

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Rolle der Aminosäuretransporter γ^+ LAT 1 und 2
für Wachstum und Viabilität von B-Zell-Leukämiezellen

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

Vorgelegt von

Daniel Pieh
aus Darmstadt

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Leukämieformen	1
1.2	Die chronische lymphatische Leukämie	3
1.3	Restriktion von Aminosäuren.....	4
1.4	Rolle des Arginins.....	5
1.5	Arginintransporter	7
1.6	hCAT-1-Suppression	10
1.7	Die Rolle von γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2	15
2	Ziele der Arbeit.....	18
3	Material	19
3.1	Allgemeine Geräte.....	19
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
3.3	Kit-Systeme	21
3.4	Antikörper	21
3.5	Chemikalien	21
4	Methoden	24
4.1	Zellkultur	24
4.1.1	HG3-Zellen	24
4.1.2	HEK-293T-Zellen.....	25
4.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblau-Färbung.....	25
4.2	Plasmidpräparation.....	26
4.2.1	Vorkultur und Hauptkultur.....	26
4.2.2	Plasmidisolation.....	27
4.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung mittels OD-Messung.....	28
4.3	Lentivirusproduktion und Transduktion.....	28
4.4	Proteinbiochemische Methoden	33
4.4.1	Herstellung von Protein-Lysaten.....	33
4.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
4.4.4	Western Blot	37
4.4.5	Immunfärbung und Analyse.....	38
4.5	Feststellung der Viabilität mittels Propidiumiodidfärbung	40
4.6	$[^3\text{H}]$ -L-Argininaufnahme unter NEM	41
4.7	Feststellung der Zellproliferation mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbaus.....	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Evaluation der shRNAs zur Expressionshemmung von γ^+ LAT1 und 2	44

5.2	Evaluation des Zeitrahmens für die funktionellen Versuche.....	48
5.3	Ablauf eines Versuchsdurchgangs	49
5.4	Gesamtergebnis der Versuchsdurchgänge unter γ^+ LAT1-Suppression	56
5.5	Gesamtergebnis der Versuchsdurchgänge unter γ^+ LAT2-Suppression	60
6	Diskussion.....	65
6.1	Der Transporter hCAT-1 ist essentiell für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen	65
6.2	Identifikation weiterer kationischer Aminosäuretransporter in den CLL-Zellen.....	66
6.3	Die Transporter γ^+ LAT1 und 2 spielen keine Rolle für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen.....	68
6.4	Argininakkumulation unter der Hemmung der Transporter des γ^+ L-Systems	70
6.5	Ausblick	71
7	Zusammenfassung	74
8	Literaturverzeichnis.....	76
9	Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zentrifugiertes Blut, Gesund vs Leukämie	1
Abbildung 2: Die Hämatopoese	2
Abbildung 3: Argininmetabolismus	6
Abbildung 4: Verteilung des γ^+ LAT1 im menschlichen Körper.....	9
Abbildung 5: Verteilung des γ^+ LAT2 im menschlichen Körper.....	10
Abbildung 6: Proliferation primärer CLL-Zellen.....	11
Abbildung 7: mRNA-Expression der Arginintransporter in den CLL-Zellreihen	13
Abbildung 8: Argininaufnahme, Proliferation und Zelltod in HG3-Zellen nach hCAT-1-Suppression	14
Abbildung 9: Tumorwachstum unter Doxycyclin induzierter hCAT-1-Suppression	15
Abbildung 10: Expression von γ^+ LAT1 in HG3-Zellen nach Exposition unterschiedlicher shRNAs	45
Abbildung 11: Expression von γ^+ LAT2 in HG3-Zellen nach Exposition unterschiedlicher shRNAs	46
Abbildung 12: Expression von γ^+ LAT2 in transduzierten HG3-Zellen mit verschiedenen shRNAs.....	47
Abbildung 13: γ^+ LAT1-Suppression über 36 Tage.....	49
Abbildung 14: γ^+ LAT1-Suppression über 60Tage.....	50
Abbildung 15: [3 H]-Argininaufnahme unter γ^+ LAT1-Suppression der HG3-Zellen in Lenti 09	52
Abbildung 16: Viabilität der HG3-Zellen unter γ^+ LAT1-Suppression Lenti 09.....	53
Abbildung 17: Proliferation der γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen Lenti 09.....	54
Abbildung 18: Versuchsdurchgang Lenti 09 unter γ^+ LAT2-Suppression	55
Abbildung 19: Zusammenfassung der γ^+ LAT1-Restexpressionen	57
Abbildung 20: [3 H]-Argininaufnahme nach γ^+ LAT1-Suppression von Lenti 07 und 09	58
Abbildung 21: Viabilität Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT1-Suppression.....	59
Abbildung 22: Proliferation Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT1-Suppression	60
Abbildung 23: Zusammenfassung der γ^+ LAT2 Restexpression aller Durchgänge	61
Abbildung 24: [3 H]-Argininaufnahme nach γ^+ LAT2-Suppression von Lenti 07 bis 09	62
Abbildung 25: Viabilität Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT2-Suppression.....	63
Abbildung 26: Proliferation Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT2-Suppression	64
Abbildung 27: Expression der Transporter hCAT-1, γ^+ LAT1 und 2 in HG3-Zellen	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: RPMI 1640 Vollkulturmedium	24
Tabelle 2: DMEM-Vollkulturmedium	25
Tabelle 3: Trypanblaulösung	26
Tabelle 4: LB-Medium.....	27
Tabelle 5: Chloroquinlösung	30
Tabelle 6: Präzipitatlösung	30
Tabelle 7: 2xHBS	31
Tabelle 8: Plasmidkonstrukte für die Lentivirale Transduktion einer shRNA gegen γ^+ LAT1 und 2, sowie einer <i>non-target</i> -RNA	31
Tabelle 9: RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor	33
Tabelle 10: BSA-Standardreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung.....	34
Tabelle 11: Sammelgel und Trenngel.....	35
Tabelle 12: 1M Tris-Lösung pH 8	36
Tabelle 13: 10% SDS-Lösung	36
Tabelle 14: 10% Ammoniumpersulfat (APS)	36
Tabelle 15: 10x SDS-Laufpuffer	36
Tabelle 16: 2x-Sample-Buffer mit Urea 8M	37
Tabelle 17: Elektrobloiting-Puffer	37
Tabelle 18: 10x TBS	39
Tabelle 19: 1x TBS-Tween	39
Tabelle 20: Ponceau S	39
Tabelle 21: Blotto mit Ziegenserum	39
Tabelle 22: Antikörperverdünnungspuffer.....	40
Tabelle 23: 10x PBS	40
Tabelle 24: Im Western Blot verwendete Antikörper	40
Tabelle 25: 10x Locke's Lösung	42
Tabelle 26: 1x BSA-Locke's Lösung (1xBSA-LL)	42
Tabelle 27: Radioaktive Aufnahmelösung	43
Tabelle 28: Vorinkubationslösung mit NEM.....	43
Tabelle 29: Transporter-Suppression im Verhältnis zur Argininaufnahme	70

Abkürzungsverzeichnis

4F2hc	4F2 <i>heavy chain</i>
ADI-PEG 20	<i>PEGylated arginine deiminase 20</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatynthetase
BAS	basische Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	<i>Cationic amino acid transporter</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HAT	heteromeren Aminosäuretransporter
hCAT	Humaner CAT
HGNC	Human Gene Organisation Gene Nomenclature Committee
k.o.	<i>Knock-out</i>
KM	Knochenmark
LPI	lysinurischen Proteinintoleranz
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NAS	neutral Aminosäure
NEM	N-Ethylmaleimid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer

RNA	Ribonucleic acid
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SV40	Simian Virus 40
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
y ⁺ LAT	System y ⁺ L Aminosäuretransporter

1 Einleitung

1.1 Leukämieformen

Der Begriff der Leukämie wurde von dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow geprägt, der nach dem Zentrifugieren des Blutes seiner Patienten/Patientinnen eine Zunahme der Leukozytenmanschette feststellte (Abbildung 1). Diese präsentierte sich im Vergleich zu den Erythrozyten und dem Serum als breite weiße Schicht, weshalb er die Erkrankung Leukämie nannte, was aus dem Griechischen übersetzt „weißes Blut“ heißt (1).

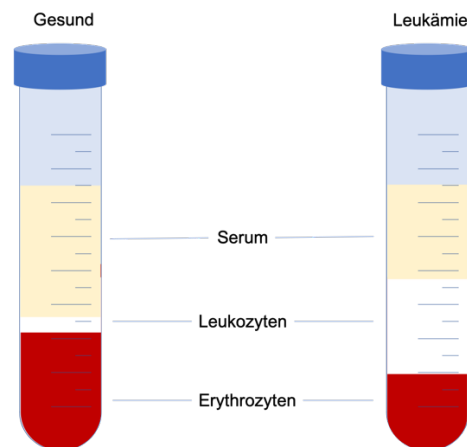


Abbildung 1: Zentrifugiertes Blut, Gesund vs Leukämie

Abgebildet ist das Schema zweier Reagenzröhrchen mit zentrifugiertem Blut, je einer gesunden und einer an Leukämie erkrankten Person. Deutlich zu erkennen ist die erweiterte Leukozytenmanschette bei der an Leukämie erkrankten Person (1). Erstellt mit Motifolio©

Die Bezeichnung der Leukämie ist historisch gewachsen und umfasst heute eine Vielzahl an Bluterkrankungen. Diese gehen nicht alle mit einer Erhöhung der Leukozytenzellzahl einher, vielmehr kann es beispielsweise bei den akuten Leukämien auch zu einer Leukozytopenie kommen.

Die Leukämien lassen sich grob einerseits nach ihren Ursprungszellreihen in myeloisch und lymphatisch, sowie andererseits nach ihren klinischen Verlaufsformen in akut und chronisch einteilen. Daraus ergeben sich folgende vier Hauptgruppen (2):

- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronisch myeloische Leukämie (CML)
- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die akuten Leukämieformen AML und ALL zeichnen sich durch eine übermäßige Proliferation von unreifen Blasten der myeloischen bzw. lymphatischen Zellreihe aus, bei denen funktionales zellbildendes Knochenmark (KM) verdrängt wird und sich Zytopenien ausbilden können (Abbildung 2) (3, 4).

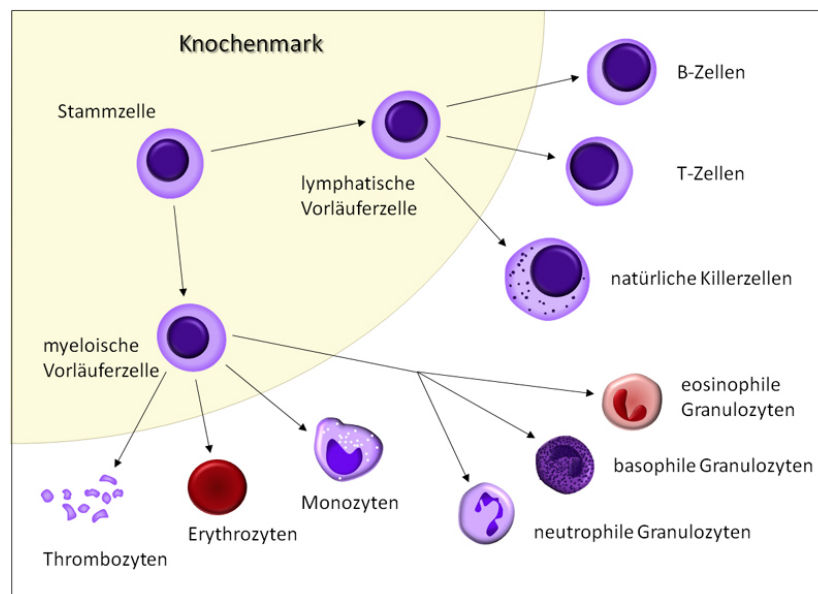


Abbildung 2: Die Hämatopoese

Abgebildet ist die Hämatopoese ausgehend von den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Bereits früh trennt sich der Entwicklungsweg in zwei Zelllinien, den myeloischen und den lymphatischen, auf. Aus den myeloischen Vorläuferzellen entstehen die Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und die verschiedenen Gruppen der Granulozyten. Der lymphatischen Zellreihe entstammen die B-Zellen, T-Zellen und die natürlichen Killerzellen. Quelle: https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/, abgerufen am 05.03.2020 (5).

Im Gegensatz zu den akuten verlaufen die chronischen Leukämieformen CML und CLL langsamer und die Symptome sind für die Erkrankten erst später wahrnehmbar. Aufgrund dessen wird die Erstdiagnose der CML bei mehr als 97% der Betroffenen in der chronischen Phase gestellt. Unbehandelt geht diese in eine Akzelerationsphase über und endet in einer Blastenkrise, die einer unbehandelten akuten Leukämie ähnelt und meist tödlich verläuft. Ursächlich für die CML ist

eine spezifische Chromosomenaberration der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes, die zu einer verstärkten klonalen Proliferation führt (6).

1.2 Die chronische lymphatische Leukämie

Der Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit liegt auf der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). Diese gilt als die häufigste Leukämieform, wobei es sich im engeren Sinne um ein Lymphom handelt, da sich ihr proliferativer Ursprung im Lymphsystem befindet. Erst bei der Infiltration des Blutes und des Knochenmarkes kommt es zu einer lymphozytären Leukozytose, deren Erscheinungsbild historisch dafür sorgte, dass die CLL zu den Leukämien gezählt wurde. Da die anderen bereits erwähnten Leukämieformen ihren Ausgangspunkt im Knochenmark haben, zählen diese indes zu den echten Leukämien.

Nach der Klassifikation der World Health Organization (WHO) zählt die CLL zu den indolenten Non-Hodgkin Lymphomen, bei der die B-Zellreihe betroffen ist. Symptomatisch für die CLL sind schmerzfreie geschwollene Lymphknoten, allgemeine Abgeschlagenheit, Infektanfälligkeit und B-Symptomatik, bestehend aus Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber. Die Therapie richtet sich nach der Stadieneinteilung nach Binet und Rai, sowie dem „Fitheitsgrad“ der Erkrankten. Hierfür stehen konventionelle Chemotherapeutika, Antikörper wie der CD20-Antikörper Rituximab und andere spezifische zielgerichtete Substanzen wie Inhibitoren von Proteinkinasen, sowie weitere Inhibitoren für die Tumorgenese relevante Regulatorproteine zur Verfügung, mit deren Hilfe jedoch keine Heilung erzielt werden kann.

Allein die allogene Stammzelltransplantation stellt eine potentiell kurative Lösung dar, die jedoch nicht für alle Betroffenen geeignet ist (7). Für die Transplantation müssen individuelle Faktoren wie das Alter und die Komorbiditäten der Erkrankten beachtet werden. Erschwerend ist der Umstand, dass zunächst eine kompatible spendende Person gefunden werden muss. Weiterhin besteht während der Konditionierung und nach der Transplantation aufgrund der Immunsuppression ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Auch kann eine *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) ausgelöst werden, bei dem das neu transplantierte Immunsystem die Körperzellen der empfangenden Person angreift. Eine akute GvHD tritt bei 30-60% aller allogenen transplantierten Patienten/Patientinnen auf. Diese wird versucht mithilfe von Immunmodulatoren zu kontrollieren (8, 9).

Somit besteht weiterhin der Bedarf nach neuartigen Medikamenten, die den Erkrankten weitere Therapieoptionen eröffnen können.

1.3 Restriktion von Aminosäuren

Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist die von Virchow beobachtete unkontrollierte Zell-Proliferation (10). Für diese durchlaufen die Tumorzellen den Zellzyklus einhergehend mit der Replikation ihres Genoms und der Anreicherung ihrer Zellmasse. Die für diesen Prozess benötigten Nährstoffe nehmen die Zellen mithilfe von membranständigen Transportern auf, die eigens hierfür verstärkt exprimiert werden. Insofern stellen diese Transporter eine grundlegende Stütze für das Tumorstoffwachstum dar, weshalb eine Intervention mit den Transportern als eine angreifbare Schwachstelle gilt, die mit einer Intervention des Tumorstoffwechsels gleich zu setzen ist (11).

Der Erfolg einer solchen Stoffwechselintervention zeigte sich bereits in den frühen 1970er Jahren bei der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie. So führte die Kombination des Enzyms Asparaginase mit den herkömmlichen Chemotherapeutika bei rund 90% der so behandelten Erkrankten zu einer Remission. Dabei spaltete die Asparaginase die für die Tumorzellen proliferationsnotwendige Aminosäure (AS) L-Asparagin in Asparaginsäure und Ammoniak auf und reduzierte das im Serum verfügbare L-Asparagin. Diese Reduktion wirkte global im Körper und betraf die Verfügbarkeit von L-Asparagin für alle Zellen. Besonders betroffen waren jedoch die ALL-Zellen, da sie die Fähigkeiten der Eigensynthese von Asparagin verloren hatten und durch die Reduktion der Asparaginkonzentration im Plasma kaum exogenes L-Asparagin importieren konnten. Mithilfe dieser Therapie konnte die Hemmung der DNA-, RNA- und Protein-Synthese mit anschließender Apoptose in den Lymphoblasten der ALL beobachtet werden (12).

Ein weiterer auf Aminosäuren (AS) basierender Therapieansatz ist die Restriktion von Cystein. Dieses benötigen Zellen neben der Proteinbiosynthese auch für die Synthese des antioxidativen Tripeptides Glutathions (Cystein, Glycin, Glutaminsäure), mit dessen Hilfe die Zellen die toxische Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) neutralisieren können (13). Da die CLL-Zellen die Fähigkeit zur Eigensynthese von Cystein verloren haben, sind sie vollständig auf den Import von exogenem Cystein für die Glutathion-Synthese angewiesen. Diese Eigenschaft wird als Cystein-Auxothrophie bezeichnet. Unter der von Zhang et al. durchgeführten Studie konnte beobachtet werden, dass unter Chemotherapie hohe Konzentrationen von ROS in den neoplastischen CLL-Zellen anfallen, die zum konsekutiven Untergang der Zellen führten. Lediglich im Knochenmark der Betroffenen gelang es vereinzelt CLL-Zellen, aufgrund hoher Cysteinkonzentrationen, bereitgestellt durch die Stromazellen, zu überleben (14, 15). Um die verbliebenen CLL-Zellen therapeutisch zu erreichen, versuchten die Autoren den

Zellen den Zugang zu Cystein zu verwehren. Hierfür wurde der Aminosäuretransporter xCT⁻, der für den überwiegenden Transport von Cystein in die CLL-Zellen zuständig ist, blockiert. Allerdings erwies sich diese Methode als unzureichend, da noch ausreichend Cystein über die Alternativtransporter ASCT1 und ASCT2 transportiert wurde, weshalb eine solche Restriktion auf zellulärer Ebene nicht zielführend war.

Die Gruppe um Cramer et al. entschied sich für einen systemischen Ansatz, bei dem das freie Cystein im Serum gesenkt wurde. Hierzu wurde Cysteinase, ein Enzym das Cystein abbaut, in Kombination mit ROS-erhöhenden Chemotherapeutika verabreicht. Diese Kombinationstherapie führte zu einem Arrest des Zellzyklus und zur Induktion der Apoptose in Tiermodellen (16).

In beiden Beispielen waren die Tumorzellen auf den Import bestimmter exogener Aminosäuren angewiesen, die sie selbst nicht mehr synthetisieren konnten.

1.4 Rolle des Arginins

Analog zur Restriktion von Asparagin und Cystein beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe mit der Restriktion von Arginin, einer semi-essentiellen Aminosäure, die neben der Proteinbiosynthese für eine Vielzahl an intrazellulären Stoffwechselprozessen benötigt wird, wie beispielsweise der Entgiftung stickstoffhaltiger Verbindungen über den Harnstoffzyklus (Abbildung 3). Darüber hinaus dient Arginin als Substrat für die Synthese von biologisch aktiven Substanzen, wie Ornithin, Citrullin, Stickstoffmonoxid (NO), Kreatin und Glutamat. Weiterhin wirkt es als Regulator für zelluläre Prozesse, wie der Aktivierung der Proteinkinase mTORC1, die als Regulator einer zentralen Schaltstelle des Zellmetabolismus und der Proteinbiosynthese fungiert (17, 18).

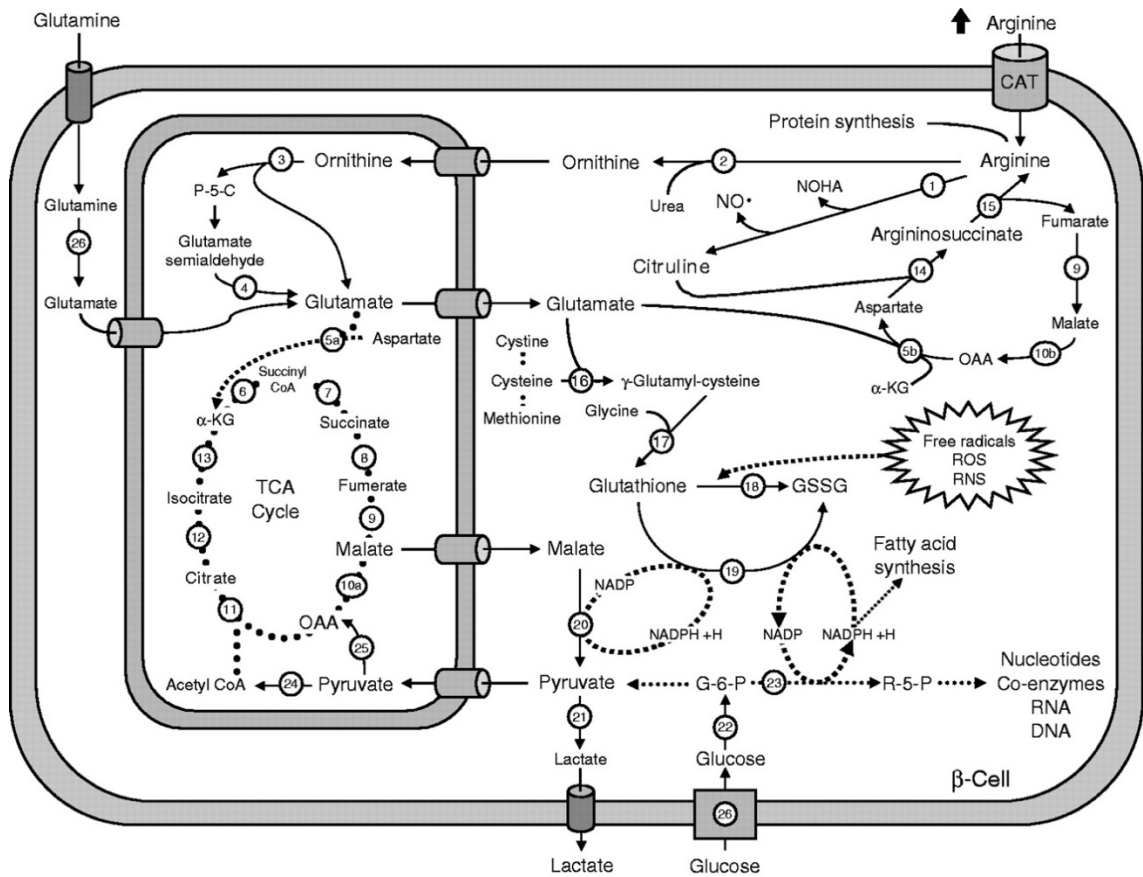


Abbildung 3: Argininmetabolismus

Dargestellt sind die vielfältigen Stoffwechselprozesse in denen Arginin involviert ist. Oben rechts wird die Aufnahme von exogenem Arginin über den kationischen Aminosäuretransporter (CAT) dargestellt. Darunter werden die enzymatischen Abbauprozesse zu Ornithin und Citrullin, die Arginin- und Glutathion-Synthese, sowie die Beteiligung der einzelnen Substanzen an dem links dargestellten Citratzyklus gezeigt. Quelle: <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0236>, abgerufen am 06.03.2020, L-arginine is essential for pancreatic β-cell functional integrity, metabolism and defense from inflammatory challenge (19).

Arginin spielt auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems. Es konnte *in vitro* eine verlängerte Viabilität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und eine verstärkte antitumorale Aktivität in murinen Modellen bei erhöhten intrazellulären Arginkonzentrationen festgestellt werden (20).

Die Gruppe um Rodriguez et al. konnte nachweisen, dass Arginin von entscheidender Bedeutung für die T-Zell Rezeptor Expression ist. Unter Argininmangel kam es hierbei zu einer verminderten Translation der Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors (21). Weiterhin führte ein Arginkonzentrationsabfall durch die granulozytäre Arginase zu einer Immunsuppression und bestätigte die immunstimulierende Funktion von Arginin (22).

Bei Erkrankten mit erniedrigten Plasma-Argininkonzentrationen, die an oro- und/oder hypopharyngealen Plattenepithelkarzinomen erkrankt waren, konnte die Langzeit-Überlebensrate signifikant erhöht werden, indem den Betroffenen präoperativ argininreiche Lebensmittel verabreicht wurden (23).

Arginin zählt zu den semi-essentiellen Aminosäuren, das bedeutet, dass der Körper grundsätzlich in der Lage ist, den Bedarf an Arginin durch Eigensynthese zu decken, es aber in besonderen Situationen wie Wachstum, Infektion, Entzündung o.Ä. zu Versorgungsengpässen kommen kann und der Körper dann auf die exogene Zufuhr von Arginin angewiesen ist (24).

Die aus dem Ornithinzyklus stammende Aminosäure Citrullin ist die Ausgangssubstanz der Arginin-Synthese. Aus Citrullin wird mithilfe der Enzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS) und Argininosuccinat-Lyase (ASL) in zwei Schritten Arginin hergestellt (25).

Das Vorkommen dieser beiden zytosolischen Enzyme ist dabei im großen Maße vom jeweiligen Gewebetyp abhängig. So haben einige Tumorarten die Fähigkeit der ASS-Expression über epigenetische Stilllegung verloren und gelten somit als argininauxotroph, was bedeutet, dass sie vollständig vom Import exogenen Arginins abhängig sind (26). Bekannt ist die Arginin-Auxotrophie bereits für Melanome, hepatozellulären Karzinomen, Prostatakarzinome u.a., sowie neuerdings auch bei hämatologischen Erkrankungen wie der ALL und der AML (26-29). Dies eröffnet die Perspektive der möglichen Behandlung, mittels einer argininrestriktiven Therapie.

In ersten klinischen Studien konnten bereits positive Resultate erzielt werden, bei denen die plasmatische Argininkonzentration mittels argininmetabolisierenden Enzymen (ADI-PEG 20) gesenkt wurde (30, 31). Die Gruppe um Miraki-Moud et al. belegte zudem, dass es unter dieser Arginindepletion zur induzierten Apoptose der Tumorzellen kam (32).

Arginin spielt daher, sowohl in der Entwicklung und Funktion des Immunsystems, als auch in der Tumorprogression eine entscheidende Rolle (27).

1.5 Arginintransporter

Für die Proteinbiosynthese und weitere intrazelluläre Stoffwechselwege sind Zellen auf Aminosäuren als Grundbausteine angewiesen. Diese hydrophilen Substanzen können die Lipiddoppelmembrane der Zellen nicht ohne Hilfe passieren, weshalb die Zellen Transporter für den Import und Export der Aminosäuren verwenden (33).

Für die Klassifikation der Transporter hat das Human Gene Organisation Gene Nomenclature Committee (HGNC) eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. Danach werden aktuell über 300 verschiedene Transporter unterschieden, die sich wiederum in über 60 Familien einteilen lassen (34-36).

Die für den Transport von Arginin zuständigen Aminosäuretransporter gehören zu den Familien der SLC6 und SLC7 (*Solute Carrier Family 6 and 7*) Transporter. Die Transporter der SLC7-Familie können wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden, die kationischen Aminosäuretransportern (CATs) und die heteromeren Transporter (HATs). Die HATs bestehen aus zwei unterschiedlichen Proteinen, den der SLC7-Familie zugehörigen leichten Ketten (*light chains* = lc), die die katalytisch aktiven Komponenten darstellen und den schweren Ketten 4F2hc (*heavy chains* = hc) oder rBAT, die der SLC3-Familie zugeordnet werden und die für die Lokalisation der leichten Ketten in die Plasmamembran wichtig sind. Zu den HATs zählen die Transporter y^+ LAT1 (SLC7A7), y^+ LAT2 (SLC7A6) und $b^{0,+}$ AT (SLC7A9). Hierbei sind die Transporter y^+ LAT1 und 2 mit dem Glykoprotein 4F2hc assoziiert, während das Glykoprotein rBAT mit dem Transporter $b^{0,+}$ AT in Verbindung steht (37).

Zu den CATs zählen die Transporter hCAT-1 (SLC7A1), hCAT-2A und hCAT-2B (SLC7A2) und hCAT-3 (SLC7A3), welche natriumunabhängig für den Hauptanteil des Arginin-Importes in die meisten Zellen verantwortlich sind (38, 39). Wie der Name nahelegt, transportieren die CATs nur kationische Aminosäuren, während die HATs zusätzlich neutrale Aminosäure (NAS) transportieren können.

Bereits vor der Nomenklatur der HGNC wurden die Transporter nach ihren Transporteigenschaften eingeteilt. Die CATs wurden dem System y^+ zugeordnet, das erstmals 1969 von Christensen und Antonioli in Retikulozyten aus Kaninchen beschrieben wurde (40). Der Namen der y^+ erklärt sich danach wie folgt: y steht für einen natriumunabhängigen Transport von basischen Aminosäuren (BAS). Ursprünglich stand es für Lysin und wurde Ly abgekürzt, nach dem Nachweis weiterer BAS, die transportiert wurden, ließ man das L wegfallen. Das + steht für die positive Ladung der BAS in physiologischer Umgebung, weshalb diese auch als kationische Aminosäuren bezeichnet werden. Hierzu zählen die Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin (38). Die HATs wurden dem System y^+L zugeordnet. Deves entdeckte 1992 dieses neue Transporter-System, das neben den kationischen AS noch zusätzlich neutrale AS transportieren kann. Der Buchstabe L wurde für die in den Experimenten transportierte NAS Leucin gewählt (41).

Die den HATs zugehörigen Transporter γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 sind obligatorische Austauscher. Sie können natriumunabhängig intrazelluläre BAS sowohl gegen extrazelluläre BAS tauschen, als auch natriumgekoppelt gegen große NAS aus dem extrazellulären Raum. Aufgrund des Natriumkonzentrationsgefälles zwischen intra- und extrazellulärem Raum findet überwiegend der Import von NAS im Austausch gegen BAS statt (33).

Der Transporter γ^+ LAT1 befindet sich hauptsächlich an der basolateralen Membran von Epithelzellen des Dünndarms und des Nierentubulus (Abbildung 4). Basische Aminosäuren werden von den Epithelzellen über den $b^{0,+}$ AT (*SLC7A9*) aus dem Darm oder aus dem Harn an der apikalen Seite der Epithelien aufgenommen und an der basalen Seite über den Transporter des γ^+ LAT1 wieder an das Blut abgegeben. Bei einem Defekt des γ^+ LAT1 kommt es zum klinischen Bild der lysinurischen Proteinintoleranz (LPI), einer seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit, die mit einer verminderten Resorption von BAS einhergeht. Diese äußert sich in Form von geistiger Retardierung, Gedeihstörungen, Übelkeit, Erbrechen, Hepatosplenomegalie, Osteoporose, Nierenfunktionsstörungen, Lungenbeteiligung, Knochenmarkanomalitäten, Koma und veränderter Immunantwort (37).

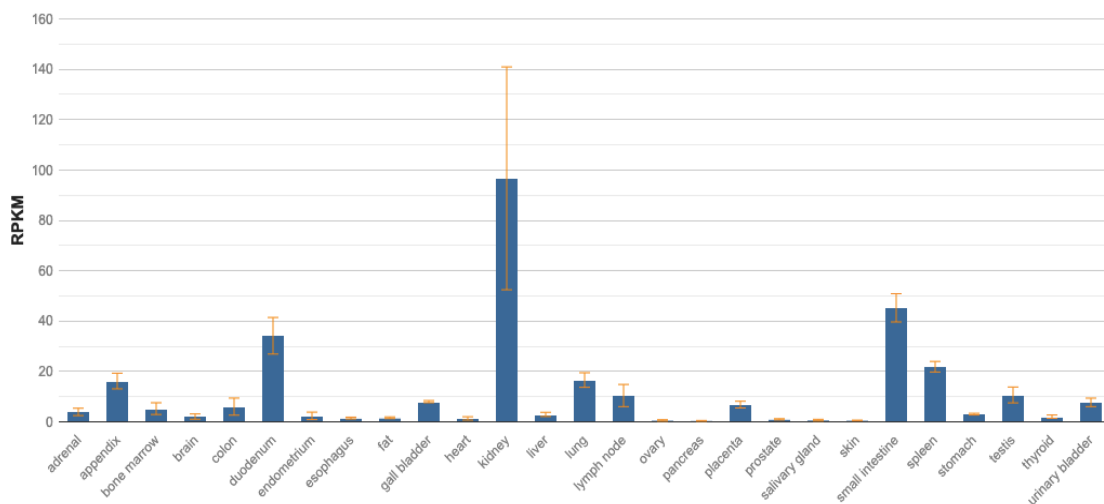


Abbildung 4: Verteilung des γ^+ LAT1 im menschlichen Körper

Dargestellt ist die relative Expression der γ^+ LAT1-RNA in 27 verschiedenen Körpergeweben von 95 unterschiedlichen Personen. Deutlich erkennbar ist die vermehrte Expression in Niere, Dünndarm und Zwölffingerdarm. Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9056#gene-expression>, abgerufen am 09.03.2020.

Der y^+ LAT2 ist weniger erforscht und es gibt bei dessen Ausfall kein klares klinisches Krankheitsbild. Die Transporteigenschaften decken sich mit denen des y^+ LAT1, wobei das Expressionsspektrum breiter ist und der y^+ LAT2 sowohl in zahlreichen epithelialen als auch nicht-epithelialen Zellen nachgewiesen werden kann (Abbildung 5) (42).

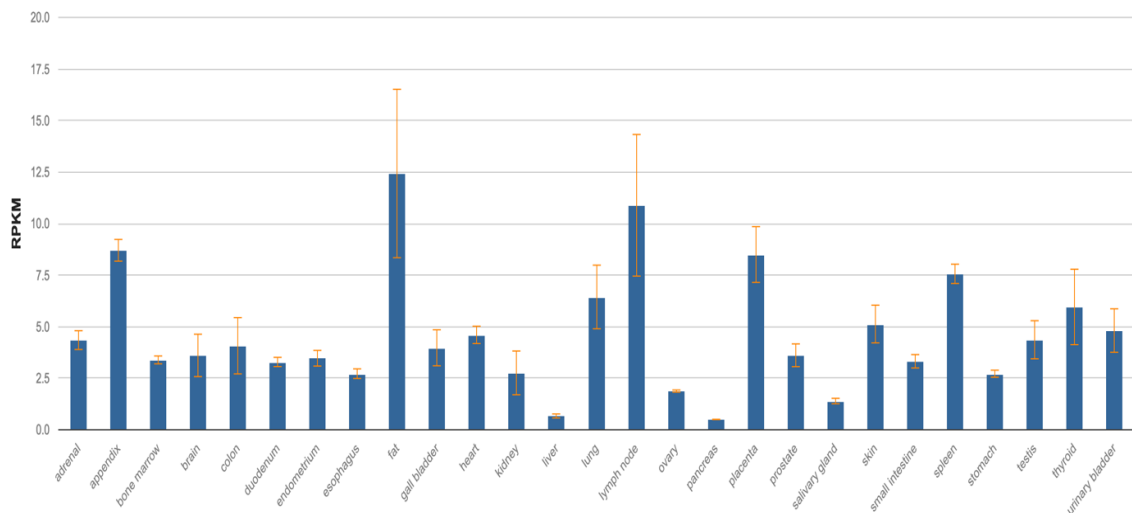


Abbildung 5: Verteilung des y^+ LAT2 im menschlichen Körper

Dargestellt ist die relative Expression der y^+ LAT2-RNA in 27 verschiedenen Körpergeweben von 95 unterschiedlichen Personen. Deutlich erkennbar ist das im Vergleich zum y^+ LAT1 vermehrte Vorkommen von y^+ LAT2. Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9057>, abgerufen am 24.11.2021.

Auch der $ATB^{0,+}$ Transporter befähigt Zellen zur Argininaufnahme. Er zählt allerdings zu der Familie der SLC6-Transporter und ist der einzige bekannte Transporter, der natriumabhängig Arginin importieren kann (33).

1.6 hCAT-1-Suppression

Ein Ziel unserer Arbeitsgruppe war die Ermittlung des Transporters, der für den Hauptimport von Arginin in die CLL-Zellen zuständig ist, und die Klärung der Frage ob sich dieser als Angriffspunkt für eine antitumorale Therapie eignen könnte. Für eine erfolgreiche Therapie mittels hCAT-1-Suppression müssten folgende Konditionen erfüllt sein:

- 1) die Zellproliferation und Viabilität müssen von Arginin abhängig sein (i)

- 2) die CLL-Zellen müssen argininauxotroph sein (ii)
- 3) den Zellen sollte nur ein Transporter für die Argininaufnahme zur Verfügung stehen (iii)

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es sowohl bei der Kultivierung von primären, humanen CLL-Zellen aus dem peripheren Blut von Erkrankten, als auch bei immortalisierten CLL-Zellreihen (HG3, MEC1, JVM-2) in argininfreier Umgebung zu einem vollständigen Proliferationsstopp kam (Abbildung 6) (39). Diese Erkenntnisse wurden gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Dissertation publiziert. Die grundlegende Voraussetzung für eine argininrestriktive Therapie ist somit gegeben (i).

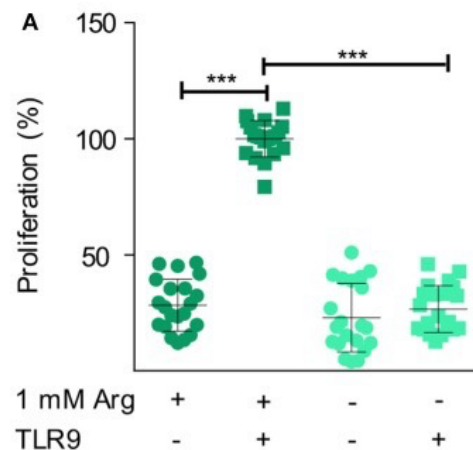


Abbildung 6: Proliferation primärer CLL-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von primären CLL-Zellen unter oder ohne Arginin (Arg+/-) und unter oder ohne Stimulation mit dem Wachstumsfaktor Toll-ähnlichen Rezeptor 9-Agonist (TLR9 +/-). Die primären CLL-Zellen aus dem peripheren Blut von Erkrankten proliferieren nur unter der Stimulation von TLR9, da sie physiologisch in der G0/G1 Phase des Zellzyklus gefangen sind. Zusätzlich benötigen sie extrazelluläres Arginin zur Proliferation. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test (***: $p \leq 0,001$) Quelle: Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability (39).

Für die zweite Kondition wurde die Expression des Enzymes Argininosuccinat-Synthase überprüft. Dieses Enzym dient den Zellen zur Eigensynthese von Arginin. Hier konnten wir zeigen, dass nur bei einem von den 18 untersuchten Betroffenen die CLL-Zellen über das Enzym ASS verfügten. Selbst ein Argininmangel und eine Wachstumsstimulation führten nicht zu einer Induktion der ASS.

Eine Wachstumsstimulation der primären CLL-Zellen mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor 9-Angonisten (TLR9) war nötig, da sich die Zellen in der peripheren Blutbahn in einem Zellzyklusarrest in den Phasen G0/G1 befanden. Durch die Stimulation konnten die primären CLL-Zellen erneut zur Proliferation angeregt werden (43). Hingegen benötigten die immortalisierten CLL-Zellreihen keine Proliferationsstimulation. Eine Kultivierung dieser unter Argininmangel über einen Zeitraum von 48 Stunden führte zu einer mäßigen ASS-Induktion. Die immortalisierten Zellen benötigten verglichen mit der physiologischen Körperkonzentration allerdings eine 25 bis 50fach höhere Citrullinkonzentration, um eine Proliferation wieder in Gang zu setzen. Somit gelangten wir zu der Hypothese, dass CLL-Zellen als argininauxotroph angesehen werden können (ii).

Für die dritte Kondition wurden die Expressionen aller potenziellen Arginintransporter auf mRNA-Ebene in den CLL-Zellen untersucht, in denen die mRNA der Transporter hCAT-1, γ^+ LAT1, γ^+ LAT2 und $b^{0,+}$ AT detektiert werden konnten. In der HG3-CLL-Zellreihe ist der γ^+ LAT1 auf mRNA-Ebene stark exprimiert, während die Expressionen der Transporter hCAT-1 und γ^+ LAT2 um etwa 60% niedriger lagen. Der Transporter $b^{0,+}$ AT wurde kaum von den HG3-Zellen exprimiert (Abbildung 7) (44). Unter physiologischen Bedingungen dient der hCAT-1 und der $b^{0,+}$ AT dem Import von Arginin, während die γ^+ LAT1 und 2 Transporter für den Export zuständig sind.

Die Annahme, dass die kanzerogenen Zellen einen erhöhten Argininbedarf für Proliferation und Wachstum haben, bestätigte sich auf mRNA-Ebene. Hierzu wurden die mRNA-Menge der Arginintransporter von primären CLL-Zellen im nicht stimulierten und stimulierten Zustand gemessen. Unter Stimulation zeigte sich eine verstärkte hCAT-1-Expression bei wiederum verringerter γ^+ LAT1- und gleichbleibender γ^+ LAT2-Expression verglichen mit den nicht stimulierten Zellen.

Dieses Expressionsmuster legte die Vermutung nahe, dass die Zellen versuchen, ihren Argininimport zu erhöhen, während sie kompensatorisch die exportierenden Transporter herunterregulieren.

Für die Differenzierung welcher der kationischen Aminosäuretransporter für den Hauptanteil der Argininaufnahme zuständig ist, wurden die verschiedenen Transporter-Systeme gehemmt und die Aufnahme von radioaktiv markiertem Arginin gemessen. Unter der Hemmung des γ^+ -Systems mit N-Ethylmaleimid (NEM), dessen einziger in den HG3-Zellen detektierbare Vertreter der hCAT-1 war, zeigte sich eine um 75,8% reduzierte Argininaufnahme, was diesen als Hauptimporteuer für Arginin identifizierte (44). Aufgrund der fast nicht vorhandenen Expression des Transporters $b^{0,+}$ AT und der Tatsache, dass die Transporter γ^+ LAT1

und 2 in physiologischer Umgebung überwiegend für den Export von Arginin zuständig sind, vermuteten wir, dass die CLL-Zellen lediglich über den hCAT-1 als Argininimportierenden Transporter verfügten. Somit trifft auch die dritte Kondition zu (iii).

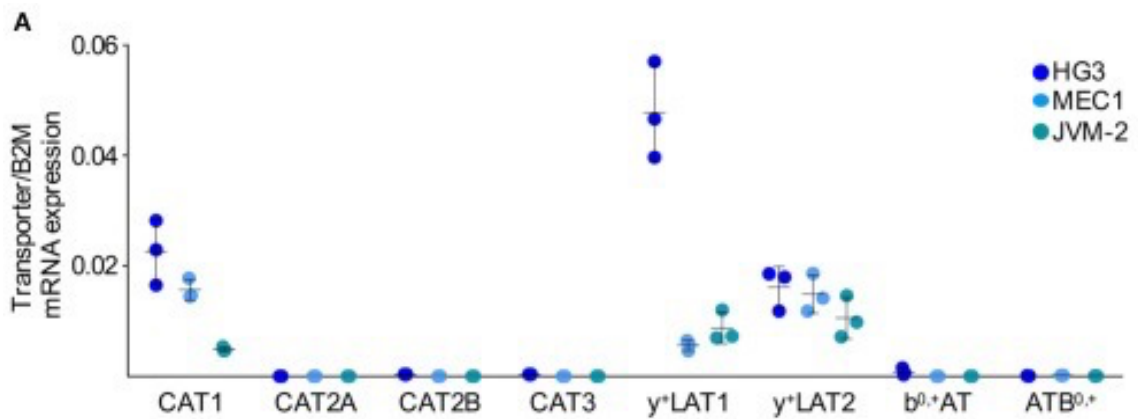


Abbildung 7: mRNA-Expression der Arginintransporter in den CLL-Zellreihen

Expression der Arginintransporter in den CLL-Zellreihen HG3, MEC1 und JVM-2 auf mRNA-Ebene. Die Transporter hCAT-1, y⁺LAT1, y⁺LAT2 und b^{0,+}AT werden exprimiert. Besonders in der HG3-Zellreihe wird der y⁺LAT1 stark exprimiert. Quelle: Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability (39).

In der Folge dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass der hCAT-1 Transporter essentiell für die Argininversorgung der CLL-Zellen ist.

Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde die hCAT-1-Expression mittels *small-hairpin*-RNA (shRNA) supprimiert und die Auswirkungen in verschiedenen Experimenten an den HG3-Zellen überprüft.

Unter Suppression des Transporters konnte eine verminderte Argininaufnahme nachgewiesen und in den nachfolgenden Experimenten ein Proliferationsstopp und ein vermehrter Zelltod beobachtet werden (Abbildung 8). Der Nachweis des Zelltodes gelang mithilfe von Annexin und Propidiumiodid (PI). Annexin band an das in der Plasmamembran eingelagerte Phospholipid Phosphatidylserin, welches sich bei intakten Zellen intrazellulär befand und lediglich bei der zelltodbedingten Rekonfiguration durch Membranausstülpungen für Annexin zugänglich wurde. PI ist ein Nukleinsäure-Interkalator, der nur die Zellmembran von toten

Zellen durchdringen konnte (45). Das gleiche Bild von Proliferationsstopp und vermehrtem Zelltod wurde auch bei der Kultivierung von nicht transfizierten HG3-Zellen in argininfreiem Medium beobachtet. Somit konnte bestätigt werden, dass die CLL-Zellen auf die Argininaufnahme mittels hCAT-1-Transporter für ihre Viabilität und Proliferation angewiesen sind.

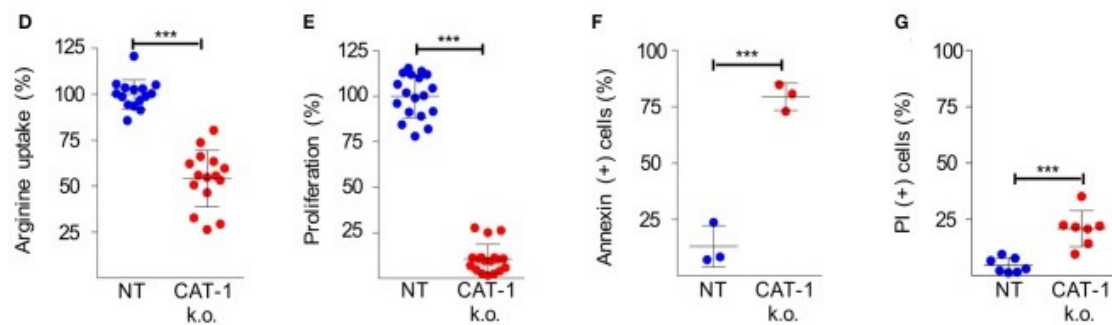


Abbildung 8: Argininaufnahme, Proliferation und Zelltod in HG3-Zellen nach hCAT-1-Suppression

Nach hCAT-1-Suppression (CAT-1 k.o.) und Kultur in regulären 1mM argininhaltigem Medium kommt es im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen (NT) bei den transportersupprimierten HG3-Zellen zu einer verminderten Aufnahme von Arginin (D), zu einem Proliferationsstopp (E) und zu einem erhöhten Untergang von Zellen (G) und (F). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test (***: $p \leq 0,001$). Quelle: Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability (39).

Neben den beschriebenen *in vitro* Versuchen wurde das Tumorverhalten unter hCAT-1-Suppression auch *in vivo* erforscht. Hierzu wurde ein Xenograft-Modell erschaffen, in dem Mäusen HG3-Zellen implantiert wurden. Mittels Doxycyclin-induzierbarer shRNA konnte eine hCAT-1-Suppression initiiert werden, bei der ein verzögertes Tumorstadium beobachtet werden konnte (Abbildung 9). Das Tumorstadium konnte lediglich verzögert und nicht gänzlich gestoppt werden. Ursachen und etwaige Kompensationsmechanismen für das wiederaufflammende Wachstum wurden untersucht. Dabei zeigte sich eine kontinuierliche hCAT-1-Suppression und ein unverändertes Expressionsprofil der anderen Arginintransporter. Eine in den HG3-Tumorzellen detektierbare ASS-Expression des Xenograft-Modells könnte eine Ursache für den Durchbruch des Tumorstadiums sein.

In den primären CLL-Zellen, die den Erkrankten direkt entnommen wurden, zeigte sich mit Ausnahme einer Person hingegen keine ASS-Expression. Auch unter einer Arginindepletion und Stimulation mit TLR9 konnte keine ASS-Reinduktion beobachtet werden. TLR9 aktivierte in den Zellen ein Translationsprofil,

das den Proliferationsprozessen in den Lymphknoten *in vivo* stark ähnelte, so dass wir annahmen, dass es auch in den Patienten/Patientinnen zu keiner ASS-Reinduktion kommen wird (39). Somit könnte eine Arginindepletion mittels Hemmung des hCAT-1-Transporters eine mögliche Therapieoption für Erkrankte darstellen.

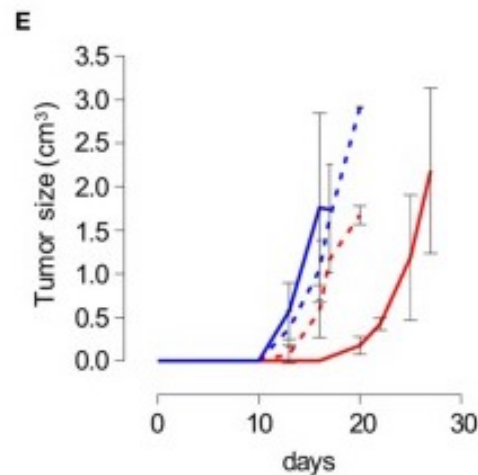


Abbildung 9: Tumorwachstum unter Doxycyclin induzierter hCAT-1-Suppression

Die Mausmodelle wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: rot mit Doxycyclin- und blau ohne Doxycyclin-Gabe. Das Antibiotikum Doxycyclin aktiviert die Transkription der shRNA. Jede Gruppe enthielt eine Kontrolle mit einer induzierbaren *non-target* shRNA (gestrichelt Linie) und einer Probe mit induzierbaren hCAT-1 knock-out shRNA (durchgängige Linie). Es zeigte sich ein zeitverzögertes Tumorwachstum der HG3-Zellen bei der induzierten Suppression von hCAT-1. Quelle: Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability (39).

1.7 Die Rolle von γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2

Bereits in der Frühphase der Experimente zur hCAT-1-Suppression zeichnete sich eine vielversprechende Wirkung im Hinblick auf die CLL-Zellen ab, sodass sich parallel die Frage stellte, inwieweit die Aminosäuretransporter γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 hinsichtlich der Viabilität und der Proliferation der HG3-Zellen eine Rolle spielen könnten.

Auf mRNA-Ebene wurden diese beiden Transporter neben dem hCAT-1 am stärksten exprimiert. Zudem konnte im [3 H]-Arginin-Aufnahmeversuch durch die

Hemmung des y^+L -Systems (y^+LAT1 und 2) und des Transporters $b^{0,+}AT$ mit Leucin eine um 53% verringerte Argininaufnahme beobachtet werden. Dies wies auf eine Beteiligung eines dieser Systeme neben dem hCAT-1 hin. Zur Differenzierung zwischen den Transportern des y^+L -Systems und dem Transporter $b^{0,+}AT$ diente die Durchführung des Arginin-Aufnahmeversuch unter der gleichzeitigen Gabe von NEM und Leucin, sowie in Abwesenheit von Natrium. NEM hemmte die Argininaufnahme über den hCAT-1, während Leucin als NAS sowohl den Transporter y^+LAT1 und 2 und dem Transporter $b^{0,+}AT$ als Substrat diente. Allerdings konnten die Transporter des y^+L -Systems Leucin nur in Anwesenheit von Natrium importieren, während der Transporter $b^{0,+}AT$ dieses natriumunabhängig aufnehmen konnte. Wir beobachteten eine Argininaufnahme unter dieser Konstellation aus Natriummangel, NEM und Leucin. Dies sprach dafür, dass die Transporter y^+LAT1 und 2 keine extrazelluläre NAS im Austausch gegen intrazelluläre BAS aufnehmen, sondern ein Austausch von BAS gegen BAS stattfand, der dafür sorgte das radioaktiv-markiertes Arginin aus dem extrazellulären Raum aufgenommen wurde. Eine Aufnahme von Arginin über den $b^{0,+}AT$ war aufgrund der vorliegenden Substrat-Inhibition durch Leucin und der nur geringen Expression des Transporters in den HG3-Zellen als unwahrscheinlich anzusehen (33). Es konnte somit im [3H]-Arginin-Aufnahmeversuch gezeigt werden, dass neben dem hCAT-1 noch die Transporter des y^+L -Systems eine Rolle in der Argininaufnahme spielten (44).

Trotz ihrer überwiegenden Exporteigenschaften für BAS in physiologischer Umgebung konnte eine Argininaufnahme nicht ganz ausgeschlossen werden. Daher stellte sich die Frage, welcher der beiden Transporter y^+LAT1 oder 2 des y^+L -Systems in den CLL-Zellen den größeren Anteil an der Argininaufnahme haben könnte und ob einer dieser beiden Transporter eine entscheidende Rolle für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen spielen könnte.

Im Hinblick auf den y^+LAT1 -Transporter konnte bislang keine klare Aussage darüber getroffen werden, welchen Effekt eine verminderte oder erhöhte Expression in verschiedenen Tumorarten auf Wachstum und Überleben hat.

Eine Überexpression des y^+LAT1 ging mit einer schlechteren Prognose bei Erkrankten mit Glioblastom einher (46). Zudem konnte die Gruppe um Cheng et al. mittels Sequenzierung des Transkriptoms eine Überexpression des y^+LAT1 in Ovarialtumoren feststellen, welche eine Schlüsselfunktion in der Chemotherapie-Resistenz innehaben könnte, da vermutet wird, dass der Transporter die Aufnahme und Abgabe von Medikamentenwirkstoffen modulieren könnte (47).

Doch nicht in allen Tumorentitäten wird ein vermehrtes y^+ LAT1-Vorkommen als tumorfördernd angesehen. Bei Patienten/Patientinnen mit Multiplem Myelom verbesserte sich hingegen die Prognose bei erhöhter y^+ LAT1-Expression (48).

Xie et al. wiederum brachten eine Herunterregulation des y^+ LAT1 mit einer erhöhten Radioresistenz bei nicht kleinzelligem Lungenkarzinom in Verbindung (49).

Aus den unterschiedlichen Studienergebnissen konnte daher nicht abgeleitet werden, welche Rolle der y^+ LAT1 für die CLL-Zellen einnimmt.

Für den y^+ LAT2 Transporter gab es zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Dissertation keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Transporterexpression und dem Tumorwachstum untersuchten.

In der vorliegenden Arbeit sollten analog zu den Versuchen mit dem hCAT-1 die Aminosäuretransporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 mittels shRNA-Transfektion supprimiert und die Auswirkungen auf die CLL-Zellen erforscht werden.

2 Ziele der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass chronische lymphatische Leukämiezellen (CLL) zum Überleben und zum Wachsen von dem Import der basischen Aminosäure Arginin abhängig sind, da sie die Fähigkeit der Eigensynthese von Arginin verloren haben. Für den Arginintransport stehen den CLL-Zellen die Aminosäuretransporter hCAT-1, y^+ LAT1 und 2 zur Verfügung. Für den hCAT-1 konnte nachgewiesen werden, dass eine shRNA vermittelte Suppression der Transporterexpression zu einer verminderten Argininaufnahme führte, verbunden mit einem konsekutiven Zelluntergang und Proliferationsstopp der CLL-Zellen.

Analog zu den Versuchen mit dem Transporter hCAT-1 war das Ziel dieser Arbeit, die anderen beiden Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 auf ihre Rolle für die Viabilität und Proliferation der B-Zell-Leukämiezellen hin zu überprüfen.

Die ausgewählte Methode für die Suppression der Aminosäuretransporter war die Lentivirale Transduktion, bei der eine shRNA in die CLL-Zellen eingebracht wurde. Die shRNA wurde in mehreren Schritten zu einer small-interfering-RNA (siRNA) prozessiert, die teilweise oder vollständig komplementär zur messenger-RNA (mRNA) der Transporter war. Dies führte zu dem Zusammenschluss der si- und mRNA und deren damit verbundenen Abbau, mit der Folge, dass weniger Transporter exprimiert wurden.

Das erste Ziel bestand somit in der Ermittlung der passenden shRNA für die Transporter-Suppression von y^+ LAT1 und 2. Anschließend sollte der Zeitraum evaluiert werden, in dem die Transporter-Restexpressionen möglichst gering waren, um die funktionellen Versuche der Argininaufnahme, der Viabilität und der Proliferation durchführen zu können.

In der so festgestellten Zeitspanne galt es die Versuchsdurchgänge für die Generierung einer ausreichenden Datenmenge zu Sicherung valider Ergebnisse drei bis viermal zu wiederholen.

3 Material

3.1 Allgemeine Geräte

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Laboport Neuberger (Freiburg)
Absorptions-Mikroplatten-Reader [Sunrise]	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Aufnahmegerät für Western Blots [Molecular Imager Chemi Doc XRS]	BioRad (München)
Begasungsbrutschrank [Heracell 150 Kupferausführung]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Blotkammer [TransBlot Electrophoretic Transfer Cell]	BioRad (München)
Brutschrank [mikrobiologisch WTB 37°C]	Binder (Tuttlingen)
Durchflusszytometer [BD Accuri C6 Flowcytometer]	BD Bioscience (San Jose, USA)
elekt. Piepette [Pipetus®-akku]	Merck KGaA (Darmstadt)
Flüssigszintillationszähler [Tri-Carb 2810TR Counter]	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Gelelektrophoresekammer [Perfektblue™ Doppelsystem Twin EXWS]	Peq-Lab (Erlangen)
Glas-Messpipetten	Brand (Wertheim)
Glas-Reagenzröhrchen	Schott (Mainz)
Gleichstromquelle [Power Pac 300]	BioRad (München)
Hochgeschwindigkeitszentrifuge [Avanti™ J-30 I mit Rotor JLA 16.250]	Beckman-Coulter (Krefeld)
Hochgeschwindigkeitszentrifuge [J2-MC mit Rotor 13.1]	Beckman-Coulter (Krefeld)
Inkubationsschüttler [Incubator Shaker Series innova 40]	New Brunswick Scientific (Echison, USA)
Kühlschrank [KTe 1740]	Liebherr (Biberach)
Magnetrührer [IKAMAG RCT]	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Mikroskop [Leitz DM IL]	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
pH-Meter [CG809]	Schott AG (Mainz)
Photometer [NanoDrop 2000]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetten [Pipetman®]	Gilson (Middelton, USA)
Pipettenspitzen 0,1-20 µl; 2-200 µl; 50-1000 µl	Greiner Bio-One (Frickenhäuser) Sarstedt (Nümbrecht)
Präzisionswaage [Kern 440]	Kern & Sohn GmbH (Bahlingen)
Schikanenkolben	Schott (Mainz)
Schüttler [IKA-VIBRAX-VXR]	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)

Sicherheitsbunsenbrenner [Fireboy eco]	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Sterilbank [Mikrobiologische Sicherheitswerkbank NF6.18S]	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Tischzentrifuge [Hereaus Megafuge 40R]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tischzentrifuge [Hereaus Multifuge X3R]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vortex-Gerät [Reax 2000]	Heidolph (Schwabach)
Wasseraufbereitungsanlage [Milli-Q-Plus]	Merck KGaA (Darmstadt)
Zentrifugenbecher 200 ml [PPCO-Centrifuge Bottle]	Nalgene (Rochester, USA)
Zentrifugenröhrchen	DuPont (Neuisenbourg)
Zentrifugenröhrchen	Kimble-Chase (Vineland, USA)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
30 ml Spritze [Luer-Lok]	Becton Dickinson and Company Limited (Irland)
6 Well Platte	Corning GmbH (Kaiserslautern)
96 Well Platte	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Beschichtete Petrischale 10 cm [Tissue Culture Dish 100x20mm] (#353303)	Falcon; Corning GmbH (Kaiserslautern)
Blotting-Papier (#742113)	Macherey-Nagel (Düren)
Einwegpipetten steril [Cellstar]	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Fotofilm [Hyperfilm™ ECL] (#28906837)	GE Healthcare Life science (Freiburg)
Glas-Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen (#4522)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Minivials	Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt)
Nitrozellulose Blotting Membrane [Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC]	GE Healthcare Life science (Freiburg)
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Petrischalen (#633161)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäß 0,2;0,5;1,5;2,0 ml und 1,5 ml mit Schraubdeckel	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Rundboden-Kunststoffröhrchen [Polypropylene round bottom tube with cap]	Falcon; Corning GmbH (Kaiserslautern)
Spritzenfilter 0,45 µm (#10462100)	Whatman GmbH (Dassel)
Suspensionskulturflasche [Cellstar white filter screw cap 50 ml] (#690195)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Suspensionskulturflasche [Cellstar white filtercap for suspensions cells 250 ml]	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Zählkammer [Glasstic Slide 10 with Grids]	Kova International Inc. (Carlifornien, USA)
Zellkulturflasche [Cellstar red filtercap for cell culture 550]	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturflasche [Cellstar red filtercap for cell culture 250]	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

3.3 Kit-Systeme

Material	Hersteller
Flow Cytometer Fluid Kit (#653158)	BD Bioscience (San Jose, USA)
Flow Cytometer Starter Kit (#653160)	BD Bioscience (San Jose, USA)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23225)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PureLink HiPure Plasmidfilter Purification Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)

3.4 Antikörper

Material	Hersteller
Anti γ^+ LAT-1 aff pur EP82 run1 22.08.12	Eurogentec im Auftrag der AG Closs
Anti γ^+ LAT-2 PP6 27.11.14	Eurogentec im Auftrag der AG Closs
GAPDH Rabbit mAB (#2218)	Cell Signaling (Danvers,USA)
Goat anti Rabbit IgG (#401393)	Merck KGaA (Darmstadt)

3.5 Chemikalien

Material	Hersteller
[3 H]-L-Arginin	New England Network Solutions (Boston, USA)
[3 H]-Methyl-Thymidine (#NET027E005MC)	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
2-Mercapthoethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
70% Ethanol vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Acrylamid 4K-Lösung 30% Mix 37,5:1 (#A1672)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Agar-Agar Kobe I pulv.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat ≥98% p.a. (#9592)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ampicillin	Ratiopharm GmbH (Ulm)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Chemilumineszenz [Western Lightning Plus ECL]	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Chloroquindiphosphat (#C6628)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (#T877)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (#D8537)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Eisessig [Acetic Acid Glacial]	Merck KGaA (Darmstadt)
Entschäumer [Antifoam A] (#A5758)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Fetales Kälber Serum (#F99665)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Glucose	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycerin (#A1123)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glycin >99% p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Harnstoff (#2317)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Hefeextrakt (pulv.)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
HEPES	KN Biomedicals Inc. (Aurora, USA)
Irgasafe Plus Szintillationscocktail	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
L-Glutamin (#G7513)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Magermilchpulver (#T145)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Methanol (#4627)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Molekulargewicht-Markierer [PageRuler™ Prestained Protein Ladder]	Fermentas Life Sciences (Leon-Rot)

N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
N-Glucosidase (Roche 11365193001)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Na-Desoxycholat	VWR (West Chester, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (#P0781)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Propidiumiodid-Färbelösung [Propidium Iodid Staining Solution] (#556463)	BD Bioscience (San Jose, USA)
Protaminsulfat (#P4505)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Proteaseinhibitor (#P8340)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Puromycin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Rinder-Albumin [Albumin bovine Fraction V] (#8076)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
RIPA (#R0278)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SDS ultra-pure (#2326)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Sodiumpyruvat (#S8636)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
TE Puffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
TEMED>99% p.a. (#2367)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tris Base	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton x100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Trypsin EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Tween 20 (#9127)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ziegen Serum (#CL 1200-100)	CEDARLANE (Ontario, Kanada)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit den Zellen fanden unter sterilen Bedingungen statt.

4.1.1 HG3-Zellen

Die Zellen der Zelllinie HG3 wurden ursprünglich aus dem peripheren Blut eines 70 Jahre alten kaukasischem Mann, der an einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL, Rai *stage* II) erkrankt war, isoliert und befinden sich seit 1998 in Zellkultur. Die HG3-Zellen sind in der PCR positiv für das Epstein-Barr-Virus, wobei die Infektion als latent eingestuft wurde und so die Zellen auf *Biosafety Level* 1 gehalten werden konnten. Sobald genetische Manipulationen stattfanden, wurden die Zellen unter *Biosafety Level* 2 weiter kultiviert.

HG3-Zellen sind Suspensionszellen, die im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in 10 ml RPMI 1640 Vollkulturmedium in einer 250 ml Zellkulturflasche mit Filterdeckel kultiviert wurden (Tabelle 1). Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 aufgeteilt. Da die Zellen zu Traubenbildung neigten, wurden sie vor dem Splitten durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert. Für die Weiterkultivierung wurde 1 ml der Zellsuspension in 19 ml frisches Medium überführt.

Ausschlaggebend für das suffiziente Zellwachstum war die Zelldichte. Die Proliferationsrate nahm drastisch ab, sobald die HG3-Zellen zu stark verdünnt wurden. Eine Konzentration von 2 Millionen Zellen pro 1 ml wurde toleriert.

Tabelle 1: RPMI 1640 Vollkulturmedium

RPMI 1640 ohne Glutamin	500 ml
Fetales Kälber Serum	50 ml
L-Glutamin 2 mM	5 ml
Pen/Strep (10000 U Pen., 10 mg Strep. in 0,9% NaCl)	5 ml

4.1.2 HEK-293T-Zellen

Bei den HEK-293T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, welche mit dem SV40 *large T*-Antigen ausgestattet sind, was durch die Abkürzung „T“ im Namen der Zelllinie erkenntlich ist. Dies ermöglicht die Amplifikation von Plasmiden mit einem SV40-Replikationsursprung (50). Diese Eigenschaft wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Produktion von Lentiviren mittels der Transfektion von lentiviralen Plasmiden in die HEK293T-Zellen genutzt.

Die adhärenenten embryonalen Nierenzellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bei 37°C in 20 ml DMEM Vollkulturmedium in einer 250 ml Zellkulturflasche mit Filterdeckel (Tabelle 2) kultiviert. Einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden diese zunächst mit 10 ml *Dulbecco's Phosphat Buffered Saline* (DPBS Ca²⁺/Mg²⁺-frei) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA für drei Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend in 10 ml serumhaltigen Medium (DMEM) aufgenommen, wodurch die Aktivität des Trypsins gestoppt wurde. Für die Fortsetzung der Kultivierung wurde 1 ml der Zellsuspension in 19 ml DMEM-Medium überführt.

Tabelle 2: DMEM-Vollkulturmedium

DMEM-Medium mit 4,5 g Glucose	500 ml
Fetales Kälber Serum	50 ml
L-Glutamin, 2 mM	5 ml
Pen/Strep (10000 U Pen., 10 mg Strep. in 0,9% NaCl)	5 ml
Natriumpyruvat 1 mM	5 ml

4.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblau-Färbung

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die kultivierten Zellen mit dem polyanionischen Azoarfarbstoff gefärbt, welcher nur von toten Zellen aufgenommen werden konnte und diese in der Folge dunkelblau anfärbte (Tabelle 3). Gezählt wurden nur die vitalen Zellen, die sich hell auf blau gefärbten Hintergrund darstellten. Dabei musste zügig vorrangingen werden, da Trypanblaulösung toxisch für die Zellen ist und so über die Zeit das Ergebnis hätte verfälschen können.

Für die Färbung wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,5%iger Trypanblaulösung gemischt und davon 6,6 µl in eine Zählkammer pipettiert. Um die durchschnittliche Zellzahl pro Feld zu errechnen, wurden jeweils drei große Felder ausgezählt und durch 3 dividiert. Das Volumen eines großen Feldes betrug 0,1 µl. Mit der folgenden Gleichung wurde die Zellzahl pro ml bestimmt:

Durchschnittliche Zellzahl pro großem Feld x Volumenfaktor pro großem Feld (10^4 ml^{-1}) x Verdünnungsfaktor (2) = Zellen/ml

Tabelle 3: Trypanblaulösung

Trypanblau	0,5 g	Trypanblaulösung lichtgeschützt lagern
------------	-------	--

4.2 Plasmidpräparation

4.2.1 Vorkultur und Hauptkultur

Die für die Lentivirale Transduktion benötigten Viren wurden mittels Transfektion von 3 verschiedenen Plasmiden in die eukaryotischen HEK-293T-Zellen hergestellt. Zwei der Plasmide waren Hilfsplasmide, die für die Enzyme und Hülle der Viren kodierten. Das dritte Plasmid pLKO.1-puro wurde mit der für die Transporter-hemmenden-shRNA-kodierenden-DNA beladen und von der Molecular Signaling Unit des Instituts für Immunologie der Universitätsklinik Mainz in Form von transformierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien zur Verfügung gestellt.

Für die Amplifikation des beladenen Plasmids pLKO.1-puro mussten zunächst die transformierten Bakterien vermehrt werden. Hierfür wurde eine Vorkultur angesetzt, bei der eine einzelne Kolonie der bereitgestellten Bakterien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml LB-AMP-Medium überführt wurde (Tabelle 4). Da die pLKO.1-puro Plasmide mit einer Ampicillinresistenz ausgestattet waren, ermöglichte die Inkubation in der Gegenwart von Ampicillin die Selektion der transformierten Bakterien, wohingegen die Bakterien ohne das Plasmid unter diesen Bedingungen nicht wachsen konnten. Die Kultur wurde über Nacht auf dem Inkubationsschüttler bei 250 rpm und 37°C inkubiert.

Für die Hauptkultur der Plasmidpräparation wurden 200 µl der Vorkultur in 200 ml LB-AMP-Medium in einen Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt und unter

den gleichen Bedingungen wie in der vorherigen Nacht inkubiert. Die Hauptkultur diente dazu die Ausbeute der transformierten Bakterien zu erhöhen.

Tabelle 4: LB-Medium

Pepton aus Casein	1%	Mit Aqua bidest. auffüllen und auf pH 7 mit NaOH einstellen; anschließend 20 min auto-klavieren
Natriumchlorid	1%	
Hefeextrakt	0,5%	

LB-AMP-Medium:

Ampicillin wurde nach Abkühlen des Mediums, auf unter 60°C, hinzugegeben. Die Endkonzentration betrug 100 mg/l.

4.2.2 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung aus den *E. coli* Bakterien wurde das *PureLink HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

Die transformierten *E. coli* Bakterien aus der Hauptkultur wurden mittels SDS und NaOH lysiert und unerwünschte RNA mit einer RNase zerschnitten. Die zu isolierende Plasmid-DNA blieb hiervon unbeeinflusst. Das SDS hob zudem die ionische Verbindung zwischen den Proteinen und der DNA auf.

Das Lysat wurde in eine Anionenaustauschersäule überführt und band dort die durch ihre Phosphatgruppen negative geladene DNA an einer positiv geladenen Zellulose- oder Dextranmatrix. Proteine, Kohlenhydrate und andere Zellbestandteile wurden hingegen nicht gebunden und konnten ausgewaschen werden.

Schließlich konnte die DNA in der Gegenwart einer 1,25 molaren Natriumchlorid-Lösung eluiert und durch Waschungen mit Alkohol von den Salzen befreit werden. Die Plasmide wurden in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels OD-Messung

Die Nukleinsäurekonzentrationen der DNA-Lösung wurden mit dem Nanodrop 2000 über eine optische Dichte-Messung ermittelt. Grundlage dafür ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

E= Extinktion ϵ = Extinktionskoeffizient c=Konzentration d= Schichtdicke

Das Photometer, Nanodrop 2000, regulierte die Schichtdicke automatisch, in dem ein 1,5 μ l großer Tropfen der Plasmidlösung zwischen den beiden Messköpfen durch die Oberflächenspannung in Form gehalten wurde. Ein monochromatischer Lichtstrahl durchleuchtete die Lösung und die Transmission konnte detektiert werden. Die Extinktion entsprach dem negativen Logarithmus der Transmission. Der Extinktionskoeffizient wird von der Software des Nanodrop 2000 vorgegeben. Mittels dieser konnten die verwendeten Plasmidkonzentrationen bestimmt werden.

4.3 Lentivirusproduktion und Transduktion

Vor der Lentiviralen Transduktion der HG3-Zellen mit einer gegen die Transporter gerichteten shRNA, mussten zuerst die Lentiviren aus der Transfektion der HEK-293-T-Zellen generiert werden. Die so entstandenen Viren trugen die transportersupprimierende shRNA in ihrem Genom und wurden zur Infektion/Transduktion der HG3-Zellen verwendet. Hierbei wurde die virale RNA durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und fest in das Genom der HG3-Zellen integriert. Somit produzierten die Zellen kontinuierlich shRNAs, die für einen *Knock-down* des jeweiligen Aminosäuretransporters γ^+ LAT1 oder 2 sorgten. Detailliert betrachtet, entstand bei der Transkription der integrierten DNA RNA-Abschnitte, die sich aufgrund ihrer Basenpaare zu einer Haarnadelstruktur (*small-hairpin*) faltete. Diese *small-hairpin*-RNA wurde aus dem Zellkern exportiert und dort von dem Enzym *Dicer* zu einer *small-interfering*-RNA (siRNA) geschnitten. Diese siRNA ist vollständig oder teilweise komplementär mit der *messenger*-RNA (mRNA) die für Aminosäuretransporter codiert. Der komplementäre Aufbau zwischen si- und mRNA sorgte dafür, dass sich diese zusammenlagerten und gemeinsam abgebaut wurden. Somit wurden die Baupläne für die Aminosäuretransporter teilweise zerstört und die Expression der Transporter sank. Für die Erstellung passender Kontrollzellen, wurden diese ebenfalls mit einer shRNA transduziert. Diese codierte allerdings für keine komplementäre mRNA und war somit eine *non-target* shRNA mit dem Namen shc002.

Für die Lentivirusproduktion wurden an Tag eins 3,5 Millionen HEK-293T-Zellen auf eine beschichtete 10 cm Petrischale in 10 ml DMEM Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Am nächsten Tag wurde zwei Stunden vor der Transfektion das alte Medium durch 8 ml neues DMEM-Vollkulturmedium ersetzt und kurz vor der Transfektion zusätzlich 1 ml Chloroquinlösung zu den 8 ml hinzugegeben (Tabelle 5). Die Zugabe von Chloroquin erhöhte dabei die Transfektionseffizienz um das 5-fache, in dem es den pH-Wert in den Lysosomen an hob und somit die hydrolytischen Enzyme hemmte (51). Die Transfektion der HEK-293T-Zellen erfolgte mittels Calcium-Phosphat, das mit den DNA-Plasmiden Präzipitate bildete und wiederum von den adhären ten Zellen mittels Endozytose aufgenommen wurde (52, 53). Dafür wurden 1 ml der Präzipitatlösung auf die HEK-293T-Zellen getropft und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt (Tabelle 6 und 7).

Die Präzipitatlösung enthielt die drei Plasmide, die für die Transfektion benötigt wurden, bestehend aus dem Transgenvektor pLKO.1-puro mit den für die shRNA codierenden Abschnitt (Tabelle 8), sowie aus den Verpackungsvektor pCMV-VSV-G für die Virushülle und dem Enzymvektor pCMV Δ R8.91, der für die retroviralen Enzyme kodierte. Sowohl der Transgenvektor als auch der Enzymvektor enthielten einen Simian-Virus-40 Replikationsursprung, der eine höhere Amplifizierungsrate ermöglichte, da die HEK 293T das große SV40 T-Antigen exprimierten.

Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das Chloroquin und die Präzipitatlösung zu entfernen. Die HEK-293T-Zellen wurden für weitere 24 Stunden in 5 ml frischen DMEM-Vollmedium inkubiert.

Anschließend fand die erste Virusernte am vierten Tag statt. Dafür wurde vorsichtig der Überstand mit den Viren abgenommen und für zehn Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch einen 0,45 μ m Spritzenfilter filtriert, um den eventuell vorhandenen Zelldetritus zu entfernen.

Für eine zweite Virusernte am Tag fünf wurden die transfizierten HEK-293T-Zellen in 5 ml DMEM-Vollkulturmedium erneut über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der virushaltige Überstand zentrifugiert, filtriert und bei -80°C eingefroren, wobei die Potenz der Viren durch das Einfrieren nicht gemindert wurde. Für die Transduktion mit den eingefrorenen Virusüberständen wurden diese lediglich bei Raumtemperatur aufgetaut und wie im nachfolgenden Abschnitt verwendet.

Für die Transduktion wurden je 1 Millionen HG3-Zellen in 0,5 ml RPMI-Medium in je ein Well einer 6 Wellplatte ausgesät. Auf diese Zellen wurden jeweils 2 ml Virusüberstand und 4 µg/ml Protaminsulfat gegeben. Das Protaminsulfat neutralisierte sowohl die negative Ladung der Virusmembran, als auch die der Zellmembran und verbesserte so die Adsorption des Virus, was zu einer höheren Transduktionsrate führte (54).

Fünf Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen bei 350 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Von dem alten Medium wurde 1 ml abgesaugt und durch 1 ml frisches RPMI Medium ersetzt, was die Viruskonzentration senkte und die HG3-Zellen mit ihrem bevorzugten RPMI Medium versorgte. Über Nacht konnten die Zellen wie gewohnt im Brutschrank weiter kultiviert werden. Um die verbleibenden Viren zu entfernen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transduktion dreimal mit PBS gewaschen. Hierzu wurden die Zellen für je fünf Minuten bei 350 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend folgte die Selektion der transduzierten HG3-Zellen in der Gegenwart von Puromycin. Dafür wurden jeweils 1 Million Zellen in 0,75 ml RPMI-Vollkulturmedium plus 2,5 µg/ml Puromycin inkubiert und alle drei bis vier Tage passagiert.

Tabelle 5: Chloroquinlösung

DMEM-Vollkulturmedium	1 ml	Die Lösung wurde stets neu angesetzt
Chlorquindiphosphat 100 mM in 1x PBS	10 µl	

Tabelle 6: Präzipitatlösung

Transgenvektor pLKO.1-puro	13,2 µg	Lösung mischen und anschließend unter kontinuierlichem Vortexen 500 µl 2x HBS hinzufügen; das Endvolumen ergibt 1 ml
Verpackungsvektor pCMV-VSV-G	4 µg	
Enzymvektor pCMVΔR8.91	10 µg	
2,5 M Calciumchlorid steril filtriert	50 µl	
TE-Puffer (H ₂ O/TE 1/3 steril filtriert).	add 500 µl	

Tabelle 7: 2xHBS

Natriumchlorid	281 mM	Lösung auf einen pH von 7,12 einstellen und bei -20°Celsius lagern
HEPES	100 mM	
NaH ₂ PO ₄	1,5 mM	

Tabelle 8: Plasmidkonstrukte für die Lentivirale Transduktion einer shRNA gegen y⁺LAT1 und 2, sowie einer *non-target*-RNA

Die TRCN ist die Identifikationsnummer des The RNAi Consortium (TRC).

Plasmidbezeichnung	Beschreibung
pLKO.1-puro_SCL7A7-1	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCAGATCAGATATTTGGAATA; (TRCN0000043033)
pLKO.1-puro_SCL7A7-2	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCTCATATACAGTGCCTCCTT; (TRCN0000043034)
pLKO.1-puro_SCL7A7-3	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CAGAACATAAGCGACCGCTTT; (TRCN0000043035)
pLKO.1-puro_SCL7A7-4	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCTGCCTGCATTTGTCTCTTA; (TRCN0000043036)
pLKO.1-puro_SCL7A7-5	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT1; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CCTTTGGAGGATTCCTTGCTT; (TRCN0000043037)
pLKO.1-puro_SCL7A6-1	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): GCAGTCAGTTAAGGCAGCTAT; (TRCN0000196072)

pLKO.1-puro_SCL7A6-2	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CACCTACCATCTTGTCCCTAA; (TRCN0000184388)
pLKO.1-puro_SCL7A6-3	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'): CTCATCTACATCCTGACCAAT; (TRCN0000178806)
pLKO.1-puro_SCL7A6-4	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'):GCTTATCAACTACTTCAGCTT; (TRCN0000149863)
pLKO.1-puro_SCL7A6-5	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'):GCTTATATTCTAGAGGCCTTT; (TRCN0000149896)
pLKO.1-puro_SCL7A6-6	lentivirales Plasmid für die Expression einer shRNA gegen y ⁺ LAT2; integrierte shRNA-Sequenz (5'-3'):CTCTTCACTGACACCATTAAT; (TRCN0000279633)
pLKO.1-puro_SHC002	lentivirales Plasmid für die Expression einer <i>non-target</i> -RNA (#SHC002, Sigma Aldrich)
pCMV Δ R8.9	lentivirales Verpackungsplasmid: HIV-1-Kapsidproteine (gag), HIV-1-Reverse Transkriptase und Protease (pol);
pCMV-VSV-G	lentivirales Verpackungsplasmid: Glykoprotein der Virushülle des „Vesicular stomatitis virus“ (VSV-G);

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Herstellung von Protein-Lysaten

Ziel der Proteinbiochemischen Methoden, war der Nachweis der membranständigen Proteine γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2. Die eingebrachte shRNA sorgte über mehrere Zwischenschritte für den Abbau der mRNA der Transporter, was zur Folge hatte, dass die Zellen diese Transporter weniger produzierten. Für den Nachweis der Proteine im Western Blot mussten diese zunächst aus der Zellmembran gelöst und isoliert werden.

Für die Herstellung des Zelllysates wurden zunächst mindestens 1 Million transduzierte HG3-Zellen bei 300 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 2-mal mit 1 x PBS gewaschen und in 100 bis 300 μ l RIPA (Radioimmunpräzipitations-Assay)-Puffer plus Proteaseinhibitor gelöst, welcher die Zellen lysierte und die Proteine aus der Zellmembran, dem Zytoplasma und dem Zellkern löste. Der Proteaseinhibitor verhinderte den weiteren Proteinabbau (Tabelle 9). Die Lysate wurden für mindestens 45 Minuten im Kühlraum bei 4°C auf mittlerer Geschwindigkeit geschüttelt oder alternativ für 30 Minuten auf Eis gestellt und in einem Intervall von zehn Minuten jeweils für 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Lysate bei 20817 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer von dem Proteinlysate zu trennen. Die Proteine befanden sich gelöst im Überstand, der vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde und dann bei -20°C gelagert werden konnte.

Tabelle 9: RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor

NaCl 4 M	3,75 ml	ad 100 ml Millipore H ₂ O; plus 1 Tablette Protease-Inhibitor auf 10 ml RIPA-Puffer; Lagerung bei -20°C
Triton X100	1 ml	
Sodiumdeoxycholat	1 g	
SDS 10%	1 ml	
Tris 1 M pH 7,2	10 ml	
EDTA	37 mg	

4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet, wobei BCA für *Bicinchoninic Acid Assay* steht, einer Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mittels der Bicinchoninsäure. In der Biuret-Reaktion wurden in alkalischer Umgebung zweiwertige Kupferionen durch die Seitenäste der Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert, die wiederum mit der Bicinchoninsäure einen Farbkomplex bildeten, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hatte (55). Die Absorption konnte mittels Mikrotiterplatten-Photometer detektiert werden, wobei ein Vergleich mit einer Standardreihe der Ermittlung der Proteinkonzentration diente (Tabelle 10). Die Proteinkonzentration entsprach der Intensität der mit der Säure gebildeten Farbkomplexe. Für die Bestimmung wurden die Proben 1:6 verdünnt und jeweils 25 µl dieser Verdünnung auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl der BCA-Lösung hinzugegeben und die Platte für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C gestellt. Die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm.

Tabelle 10: BSA-Standardreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung

An-satz	Volumen Wasser (µl)	BSA	BSA-Endkonzentration (µg/ml)
A	0	300 µl der Stocklösung 2mg/ml	2000
B	125	375 µl der Stocklösung 2mg/ml	1500
C	325	325 µl der Stocklösung 2mg/ml	1000
D	175	175 µl des Ansatzes B	750
E	325	325 µl des Ansatzes C	500
F	325	325 µl des Ansatzes E	250
G	325	325 µl des Ansatzes F	125
H	400	100 µl des Ansatzes G	25
I	400	-	0

4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Als Vorbereitung wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 2x-Sample-Buffer-Laufpuffer gemischt und bei 37°C für zehn Minuten inkubiert (Tabelle 16). Das anionische Natriumdodecylsulfat denaturierte die Proteine, wodurch ihre Tertiärstruktur zerstört wurde und gleichzeitig ihre elektrischen Eigenladungen überdeckt wurden. Die so behandelten Proteine waren negativ geladen und unter-

schieden sich nur in der Länge ihrer Aminosäureketten. Bei Anlegen eines Spannungsfeldes wanderten die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode, wobei kürzere Proteine die Poren der Polyacrylamid-Gelmatrix schneller passierten als die Längeren. Die Porengröße war abhängig von der gewählten Konzentration des Polyacrylamids. Je höher die Konzentration, desto feiner die Poren und somit auch die Trennschärfe.

Für die SDS-Page wurde ein Gel mit zwei unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen verwendet (Tabelle 11). In einer Vertikal-Gelelektrophoresekammer hatte das obere Sammelgel nur einen 6%igen Polyacrylamidanteil und diente der Aufnahme und des Sammelns der Proben in den einzelnen Taschen. Das untere Trenngel verfügte über einen höheren Polyacrylamid Anteil von 10%, das somit feinere Poren hatte und dem eigentlichen Auftrennen der Proben galt. Beide Gele wurden mit 1x SDS-Laufpuffer überdeckt. 3 µl des Markers *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* wurden neben den Proben in die Geltaschen des Sammelgels gegeben. Mithilfe dessen konnten später die Proteinbanden ihrer Größe zugeordnet werden. Mit dem Anlegen einer konstanten Spannung von 200 Volt begannen die Proteine Richtung Anode zu wandern. Nach einem gleichmäßigen Einwandern durch das Sammelgel wurde die Spannung nach zehn Minuten auf 100 Volt reduziert.

Tabelle 11: Sammelgel und Trenngel

SDS-PAGE	Sammelgel	Trenngel
Aqua bidest.	12,2 ml	18 ml
1,5 M Tris-Lsg pH 8,8	–	11,25 ml
0,5 M Tris-Lsg pH 6,8	5 ml	–
10% SDS-Lsg	200 µl	450 µl
30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid	4,6 ml	15 ml
10% Ammoniumpersulfat	132 µl	300 µl
TEMED-Lsg	28 µl	30 µl

Tabelle 12: 1M Tris-Lösung pH 8

Tris	121 g	Mit rauchender HCL-Säure auf gewünschten pH puffern
Aqua dest.	1 L	

Tabelle 13: 10% SDS-Lösung

SDS	10 g	Gut mischen und bei Raumtemperatur lagern
Aqua dest.	100 ml	

Tabelle 14: 10% Ammoniumpersulfat (APS)

Ammoniumpersulfat	1 g	Aliquotieren und bei -20°C lagern
Aqua dest.	9 ml	

Tabelle 15: 10x SDS-Laufpuffer

240 mM Tris Base	30,2 g	Für 1xSDS-Laufpuffer den 10x SDS-Laufpuffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua Dest verdünnen; Lagerung bei 4°C
1,9 M Glycin	144 g	
1% SDS	10 g	
Aqua dest.	ad 1 L	

Tabelle 16: 2x-Sample-Buffer mit Urea 8M

Tris Base 125 mM	0,7g	Zuerst 10 ml Aqua Dest. Vorlegen; mit rauchender Salzsäure auf pH 6,8 einstellen; dann ad 50 ml Aqua; in 500 µl aliquotieren bei -20°C lagern; frisch dazu geben: 2-Mercaptoethanol 10 µl/500 µl Aliquot = 2 Vol%
Glycerol 20 Vol%	10 ml	
SDS 5 %	1 g	
Harnstoff	24 g	
Aqua Dest.	60 ml	

4.4.4 Western Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Nitrozellulose-Membrane übertragen und konnten anschließend mittels Immunfärbung sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurde die Membrane auf das Gel gelegt, mit mehreren Schwämmen fixiert und in einer sogenannten Blottingkammer gespannt. Eine konstante Stromstärke von 200 mA wurde angelegt, wobei sich die Anode auf der Seite der Nitrozellulose-Membrane befand, was dafür sorgte, dass die Proteine auf die Membran wanderten. Dort blieben die Proteine durch die hydrophoben Wechselwirkungen haften. Aufgrund des Erhitzens des Elektrobloiting-Puffers, welcher als Spannungsmedium diente, wurde der Vorgang in einem Kühlraum bei 4°C für circa 20 Stunden durchgeführt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Elektrobloiting-Puffer

20 mM Tris Base	9,7 g	Lagerung bei 4°C
150 mM Glycin	45 g	
20% Methanol	800 ml	
Aqua Dest.	ad 4 L	

4.4.5 Immunfärbung und Analyse

Die auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteine konnten durch die Zugabe von γ -LAT1 - oder 2 -Antikörper gebunden werden und dienten gleichzeitig als eine Bindungsstelle für einen zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörper. Die Peroxidase wandelt die Chemielumineszenz-Reagenz Luminol, die in der Substanz Western Lightning enthalten ist, um, woraufhin Photonen emittiert wurden, mit deren Hilfe ein Fotofilm belichtet werden konnte. Mithilfe dieses Fotos konnten die einzelnen Proteinbanden betrachtet und ausgewertet werden.

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese für zehn Minuten in Ponceau S eingelegt (Tabelle 20). Durch die negative Ladung des Ponceau S bindet dieses an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und färbte diese rot an. Hiermit konnte die Transfereffizienz des Western Blots überprüft werden. Anschließend wurde das Ponceau S durch mehrmaliges Waschen der Membran mit 1xTBS entfernt (Tabelle 18). Die Nitrozellulose-Membrane wurde anschließend mit Blotto und 5% Ziegen Serum für eine Stunde blockiert, um die noch freien Stellen für Proteine auf der Membran zu besetzen und somit unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrozellulose-Membran zu verhindern (Tabelle 21).

Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal mit Antikörperverdünnungspuffer für je zehn Minuten gewaschen (Tabelle 22). Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten spezifischen Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit Blotto für je zehn Minuten gewaschen und der zweite Peroxidase-gekoppelte Antikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben. Zu beachten war, dass der zweite Antikörper lichtempfindlich ist und entsprechend geschützt werden musste. Es folgten drei Waschungen mit TBS-Tween und eine Waschung mit 1x TBS, für je zehn Minuten (Tabelle 19).

Nun konnte die Chemielumineszenz-Reagenz Western Lightning, auf die Membrane gegeben werden. Nach einminütiger Inkubation wurde die überschüssige Reagenzflüssigkeit entfernt und die Nitrozellulose-Membran zur Aufnahme in das Fotolabor gebracht. Die durch die Peroxidase entstandenen Photonen konnten im Fotolabor einen Fotofilm belichten. Hierzu wurde der Film auf die Membran gelegt. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Proteinmenge und der Qualität der Primärantikörper und musste individuell für jeden Durchgang bestimmt werden. Nach anschließendem Entwickeln und Fixieren, konnten schwarze Banden an den Stellen abgelesen werden, an denen das Luminol umgesetzt wurde und sich die damit verbunden markierten Proteine befanden.

Neben dem Fotolabor wurde noch das Aufnahmegerät ChemieDoc™ XRS verwendet, eine hochsensible Kamera, die bereits geringe Mengen an Photonen detektieren konnte und ein digitales Foto erstellte. Dieses Verfahren wurde mit dem Programm Quantity One für eine computergestützte Quantifizierung benutzt.

Tabelle 18: 10x TBS

1 M Tris pH 8,0	100 ml	Lagerung RT; für 1xTBS im Verhältnis 1:10 mit Aqua Dest. ver- dünnen
NaCl	87,7 g	
Aqua dest.	ad 1 L	

Tabelle 19: 1x TBS-Tween

1x TBS	200 ml
Tween 20	100 µl

Tabelle 20: Ponceau S

Ponceau S Sodium Salt	500 mg	Bei RT lagern; Nach- weisgrenze 5-15 ng Protein
Eisessig	1 ml	
Aqua dest.	ad 100 ml	

Tabelle 21: Blotto mit Ziegen Serum

1 M Tris pH 8	12,5 ml	Gut rühren; bei 4°C 8- 10 Tage haltbar; 10% Ziegen Serum zu Blotto geben für den Block
1 M CaCl ₂	500 µl	
Antifoam A	25 µl	
Tween 20	125 µl	
Magermilchpulver	12,5 g	
Aqua dest.	ad 250 ml	

Tabelle 22: Antikörperverdünnungspuffer

BSA	1%	Gelöst in 1x PBS, (Tabelle 23)
Tween	0,1%	

Tabelle 23: 10x PBS

KH ₂ PO ₄	17,6 mM	Auf pH 7,4 einstellen
KCL	26,8 mM	
NaCl	1,4 M	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	101 mM	

Tabelle 24: Im Western Blot verwendete Antikörper

Primärantikörper	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verdünnung
anti-γ+LAT1 (aff.pur. EP82, 22.08.12 run 1)	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG Closs	1:3000 in Antikörper- verdünnungspuffer
anti-γ ⁺ LAT2 (PP6 SA7667, 27.11.2014)	Kaninchen	Eurogentec im Auftrag der AG Closs	1:10000 in Antikörper- verdünnungspuffer
anti-GAPDH	Kaninchen	Cell signaling (14C10, #2118)	1:10000 in Blotto
Sekundärantikörper	Ursprungsorganismus	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit igG	Ziege	Merck KGaA Darmstadt (#401393)	1:15000 in Blotto

4.5 Feststellung der Viabilität mittels Propidiumiodidfärbung

Die Viabilität der transduzierten HG3-Zellen konnte durch die Hinzugabe des Farbstoffes Propidiumiodid und der anschließenden Detektion der so markierten toten Zellen in der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Die Durchflusszytometrie, auf Englisch als FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) abgekürzt, er-

möglichte die Analyse einzelner Zellen mithilfe eines Laserstrahles. Das so entstehende Streulicht kann von verschiedenen Detektoren eingefangen werden. Mithilfe dieser Methode können verschiedene Zellarten anhand ihrer typischen Streustrahlungsmuster unterschieden werden. Ursächlich für diese Muster sind Zellcharakteristika wie Granulation, Mitochondriendichte und Zellgröße. Die hierige Untersuchung diente indes der Bestimmung der Viabilität über die Markierung der toten Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid. Propidiumiodid konnte nur die Plasmamembran von toten Zellen passieren und interkalierte mit der DNA der Zelle, was dessen Absorptionsspektrum veränderte. Dadurch konnten die so markierten Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Mithilfe dieses Farbstoffes konnte der Anteil der toten Zellen und aus diesem wiederum auch der Anteil der vitalen Zellen, die sogenannte Viabilität bestimmt werden.

Hierfür wurden 300.000 der transduzierten HG3-Zellen entnommen und für 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl 1x PBS aufgenommen. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und im dritten Durchgang 3 µl Propidiumiodid hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Auswertung in der Durchflusszytometrie.

4.6 [³H]-L-Argininaufnahme unter NEM

Für die Messung der Transportleistung wurde den transduzierten HG3-Zellen extrazelluläres, mit Tritium radioaktiv-markiertes Arginin für eine bestimmte Zeit angeboten und anschließend nach Zellaufschluss die intrazelluläre Radioaktivität gemessen. Im Vergleich zu den *non-target* transduzierten HG3-Zellen konnte aus der gemessenen intrazellulären Radioaktivität die Argininaufnahme der transportersupprimierten Zellen abgeleitet werden. Unter der Zugabe von N-ethylmaleimide (NEM) konnte die Transportaktivität des hCAT-1 gehemmt werden (56, 57). Hierfür wurden 1,5 Millionen Zellen bei 350 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml 1x BSA-Lockes-Lösung aufgenommen (Tabelle 25 und 26). Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Beim dritten Durchgang wurden die Zellen anstatt in 5 ml in 3,3 ml 1x BSA-Locke's aufgenommen und dann je 1 ml auf drei Reaktionsgefäße verteilt, so dass sich in jedem Reaktionsgefäß 500.000 Zellen befanden. Die Reaktionsgefäße wurden erneut bei 350 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die anschließende Inkubation der Zellen für zehn Minuten in der vorgewärmten 100 µl NEM-haltiger Vorinkubationslösung bei 37°C sorgte für die Blockierung des Transporters hCAT-1 (Tabelle 28). Anschließend wurden 100 µl der 37°C warmen, radioaktiven Aufnahmelösung den Zellen verabreicht

und durch kurzes Pipettieren vermischt (Tabelle 27). Nach 30-sekundiger Inkubation konnte die Aufnahme des [^3H]-L-Arginins mit 1 ml eiskalter 1x BSA-Lockes-Lösung gestoppt und die Zellen auf Eis gestellt werden. Anschließend erfolgte die dreimalige Waschung der Proben, bei der diese bei 350 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert, der radioaktive Überstand entsorgt und erneut in 1 ml eiskalter 1x BSA-Lockes-Lösung aufgenommen wurden. Nicht importiertes, extrazelluläres [^3H]-L-Arginin wurde so entfernt und die Zellpellets mit 200 μl 2%-SDS für mindestens zehn Minuten lysiert. Das Lysat wurde in geeignete Minivials überführt und in 2 ml Irga-Safe Plus Szintillationscocktail aufgenommen. Tritium ist ein β -Strahler und erzeugt ionisierende Strahlung, die von dem Szintillations-Counter detektiert werden konnte. Somit konnte der quantitative Anteil des aufgenommenen [^3H]-L-Arginins in den Zellen bestimmt werden.

Tabelle 25: 10x Locke's Lösung

NatriumChlorid	45 g	ad 500 ml Millipore H ₂ O, puffern auf pH 7,4 mit NaOH
KaliumChlorid	2,09 g	
Magnesiumdichlorid	1,013 g	
HEPES	11,91 g	

Tabelle 26: 1x BSA-Locke's Lösung (1xBSA-LL)

10x Locke's Lösung	10 ml	ad 100 ml Millipore H ₂ O, pH 7,2 mit NaOH
Glucose (steril filtriert) 1 M	560 μl	
CalciumChlorid 1 M	200 μl	
Albumin Bovine Fraction V	2 g	

100 mM L-Arginin Stocklösung in H₂O mit 1xBSA-LL im Verhältnis 1:100 verdünnen → 1 mM L-Arginin

1 M NEM Stocklösung in DMSO mit 1x BSA-LL im Verhältnis 1:1000 verdünnen → 1 mM NEM

Tabelle 27: Radioaktive Aufnahmelösung

Radioaktive Aufnahmelösung	1 ml
L-Arginin 1 mM	200 µl
³ H-L-Arginin 1 mCi/ml	20 µl
NEM 1 mM	200 µl
1x BSA-LL	580 µl

Tabelle 28: Vorinkubationslösung mit NEM

Vorinkubationslösung mit NEM	1 ml
NEM 1 mM	200 µl
1x BSA-LL	800 µl

4.7 Feststellung der Zellproliferation mittels [³H]-Thymidineinbaus

Die Zellproliferation wurde durch den Einbau des Tritium-markierten DNA-Bausteines Thymidin quantifiziert. Je 150.000 Zellen wurden bei 350 g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 600 µl frischem Medium aufgenommen und hiervon 200 µl, in je ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Jede Probe wurde in einem Triplett gemessen. In jedes Well wurden 1 µCi [³H]-Thymidin gegeben. Die 96-Wellplatte wurde für 16 Stunden in einem Brutschrank mit 5% CO₂-Gehalt und 37°C inkubiert und anschließend jedes Well in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 1 ml 1x PBS + 1% FCS gegeben und anschließend das Reaktionsgefäß bei 350 g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der radioaktive Überstand konnte so entfernt und das Zellpellet erneut in 1 ml 1x PBS + 1% FCS aufgenommen werden. Insgesamt wurden die Zellen auf diese Art dreimal gewaschen. Nicht eingebautes [³H]-Thymidin konnte entfernt werden. Nach dem Lysieren der Zellen in 200 µl 2% SDS für zehn Minuten wurden die Proben in Minivials für den Szintillations-Counter überführt. Zum Schluss wurde 2 ml Szintillator zu den Proben gegeben, gefolgt von kurzem Vortexen. Anschließend konnten die Proben in den Szintillations-Counter gestellt und das eingebaute [³H]-Thymidin quantitativ bestimmt werden.

5 Ergebnisse

Das Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle der Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 für die Viabilität und die Proliferation hinsichtlich der CLL-Zellen zu ermitteln. Hierfür wurden HG3-Zellen als immortalisierte CLL-Zellen verwendet und mittels Lentiviraler Transduktion eine gegen den jeweiligen Transporter gerichtete shRNA in die DNA der Zellen integriert. Die in der Folge der Transkription entstandenen shRNAs wurden zu siRNAs prozessiert, die über ihren komplementären Aufbau mit den mRNAs der Transporter y^+ LAT1 und y^+ LAT2 sich verbanden und so zu deren gemeinsamen Abbau führten.

Insgesamt wurden zehn Durchgänge mit Lentiviralen Transduktionen (Lenti 01 bis Lenti 10) vorgenommen, wovon die ersten sechs der Ermittlung der passenden shRNAs und des optimalen Zeitrahmens für die funktionalen Versuche der Viabilität, Argininaufnahme und Proliferation dienten. Mit den anschließenden Durchgängen (7 bis 10) konnten ausreichende Datenmengen zur Beantwortung der Fragestellung generiert werden.

5.1 Evaluation der shRNAs zur Expressionshemmung von y^+ LAT1 und 2

Zu Beginn musste evaluiert werden, wie gut die shRNAs sich zum Abbau der mRNA und somit zur Suppression der Transporter eigneten. Mittels Western Blots konnte die verbliebene Expressionsstärke der einzelnen Transporter überprüft werden. In dem Durchgang Lenti 02 wurden für den y^+ LAT1 (*SLC7A7*) fünf verschiedene Plasmide (*SCL7A7-1* bis *SLC7A7-5*) getestet, wovon das Plasmid mit der shRNA *SLC7A7-1* die beste Suppression mit einer Restexpression von 18,3% erzielte (Abbildung 10). Für das Plasmid mit dem Namen *SLC7A7-2* konnten in keinem Durchgang genügend Zellen für eine Analyse generiert werden.

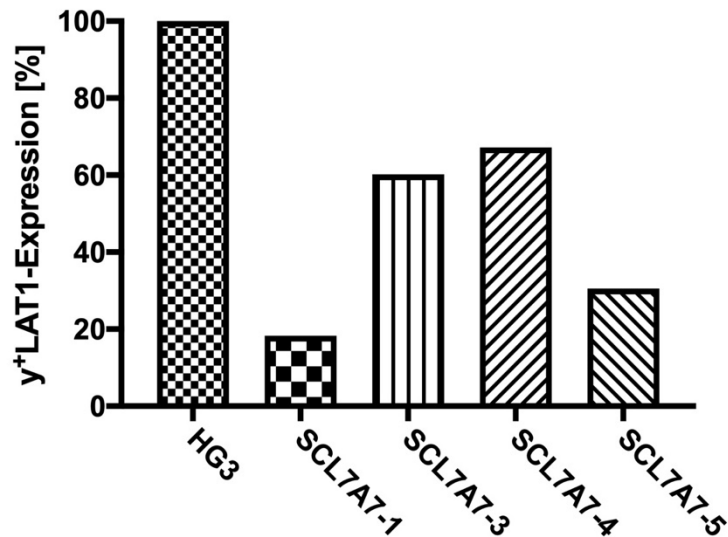


Abbildung 10: Expression von γ^+ LAT1 in HG3-Zellen nach Exposition unterschiedlicher shRNAs

Dargestellt ist die quantitative Auswertung des Western Blots von Lenti 02, in dem die Expression des γ^+ LAT1 in HG3-Zellen nach der Transduktion mit jeweils fünf verschiedenen shRNAs (SLC7A7-1 bis SCL7A7-5) überprüft wurde. Als Kontrolle diente hierbei die Expression von γ^+ LAT1 in nativen HG3-Zellen. Als Ladekontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Der Quotient der Signalstärke γ^+ LAT1/GAPDH wurde gebildet. Die Expression der nativen HG3-Zellen diente als Kontrolle und wurde auf 100% gesetzt. Für die shRNA SLC7A7-2 konnten nicht genügend Zellen zur Auswertung generiert werden, weshalb sie nicht in die Darstellung aufgenommen wurde.

In dem Durchgang Lenti 04 standen für den γ^+ LAT2 sechs Plasmide mit verschiedenen shRNAs (SLC7A6-1 bis SLC7A6-6) zur Verfügung. Hiervon erwies sich das Plasmid mit der shRNA SLC7A6-6 mit einer verbliebenen γ^+ LAT2-Restexpression von 71,2% am effizientesten. Im Vergleich zur Suppression des γ^+ LAT1 fiel die des γ^+ LAT2 deutlich schlechter aus. Die hohen Werte der shRNA SLC7A6-1 erklärten sich durch die deutlich reduzierte Ladekontrolle mit GAPDH. Das Plasmid mit der shRNA SLC7A6-4 erzielte die zweitbeste Suppression mit einer Restexpression von 84,8% (Abbildung 11).

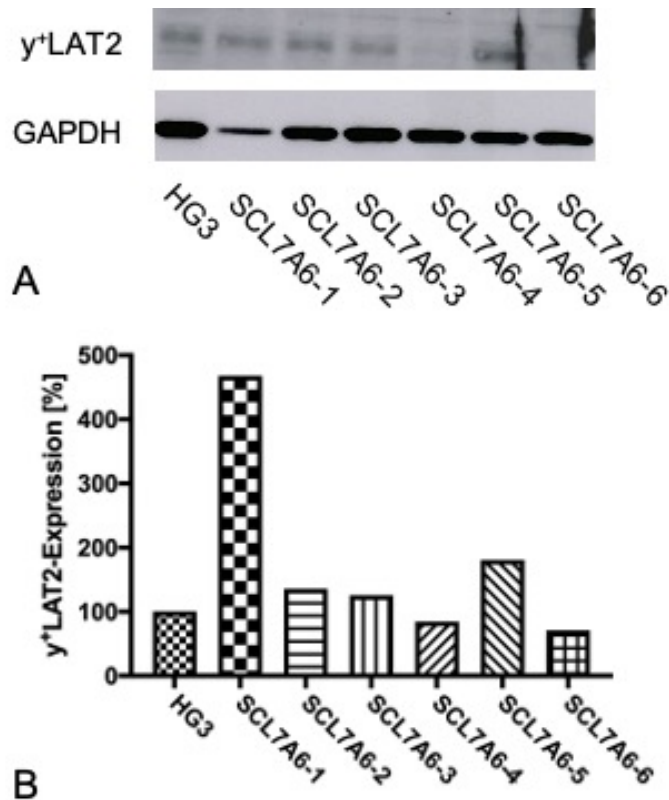


Abbildung 11: Expression von y⁺LAT2 in HG3-Zellen nach Exposition unterschiedlicher shRNAs

A) Dargestellt ist ein Western Blot zum Nachweis der y⁺LAT2 Restexpression der HG3-Zellen nach Lentiviraler Transduktion mit je einer der sechs verschiedenen shRNAs (SLC7A6-1 bis SLC7A6-6). Ziel war die Ermittlung der effizientesten shRNA. Als Kontrolle dienten die Expression von y⁺LAT2 in nativen HG3-Zellen. Die Proteine y⁺LAT2 und GAPDH wurden mit rabbit-anti-y⁺LAT2 Rohserum PP6 bzw. mit rabbit-anti-GAPDH und goat-anti-rabbit IgG Peroxidase nachgewiesen. Die obere Bande zeigt die Banden des y⁺LAT2-Aminosäuretransporters. Bei dem Konstrukt SLC7A6-6 war die Suppression am stärksten. Bei Konstrukt SLC7A6-1 lag die Expression bei annähernd 500%. Dies lag an der schwachen GAPDH-Bande, welche bei der Auswertung berücksichtigt wurde. Die untere Bande zeigt den Nachweis der Ladungskontrolle GAPDH bei der 15 µg Protein pro Probe aufgetragen wurden (Ausnahme SLC7A6-1).

B) Dargestellt ist die quantitative Auswertung des in A gezeigten Western Blots, die mithilfe des Aufnahmegerätes Chemidoc (Biorad) durchgeführt wurde. Der Quotient der Signalstärke y⁺LAT2/GAPDH wurde gebildet. Die Expression der nativen HG3-Zellen diente als Kontrolle und wurde auf 100% gesetzt.

In einem erneuten Durchgang (Lenti 06) in dem nur die beiden shRNAs SLC7A6-4 und SLC7A6-6 getestet wurden, zeigten sich deutlich bessere Suppressionswerte (Abbildung 12). So betrug die Restexpression des y⁺LAT2 am ersten Tag nach der Transduktion für die shRNA SLC7A6-6 nur 7,2% und für die shRNA SLC7A6-4 15%. Die Expression stieg am vierten Tag für die shRNA SLC7A6-6

auf 30,2% und für die shRNA SLC7A6-4 auf 31% an. Als Kontrolle diente diesmal nicht die γ^+ LAT2-Expression von nativen HG3-Zellen, sondern die von HG3-Zellen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden. Es bestätigte sich erneut, dass mit der shRNA SLC7A6-6 eine bessere Expression-Suppression des γ^+ LAT2 erzielt werden konnte und dass die Restexpression im Laufe der Zeit wieder zunahm (Kapitel 5.2).

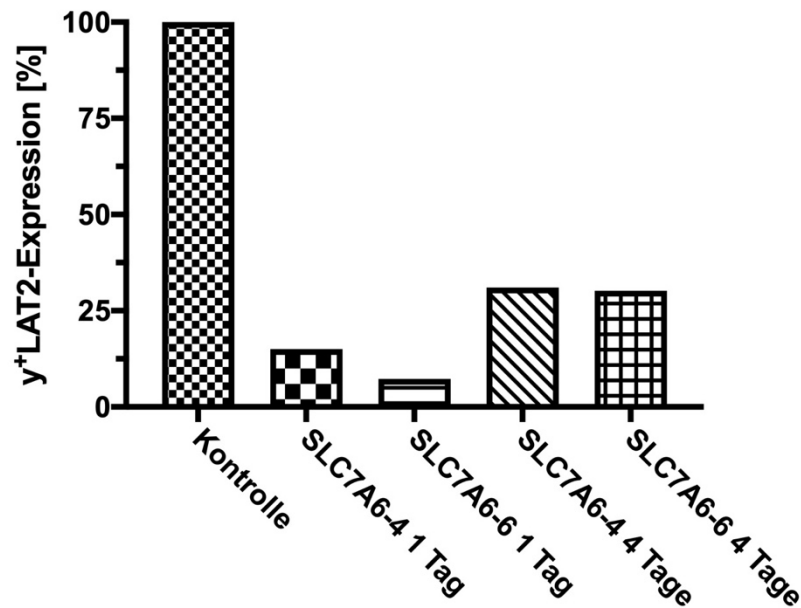


Abbildung 12: Expression von γ^+ LAT2 in transduzierten HG3-Zellen mit verschiedenen shRNAs

Dargestellt ist die quantitative Auswertung des Western Blots von Lenti 06, in dem die Expression des γ^+ LAT2 in den HG3-Zellen nach Transduktion mit jeweils zwei verschiedenen shRNAs (SLC7A6-4 und SLC7A6-6) an den Tagen eins und vier nach Transduktion überprüft wurde. Als Kontrolle diente hierbei die Expression von γ^+ LAT2 in HG3-Zellen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden. Als Ladekontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Der Quotient der Signalstärke γ^+ LAT2/GAPDH wurde gebildet und die Expression der *non-target*-transduzierten HG3-Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Nach der Evaluation der verschiedenen shRNAs zur Expressionshemmung wurde mit der shRNA SLC7A7-1 für den γ^+ LAT1 und mit der shRNA SLC7A6-6 für den γ^+ LAT2 fortgefahren.

5.2 Evaluation des Zeitrahmens für die funktionellen Versuche

Als Nächstes musste der optimale Zeitrahmen für die Durchführung der Viabilitäts- und Proliferationsversuche festgestellt werden, in dem eine Suppression der Transporter möglichst hoch ist und somit etwaige Veränderungen der Zellen in den Test beobachtet werden konnten.

Hierfür wurden im Durchgang Lenti 05 die y^+ LAT1-supprimierten Zellen für 36 Tage kultiviert und regelmäßig Proben für Western Blots entnommen. Ein dynamischer Verlauf konnte für die Suppression des y^+ LAT1 erkannt werden, in dem die Restexpression in den ersten zwei bis drei Wochen von initial 24,6% am Tag acht nach Transduktion, über den Tiefpunkt am Tag 12 sank und hiernach wieder langsam bis auf 65,2% am Tag 36 anstieg (Abbildung 13). Aufgrund des Restexpressionsverlaufs des y^+ LAT1 aus Abbildung 13 wurde sich entschieden die Viabilitäts-, Proliferations- und Arginin-Aufnahmeversuche für die Suppression beider Transporter in den ersten drei Wochen nach der Transduktion durchzuführen. In einzelne Durchgänge wurden die transduzierten HG3-Zellen länger als die geplanten drei Wochen kultiviert und in regelmäßigen Abständen Proben für den Nachweis der Transporterexpression im Western Blot entnommen. Die Zunahme der Transporterexpression im Laufe der Zeit nach der Transduktion bestätigte sich auch in Lenti 06, bei dem der Transporter y^+ LAT2 getestet wurde (Abbildung 12).

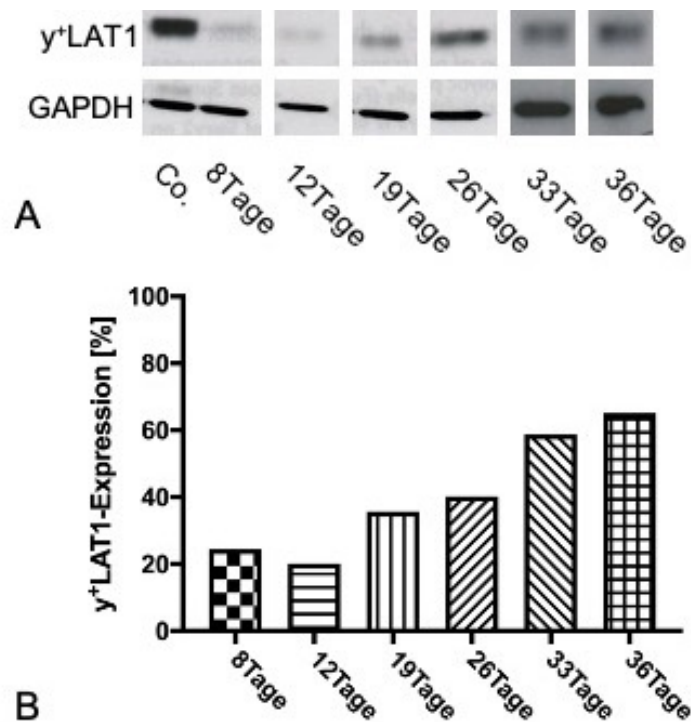


Abbildung 13: y⁺LAT1-Suppression über 36 Tage

A) Dargestellt ist ein Western Blot zum Nachweis der y⁺LAT1 Restexpression einer mit SLC7A7-1 shRNA transduzierten HG3-Population über einen Zeitraum von fünf Wochen. Dabei wurden Lysate an den Tagen 8;12;19;26;33 und 36 nach der Transduktion erstellt.

Als Kontrolle diente eine HG3-Kultur, die mit der *non-target* shRNA shc002 transduziert wurde. Die Proteine y⁺LAT1 und GAPDH wurde mit rabbit-anti-y⁺LAT1 aff pur EP82 run1 und mit rabbit-anti-GAPDH und goat-anti-rabbit IgG Peroxidase nachgewiesen.

Die obere Bande zeigt die Banden des Aminosäuretransporters y⁺LAT1. Die untere Bande zeigt den Nachweis der Ladungskontrolle GAPDH, bei der 15 µg Protein pro Probe aufgetragen wurden.

B) Dargestellt ist die quantitative Auswertung des in A gezeigten Western Blots, die mithilfe des Aufnahmeapparates Chemidoc (Biorad) durchgeführt wurde. Der Quotient der Signalstärke y⁺LAT1/GAPDH wurde gebildet. Die Expression der *non-target* transduzierten HG3-Zellen diente als Kontrolle, wurde auf 100% gesetzt und mit dem jeweils passenden Tag verglichen.

5.3 Ablauf eines Versuchsdurchgangs

Nach der Evaluation der shRNAs und des Zeitrahmens für die funktionellen Tests von Viabilität, Proliferation und Argininaufnahme erfolgte der über die Durchgänge Lenti 07 bis 10 einheitliche Versuchsaufbau, der am Lenti 09 beispielhaft gezeigt werden soll. In diesem Durchgang wurden die y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen für einen längeren Zeitraum als drei Wochen kultiviert, wodurch sich

erneut Aussagen über den Expressions-Suppressions-Verlauf treffen ließen. In Abbildung 14 ist die γ^+ LAT1-Restexpression über 60 Tage verglichen mit den *non-target* transduzierten HG3-Zellen als Kontrolle zu sehen. Die Expression sank von Tag 4 von 32,3% auf 8,7% an Tag 18 ab und stieg über die Zeit wieder an auf ein Niveau von 29,7% an Tag 60 (Abbildung 14). Hier zeigte sich ein ähnlicher Restexpressionsverlauf wie er bereits zu Beginn in Lenti 05 festgestellt wurde (Abbildung 13).

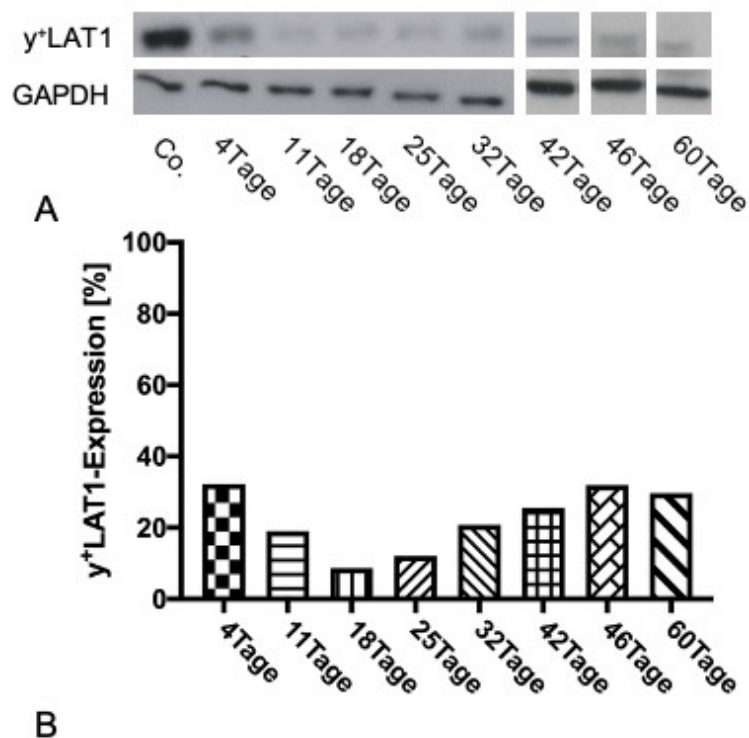


Abbildung 14: γ^+ LAT1-Suppression über 60Tage

A) Dargestellt ist der Western Blot von Lenti 09 zum Nachweis der γ^+ LAT1 Restexpression einer mit SLC7A7-1 shRNA transduzierten HG3-Population über einen Zeitraum von achteinhalb Wochen. Dabei wurden Lysate (n=1) an den Tagen 4;11;18;25;32;42 und 60 nach der Transduktion erstellt.

Als Kontrolle diente eine HG3-Kultur, die mit der *non-target* shRNA shc002 transduziert wurde. Die Proteine γ^+ LAT1 und GAPDH wurden mit rabbit-anti- γ^+ LAT1 aff pur EP82 run1 und mit rabbit-anti-GAPDH und goat-anti-rabbit IgG Peroxidase nachgewiesen.

Die obere Bande zeigt die Banden des γ^+ LAT1-Aminosäuretransporters. Die untere Bande zeigt den Nachweis der Ladungskontrolle GAPDH, bei der 15 μ g Protein pro Probe aufgetragen wurden.

B) Dargestellt ist die quantitative Auswertung des in A gezeigten Western Blots, die mithilfe des Aufnahmegerätes Chemidoc (Biorad) durchgeführt wurde. Der Quotient der Signalstärke γ^+ LAT1/GAPDH wurde gebildet. Die Expression der *non-target*-transduzierten HG3-Zellen diente als Kontrolle, wurde auf 100% gesetzt und mit dem jeweils passenden Tag verglichen.

Neben der Viabilität und Proliferation wurde auch die Argininaufnahme der Zellen nach einer Suppression der Transporter y^+ LAT1 und 2 überprüft, da grundsätzlich beide Transporter auch zur Aufnahme von BAS in der Lage sind. Durch die Suppression des hCAT-1 konnte in den CLL-Zellen eine verminderte Argininaufnahme und damit konsekutiv eine verminderte Viabilität und Proliferation beobachtet werden. Somit stellte sich die Frage, ob es bei den Transportern y^+ LAT1 und 2 ebenfalls zu einer verminderten Argininaufnahme unter Suppression der Transporter kommen könnte. Unter der Suppression des y^+ LAT1 im Durchgang Lenti 09 zeigte sich an allen getesteten Tagen nach Transduktion eine verminderte Aufnahme von [3 H]-Arginin (100 μ M, angeboten für 30 Sekunden) im Vergleich zur Kontrolle, die mit der shRNA *non-target* transduziert wurde (Abbildung 15). Der hCAT-1 war in diesem Versuch durch NEM gehemmt, der y^+ LAT2 blieb ungehemmt. Bei drei Proben erfolgte keine statistische Auswertung.

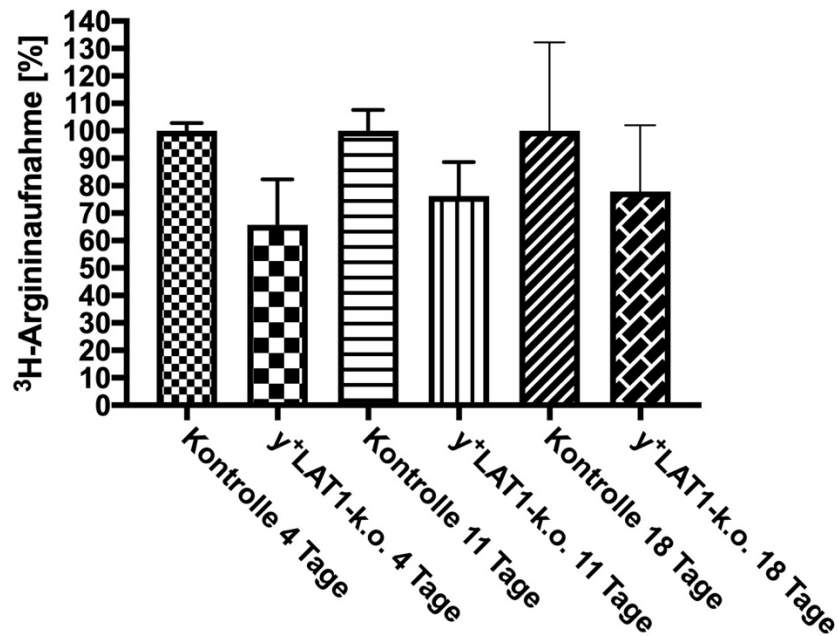


Abbildung 15: [³H]-Argininaufnahme unter y⁺LAT1-Suppression der HG3-Zellen in Lenti 09

Dargestellt ist die [³H]-Argininaufnahme der y⁺LAT1 supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT1 k.o.) im Durchgang Lenti 09 über einen Zeitraum von 18 Tagen, wobei je drei Proben (n=3) an den Tagen 4; 11; 18 abgenommen wurden. Als Kontrolle dienten die mit der *non-target* shRNA transduzierten HG3-Zellen, für die auch drei Proben an den jeweiligen Testtagen abgenommen wurden (n=3). Die Zellen wurden unter NEM-Hemmung mit einer Konzentration des L-[³H]-Arginin von 100 μM [10 μCi/ml] für 30 Sekunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen (y⁺LAT-1-Suppression an Tag 4: Mittelwert 65,6%±13,5%/10⁶Zellen; an Tag 11: Mittelwert 76,3%±10% /10⁶Zellen; an Tag 18: Mittelwert 77,9%±19,7% /10⁶Zellen). Bei n=3 erfolgte keine statistische Auswertung.

Durch eine Transporterhemmung könnte es zu einem Aminosäuremangel und in der Folge zu einer reduzierten Proteinbiosynthese kommen, die sich in einer eingeschränkten Viabilität und Proliferation gegenüber den Transporter-ungehemmten Zellen zeigen könnte. Um die Viabilität zu überprüfen, wurden die Proben mit Propidiumiodid angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nur bei toten Zellen ist die Zellmembran für Propidiumiodid (PI) permeabel und interkaliert mit der DNA der Zellen, welches das Absorptionsspektrum von PI verändert und in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Die hiermit ermittelten toten Zellen wurden von der Gesamtzellzahl abgezogen, um den Anteil der vitalen Zellen und somit die Viabilität zu bestimmen. Die Viabilität der y⁺LAT1-supprimierten

HG3-Zellen verglichen mit der Viabilität der *non-target* transduzierten HG3-Zellen über den Zeitraum von 60 Tagen des Durchganges Lenti 09, zeigte einen fast deckungsgleichen Verlauf (Abbildung 16).

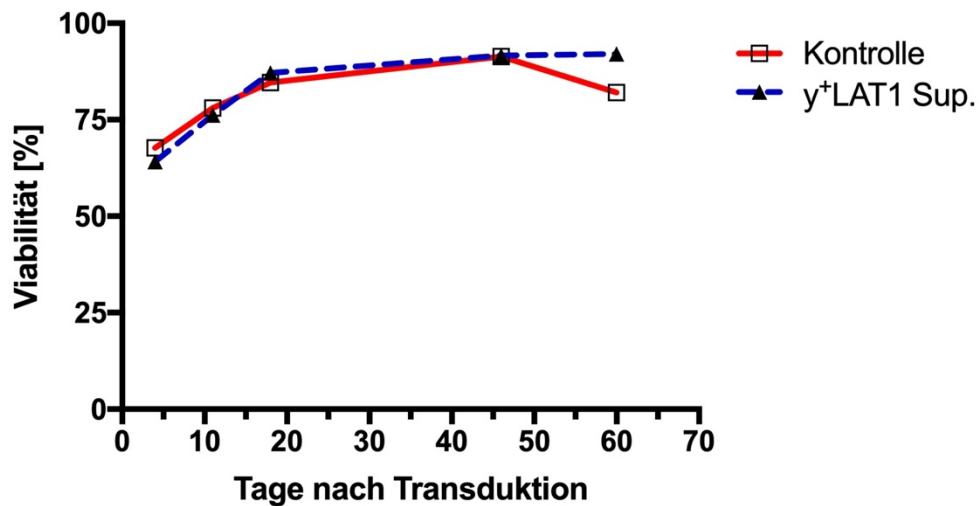


Abbildung 16: Viabilität der HG3-Zellen unter y⁺LAT1-Suppression Lenti 09

Dargestellt ist die Viabilität der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT1 Sup.) und der Kontrolle, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen im Durchgang Lenti 09. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Für jeden Testtag gab es nur eine Probe (n=1) für Kontroll- und Testzellen. Tag 4: Kontrolle 67,7%; y⁺LAT1-Sup 64,1%. Tag 11: Kontrolle 78%; y⁺LAT1-Sup 76,2%. Tag 18: Kontrolle 84,6%; y⁺LAT1-Sup 87,1%. Tag 46: Kontrolle 91,4%; y⁺LAT1-Sup 91,6%. Tag 60: Kontrolle 82%; y⁺LAT1-Sup 92%.

Für die Bestimmung der Proliferation nach der Suppression der y⁺LAT1-Expression wurden die Zellen in einem Medium, in dem Thymidin mit radioaktivem Tritium (0,05µCi/µl) markiert war, für 16 Stunden kultiviert. Während der Synthesephase des Zellzyklus wurde das so markierte Thymidin in die neue DNA der Zellen eingebaut, woran das Maß der Proliferation abgeleitet werden konnte. Hierfür wurden zunächst die nicht verbauten radioaktiven Thymidin-Nukleoside ausgewaschen und nach dem Lysieren der Zellen die Radioaktivität der einzelnen Proben gemessen. Je höher der Wert, desto mehr markiertes Thymidin wurde in die DNA verbaut und desto mehr neue Zellen sind entstanden. Bei einem Vergleich der Proliferation der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen mit den Kontroll-HG3-Zellen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden, für die Zeitpunkte 4, 11, 18 Tage nach Transduktion, zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 17).

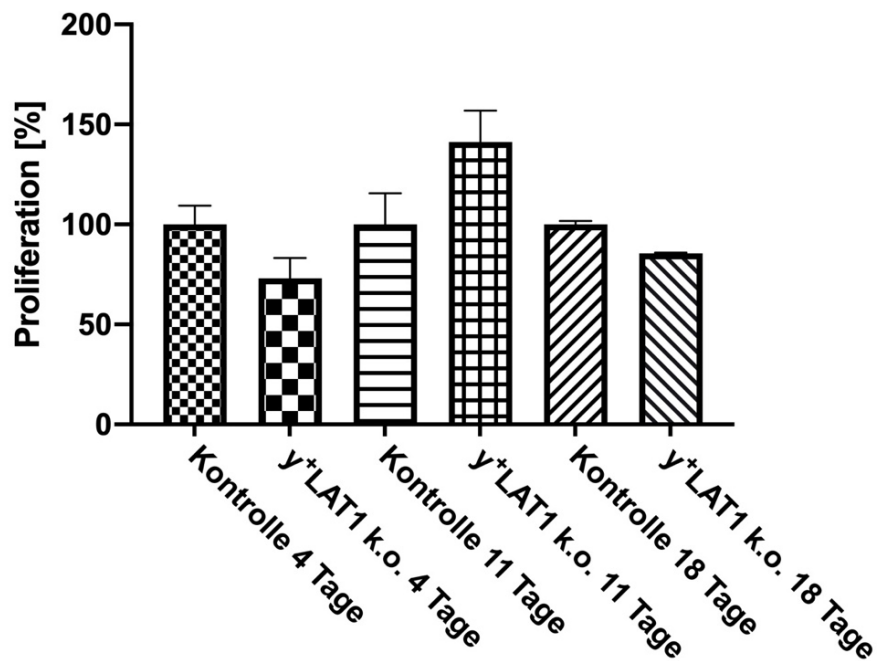


Abbildung 17: Proliferation der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen Lenti 09

Dargestellt ist der [³H]-Thymidin-Proliferationsversuch, der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT-1 k.o.), verglichen mit den Kontrollen, die mit *non-target* shRNA transduziert wurden für die Versuchstage 4;11;18. Für die Tage 4 und 11 wurden drei Proben (n=3) und für den Tag 18 wurden zwei Proben (n=2) jeweils für die Kontrolle und für die zu testenden Zellen abgenommen. Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen der Proliferation der y⁺LAT-1-supprimierten HG3-Zellen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen desselben Versuchstages. Tag 4: 73%±8,4%; Tag 11: 141,2%±12,9%; Tag: 18 85,6%±0,6%. Auf eine statistische Auswertung wurde bei n=2-3 verzichtet.

Parallel zu den Versuchen der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen wurden auch die y⁺LAT2-supprimierten HG3-Zellen nach demselben Ablauf getestet. Sie werden exemplarisch für den Lenti 09 dargestellt, bevor die Zusammenfassung aller Versuchsdurchgänge erfolgt. Verglichen mit dem y⁺LAT1 war eine deutlich höhere Restexpression des y⁺LAT2 nach Suppression im Durchgang Lenti 09 zu sehen. So zeigte sich an Tag vier nach Transduktion eine Expression des y⁺LAT2 von 73,5% verglichen mit den *non-target* transduzierten Kontrollzellen, wobei die Restexpression des y⁺LAT1 bei dem direkten Vergleich mit den gleichen Kontrollzellen bei lediglich 32,3% lag. Bei beiden Transportern sanken die Restexpressionen zunächst ab und stiegen dann erneut an (Abbildung 18 A und Abbildung 14). Der Beobachtungsendpunkt für den y⁺LAT2 war an Tag 32. In dem Versuch der Argininaufnahme zeigte sich nach Suppression des y⁺LAT2 ein ähn-

liches Bild, wie nach der Suppression des γ^+ LAT1. In den ersten beiden Beobachtungstagen zeigte sich eine niedrigere Argininaufnahme nach Suppression des γ^+ LAT2 verglichen mit den Kontrollzellen (Abbildung 18 D). Bei der Viabilität war nach der Suppression des γ^+ LAT2 ein fast deckungsgleicher Verlauf, verglichen mit den Kontrollen, beobachtbar (Abbildung 18 B). Auch in dem Proliferationsversuch mit [3 H]-Thymidin ergaben sich nur geringe Unterschiede zwischen den γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen und den Kontrollen (Abbildung 18 C).

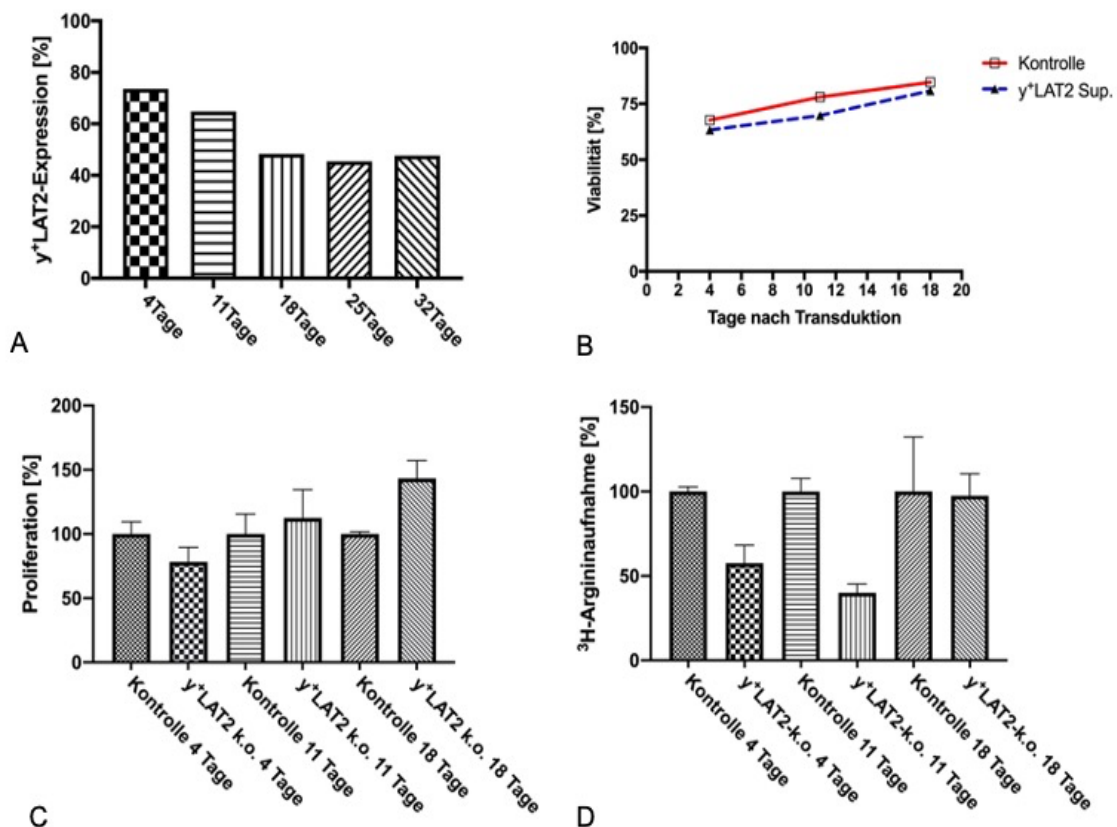


Abbildung 18: Versuchsdurchgang Lenti 09 unter γ^+ LAT2-Suppression

A: Dargestellt ist die quantitative Auswertung des Western Blots von Lenti 09 zum Nachweis der γ^+ LAT2 Restexpression, der mit der shRNA SLC7A6-6 transduzierten HG3-Population über einen Zeitraum von viereinhalb Wochen. Dabei wurden Lysate (n=1) an den Tagen 4;11;18;25 und 32; nach der Transduktion erstellt. Als Kontrolle diente eine HG3 Kultur, die mit der *non-target* shRNA shc002 transduziert wurde.

B: Dargestellt ist die Viabilität der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen (γ^+ LAT2 Sup.) und die Kontrollen, die mit der *non-target* shRNA über einen Zeitraum von 18 Tagen transduziert wurden im Durchgang Lenti 09. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid markiert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Für jeden Testtag gab es jeweils eine Probe (n=1) für die Kontroll- und Testzellen.

C: Dargestellt ist der [3 H]-Thymidin-Proliferationsversuch der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen (γ^+ LAT2 k.o.), verglichen mit den Kontrollen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden

für die Versuchstage 4;11;18. Für die Tage vier und elf wurden drei Proben (n=3) und für den Tag 18 wurden zwei Proben (n= 2) jeweils für die Kontrollen und für die zu testenden Zellen abgenommen. Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen desselben Versuchstages.

D: Dargestellt ist die [³H]-Argininaufnahme der y⁺LAT2 supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT2 k.o.) über einen Zeitraum von 18 Tagen, wobei je drei Proben (n=3) an den Tagen 4; 11; 18 abgenommen wurden. Als Kontrolle dienten die mit der *non-target* shRNA transduzierten HG3-Zellen, für die auch drei Proben an den jeweiligen Testtagen abgenommen wurden (n=3). Die Zellen wurden unter NEM-Hemmung mit einer Konzentration des L-[³H]-Arginin von 100 µM [10 µCi/ml] für 30 Sekunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen.

5.4 Gesamtergebnis der Versuchsdurchgänge unter y⁺LAT1-Suppression

In diesem Abschnitt sollen alle Versuchsdurchgänge betrachtet und die gesammelten Ergebnisse im Hinblick auf die y⁺LAT1-supprimierten Zellen präsentiert werden. Im nächsten Abschnitt folgen die Ergebnisse der y⁺LAT2-Suppression.

Für die Auswertung der funktionellen Versuche der Argininaufnahme, Viabilität und Proliferation war zunächst eine hinreichende Suppression des Transporters y⁺LAT1 notwendig. Bei dem Vergleich aller mit dem Western Blot detektierten und quantifizierten Restexpressionen aus 7 verschiedenen Lentiviralen Transduktionen (n=30) zeigte sich, unabhängig von der Zeit nach Transduktion, eine durchschnittliche Restexpression von 29,3% mit einer Standardabweichung von 14,2%. Unter Einbeziehung der unterschiedlichen Zeitpunkte nach Transduktion konnte für den Verlauf der Restexpression des y⁺LAT1 eine tendenzielle Zunahme festgestellt werden (Abbildung 19).

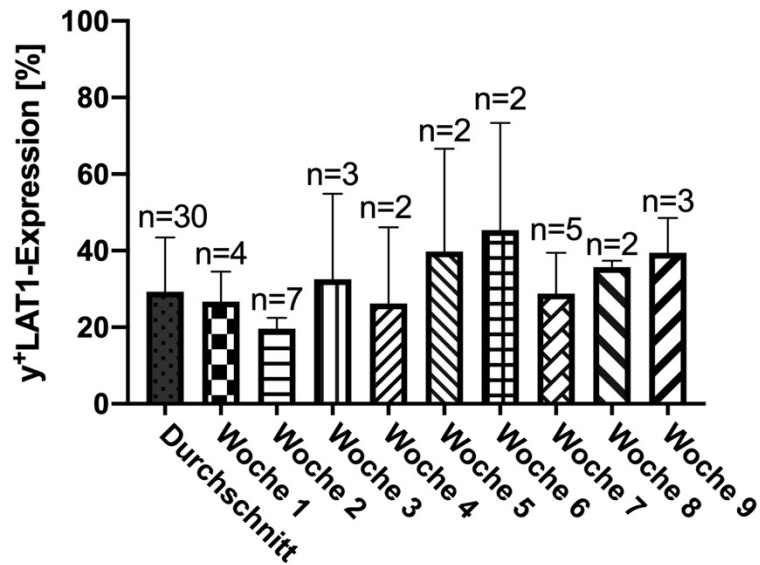


Abbildung 19: Zusammenfassung der y⁺LAT1-Restexpressionen

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Western Blots der y⁺LAT1-Restexpressionen, die eine bis neun Wochen nach der Transduktion in den Durchgängen Lenti 02 bis 10 erfolgt sind. Die y⁺LAT1-Suppression erfolgte über die Transduktion der shRNA SLC7A7-1 und die Kontrollzellen wurden mit der *non-target* shRNA transduziert. Die durchschnittliche Restexpression lag bei 29,3%±14,2%.

Bei Betrachtung der Arginin-Aufnahmeversuche als Maß der verbliebenen Transportleistungen der Durchgänge Lenti 07 und 09 für die y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zu den Kontrollen mit einem Mittelwert von 79,2%±15,5% ($n=18$) (Abbildung 20). Die Versuche wurden wöchentlich mit je drei Proben für die jeweilige Konditionen in den ersten drei Wochen nach Transduktion durchgeführt. Der Transporter hCAT-1 wurde in diesem Versuch zuvor mit NEM gehemmt, während der y⁺LAT2 unbeeinflusst blieb. Lenti 08 konnte aufgrund eines Fehl Ablaufes nicht in die Auswertung der Arginin-aufnahme unter y⁺LAT1-Suppression einbezogen werden.

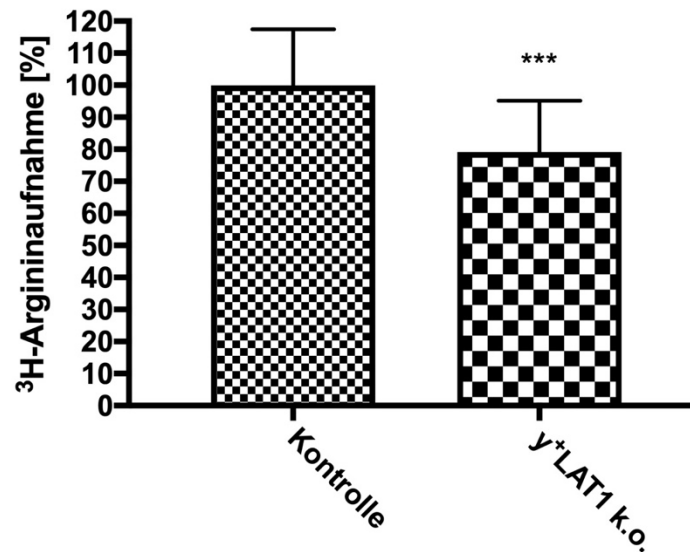


Abbildung 20: [^3H]-Argininaufnahme nach y^+LAT1 -Suppression von Lenti 07 und 09

Dargestellt ist die zusammengefasste [^3H]-Argininaufnahme der y^+LAT1 supprimierten HG3-Zellen (y^+LAT1 k.o.) der Durchgänge Lenti 07 und 09 ($n=18$). Als Kontrolle dienten die mit der *non-target* shRNA transduzierten HG3-Zellen. Für jeden Durchgang wurden in den ersten drei Wochen nach Transduktion wöchentlich drei Proben jeweils für Kontrolle und y^+LAT1 -supprimierte Zellen entnommen. Die Zellen wurden unter NEM-Hemmung mit einer Konzentration des L- ^3H -Arginin von $100 \mu\text{M}$ [$10 \mu\text{Ci/ml}$] für 30 Sekunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent. Die Argininaufnahme der y^+LAT1 -supprimierten HG3-Zellen war signifikant niedriger bei $79,2\% \pm 15,5\%$ als die der Kontrollzellen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *t*-Test (***: $p \leq 0,001$).

Für die Prüfung der Viabilität wurden in den ersten drei Wochen nach der Transduktion der Durchgänge Lenti 07 bis 09 jeweils 300.000 Zellen pro Probe entnommen. Diese wurden mit Propidiumiodid angefärbt und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Im Verlauf der drei Wochen nahm sowohl die Viabilität der Kontrollzellen, als auch der Transporter-gehemmten Zellen zu (Abbildung 21 A). Es zeigte sich ein nahezu deckungsgleicher Verlauf beider Viabilitätskurven.

Bei einer zeitunabhängigen Zusammenfassung der Viabilität ($n=12$ Kontrollzellen; $n=8$ y^+LAT1 k.o.) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den y^+LAT1 -supprimierten HG3-Zellen. Die Viabilität der Kontrollzellen lag bei $76,9\% \pm 16,8\%$ und die der y^+LAT -supprimierten HG3-Zellen bei $70,3\% \pm 17,9\%$ (Abbildung 21 B).

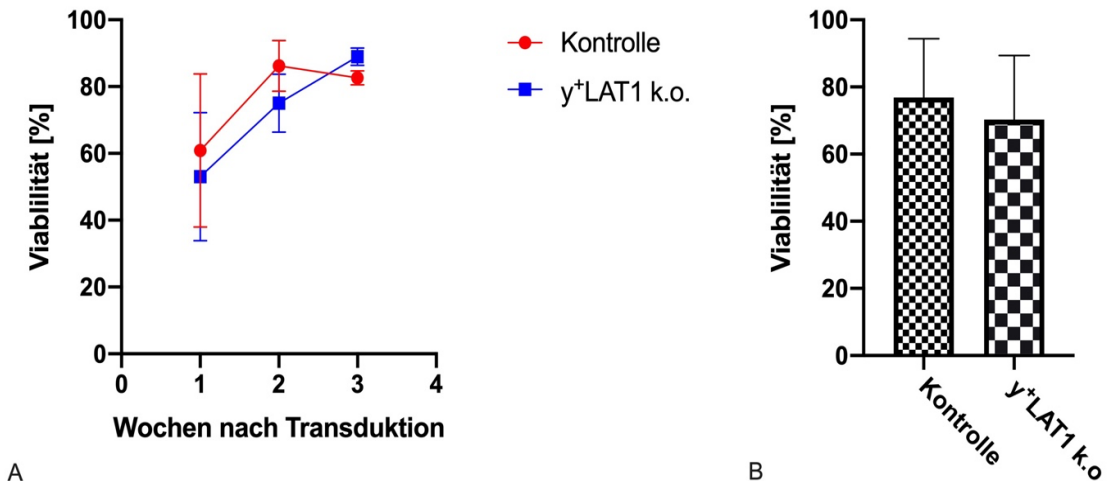


Abbildung 21: Viabilität Lenti 07 bis 09 unter y⁺LAT1-Suppression

A: Dargestellt ist die zusammengefasste Viabilität der y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT1 k.o.) und Kontrollzellen der Lentiviralen Durchgänge 07 bis 09 in den ersten drei Wochen nach Transduktion. Jede Woche wurde eine Probe jeweils für die mit der *non-target* shRNA transduzierten Zellen, als auch die mit der shRNA SLC7A7-1 transduzierten Zellen, abgenommen, mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei konnte der Anteil der toten Zellen ermittelt und von der Gesamtzellzahl abgezogen werden, wodurch der Anteil der vitalen Zellen bestimmt werden konnte. Erste Woche nach Transduktion: Kontrollen (n=4) 60,9%±19,8% vs. y⁺LAT1 (n=3) 53%±15,7%. Zweite Woche: Kontrollen (n=5) 86,2%±6,3% vs. y⁺LAT1 (n=3) 75,1%±7,1%. Dritte Woche: Kontrollen (n=3) 82,6%±1,7% vs. y⁺LAT1 (n=2) 88,9%±1,9%.

B: Dargestellt ist die in A präsentierte Viabilität der y⁺LAT1-supprimierten Zellen (y⁺LAT1 k.o.) ohne zeitlichen Bezug. Für die mit der *non-target* shRNA transduzierten Kontrollen (n=12) ergab sich eine Viabilität von 76,9%±16,8% und für die y⁺LAT1-supprimierten Zellen (n=8) eine Viabilität von 70,3%±17,9%. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Eine eingeschränkte Transporteraktivität könnte zu einem intrazellulären Aminosäuredefizit führen. Dies könnte neben einer eingeschränkten Viabilität auch mit einer gehemmten Proliferation einhergehen. Zur Überprüfung der Proliferation wurden daher die Zellen für 16 Stunden in [³H]-Thymidin-haltigem Medium kultiviert. Bei jeder Zellteilung wurde das markierte Thymidin in die DNA der neuen Zellen eingebaut. Anhand der markierten Thymidinmenge in den Zellen ließ sich das Maß der Proliferation ableiten. In den Durchgängen Lenti 07 bis 09 wurden in den ersten drei Wochen nach der Transduktion wöchentlich drei Proben a 150.000 Zellen je für die y⁺LAT1-supprimierten Zellen, als auch die *non-target* transduzierten Kontrollzellen abgenommen und auf ihre Proliferation geprüft. Hier zeigte sich für die y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen (n=6) in der ersten Woche nach der Transduktion eine reduzierte Proliferation von 75,7%±6,9% verglichen

mit den Kontrollzellen. In der zweiten und dritten Woche stieg die Proliferation wieder an (2. Woche: (n=12) 95,7%±29,7%; 3. Woche: (n=2) 85,6%±0,3%) (Abbildung 22 A). Fasste man die Proliferationen der γ^+ LAT1-supprimierten Zellen zeitunabhängig zusammen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen (γ^+ LAT1 k.o.: 88,7%±25% bei n=20; Kontrollen: 100%±8% bei n=19) (Abbildung 22 B).

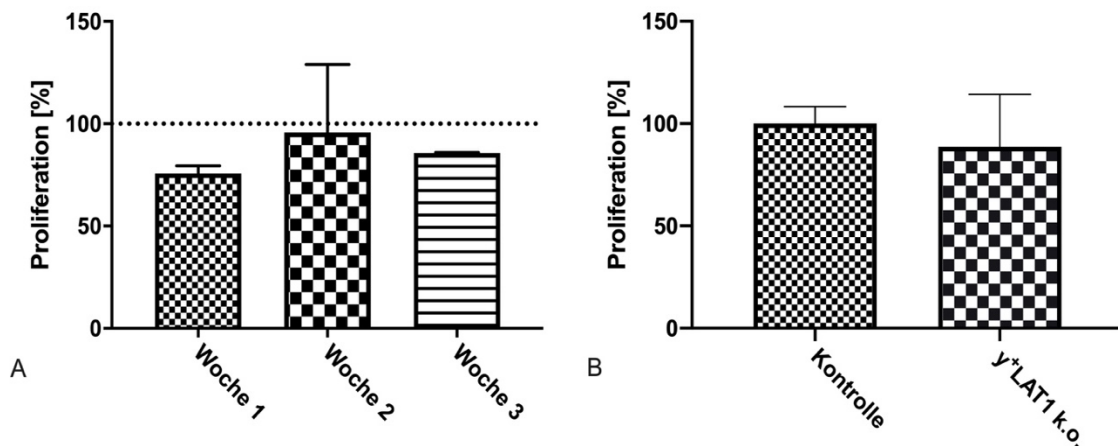


Abbildung 22: Proliferation Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT1-Suppression

A: Dargestellt ist der [3 H]-Thymidin-Proliferationsversuch der γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen, verglichen mit den Kontrollen, die mit *non-target* shRNA transduziert wurden für die ersten drei Wochen nach Transduktion. Für die erste Woche war n=6, für die Zweite war n=12 und für die Dritte war n=2. Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen.

B: Dargestellt ist die zeitlich unabhängige Zusammenfassung des in A gezeigten [3 H]-Thymidin-Proliferationsversuch der γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen, verglichen mit den Kontrollen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen (n=20) 88,7%±25% und den Kontrollzellen (n=19) 100%±8%. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen.

5.5 Gesamtergebnis der Versuchsdurchgänge unter γ^+ LAT2-Suppression

Parallel zu den Versuchen mit den γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen wurden auch HG3-Zellen mit der shRNA SLC7A6-6 transduziert und somit die Expression des Transporter γ^+ LAT2 supprimiert. Dieser Transporter ist auch wie der

y⁺LAT1 grundsätzlich in der Lage BAS zu transportieren und wurde neben dem hCAT-1 und y⁺LAT1 auf mRNA-Ebene von den HG3-Zellen am dritt häufigsten exprimiert. Aufgrund der Tatsache, dass Arginin als basische Aminosäure essentiell für die Viabilität und Proliferation von HG3-Zellen ist, wurde auch für diesen Transporter die Rolle für die Viabilität, Proliferation und Argininaufnahme von HG3-Zellen untersucht.

Ausgangspunkt für diese Versuche war eine hinreichende Suppression des Transporters y⁺LAT2. Für alle Versuchsdurchgänge von Lenti 04 bis 09 in denen der Transporter supprimiert wurde, ergab sich eine durchschnittliche Restexpression von 41,4%±18,2% (n=10). Zeitlich betrachtet wurden die y⁺LAT2-supprimierten HG3-Zellen nur im Durchgang Lenti 09 länger als die geplanten drei Wochen kultiviert. Daher lag für Wochen vier und fünf nach Transduktion jeweils nur ein Wert vor (Abbildung 23). Verglichen mit der Suppression des Transporters y⁺LAT1 war die durchschnittliche Restexpression des y⁺LAT2 etwa 12% höher. Der Effekt der steigenden Restexpression über die Zeit, der für den y⁺LAT1 beobachtet werden konnte, war für den y⁺LAT2 schwieriger zu beurteilen, da die y⁺LAT2-supprimierten Zellen meistens lediglich die geplanten drei Wochen kultiviert wurden.

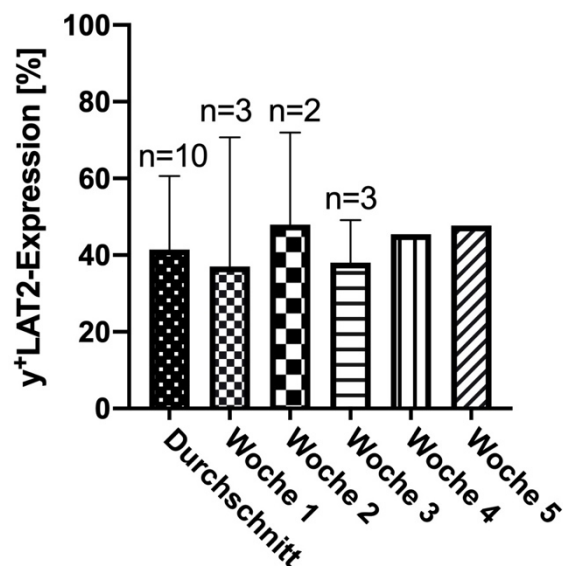


Abbildung 23: Zusammenfassung der y⁺LAT2 Restexpression aller Durchgänge

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der y⁺LAT2-Restexpression in den Western Blots der Versuche Lenti 04 bis 09 (n=10) in den ersten fünf Wochen nach Transduktion. Die y⁺LAT2-Suppression erfolgte über die Transduktion der shRNA SLC7A6-6. Die Kontrollzellen wurden mit der *non-target* shRNA transduziert. Die durchschnittliche Restexpression lag bei 41,4%±18,2%. In der vierten und fünften Woche gab es jeweils nur eine Probe (n=1) zum Auswerten.

Parallel zu den Versuchen der γ^+ LAT1-supprimierten HG3-Zellen wurde auch mit den γ^+ LAT2-supprimierten Zellen ein Arginin-Aufnahmeversuch nach dem bereits oben beschriebenen Aufbau durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Argininaufnahme zwischen den Kontroll- und den γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen ($94,9\% \pm 64,3\%$ bei $n=21$) (Abbildung 24).

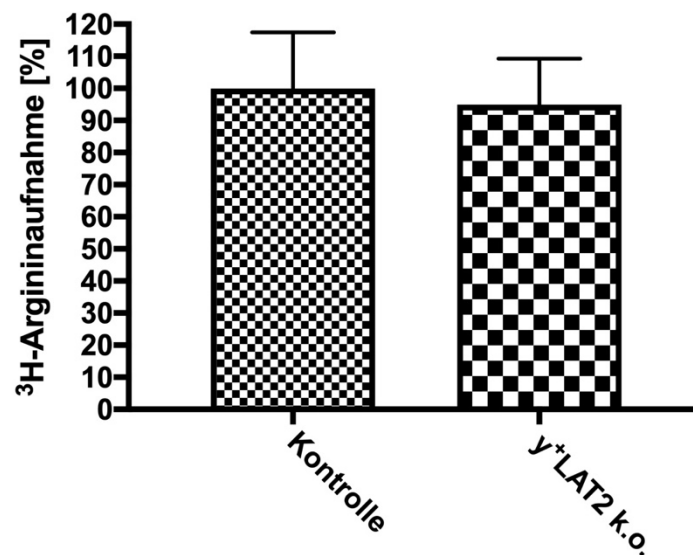


Abbildung 24: [^3H]-Argininaufnahme nach γ^+ LAT2-Suppression von Lenti 07 bis 09

Dargestellt ist die zusammengefasste [^3H]-Argininaufnahme der γ^+ LAT2 supprimierten HG3-Zellen (γ^+ LAT2 k.o.) der Durchgänge Lenti 07 bis 09 ($n=21$). Als Kontrolle dienten die mit der *non-target* shRNA transduzierten HG3-Zellen. Für jeden Durchgang wurden in den ersten drei Wochen nach Transduktion wöchentlich drei Proben jeweils für die Kontrolle und die γ^+ LAT2-supprimierten Zellen entnommen. Die Zellen wurde unter NEM-Hemmung mit einer Konzentration des L- [^3H]-Arginin von $100 \mu\text{M}$ [$10 \mu\text{Ci/ml}$] für 30 Sekunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Argininaufnahme der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen ($94,9\% \pm 64,3\%$) war nicht signifikant niedriger als die der Kontrollzellen ($100\% \pm 16,9\%$).

In der Viabilitätsprüfung der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen, die dem gleichen Versuchsaufbau wie die γ^+ LAT1-supprimierten Zellen folgten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen. Die Viabilität über einen Zeitraum von drei Wochen nach Transduktion zeigte einen nahezu deckungsgleichen Verlauf zwischen den Kontrollen und den γ^+ LAT2-supprimierten Zellen (Abbildung 25 A). Im zeitlich unabhängigen Vergleich lag die Viabilität der Kontrollzellen ($n=12$) bei $76,9\% \pm 16,8\%$ und die Viabilität der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen ($n=12$) bei $76,9\% \pm 10,2\%$ (Abbildung 25 B).

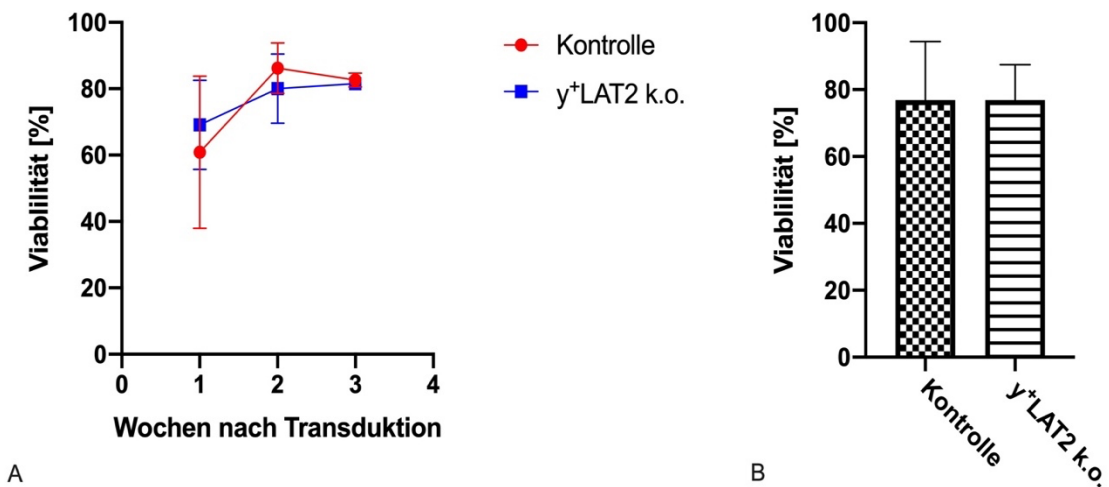


Abbildung 25: Viabilität Lenti 07 bis 09 unter y⁺LAT2-Suppression

A: Dargestellt ist die zusammengefasste Viabilität der y⁺LAT2-supprimierten HG3-Zellen (y⁺LAT2 k.o.) und Kontrollzellen der Lentiviralen Durchgänge 07 bis 09 in den ersten drei Wochen nach Transduktion. Jede Woche wurde eine Probe jeweils für die mit der *non-target* shRNA transduzierten Zellen, als auch für die mit der shRNA SLC7A6-6 transduzierten Zellen abgenommen, mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei konnte der Anteil der toten Zellen ermittelt und von der Gesamtzellzahl abgezogen werden, wodurch der Anteil der vitalen Zellen bestimmt werden konnte. Erste Woche nach Transduktion: Kontrollen (n=4) 60,9%±19,8% vs. y⁺LAT2 (n=4) 69,1±11,6%. Zweite Woche: Kontrollen (n=5) 86,2%±6,3% vs. y⁺LAT2 (n=4) 80%±9%. Dritte Woche: Kontrollen (n=3) 82,6%±1,7% vs. y⁺LAT2 (n=4) 81,5%±1%.

B: Dargestellt ist die in A präsentierte Viabilität der y⁺LAT2-supprimierten Zellen (y⁺LAT2 k.o.) ohne zeitlichen Bezug. Für die mit der *non-target* shRNA transduzierten Kontrollen (n=12) ergibt sich eine Viabilität von 76,9%±16,8% und für die y⁺LAT2-supprimierten Zellen (n=12) eine Viabilität von 76,9%±10,2%. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Parallel zu den Argininaufnahme- und den Viabilitäts-Versuchen erfolgte die Überprüfung der Proliferation der Versuchsdurchgänge Lenti 07 bis 09 nach dem gleichen Schema, das bereits für die y⁺LAT1-supprimierten HG3-Zellen beschrieben wurde. Für y⁺LAT2-supprimierten Zellen zeigte sich zeitunabhängigen betrachtet in der Proliferation kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen (Kontrollen: 100%±17,8% bei n=20; y⁺LAT2 k.o.: 110,4%±39,6% bei n=23) (Abbildung 26 B). Betrachtete man die ersten drei Wochen nach der Transduktion, so zeigte sich in der ersten Woche eine reduzierte Proliferation der y⁺LAT2-supprimierten Zellen (80,5%±10,3% bei n=6). In der zweiten und dritten Woche überstieg die Proliferation der y⁺LAT2-supprimierten Zellen die der Kontrollzellen (2. Woche y⁺LAT2: 140,6%±44,2% bei n=6; 3. Woche y⁺LAT2: 110,2%±34,3% bei n=11) (Abbildung 26 A).

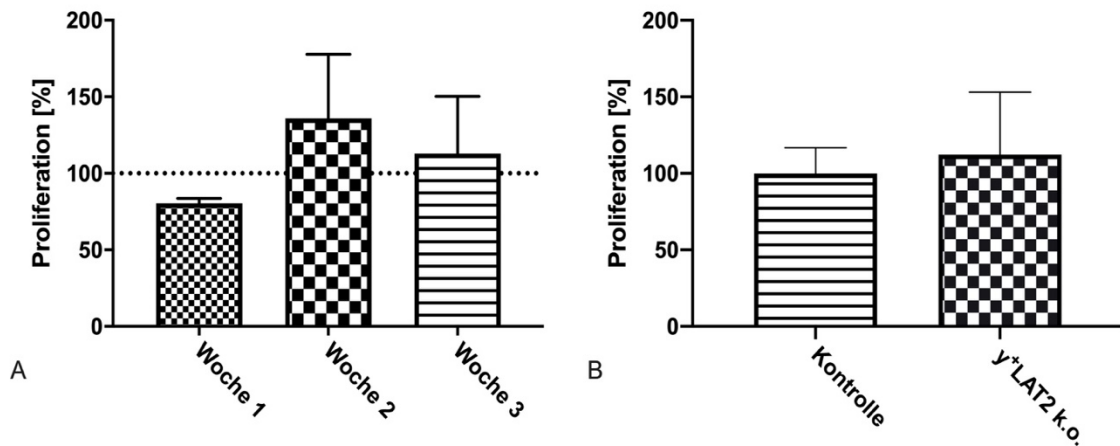


Abbildung 26: Proliferation Lenti 07 bis 09 unter γ^+ LAT2-Suppression

A: Dargestellt ist der [3 H]-Thymidin-Proliferationsversuch der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen, verglichen mit den Kontrollen, die mit *non-target* shRNA transduziert wurden für die ersten drei Wochen nach Transduktion. Für die erste und zweite Woche war $n=6$, für die dritte Woche war $n=11$. Die Zellproliferation wurde durch den Einbau von [3 H]-Thymidin über 16 Stunden ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen.

B: Dargestellt ist die zeitlich unabhängige Zusammenfassung des in A gezeigten [3 H]-Thymidin-Proliferationsversuch der γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen, verglichen mit den Kontrollen, die mit der *non-target* shRNA transduziert wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den γ^+ LAT2-supprimierten HG3-Zellen ($n=23$) $110,4\% \pm 39,6\%$ und den Kontrollzellen ($n=20$) $100\% \pm 17,8\%$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent im Vergleich^a zu den Kontrollzellen.

6 Diskussion

Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist der veränderte Zellmetabolismus zu Gunsten einer beschleunigten Zellvermehrung (10). Für die Proliferation benötigten Zellen im Allgemeinen Bausteine in Form von Aminosäuren, die sie für zahlreiche intrazelluläre Stoffwechselprozesse, sowie zur Proteinbiosynthese verwenden.

6.1 Der Transporter hCAT-1 ist essentiell für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen

Für die chronische lymphatische Leukämie (CLL) konnte unsere Arbeitsgruppe (AG) nachweisen, dass das Überleben und das Wachstum der CLL-Zellen von Arginin, einer semi-essentiellen Aminosäure abhängig ist (Abbildung 6) (39). Semi-essentiell bedeutet, dass der Körper den Bedarf an Arginin bis zu einem gewissen Grad durch die Eigensynthese decken kann. Dies gelingt den Zellen durch die Umwandlung der Aminosäure Citrullin mithilfe der Harnstoffzyklusenzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS) sowie Argininosuccinat-Lyase (ASL) (24). Können Zellen bestimmte essentielle Substanzen nicht selbst synthetisieren, sondern sind auf den Import dieser Substanzen angewiesen, wird dies als Auxothrophie bezeichnet.

Für die primären CLL-Zellen aus dem von unserer AG untersuchtem peripheren Blut der meisten Patienten/Patientinnen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die CLL-Zellen selbst unter Wachstumsstimulation und Argininmangel keine ASS exprimieren und somit als argininauxotroph angesehen werden konnten. Eine Wachstumsstimulation mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor 9-Agonisten (TLR9) war notwendig, da sich die primären CLL-Zellen aus dem peripheren Blut in einem Zellarrest in den Phasen G₀/G₁ befanden und ohne Stimulation nicht proliferieren konnten (58). Für die weiteren funktionellen Versuche wie der Argininaufnahme, der Viabilität und der Proliferation wurden immortalisierte HG3-CLL-Zellreihen verwendet, die nicht stimuliert werden mussten.

Die Abhängigkeit der CLL-Zellen von Arginin, sowie die Tatsache, dass die Zellen Arginin nicht selbst synthetisieren können, lassen hoffen, dass ein pharmakologisch erzeugter Argininmangel eine weitere Therapieoption zur Behandlung der CLL darstellen könnte. Ein Ansatz um einen Argininmangel für die Zellen hervorzurufen, ist die Argininkonzentration im Serum zu senken. Diese systemische Arginindepletion wurde bereits erfolgreich für andere Tumorentitäten getestet. So konnte für diese in der Kombination mit Cytarabin bereits ein gesteigerter Zelluntergang von argininauxotrophen AML-Zellen beobachtet werden (32).

Neben der systemischen Argininreduktion ist eine direkte Hemmung der Arginintransporter der Tumorzellen ein alternativer und innovativer Ansatz, der in anderen Tumorarten erste erfolgsversprechende Ergebnisse lieferte. In Pankreaskarzinomzellen führte eine Suppression des Aminosäuretransporters ATB^{0,+}, in Prostatakarzinomzellen eine Suppression des Transporters ASCT2, zu einer Inhibition des Tumorwachstums in Xenograftmodellen (59, 60).

Eine Intervention mit den Aminosäuretransportern beschränkt den Zugang der Tumorzellen zu den notwendigen Bausteinen und könnte somit die Achillessehne der Tumorzellen sein (11). Besonders vielversprechend für eine zelluläre Intervention ist die Tatsache, dass Tumorzellen als Ausdruck ihres gesteigerten Bedarfs an Aminosäuren vermehrt Aminosäuretransporter exprimieren (61). Auch für die primären CLL-Zellen konnte nach der Stimulation mit TLR9 eine verstärkte Expression des Aminosäuretransporters hCAT-1 beobachtet werden. Dieser Transporter konnte von unserer AG als Hauptimporteureur von Arginin identifiziert werden, bei dessen Suppression mittels einer shRNA es zu einer verminderten Viabilität und zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Proliferation der HG3-CLL-Zellreihe kam (Abbildung 8). Unter der Suppression des hCAT-1 kam es sogar zu einer verschlechterten Viabilität der HG3-Zellen verglichen mit der alleinigen Kultivierung in argininfreiem Medium. Hierfür könnte ein zusätzlicher Mangel der essentiellen Aminosäure Lysin die Ursache sein, da diese als basischen Aminosäure ebenfalls von dem hCAT-1 importiert wird (44). Neben den erfolgreichen *in vitro* Versuchen zeigte sich in einem *in vivo* Versuch mit einem murinen Xenograftmodell, bei dem HG3-CLL-Zellen implantiert wurden, ein verlangsamtes Tumorwachstum bei Suppression des hCAT-1 (Abbildung 9).

6.2 Identifikation weiterer kationischer Aminosäuretransporter in den CLL-Zellen

Neben dem Transporter hCAT-1 exprimieren die CLL-Zellen noch die Transporter γ^+ LAT1, γ^+ LAT2 und b^{0,+}AT, die ebenfalls basische (=kationische) Aminosäuren, wie Arginin, transportieren können. In der HG3-CLL-Zellreihe war der γ^+ LAT1 auf mRNA-Ebene stark exprimiert, während die Expressionen der Transporter hCAT-1 und γ^+ LAT2 um etwa 60% niedriger lagen. Der Transporter b^{0,+}AT wurde kaum von den HG3-Zellen exprimiert (Abbildung 27) (44).

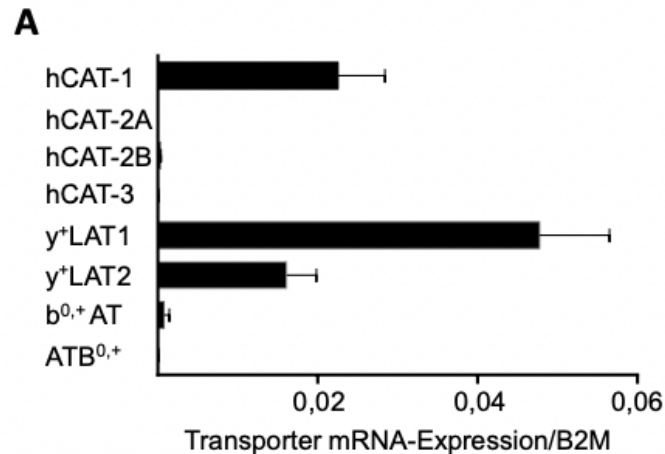


Abbildung 27: Expression der Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und 2 in HG3-Zellen

Dargestellt ist die Quantifizierung der mRNA-Expression der Arginintransporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, y⁺LAT1, y⁺LAT2, b^{0,+}AT und ATB^{0,+} in HG3-Zellen mittels quantitativer real time-PCR. Gezeigt ist die mRNA-Expression der jeweiligen Transporter in Relation zu β_2 -Mikroglobulin (B2M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n=3). Die Abbildung entstammt der Dissertation von A. Werner: Die Bedeutung von Aminosäuretransportern und endogener Synthese für die Bereitstellung von Arginin in humanen T-Lymphozyten und chronischen lymphatischen Leukämiezellen (44)

Die Transporter y⁺LAT1 und y⁺LAT2 sind obligatorische Austauschere. Sie können natriumunabhängig basische Aminosäuren (BAS) und natriumgekoppelt auch große neutrale Aminosäuren (NAS) transportieren. Aufgrund des Natriumkonzentrationsgefälles findet überwiegend ein Import von NAS im Austausch gegen BAS statt. Es können aber auch BAS gegeneinander ausgetauscht werden, die zu einem Import von Arginin führen können. Der Transporter b^{0,+}AT findet sich häufig an der apikalen Seite von polarisierten Zellen und tauscht natriumunabhängig extrazelluläre BAS und Cystin gegen intrazelluläre NAS aus (33).

Für die Analyse welcher der kationischen Aminosäuretransportern für den Hauptanteil der Argininaufnahme zuständig ist, wurden die verschiedenen Transportsysteme gehemmt und die Aufnahme von radioaktiv-markiertem Arginin gemessen. Unter der Hemmung des y⁺-Systems mit NEM, deren einziger in den HG3-Zellen detektierbarer Vertreter der hCAT-1 war, zeigte sich eine um 75,8% reduzierte Argininaufnahme, weshalb dieser als Hauptimporteuer identifiziert werden konnte.

Mit Leucin konnte die Argininaufnahme der Systeme y^+L (y^+LAT1 und 2) und $b^{0,+}$ ($b^{0,+}AT$) gehemmt werden, worunter die Argininaufnahme um 53% sank. Dies wies auf eine Beteiligung eines dieser Systeme neben dem hCAT-1 hin. Unter der Gabe von Cystin, einem Substrat des Transporters $b^{0,+}AT$, konnte die Argininaufnahme des Transporters gehemmt werden, worunter sich lediglich eine um 11% reduzierte Argininaufnahme zeigte. Dieser geringe Einfluss, sowie die niedrige Expression des Transporters $b^{0,+}AT$ in den primären CLL-Zellen ließen vermuten, dass der Transporters $b^{0,+}AT$ nur eine geringe Rolle in der Argininaufnahme in die CLL-Zellen hatte (44).

Eine Argininaufnahme unter der Gabe von Leucin, NEM und in Abwesenheit von Natrium wies zudem auf die Aktivität des y^+L -Systems hin. Mit dieser Konstellation konnte zwischen den Transportern y^+L und $b^{0,+}AT$ unterschieden werden. Leucin diente beiden Systemen als Substrat. Allerdings kann das System y^+L die NAS Leucin nur in Anwesenheit von Natrium importieren, während der Transporter $b^{0,+}AT$ diese natriumunabhängig aufnehmen kann. Durch diese Substrat-Inhibition wurde die Aufnahme von Arginin mittels des Transporters $b^{0,+}AT$ gehemmt, während die Transporter des y^+L -Systems durch die Abwesenheit des Natriums nur BAS austauschen konnten und in diesem Zuge Arginin aufnahmen (33). Es konnte somit im Arginin-Aufnahmeversuch gezeigt werden, dass neben dem hCAT-1 die Transporter des y^+L -Systems ebenfalls eine Rolle in der Argininaufnahme spielten (44).

Trotz ihrer überwiegenden Exporteigenschaft in physiologischer Umgebung für BAS konnte eine Argininaufnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher stellte sich die Frage, welcher der beiden Transporter y^+LAT1 oder 2 des y^+L -Systems in den CLL-Zellen den größeren Anteil an der Argininaufnahme haben könnte und ob einer dieser beiden Transporter eine entscheidende Rolle für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen spielen könnte.

6.3 Die Transporter y^+LAT1 und 2 spielen keine Rolle für die Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen

Anhand der durchgeführten Versuche dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine shRNA-vermittelte Suppression des y^+LAT1 zu einer signifikant reduzierten Argininaufnahme führte. Die Restexpression des Aminosäuretransporters y^+LAT1 lag durchschnittlich bei 29,3%, unter der sich eine um 20,8% reduzierte Argininaufnahme in dem L-[3H]-Arginin-Aufnahmeversuch zeigte. Allerdings konnte keine verminderte Viabilität und Proliferation zu den *non-target* transduzierten Kontrollzellen beobachtet werden.

Eine verminderte Argininaufnahme oder Einschränkung der Viabilität und Proliferation konnte für die y^+ LAT2 supprimierten HG3-Zellen nicht festgestellt werden. Somit wurde gezeigt, dass neben dem Transporter hCAT-1, der Transporter y^+ LAT1 des y^+ L-Systems, den zweitgrößten Anteil am Import von Arginin in die CLL-Zellen im Arginin-Aufnahmeversuch hat. Bei einer durchschnittlichen Suppression des hCAT-1 Transporters um 84% in den HG3-Zellen zeigte sich eine um 48,5% reduzierte Argininaufnahme, die wie die Kultivierung der HG3-Zellen, in argininfreien Medium zu einer verminderten Viabilität und einer fast vollständig gehemmten Proliferation führte. Die Tatsache, dass die Suppression des y^+ LAT1 mit einer um 20,8% reduzierten Argininaufnahme keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität und die Proliferation für die HG3-Zellen hatte, lässt sich am ehesten auf drei Ursachen zurückführen. Der y^+ LAT1 hatte erstens lediglich einen geringen Anteil an der Gesamtargininaufnahme im Arginin-Aufnahmeversuch und beinhaltete zweitens keine neutralen Aminosäuren im Versuchspuffer. Daher lagen im Arginin-Aufnahmeversuch keine physiologischen Bedingungen vor, unter denen die Transporter der y^+ L-Systems normalerweise aufgrund des Natriumkonzentrationsgefälles NAS natriumabhängig importieren und natriumunabhängig BAS wie Arginin exportieren. Somit ist anzunehmen, dass unter artifiziellen Bedingungen, wie sie im Arginin-Aufnahmeversuch vorlagen, ein Austausch von BAS gegen BAS stattfand, bei dem markiertes Arginin aufgenommen wurde. Dieser Austausch von BAS wurde bereits von Rotoli für den y^+ LAT2 beschrieben, bei dem auch ein Aufnahmeversuch in einem Puffer durchgeführt wurden, der keine NAS enthielt (62).

Der hCAT-1 wurde drittens in den Viabilitäts und Proliferationsversuchen nicht gehemmt und übernahm deshalb die Hauptversorgung der HG3-Zellen mit Arginin. Diese Besonderheiten müssen bei der Interpretation des Arginin-Aufnahmeversuches beachtet werden. Allerdings konnte durch den Versuch gezeigt werden, wie hoch der Anteil der jeweiligen Transporter an der Argininaufnahme unter diesen Bedingungen war. So belief sich der rechnerische Anteil der Argininaufnahme bei der Annahme eines 100% *Knock-outs* der einzelnen Transporter auf 61,3% für den hCAT-1, 29,4% für den y^+ LAT1 und 8,7% für den y^+ LAT2 (Tabelle 29). Für die Bestätigung dieser Annahme wären zukünftig Experimente mittels CRISPR/CAS vorstellbar, bei denen eine höhere Transporter-Suppression erreicht werden könnte.

Tabelle 29: Transporter-Suppression im Verhältnis zur Argininaufnahme

Daten des hCAT-1 stammen aus (44)

Transporter	Transporter-Suppression [%]	Reduzierte Argininaufnahme [%]	Rechnerischer Anteil der reduzierte Argininaufnahme bei 100%iger Suppression [%]
hCAT-1	84	51,5	61,3
y⁺LAT1	70,7	20,8	29,4
y⁺LAT2	58,6	5,1	8,7
Gesamt			99,4

6.4 Argininakkumulation unter der Hemmung der Transporter des y⁺L-Systems

Da die Aminosäuretransporter y⁺LAT1 und y⁺LAT2 unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich als Exporteure für BAS fungieren und lediglich einen geringen Anteil an der Argininaufnahme in die CLL-Zellen haben, stellt sich die Frage, ob eine Reduktion der Exportleistung durch die Suppression der Transporter zu einer intrazellulären Akkumulation von basischen Aminosäuren führen könnte.

Eine intrazelluläre Akkumulation der basischen AS Lysin und Arginin konnte bereits in Erythrozyten nach der Suppression des Transporters y⁺LAT2 festgestellt werden (62). Auch für Jurkat-Zellen konnten intrazellulär erhöhte Argininkonzentrationen nach shRNA-induzierter y⁺LAT1-Suppression festgestellt werden (63). Ob eine Suppression der einzelnen Transporter des y⁺L-Systemes auch zu einer Akkumulation von BAS in den CLL-Zellen führen könnte, ist aktuell noch ungewiss und könnte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Zudem stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine solche Akkumulation für die CLL-Zellen haben könnte.

Für erhöhte Konzentrationen an Stickstoffmonoxid (NO) konnten anti-apoptische Effekte in den CLL-Zellen beobachtet werden. In den in dieser Arbeit untersuchten mononukleären Zellen des peripheren Blutes von CLL-Patienten/Patientinnen (etwa 95% Tumorzellen) wurden mittels Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion und Western Blots die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) nachgewiesen, die aus Arginin NO und Citrullin synthetisiert

(64). Eine intrazelluläre Argininakkumulation durch die Suppression der Transporter des γ^+ L-Systems könnte demnach zu einem Anstieg der NO-Konzentration durch die Umwandlung der iNOS führen und somit die Viabilität der CLL-Zellen verbessern. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertation ist allerdings noch nicht bekannt, ob die in dieser Arbeit verwendeten HG3-CLL-Zellreihe eine iNOS exprimieren.

Erhöhte Konzentrationen an Arginin und NO konnten bereits bei Patienten/Patientinnen, die an einer Lysinurischen Proteinintoleranz leiden festgestellt werden (65, 66). Bei dieser Erkrankung ist der γ^+ LAT1 aufgrund eines genetischen Defektes nicht funktionstüchtig. Zukünftige Versuche wären hilfreich um zu klären, ob eine erhöhte intrazelluläre Argininkonzentration mit einer vermehrten iNOS-Aktivität zu einem anti-apoptotischen Effekt in CLL-Zellen führen könnte. Zunächst sollte aber ermittelt werden, ob HG3-Zellen eine iNOS exprimieren.

Gegen die Annahme, dass eine Erhöhung der intrazellulären Argininkonzentration zu einer gesteigerten NO Synthese führen könnte, spricht der K_m -Wert der iNOS, der bei etwa 20 μ M liegt (67). Lediglich sehr niedrige Argininkonzentrationen hätten somit einen Einfluss auf die iNOS-Aktivität. Für die von unserer Arbeitsgruppe untersuchten T-Zellen zeigte sich eine intrazelluläre Argininkonzentration von 1,2mM (44). Somit ist anzunehmen, dass die Enzymaktivität der iNOS bereits vollausgeschöpft ist und eine weitere Erhöhung der intrazellulären Argininkonzentration zu keinem Anstieg der NOS-Aktivität führen würde. Allerdings erfolgte für die HG3-Zellen keine Messung der intrazellulären Argininkonzentration. Diese Messung könnte im Zuge der bereits formulierten Fragen des Zusammenhanges zwischen der Argininkonzentration, der iNOS-Aktivität und eines anti-apoptotischen Effektes in CLL-Zellen erfolgen.

6.5 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte die ursprüngliche Vermutung, dass die Transporter γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2 keinen Einfluss auf die Viabilität und die Proliferation der CLL-Zellen haben, bestätigt werden. Unter artifiziellen Versuchsbedingungen, bei denen der Versuchspuffer keine NAS oder Natrium enthält, sind die Transporter zwar in der Lage BAS gegen BAS auszutauschen und so Arginin aufzunehmen, sie wirken aber aufgrund des Natriumkonzentrationsgefälles und der Anwesenheit von NAS in physiologischen Umgebungen als Exporteure für BAS (33, 37). Somit ist bei einem Ausfall einer der beiden Transporter γ^+ LAT1 oder 2 kein intrazellulärer Argininmangel zu vermuten. Auch anhand des Krankheitsbildes der LPI zeigt sich eine Lebensfähigkeit für die meisten Zellen (68).

Mit dieser Arbeit konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die y^+ LATs einen wesentlichen Beitrag zur Versorgung von CLL-Zellen mit BAS leisten und die Zellen lediglich über den hCAT-1 zur Argininaufnahme verfügen. Dies unterstreicht die Relevanz des hCAT-1 als einen neuen pharmakologischen Angriffspunkt für die Therapie der CLL, sowie für weitere argininauxotrophe Tumore, die ihre Argininversorgung auf den hCAT-1 stützen.

Zukünftig wird sich vor allem die Frage stellen, welche Form der Arginindepletion das Wachstum von argininauxotrophen Tumoren effizienter hemmen könnte. Entweder die Hemmung des hCAT-1 bei Tumoren, deren Argininversorgung hauptsächlich auf diesen Transporter beruht oder die systemische Argininreduktion mittels argininmetabolisierender Enzyme, für die bereits erste klinische Erfolge beobachtet werden konnten. Eine Therapie mit dem argininmetabolisierendem Enzym ADI-PEG20 verlängerte den progressionsfreie Krankheitsverlauf und das Überleben bei 25% der an Melanom und bei 47% der an Hepatozellären Karzinom erkrankten Patienten/Patientinnen (69). ADI-PEG20 wandelt hierbei Arginin in Citrullin und Ammoniak um und wird von den meisten der in dieser Weise behandelten Patienten/Patientinnen gut vertragen (70). Nachteil einer Arginindepletion könnte allerdings eine immun-inhibitorische Wirkung sein. Für T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass diese unter vollständigen Argininmangel in ihrem Wachstum und in Ihrer Funktion eingeschränkt sind (22). In Anwesenheit einer geringen Argininkonzentration von 20 μ M (das entspricht einem Fünftel der normalen Argininkonzentration) können T-Zellen ihren Argininbedarf durch die Umwandlung von Citrullin in Arginin decken, weshalb sie unter diesen Bedingungen demzufolge nicht argininauxotrop sind (44). Bei endogenen Citrullinmangel könnte zudem eine Citrullinsubstitution die Argininsynthese in argininprototrophen Zellen unterstützen (71). Bei dem Einsatz von ADI-PEG20 entstehen jedoch bereits große Mengen an Citrullin, die zur Argininsynthese genutzt werden können (70). Bei dem Einsatz von Arginase, einem weiteren argininmetabolisierenden Enzym, entsteht dagegen Ornithin, das zunächst in Citrullin umgewandelt werden müsste. Die Wahl des Enzyms zur systemischen Arginindepletion könnte somit eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung des Immunsystems spielen.

Eine systemweite hCAT-1-Inhibition würde allerdings nicht nur die Argininaufnahme einschränken, sondern sich auch auf die Aufnahme von Lysin auswirken, einer essentiellen, kationischen Aminosäure, die ebenfalls über den hCAT-1 aufgenommen wird. Eine Suppression des hCAT-1 in T-Zellen führte zu einer reduzierten Argininaufnahme, die allerdings nur eine um 30% reduzierte intrazelluläre

Argininkonzentration bewirkte. Dennoch zeigte sich hierrunter eine verstärkt eingeschränkte Proliferation, die eventuell auch auf einen begleitenden Lysinmangel zurückzuführen sein könnte (44). Hier gilt es zukünftig die Immunfunktion unter der Suppression des hCAT-1 zu erforschen.

Doch auch für die systemische Arginindepletion mittels argininmetabolisierender Enzyme ergaben sich Probleme. So konnten bei einem 57-jährigen Patienten ein Wiederanstieg der Plasma-Argininkonzentration unter der laufenden Behandlung mit ADI-PEG20 festgestellt werden, die auf die Bildung von Antikörpern gegen das bakterielle ADI-PEG20-Enzym beruhten (72). Weitere beobachtete Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegen die ADI-PEG20-Therapie beruhten auf der Re-Expression von ASS oder einer verstärkten Glykolyse (73). Eine Re-Expression von ASS hebt die Arginin-Auxothrophie der Tumorzellen auf und wäre somit ein Resistenzmechanismus sowohl gegen die systemische Arginindepletion, als auch gegen die Arginindepletion der Zellen über die Suppression des Transporters hCAT-1.

Momentan ist zudem die Interaktion zwischen der ADI-PEG20 und der Mikroumgebung der Tumore nicht hinreichend erforscht (69). Selbst unter der ADI-PEG20-Therapie könnte eine ausreichende Argininkonzentration vorhanden sein, die gesunden Zellen in der Tumorumgebung bereitstellen und es den Tumorzellen ermöglichen ihre Lebensfähigkeit aufrecht zu erhalten (74). Der innovative Ansatz einer Suppression des hCAT-1 zur direkten Hemmung der Argininaufnahme könnte sich hier wohlmöglich als überlegen erweisen. Zukünftig sollten daher beide Ansätze zur Arginindepletion verfolgt und Gegenstand weiterer Forschungen sein.

7 Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gilt als die häufigste Leukämieform in Mitteleuropa. Sie wird nach der WHO-Klassifikation den indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet, da sie ihren proliferativen Ursprung nicht im Knochenmark, sondern im Lymphsystem hat. Durch die alleinige medikamentöse Therapie ist die CLL nach derzeitigen Wissenstand nicht heilbar. Lediglich die allogene Stammzelltransplantation stellt einen potentiell kurativen Therapieansatz dar, der nicht für alle Erkrankten geeignet ist. Somit besteht ein Bedarf an neuartigen Therapieoptionen zur Behandlung der CLL.

Einer dieser neuartigen Ansätze könnte die intrazelluläre Arginindepletion von Tumorzellen sein. Bereits für andere Tumorentitäten konnte eine Argininabhängigkeit festgestellt werden und es zeigten sich in klinischen Studien erste positive Resultate nach einer systemischen Arginindepletion mittels argininmetabolisierender Enzyme. Auch für die CLL konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Zellen für ihre Viabilität und ihre Proliferation von der semi-essentiellen Aminosäure Arginin abhängig sind. Primäre CLL-Zellen exprimieren zudem keine Argininosuccinat-Synthase (ASS), die es den Zellen ermöglicht aus Citrullin selbst Arginin herzustellen. Somit sind die CLL-Zellen vollständig auf den Import von extrazellulärem Arginin angewiesen und gelten als argininauxotroph. Neben der Argininreduktion im Serum durch die argininmetabolisierenden Enzyme, könnte ein alternativer und innovativer Ansatz die Intervention mit den Aminosäuretransportern, die für die Aufnahme von Arginin in die CLL-Zellen verantwortlich sind, sein. So gelang es unserer Arbeitsgruppe den Haupttransporter hCAT-1 für die Argininaufnahme in die CLL zu identifizieren. Unter der shRNA vermittelten Suppression des Transporters hCAT-1 kam es zu einer verminderten Viabilität und einer vollständigen gehemmten Proliferation der CLL-Zellen *in vitro*, sowie zu einem verzögerten Tumorwachstum in CLL-Xenograftmodellen. Somit stellt die Intervention mit dem Aminosäuretransporter hCAT-1 einen neuen und vielversprechenden Therapieansatz für die Behandlung der CLL dar.

Neben dem Transporter hCAT-1 verfügen die CLL-Zellen aber noch über weitere kationische Aminosäuretransporter (namentlich γ^+ LAT1 und 2), die ebenfalls in der Lage sind Arginin zu transportieren. Die beiden Transporter zählen zu dem γ^+ L-System und gelten als obligatorische Austauschpartner, die in physiologischer Umgebung intrazelluläre kationische Aminosäuren gegen extrazelluläre große neutrale Aminosäuren austauschen. Somit bestand die Vermutung, dass diese Transporter keine essentielle Rolle für die Argininaufnahme in die CLL-Zellen hätten und daher auch keinen Einfluss auf die Viabilität und die Proliferation der Zellen ausüben würden. In den experimentellen Versuchen unserer AG konnte

allerdings eine Argininaufnahme in die CLL-Zellen über das γ^+L -System beobachtet werden, so dass wir auch ihre Rolle hinsichtlich der Viabilität und der Proliferation der CLL-Zellen überprüfen wollten.

In dieser Arbeit konnte die Argininaufnahme durch das γ^+L -System auf den Transporter γ^+LAT1 zurückgeführt werden. Unter der Suppression des γ^+LAT2 wurde keine reduzierte Argininaufnahme in die CLL-Zellen beobachtet. Die Argininaufnahme durch den γ^+LAT1 ist am ehesten auf die artifiziellen Bedingungen, die in dem [3H]-Arginin-Aufnahmeversuch herrschten, zurückzuführen. In den Viabilitäts- und Proliferationsversuchen zeigte sich keine Einschränkung der CLL-Zellen bei der Suppression der Transporter γ^+LAT1 oder 2. Dies bestätigte unsere initiale Annahme, dass die beiden Transporter in physiologischer Umgebung überwiegend kationische Aminosäuren exportieren und somit keinen Einfluss auf die Argininaufnahme und die damit verbundene Viabilität und Proliferation der CLL-Zellen haben. Zudem konnte so ausgeschlossen werden, dass die CLL-Zellen über noch weitere essentielle kationische Aminosäuretransporter zur Argininaufnahme verfügen.

8 Literaturverzeichnis

1. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res.* 2012 Jan;36(1):6-13. PubMed PMID: 22033191. Epub 2011/10/29.
2. Michl M. *Basics Hämatologie*. 4. Auflage ed. München 2016.
3. Nicola Gökbuget CB, Monika Brüggemann, Alexander W. Hauswirth, Urs Schanz, . Akute Lymphatische Leukämie (ALL), *Onkopedia*, Februar 2018, [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@@guideline/html/index.html>, .
4. Christoph Röllig DWB, Jan Braess, Richard Greil, Dietger Niederwieser, Jakob Passweg, Dirk Reinhardt, Richard F. Schlenk, . Akute Myeloische Leukämie (AML) *Onkopedia*, Oktober 2019 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>, .
5. Blut und Blutbildung Kompetenznetz-Leukaemia.de 2015 [Available from: https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/, .
6. Andreas Hochhaus GMB, Tim Henrik Brümmendorf, Philipp le Coutre, Markus Metzler, Andreas Petzer, Susanne Sauße, Meinolf Suttrop, Dominik Wolf, . Chronische Myeloische Leukämie (CML), *Onkopedia*, Juni 2018, [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml/@@guideline/html/index.html>, .
7. Clemens-Martin Wendtner PD, Barbara Eichhorst, Michael Gregor, Richard Greil, Michael Hallek, Wolfgang Ulrich Knauf, Ron Pritzkeleit, Johannes Schetelig, Stephan Stilgenbauer, Bernhard Wörmann, Thorsten Zenz, . Chronische lymphatische Leukämie (CLL), *Onkopedia*, April 2019, [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html>, .
8. Muller LP, Muller-Tidow C. The indications for allogeneic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Dtsch Arztebl Int.* 2015 Apr 10;112(15):262-70. PubMed PMID: 25920358. PMCID: PMC4419367. Epub 2015/04/30.
9. Robert Zeiser DW, Christof Scheid, Thomas Luft, Hildegard Greinix, Peter Dreger, Jürgen Finke, Ernst Holler, . Graft-versus-Host Erkrankung, akut, *Onkopedia*, Januar 2020, [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut/@@guideline/html/index.html>, .
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230. Epub 2011/03/08.
11. McCracken AN, Edinger AL. Nutrient transporters: the Achilles' heel of anabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Apr;24(4):200-8. PubMed PMID: 23402769. PMCID: PMC3617053. Epub 2013/02/14.
12. Piatkowska-Jakubas B, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, Adamczyk-Cioch M, Czyz A, Lech Maranda E, et al. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic

- leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Pol Arch Med Wewn.* 2008 Nov;118(11):664-9. PubMed PMID: 19140571. Epub 2009/01/15.
13. Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas).* 2014 Feb;13(1):8-12. PubMed PMID: 26770075. PMCID: PMC4684116. Epub 2014/02/01.
14. Zhang W, Trachootham D, Liu J, Chen G, Pelicano H, Garcia-Prieto C, et al. Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Cell Biol.* 2012 Feb 19;14(3):276-86. PubMed PMID: 22344033. PMCID: PMC3290742. Epub 2012/02/22.
15. Zhang W, Pelicano H, Yin R, Zeng J, Wen T, Ding L, et al. Effective elimination of chronic lymphocytic leukemia cells in the stromal microenvironment by a novel drug combination strategy using redox-mediated mechanisms. *Mol Med Rep.* 2015 Nov;12(5):7374-88. PubMed PMID: 26458979. PMCID: PMC4626185. Epub 2015/10/16.
16. Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med.* 2017 Jan;23(1):120-7. PubMed PMID: 27869804. PMCID: PMC5218918. Epub 2016/11/22.
17. Müller-Esterl W, Brandt U, Anderka O, Kerscher S. *Biochemie : eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Lehrbuch. 3., korrigierte Auflage ed.* Berlin 2018. p. 371;665-7.
18. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell.* 2016 Mar 24;165(1):153-64. PubMed PMID: 26972053. PMCID: PMC4808398. Epub 2016/03/15.
19. Krause MS, McClenaghan NH, Flatt PR, de Bittencourt PI, Murphy C, Newsholme P. L-arginine is essential for pancreatic beta-cell functional integrity, metabolism and defense from inflammatory challenge. *J Endocrinol.* 2011 Oct;211(1):87-97. PubMed PMID: 21784771. Epub 2011/07/26. eng.
20. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell.* 2016 Oct 20;167(3):829-42 e13. PubMed PMID: 27745970. PMCID: PMC5075284. Epub 2016/10/22.
21. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1232-9. PubMed PMID: 12874210. Epub 2003/07/23. eng.
22. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood.* 2006 Sep 1;108(5):1627-34. PubMed PMID: 16709924. Epub 2006/05/20.
23. Buijs N, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Leemans CR, Kuik DJ, Vermeulen MA, et al. Perioperative arginine-supplemented nutrition in malnourished patients with head and neck cancer improves long-term survival. *Am J Clin Nutr.* 2010 Nov;92(5):1151-6. PubMed PMID: 20881073. Epub 2010/10/01. eng.
24. Morris SM, Jr. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr.* 2016 Dec;146(12):2579S-86S. PubMed PMID: 27934648. Epub 2016/12/10.

25. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* 2014;5:532. PubMed PMID: 25386178. PMCID: PMC4209874. Epub 2014/11/12. eng.
26. Phillips MM, Sheaff MT, Szlosarek PW. Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges. *Cancer Res Treat.* 2013 Dec;45(4):251-62. PubMed PMID: 24453997. PMCID: PMC3893322. Epub 2014/01/24.
27. Szeffel J, Danielak A, Kruszewski WJ. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci.* 2019 Mar;64(1):104-10. PubMed PMID: 30605863. Epub 2019/01/04. eng.
28. De Santo C, Booth S, Vardon A, Cousins A, Tubb V, Perry T, et al. The arginine metabolome in acute lymphoblastic leukemia can be targeted by the pegylated-recombinant arginase I BCT-100. *Int J Cancer.* 2018 Apr 1;142(7):1490-502. PubMed PMID: 29168171. PMCID: PMC5849425. Epub 2017/11/24.
29. Mussai F, Egan S, Higginbotham-Jones J, Perry T, Beggs A, Odintsova E, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood.* 2015 Apr 9;125(15):2386-96. PubMed PMID: 25710880. PMCID: PMC4416943. Epub 2015/02/25.
30. Lam SK, Yan S, Xu S, U KP, Cheng PN, Ho JC. Endogenous arginase 2 as a potential biomarker for PEGylated arginase 1 treatment in xenograft models of squamous cell lung carcinoma. *Oncogenesis.* 2019 Feb 26;8(3):18. PubMed PMID: 30808864. PMCID: PMC6391460. Epub 2019/02/28. eng.
31. Synakiewicz A, Stachowicz-Stencel T, Adamkiewicz-Drozynska E. The role of arginine and the modified arginine deiminase enzyme ADI-PEG 20 in cancer therapy with special emphasis on Phase I/II clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014 Nov;23(11):1517-29. PubMed PMID: 24965808. Epub 2014/06/27. eng.
32. Miraki-Moud F, Ghazaly E, Ariza-McNaughton L, Hodby KA, Clear A, Anjos-Afonso F, et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood.* 2015 Jun 25;125(26):4060-8. PubMed PMID: 25896651. Epub 2015/04/22. eng.
33. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr.* 2004 Oct;134(10 Suppl):2752S-9S; discussion 65S-67S. PubMed PMID: 15465780. Epub 2004/10/07.
34. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):465-8. PubMed PMID: 14624363. Epub 2003/11/19. eng.
35. Hediger MA, Clemençon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med.* 2013 Apr-Jun;34(2-3):95-107. PubMed PMID: 23506860. PMCID: PMC3853582. Epub 2013/03/20. eng.

36. HUGO Gene Nomenclature Committee. Gene Group: Solute Carriers (SLC), www.genenames.org, [Available from: <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/752>, .
37. Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* 2013 Apr-Jun;34(2-3):139-58. PubMed PMID: 23506863. Epub 2013/03/20.
38. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol.* 2006;213(2):67-77. PubMed PMID: 17417706. Epub 2007/04/10.
39. Werner A, Pieh D, Echchannaoui H, Rupp J, Rajalingam K, Theobald M, et al. Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability. *Front Oncol.* 2019;9:1268. PubMed PMID: 31824848. PMCID: PMC6879669. Epub 2019/12/12.
40. Christensen HN, Antonioli JA. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J Biol Chem.* 1969 Mar 25;244(6):1497-504. PubMed PMID: 5773053.
41. Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol.* 1992 Aug;454:491-501. PubMed PMID: 1474499. PMCID: PMC1175616. Epub 1992/08/01. eng.
42. Broer A, Wagner CA, Lang F, Broer S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y⁺LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J.* 2000 Aug 1;349 Pt 3:787-95. PubMed PMID: 10903140. PMCID: PMC1221206.
43. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1568-73. PubMed PMID: 17023580. PMCID: PMC1794048. Epub 2006/10/07.
44. Werner A. Die Bedeutung von Aminosäuretransportern und endogener Synthese für die Bereitstellung von Arginin in humanen T-Lymphozyten und chronischen lymphatischen Leukämiezellen: Johannes Gutenberg-Universität; 2020.
45. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Nov 1;2016(11). PubMed PMID: 27803250. Epub 2016/11/01.
46. Fan S, Meng D, Xu T, Chen Y, Wang J, Li X, et al. Overexpression of SLC7A7 predicts poor progression-free and overall survival in patients with glioblastoma. *Med Oncol.* 2013 Mar;30(1):384. PubMed PMID: 23408368. Epub 2013/02/15. eng.
47. Cheng L, Lu W, Kulkarni B, Pejovic T, Yan X, Chiang JH, et al. Analysis of chemotherapy response programs in ovarian cancers by the next-generation sequencing technologies. *Gynecol Oncol.* 2010 May;117(2):159-69. PubMed PMID: 20181382. PMCID: PMC2849907. Epub 2010/02/26. eng.
48. Agnelli L, Forcato M, Ferrari F, Tuana G, Todoerti K, Walker BA, et al. The reconstruction of transcriptional networks reveals critical genes with implications

- for clinical outcome of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 1;17(23):7402-12. PubMed PMID: 21890453. Epub 2011/09/06. eng.
49. Xie L, Song X, Yu J, Guo W, Wei L, Liu Y, et al. Solute carrier protein family may involve in radiation-induced radioresistance of non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Dec;137(12):1739-47. PubMed PMID: 21909646. Epub 2011/09/13. eng.
50. Fairman MP, Stillman B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *The EMBO journal.* 1988 Apr;7(4):1211-8. PubMed PMID: 2841119. PMCID: PMC454458. Epub 1988/04/01. eng.
51. Luthman H, Magnusson G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic acids research.* 1983 Mar 11;11(5):1295-308. PubMed PMID: 6298741. PMCID: PMC325797. Epub 1983/03/11. eng.
52. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973 Apr;52(2):456-67. PubMed PMID: 4705382. Epub 1973/04/01. eng.
53. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology.* 1987 Aug;7(8):2745-52. PubMed PMID: 3670292. PMCID: PMC367891. Epub 1987/08/01. eng.
54. Yang YW, Hsieh YC. Protamine sulfate enhances the transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Pharmaceutical research.* 2001 Jul;18(7):922-7. PubMed PMID: 11496950. Epub 2001/08/11. eng.
55. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949 Feb;177(2):751-66. PubMed PMID: 18110453.
56. Deves R, Angelo S, Chavez P. N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *The Journal of physiology.* 1993 Aug;468:753-66. PubMed PMID: 8254535. PMCID: PMC1143854. Epub 1993/08/01. eng.
57. Beyer SR, Mallmann RT, Jaenecke I, Habermeier A, Boissel JP, Closs EI. Identification of cysteine residues in human cationic amino acid transporter hCAT-2A that are targets for inhibition by N-ethylmaleimide. *The Journal of biological chemistry.* 2013 Oct 18;288(42):30411-9. PubMed PMID: 24019517. PMCID: PMC3798505. Epub 2013/09/11. eng.
58. Andreeff M, Darzynkiewicz Z, Sharpless TK, Clarkson BD, Melamed MR. Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood.* 1980 Feb;55(2):282-93. PubMed PMID: 6928106.
59. Coothankandaswamy V, Cao S, Xu Y, Prasad PD, Singh PK, Reynolds CP, et al. Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol.* 2016 Dec;173(23):3292-306. PubMed PMID: 27747870. PMCID: PMC5738662. Epub 2016/10/19.
60. Wang Q, Hardie RA, Hoy AJ, van Geldermalsen M, Gao D, Fazli L, et al. Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol.* 2015 Jul;236(3):278-89. PubMed PMID: 25693838. PMCID: PMC4973854. Epub 2015/04/07.

61. Bhutia YD, Babu E, Ramachandran S, Ganapathy V. Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res.* 2015 May 1;75(9):1782-8. PubMed PMID: 25855379. Epub 2015/04/10. eng.
62. Rotoli BM, Closs EI, Barilli A, Visigalli R, Simon A, Habermeier A, et al. Arginine transport in human erythroid cells: discrimination of CAT1 and 4F2hc/y+LAT2 roles. *Pflugers Arch.* 2009 Oct;458(6):1163-73. PubMed PMID: 19562367. Epub 2009/06/30. eng.
63. Ji X, Yang X, Wang N, Kang M, Wang Y, Rong L, et al. Function of SLC7A7 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(2):731-40. PubMed PMID: 30025393. Epub 2018/07/20.
64. Zhao H, Dugas N, Mathiot C, Delmer A, Dugas B, Sigaux F, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood.* 1998 Aug 1;92(3):1031-43. PubMed PMID: 9680373.
65. Ogier de Baulny H, Schiff M, Dionisi-Vici C. Lysinuric protein intolerance (LPI): a multi organ disease by far more complex than a classic urea cycle disorder. *Mol Genet Metab.* 2012 May;106(1):12-7. PubMed PMID: 22402328. Epub 2012/03/10. eng.
66. Mannucci L, Emma F, Markert M, Bachmann C, Boulat O, Carozzo R, et al. Increased NO production in lysinuric protein intolerance. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(2):123-9. PubMed PMID: 15877200.
67. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* 2000 Jan;57(1):68-74. PubMed PMID: 10617680.
68. Noguchi A, Takahashi T. Overview of symptoms and treatment for lysinuric protein intolerance. *J Hum Genet.* 2019 Sep;64(9):849-58. PubMed PMID: 31213652. Epub 2019/06/20. eng.
69. 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.* 2018;51(2):854-70. PubMed PMID: 30466103. Epub 20181122.
70. Tsai HJ, Jiang SS, Hung WC, Borthakur G, Lin SF, Pemmaraju N, et al. A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients. *Sci Rep.* 2017 Sep 12;7(1):11253. PubMed PMID: 28900115. PMCID: PMC5595917. Epub 2017/09/14.
71. Mauldin JP, Zeinali I, Kleypas K, Woo JH, Blackwood RS, Jo CH, et al. Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation. *Transl Oncol.* 2012 Feb;5(1):26-31. PubMed PMID: 22348173. PMCID: PMC3281408. Epub 20120201.
72. Szlosarek PW, Luong P, Phillips MM, Baccarini M, Stephen E, Szyszko T, et al. Metabolic response to pegylated arginine deiminase in mesothelioma with promoter methylation of argininosuccinate synthetase. *J Clin Oncol.* 2013 Mar 1;31(7):e111-3. PubMed PMID: 23319692. Epub 20130114.

73. Qiu F, Huang J, Sui M. Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers. *Cancer Lett.* 2015 Aug 1;364(1):1-7. PubMed PMID: 25917076. Epub 20150423.

74. Glazer ES, Piccirillo M, Albino V, Di Giacomo R, Palaia R, Mastro AA, et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2010 May 1;28(13):2220-6. PubMed PMID: 20351325. Epub 20100329.

9 Danksagung

Ein herzliches Dankschön geht an Frau ..., die mich freundlichst in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Durchführung dieser experimentellen Doktorarbeit ermöglicht hat. Ihre Tür stand mir für alle meine Fragen stets offen und mit ihrer jahrelangen Erfahrung war sie mir sowohl in der praktischen Umsetzung, als auch in der theoretischen Ausarbeitung meiner Promotionsarbeit eine große Hilfe.

Ich danke zudem Frau ... für ihre vielfältige Unterstützung – nicht nur im Labor, sondern auch bei all meinen Fragen und für das kritische Gegenlesen meines Methodenteils. Sie beeindruckte mich mit ihrem Wissensschatz und ihrem Herzblut für dieses Thema.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau ..., die mich mit ihren präzisen Anleitungen und ihrer gründlichen Einarbeitung in die Welt der Laborversuche einführte. Von ihrer strukturierten Arbeitsweise und Dokumentation habe ich bis zuletzt profitiert.

Auch möchte ich mich bei Frau ... bedanken, die mir stets geholfen hat die Orientierung im Labor nicht zu verlieren.

Bei Herrn ... möchte ich mich für die Zusammenarbeit, sowie seinen Einsatz bei der Bewertung dieser Promotionsarbeit bedanken.

Ich danke zudem der Manfred-Lautenschläger-Stiftung, die mich finanziell mit einem Stipendium unterstützte, das mir erlaubte, mich umfassend meiner Forschung zu widmen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die fortlaufende Unterstützung bedanken. Ein ausdrückliches Dankeschön gebührt vor allem meiner Partnerin Frau ..., die mich an unzähligen Abenden bei der konstruktiven Überarbeitung unterstützte und mir stets zur Seite stand.

Veröffentlichung der Arbeit

- Werner A, Pieh D, Echchannaoui H, Rupp J, Rajalingam K, Theobald M, et al. Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability. *Front Oncol.* 2019;9:1268. PubMed PMID: 31824848. PMCID: PMC6879669. Epub 2019/12/12.

LEBENS LAUF

■ Persönliche Daten

Name: Daniel Pieh
Geburtstag: 31.07.1990 in Darmstadt
Familienstand: ledig

■ Arbeit

Seit 2022 Facharztweiterbildung Humangenetik an der
Universitätsmedizin Mainz
2020 – 2021 Facharztweiterbildung Innere Medizin an der
Universitätsmedizin Mainz
2015 – 2016 Studentische Aushilfskraft im Ambulanten
OP-Zentrum Mainz

■ Ausbildung

Approbation 21.01.2020
2013 – 2019 Humanmedizin Studium an der Universitätsmedi-
zin Mainz (Notenschnitt 2,3)
2012 – 2013 Ausbildung zum Rettungsassistenten im Bildungs-
institut Mainz des DRK
Abbruch für Medizinstudienplatz
Abschluss als Rettungssanitäter
2010 – 2011 Bachelorstudium der Biologie an der TU Darm-
stadt für zwei Semester

■ Schulbildung

2001 – 2010 Besuch des Gymnasiums Eleonorenschule in
Darmstadt, Abschluss Abitur (Abiturschnitt: 1,8)
1997 – 2001 Besuch der Grundschule Schillerschule in Darm-
stadt

■ Praktika

2018 – 2019	Praktisches Jahr: 1. Terial Innere St. Marienwörth Bad Kreuznach 2. Terial Chirurgie Juntendo University Tokyo und Katholisches Krankenhaus Mainz 3. Terial Radiologie Universitätsmedizin Mainz
2018	4 Wochen Famulatur Neurologie in der Universi- tätsmedizin Mainz
2017	4 Wochen Famulatur Hausarztpraxis in Mainz 4 Wochen Famulatur Radiologie in der Tokyo Me- dical University
2015	4 Wochen Famulatur im Ambulanten OP-Zentrum in Mainz

■ Sonstige Qualifikationen

Sprachkenntnisse:	Deutsch C2 Englisch C1 Japanisch A2 Französisch A2
Sonstiges:	Science Excellence Stipendium der Manfred-Lau- tenschläger-Stiftung 2016 Sieger des Science Slam Vortrages im Oktober 2016 zur 70-jährigen Wiedereröffnungsfeier der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz Karl-von-Frisch Abiturientenpreis 2010 als Bester in Hessen für das Fach Biologie Deutsches Rettungsschwimmabzeichen Silber Führerschein Klasse B und C1 Bootsführerschein SBF See & Binnen
Hobbies:	Schwimmen, Japanisch, Fotografie, Gesell- schaftsspiele

Mainz, den 12. Juli 2022