Material ein. Es entsteht eine doppelmembranige runde Struktur, die als Autophagosom bezeichnet wird. Das Autophagosom trägt die für den Abbau bestimmten Substrate in sich (58). Das Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zum Autolysosom. Die eingeschlossenen Strukturen werden im Autolysosom mithilfe von sauren Hydrolasen verdaut. Anschließend gelangt der Inhalt erneut ins Zytosol und die Zelle kann die freigesetzten Substrate als Grundbausteine für neue Makromoleküle oder als Energieträger nutzen.

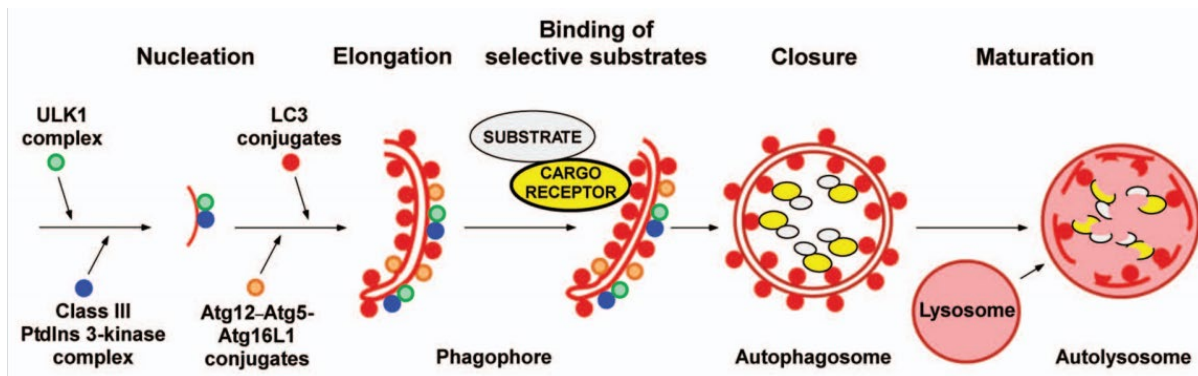


Abbildung 2) Übersicht über die Makroautophagie

Nach Formation eines Initiationskomplexes helfen Proteine der ATG-Familie bei der Nukleation der Phagophore. Mit Hilfe von Adaptorproteinen wie p62 können fehlgefaltete Proteine an das LC3-II gebunden werden. Bei der selektiven Auswahl der fehlgefalteten Proteine kann BAG 3 helfen (nicht in der Abbildung zu sehen). Das Autophagosom umschließt das zu verdauende Zellmaterial. Das Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zum Autophagolysosomen. Der Inhalt wird mithilfe von sauren Hydrolasen verdaut. Abbildung aus (64).

Die Autophagie wird unter suboptimalen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Nährstoffmangel, Energiemangel oder bei oxidativem Stress aktiviert, um eine adäquate Energieversorgung der Zelle zu gewährleisten und durch den Abbau überschüssiger Materialien die zelluläre Homöostase wieder herzustellen (54). Der Prozess der Autophagie wird durch die *target of rapamycin* (TOR) Kinase reguliert. Die Kinase wird unter anderem durch ein verändertes Aminosäureangebot, durch Hormone und über den Energiehaushalt reguliert (63). In vielen Situationen ist die Autophagie ein Anpassungsmechanismus: Mithilfe dieses Prozesses können die Zellen ihre Homöostase wiedererlangen und sich vor dem Zelluntergang schützen. Aktuelle Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass Autophagie auch zum Untergang der Zelle beitragen kann (64). Zellen, die Resistenzen gegen apoptotische Mechanismen erworben haben, können den Zelltod mithilfe der Autophagie einleiten (65).

2.7.1. Autophagiemonitoring

Ein Anstieg der Autophagosomen bedeutet nicht zwingend einen höheren autophagischen Flux. Durch eine Inhibierung der letzten Phase der Autophagie kommt es zu einer Akkumulation von Autophagosomen, ohne dass mehr autophagische Aktivität stattfindet. Ein Anstieg der Autophagieinduktion kann mithilfe eines Endstadium-Autophagieinhibitors festgestellt werden

(66). Inhibiert man die Fusion des Autophagosom mit dem Lysosom akkumulieren bei erhöhter Autophagieinduktion, im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor, mehr Autophagosomen. Das LC3-II steigt durch die erhöhte Akkumulation der Autophagosomen an (67).

2.7.2. Autophagie im Multiplen Myelom

Autophagie kann der Tumorzelle helfen sich an zelleigene, umweltbedingte sowie therapieinduzierte Stressoren anzupassen. Der Prozess kann dazu beitragen, dass metabolische Funktionen der Tumorzelle aufrechterhalten werden können. Es ist daher anzunehmen, dass der Mechanismus der Autophagie relevant für Tumorgenese, Tumorphiliferation, Metastasierung sowie für den Metabolismus des Tumors ist. Insbesondere in der fortgeschrittenen Kanzerogenese stellt die Autophagie häufig einen Resistenzmechanismus dar (54). In frühen Stadien der Tumorentwicklung werden der Autophagie jedoch auch tumorsuppressive Funktionen zugeschrieben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Fehlen des für die Autophagieinitiierung essenziellen Proteins Beclin 1 zu einem vermehrten Tumorwachstum führt (68). Die konkrete Rolle der Autophagie ist noch Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Einige Daten sprechen dafür, dass die Autophagie ein Tumorsuppressionsmechanismus ist, andere Untersuchungen deuten eher daraufhin, dass die Autophagie ein Resistenzmechanismus der Tumorzellen darstellt. Die Funktion der Autophagie scheint in der Tumorgenese und Tumorprogression kontextabhängig (61). In Zusammenarbeit mit dem UPS spielt die Autophagie, als weiteres Degradierungssystem, in Myelomzellen eine entscheidende Rolle. Da die Autophagie in Myelomzellen einen Resistenzmechanismus darstellen kann, bietet sich die Inhibierung der Autophagie als vielversprechende Therapieoption für das Multiple Myelom an (54).

2.7.3. Autophagieinhibitoren

Man kann die Autophagieinhibitoren in zwei große Gruppen einteilen, nämlich in Substanzen, welche die frühe Phase oder die späte Phase der Autophagie hemmen (69). Zu den Inhibitoren der frühen Autophagie zählen Hemmstoffe der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase). Durch die Inhibierung dieser Kinase wird die Bildung der Phagophore gehemmt. Derartige Inhibitoren sind z.B. 3-Methyladenin (3-MA) und Wortmannin (70). Wirkstoffe, welche die Degradierung des Autophagosomeninhaltes durch das Lysosom verhindern, zählen zu den Inhibitoren der späten Autophagie. Um die Degradierung des Inhalts zu gewährleisten, werden Wasserstoffionen in das Lumen des Autophagolysosoms gepumpt. Dies geschieht mittels eines Ionentransporters, einer sogenannten H^+ -ATPase (V-ATPase). Die Wasserstoffionen führen zu

einer Ansäuerung des Milieus. Dies ermöglicht die Aktivierung der lysosomalen Hydrolasen und damit die Degradierung des Autophagolysosomeninhaltes. Bafilomycin A1 wirkt als Hemmstoff der H^+ -ATPase und zählt damit zu den Autophagieinhibitoren der späten Phase (71). Weitere Hemmstoffe der späten Phase der Autophagie sind Chloroquin und Hydroxychloroquin. Es handelt sich um bereits klinisch erprobte Medikamente, die bei Erkrankungen aus dem autoimmunen Formenkreis, wie bei der rheumatoiden Arthritis oder bei Lupus erythematoses sowie bei Malaria erfolgreich eingesetzt werden (69). Chloroquin und Hydroxychloroquin inhibieren die Fusion des Autophagosomen mit dem Lysosom. Der Abbau des Autophagosomeninhaltes wird verhindert. Dies führt zu einer Akkumulation von Autophagosomen (72). In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Autophagieinhibitoren, wie Chloroquin, effektiv in der antitumoralen Therapie eingesetzt werden können (73).

2.7.4. Aggresomen

Wenn die Degradierung fehlgefalteter Proteine nicht direkt stattfinden kann, akkumulieren diese Proteine in der Zelle. Sie bilden für die Zelle potenziell toxische Aggregate. Die aggregierten Proteine werden vorerst zu Aggresomen, einem Zwischenlagerungsort, transportiert. Anschließend werden sie der autophagischen Degradierung zugeführt (74). Mithilfe des Proteins HDAC6 können die für den Abbau bestimmten polyubiquitinierten Proteine zum Aggresom transportiert werden (75). Daneben hat diese Histondeacetylase noch eine Vielzahl an weiteren Funktionen. Sie ist unter anderem beteiligt an DNA-Reparaturen, bei der Zellbewegung und an der Transkription (76). Da die Bildung von Aggresomen im Multiplen Myelom einen möglichen Resistenzmechanismus im Umgang mit dem erhöhten ER-Stress darstellt, ist die Inhibierung der Aggresomenbildung eine vielversprechende Therapieoption (77). Ricolinostat ist ein selektiver HDAC6-Inhibitor. Der Wirkstoff konnte in präklinischen Studien im Multiplen Myelom eine antitumoröse Wirkung durch die Hemmung der Proteindegradierung, sowie durch eine Erhöhung von ER-Stress zeigen (78).

2.8. Endoplasmatisches Retikulum (ER)

Das Endoplasmatische Retikulum übernimmt in der Zelle vielseitige Funktionen: Es ist Ort der Proteinsynthese, der Proteinmodifikationen und des Proteintransfers. Zusätzlich hat das ER die Fähigkeit Lipide und Kohlenhydrate zu synthetisieren und spielt eine zentrale Rolle im

zellulären Kalziumstoffwechsel (10).

2.8.1. ER-Stress

ER-Stress tritt dann auf, wenn die Akkumulation von fehlgefalteten oder ungefalteten Proteinen die Rate des Abbaus, beziehungsweise der Reparaturen, übersteigt (10). Auch Redoxpotentialänderungen, gewisse Medikamente und eine Veränderung des Kalziumshaushaltes können zu ER-Stress führen (79). Der ER-Stress aktiviert Signalprozesse, die dafür zuständig sind, die zelluläre Homöostase wiederherzustellen. Zu diesen Signalprozessen zählen die ungefaltete Proteinantwort (*unfolded protein response*, UPR), die sogenannte Endoplasmatische Retikulum assoziierte Degradation (*endoplasmic reticulum associated degradation*, ERAD) und die Autophagie. Die UPR wird durch die Transmembranproteine *Inositol-Requiring Enzyme 1* (IRE1), *Protein Kinase RNA-like ER Kinase* (PERK) und *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) im ER aktiviert (Abbildung 3). Diese Reaktion auf fehlgefaltete Proteine trägt dazu bei, dass diese Proteine degradiert werden und die Translation herunterreguliert wird. Es handelt sich um einen Anpassungsprozess der Zelle an den ER-Stress. Infolgedessen kann die zelluläre Homöostase wiedererlangt werden (80). Dennoch kann dauerhafter ER-Stress über die Aktivierung des Signalmoleküls *C/EBP homologous protein* (CHOP) zum kontrollierten Tod der Zelle führen (81). Der PERK-Signalweg führt über eine Phosphorylierung des Signalmoleküls *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2-alpha* (eIF2 α) zu einer Aktivierung des *Activating Transcription Factor 4* (ATF4). Dieses Signalmolekül ist für Anpassungsvorgänge in der Zelle mitverantwortlich. ATF4 kann unter anderem eine erhöhte Transkription von Autophagiegenen und damit eine Erhöhung des autophagischen Flux bewirken (79). Die autophagische Degradierung der fehlgefalteten und ungefalteten Proteine trägt zu einer Verringerung von ER-Stress bei. Die ER-Stress-getriggerte Aktivierung des programmierten Zelltodes kann somit verhindert werden. Eine exzessive Aktivierung der Autophagie kann hingegen den Zelltod einleiten (81).

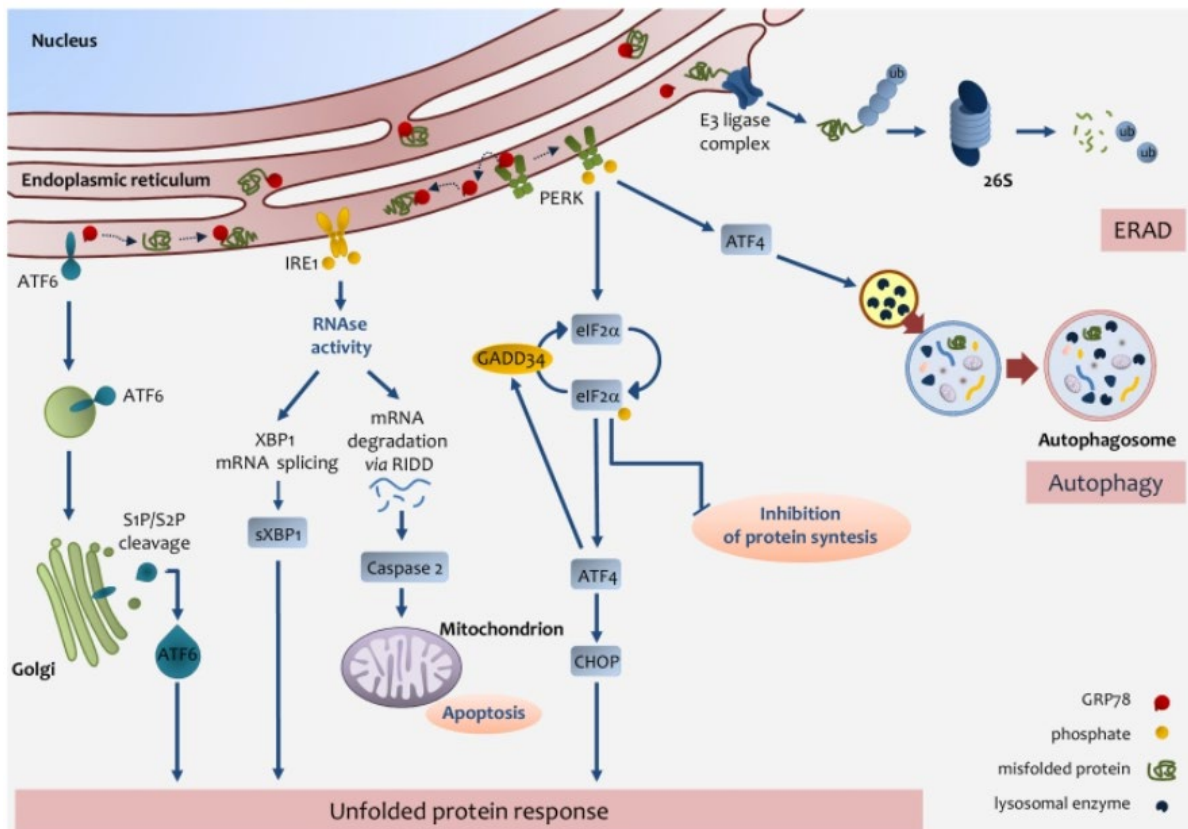


Abbildung 3) Übersicht über UPR und ERAD

Die UPR geht von den 3 Transmembranproteinen IRE1, PERK und ATF6 aus. Sie werden durch Fehlfaltung luminaler Proteine aktiviert. Über ATF4 kann es zu einer Aktivierung der Autophagie kommen. Das Ziel ist die Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase. Eine massive Aktivierung kann jedoch auch die Einleitung des programmierten Zelltodes zur Folge haben. Abbildung aus (82).

2.8.2. ER-Stress im Multiplen Myelom

Tumorzellen sind ständigen Stressoren, wie der Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie, Nährstoffmangel, Proteasomendysfunktionen und somatischen Mutationen ausgesetzt. Dies hat häufig eine erhöhte Rate an fehlgefalteten Proteinen und eine chronisch erhöhte Aktivierung der UPR zur Folge. Es ist anzunehmen, dass dieser Prozess für Krebszellen einen Überlebensmechanismus als Anpassungsprozess darstellt, der es den Zellen ermöglicht zu metastasieren und sich an örtliche Gegebenheiten anzupassen (80). Ein Charakteristikum der Myelomzellen ist erhöhter ER-Stress und eine chronische Aktivierung der UPR. Das Überleben der Myelomzellen ist von der funktionierenden Antwort auf die erhöhte Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen abhängig (10). Die Proteasomeninhibition mittels Bortezomib ist eine wichtige Behandlungsoption im Multiplen Myelom, die unter anderem über eine Erhöhung des ER-Stresses wirkt. Bortezomib verhindert den Abbau von fehlgefalteten Proteinen und erhöht damit den bereits bestehenden ER-Stress auf ein für die individuelle Zelle intolerables Maß. Der programmierte Zelltod ist die Folge (54).

2.8.3. ER-Stress-Induktor Tunicamycin

Tunicamycin ist ein in der Natur vorkommendes Substrat, das N-Glykosylierungen der Proteine im ER verhindert. Es wirkt als starker ER-Stress-Induktor und aktiviert die UPR (83). Durch die Induktion der UPR, insbesondere des PERK/ATF4-Signalwegs, kann Tunicamycin auch die Autophagiemaschinerie in der Zelle aktivieren (84). Tunicamycin wurde in experimentellen Studien genutzt, um die Effektivität von Chemotherapeutika zu steigern. So konnte unter anderem im Magenkarzinom gezeigt werden, dass mithilfe von Tunicamycin bestehende Resistenzen gegenüber der Therapie überwunden werden konnten (85). Im Multiplen Myelom konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Induktion der UPR, insbesondere des IRE1-Signalweges, mittels Tunicamycin eine Differenzierung und Reifung der Tumorzellen erreicht werden konnte. Da die mangelnde Differenzierung mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, stellt die Behandlung mit Tunicamycin einen vielversprechenden Ansatz dar (86).

2.9. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Nutzung von Sauerstoff führt in anaeroben Organismen zur Bildung von Sauerstoff-beinhaltenden reaktiven Molekülen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind kurzlebige Moleküle, die durch ein ungepaartes Elektron in ihrer Hülle charakterisiert sind. Sie entstehen während einer Reihe von zellulären Prozessen durch die partielle Reduktion von Sauerstoff (87). Hauptsächlich entstehen ROS bei Stoffwechselfvorgängen in Mitochondrien und in Peroxisomen (88). Aber auch externe Faktoren, wie zum Beispiel Bestrahlung, Xenobiotika, Nährstoffmangel und Tabakrauch können die Bildung von ROS verursachen (89). Kommt es zu einer Akkumulation von ROS, führt dies zu oxidativem Stress in der Zelle: Ein Zustand bei dem die hochreaktiven Sauerstoffspezies DNA, Proteine und Lipide oxidieren und dadurch schädigen können (90). Durch eine starke ROS-Erhöhung kann es infolge einer veränderten Redoxbalance im ER zu Oxidierungen von Proteinen kommen. Dies kann zur Fehlfaltung der betroffenen Proteine führen und über die Akkumulation der Proteine ER-Stress auslösen. Die Entstehung von ROS kann andersherum auch durch fehlgefaltete Proteine verursacht werden (91).

2.9.1. ROS im Multiplen Myelom

Während ein gewisses Maß an zellulären ROS physiologisch ist, konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen meist höhere ROS-Konzentrationen aufweisen.

Dies ist insbesondere eine Folge des veränderten Metabolismus und der mitochondrialen Dysfunktionen in Tumorzellen. Die erhöhte Entstehungsrate der ROS ist sowohl Folge als auch Motor der Tumorgenese: Durch die freien Radikale werden der DNA oxidative Schäden zugefügt. Dies kann zu einer Aktivierung von Onkogenen führen und die genetische Instabilität des Tumors fördern. ROS scheint während allen Stadien der Tumorgenese und der Metastasierung eine entscheidende Rolle zu spielen (89). In allen Zellen kann ein dysproportionaler Anstieg der intrazellulären ROS einen Zellzyklusarrest sowie die Induktion der Apoptose zur Folge haben (92). Dieser Wirkmechanismus bildet den Kern vieler Chemotherapeutika in der Tumorthherapie: Sie erzeugen ein hohes Maß an ROS, das mit der Viabilität der Zelle nicht vereinbar ist. Es kommt zur Induktion der Apoptose. Da gesunde Zellen niedrigere basale ROS-Spiegel aufweisen, tolerieren sie die Erhöhung der ROS durch die Chemotherapeutika besser (93). Im Multiplen Myelom führt der erhöhte ER-Stress zu einer vermehrten Bildung von toxischen ROS (94). Dementsprechend stellt die ROS-Erhöhung und die daraus folgende Aktivierung des programmierten Zelltods auch in dieser Tumorentität eine vielversprechende Therapieoption dar. Auch Proteasomeninhibitoren scheinen einen Teil ihrer Wirkung im Myelom über den eben beschriebenen Effekt einer ROS-Induktion zu entfalten (88). Antioxidantien schützen Zellen vor oxidativen Schäden (95). Zu den Antioxidantien, die ROS abfangen können, zählt das synthetisch hergestellte Aminothiol N-Acetylcystein (NAC). Es fungiert als Vorstufe des intrazellulären Antioxidans Glutathion (GSH) (96).

3. Material

3.1. Allgemeine Substanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet (Tabelle 2).

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
2-Propanol	6752.3	Carl Roth
Acrylamidstammlösung 30%	3029.1	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	A3678	Bio-Rad
Bafilomycin A1	BML-CM-110-0100	Enzo
Bovines Serum Albumin (BSA)	sc-2323	SantaCruz Biotechnology
Brij®O10	P6136	Sigma-Aldrich
Chloroquin Diphosphat	C6628	Sigma-Aldrich
CM-H ₂ DCFDA	C6827	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.2	Carl Roth
Dulbecco's Phosphat buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich
Ethanol	VE29169	Martin und Werner
Glycin	3908.2	Carl Roth
H ₂ O ₂	7209	Merck
L-Arginin	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Canavanin	C1625	Sigma-Aldrich
L-Leucin	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin	L-5626	Sigma-Aldrich
Laemmli 2x Probenpuffer	S3401	Sigma-Aldrich
Leupeptin	L2884	Sigma-Aldrich
Methanol	0082.3	Carl Roth
Milchpulver Blotting-Grade	T145.1	Carl Roth
N-Acetyl-L-Cystein	A7250	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat	L3771	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	S7920	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	S-6508	Sigma-Aldrich

Pepstatin	P5318	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfoniumfluorid (PMSF)	P7626	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	161-0376	Biorad
Propidiumiodid (PI)	P4170	Sigma-Aldrich
Ricolinostat	A4083	Apexbio
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich
Tris	4855.2	Carl Roth
Trypanblau	T-0776	Biochrom AG
Tunicamycin	T7765	Sigma-Aldrich
Tween® 20	9127.1	Carl Roth
Wortmannin	9915s	Cell Signalling
β-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth

Tabelle 2) Verwendete allgemeine Substanzen

3.2. Allgemeine Materialien

In dieser Arbeit wurden folgende Materialien verwendet (Tabelle 3).

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
Cellstar Zellkulturflaschen mit Filterkappe 25/75/175 cm ²	690175/658175/660175	Greiner Bio-One
Cellstar 6/24/96 Well Multiwell Platten, F-Boden	657160/662160/6551	Greiner Bio-One
Gefrierlagerröhrchen Cryo.s	122279	Greiner Bio-One
Kova Glasstic Slide 10 mit Grid	22-270141	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer improved Tiefe 0,100 mm	0640010	Marienfeld
Pipettenspitzen 5/10/25/50 ml	606180/607180/760180/768180	Greiner Bio One
Pipettenspitzen 0,5–10/10–200/200–1000 µl	771287/739261/740274	Greiner Bio One

Tabelle 3) Verwendete allgemeine Materialien

3.3. Kits

Im Rahmen dieser Arbeit kamen die folgenden Kits zum Einsatz (Tabelle 4).

Kit	Inhalt	Artikelnummer	Hersteller
DCTM Protein Assay Reagents Package	DCTM Protein Assay Reagent A DCTM Protein Assay Reagent B DCTM Protein Assay Reagent S	5000116	Bio-Rad
Western Lightning® Plus ECL	Oxidizing Reagent Plus Enhanced Luminol Reagent Plus	NEL103001EA	Perkin Elmer

Tabelle 4) Verwendete Kits

3.4. Medien und Zusätze

Folgende Medien und Zusätze fanden Verwendung (Tabelle 5).

Medium/Zusatz	Artikelnummer	Hersteller
Fötales Kälberserum (FCS) dialysiert, hitzeinaktiviert, 10%	F0392	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	F7524	Sigma-Aldrich
Gibco® CD Hybridoma Medium	11279023	Thermo Fisher Scientific
L-Arginin, 100 mM	A-8094 11279023	Sigma-Aldrich
L-Glutaminlösung, 200 mM	G7513	Sigma-Aldrich
L-Leucin, 100 mM	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysin Monohydrochlorid, 100 mM	L8662	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Lösung 10 mg/ml	P4333	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin und Natriumhydrogencarbonat, ohne Arginin, Leucin, Lysin und Phenolrot, steril-filtriert	R1780	Sigma-Aldrich

RPMI-1640 Natriumhydrogencarbonat, ohne L-Glutamin, steril filtriert	Medium mit	R0883	Sigma-Aldrich
--	------------	-------	---------------

Tabelle 5) Verwendete Medien und Zusätze

3.5. Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Geräte genutzt (Tabelle 6).

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAHD	Köttermann
Blottingkammer	Trans-Blot SD Semi Dry	Bio-Rad
Chemidoc	Universal Hood III	Bio-Rad
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences
Energieversorgung SDS	Power PAC TM 3000	Bio-Rad
Energieversorgung WB	Power PACTM HC	Bio-Rad
Heizblock	Thermostat Plus 1,5 ml	Eppendorf
Inkubator	Function Line	Heraeus
Mikroskop	AE2000	Motic
Magnetrührer	VMS-A	VWR, Darmstadt
Sterilbank	Hera Safe HS18	Heraeus
Vortexer	REAX 2000 Vortex Genius 3 G-560 E	Heidolph IKA Labortechnik Scientific Industries
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge groß	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge klein	5417 R	Eppendorf

Tabelle 6) Verwendete Geräte

3.6. Zelllinien

Die Zelllinie NCI-A2 wurde in den Experimenten eingesetzt (Tabelle 7).

Zelllinie	Tumorentität	Bezugsquelle
NCI-H929	Multiples Myelom	Prof. Dr. H. Goldschmidt, Universitätsklinikum Heidelberg

Tabelle 7) Verwendete Zelllinien

Die Zelllinie NCI-H929 wurde in unserer Kooperationsarbeitsgemeinschaft AG Theobald mit humanem HLA-A2 transfiziert. In dieser Arbeit werden die NCI-H929 HLA-A2 Zellen abgekürzt NCI-A2 genannt.

3.7. Lösungen und Puffer

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden verwendet (Tabelle 8).

Lösung/Puffer	Bestandteile
4% Trypanblau-Lösung	4% Trypanblau in PBS
10% Brij	Brij®O10 in 50mM Tris/HCl, pH = 7,5
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 10% einer 10%igen SDS-Lösung
10x TBS	100 mM Tris/HCl, pH 8 1,5 M NaCl
1x TBST	10 mM Tris 150 mM NaCl Tween-20 0,1 % in 1x TBS-Lösung
Blockierlösung WB	5% Milchpulver in TBST
Blottingpuffer WB	20 mM Tris 150 mM Glycin 20% Methanol

Lysepuffer (Standardprotokoll)	1% Brij in 50mM Tris/HCl, pH = 7,5 2,19 μ M Pepstatin 2,34 μ M Leupeptin 1 mM PMSF 10 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumorthovanadat
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH = 6,8 0,4 % SDS TBST 0,1% Tween20 in 1x TBS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8 0,4% SDS

Tabelle 8) Verwendete Lösungen und Puffer

3.8. Antikörper für Western Blot

Bis auf die Antikörper mit Spezifität gegen Caspase-3 und *cleaved* Caspase-3, die in 5%iger Milch/TBST-Lösung angesetzt wurden, wurden alle Antikörper in 5%iger BSA/TBST-Lösung gelöst. Die Primärantikörper wurden mit einer Konzentration von 1:1000 verdünnt. Der als Ladekontrolle fungierende Antikörper anti-GAPDH wurde in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt. Die eingesetzten Primärantikörper sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Primärantikörper	Ursprung	Artikelnummer	Hersteller
ATF 4	Kaninchen	11815S	Cell Signaling
BAG3	Kaninchen	10599-1-AP	Proteintech™
Caspase 3	Kaninchen	9662S	Cell Signaling
<i>Cleaved</i> Caspase 3	Kaninchen	9661S	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	2118L	Cell Signaling
LC3 A/B (LC3-I/II)	Kaninchen	4108S	Cell Signaling
Phospho-eIF2 α	Kaninchen	3398P	Cell Signaling

Tabelle 9) Verwendete Primärantikörper

Als Sekundärantikörper wurde ein anti-Kaninchen IgG, gelöst in einer 5%iger BSA/TBST-Lösung, mit einer Verdünnung von 1:2000 verwendet (Tabelle 10).

Sekundärantikörper	Artikelnummer	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt	7074S	Cell Signaling

Tabelle 10) Verwendete Sekundärantikörper

4. Methoden

4.1. Methoden der Zellkultur

4.1.1. Kultivierung der Zellen

Die Zellreihe NCI-A2 wurde in Suspensionszellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss in RPMI-1640 Medium mit Zusatz von 10%igem fötalen Kälberserum (FCS), 1%igem L-Glutamin und 1%iger Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S-Lösung) kultiviert. Vor Gebrauch der Medien wurden sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Inkubationstemperatur betrug konstant 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5%. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich in frisches Kulturmedium in einer Verdünnung von 1:10 umgesetzt. Hierfür wurde das entsprechende Volumen mit den darin enthaltenen Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten (min) zentrifugiert und anschließend erfolgte die Zugabe des frischen Mediums und die Überführung in eine frische Suspensionszellkulturflasche. Die verwendeten Lösungen und Chemikalien wurden vor deren Nutzung auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde stets an einer Sterilbank gearbeitet.

4.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert werden. Die Zellen wurden aus einer Zellkulturflasche entnommen. Anschließend wurden sie in FCS mit 10% DMSO aufgenommen und in 1,5 ml fassende Gefrierlagerröhrchen aliquotiert. Um die Unversehrtheit der Zellen zu sichern erfolgte eine schrittweise Kühlung. Zuerst wurden die Zellen bei -20°C für 1 Stunde (h) eingefroren, anschließend wurde die Temperatur auf -80°C gesenkt und erst nach 24 h erfolgte die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Wenn die Zellen wieder aufgetaut werden sollten, wurden die Gefrierlagerröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde das, im Vergleich zum Gefriermedium 10-fache, Volumen des Zellkulturmediums dazugegeben. Die 15 ml Röhrchen wurden anschließend bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium gelöst und in 25 cm² Kulturflaschen in den Inkubator gestellt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach etwa 12 bis 24 h.

4.1.3. Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurden 50 µl Zellsuspension entnommen und mit 50 µl 4%Trypanblaulösung (Tabelle 8) gemischt. Anschließend wurden etwa 8 µl auf einen

Objektträger mit Zählkammer gegeben. Anschließend wurden unter dem Mikroskop 3 von 9 Quadraten ausgezählt und daraus der Mittelwert und damit die Zellzahl pro Milliliter berechnet.

4.1.4. Ansetzen der Versuchsbedingungen

Am Vortag des Versuches wurde stets das Nährmedium gewechselt. Der Inhalt der Suspensionszellkulturflaschen wurde für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend wurde das Zellpellet in frischem, im Wasserbad erwärmten Medium aufgenommen. Die frischen Suspensionszellkulturflaschen wurden zurück in den Inkubator gestellt. Am Versuchstag wurden die Suspensionszellkulturflaschen aus dem Inkubator entnommen. Es erfolgte eine Zählung der Zellen mithilfe der Zählkammer unter dem Mikroskop und eine anschließende Berechnung der benötigten Menge der Zellsuspension. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in ein Röhrchen (*Falcon*) überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Zellpellet wurde 1 ml PBS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml große Reaktionsgefäße (*Eppendorf-Tubes*) überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation in der kleinen Zentrifuge für 5 min bei 1800 rpm. Der Vorgang wurde 2-mal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von frischem argininfreien Nährmedium (auch: Argininmangelmedium, Tabelle 11) zu dem Zellpellet.

Bestandteile	Menge pro 50 ml
10% dialysiertes FCS	5 ml
1% Glutamin	500 µl
1% P/S	500 µl
0,22% L-Lysin	110 µl
0,4% L-Leucin	200 µl
RPMI 1640 (argininfrei)	43,69 ml

Tabelle 11) Zusammensetzung Argininmangelmedium

Es wurden je nach Versuch in einer 6- oder einer 12-Multiwellplatte $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml in dem benötigten Probenvolumen angesetzt. Um die korrekte Konzentration an Zellen auszusähen, erfolgte stets eine Zählung mittels Zählkammer. Je nach Versuchsbedingung wurden die eingesetzten Substanzen den Zellen im Argininmangelmedium zugesetzt (Tabelle 12). Die Zellen wurden je nach Versuch in den angesetzten Bedingungen für 0, 5 bis 8 h inkubiert.

Zusatz	Stockkonzentration	Eingesetzte Konzentration
L-Arginin	100 mM (in PBS)	1 mM
L-Canavanin	100 mM (in dH ₂ O)	100 µM
N-Acetyl-L-Cystein	600mM (in dH ₂ O)	6 mM
Bafilomycin A1	1mM (in EtOH)	100 nM
Chloroquin	10 mM (in dH ₂ O)	50 µM
Tunicamycin	1 mg/ml (in DMSO)	33 µM
Ricolinostat	3 mM (in DMSO)	3 µM
Wortmannin	2 mM (in DMSO)	5 µM

Tabelle 12) Konzentrationen der Zusätze

4.2. Methoden der Proteinanalytik

4.2.1. Probenvorbereitung

Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Inhalte der Zellkulturplatten in beschriftete 15 ml Röhren gefüllt. Es folgt die Zentrifugation der Röhren für 5 min bei 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf-*Tubes*) überführt. Nach vorsichtigem Auf- und abpipettieren, erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Vorgang wurde 2-mal wiederholt. Der Überstand wurde abschließend erneut verworfen und die Zellpellets für mindestens 30 min in -80°C eingefroren. Nachdem die Zellen langsam aufgetaut wurden, wurden 50 µl des Lysepuffers (Tabelle 8) in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben. Es erfolgte die Durchmischung mithilfe des Vortexers für einige Sekunden. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3-mal, im Abstand von jeweils 10 min wiederholt. Die Proben wurden in der Zwischenzeit stets auf Eis gelagert. Abschließend erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C über 10 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Probengefäß pipetiert. Es handelte sich nun um das fertige Proteingemisch. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen lysiert waren und die Proteine gelöst vorlagen.

4.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit der Methode nach Lowry durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein kolorimetrisches Verfahren, welches die Biuret Methodik weiterentwickelt hat. In einer zweizeitigen Reaktion entsteht ein blauer Farbstoff. Das

Absorptionsmaximum liegt bei 750 nm. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des DCTM Kits (Tabelle 4). Es wurde stets eine 96-Well-Platte genutzt. Es wurden 2 Eichgeraden und 3 Vergleichsreihen der zu bestimmenden Proteinproben angesetzt. Zunächst wurden die Lösungen S und A in einem Verhältnis von 1:50 gemischt. Jeweils 25 µl wurden davon in jedes Well pipettiert. Da es sich um eine Relativmessung handelt, wurde stets ein bekannter Standard genutzt. Für die Herstellung der Standardproben wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin angesetzt. Für die Verdünnungsreihe wurden von oben absteigend Konzentrationen von 4000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml und 0 µg/ml Rinderserumalbumin gewählt. Es wurden 5 µl der zu messenden Standardprobe beziehungsweise der Proteinproben in jedes Well pipettiert. Pro Well wurden anschließend 200 µl der Lösung B hinzugefügt. Anschließend wurde die 96-Well-Zellkulturplatte für 10 min im Dunklen inkubiert. Mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts erfolgte die Absorptionsmessung. Mithilfe der Absorptionsmessung konnte die Proteinkonzentration jeder Bedingung bestimmt werden.

4.2.3. SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Es wurden pro Probe 20 µg Protein 1:1 mit 2x Laemmli Probenpuffer gemischt und bei 95°C für 5 min aufgekocht. Es wird ein 12% oder 15% Trenngel sowie ein 5% Sammelgel angesetzt (Tabelle 13). Als Marker wurde Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Tabelle 2) genutzt.

12% Trenngel, 50 ml	15% Trenngel, 50 ml	5% Sammelgel, 10 ml
17,5 ml dH ₂ O	11,5 ml dH ₂ O	6,1 ml dH ₂ O
12,5 ml Trenngelpuffer	13 ml Trenngelpuffer	2,5 ml Sammelgelpuffer
20 ml 30% Acrylamid	25 ml 30% Acrylamid	1,3 ml 30% Acrylamid
0,5 ml 10% APS	0,5 ml 10% APS	50 µl 10% APS
0,0035 ml TEMED	0,02 ml TEMED	0,01 µl TEMED

Tabelle 13) Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel

Für das Trenngel wurden entsprechende Volumina Wasser, 1,5 M Tris (pH 8,8) incl. SDS sowie 30% Acrylamid in einem 50 ml Röhrchen unter dem Abzug angesetzt. Anschließend wurden APS und TEMED hinzugefügt. Das Trenngel wurde in eine Glaskammer gefüllt und mit Ethanol überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Ethanol entfernt. Es folgte die Zugabe des Sammelgels und das Einlegen eines Kamms zur Herstellung der

Proteintaschen. Parallel wurde die Elektrophoresekammer aufgebaut und mit 1xSDS-Laufpuffer aufgefüllt. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurden der Proteinmarker und je 20 µg der Proteinprobe pro Bedingung in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Mithilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können die einzelnen Proteine aus der Proteinprobe nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden (97). Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die Seitenketten der Aminosäuren. Die Aminosäuren sind dadurch unabhängig von ihrer ursprünglichen Nettoladung alle stark negativ geladen. Es wurde die Energieversorgung angeschlossen. Die Proben liefen bei 84 Volt, bis Zeichen der Auftrennung zu sehen waren. Anschließend wurde 100 Volt für 3 h eingestellt. Die Proteine trennten sich in dieser Zeit auf. Anschließend wurden die Gele für 10 min im Blottingpuffer äquilibriert und die Proteine im Gel dann mithilfe des Western Blot-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen.

4.2.4. Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde ein *Semy-dry*-Blot-Verfahren angewendet. Zuerst wurde die PVDF-Membran nach Äquilibration im Blottingpuffer, mithilfe von Methanol aktiviert. Dafür wurde sie etwa 10 Sekunden in Methanol inkubiert. Anschließend wurden in der Blotkammer ein Schwamm, 2 Schichten Whatmann-Papier, das Gel, die PVDF-Membran wieder 2 Schichten Whatman-Papier und ein Schwamm angefeuchtet, akkurat von Kathode zur Anode, übereinandergelegt. Das Transblottingsystem wurde für 75 min bei konstantem Strom mit 67 mA angeschlossen, um die Proteine vom Gel auf die PVDF Membran zu übertragen. Anschließend wurde die Membran nach 2-maligem 2-minütigem Waschen mit TBST zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5%iger Magermilch in TBST Lösung für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST für jeweils 7 min 3-mal gewaschen. Der Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde danach 3-malig mit TBST je 7 min gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut für je 7 min 3-mal mit TBST gewaschen. Unter einer Abdeckung wurde nun das lichtemittierende, nicht-radioaktive Western Lightning® Plus ECL (Tabelle 4) hinzugegeben. Mithilfe einer Peroxidase, die am sekundären Antikörper bindet, wird das Luminol oxidiert und das so mittels Chemilumineszenz entstehende Licht kann mithilfe des Chemidoc-Systems aufgenommen werden.

4.3. Durchflusszytometrie

4.3.1. Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die sogenannte *Fluorescence Activated Cell Sorting*- (FACS) Messung findet vielseitige Anwendungsmöglichkeiten. Die einzelnen Zellen werden durch eine Durchflusszelle geschickt und hier mit einem gezielten Laser bestrahlt. Die Streuung des Laserstrahles, die durch die Zelle entsteht wird mithilfe von Detektoren erfasst. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) gibt mithilfe der Lichtbeugung Informationen zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) ist ein Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel und lässt Rückschlüsse über Zellgranularität sowie Größe und Struktur des Zellkerns zu. Des Weiteren können die Zellen auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert oder direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff beladen werden. So lassen sich unterschiedlichste Oberflächenantigene oder – nach Permeabilisierung der Zellmembran – auch lösliche zytoplasmatische Antigene detektieren. Das verwendete Gerät (FACS Canto von Becton Dickinson) kann 6 unterschiedliche Fluorochrome gleichzeitig erfassen (sog. multiparametrische Durchflusszytometrie). Die detektierten Fluorochrome werden in elektronische Signale übersetzt. Diese Signale werden an einen Computer weitergeleitet. Anschließend wurden die Daten mittels dem Programm FlowJo analysiert.

4.3.2. FACS-Messung von Propidiumiodid

Der Versuchsansatz verläuft auf die Gleiche weise wie in 4.1.4. geschildert. Es wurden 1,3 Millionen Zelle pro Bedingung in 1 ml Argininmangelmedium mit den verschiedenen - Substanzen in 12-Well Platten angesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 8 h. 300 µl der Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen pipettiert. Pro Bedingung wurden 2 FACS Röhrchen vorbereitet. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde 1 ml PBS dazugegeben, mit dem Zellpellet gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und zu dem 1ml PBS wurde nun pro Röhrchen 2 µl Propidiumiodid pipettiert. Die FACS Röhrchen wurden für wenige Sekunden gevortext und anschließend für 15 min in einem dunklen Behältnis inkubiert. Anschließend konnte mithilfe eines Durchflusszytometers die Messung des Farbstoffs durchgeführt werden. Propidiumiodid ist ein DNA-Interkalator und kann nicht in viable Zellen eindringen: Propidiumiodid färbt tote Zellen.

4.3.3. FACS-Messung von CM-H₂DCFDA

Der Versuchsansatz verläuft auf die gleiche Weise wie in 4.1.4. geschildert. Es wurden $1,3 \times 10^6$ Zellen pro Bedingung in 1 ml Argininmangelmedium mit den verschiedenen Substanzen in 12-Well-Platten angesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 0,5, 4 und 8 h. Die Zellen wurden geerntet und mit Gibco CD Hybridoma Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer frischen 12-Well-Platte mit 5 µl des Farbstoffes CM-H₂DCFDA in 1 ml Gibco CD Hybridoma Medium pro Bedingung aufgenommen und für 20 min mit dem Farbstoff bei 37°C inkubiert. Eine Kontrollbedingung wurde mit dem gleichen Medium inkubiert, jedoch ohne Farbstoff. Nach der Inkubation wurden die Inhalte der jeweiligen Wells aus der Platte in die FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 1 ml des Hybridoma Mediums dazugegeben, mit dem Zellpellet gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Der Farbstoff reagiert mit intrazellulären freien radikalischen Sauerstoffspezies und kann anschließend im FITC-Kanal des Durchflusszytometers gemessen werden.

4.4. Statistik und verwendete Programme

Für die quantitative Analyse der Western Blot Experimente wurde das Programm ImageJ verwendet. Zur Auswertung der FACS-Messungen wurde das Programm FACS Diva (Becton Dickinson) genutzt. Die FACS-Daten wurden mithilfe des Programms FlowJo der Firma FlowJo LLC analysiert. Zur Datenspeicherung fand das Programm Microsoft Excel Verwendung. Das Programm GraphPad Prism 6.0 wurde für die statistische Auswertung und die Erstellung aller Graphen genutzt. Im Falle einer Normalverteilung der Messwerte wurde die Auswertung mittels *Ordinary one-way Anova multi comparison* durchgeführt. Alle Werte für $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet (Tabelle 14).

Symbol	p-Wert
***	< 0,001
**	< 0,01
*	< 0,05
n.s.	> 0,05

Tabelle 14) P-Werte und dazugehörige Symbole

5. Ergebnisse

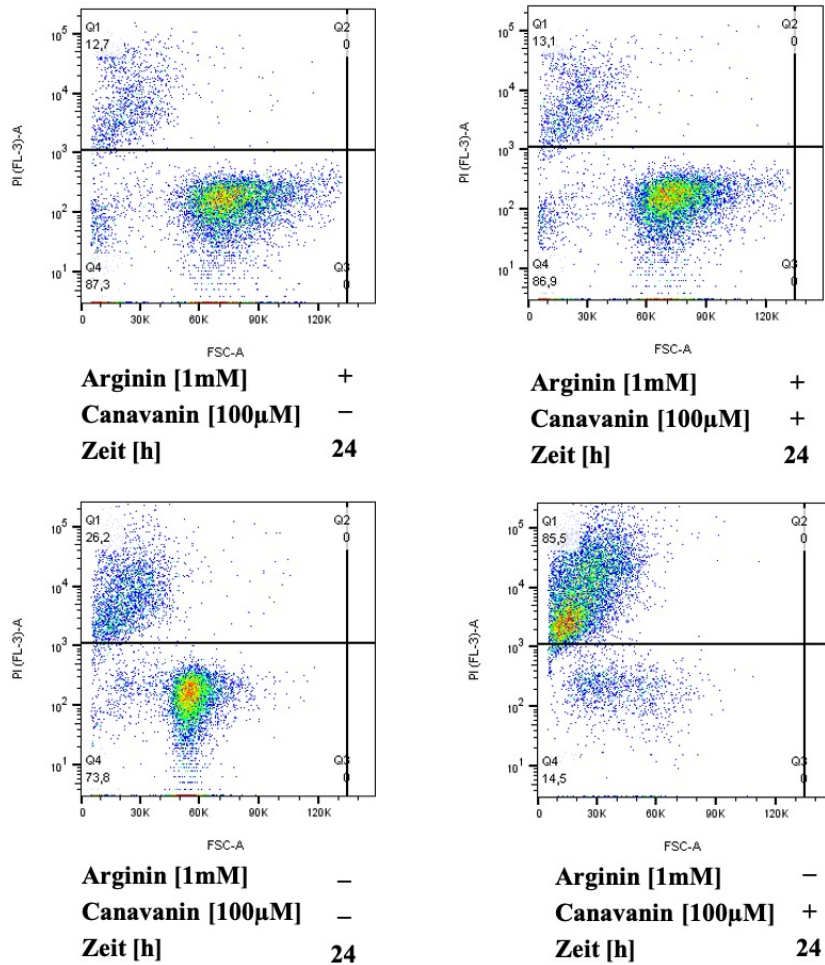
5.1. Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität

Zunächst wurde das System des induzierten Zelltodes durch Arginindepletion mit Canavanin-Supplementation an den in der Folge biochemisch zu untersuchenden NCI-A2 Myelomzellen validiert. In diesen Versuchen wurde mithilfe des Farbstoffes Propidiumiodid die prozentuale Anzahl der toten Zellen der Zelllinie NCI-A2 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in den Bedingungen für 24 h inkubiert:

- + 1 mM Arginin
- + 1 mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin

Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo. Die NCI-A2 Zellpopulation wurde im FSC/SSC Diagramm eingegrenzt. Anschließend wurde die Propidiumiodid-positive Zellpopulation dargestellt (Abbildung 4).

A



B

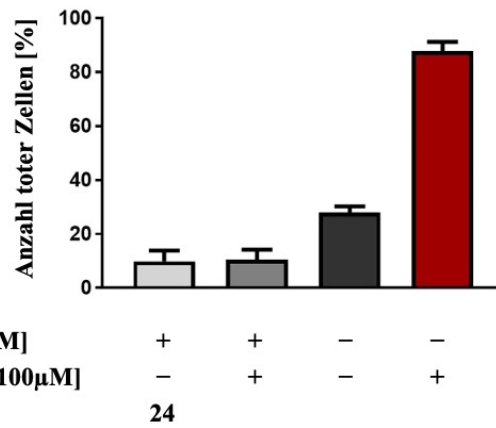


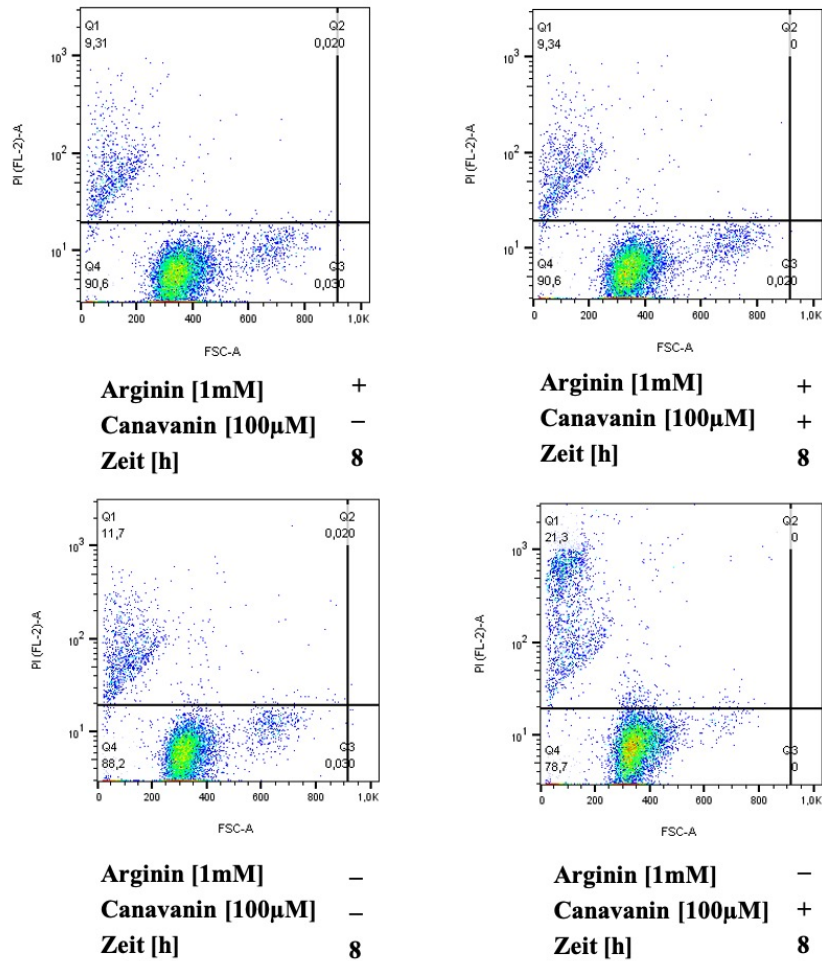
Abbildung 4) Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität der NCI-A2: 24 h Inkubation

Die Zellen wurden in den Bedingungen +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 24 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. (A) Beispielhafte Darstellung der FlowJo-Auswertung. Es erfolgte die Eingrenzung der NCI-A2 Zellpopulation. Anschließend erfolgte eine Darstellung der Propidiumiodid-positiven Zellpopulation. (B) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual gemessenen Propidiumiodid-positiven Zellen aus n=2 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %.

Der Auswertung in Abbildung 4A sind die Propidiumiodid-positiven Zellen zu entnehmen. Diese entsprechen den toten Zellen in der eingegrenzten Zellpopulation. In Abbildung 4B sind die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den FACS-Auswertungen von n=2 unabhängigen Versuchen dargestellt. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der toten Myelomzellen zu sehen. Auf der x-Achse finden sich die oben genannten (o.g.) Bedingungen. Bereits bei Argininsuffizienz (+Arg) wurden Propidiumiodid-positiv Zellen als nicht vermeidbarer Hintergrund gemessen. Bei Argininmangel ist zum Zeitpunkt t = 24 h eine bereits erhöhte Zytotoxizität messbar ($27,9\% \pm 2,4\%$). Die Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) hatte eine massive Zunahme der Propidiumiodid-positiven Zellpopulation zur Folge ($87,9\% \pm 3,4\%$). Die alleinige Canavaninsupplementation bei Argininsuffizienz erhöhte hingegen den Zelltod nicht.

Anschließend wurde mithilfe des Farbstoffes Propidiumiodid die prozentuale Anzahl der toten Zellen der Zelllinie NCI-A2 nach nur 8 h Inkubation, unter den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 4 aufgeführt, durchflusszytometrisch bestimmt. Die NCI-A2 Zellpopulation wurde im FSC/SSC Diagramm eingegrenzt. Anschließend wurde die Propidiumiodid-positiv Zellpopulation dargestellt (Abbildung 5).

A



B

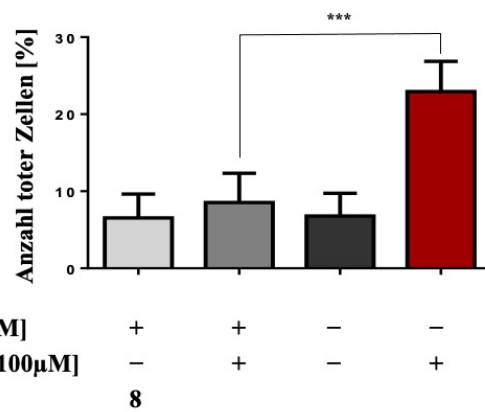


Abbildung 5) Auswirkung der Canavaninsupplementation auf die Zellviabilität der NCI-A2: 8 h Inkubation

Die Zellen wurden in den Bedingungen +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 8 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. (A) Beispielhafte Darstellung der FlowJo-Auswertung. Es erfolgte die Eingrenzung der NCI-A2 Zellpopulation. Anschließend erfolgte eine Darstellung der Propidiumiodid-positiven Zellpopulation. (B) Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual gemessenen Propidiumiodid-positiven Zellen aus n=5 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (***) p < 0,001).

Der Auswertung in Abbildung 5A sind die Propidiumiodid-positiven Zellen zu entnehmen. Diese entsprechen den toten Zellen in der eingegrenzten Zellpopulation. Bereits bei Argininsuffizienz (+Arg) wurden auch nach 8 h Propidiumiodid-positive Zellen als nicht vermeidbarer Hintergrund gemessen. Die Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) hatte eine starke Zunahme der Propidiumiodid-positiven Zellpopulation zur Folge. In Abbildung 5B sind die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den FACS-Auswertungen von n=5 unabhängigen Versuchen dargestellt. Auf der y-Achse ist die prozentuale Anzahl der toten Myelomzellen zu sehen. Auf der x-Achse finden sich o.g. Bedingungen. Nach 8 h waren bei Argininsuffizienz (+Arg, +Arg/+Can) und bei alleiniger Arginindepletion (-Arg) zwischen 5-10% der Zellen tot. Bei Argininmangel ist zum Zeitpunkt $t = 8$ h noch keine erhöhte Zytotoxizität messbar. Bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) zeigte sich eine Zunahme der Anzahl der toten Zellen auf etwa 22,94% +/- 3,91% ($p < 0,001$). War Arginin (+Arg) in den Zellen vorhanden und es wurde Canavanin (+Arg/+Can) dazugegeben, zeigte sich keine signifikante Zunahme des Zelltodes. Die Canavaninsupplementation wirkt nur bei zusätzlicher Arginindepletion zytotoxisch auf die NCI-A2 Myelomzellen.

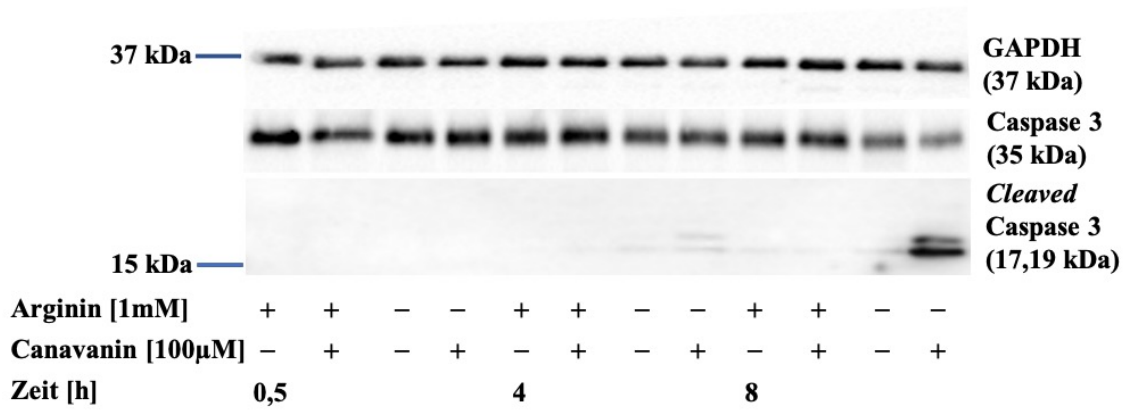
5.2. Apoptoseinduktion durch Canavaninsupplementation

Nachdem gezeigt wurde, dass die Behandlung mit Canavanin unter Arginindepletion in der untersuchten Tumorzelllinie stark zytotoxisch wirkt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob es durch die Behandlung mit Canavanin zu einer Aktivierung der Caspase-vermittelten Apoptose kommt. Untersucht wurde die Caspase 3, eine Effektorcaspase, die am Ende der Signalkaskade der Apoptose steht (33). Durch die Aktivierung entstehen 2 Spaltprodukte unterschiedlicher Größe, die im Western Blot detektiert werden können (98). Da nach 8 h eine signifikante Erhöhung des Zelltodes nachgewiesen werden konnte, sollten zusätzlich frühere Zeitpunkte untersucht werden. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in den folgenden Bedingungen für 0,5, 4 und 8 h inkubiert:

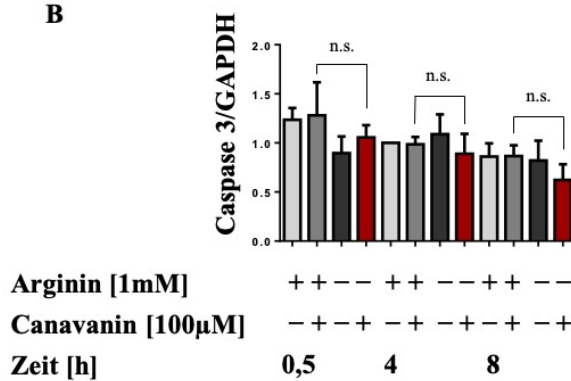
- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin

Anschließend wurden die aus den Zellysaten gewonnenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Mithilfe der Western Blot-Methode wurden die Caspase 3, sowie die *cleaved* Caspase 3, welche als Apoptose-vermittelnde aktivierte Caspase relevant ist, sichtbar gemacht. Als Ladekontrolle wurde die GAPDH verwendet (Abbildung 6).

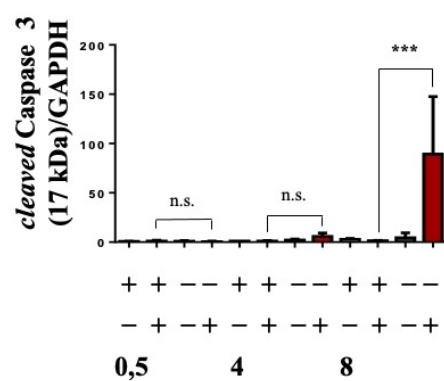
A



B



C



D

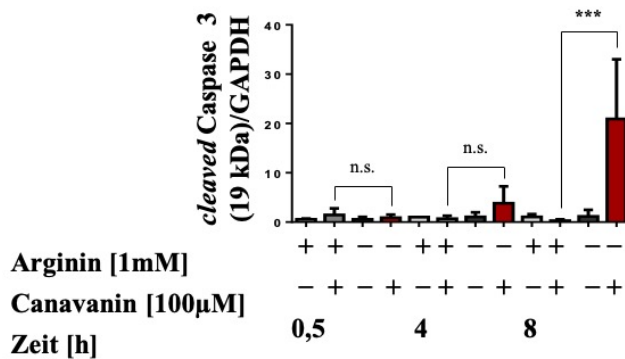


Abbildung 6) Caspase 3- und *cleaved* Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen Caspase 3- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus n=3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: p > 0,05). (C) Darstellung der Mittelwerte der relativen Expression von *cleaved* Caspase 3- (17 kDa) zur GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus n=3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: p > 0,05, *** p < 0,001). (D) Darstellung der Mittelwerte der relativen Expression von *cleaved* Caspase 3- (19 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus n=3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: p > 0,05, *** p < 0,001). Als Bezugswert für die Auswertung der 3 Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 4 h Inkubation gewählt.

In Abbildung 6A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH gezeigt. In Abbildung 6B sieht man die Mittelwerte der Caspase 3-Expression in Relation zur GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von n=3 unabhängigen Experimenten. In Abbildung 6C bzw. 6D sind die Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3-Expression (17 kDa bzw. 19 kDa) in Relation zur GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern dargestellt, auch als Ergebnis von den densitometrischen Auswertungen von n=3 unabhängigen Experimenten. Auf der y-Achse ist die relative Proteinexpression der Caspase 3 bzw. der *cleaved* Caspase 3 zur Ladekontrolle GAPDH aufgetragen. Wie in Abbildung 6A zu sehen, ist die Caspase 3 innerhalb der Zeitpunkte in allen Behandlungen etwa gleichbleibend exprimiert. Dies wird auch durch die quantitative Auswertung der densitometrisch quantifizierten Caspase 3- zur GAPDH-Expression ersichtlich (Abbildung 6B). Innerhalb von 8 h Inkubation konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Die *cleaved* Caspase 3 (17 sowie 19 kDa) ist im Western Blot in der -Arg/+Can Bedingung nach 4 h und nach 8 h detektierbar. In Abbildung 6C und 6D sieht man die statistische Auswertung der auf die GAPDH normierten Expression der *cleaved* Caspase bei 17 kDa und 19 kDa. Canavanin, führte nur bei zusätzlichem Argininmangel zu einer Spaltung der Caspase 3: Vergleicht man die +Arg/+Can Bedingung mit der -Arg/+Can Bedingung zeigt sich sowohl eine signifikante Erhöhung der *cleaved* Caspase 3 bei 17 kDa ($p < 0,001$), als auch bei 19 kDa ($p < 0,001$) nach 8 h Inkubation. Nach 4 h Inkubation sieht man auf dem Western Blot bei der gleichen Bedingung bereits schwache Expressionsbanden, die jedoch in der Auswertung nicht signifikant sind. Bei Canavaninsupplementation korreliert also offensichtlich bei zusätzlicher Arginindepletion der induzierte Zelltod mit einer Aktivierung der Caspase 3.

5.3. Autophagie als potenzieller Zytotoxizitäts- oder Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation

5.3.1. Monitoring der Autophagie

Canavanin aktiviert bei gleichzeitiger Arginindepletion in Krebszellen die Apoptose (siehe Abbildung 5; (45)). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche biochemischen Abläufe potenzielle Zytotoxizitäts- beziehungsweise Überlebensmechanismen in Myelomzellen darstellen. Dafür sollte die Rolle der Autophagie analysiert werden. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in den folgenden Bedingungen für 0,5, 4 und 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 µM Canavanin

Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und es wurde ein Western Blot angefertigt. Anschließend wurden die Proteine LC3-I/II und GAPDH detektiert (Abbildung 7).

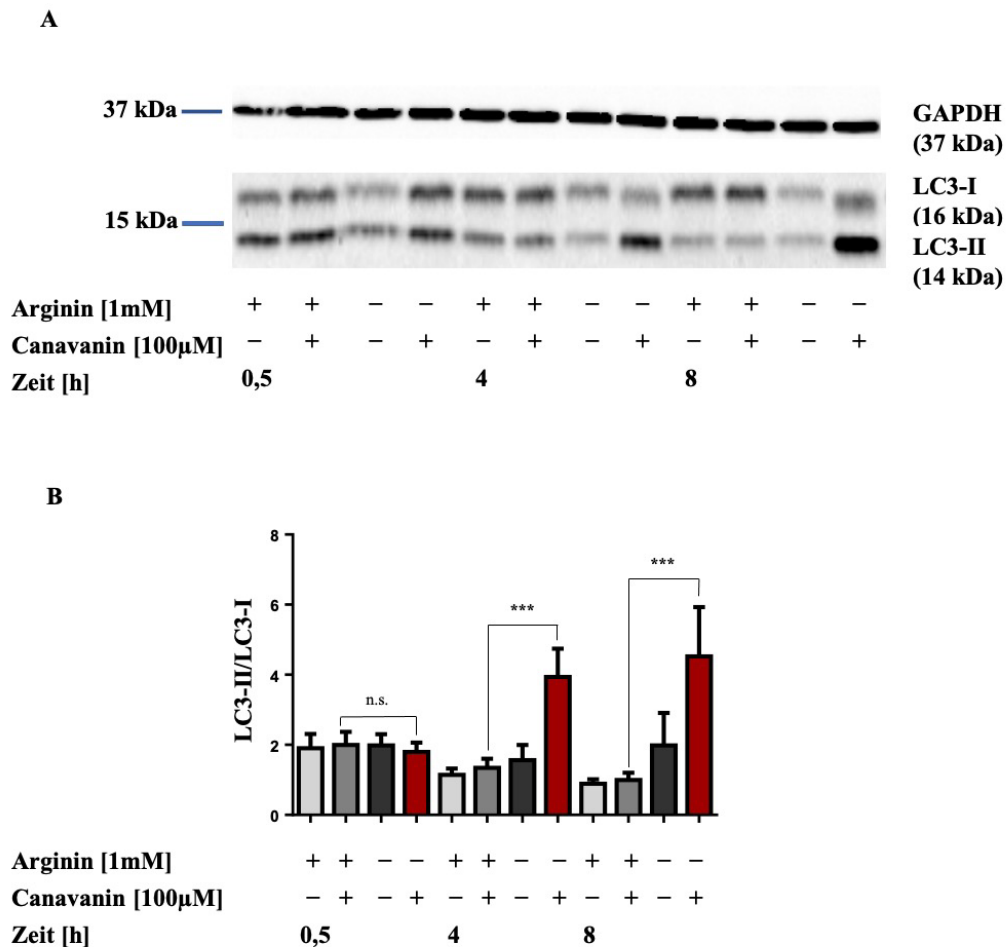


Abbildung 7) LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen Expression von LC3-II zu LC3-I im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus n=3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (n.s.: $p > 0,05$, *** $p < 0,001$).

In Abbildung 7A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH gezeigt. In Abbildung 7B sieht man die Mittelwerte der relativen LC3-II- zu LC3-I-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Auf

der y-Achse ist die Ratio der relativen Proteinexpression von LC3-II zu LC3-I aufgetragen. Die Induktion der Autophagie geht mit einer Umwandlung des LC3-I in das membrangebundene LC3-II einher. Die Ratio aus LC3-II zu LC3-I korreliert mit der Anzahl an Autophagosomen in der Zelle (46). Die Expression von LC3-II und LC3-I veränderte sich insbesondere bei Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can) nach 4 und nach 8 h (Abbildung 7A). Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich eine stärkere Expression des LC3-II-Proteins. Dies bestätigte sich auch in der statistischen Auswertung: Der Abbildung 7B ist zu entnehmen, dass die Ratio der relativen Proteinexpression von LC3-II zu LC3-I bei Canavaninsupplementation (+Arg/+Can), nur bei zusätzlicher Arginindepletion (-Arg/+Can), sowohl nach 4 h als auch nach 8 h signifikant ($p < 0,001$) zunahm. Die anderen Bedingungen führten zu keiner signifikanten Erhöhung der Ratio. Dies bedeutet, dass die Anzahl der Autophagosomen durch die Canavaninbehandlung bei zusätzlicher Arginindepletion stark zunimmt.

Eine Zunahme der Autophagosomen kann jedoch auch im Falle einer Inhibierung der späten Autophagiemechanismen auftreten (99). Daher sollte in einem nächsten Schritt gezeigt werden, ob es sich in dem untersuchten System um eine Erhöhung oder Erniedrigung des autophagischen Flux handelt. Dazu wurde zu jeder Bedingung der Autophagieinhibitor Chloroquin hinzugegeben. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in den folgenden Bedingungen, für 4 und 8 h, inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 50 μ M Chloroquin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 50 μ M Chloroquin
- - Arginin
- - Arg + 50 μ M Chloroquin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 50 μ M Chloroquin

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mithilfe eines Western Blots wurden die Proteine LC3-I und LC3-II, sowie die Ladekontrolle GAPDH detektiert (Abbildung 8).

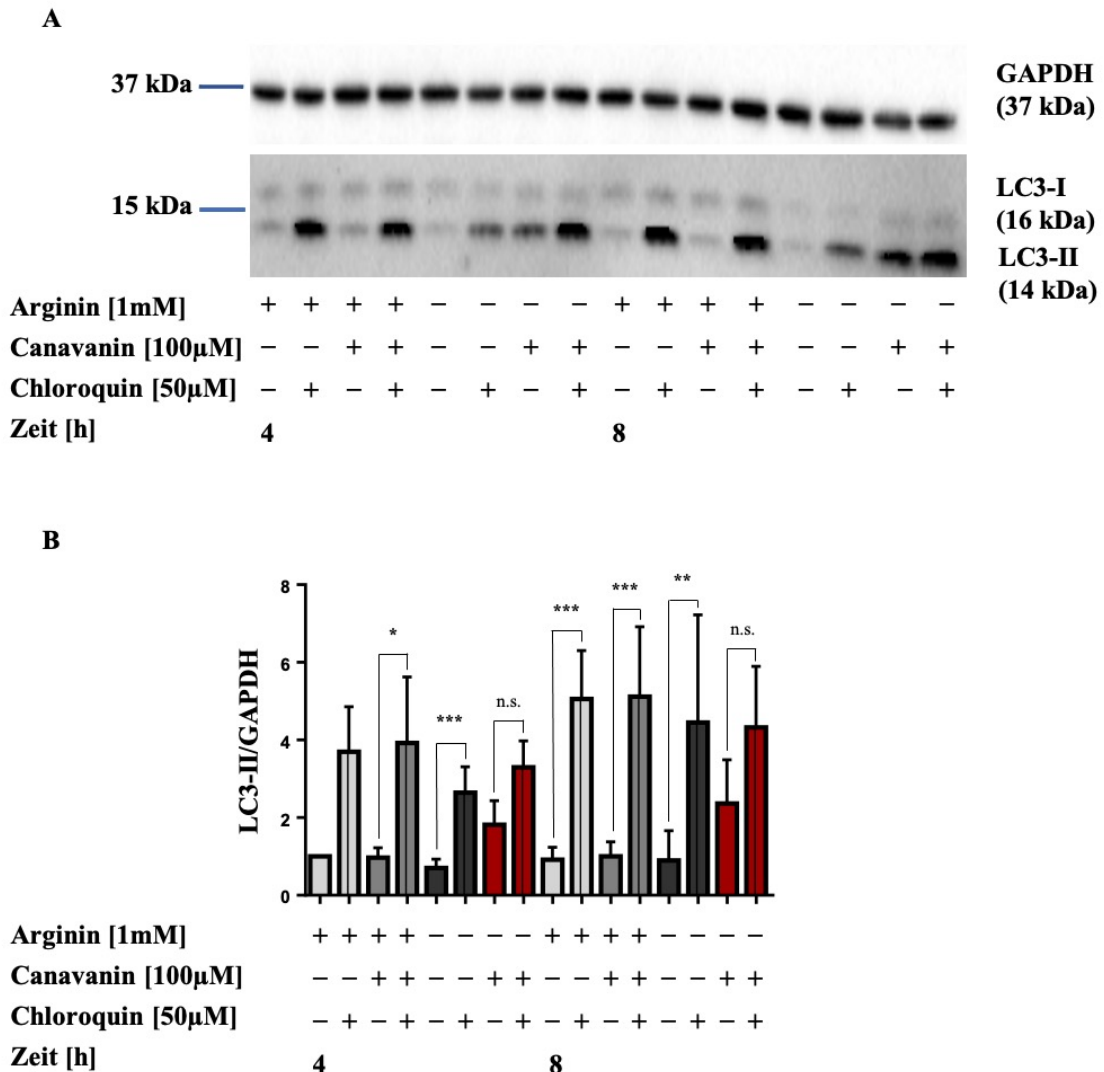


Abbildung 8) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Chloroquin (Chloro), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Chloro, -Arg, - Arg/+Chloro, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Chloro für je 4 h und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH. (B). Darstellung der Mittelwerte der relativen LC3-II-Expression zur GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus n=5 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Als Bezugswert für die Auswertung des Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 4h Inkubation gewählt.

In Abbildung 8A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH dargestellt. In Abbildung 8B sind die Mittelwerte der LC3-II-Expressionsstärken relativ zur jeweiligen GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von 5 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. Um Aussagen über den autophagischen Flux treffen zu können,

wurden die Werte der Proteinexpression von LC3-II relativ zu GAPDH der Bedingungen ohne Chloroquin mit der jeweiligen Bedingung mit zusätzlicher Chloroquinbehandlung verglichen (99). Durch eine Behandlung mit Chloroquin kommt es infolge der Blockierung der autophagischen Degradierung zu einer Akkumulation von LC3-II (67). In der Abbildung 8A ist zu erkennen, dass die +Arg, die +Arg/+Can und die -Arg Bedingungen durch zusätzliche Chloroquinbehandlung (+Arg/+Chloro, +Arg/+Can/+Chloro, -Arg/+Chloro) eine signifikant stärkere Bande des Proteins LC3-II aufweisen. Die Zunahme der relativen LC3-II-Expressionsstärken in den +Arg/+Can Bedingungen bei zusätzlicher Chloroquinbehandlung (+Arg/+Can/+Chloro), konnte in der statistischen Auswertung (Abbildung 8B) sowohl nach 4 h ($p < 0,05$) als auch nach 8 h ($p < 0,001$) gezeigt werden. Im Vergleich dazu hatte die Zugabe von Chloroquin bei Argininmangel und Canavaninsupplementation (-Arg/+Can/+Chloro) weder nach 4 h noch nach 8 h eine Erhöhung der LC3-II-Expression, normiert auf die GAPDH-Expression zur Folge ($p > 0,05$). Dies kann man auch im Western Blot in Abbildung 8A deutlich erkennen: Zwischen der -Arg/+Can und der -Arg/+Can/+Chloro Bedingung zeigt sich kein relevanter Unterschied der LC3-II-Bandenstärke. In Zusammenschau mit dem Ergebnis aus Abbildung 7, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Canavaninsupplementation nur bei zusätzlicher Arginindepletion (-Arg/+Can) zu einer verstärkten Bildung von Autophagosomen führt. Dies kann jedoch nur durch eine Hemmung der späten Phase der Autophagie erklärt werden, und eine Verstärkung des autophagischen Fluxes liegt nicht vor.

Eine weitere Möglichkeit, um den autophagischen Flux zu bestimmen, ist eine Untersuchung der Expression von p62. Dieses Protein, bindet sowohl ubiquitinierte Substrate als auch LC3-II und fungiert somit als Adaptorprotein (100). Im Falle einer Erhöhung des autophagischen Flux kommt es zu einer Verminderung des p62, da es im autophagischen Prozess degradiert wird. Bei einer Hemmung der Autophagie akkumuliert p62 (99). Die Zellen der Myelomzelllinie NCI-A2 wurden in den Standardbedingungen für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin

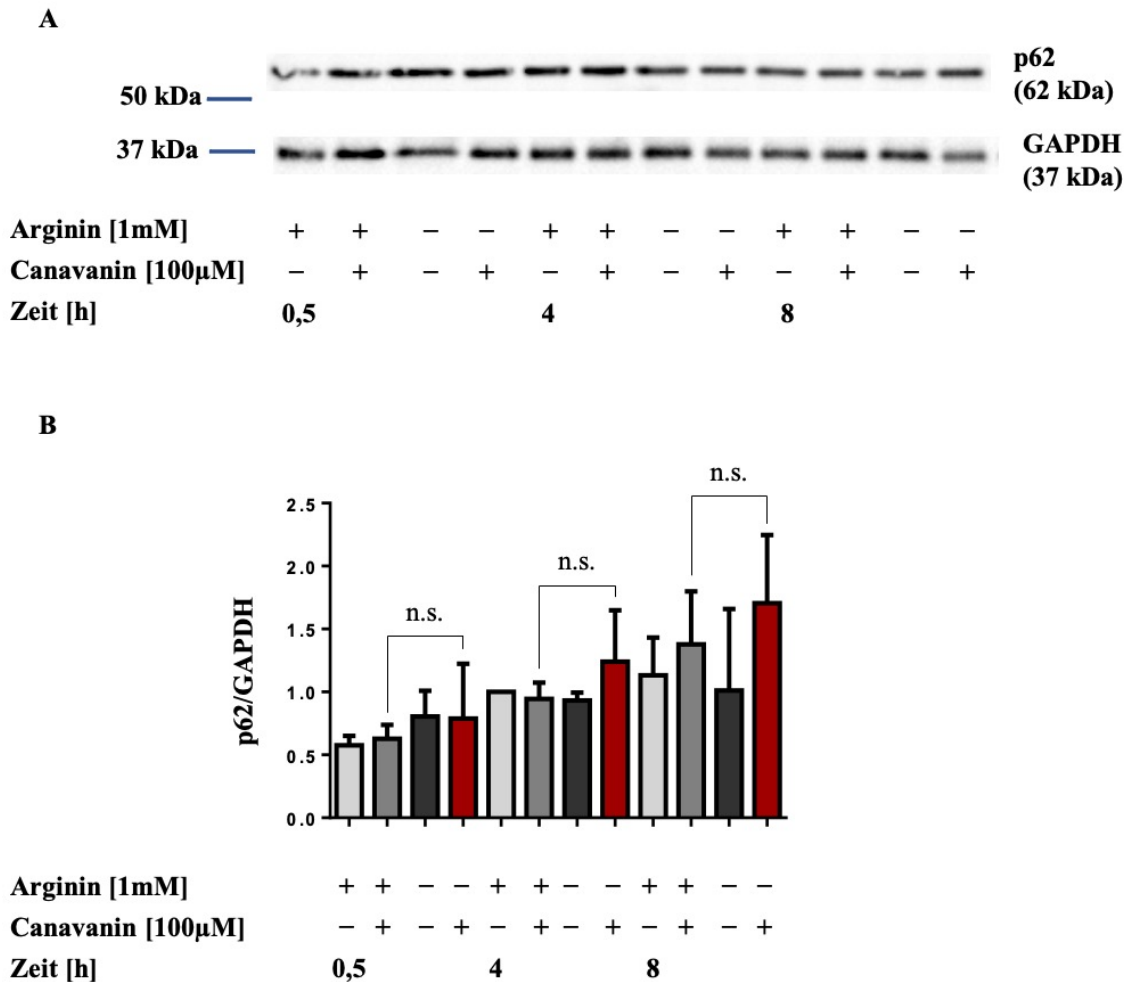


Abbildung 9) p62-Expression in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen p62 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der p62-Expression, normiert auf die GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: $p > 0,05$). Als Bezugswert für die Auswertung des Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 4h Inkubation gewählt.

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen p62 und GAPDH verwendet (Abbildung 9). Abbildung 9A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit Antikörpern gegen p62 und GAPDH. Insgesamt wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt, Western Blots angefertigt und die densitometrischen Dichtewerte quantitativ ausgewertet. In Abbildung 9B sind die Mittelwerte der p62-Expression, normiert auf die jeweiligen GAPDH-Expressionsstärken im Säulendiagramm mit Standardfehlern zu sehen. Wie man in dem Western Blot in Abbildung 9A sieht, ist die Proteinexpression von p62 in allen Bedingungen im Kontext der jeweiligen Zeitpunkte konstant. Dies bestätigt sich auch in der densitometrischen Auswertung (Abbildung 9B). Innerhalb der Zeitpunkte gibt es keine signifikanten Unterschiede der auf GAPDH

normierten p62-Expression zwischen den einzelnen Bedingungen. Auch die Arginindepletion unter Canavaninbehandlung hat im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation keinen signifikanten Anstieg der p62-Expression zur Folge ($p > 0,05$). Im Laufe des Experimentes steigt die Expression von p62 in allen Bedingungen leicht an (Abbildung 9B).

5.3.2. Inhibierung der *late-stage*-Autophagie

Es konnte gezeigt werden, dass die Autophagie unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion abnimmt. Nun stellte sich die Frage, ob eine zusätzliche Hemmung der Autophagie zu einer Erhöhung des Zelltodes in dieser Bedingung führt. Um diese Frage zu untersuchen, wurden die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 mit den folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 50 μ M Chloroquin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 50 μ M Chloroquin

Anschließend wurde mithilfe von Propidiumiodid die Anzahl toter Zellen in den jeweiligen Bedingungen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 10).

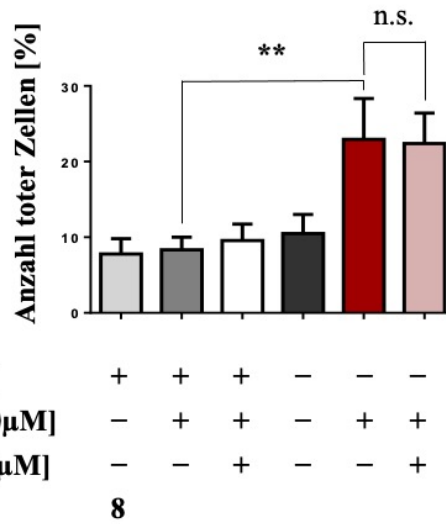


Abbildung 10) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Chloroquin (Chloro), -Arg, -Arg/+Can/+Chloro für je 8 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentualen toten Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (** p < 0,01, n.s.: p > 0,05).

In der Abbildung 10 sieht man die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den Auswertungen von 3 FACS-Messungen. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der toten Myelomzellen. In der Abbildung 10 ist zu erkennen, dass der Zelltod in der Bedingung -Arg/+Can im Vergleich zu der Bedingung +Arg/+Can signifikant ansteigt (p < 0,01). Durch eine zusätzliche Autophagieinhibierung mit Chloroquin unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can/+Chloro) konnte durchflusszytometrisch, im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can), kein signifikanter Anstieg der toten Zellen festgestellt werden (p > 0,05). Auch bei Argininsuffizienz (+Arg/ +Can) führte die zusätzliche Gabe von Chloroquin (+Arg/+Can/+Chloro) nicht zu einem Anstieg der Anzahl toter Zellen (p > 0,05).

In einem weiteren Schritt sollte nun die Caspase 3 und die *cleaved* Caspase 3 bei zusätzlicher Autophagieinhibierung beurteilt werden. Dafür wurden die NCI-A2 in den folgenden Bedingungen für 4 und 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 50 µM Chloroquin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin + 50 µM Chloroquin

- - Arginin
- - Arg + 50 μ M Chloroquin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 50 μ M Chloroquin

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot detektiert. Es wurden Antikörper gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH verwendet (Abbildung 11).

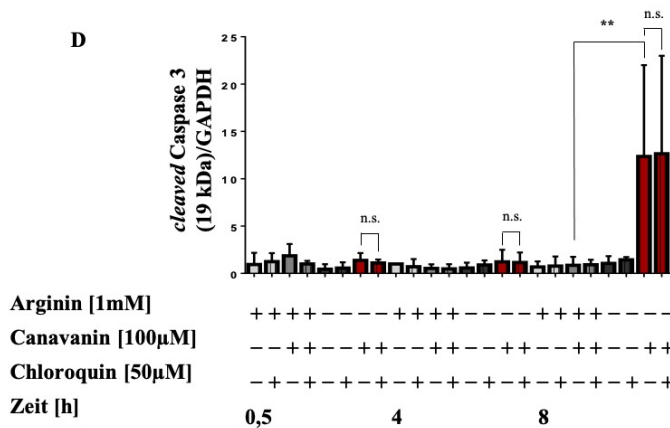
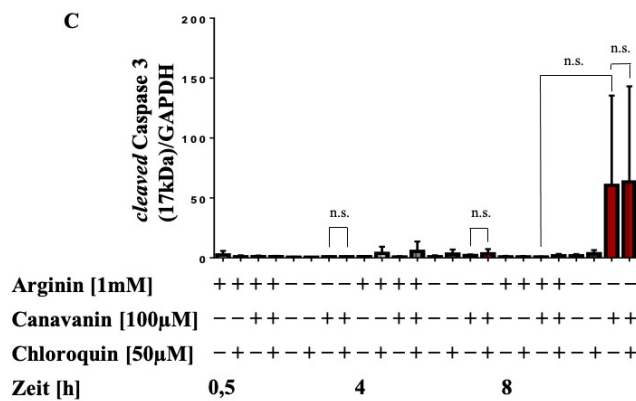
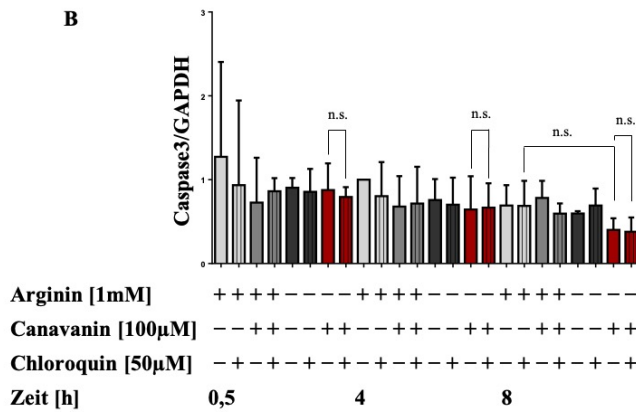
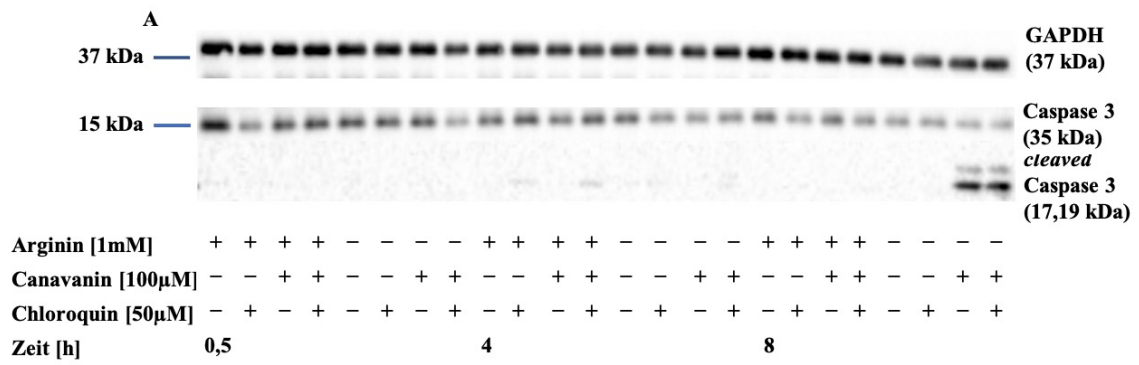


Abbildung 11) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Chloroquin: Caspase 3- und *cleaved* Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arg, +Arg/+Chloroquin (Chloro), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Chloro, -Arg, -Arg/+Chloro, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Chloro für je 4 h und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen Caspase 3- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: $p > 0,05$). (C) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (17 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: $p > 0,05$). (D) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (19 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (** $p < 0,01$, n.s.: $p > 0,05$). Als Bezugswert für die Auswertung der 3 Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 4h Inkubation gewählt.

In Abbildung 11A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH gezeigt. In Abbildung 11B sieht man die Mittelwerte der Caspase 3-Expression, normiert auf die GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von 3 Western Blots. In Abbildung 11C bzw. 11D sieht man die Mittelwerte der Expressionsstärken von *cleaved* Caspase 3 (17 kDa bzw. 19 kDa), jeweils normiert auf die GAPDH-Expression. In Abbildung 11A ist auf dem repräsentativen Western Blot zu sehen, dass sich die Expression der Caspase 3 zur GAPDH in den unterschiedlichen Bedingungen kaum verändert. Dies bestätigt sich auch in der quantitativen densitometrischen Auswertung (Abbildung 11B). Die relative Expression der Caspase 3 zur GAPDH ist innerhalb der einzelnen Zeitpunkte nicht signifikant verändert ($p > 0,05$). In Abbildung 11D sieht man, dass die *cleaved* Caspase 3-Expression unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can) nach 8 h im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation (+Arg/+Can) erhöht ist ($p < 0,01$). Dies wurde in den vorherigen Experimenten bereits gezeigt (Abbildung 6). Bei der zusätzlichen Gabe von Chloroquin (-Arg/+Can/+Chloro) zur -Arg/+Can Bedingung zeigte sich keine zusätzliche, signifikante Erhöhung der relativen Proteinexpressionen der *cleaved* Caspase: Weder die *cleaved* Caspase 3 bei 17kDa (Abbildung 11C; $p > 0,05$), noch die *cleaved* Caspase 3 bei 19kDa (Abbildung 11D; $p > 0,05$) ist stärker exprimiert. Eine Kombinationsbehandlung aus Chloroquin, Canavanin und Arginindepletion führte nicht zu einer vermehrten Aktivierung der Caspase 3. Die Inhibierung der Autophagie mit Chloroquin zeigt weder unter Arginindepletion noch bei Argininsuffizienz, eine Erhöhung der Caspase 3-vermittelten Zytotoxizität der Canavaninbehandlung.

Um auszuschließen, dass auch andere Inhibitoren der späten Phase der Autophagie nicht zu einem erhöhten Zelltod führen, wurden die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 inkubiert. Bafilomycin A1 verhindert über eine

Hemmung des Wasserstoffionentransports die Ansäuerung des Lysosoms. Dadurch inhibiert es die autophagische Degradierung des lysosomalen Inhalts und ist somit ein Inhibitor später Schritte der Autophagie (71). Die Zellen wurden in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin + 100 nM Bafilomycin A1
- - Arginin
- - Arginin + 100 µM Canavanin
- - Arginin + 100 µM Canavanin + 100 nM Bafilomycin A1

Anschließend wurden mithilfe des Farbstoffes Propidiumiodid die prozentuale Anzahl der toten Zellen der Zelllinie NCI-A2 durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 12).

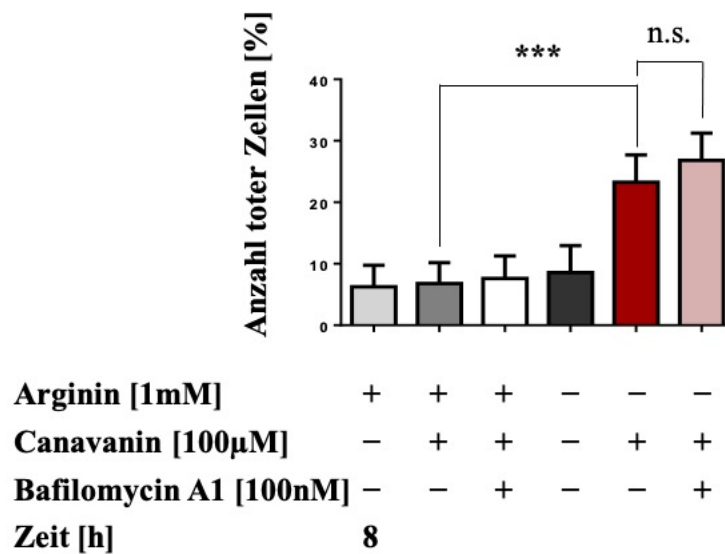


Abbildung 12) Zusätzliche Hemmung der späten Autophagie durch Bafilomycin A1: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Bafilomycin A1 (Bafi), -Arg, -Arg/+Bafi, -Arg/+Can/+Bafi für je 8 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual toten Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (***) $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$).

In der Abbildung 12 sind die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den Auswertungen von 4 FACS-Messungen dargestellt. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der toten Myelomzellen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. In

Abbildung 12 ist zu sehen, dass die Canavaninsupplementation nur unter Arginindepletion (-Arg/+Can) zu einer Erhöhung der Anzahl der toten Zellen führt ($p < 0,001$). Die Zugabe des Autophagieinhibitors Bafilomycin A1 (-Arg/+Can/+Bafi) konnte, im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung, keinen signifikanten Anstieg der Anzahl der toten Zellen bewirken ($p > 0,05$).

5.3.3. Inhibierung der Autophagieinduktion

In einem nächsten Schritt sollte die Hemmung der Autophagieinduktion untersucht werden. Wortmannin hemmt über die Inhibierung der PI3-Kinase die Autophagieinduktion: Es ist ein Inhibitor der frühen Phase der Autophagie (69). Dafür wurden die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 mit Wortmannin in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 5 μ M Wortmannin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 5 μ M Wortmannin

Anschließend wurde mithilfe von Propidiumiodid die prozentuale Anzahl der toten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 13).

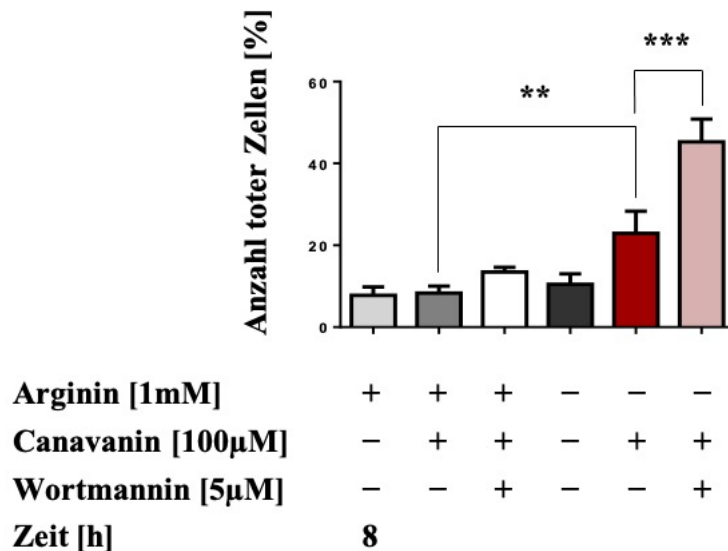


Abbildung 13) Zusätzliche Hemmung der frühen Autophagie durch Wortmannin: Auswirkung auf die Zellviabilität der NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Wortmannin (Wn), -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Wn für je 8 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual toten Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (** < 0,01, *** p < 0,001).

In der Abbildung 13 sieht man die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den Auswertungen von 3 unabhängigen Experimenten bzw. FACS-Messungen. Auf der y-Achse ist die prozentuale Anzahl der toten Myelomzellen aufgetragen. In Abbildung 13 sieht man, dass die Bedingung -Arg/+Can im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation (+Arg/+Can) zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl toter Zellen nach 8 h führt (p < 0,01). Die zusätzliche Gabe von Wortmannin (-Arg/+Can/+Wn) zu den mit Canavanin und Arginindepletion (-Arg/+Can) behandelten NCI-A2 Myelomzellen führte zu einer signifikanten starken Zunahme des Zelltodes (p < 0,001). Die Anzahl der toten Zellen stieg in dieser Bedingung nach 8 h auf 45,3% ± 4,5%. Bei Argininsuffizienz dagegen erhöhte sich, durch die zusätzliche Gabe von Wortmannin (+Arg/+Can/+Wn), im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation (+Arg/+Can) die Anzahl der toten Zellen nicht (p > 0,05). Es besteht somit ein Wirksynergismus zwischen Wortmannin und Canavanin bei zusätzlicher Arginindepletion.

Ob die signifikante Erhöhung der Anzahl der toten Zellen mit einer erhöhten Aktivierung des programmierten Zelltodes und einer Aktivierung der Caspase 3 korreliert, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden. Dazu wurden die NCI-A2 Myelomzellen in den

Bedingungen, wie in 5.3.3. beschrieben, für 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot angefertigt. Im Western Blot wurde die Caspase 3 und die *cleaved* Caspase 3 detektiert. Als Ladekontrolle wurde die GAPDH verwendet (Abbildung 14).

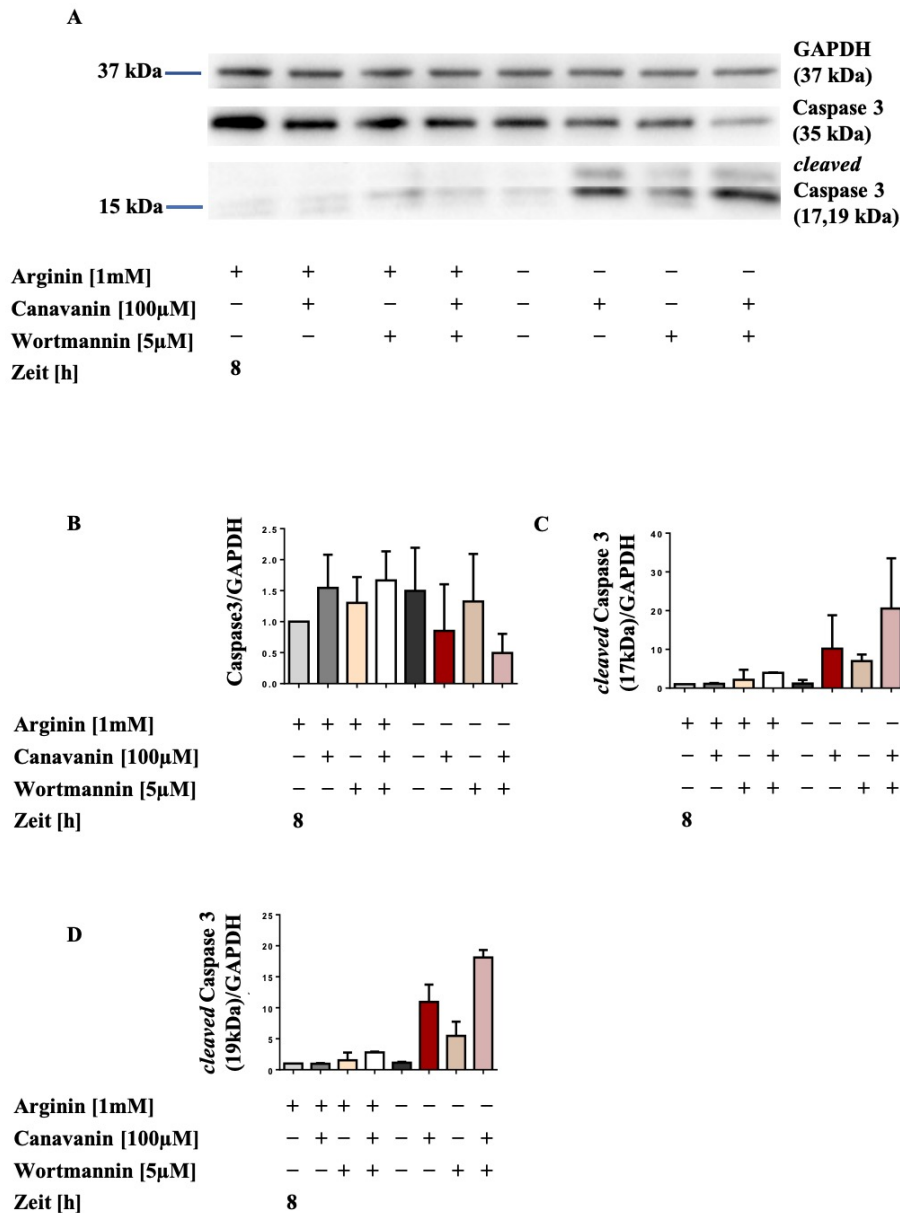


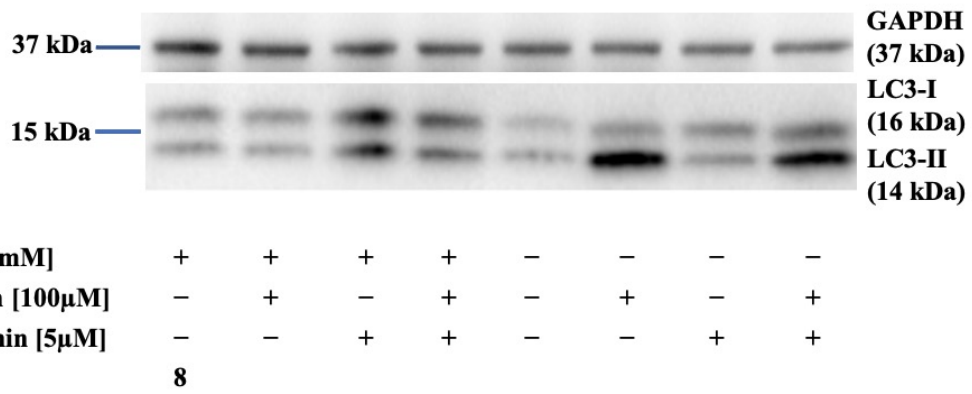
Abbildung 14) Hemmung der frühen Autophagie durch Wortmannin: Caspase 3- und *cleaved* Caspase 3-Nachweis in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Wortmannin (Wn) +Arg/+Can/+Wn, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Wn, -Arg/+Can/+Wn für je 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen Caspase 3- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 2 Western Blots. (C) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (17 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 2 Western Blots. (D) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (19 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 2 Western Blots.

In Abbildung 14A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH gezeigt. In Abbildung 14B sieht man die Mittelwerte der Expression von Caspase 3, normiert auf die GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von 2 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. In Abbildung 14C bzw. 14D sind die Mittelwerte der relativen Expressionen der 17 kDa bzw. 19 kDa Form der *cleaved* Caspase 3, normiert auf die GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern, auch als Ergebnis der densitometrischen Auswertungen, dargestellt. Der Western Blot (Abbildung 14A) lässt vermuten, dass insbesondere in der Bedingung -Arg/+Can/+Wn eine Abnahme der Caspase 3-Expression stattfand. In den Bedingungen -Arg/+Can, -Arg/+Wn und -Arg/+Can/+Wn sind deutliche Banden der *cleaved* Caspase 3 bei 17 kDa und bei 19 kDa zu sehen (Abbildung 14A). In der quantitativen densitometrischen Auswertung zeigte sich, im Vergleich zur Bedingung -Arg/+Can, in der Bedingung -Arg/+Can/+Wn eine Erhöhung der relativen Proteinexpression der *cleaved* Caspase 3 bei 19 kDa. Wortmannin führt unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion zu einer Erhöhung der Apoptoseinduktion, assoziiert mit einer Aktivierung der Caspase 3.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die signifikante Erhöhung der Zytotoxizität durch Wortmannin tatsächlich auf eine Hemmung der Autophagieinduktion zurückzuführen ist. Dazu wurden die NCI-A2 Zellen, wie in 5.3.3. beschrieben, für 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und LC3-I/II wurde im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet (Abbildung 15).

A



B

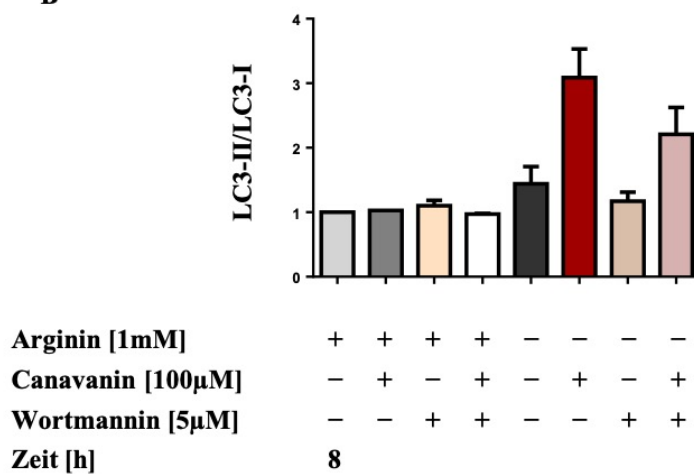


Abbildung 15) Einfluss einer PI3K-Inhibierung mittels Wortmannin auf die LC3-I/II-Expression in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Wortmannin (Wn) +Arg/+Can/+Wn, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Wn, -Arg/+Can/+Wn für je 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte des Verhältnisses von LC3-II- zu LC3-I-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 2 Western Blots.

Abbildung 15A zeigt einen repräsentativen Western Blot zum Nachweis von LC3-I/II und GAPDH. In Abbildung 15B sieht man die Mittelwerte des Verhältnisses der Expression von LC3-II zu LC3-I im Säulendiagramm mit Standardfehlern. Die Ratio von LC3-II zu LC3-II ist ein Maß für die Anzahl an Autophagosomen. Im Falle einer Inhibierung der Autophagieinduktion sollte es zu einer verminderten Anzahl an Autophagosomen kommen (101). In den Bedingungen -Arg/+Can, sowie -Arg/+Can/+Wn sieht man jeweils eine recht starke LC3-II-Expression. Dies bestätigte sich auch in der densitometrischen Auswertung in Abbildung 15B. Bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) nahm die Ratio der Expression von LC3-II zu LC3-I im Vergleich zur argininsuffizienten Bedingung (+Arg/+Can) stark zu. Im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung ist in der densitometrischen

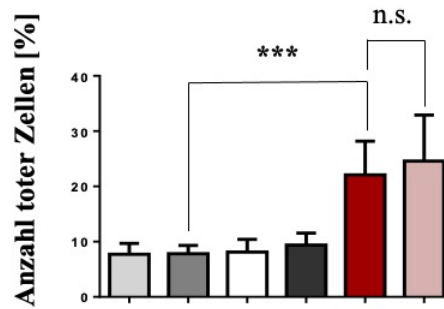
Auswertung eine Reduktion der Ratio von LC3-II zu LC3-I durch Wortmanninbehandlung (-Arg/+Can/+Wn) zu sehen. Diese Reduktion spricht dafür, dass Wortmannin in diesen Tumorzellen die frühe Phase der Autophagie hemmt.

5.3.4. Synergismustest mit Ricolinostat

Als nächstes sollte der, bereits in klinischen Studien eingesetzte, HDAC6-Inhibitor Ricolinostat auf eine mögliche Wirksynergie geprüft werden: Es sollte analysiert werden, ob Ricolinostat die Zytotoxizität der Canavaninsupplementation unter Arginindepletion erhöhen kann. Bevor fehlgefaltete Proteine degradiert werden, bilden sie häufig Aggresomen. HDAC6 ist an der Bildung von Aggresomen beteiligt. Ricolinostat ist ein selektiver HDAC6-Inhibitor (102). Die Myelomzellen, der Zelllinie NCI-A2 wurden in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin + 3 µM Ricolinostat
- - Arginin
- - Arginin + 100 µM Canavanin
- - Arginin + 100 µM Canavanin + 3 µM Ricolinostat

Anschließend wurden die Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid gefärbt und die Anzahl der toten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 16).



Arginin [1mM]	+	+	+	-	-	-
Canavanin [100µM]	-	+	+	-	+	+
Ricolinostat [3µM]	-	-	+	-	-	+
Zeit [h]	8					

Abbildung 16) Zusätzliche Hemmung der Aggresomenbildung: Auswirkung von Ricolinostat auf die Zellviabilität der NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), + Arg/+Can/+Ricolinostat (Rico), -Arg, -Arg/+Can, - Arg/+Can/+Rico für je 8h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual toten Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (** $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$).

5.4. ER-Stress als potenzieller Zytotoxizitäts- oder Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation

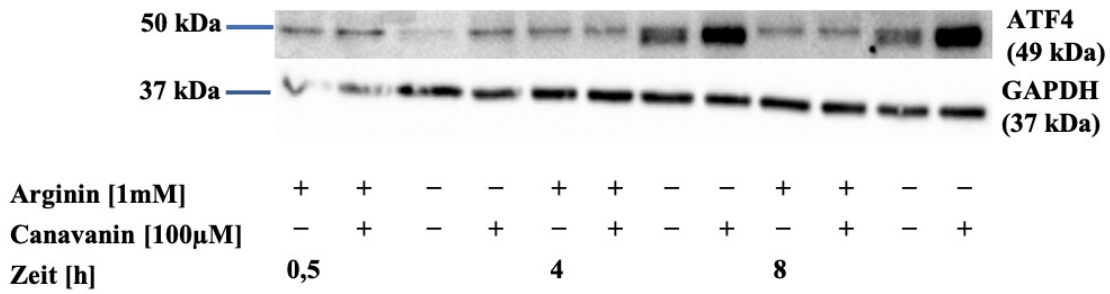
5.4.1. Induktion der UPR

In einem nächsten Schritt sollte ATF4, ein wichtiges UPR Signalmolekül, untersucht werden. Die Myelomzellen NCI-A2 wurden in folgenden Bedingungen für 0,5, 4 und 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 µM Canavanin

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und es wurde ein Western Blot angefertigt. Es wurden Antikörper gegen ATF4 und GAPDH verwendet (Abbildung 17).

A



B

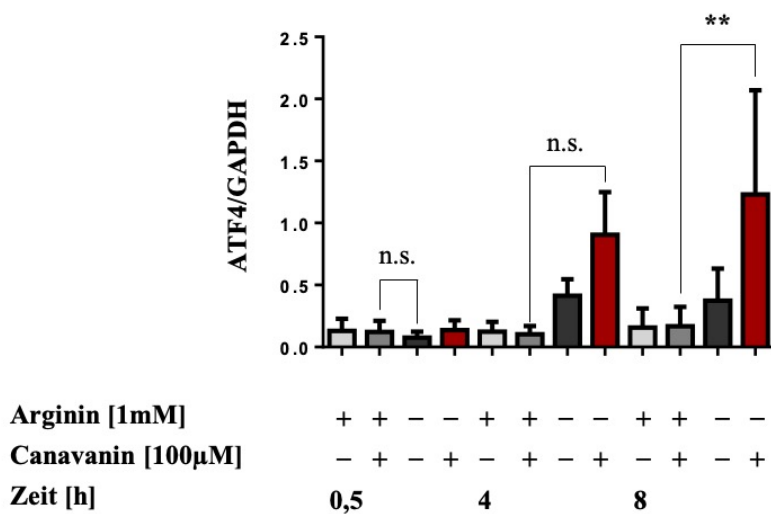


Abbildung 17) ATF4-Expression in den NCI-A2 Zellen

Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen ATF4 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der ATF4-Expression, normiert auf die GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (** $p < 0,01$, n.s.: $p > 0,05$).

Abbildung 17A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen ATF4 und GAPDH. In der Abbildung 17B sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. Auf der y-Achse ist die Proteinexpression von ATF4, normiert auf die GAPDH-Expression, aufgetragen. Insbesondere unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can) ist eine starke Expression des ATF4 nach 4 h und 8 h in dem Western Blot (Abbildung 17A) zu sehen. Im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation (+Arg/+Can) konnte in der densitometrischen Auswertung durch den zusätzlichen Argininentzug (-Arg/+Can) ein signifikanter Anstieg der ATF4-Expression nach 8 h nachgewiesen werden ($p < 0,001$), während diese verstärkte Expression nach 4 h formal noch nicht signifikant war ($p > 0,05$).

Zusammenfassend folgt, dass eine Canavaninsupplementation unter Arginindepletion zu einer verstärkten Expression des Signalmoleküls ATF4 führt.

5.4.2. ER-Stress-Induktion mit Tunicamycin

Aufgrund der nachgewiesenen UPR-Induktion bei Argininmangel und Canavaninsupplementation sollte anschließend untersucht werden, ob eine zusätzliche Erhöhung des ER-Stresses durch Applikation des UPR-Induktors Tunicamycin zu einer Verstärkung des induzierten Zelltodes in der Zelllinie NCI-A2 führt. Tunicamycin führt über eine Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen zu einer Erhöhung von ER-Stress (103). Zunächst sollte daher untersucht werden, ob Tunicamycin in den NCI-A2 Zellen zu einer vermehrten Expression des UPR-assoziierten Transkriptionsfaktors ATF4 führt. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 33 μ M Tunicamycin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 33 μ M Tunicamycin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 33 μ M Tunicamycin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 33 μ M Tunicamycin

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot erstellt. Es wurden Antikörper gegen ATF4 und GAPDH verwendet (Abbildung 18).

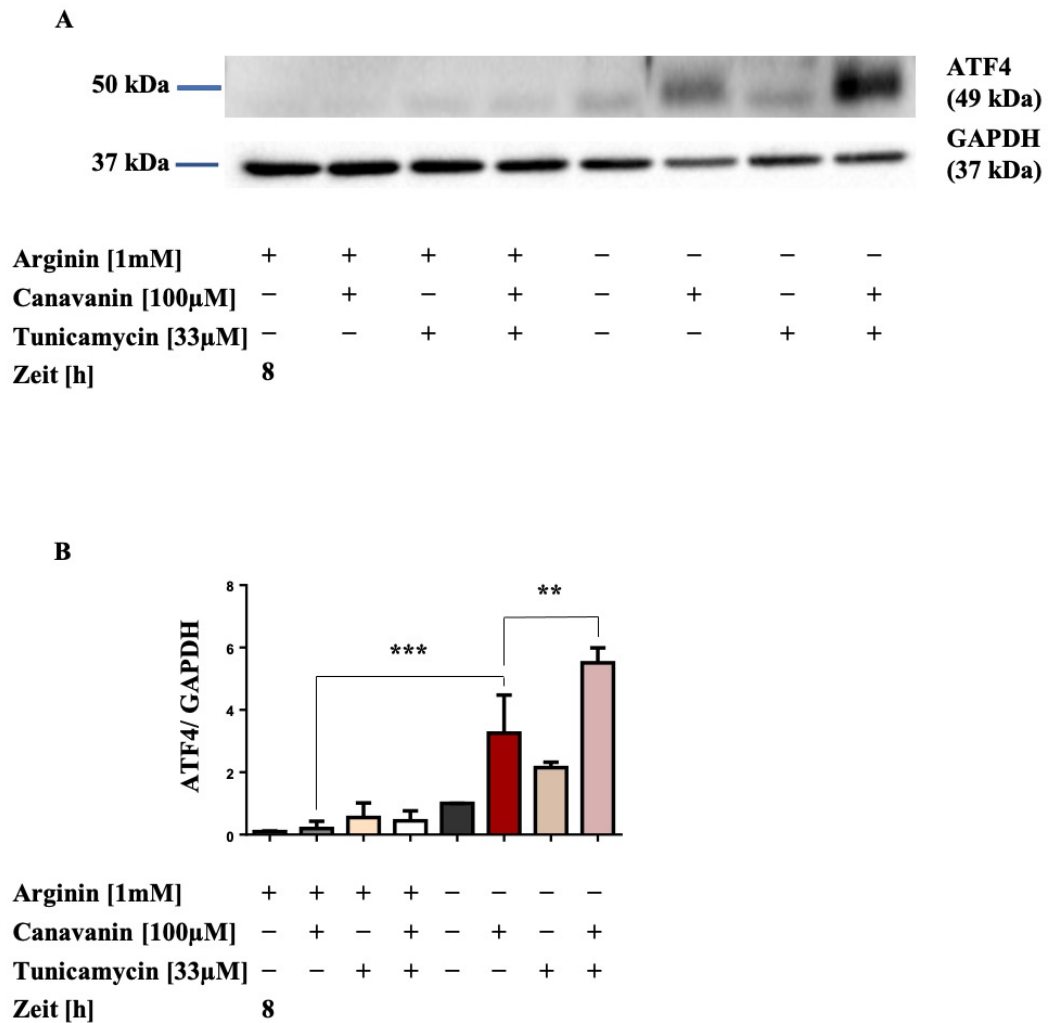


Abbildung 18) Zusätzliche UPR-Induktion mit Tunicamycin: ATF4-Nachweis in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Tunicamycin (Tunica), +Arg/+Can/+Tunica, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Tunica, -Arg/+Can/+Tunica für je 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen ATF4 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen ATF4- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 3 Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Als Bezugswert für die Auswertung des Graphen wurde die Bedingung -Arg nach 8 h Inkubation gewählt.

Abbildung 18A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit dem ATF4 Antikörper. In Abbildung 18B ist die quantitative densitometrische Auswertung der relativen ATF4 zur GAPDH-Expression aus 3 Western Blots dargestellt. Wie man in dem Western Blot (Abbildung 18A) erkennen kann, ist die stärkste Bande des ATF4 Antikörpers bei der -Arg/+Can/+Tunica Bedingung zu sehen. Wie bereits gezeigt, kam es auch in diesem Versuch unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can) im Vergleich zur Kontrolle (+Arg/+Can) zu einer signifikant erhöhten relativen ATF4- zu GAPDH-Expression ($p < 0,001$). Bei der -Arg/+Can/+Tunica Bedingung konnte ein zusätzlicher signifikanter Anstieg der ATF4- zu GAPDH-Proteinexpression im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung gezeigt werden ($p <$

0,01). Die Ko-Applikation von Tunicamycin zu Canavanin unter Arginindepletion führt daher offenbar in der Tat zu einer UPR-Verstärkung.

Nun sollte untersucht werden, welchen Einfluss die zusätzliche Applikation des UPR-Induktors Tunicamycin bzw. einer verstärkten UPR auf die Zytotoxizität der verschiedenen Argininmangelbedingungen in der Zelllinie NCI-A2 hat. Hierfür wurden die Zellen in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 µM Canavanin + 33 µM Tunicamycin
- - Arginin
- - Arginin + 100 µM Canavanin
- - Arginin + 100 µM Canavanin + 33 µM Tunicamycin

Anschließend wurde die prozentuale Anzahl toter Zellen durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodidfärbung bestimmt (Abbildung 19).

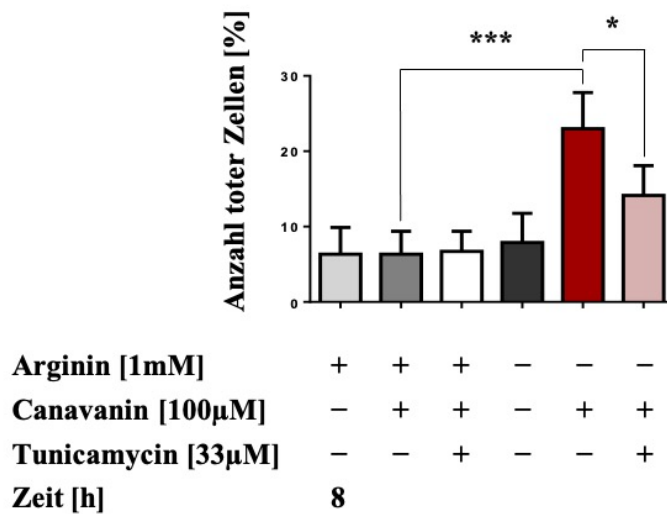


Abbildung 19) Zusätzliche UPR- Induktion: Auswirkung von Tunicamycin auf die Zellviabilität in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Tunicamycin (Tunica) - Arg, - Arg/+Can, -Arg/+Can/+Tunica für je 8 h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der prozentual toten Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (* p < 0,05, *** p < 0,001).

In Abbildung 19 sind die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den Auswertungen von 4 unabhängigen Experimenten bzw. FACS-Messungen dargestellt. In der Abbildung 19 lässt sich erkennen, dass die Bedingung -Arg/+Can, wie bereits in den vorherigen FACS-Messungen gezeigt, zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl toter Zellen führte. Bei zusätzlicher Behandlung mit Tunicamycin unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can/+Tunica, 14,1% ± 3,4%) war die Anzahl toter Zellen im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can, 22,9% ± 4,2%) signifikant niedriger ($p < 0,05$), während Tunicamycin keinen Einfluss auf die basale Rate an Zelltod bei allen anderen Bedingungen hatte.

Ob die signifikante Erniedrigung der Anzahl der toten Zellen bei Ko-Applikation des UPR-Induktors Tunicamycin auf eine verminderte Aktivierung des programmierten Zelltodes zurückzuführen ist, sollte mithilfe der Untersuchung der Caspase 3-Spaltung geklärt werden. Dafür wurden die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 den Bedingungen, wie in 5.4.2. beschrieben, für 8 h inkubiert. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und es wurde ein Western Blot angefertigt. Es wurden Antikörper gegen Caspase 3, gegen *cleaved* Caspase 3 und gegen GAPDH verwendet (Abbildung 20).

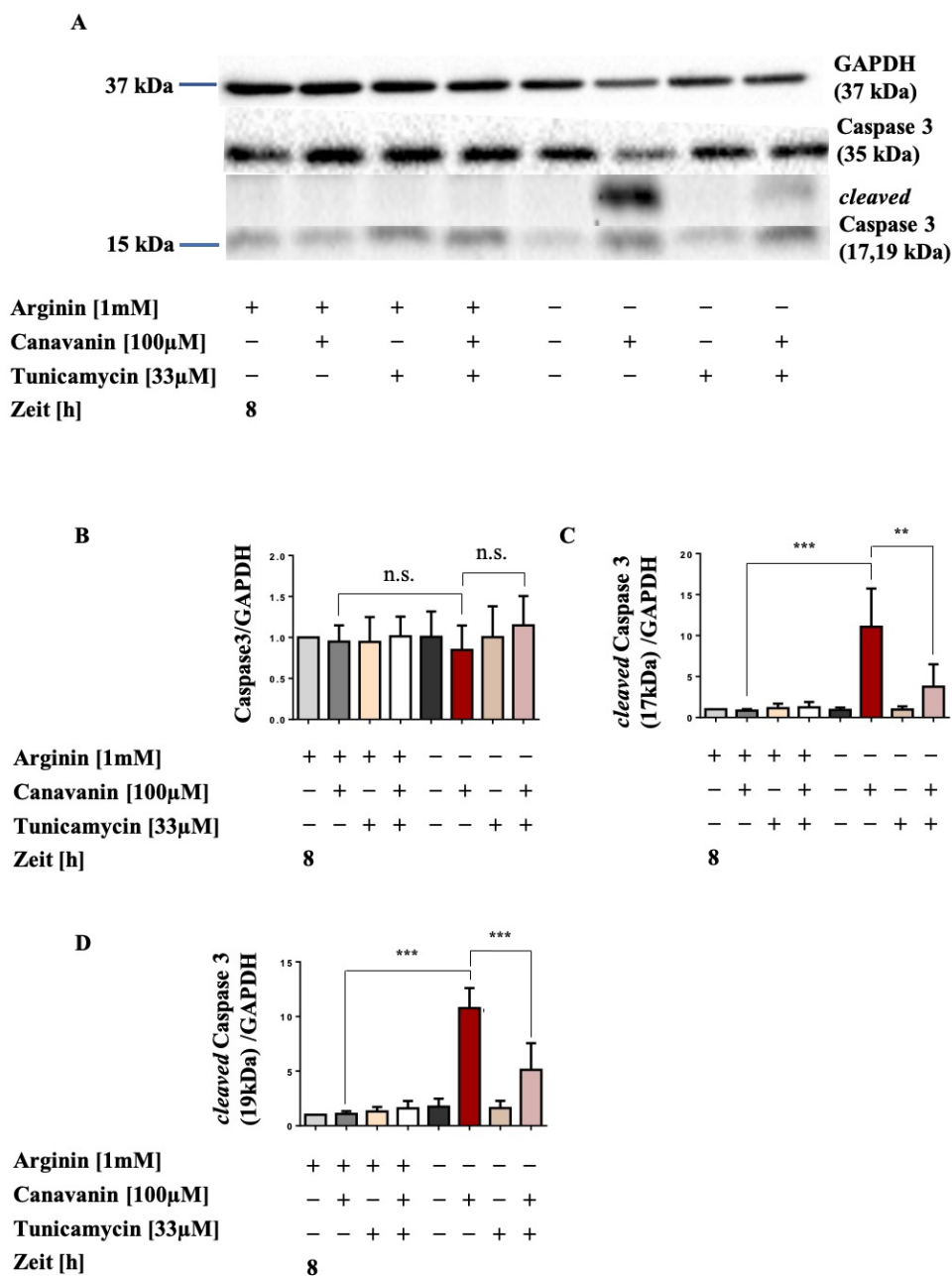


Abbildung 20) Induktion der UPR durch Tunicamycin: Reduktion der Caspase 3-Spaltung in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), + Arg/+Tunicamycin (Tunica), + Arg/+Can/+Tunica, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Tunica, -Arg/+Can/+Tunica für je 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen Caspase 3- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 3 Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (n.s.: $p > 0,05$) (C) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (17 kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 3 Western Blots dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (D) Darstellung der Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (19kDa) zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 3 Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (***) $p < 0,001$). Als Bezugswert für die Auswertung der 3 Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 8 h Inkubation gewählt.

In Abbildung 20A ist ein repräsentativer Western Blot mit Antikörpern gegen Caspase 3, *cleaved* Caspase 3 und GAPDH gezeigt. In Abbildung 20B sieht man die Mittelwerte der Caspase 3-Expressionen, jeweils normiert auf die GAPDH-Expressionen im Säulendiagramm mit Standardfehlern, als Ergebnis aus den densitometrischen Auswertungen von 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots. In Abbildung 20C bzw. 20D sieht man die Mittelwerte der relativen *cleaved* Caspase 3- (17 kDa bzw. 19 kDa), normiert auf die jeweiligen GAPDH-Expressionsstärken im Säulendiagramm mit Standardfehler, auch als Ergebnis von den densitometrischen Auswertungen von 3 Western Blots. In Abbildung 20A ist zu sehen, dass die Caspase 3 in allen Bedingungen etwa gleich exprimiert ist. Dies bestätigte sich auch in der quantitativen densitometrischen Auswertung (Abbildung 20B). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen ($p > 0,05$). Die Banden der *cleaved* Caspase bei 17 kDa und bei 19 kDa erscheinen im Western Blot bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) deutlich stärker als in den anderen Bedingungen (Abbildung 20A). Im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation (+Arg/+Can) hatte die Behandlung mit Canavanin unter Arginindepletion (-Arg/+Can), wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt (Abbildung 6), eine signifikante Erhöhung der *cleaved* Caspase 3 bei 17 kDa und 19 kDa ($p < 0,001$) zur Folge. Im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung sieht man im Western Blot bei der *cleaved* Caspase 3 bei 17 kDa und bei 19 kDa in der -Can/+Arg/+Tunica Bedingung deutlich schwächere Banden. Dies bestätigte sich auch, wie in Abbildung 20C und 20D zu sehen, in der densitometrischen Auswertung: Die relativen Proteinexpressionen der *cleaved* Caspase 3 bei 17 kDa und 19 kDa, jeweils normiert auf die GAPDH, nahmen signifikant ab im Vergleich zu den Bedingungen ohne Tunicamycin ($p < 0,01$, $p < 0,001$). Eine zusätzliche Gabe von Tunicamycin hat bei Canavaninsupplementation und Arginindepletion eine verminderte Aktivierung der Caspase 3 zur Folge. Diese Befunde korrelieren mit einer reduzierten Induktion von induziertem Zelltod bei Tunicamycin-Applikation unter Argininmangel und Canavaninzugabe.

Jetzt sollte untersucht werden, ob eine Veränderung der Autophagie, einen möglichen Erklärungsansatz für den Überlebensvorteil der Myelomzellen durch die zusätzliche Tunicamycinbehandlung darstellt. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen der Zelllinie NCI-A2 den Bedingungen, wie in 5.4.2. beschrieben, für 8 h inkubiert. Anschließend wurden

die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und es wurde ein Western Blot angefertigt. Es wurden Antikörper gegen LC3-I/II und GAPDH verwendet (Abbildung 21).

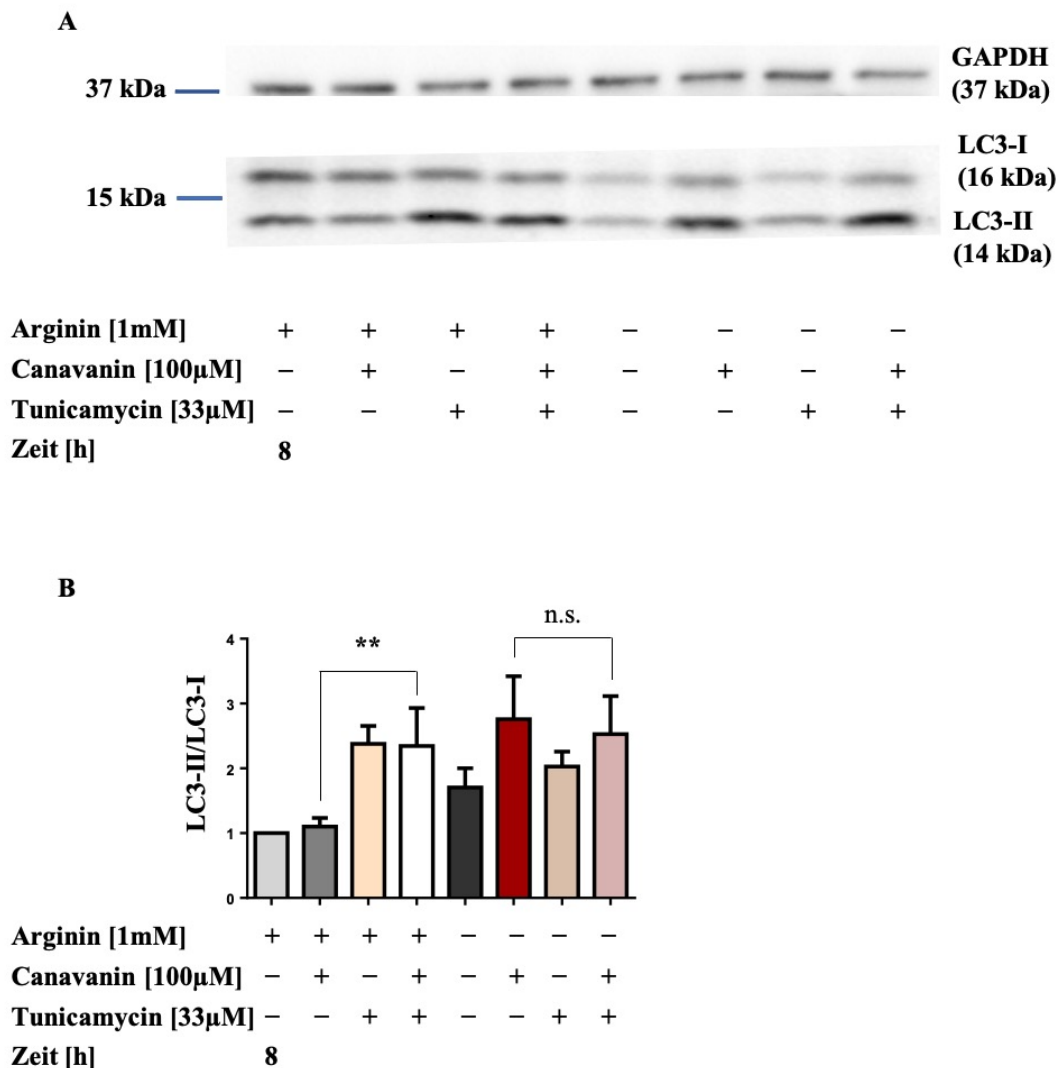


Abbildung 21) Zusätzliche UPR- Induktion mit Tunicamycin: LC3-I/II-Nachweis in den NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+Tunica, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Can/+Tunica für je 0,5, 4 und 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen LC3-I/II und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen LC3-II- zu LC3-I-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 5 Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (** $p > 0,01$, n.s.: $p > 0,05$). Als Bezugswert für die Auswertung des Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 8h Inkubation gewählt.

In der Abbildung 21A ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt. In Abbildung 21B ist die quantitative densitometrische Auswertung der relativen LC3-II- zu LC3-I-Proteinexpression aus 5 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. In dem Western Blot in Abbildung 21A ist zu sehen, dass die zusätzliche Behandlung mit Tunicamycin unter Canavaninsupplementation (+Arg/+Can/+Tunica) bei Argininsuffizienz eine signifikante Erhöhung der LC3-II- zu LC3-I-Ratio im Vergleich zur alleinigen Canavaninsupplementation

(+Arg/+Can) zur Folge hatte ($p < 0,01$). Bei Argininsuffizienz führt die Behandlung mit Tunicamycin zu einer signifikanten Erhöhung der Autophagosomen in der Zelle. Im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung kam es bei zusätzlicher Applikation von Tunicamycin hingegen nicht zu einer Veränderung der LC3-II- zu I-Ratio ($p > 0,05$).

In einem nächsten Schritt sollte die selektive Makroautophagie mithilfe der BAG3-Expression untersucht werden. BAG3 ist ein Mediator der selektiven Makroautophagie (57). Unter akutem Stress ist BAG3 am Transport von zur Aggregation neigenden Proteinen zu den Autophagosomen beteiligt (104). Es korreliert in einigen Systemen mit der Aktivierung von Proteindegradierungssystemen. Eine erhöhte Expression von BAG3 steht für einen erhöhten Anfall an ubiquitinierten Proteinen in der Zelle (105). Die Zellen wurden in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 33 μ M Tunicamycin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 33 μ M Tunicamycin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 33 μ M Tunicamycin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 33 μ M Tunicamycin

Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot hergestellt. Es wurden Antikörper gegen BAG3 und GAPDH verwendet (Abbildung 22).

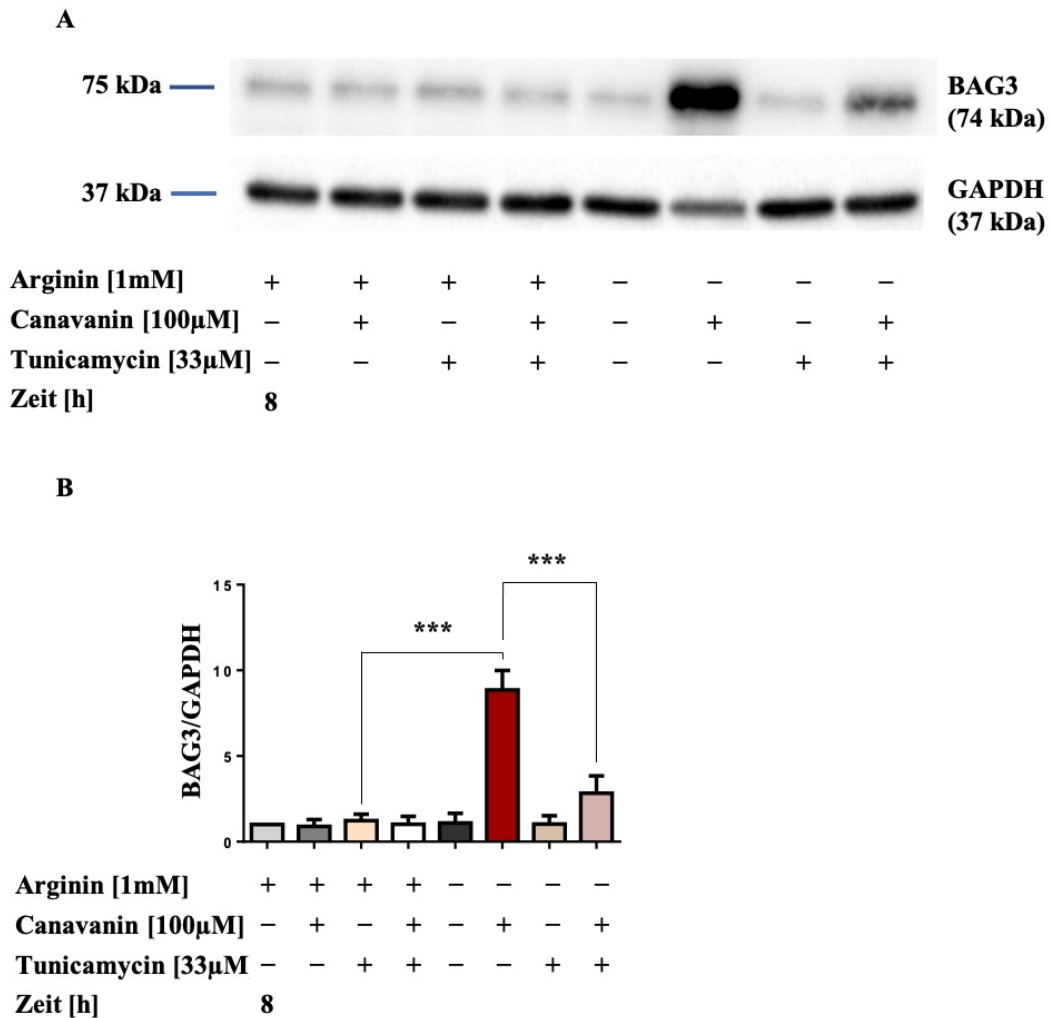


Abbildung 22) Zusätzliche UPR-Induktion mit Tunicamycin: BAG3-Nachweis in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Tunicamycin (Tunica), +Arg/+Can/+Tunica, -Arg, -Arg/+Can, -Arg/+Tunica, -Arg/+Can/+Tunica für je 8 h inkubiert. Es wurde ein Western Blot angefertigt. (A) Repräsentativer Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen BAG3 und GAPDH. (B) Darstellung der Mittelwerte der relativen BAG3- zu GAPDH-Expression im Säulendiagramm mit Standardfehler aus 3 Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (** $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$). Als Bezugswert für die Auswertung der Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 8 h Inkubation gewählt.

Abbildung 22A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit den monoklonalen BAG3 und GAPDH Antikörpern. In der Abbildung 22B sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. Western Blots dargestellt. Auf der y-Achse ist die relative Proteinexpression von BAG3 zu GAPDH aufgetragen. Die BAG3-Expression war, wie im Western Blot (Abbildung 22A) zu sehen, unter Arginindepletion und Canavaninsupplementation (-Arg/+Can) am stärksten. Im Vergleich zur +Arg/+Can Bedingung zeigte sich in der -Arg/+Can Bedingung eine signifikante Erhöhung der BAG3- Expression ($p < 0,001$). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Tunicamycin unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can/+Tunica) führte im Vergleich

zur alleinigen Canavaninsupplementation und Arginindepletion (-Arg/+Can) zu einer signifikanten Erniedrigung der BAG3-Proteinexpression ($p < 0,001$).

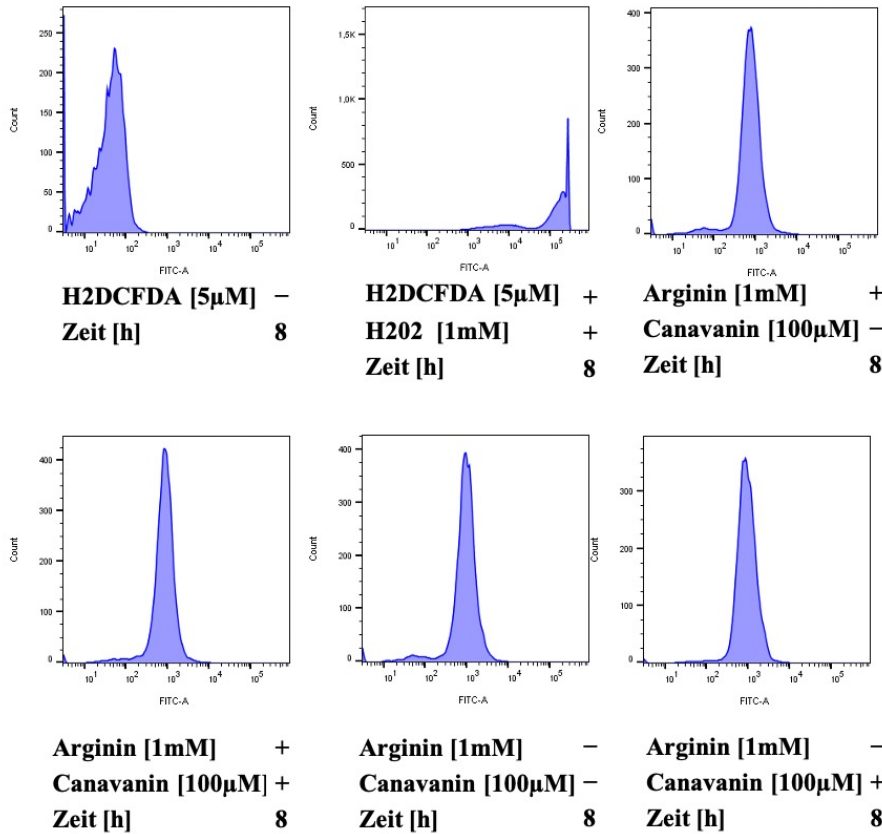
5.5. ROS-Entstehung als potenzieller Zytotoxizitäts-/ Überlebensmechanismus unter Canavaninsupplementation

Im Falle eines vermehrten intrazellulären Anfalls von fehlgefalteten Proteinen kann es zur verstärkten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen, die den Zelltod einleiten können (106). Daher sollte abschließend untersucht werden, ob es durch die Supplementation von Canavanin unter Arginindepletion zu einer vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt. Die Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 wurden in folgenden Bedingungen für 4 und 8 h inkubiert:

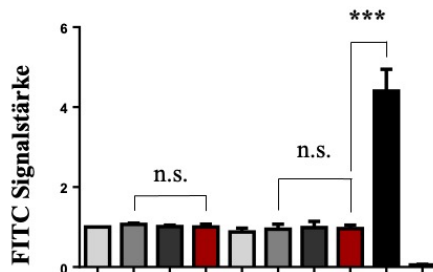
- + 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 1mM H₂O₂

Anschließend wurden die Zellen mit dem Farbstoff H₂DCFDA gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo. Die NCI-A2 Zellpopulation wurde eingegrenzt. Anschließend konnte die FITC-Signalstärke als Ausdruck der abgelaufenen ROS-Synthese im Histogramm dargestellt werden (Abbildung 23).

A



B



Arginin [1mM]	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Canavanin [100µM]	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
H ₂ O ₂ [1mM]	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H ₂ DCFDA [5µM]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Zeit [h]	4					8				

Abbildung 23) ROS-Messung in den NCI-A2 Zellen

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), -Arg, -Arg/+Can für je 4 und 8 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde H₂O₂ genutzt. Zur Anfärbung der Zellen wurde H₂DCFDA verwendet. Eine Bedingung wurde ungefärbt gemessen. (A) Beispielhafte Darstellung der Auswertung nach 8 h mithilfe von FlowJo. Es erfolgte die Eingrenzung der NCI-A2 Zellpopulation. Anschließend erfolgte eine Darstellung der FITC-Signalstärke in einem Histogramm. (B) Darstellung der Mittelwerte des FITC-Signals (*Mean*) im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. FACS-Messungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way ANOVA* (***p* < 0,001, n.s.: *p* > 0,05). Als Bezugswert für die Auswertung des Graphen wurde die Bedingung +Arg nach 4h Inkubation gewählt.

In Abbildung 23A ist eine Darstellung einer Auswertung mithilfe von FlowJo zu sehen. Es erfolgte die Eingrenzung der NCI-A2 Zellpopulation und die Darstellung der FITC-Signalstärke im Histogramm. In der Abbildung 23B sieht man die Mittelwerte der FITC-Signalstärken mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten bzw. FACS-Messungen. In der Auswertung ist zu erkennen, dass die FITC-Signalstärke in jeder Bedingung etwa gleich hoch war. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der +Arg, +Arg+Can, -Arg und -Arg+Can Bedingungen ($p > 0,05$). Die Positivkontrolle mit H_2O_2 (+Arg/+ H_2O_2) führte zu einer signifikanten Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies ($p < 0,001$) im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung. Canavaninsupplementation unter Arginindepletion (-Arg/+Can) hat dagegen keine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge ($p > 0,05$).

5.5.1. Synergismustest mit N-Acetylcystein

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die Zugabe eines Antioxidans zu einer Erhöhung der Zytotoxizität bzw. zu einem Überlebensvorteil der Zellen führt. Als Antioxidans wurde das N-Acetylcystein genutzt. Dazu wurden die NCI-A2 in folgenden Bedingungen für 8 h inkubiert:

- 1mM Arginin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin
- + 1mM Arginin + 100 μ M Canavanin + 6 mM N-Acetylcystein
- - Arginin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin
- - Arginin + 100 μ M Canavanin + 6 mM N-Acetylcystein

Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und die Anzahl toter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 24).

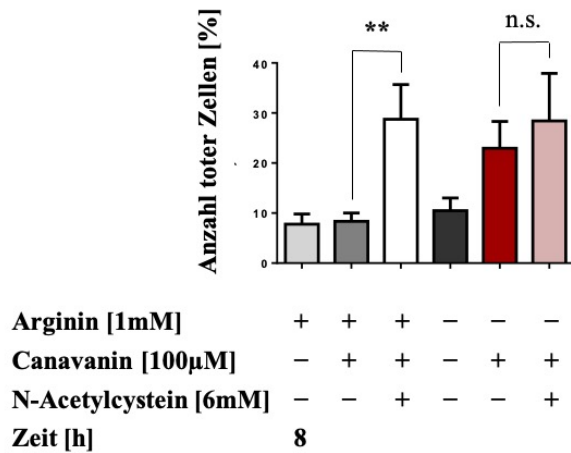


Abbildung 24) Zusätzliche Gabe eines Antioxidans: Auswirkung von N-Acetylcystein auf die Zellviabilität der NCI-A2

Die Zellen wurden in +Arginin (Arg), +Arg/+Canavanin (Can), +Arg/+Can/+N-Acetylcystein (NAC), -Arg, -Arg/+Can, - Arg/+Can/+NAC für je 8h inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentual toten Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardfehlern in %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *ordinary one-way* ANOVA (** p < 0,01, n.s.: p > 0,05).

In Abbildung 24 sind die Mittelwerte im Säulendiagramm mit Standardfehlern aus den Auswertungen von 3 unabhängigen Experimenten bzw. FACS-Messungen gezeigt. Auf der y-Achse ist die prozentuale Anzahl der toten Myelomzellen aufgetragen. Eine zusätzliche Gabe des Antioxidans N-Acetylcystein (+Arg/+Can/+NAC) zur Canavaninsupplementation unter Argininsuffizienz (+Arg/+Can) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Fraktion toter Zellen von $8,4\% \pm 1,7\%$ auf $28,7\% \pm 6,9\%$ ($p < 0,001$). In der -Arg/+Can/+NAC Bedingung konnte keine Erhöhung der Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung nachgewiesen werden. Das Antioxidans N-Acetylcystein hat keine weitere Erhöhung der Zytotoxizität bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion zur Folge.

6. Diskussion

6.1. Canavaninsupplementation führt unter Argininepletion zu raschem Zelltod

Trotz der Einführung vieler neuer und wirksamer Medikamente in den letzten zwei Dekaden, sowie einer dadurch erreichten Verbesserung des Gesamtüberlebens von Myelompatienten bleibt das Multiple Myelom eine Tumorerkrankung, die bis heute nicht heilbar ist (28,107). Daher bedarf es weiterhin neuer Behandlungsstrategien. Insbesondere sollten Therapiemethoden erforscht werden, welche die Tumorzellen effektiv töten, die gesunden Zellen hingegen unversehrt lassen, um Nebenwirkungen zu vermindern und das Immunsystem nicht zu kompromittieren. Da Tumorzellen häufig einen veränderten Aminosäuremetabolismus aufweisen, stellt dieser einen möglichen Angriffspunkt dar (108). Darunter auch die *De-novo*-Synthese von Arginin: Sie wird häufig von Tumorzellen deaktiviert (38). Während gesunde Körperzellen Arginin aus Citrullin synthetisieren können, sind diese Tumorzellen auf eine externe Zufuhr von Arginin angewiesen (40). Die Wirksamkeit von extrazellulärem Argininzug konnte mithilfe von ADI PEG20 bereits in fortgeschrittenen malignen Melanomen in Phase 1 und Phase 3 Studien demonstriert werden (109). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass kultivierte Myelomzelllinien unter Argininzug ihre Proliferation innerhalb von 24 h einstellen (Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Auch die Therapie mit dem Argininanalogon Canavanin stellt eine vielversprechende Behandlungsoption für Tumorerkrankungen dar (11). Jang et al. konnten beispielsweise in ihren Versuchen eine starke Abnahme der Zellviabilität der humanen Jurkat-T-Zellen, einer Leukämiezelllinie, durch Canavaninsupplementation demonstrieren. Die Anzahl der toten Zellen stieg ab einer Konzentration von 1,25 mM Canavanin nach 36 h stark an (110). Eine Kombination der zwei oben genannten Therapiestrategien scheint nun sehr interessant. Die antitumorale Aktivität von Canavanin in Kombination mit einer Arginindeprivation konnte bereits in einigen *in vitro* Studien belegt werden. Kurlishuk et al. konnten in ihren 3D Spheroid-Tumormodellen von Kolorektaltumoren zeigen, dass eine Canavaningabe unter Arginindepletion zu einer starken Erhöhung von strahleninduzierter Zytotoxizität führt. In diesem Modell wurde bei gleicher Behandlung keine Kompromittierung von gesunden Kolonepithelzellen festgestellt (111). Für Leukämiezelllinien zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass Argininzug mittels dem Enzym Arginase die Zytotoxizität des Canavanins stark erhöhen kann. In gesunden Mäusen trat keine evidente Toxizität auf (112). Außerdem konnte Argininzug und eine zusätzliche Canavaninbehandlung eine starke Erhöhung der Zytotoxizität der Chemotherapiebehandlung mit Doxorubicin und Cisplatin in mehreren

Tumorzelllinien bewirken. In der Studie wurden Zelllinien des Hepatozellulären Karzinoms, des Pankreaskarzinoms, des kolorektalen Adenokarzinoms und des Zervixkarzinoms untersucht. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass der Wirksynergismus hauptsächlich auf die erhöhte Entstehungsrate an fehlgefalteten Proteinen unter Arginindepletion und Canavaninsupplementation zurückzuführen ist. Dies habe eine erhöhte Anfälligkeit der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie zur Folge (43). Die Zellen des Multiplen Myeloms sind besonders anfällig für proteotoxischen Stress (91). Es lag daher nahe, eine Behandlung mit Canavanin unter Arginindepletion präferentiell auch in Myelomzellen zu untersuchen. In der durchflusszytometrischen Untersuchung (Abbildungen 4 und 5) konnte in der Myelomzelllinie NCI-A2 nach bereits 8 h bei einer Verdreifachung des Zelltodes ein deutlicher Wirksynergismus zwischen Canavaninsupplementation und Arginindepletion gezeigt werden. Der Anteil der toten Zellen betrug bei Canavaninbehandlung unter Arginindepletion nach 24 h fast 100%. So zeigte sich in unserem Myelommodell ein vergleichbares Ergebnis zu den genannten Studien. Die Kombination aus Argininentzug und Canavaningabe stellt eine effektive, vielversprechende und zielgerichtete Behandlungsmöglichkeit in Tumorzellen dar.

6.2. Einleitung der Apoptose

Apoptose ist ein hochkomplexer Vorgang, der durch eine Aktivierung von Caspasen charakterisiert ist. Die Caspase 3 ist eine Haupteffektorcaspase, die als gemeinsame Endstrecke, sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Apoptose dient (113). Auf dem Western Blot in Abbildung 6 ist zu sehen, dass die Behandlung mit Canavanin unter Arginindepletion in Myelomzellen der Zelllinie NCI-A2 zu einer starken Induktion der Apoptose nach 4-8 h führt. Die Apoptoseinduktion erfolgt über eine Aktivierung der Caspase 3. Weder durch die alleinige Behandlung mit Canavanin bei Argininsuffizienz noch durch alleinige Arginindepletion konnte ein vermehrter Anfall der *cleaved* Caspase 3 gezeigt werden. Ähnlich sensibel wie die von uns untersuchten Myelomzellen zeigten sich die Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie A431 und die Zellen des hepatozellulären Karzinoms HepG2 in *in vitro* Versuchen bei Argininmangel und Canavaninzugabe. Nach 6-12 h zeigte sich in beiden Zelllinien eine starke Caspase-vermittelte Induktion der Apoptose (114). Ein Wirksynergismus bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion konnte auch in der Lungenkrebszelllinie A549, den Darmkrebszelllinien HCT-116 und HT29 und in der HEPG2 Zelllinie des Hepatozellulären Karzinoms nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich im Vergleich zur alleinigen Arginindepletion, eine starke Induktion der Apoptose. Die Apoptoseinduktion erfolgte auch in diesen Zelllinien Caspase-abhängig (45). In unseren

Versuchen zeigte sich durch die alleinige Behandlung mit Canavanin bei Argininsuffizienz kein vermehrter Anfall der *cleaved* Caspase 3. Um die alleinige Wirkung von Canavanin auf die NCI-A2 Zellen weiter zu beleuchten, sollten in zukünftigen Experimenten spätere Zeitpunkte und höhere Dosierungen gewählt werden. Dies könnte unter anderem wie in der Studie von Ho Jang et al. mit einer höheren Dosierung von Canavanin auf 1,25-5 mM getestet werden (110). Da in dieser Arbeit der biochemische Wirkmechanismus des Synergismus zwischen Canavaninsupplementation und Arginindepletion untersucht werden sollte, ist die von uns gewählte niedrige Canavanin-Konzentration (100 μ M) und der frühe Zeitpunkt der Analyse (8 h) aufgrund des bereits zu diesem Zeitpunkt beobachteten synergistischen zytotoxischen Effektes geeignet. Des Weiteren eignet sich dieser frühe Zeitpunkt, da nach 24 h bereits nahezu alle Zellen in der Kombinationsbehandlung tot sind (Abbildung 4). Daher sollten biochemische Mechanismen zu einem früheren Zeitpunkt analysiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Arbeit ein mit den anderen Publikationen vergleichbares Ergebnis zeigte: Canavanin führt insbesondere unter Arginindepletion zu einer frühen Induktion des Caspase 3-assoziierten Zelltodes.

6.3. Inhibierung der Autophagie

Autophagie dient dem Abbau von gealterten, nicht mehr funktionsfähigen oder beschädigten Organellen und Proteinen. Zusätzlich zum UPS leistet die Autophagie einen weiteren wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Zellhomöostase. Diese beiden Systeme zählen zu den Hauptdegradierungsmechanismen und schützen die Zellen vor den potenziell toxischen fehlgefalteten Proteinen (115). Das Überleben der Myelomzellen ist von intakten Degradierungssystemen abhängig. In den letzten 15 Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des UPS mithilfe von Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib, Carfilzomib oder Ixazomib eine effektive Therapie im Multiplen Myelom darstellt. Ein Hauptwirkmechanismus von Proteasomeninhibitoren ist die Akkumulation der für die Tumorzellen toxischen fehlgefalteten Proteine. Der daraus resultierende ER-Stress trägt zum Untergang der Tumorzelle bei (116). In Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass es bei einem vermehrten Anfall fehlgefalteter Proteine zu einer Aktivierung der Autophagie kommen kann. Riz et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Inhibierung des Proteasoms durch den Proteasomeninhibitor Carfilzomib in den Myelomzelllinien KMS-11 und KMS-34 MM über eine Akkumulation von aggregierten Substanzen zu einer zellprotektiven Autophagieinduktion führt (117). Die Zytotoxizität von Canavanin ist laut aktueller Studienlage hauptsächlich darauf

zurückzuführen, dass Canavanin Substrat der Arginyl-tRNA-Synthetase ist: Zellen bauen Canavanin in ihre Proteine ein. Die dadurch entstehenden fehlgefalteten Proteine können zum Zelltod führen (118). Unsere Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass Canavanin insbesondere unter Arginindepletion in der Zelllinie NCI-A2 zu einer Erhöhung der fehlgefalteten ubiquitinierten Proteine führt (B. Jacobi, Manuskript in Vorbereitung). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Myelomzellen ihre Degradierungssysteme aktivieren, um die unter Canavaninbehandlung und Arginindepletion entstehenden toxischen fehlgefalteten Proteine abzubauen. Aus *in vitro* und *in vivo* Versuchen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Myelomzellen bei der Behandlung mit Canavanin unter Argininmangel eine erhöhte Konversion von LC3-I zu LC3-II aufweisen (Abbildung 6, (8)). Mithilfe der Western Blot-Methode (Abbildung 6) konnte gezeigt werden, dass die Ratio von LC3-II zu LC3-I lediglich in der -Arg/+Can Bedingung in den NCI-A2 Zellen nach 4 h und nach 8 h stark zunimmt. Weder die alleinige Canavaninsupplementation noch die alleinige Arginindepletion führten zu einer Erhöhung der Autophagosomenanzahl (Abbildung 6B). Die Erhöhung der Autophagosomenanzahl tritt im Falle eines erhöhten autophagischen Flux und bei einer Hemmung der Autophagie im Endstadium auf (101). In Abbildung 7 ist zu sehen, dass die Autophagie in den NCI-A2 Zellen durch Canavaninsupplementation bei zusätzlicher Arginindepletion nach 4 h und nach 8 h inhibiert wird. Auch das Malariamedikament Dihydroartemisinin führte in Osteosarkomzellen zu einer Inhibierung der Autophagie. Dies hatte einen Untergang der Osteosarkomzellen zur Folge (119). Yang et al. konnten in den von Ihnen untersuchten KM3 Myelomzellen zeigen, dass eine Behandlung mit dem Pflanzenstoff Betulinsäure auch zu einer Inhibierung des autophagischen Fluxes mit einer Akkumulation von Autophagosomen führte. Die Behandlung mit Betulinsäure hatte eine Caspase-3-vermittelte Einleitung der Apoptose zur Folge, die zu einer Herunterregulierung von Beclin 1, und damit zu einer Inhibierung der Autophagie, führte (120). Die Hemmung des autophagischen Fluxes kann also kontextabhängig zum Zelltod führen bzw. alternativ auch eine Reaktion der Zelle auf den eintretenden Zelltod sein.

Eine weitere von uns eingesetzte Methode, um den autophagischen Prozess zu analysieren, ist die Untersuchung des p62 Adaptorproteins. Es bindet für den Abbau bestimmte Substrate und das Membranmolekül LC3 des Autophagosoms. Es wird während des autophagischen Prozesses degradiert (121). Canavaninsupplementation unter Arginindepletion führt in der Myelomzelllinie NCI-A2 nicht zu einer signifikanten veränderten Expression von p62 (Abbildung 8A/8B). Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Transkription des p62 in der Zelllinie verändert sein könnte, was zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse führen kann (122).

6.4. Gleichzeitige Autophagieinhibierung und Apoptoseinduktion

Wie bereits in den Ergebnissen diskutiert, und in Abbildung 5 zu sehen, kommt es nach 8 h in der -Arg/+Can Bedingung zu einer starken Caspase 3-Aktivierung. Nach 4 h zeigte sich bereits eine Bande der *cleaved* Caspase 3 im Western Blot. Daher ist anzunehmen, dass die Induktion der Apoptose bereits nach 4 h beginnt. Auch die Autophagie wird durch Canavaninsupplementation unter Arginindepletion nach 4 h Inkubationszeit gehemmt. Die Induktion der Apoptose und die Autophagieinhibierung scheinen also etwa zeitgleich einzusetzen. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze: Die Autophagieinhibierung kann, wie bereits beschrieben zur Einleitung der Apoptose beitragen. Alternativ ist eine Hemmung der Autophagie auch durch die Einleitung der Apoptose möglich. Young et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass bei der Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib in MEF (*mouse embryonic fibroblast*) Zellen, Autophagosomen eine Plattform bilden können, auf der eine Aktivierung von Caspasen stattfindet. Die Caspase 8 tritt hier besonders hervor (123). Der andere mögliche Erklärungsansatz ist, dass durch die Einleitung der Apoptose die Zelle alle der Regeneration dienenden Systeme, wie z.B. die Autophagie, herunterreguliert. Die Aktivierung einer Reihe von Caspasen führt zu einer Hemmung der Autophagie. Auch die Effektorcaspase 3 kann durch eine Spaltung des Autophagieinitiators Beclin 1 und von ATG (*autophagy-related genes*) Proteinen die Autophagie inhibieren (124). Dieser Mechanismus wurde, wie in der o.g. Studie, auch bei der Behandlung der Myelomzelllinie KM3 beobachtet (125). In der Myelomzelllinie RPMI8226 konnte gezeigt werden, dass Nährstoffmangel zur Caspase 3-vermittelten Apoptoseinduktion führte und dass auch hier die Apoptoseinduktion eine Inhibierung der Autophagie zur Folge hatte. Interessanterweise zeigte sich in diesen Versuchen, dass zu Beginn des Nährstoffmangels eine Hochregulation der Autophagie zu verzeichnen war (126). Es wäre also in unserem Modell interessant noch weitere Zeitpunkte zwischen 0,5 und 4 h mit der Fragestellung zu untersuchen, ob es auch hier zu einer vorläufigen Hochregulation der Autophagie kommt. In dem von uns gewählten Zeitpunkt (0,5 h nach Start der Inkubation) zeigte sich bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion keine Erhöhung der Autophagie im Vergleich zu den anderen Bedingungen (Abbildung 7). Des Weiteren sollte in zukünftigen Versuchen die Expression der Caspase 8 sowie von Beclin 1 bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion untersucht werden. Darüber hinaus könnte mithilfe eines *Knockout*--Modells, die Rolle der Autophagie in der Apoptoseregulation genauer untersucht werden.

6.5. Keine Erhöhung der Zytotoxizität durch *late-stage*-Autophagieinhibitoren

Das Spätstadium der Autophagie ist definiert als die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom und die Degradierung des Inhalts sowie die anschließende Freisetzung der Inhalte ins Zytosol. Der Autophagieinhibitor Chloroquin hemmt die Degradierung innerhalb des Autophagosoms (72). Jarauta et al. demonstrierten in ihren Versuchen mit Myelomzellen, dass Autophagie ein Überlebensmechanismus bei Proteasomeninhibierung darstellt. Sie konnten in ihren *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten eine Potenzierung des Zelltodes unter Chloroquinsupplementation bei Carfilzomibbehandlung in den Myelomzelllinien NCI-H929, U266 und MM.1S nachweisen. Die Kombinationsbehandlung zeigte im Mausmodell eine Verminderung der initialen Tumorgroße nach 30 Tagen. Die Kontrollmäuse verstarben zu diesem Zeitpunkt bereits (127). Wie in der Viabilitätsmessung in Abbildung 10 zu sehen ist, trat im Falle der Canavaninsupplementation unter Arginindepletion nach 8 h eine erhöhte Anzahl toter NCI-A2 Myelomzellen auf. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Chloroquin (-Arg/+Can/+Chloro) führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der Zytotoxizität. Die Anzahl der toten Zellen war unverändert trotz zusätzlicher Inhibierung der späten Phase der Autophagie. Auch bei Argininsuffizienz zeigte sich durch die Gabe von Chloroquin kein Effekt auf die Zellviabilität. Da es sich um einen einzigen Messzeitpunkt (8 h) handelt, sollte dieses Ergebnis kritisch betrachtet werden. Eine erneute Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt wäre sinnvoll. In unserer Arbeitsgruppe wurden entsprechende Untersuchungen mit längeren Inkubationszeiten vorgenommen. Die Zellviabilität wurde nach 0, 4, 8, 12, 18, 24 und 36 h gemessen. Auch zu späteren Zeitpunkten ergab sich in den NCI-A2 Zellen kein Viabilitätsunterschied in der -Arg/+Can Behandlung im Vergleich zur -Arg/+Can/+Chloro Behandlung. Es konnte auch hier kein Wirksynergismus durch zusätzliche Autophagieinhibierung mit Chloroquin nachgewiesen werden (J. Windschmitt, Manuskript in Vorbereitung).

Zur Prüfung der Hypothese, dass Chloroquin nicht zu einer Erhöhung der Zytotoxizität unter Canavaninsupplementation führt, wurde in einem weiterführenden Experiment die Caspase 3 untersucht. Die Effektorcaspase 3 wird in vielen hämatologischen Krebserkrankungen durch zytotoxische Agenzien aktiviert (128). Die Kombinationsbehandlung aus dem Proteasomeninhibitor Carfilzomib und dem Autophagieinhibitor Chloroquin führte in den NCI-H929, U266 und MM.1S Myelomzellen zu einer Aktivierung der Caspase 3-vermittelten Apoptose (127). In Abbildung 11A ist zu sehen, dass unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion, eine Aktivierung der Caspase 3 stattfindet. Die zusätzliche Behandlung mit Chloroquin in der -Arg/+Can Bedingung, konnte jedoch in unseren Myelomzellen keine

zusätzliche Erhöhung der Caspase 3-Spaltung bewirken. Weder nach 0,5, 4 noch nach 8 h konnte durch die zusätzliche Autophagieinhibierung eine höhere Induktion der Apoptose gezeigt werden. Auch hier kann eingewendet werden, dass der späteste Zeitpunkt nach 8 h Inkubation untersucht wurde. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch bereits etwa 25% der Zellen tot (Abbildung 5). Des Weiteren konnte nach 4 und nach 8 h in der -Arg/+Can Bedingung eine starke Veränderung der Autophagie (Abbildung 6) und der ATF4-Expression (Abbildung 17) nachgewiesen werden. Es kommt bereits zu diesen Zeitpunkten zu biochemischen Mechanismen, die als Überlebens- bzw. Zytotoxizitätsmechanismen in der Zelle fungieren können.

Um auszuschließen, dass nicht nur die Behandlung mit Chloroquin, sondern auch andere Autophagieinhibitoren der späten Phase zu keiner Veränderung der Viabilität führen, wurde eine Behandlung der Zellen mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 vorgenommen. Kawaguchi et al. demonstrierten in ihrer Studie, dass der Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 in der Myelomzelllinie U266 mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib synergisierte. Es konnte eine verstärkte Apoptoseinduktion in der Kombinationsbehandlung gezeigt werden (129). Wie in Abbildung 11 zu sehen, konnte in dem von uns untersuchten Tumormodell in der -Arg/+Can Behandlung durch die zusätzliche Gabe von Bafilomycin A1 kein Wirksynergismus nachgewiesen werden. Die Anzahl der toten Zellen ist bei zusätzlicher Bafilomycin A1-Behandlung gleichbleibend. Auch die Bafilomycin A1-Gabe bei Argininsuffizienz führte zu keiner Veränderung der Viabilität. Dieses Ergebnis entspricht der zuvor beschriebenen gleichbleibenden Viabilität bei zusätzlicher Autophagieinhibierung durch Chloroquinbehandlung unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion (Abbildung 10). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zusätzliche Inhibierung der letzten Phase der Autophagie in den NCI-A2 Myelomzellen in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion weder zytotoxisch noch zytoprotektiv wirkt. Dieses Ergebnis würde am ehesten zu der Vermutung passen, dass es sich um eine Beclin 1-vermittelte Hemmung der Autophagie im Rahmen einer Caspase 3-abhängigen Apoptoseeinleitung handelt (126,130).

6.6. Wirksynergismus mit Wortmannin

Wortmannin ist ein aus Pilzen gewonnener PI3K-Inhibitor (131). Wortmannin kann zur Hemmung der Autophagieinduktion eingesetzt werden: Es verhindert über die Inhibierung der PI3K die Entstehung von autophagischen Vesikeln (70). Die Zellen der Kopf-Hals-

Plattenepithelkarzinom-Zelllinien HN4 und HN30 wurden *in vitro* mit Interferon-Alpha und Wortmannin behandelt. Durch die Behandlung mit Wortmannin erniedrigte sich, sowohl bei alleiniger als auch in der Kombinationbehandlung, der autophagische Flux. Durch die Inhibierung der Autophagieinduktion konnten Yang et al. eine Erhöhung der Interferon-Alpha getriggerten Apoptose zeigen (132). In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die Behandlung der NCI-A2 Myelomzellen mit Wortmannin bei Canavaninsupplementation und unter Arginindepletion (-Arg/+Can/+Wn) synergistisch wirkt. Die Anzahl der toten Zellen verdoppelte sich nach 8 h. Bei Argininsuffizienz bleibt die Viabilität durch die Wortmanninbehandlung unverändert. Der Wirksynergismus zwischen Wortmannin und der Canavaninsupplementation unter Arginindepletion führt zu einer erhöhten Apoptoseinduktion. Im Western Blot in Abbildung 14D ist die zusätzliche Aktivierung der Caspase 3 in der -Arg/+Can/+Wn Behandlung zu sehen. Dieses Ergebnis ist kohärent zu der Erhöhung der Anzahl der toten Zellen in der FACS-Messung. In der -Arg/+Can/+Wn Bedingung kommt es im Vergleich zur -Arg/+Can Bedingung zu einer tendenziell sichtbaren Erniedrigung der LC3-I/II-Ratio. Wortmannin scheint auch in den NCI-A2 Myelomzellen die Autophagieinduktion zu hemmen. Dennoch müsste eine erneute Wiederholung des Experiments durchgeführt werden, um eine Signifikanz zu bestätigen. Des Weiteren gilt zu bedenken, dass eine Vielzahl zellulärer Prozesse über PI3K-Aktivierung reguliert wird (133). Daher kann Wortmannin in Myelomzellen auch über die Hemmung anderer Signalwege als der Autophagie zytotoxisch wirken (134). Kürzlich publizierte Untersuchungen von Karatsai et al. legen nahe, dass Canavanin unter Arginindeprivation über eine Inhibierung der PI3K zu einer Apoptoseinduktion führt (135). Dieser Wirkmechanismus, der in Glioblastomzellen beobachtet wurde, wäre auch ein möglicher Erklärungsansatz des von uns in Myelomzellen beobachteten Wirksynergismus mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin. Ob die Autophagie also ein Überlebensmechanismus oder ein Zytotoxizitätsmechanismus in der Canavaninbehandlung unter Arginindepletion ist, konnte mithilfe des PI3K-Inhibitor Wortmannin nicht abschließend geklärt werden. Um dies genauer zu untersuchen, sollte ein weiterer Inhibitor der Autophagieinduktion, wie 3-Methyladenin (3-MA), getestet werden (69). Die Wirksamkeit der Autophagiehemmung mittels 3-MA konnte bereits in Myelomzelllinien demonstriert werden (136).

6.7. Keine Erhöhung der Zytotoxizität durch Ricolinostat

Die Histondeacetylase HDAC6 hat vielseitige Funktionen in der Zelle. Eine wichtige Aufgabe ist der Transport fehlgefalteter Proteine zum Aggresom (75). Ricolinostat ist ein selektiver

HDAC6-Inhibitor. Mishima et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass Ricolinostat in Kombination mit dem Proteasomeninhibitor Carfilzomib in den Myelomzelllinien RPMI8226, U266, H929 und MM.1S durch die Hemmung der Aggresomenbildung zu einer Beschleunigung der Apoptoseinduktion führt (102). Auch andere HDAC6-Inhibitoren zeigten sich besonders effizient zur Induktion der Apoptose in Myelomzellen. So konnte beispielsweise der HDAC-Inhibitor ACY-241 in Kombination mit einem Anti-PD-L1 Antikörper eine starke Zunahme der Zytotoxizität in Myelomzellen bewirken (137). Ein weiterer HDAC6-Inhibitor namens Tubacin führte unter Bortezomib-Behandlung in Myelomzellen zur Apoptoseinduktion (74). Da Canavanin unter Arginindepletion zu einer Erhöhung der ubiquitinierten Proteine in Myelomzellen führt, lag die Vermutung nahe, dass ein HDAC6-Inhibitor wie Ricolinostat auch die Toxizität dieser Behandlung erhöhen könnte. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch führte die Kombinationsbehandlung aus Ricolinostat und Canavanin unter Arginindepletion nicht zu einer Erhöhung der Zytotoxizität. Nach 8 h waren durch die Ricolinostatbehandlung weder bei Argininsuffizienz noch bei Arginindepletion mehr Zellen tot als in den Kontrollbedingungen. Dieses Experiment lässt vermuten, dass die Bildung von Aggresomen in den NCI-A2 Myelomzellen keinen *Rescue*-Mechanismus darstellt. Dennoch sollte diese Hypothese in weiteren Experimenten geprüft werden: Es sollte geprüft werden, ob die Canavaninsupplementation unter Arginindepletion zu einer Bildung von Aggresomen führt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten dies zu untersuchen. Aggresomen können unter anderem elektronenmikroskopisch sowie mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden (138). In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Bildung der Aggresomen durch Ricolinostat in den von uns untersuchten Tumorzellen tatsächlich effektiv gehemmt wird. Wenn dies nicht der Fall ist, sollten alternative HDAC6-Inhibitoren eingesetzt werden (74,137). Außerdem sollte überprüft werden, ob es durch eine höhere Dosierung, einen späteren Zeitpunkt oder in einer anderen Zellreihe, zu einer synergistischen Wirkung kommt.

6.8. ATF4-Induktion

Das Regulatorprotein ATF4 spielt in einer Vielzahl von adaptiven Stressantworten eine essenzielle Rolle (139). ATF4 ist unter anderem als wichtiges Signalmolekül an der ungefalteten Proteinantwort (UPR) beteiligt. Es wird von pEIF2alpha aktiviert. Ein hohes Ausmaß an ER-Stress kann mit Hilfe des Signalmoleküls ATF4 zu einer Aktivierung des proapoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP führen (140). ATF4 kann jedoch auch Adaptationsmechanismen unter ER-Stress aktivieren und dadurch den Zelltod verhindern. Zu den Adaptationsvorgängen der Zelle zählt die Autophagie. Der Prozess wird induziert, um den

ER-Stress wieder auf ein für die Zelle tolerables Niveau zu senken (81). ATF4 ist nicht nur in der UPR involviert, sondern auch als Signalmolekül bei der Antwort auf Aminosäuremangel beteiligt. Das Signalmolekül eIF2 α wird durch die GCN2-Kinase phosphoryliert, wobei phospho-eIF2 α wiederum die Expression von ATF4 erhöht. Es kommt zu einer Aktivierung von Anpassungsprozessen, wie der Autophagie, die zu einem erhöhten Aminosäureangebot führen (141). Myelomzellen neigen durch ihre erhöhte Proteinsyntheserate zu erhöhtem ER-Stress. Obeng et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass der Anstieg an fehlgefalteten Proteinen durch eine Proteasomeninhibierung in Myelomzellen der Zelllinien 8226/S, MM.1S, KMS-18, KMS-11 und U266 eine Erhöhung der UPR zur Folge hatte. Die Proteasomeninhibitoren führten bereits 1-2 h nach Behandlungsbeginn zu einer stark erhöhten ATF4-Expression. Infolgedessen kam es zu einer CHOP-Aktivierung mit einer daraus resultierenden Apoptoseinduktion (142). Auch V8, ein neues synthetisches Flavonoid, führte über eine Aktivierung von ATF4 zu einer Induktion der Apoptose in Myelomzellen der Zelllinie RPMI 8226 (143). ATF4 kann jedoch auch in Stresssituationen aktiviert werden und in diesen Fällen als Anpassungsmechanismus fungieren. So konnten Zang et al. zeigen, dass in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen (HNSCC-Zellen) unter Carfilzomibbehandlung ATF4 induziert wird und dies eine *prosurvival* Autophagie zur Folge hatte (144). Da Canavanin unter Arginindepletion zu einer erhöhten Anzahl an ubiquitinierten Proteinen in Myelomzellen führt, sollte die ATF4-Expression in dieser Behandlung untersucht werden. In dem Western Blot in Abbildung 17A ist zu sehen, dass es in der Myelomzelllinie NCI-A2 zu einer starken Expression von ATF4 bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion nach 4 und nach 8 h kommt. Unter alleiniger Arginindepletion ist eine schwache Bande zu sehen, die jedoch in der Auswertung nicht signifikant ist. Die alleinige Canavaninsupplementation führt nicht zu einer verstärkten Expression des ATF4. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der -Arg/+Can Kombinationsbehandlung eine Stressantwort mit Überexpression des ATF4-Signalmoleküls stattfindet. Im Vergleich zu den von Zang et al. durchgeführten Untersuchungen scheint ATF4 in unserem Tumormodell durch eine Canavaninbehandlung bei Arginindepletion keine beziehungsweise keine ausreichende *prosurvival* Autophagieinduktion zur Folge zu haben, da bereits nach 4 h eine Inhibierung der Autophagie eintritt (Abbildung 8). Zu bedenken ist, dass auch die Aktivierung anderer *prosurvival* Mechanismen durch eine erhöhte ATF4-Expression möglich ist. Hierzu zählen zum Beispiel eine Hochregulation von Chaperonen, ein Translationsstopp, eine Veränderung der antioxidativen Antwort sowie eine Aktivierung des ERADs (145). Diese Mechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, sollten jedoch in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

6.9. Wirkantagonismus mit Tunicamycin

Tunicamycin führt durch eine Hemmung der Glykosylierung von Proteinen zu ER-Stress und einer Aktivierung der UPR (146). Der Wirkstoff demonstrierte bereits in einigen *in vitro* Studien eine antitumorale Wirkung (85,147). Auch Wang et al. konnten zeigen, dass Tunicamycin über eine Erhöhung des ER-Stress und eine Aktivierung der UPR zu einer vermehrten Apoptoseinduktion von Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomen führt (103). Auch in den Myelomzelllinien U266 und MM.1S konnte durch eine Kombinationsbehandlung, bestehend aus Tunicamycin und dem Proteasomeninhibitor Bortezomib, eine starke Erhöhung des programmierten Zelltodes gezeigt werden. Der verstärkten Apoptoseinduktion ging eine potenzierte Erhöhung des ER-Stress in den Myelomzelllinien voraus (148). Die durch den ER-Stress induzierte UPR kann kontextabhängig auch protektiv für die Zelle sein und der Zelle als Überlebensmechanismus bei einer antitumoralen Behandlung dienen (149). Michallet et al. demonstrierten beispielsweise in ihren Versuchen, dass das gezielte Ausschalten von UPR Signalmolekülen in den Myelomzellen der Zelllinie NCI-H929 den Untergang der Zellen zur Folge hatte (150). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass eine zusätzliche Gabe von Tunicamycin (-Arg/+Can/+Tunica) zu einer verminderten Anzahl an toten Myelomzellen führte (Abbildung 19). Der Wirkstoff Tunicamycin antagonisiert die zytotoxische Wirkung des Canavanins unter Arginindepletion in der Zelllinie NCI-A2. Dies ist im Western Blot in Abbildung 20A zu sehen: Es ist eine verminderte Aktivierung der Caspase 3 in der -Arg/+Can/+Tunica im Vergleich zur -Arg/+Can Behandlung zu erkennen. Die Vermittlung der zellprotektiven Antwort durch die zusätzliche Tunicamycingabe geht mit einer erhöhten Expression von ATF4 einher (Abbildung 18). Die erhöhte ATF4-Expression, die verminderte Anzahl der toten Zellen und die verminderte Aktivierung der Caspase 3 bei Hinzunahme von Tunicamycin zur -Arg/+Can Behandlung sprechen dafür, dass die UPR in der Behandlung mit Canavanin unter Arginindepletion einen Überlebensmechanismus in den NCI-A2 Zellen darstellt. Die UPR wird möglicherweise nicht stark genug aktiviert, um der Zelle das Überleben zu garantieren. Dieses Ergebnis würde mit der Studie von Michallet et al. übereinstimmen: Auch in dieser Studie führte die Hemmung der UPR in Myelomzellen zu einem erhöhten Zelltod (150).

ER-Stress kann, wie bereits erläutert, zu einer Aktivierung der Autophagie führen. Das Signalmolekül ATF4 spielt hierbei eine wichtige Rolle: Als Teil der UPR aktiviert es Gene, die bei der Autophagie beteiligt sind (151). Auch Tunicamycin kann durch eine verstärkte Expression von ATF4 zu einer Aktivierung der Autophagie führen. Dies konnten Luhr et al. in den Prostatakarzinomzellen der Zelllinien LNCaP und PC3 sowie in den RPE-1 und

HeLaT-Zelllinien demonstrieren (84). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Behandlung der NCI-A2 Myelomzellen mit Tunicamycin bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion eine geringere Apoptoseinduktion zur Folge hat. Tunicamycin verändert auch in den von uns untersuchten Tumorzellen die Autophagie: die Tunicamycingabe hatte bei Argininsuffizienz eine deutliche Zunahme der LC3-II/I-Ratio zur Folge (Abbildung 21B). Das gleiche gilt für die Bedingungen mit zusätzlicher Canavanin-Applikation: in der +Arg/+Can/+Tunica Bedingung ist die LC3-II/I-Ratio, im Vergleich zur +Arg/+Can Behandlung, erhöht, was für eine Zunahme der Autophagosomen unter Tunicamycinbehandlung spricht. Diese Daten sind damit vereinbar, dass es, wie in dem Tumormodell von Luhr et al., auch in unseren NCI-A2 Zellen über eine Tunicamycin-vermittelte Überexpression von ATF4 zu einer Zunahme der Autophagie kommt.

Weiterführend sollte BAG3 untersucht werden. Bei der selektiven Auswahl der zu degradierenden fehlgefalteten Proteine spielen Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle. Das Ko-Chaperon BAG3 ist ein wichtiger Mediator der selektiven Autophagie (57). Eine Überexpression von Hitzeschockproteinen ist ein möglicher Anpassungsmechanismus von Myelomzellen an fehlgefaltete Proteine (152). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnte demonstriert werden, dass die Canavaningabe unter Arginindepletion zu einer starken Zunahme der Expression von BAG3 führt. Diese Beobachtung stützt die aufgestellte Hypothese eines vermehrten Anfalls fehlgefalteter Proteine unter Canavaninsupplementation bei Arginindepletion. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die zusätzliche Tunicamycingabe bei Canavaninsupplementation unter Arginindepletion zu einer deutlichen Verminderung der BAG3-Expression führte. Dies spricht dafür, dass unter Tunicamycinbehandlung weniger BAG3-gebundene fehlgefaltete Proteine in der Zelle vorliegen. Es liegt nahe, dass die Zelle mithilfe von Tunicamycin besser mit den anfallenden fehlgefalteten Proteinen unter Canavaninsupplementation und Arginindepletion umgehen kann. Als Erklärung hierfür gibt es mindestens zwei plausible Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist, dass es zu einer Tunicamycin-vermittelten ATF4-getriggerten *prosurvival* Autophagieinduktion kommt (84). Eine andere Möglichkeit ist beispielsweise ein Translationsstop infolge einer erhöhten UPR durch eine zusätzliche Tunicamycingabe mit der Folge einer geringeren Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen (145). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zusätzliche Behandlung mit Tunicamycin zu einer Canavaninsupplementation unter Arginindepletion zu einer Antagonisierung der zytotoxischen Wirkung in der Myelomzelllinie NCI-A2 führt. Die adaptive Stressantwort der Myelomzellen scheint nicht auszureichen, um angemessen auf die erhöhte Entstehungsrate an fehlgefalteten Proteinen zu reagieren. Tunicamycin wirkt durch eine vermehrte Induktion der UPR protektiv auf die NCI-A2

Myelomzellen, die mit Canavanin und Arginindepletion behandelt werden. Ob Tunicamycin über die Erhöhung des ER-Stress zu einer für die Zelle protektiven Autophagieinduktion führt, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Mögliche weiterführende Untersuchungen könnten mit Hilfe eines Elektronenmikroskops oder von Immunfluoreszenz gemacht werden (122). Es sollten auch weiterführende Experimente im Bezug auf andere mögliche *prosurvival* Mechanismen, wie eine Hochregulation von Chaperonen, einen Translationsstopp, eine Veränderung der antioxidativen Antwort sowie eine Aktivierung des ERADs, vorgenommen werden (145). In der Abbildung 25 sind potenzielle Zytotoxizitätsmechanismen bildlich zusammenfassend dargestellt (Abbildung 25).

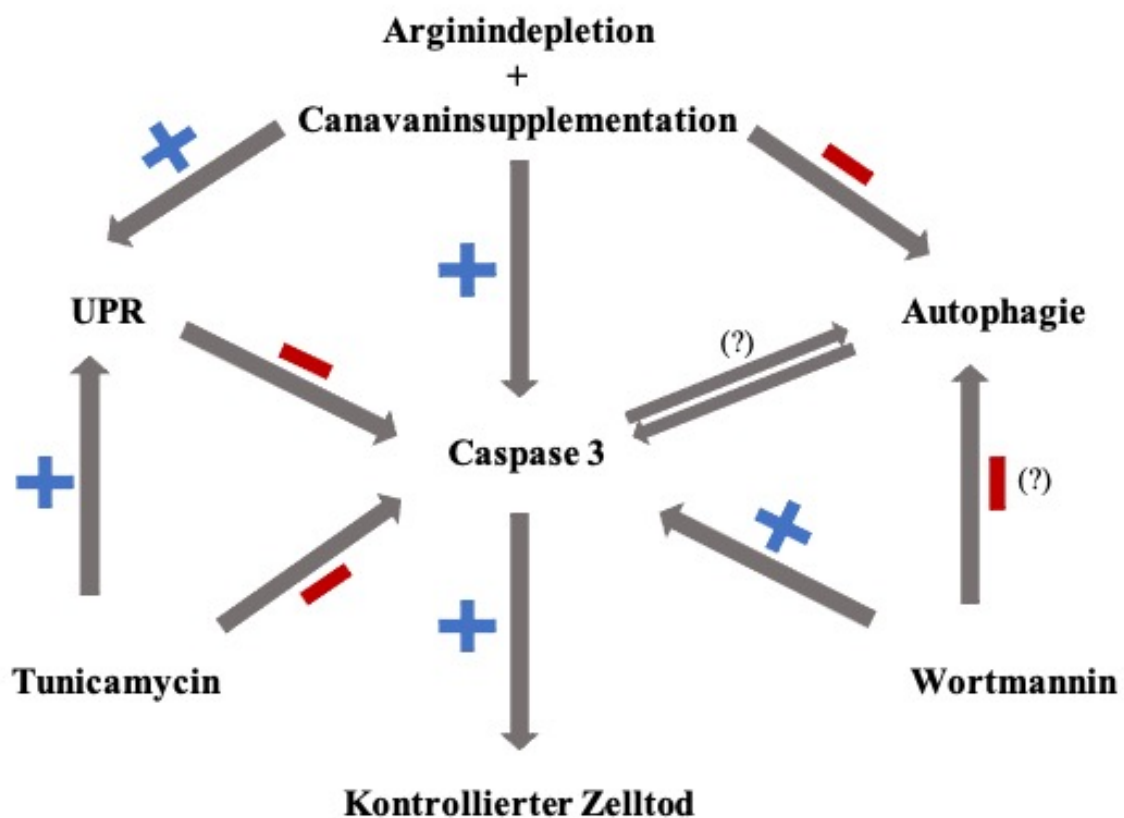


Abbildung 25) Canavaninsupplementation unter Arginindepletion: Potenzielle Zytotoxizitätsmechanismen

In dem von uns untersuchten Tumormodell wurden unterschiedliche Mechanismen untersucht, die unter der Behandlung mit Canavanin unter Arginindeprivation zum beobachteten Zelltod führen. Tunicamycin führt über eine erhöhte UPR zu einer verminderten Spaltung der Caspase 3 und somit zu einem verminderten Zelltod. Somit konnte indirekt gezeigt werden, dass die UPR in unserem Tumormodell am ehesten als *prosurvival* Mechanismus fungiert. Wortmannin führt in dem untersuchten Modell zu einer starken Erhöhung des Zelltodes. Dies scheint möglicherweise auf eine Inhibierung der frühen Phase der Autophagie zurückzuführen zu sein. Dennoch ist die Rolle der Autophagie in dem System nicht abschließend geklärt.

6.10. Kein Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen als Nebenprodukte bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Sie fungieren auch als Signalmoleküle in der Zelle: Sie können sowohl adaptive Stressantworten aktivieren als auch zum Zelltod beitragen (95). Tumorzellen neigen zu einer erhöhten Bildung von ROS. Diese fördern die Tumorgenese, können bei übermäßiger Bildung jedoch auch die Apoptose einleiten. Dies ist ein Wirkmechanismus der Chemotherapie in der Krebsbehandlung: Durch eine Erhöhung der ROS können Chemotherapeutika zu einer Aktivierung des programmierten Zelltodes führen (92). Eine erhöhte Entstehungsrate an fehlgefalteten Proteinen und dem daraus resultierendem ER-Stress kann auch eine vermehrte Entstehung von ROS zur Folge haben (94). Fribley, Zeng und Wang konnten in ihren Versuchen zeigen, dass der Proteasomeninhibitor PS-341 in Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomzellen zu einer erhöhten Rate an fehlgefalteten Proteinen führt und dies eine vermehrte Bildung von ROS und eine Caspase-vermittelten Aktivierung der Apoptose zur Folge hat (153). Bei der Therapie mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib in den Mantelzelllymphomzelllinien Granta-519, Jeko, REC-1 und JVM-2 demonstrierten Pérez-Galán et al., dass die Produktion von ROS der Initiierung des programmierten Zelltodes vorausgeht (154). Auch in Myelom-Zelllinien konnte bei der Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen eine ROS-getriggerte Induktion des Zelltodes nachgewiesen werden (130,155). Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, zeigte sich in den NCI-A2 Zellen durch die Canavaninbehandlung, bei zusätzlicher Arginindepletion, keine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies. Da jedoch nach 8 h Inkubation in dieser Behandlungsoption bereits eine starke Aktivierung der Caspase 3 nachweisbar ist (Abbildung 6), geht eine vermehrte Entstehung von ROS dem Zelltod in den NCI-A2 Zellen nicht voraus. Dennoch gilt es anzumerken, dass ROS in allen Bedingungen nachweisbar sind. Eine Erhöhung des oxidativen Stress scheint für das Multiple Myelom charakteristisch (88). Für die beobachtete erhöhte Zytotoxizität unter Canavaninsupplementation bei Arginindeprivation liefert die vermehrte Bildung von ROS jenseits des Grundniveaus allerdings im Gegensatz zu den o.g. Tumormodellen keinen möglichen Erklärungsansatz (130,155).

Bei N-Acetylcystein handelt es sich um ein in der Natur vorkommendes Antioxidans, das bereits in einigen Tumorentitäten seine antitumorale Wirkung *in vitro* gezeigt hat (156). Unter anderem konnte in Brustkrebszellen der Zelllinie MDA-MB-435 nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit N-Acetylcystein zu einer erhöhten Apoptoseinduktion, sowie zu einer verminderten Tumorprogression und Metastasierung führt (157). Auch konnte in Brustkrebspatientinnen bereits in einer klinischen Pilotstudie gezeigt werden, dass

N-Acetylcystein eine Abnahme der Proliferationsrate der Krebszellen zur Folge hatte (158). In der Zelllinie NCI-A2 zeigte die zusätzliche Gabe von N-Acetylcystein zur -Arg/+Can Bedingung keinen Wirksynergismus. Dies bestätigt die Hypothese, dass ROS keine Rolle bei der Induktion der Apoptose durch Canavaninsupplementation unter Arginindeprivation spielen. Allerdings zeigte sich in den Untersuchungen, dass die zusätzliche Gabe des Antioxidans bei Argininsuffizienz zu einer starken Zunahme an toten Zellen führt. Dies könnte daran liegen, dass bereits ein erhöhtes ROS Grundniveau in den NCI-A2 vorliegt, die der Tumorprogression dienen. In zukünftigen Experimenten sollte eine erneute Messung von ROS unter Supplementation von N-Acetylcystein durchgeführt werden. Abschließend lässt sich sagen, dass dieser Versuch die zuvor gezeigten Ergebnisse der ROS-Messung stützt: die Entstehung von ROS ist kein biochemischer Wirkmechanismus, der die hohe Zytotoxizität der Canavaninbehandlung unter Arginindepletion erklärt.

7. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist die zweithäufigste hämatologische Neoplasie des Menschen. Im Erkrankungsverlauf treten schwerwiegende Komplikationen wie Osteolysen, Niereninsuffizienz, Anämie und Hyperkalzämie auf. Trotz der zahlreichen Fortschritte in der Behandlung dieser Tumorentität gibt es bisher keine kurative Therapieoption. Die Beeinflussung des Stoffwechsels der proteinogenen Aminosäure Arginin konnte in unserer Arbeitsgruppe als neue effektive Therapiestrategie im Multiplen Myelom beschrieben werden. Insbesondere die Supplementation des Arginin-Analogons Canavanin bei gleichzeitigem Argininmangel führt zu einer schnellen und sehr ausgeprägten Zytotoxizität in Myelomzellen. Dies wird vermutlich durch den Einbau des Canavanins an Stelle von Arginin in neu entstehende Proteine bewirkt, was konsekutiv zu dem Anfall einer großen Menge fehlgefalteter Proteine mit nachfolgender Ubiquitynylierung führt. Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit sollten mögliche biochemische Mechanismen charakterisiert werden, welche in diese induzierte Zytotoxizität involviert sind bzw. gegenregulatorisch induziert werden könnten.

Zunächst wurde gezeigt, dass die untersuchte Myelom-Zelllinie NCI-A2 auf eine externe Zufuhr von Arginin angewiesen ist. Die Zellen exprimieren nicht das für die *De-novo*-Synthese von Arginin benötigte Enzym ASS1 und sind Arginin-auxotroph. Canavaninsupplementation unter Arginindepletion führte zu einer bereits nach 8 h eintretenden starken Induktion der Caspase 3-vermittelten Apoptose. Des Weiteren konnte mithilfe der Detektion der LC3-Spleißformen im Western Blot eine starke Autophagosomenakkumulation nachgewiesen werden. Als Ursache hierfür erwies sich eine bereits nach 4 h eintretende Hemmung der späten Phase der Autophagie. Es zeigte sich ein starker Anstieg des Ko-Chaperons BAG3 spezifisch bei Canavaninapplikation unter Argininmangel, was für einen Anfall intrazellulär fehlgefalteter Proteine unter dieser Bedingung spricht. Eine Inhibierung der lysosomalen Degradierung mithilfe von Chloroquin oder Bafilomycin A1 konnte keinen Wirksynergismus erzielen. Durch die Inhibierung der Autophagieinduktion mittels Wortmannin erhöhte sich der Zelltod dagegen signifikant. Diese Ergebnisse deuten auf einen komplexen Beitrag der Autophagie hin: als möglichem Überlebensmechanismus oder gegenteilig als Apoptose-Induktor, was nicht abschließend geklärt werden konnte. Es fand sich bei Canavaningabe unter Arginindepletion eine starke Induktion des bei Proteinstress regelhaft involvierten Transkriptionsfaktors ATF4. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem ER-Stress-Induktor Tunicamycin hatte überraschenderweise eine Steigerung der Viabilität der Myelomzellen zur Folge. Tunicamycin

fürte zu einer Erhöhung der ATF4-Expression und zu einer verminderten BAG3-Expression. Dies spricht dafür, dass die Zellen bei Canavanin unter Argininmangel nicht ausreichend auf den Proteinstress mithilfe der UPR reagieren können. Abschließend wurde noch gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies keine Rolle in dem untersuchten experimentellen System bei der induzierten Zytotoxizität spielen.

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit, wichtige intrazelluläre biochemische Prozesse näher zu charakterisieren, welche bei der durch Canavaninapplikation unter Argininmangel induzierten außergewöhnlich schnellen und starken Zytotoxizität involviert sind. Diese Arbeiten tragen zu einem besseren pathophysiologischen Verständnis dieses neuartigen und vielversprechenden Therapieprinzips bei.

8. Literaturverzeichnis

1. Stanaway JD, Afshin A, Gakidou E, Lim SS, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Stu. *Lancet* [Internet]. 2018 Nov 10 [cited 2020 Dec 3];392(10159):1923–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30496105/>
2. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdel-Rahman O, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-Adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];5(12):1749–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31560378/>
3. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2011 Sep [cited 2020 Dec 3];3(3):3279–330. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212956/>
4. Wang S, Liu Y, Feng Y, Zhang J, Swinnen J, Li Y, et al. A review on curability of cancers: More efforts for novel therapeutic options are needed. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766180/>
5. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Mar 17 [cited 2020 Dec 3];364(11):1046–60. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1011442>
6. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG. Kidney disease and multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013 Nov 7 [cited 2020 Dec 3];8(11):2007–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23868898/>
7. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2015 May 30 [cited 2020 Dec 3];385(9983):2197–208. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673614604931/fulltext>
8. Jacobi B. Interferenz mit dem Argininstoffwechsel als neue Therapiestrategie beim Multiplen Myelom [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 21]. Available from: <https://openscience.ub.uni-mainz.de/handle/20.500.12030/2357>
9. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2016 Dec 13 [cited 2020 Dec 3];21(1):29. Available from: <http://cml.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-016-0031-z>
10. Nikesitch N, Lee JM, Ling S, Roberts TL. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Dec 3];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29484184/>
11. Bence AK, Crooks PA. The mechanism of L-Canavanine cytotoxicity: Arginyl tRNA synthetase as a novel target for anticancer drug discovery. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 2003 Oct [cited 2020 Dec 3];18(5):383–94. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14692504/>
12. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2020 Dec 3];131(4):959–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23465663/>
 13. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: Step by step towards immune competence. *Trends Immunol* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2020 Dec 3];24(6):343–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810111/>
 14. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2020 Dec 3];15(3):137–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25656706/>
 15. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, MacKay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2020 Dec 3];11(8):681–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20644574/>
 16. Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dörner T. Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2020 Dec 3];20(2):162–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18456483/>
 17. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2009 Jul 25 [cited 2020 Dec 3];374(9686):324–39. Available from: www.thelancet.com
 18. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2020 Dec 3];127(20):2375–90. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/20/2375/1393632/2375.pdf>
 19. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Oct 28 [cited 2020 Dec 3];351(18):1860–73. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra041875>
 20. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2020 Dec 4];3:17046. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28726797/>
 21. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];43(6):676–81. Available from: </pmc/articles/PMC5283695/?report=abstract>
 22. Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(3):413–22.
 23. Mimura N, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Exp Hematol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2020 Dec 3];43(8):732–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26118499/>
 24. Fotiou D, Dimopoulos MA, Kastritis E. How We Manage Patients with Plasmacytomas. *Curr Hematol Malig Rep* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Dec 3];13(3):227–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29667156/>
 25. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];15(12):538–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25439696/>

26. Caers J, Garderet L, Kortüm KM, O'dwyer ME, van de Donk NWCJ, Binder M, et al. European myeloma network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: What to use and when. *Haematologica* [Internet]. 2018 Oct 31 [cited 2020 Dec 3];103(11):1772–84. Available from: www.haematologica.org/content/103/11/1772
27. Willenbacher E, Balog A, Willenbacher W. Short overview on the current standard of treatment in newly diagnosed multiple myeloma. *Memo - Mag Eur Med Oncol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];11(1):59–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12254-018-0383-3>
28. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2020 Dec 3];95(5):548–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32212178/>
29. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* [Internet]. 1993 [cited 2020 Dec 3];9(4):138–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8516849/>
30. Duffy MJ. Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer. *Clin Biochem* [Internet]. 1993 [cited 2020 Dec 3];26(6):439–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8124858/>
31. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for Making Human Tumor Cells. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Nov 14 [cited 2020 Dec 3];347(20):1593–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12432047/>
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2020 Dec 3];144(5):646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
33. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* [Internet]. 2000 Oct 12 [cited 2020 Dec 3];407(6805):770–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11048727/>
34. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];43:95–118. Available from: </pmc/articles/PMC4762029/?report=abstract>
35. Kumar R, Herbert PE, Warrens AN. An introduction to death receptors in apoptosis. *Int J Surg*. 2005 Jan 1;3(4):268–77.
36. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2020 Dec 3];29(5):347–64. Available from: </pmc/articles/PMC6796845/?report=abstract>
37. Kaczanowski S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol* [Internet]. 2016 May 9 [cited 2020 Dec 3];13(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172135/>
38. Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A. Arginine—Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];115(3):273–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27861915/>
39. Morris SM. Arginine metabolism revisited. *J Nutr* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];146(12):2579–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27934648/>
40. Riess C, Shokraie F, Classen CF, Kreikemeyer B, Fiedler T, Junghanss C, et al. Arginine-

- Depleting Enzymes – An Increasingly Recognized Treatment Strategy for Therapy-Refractory Malignancies. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];51(2):854–70. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/495382>
41. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Priya Narayanan S, Caldwell RB. Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2020 Dec 3];98(2):641–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29412048/>
 42. Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S, Banerjee UC, Fukumura D. Arginine dependence of tumor cells: Targeting a chink in cancer’s armor. *Oncogene* [Internet]. 2016 Sep 22 [cited 2020 Dec 4];35(38):4957–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27109103/>
 43. Nurcahyanti ADR, Wink M. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ* [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 3];4(1):e1542. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26839743/>
 44. Bence AK, Worthen DR, Adams VR, Crooks PA. The antiproliferative and immunotoxic effects of L-canavanine and L-canaline. *Anticancer Drugs* [Internet]. 2002 [cited 2020 Dec 3];13(3):313–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11984075/>
 45. Vynnytska-Myronovska B, Bobak Y, Garbe Y, Dittfeld C, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2020 Dec 3];130(9):2164–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647872/>
 46. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [Internet]. Vol. 36, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. *Int J Biochem Cell Biol*; 2004 [cited 2020 Dec 3]. p. 2491–502. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15325587/>
 47. Manasanch EE, Orłowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2020 Dec 3];14(7):417–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28117417/>
 48. Jain C, Arora S, Khanna A, Gupta M, Wadhwa G, Sharma S. The Ubiquitin-Proteasome Pathway an Emerging Anticancer Strategy for Therapeutics: A Patent Analysis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* [Internet]. 2015 May 14 [cited 2020 Dec 4];10(2):201–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25877716/>
 49. Vabulas RM, Hartl FU. Cell biology: Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* (80-) [Internet]. 2005 Dec 23 [cited 2020 Dec 3];310(5756):1960–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16373576/>
 50. Voutsadakis IA. Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];39(3):1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345458/>
 51. Chen Y, Zhang Y, Guo X. Proteasome dysregulation in human cancer: implications for clinical therapies. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];36(4):703–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9704-y>
 52. Frezza M, Schmitt S, Ping Dou Q. Targeting the Ubiquitin-Proteasome Pathway: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2011 Nov 28 [cited 2020 Dec 3];11(23):2888–905. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21824109/>
 53. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The

- proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Dec 3];36(4):561–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196868/>
54. Yun Z, Zhichao J, Hao Y, Ou J, Ran Y, Wen D, et al. Targeting autophagy in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2017 Aug 1;59:97–104.
 55. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* [Internet]. 2011;147(4):728–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
 56. Dunn WA. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* [Internet]. 1994 [cited 2020 Dec 3];4(4):139–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14731737/>
 57. Gamerdinger M, Carra S, Behl C. Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: Focus on BAG proteins. *J Mol Med* [Internet]. 2011 Dec 5 [cited 2020 Dec 3];89(12):1175–82. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-011-0795-6>
 58. Jacomin AC, Gul L, Sudhakar P, Korcsmaros T, Nezis IP. What we learned from big data for autophagy research. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 Aug 17 [cited 2020 Dec 3];6. Available from: [/pmc/articles/PMC6107789/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3107789/)
 59. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal* [Internet]. 2014 Jan 20 [cited 2020 Dec 3];20(3):460–73. Available from: [/pmc/articles/PMC3894687/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24687787/)
 60. Ji CH, Kwon YT. Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Mol Cells* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];40(7):441–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28743182/>
 61. Bhutia SK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Das DN, Panda PK, Patra SK, et al. Autophagy: Cancer’s friend or foe? *Adv Cancer Res* [Internet]. 2013 [cited 2020 Dec 3];118:61–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768510/>
 62. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];19(21):5720–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11060023/>
 63. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* [Internet]. 2010 Jun 17 [cited 2020 Dec 3];465(7300):942–6. Available from: [/pmc/articles/PMC2920749/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2020749/)
 64. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death [Internet]. Vol. 26, *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Dec 3]. p. 605–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568239/>
 65. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2004 Dec [cited 2020 Dec 3];6(12):1221–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15558033/>
 66. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2020 Dec 3];18(9):1865. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846632/>

67. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozana AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* [Internet]. 2016 Jan 21 [cited 2020 Dec 3];12(1):1–222. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799652/>
68. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 [cited 2020 Dec 3];112(12):1809–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638851/>
69. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];73(5):985–1001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26658914/>
70. Chude CI, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer: Update on clinical trials and novel inhibitors [Internet]. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017 [cited 2020 Dec 3]. p. 1279. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621712/>
71. Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];11(8):1437–8. Available from: </pmc/articles/PMC4590655/?report=abstract>
72. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2020 Dec 3];14(8):1435–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29940786/>
73. Xu R, Ji Z, Xu C, Zhu J. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 97, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2020 Dec 3]. p. e12912. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30431566/>
74. Simms-Waldrip T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Fu C, Sakamoto KM. The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2008 [cited 2020 Dec 3];94(3):283–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18472289/>
75. Salem LM, Almawi AW, Lefebvre KJ, Schild-Poulter C. Aggresome formation is regulated by RanBPM through an interaction with HDAC6. *Biol Open* [Internet]. 2014 Jun 15 [cited 2020 Dec 3];3(6):418–30. Available from: </pmc/articles/PMC4058076/?report=abstract>
76. Li T, Zhang C, Hassan S, Liu X, Song F, Chen K, et al. Histone deacetylase 6 in cancer [Internet]. Vol. 11, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Dec 3]. p. 111. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>
77. Cea M, Cagnetta A, Gobbi M, Patrone F, Richardson PG, Hideshima T, et al. New insights into the treatment of multiple myeloma with histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013 [cited 2020 Dec 3];19(4):734–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016853>
78. Vogl DT, Raje N, Jagannath S, Richardson P, Hari P, Orlowski R, et al. Ricolinostat, the first selective histone deacetylase 6 inhibitor, in combination with bortezomib and dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2020 Dec 3];23(13):3307–15. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053023/>
79. Smith M, Wilkinson S. ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2020 Dec 3];61(6):625–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29233873/>
 80. Oakes SA. Endoplasmic reticulum proteostasis: A key checkpoint in cancer. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Dec 3];312(2):93–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27856431/>
 81. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];232(11):2977–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28067409/>
 82. Fazia MA Della, Servillo G. Foie gras and liver regeneration: A fat dilemma. *Cell Stress*. 2018 Jul 1;2(7):162–75.
 83. Yoo J, Mashalidis EH, Kuk ACY, Yamamoto K, Kaeser B, Ichikawa S, et al. GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];25(3):217–24. Available from: [/pmc/articles/PMC5840018/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926605/)
 84. Luhr M, Torgersen ML, Szalai P, Hashim A, Brech A, Staerk J, et al. The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *J Biol Chem* [Internet]. 2019 May 17 [cited 2020 Dec 3];294(20):8197–217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926605/>
 85. Wu J, Chen S, Liu H, Zhang Z, Ni Z, Chen J, et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Nov 9 [cited 2020 Dec 3];37(1):272. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13046-018-0935-8>
 86. Jiang H, Zou J, Zhang H, Fu W, Zeng T, Huang H, et al. Unfolded protein response inducers tunicamycin and dithiothreitol promote myeloma cell differentiation mediated by XBP-1. *Clin Exp Med* [Internet]. 2013 Dec 20 [cited 2020 Dec 3];15(1):85–96. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10238-013-0269-y>
 87. Panieri E, Santoro MM. Ros homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells [Internet]. Vol. 7, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2020 Dec 3]. p. 2253. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27277675/>
 88. Lakhani CM. Oxidative Stress and Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. *Pharmacol Res*. 2019;176(3):139–48.
 89. Siwecka N, Rozpędek W, Pytel D, Wawrzynkiewicz A, Dziki A, Dziki Ł, et al. Dual role of endoplasmic reticulum stress-mediated unfolded protein response signaling pathway in carcinogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Dec 3];20(18):4354. Available from: [/pmc/articles/PMC6770252/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926605/)
 90. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2011 Jan [cited 2020 Dec 3];36(1):30–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20728362/>
 91. Guang MHZ, Kavanagh EL, Dunne LP, Dowling P, Zhang L, Lindsay S, et al. Targeting proteotoxic stress in cancer: A review of the role that protein quality control pathways play in oncogenesis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];11(1):66.

Available from: [/pmc/articles/PMC6356294/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6356294/?report=abstract)

92. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* [Internet]. 2010 [cited 2020 Dec 3];44(5):479–96. Available from: [/pmc/articles/PMC3880197/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3880197/?report=abstract)
93. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* [Internet]. 2011 [cited 2020 Dec 3];71(11):1385–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21812504/>
94. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Dec 3];104(3):273–80. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-016-2016-0>
95. Li YR, Trush M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];1(1):9–21. Available from: [/pmc/articles/PMC5921829/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5921829/?report=abstract)
96. Sun S-Y. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2010 [cited 2020 Dec 3];9(2):109–10. Available from: <https://doi.org/10.4161/cbt.9.2.10583>
97. Gallagher SR. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins [Internet]. *Current Protocols in Protein Science*. *Curr Protoc Protein Sci*; 2012 Apr [cited 2020 Dec 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22470126/>
98. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];2016(11):958–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27803251/>
99. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* [Internet]. 2010 Feb 5 [cited 2020 Dec 3];140(3):313–26. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867410000632/fulltext>
100. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2020 Dec 3];147(4):728–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22078875/>
101. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 2010;140(3):313–26.
102. Mishima Y, Santo L, Eda H, Cirstea D, Nemani N, Yee AJ, et al. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2020 Dec 3];169(3):423–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25709080/>
103. Wang Y, Zhang L, He Z, Deng J, Zhang Z, Liu L, et al. Tunicamycin induces ER stress and inhibits tumorigenesis of head and neck cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *Am J Transl Res*. 2020;12(2):541–50.
104. Stürner E, Behl C. The role of the multifunctional bag3 protein in cellular protein quality control and in disease. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2017 Jun 21 [cited 2020 Dec 3];10:177. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28680391/>
105. Gentilella A, Khalili K. BAG3 expression in glioblastoma cells promotes accumulation of ubiquitinated clients in an Hsp70-dependent manner. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Mar 18 [cited 2020 Dec 3];286(11):9205–15. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21233200/>
106. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. 2014;21(3):396–413.
 107. Ria R, Vacca A. Bone marrow stromal cells-induced drug resistance in multiple myeloma [Internet]. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020 [cited 2020 Dec 3]. p. 613. Available from: </pmc/articles/PMC7013615/?report=abstract>
 108. Tabe Y, Lorenzi PL, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood* [Internet]. 2019 Sep 26 [cited 2020 Dec 3];134(13):1014–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416801/>
 109. Ascierto PA, Scala S, Castello G, Daponte A, Simeone E, Ottaiano A, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: Results from phase I and II studies. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 [cited 2020 Dec 3];23(30):7660–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16234528/>
 110. Ho Jang M, Youn Jun D, Woo Rue S, Hyun Han K, Park W, Ho Kim Y. Arginine antimetabolite L-canavanine induces apoptotic cell death in human Jurkat T cells via caspase-3 activation regulated by Bcl-2 or Bcl-xL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 12;295(2):283–8.
 111. Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grosse-Gehling P, Bobak Y, Manig F, Chen O, et al. Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 3];7(45):73292–308. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27689335/>
 112. Vovk OI, Chen OI, Igumentseva NI, Senchuk OY, Barska ML, Sybirna NO, et al. Effects of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. *Ukr Biochem J* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];88(2):45–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29227602/>
 113. Susan E. Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2007;35(4):496–516. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/pdf/nihms33547.pdf>
 114. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk Y V., Bobak YP, Stasyk O V. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anticancer Drugs* [Internet]. 2011 [cited 2020 Dec 3];22(2):148–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20717004/>
 115. Yun Z, Zhichao J, Hao Y, Ou J, Ran Y, Wen D, et al. Targeting autophagy in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2017;59(155):97–104.
 116. Mimura N, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Exp Hematol* [Internet]. 2015;43(8):732–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.04.010>
 117. Riz I, Hawley TS, Hawley RG. KLF4-SQSTM1/p62-associated prosurvival autophagy contributes to carfilzomib resistance in multiple myeloma models. *Oncotarget*. 2015;6(17):14814–31.
 118. Bence AK, Crooks PA. The Mechanism of l-Canavanine Cytotoxicity: Arginyl tRNA Synthetase as a Novel Target for Anticancer Drug Discovery. Vol. 18, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2003. p. 383–94.

119. Shen Y, Zhang B, Su Y, Badshah SA, Wang X, Li X, et al. Iron Promotes Dihydroartemisinin Cytotoxicity via ROS Production and Blockade of Autophagic Flux via Lysosomal Damage in Osteosarcoma. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 May 5 [cited 2020 Oct 3];11:444. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00444/full>
120. Yang LJ, Chen Y, He J, Yi S, Wen L, Zhao J, et al. Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012 Dec [cited 2020 Oct 3];33(12):1542–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23064721/>
121. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1–13.
122. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1–222.
123. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. *Essays Biochem* [Internet]. 2013 [cited 2020 Dec 3];55(1):105–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070475/>
124. Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 Dec 3];24(8):1369–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28574508/>
125. Yang LJ, Chen Y, He J, Yi S, Wen L, Zhao J, et al. Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2020 Dec 3];33(12):1542–8. Available from: www.chinaphar.com
126. Zeng R, Chen Y, Zhao S, Cui GH. Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin in vitro via regulating intracellular ROS and SIRT1. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012 Jan [cited 2020 Dec 3];33(1):91–100. Available from: [/pmc/articles/PMC4010261/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4010261/?report=abstract)
127. Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O, de Miguel D, Ramírez-Labrada A, Martínez-Lostao L, et al. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];382(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27565383/>
128. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* [Internet]. 2000 [cited 2020 Dec 3];14(10):1833–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11021759/>
129. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, et al. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: Crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2020 Dec 3];38(3):643–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21174067/>
130. Yang LJ, Chen Y, He J, Yi S, Wen L, Zhao S, et al. Effects of gambogic acid on the activation of caspase-3 and downregulation of SIRT1 in RPMI-8226 multiple myeloma cells via the accumulation of ROS. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 May [cited 2020 Dec 3];3(5):1159–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22783411/>

131. Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1995 [cited 2020 Dec 3];20(8):303–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7667888/>
132. Yang W, Jiang C, Xia W, Ju H, Jin S, Liu S, et al. Blocking autophagy flux promotes interferon-alpha-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Dec 3];451:34–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30862487/>
133. Delbridge ARD, Valente LJ, Strasser A. The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2020 Dec 3];4(11):a008789. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/>
134. Pene F, Claessens YE, Muller O, Vigiú F, Mayeux P, Dreyfus F, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* [Internet]. 2002 [cited 2020 Dec 3];21(43):6587–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12242656/>
135. Karatsai O, Shliha P, Jensen ON, Stasyk O, Rędowicz MJ. Combinatory Treatment of Canavanine and Arginine Deprivation Efficiently Targets Human Glioblastoma Cells via Pleiotropic Mechanisms. *Cells* [Internet]. 2020 Sep 30 [cited 2020 Dec 3];9(10):2217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008000/>
136. Hoang B, Benavides A, Shi Y, Frost P, Lichtenstein A. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2020 Dec 3];8(7):1974–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19509276/>
137. Ray A, Das DS, Song Y, Hideshima T, Tai YT, Chauhan D, et al. Combination of a novel HDAC6 inhibitor ACY-241 and anti-PD-L1 antibody enhances anti-tumor immunity and cytotoxicity in multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Dec 3];32(3):843–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29104288/>
138. Lesire L, Chaput L, Cruz De Casas P, Rousseau F, Piveteau C, Dumont J, et al. High-Throughput Image-Based Aggresome Quantification. *SLAS Discov* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2020 Dec 3];25(7):783–91. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2472555220919708>
139. Evstafieva AG, Kovaleva IE, Shoshinova MS, Budanov A V., Chumakov PM. Implication of KRT16, FAM129A and HKDC1 genes as ATF4 regulated components of the integrated stress response. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2020 Dec 3];13(2):e0191107. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191107.g001>
140. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med* [Internet]. 2016 Jun 5 [cited 2020 Dec 3];16(6):533–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27211800/>
141. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J* [Internet]. 2010 Jun 16 [cited 2020 Dec 3];29(12):2082–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20473272/>
142. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2020 Dec 3];107(12):4907–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507771/>

143. Zhong Y, Zhang Y, Wang P, Gao H, Xu C, Li H. V8 induces apoptosis and the endoplasmic reticulum stress response in human multiple myeloma RPMI 8226 cells via the PERK-eIF2 α -ATF4 signaling pathway. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Dec 3];12(4):2702–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27703527/>
144. Zang Y, Thomas SM, Chan ET, Kirk CJ, Freilino ML, DeLancey HM, et al. The next generation proteasome inhibitors carfilzomib and oprozomib activate prosurvival autophagy via induction of the unfolded protein response and ATF4. *Autophagy* [Internet]. 2012 [cited 2020 Dec 3];8(12):1873–4. Available from: </pmc/articles/PMC3541310/?report=abstract>
145. Hsu SK, Chiu CC, Dahms HU, Chou CK, Cheng CM, Chang WT, et al. Unfolded protein response (UPR) in survival, dormancy, immunosuppression, metastasis, and treatments of cancer cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 May 2 [cited 2020 Dec 3];20(10):2518. Available from: </pmc/articles/PMC6566956/?report=abstract>
146. Lin Y, Jiang M, Chen W, Zhao T, Wei Y. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2020 Dec 3];118:109249. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31351428/>
147. Ahmmed B, Khan MN, Nisar MA, Kampo S, Zheng Q, Li Y, et al. Tunicamycin enhances the suppressive effects of cisplatin on lung cancer growth through PTX3 glycosylation via AKT/NF- κ B signaling pathway. *Int J Oncol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2020 Dec 3];54(2):431–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483742/>
148. Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F, Cerruti F, et al. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* [Internet]. 2009 Mar 26 [cited 2020 Dec 3];113(13):3040–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19164601/>
149. Avril T, Vauléon E, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* [Internet]. 2017 Aug [cited 2020 Dec 3];6(8):e373. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846078/>
150. Michallet AS, Mondiere P, Taillardet M, Leverrier Y, Genestier L, Defrance T. Compromising the unfolded protein response induces autophagy-mediated cell death in multiple myeloma cells. *PLoS One* [Internet]. 2011 Oct 18 [cited 2020 Dec 3];6(10):e25820. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22028791/>
151. Song S, Tan J, Miao Y, Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Dec 3];233(5):3867–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28777470/>
152. Hamouda MA, Belhacene N, Puissant A, Colosetti P, Robert G, Jacquelin A, et al. The small heat shock protein B8 (HSPB8) confers resistance to bortezomib by promoting autophagic removal of misfolded proteins in multiple myeloma cells. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 3];5(15):6252–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051369/>
153. Fribley A, Zeng Q, Wang C-Y. Proteasome Inhibitor PS-341 Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress-Reactive Oxygen Species in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2020 Dec 3];24(22):9695–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15509775/>

154. Pérez-Galán P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2020 Dec 3];107(1):257–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166592/>
155. Shen M, Hu Y, Yang Y, Wang L, Yang X, Wang B, et al. Betulinic acid induces ROS-dependent apoptosis and S-phase arrest by inhibiting the NF- κ B pathway in human multiple myeloma. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019 [cited 2020 Dec 3];2019(5083158). Available from: [/pmc/articles/PMC6590575/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3590575/)
156. Šalamon Š, Kramar B, Marolt TP, Poljšak B, Milisav I. Medical and dietary uses of n-acetylcysteine. *Antioxidants* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2020 Dec 3];8(5):111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31035402/>
157. Agarwal A, Muñoz-Nájjar U, Klueh U, Shih SC, Claffey KP. N-Acetyl-Cysteine Promotes Angiostatin Production and Vascular Collapse in an Orthotopic Model of Breast Cancer. *Am J Pathol* [Internet]. 2004 [cited 2020 Dec 3];164(5):1683–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111315/>
158. Monti D, Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Tuluc M, Birbe R, Berger A, et al. Pilot study demonstrating metabolic and anti-proliferative effects of in vivo anti-oxidant supplementation with N-Acetylcysteine in Breast Cancer. *Semin Oncol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2020 Dec 3];44(3):226–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29248134/>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei M. bedanken, der mir, zu meinen Interessen passend, eine Doktorarbeit mit einer biochemischen Fragestellung ermöglichte. Die wöchentlichen Labor-Treffen waren sehr hilfreich und er konnte mir stets neue Anregungen und Hilfestellungen geben. Durch seinen unentwegten Optimismus motivierte er mich weiterhin in der Forschung tätig zu bleiben.

Mein besonderer Dank geht an J., der stets sein Wissen mit mir teilte und dafür auch gerne Überstunden machte. Seine konkrete Planung und genaue Einarbeitung in das Thema halfen mir schlussendlich meine Experimente zu vervollständigen.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei A. bedanken. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und konnte mir zu jeder Frage hilfreiche Tipps geben. Durch ihre optimistische Art hatte ich große Freude an der Forschung.

Ein großes Dankeschön geht an N.. Dank ihr habe ich mich im Labor zurechtgefunden. Ich hatte großen Spaß mit ihr in einem Team zu arbeiten und möchte mich an dieser Stelle für die gemeinsame Zeit bedanken.

Für die Bereitstellung einiger Geräte sowie für die gemeinsamen Labor-Treffen danke ich ich der AG.

Zuletzt geht ein großes Dankeschön an meine Familie und an meine Freunde. Nur durch ihre Unterstützung konnte ich mich meinem Studium und der experimentellen Forschung widmen.

Aktueller Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lilli Sophie Sester
Anschrift Rohrbacher Straße 188, 69126 Heidelberg
E-Mail sesterlili@gmail.com
Geb. 03.11.1993 in Mannheim-Neckarau

Berufserfahrung

Juli 2020 – heute
Universitätsklinikum Heidelberg
Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin
Innere Medizin V
Im Neuenheimer Feld 410
69120 Heidelberg

Hochschulstudium

April 2013 – Mai 2020
Studium der Humanmedizin
Staatsexamen (Abschlussnote: 1,6)
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz, Deutschland
Abschlussnote: 1,6

Februar 2020 – April 2020
Praktisches Jahr in der Chirurgie
Kantonspital Obwalden
Sarnen, Schweiz

Dezember 2019 – Februar 2020
Praktisches Jahr in der Allgemein- und Viszeralchirurgie
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Ev. Stift St.
Martin
Koblenz, Deutschland

September 2019 – Dezember 2019	Praktisches Jahr in der Anästhesie und Intensivmedizin Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Ev. Stift St. Martin Koblenz, Deutschland
Mai 2019 – September 2019	Praktisches Jahr in der Innere Medizin Spezialisierung auf Autoimmunerkrankungen und seltene Erkrankungen Universitätsklinikum Montpellier (CHU) Montpellier, Frankreich
September 2018 – Oktober 2018	Famulatur Allgemeinmedizin Frau Jutta Jach-Brötzmann Mainz, Deutschland
März 2018 – April 2018	Famulatur Gynäkologie Kantonspital Obwalden Sarnen, Schweiz
September 2017 – Oktober 2017	Famulatur Innere Medizin und Notaufnahme Ortenauklinikum Kehl, Deutschland
März 2016 – Mai 2019	Experimentelle Forschung zum Multiplen Myelom AG Munder Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland
März 2016 – April 2016	Famulatur Pädiatrie Hochgebirgsklinik Davos, Schweiz

Schul Ausbildung

September 2005 – Juli 2012	Allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote: 1,3) Carl-Benz-Gymnasium Ladenburg, Deutschland
Juli 2011	Deutsche Schülerakademie Stipendium Bildung und Begabung Internatgymnasium Torgelow Torgelow, Deutschland
September 2001 – Juli 2005	Grundschule Dalberg-Grundschule Ladenburg, Deutschland
<i>Nebentätigkeiten</i>	
Juni 2018 – März 2019	Blutentnahmedienste Allgemein- und Viszeralchirurgie St. Josefhospital Wiesbaden, Deutschland
Juli 2016 – April 2017	Bereitschafts- und Nachtdienste Akutpsychiatrie Rheinhessenfachklinik Alzey, Deutschland
April 2015 – Oktober 2016	Tutorium der Biochemie für Humanmedizinstudierende Institut für Biochemie Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland

Kenntnisse & Fähigkeiten

Englisch sehr gut (C1) in Wort und Schrift

Französisch sehr gut (C1) in Wort und Schrift

Spanisch Grundkenntnisse (A2) in Wort und Schrift