

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

Biochemie der Myelomzelle bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation

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

vorgelegt von

Anna Nina Marie Schindera  
aus Saarbrücken

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

24. November 2023

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Ziel der Dissertation .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Literaturdiskussion .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Multiples Myelom .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Therapie des Multiplen Myeloms.....	12
<b>2.2 Arginin-Metabolismus .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Rolle von Arginin im gesunden Organismus .....	14
2.2.2 Rolle von Arginin im Tumormetabolismus.....	15
<b>2.3 Therapeutische Arginindepletion .....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Zelluläre Effekte des Enzym-induzierten Argininmangels .....	18
2.3.2 Arginin-Deiminase (ADI) .....	19
2.3.3 Arginase .....	19
2.3.4 Bekannte Resistenzmechanismen einer Argininmangel-Therapie	20
<b>2.4 Kombinationstherapie von Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Apoptose .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Bildung von Aggresomen .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Induktion von ER-Stress .....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Autophagie - Recyclingmechanismus vs. Todesmechanismus.....</b>	<b>31</b>
2.8.1 Funktion und Ablauf der Autophagie .....	31
2.8.2 Induktion von Autophagie.....	34
2.8.3 Autophagie bei Argininmangel .....	35
2.8.4 Therapeutische Möglichkeiten in Bezug auf Autophagie und mTOR-Inhibition.....	37
<b>2.9 mTOR-Signalweg .....</b>	<b>38</b>
2.9.1 mTORC1.....	38
2.9.2 mTORC2 - Akt.....	39



<b>3. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>41</b>
3.1.1 Chemikalien und Lösungen.....	41
3.1.2 Kits.....	43
3.1.3 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur .....	44
3.1.4 Lösungen und Puffer.....	45
3.1.5 Antikörper.....	46
3.1.5.1 Primärantikörper für Western Blot (WB)-Analysen.....	46
3.1.5.2 Primärantikörper für die Immunfluoreszenz (IF) - Färbung .....	47
3.1.5.3 Sekundärantikörper für WB-Analysen.....	47
3.1.5.4 Sekundärantikörper für die IF-Färbung.....	47
3.1.6 Primer und Sonden .....	48
3.1.7 Verbrauchsmaterial .....	48
3.1.8 Geräte .....	50
3.1.9 Zelllinien.....	52
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>53</b>
3.2.1 Zellbiologische Methoden .....	53
3.2.1.1 Zellkultur .....	53
3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen .....	53
3.2.2 Allgemeine Versuchsvorbereitung.....	53
3.2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	53
3.2.2.2 Versuchsansatz.....	54
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden .....	55
3.2.3.1 Isolierung von Proteinen .....	55
3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	55
3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.2.3.4 Western Blot (WB) .....	57
3.2.3.5 Detektion von Proteinen.....	58
3.2.3.6 Strippen von Western Blot-Membranen.....	59
3.2.4 Durchflusszytometrie.....	59
3.2.5 Konfokal-Mikroskopie .....	60
3.2.6 Molekularbiologische Methoden.....	61
3.2.6.1 Isolierung von RNA .....	61
3.2.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	62
3.2.6.3 Reverse Transkription (RT).....	62
3.2.6.4 Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) .....	63
3.2.7 Statistik .....	65

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1 Wirkt die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation zytotoxisch?</b> .....	<b>67</b>
<b>4.2 Werden unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation Aggresomen gebildet?</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3 Wird unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation ER-Stress induziert?</b> .....	<b>72</b>
<b>4.4 Wirkt die Inhibition von mTOR mittels Torin 1 zwecks Autophagie-Induktion protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?</b> .....	<b>74</b>
4.4.1 Ergibt sich durch Torin 1 eine Verbesserung der Zell-Viabilität bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation? .....	74
4.4.1.1 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen an Torin 1 .....	74
4.4.1.2 Zeitkinetiken: Viabilität und Spaltung der Caspase 3 bei Applikation von Torin 1 .....	76
4.4.2 Wird unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation und durch Torin 1 im aktuellen Modell Autophagie induziert? .....	80
4.4.3 Wird durch Torin 1 im aktuellen Modell mTOR suffizient inhibiert? .....	87
<b>4.5 Einfluss der Translation auf den Toxizitätsmechanismus von Argininmangel und Canavanin-Supplementation</b> .....	<b>91</b>
4.5.1 Wird die Translation bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation durch Torin 1 gehemmt? .....	91
4.5.2 Wirkt Cycloheximid protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation? .....	94
<b>4.6 Wirkt die Inhibition von Akt protektiv bezüglich Viabilität und Apoptose-Induktion unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation?....</b>	<b>96</b>
4.6.1 Wie beeinflusst Torin 1 den mTORC2-Signalweg in FD50- und U266-Myelomzellen? .....	96
4.6.2 Ergibt sich durch direkte Inhibition von Akt mittels Afuresertib bzw. Akti-1/2 bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation ein Überlebensvorteil? .....	100
4.6.2.1 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen an Afuresertib bzw. Akti-1/2.....	100
4.6.2.2 Viabilitätsbestimmungen und Caspase 3-Spaltung von FD50- und U266-Zellen unter der optimalen Konzentration von Afuresertib: Zeitkinetiken .....	102

4.6.3	Wird durch Afuresertib Akt suffizient inhibiert?.....	106
4.6.4	Wirkt die Kombination von Torin 1 und Afuresertib protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation? .....	110
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>114</b>
<b>5.1</b>	<b>Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation wirkt zytotoxisch.....</b>	<b>114</b>
<b>5.2</b>	<b>Bildung von Aggresomen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....</b>	<b>116</b>
<b>5.3</b>	<b>Unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation erfolgt keine Induktion von CHOP als Teil der ER-Stress-Antwort.....</b>	<b>119</b>
<b>5.4</b>	<b>Inhibition von mTOR mittels Torin 1 wirkt protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....</b>	<b>122</b>
5.4.1	Torin 1 bewirkt einen Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin- Supplementation .....	122
5.4.2	Unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation und durch Torin 1 in diesem Modell keine Autophagie-Induktion.....	123
5.4.3	mTORC1-Inhibition durch Torin 1 .....	126
<b>5.5</b>	<b>Reduktion der Proteintranslation als Resistenzmechanismus unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....</b>	<b>128</b>
5.5.1	Hemmung der Translation bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation durch Torin 1 .....	128
5.5.2	Cycloheximid bietet einen Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	130
<b>5.6</b>	<b>Inhibition von Akt wirkt für die FD50-Zellen protektiv unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....</b>	<b>132</b>
5.6.1	Torin 1 hemmt Akt in den FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	132
5.6.2	Afuresertib inhibiert Akt in Myelomzelllinien und bewirkt einen Überlebensvorteil in den FD50-Zellen bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	133
5.6.3	Kombination von Torin 1 und Afuresertib wirkt protektiv, allerdings nicht synergistisch bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation .....	135
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>136</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>

<b>8. Anhang</b> .....	<b>155</b>
<b>8.1 Einsatz von Torin 1 in unterschiedlichen Konzentrationen</b> .....	<b>155</b>
8.1.1 Einfluss von Torin 1 auf die Induktion von Apoptose bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation .....	155
8.1.2 Wird durch Torin 1 im aktuellen Modell Autophagie induziert? ...	156
8.1.3 Findet durch Torin 1 eine effektive mTOR-Inhibition statt? .....	161
8.1.4 Wie beeinflusst Torin 1 den mTORC2-Signalweg? .....	164
<b>8.2 Wirkt die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin zwecks Autophagie-Induktion protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?</b> .....	<b>165</b>
8.2.1 Ergibt sich durch Rapamycin ein Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation? .....	165
8.2.2 Wird durch Rapamycin Autophagie induziert? .....	169
8.2.3 Wird durch Rapamycin mTOR inhibiert? .....	171
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>173</b>
<b>10. Lebenslauf</b> .....	<b>174</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
‰	Promille
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ADI(-PEG20)	(pegylierte) Arginin-Deiminase
Afu	Afuresertib
AG	Arbeitsgruppe
Akt	ak strain transforming
AML	Akute myeloische Leukämie
AMPK	adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase
Apaf1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
ATF4 / ATF6	activating transcription factor 4 / 6
ATG	autophagy-related
BAG3	BCL-2-associated athanogene 3
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCMA	B-cell maturation antigen
BSA	Bovines Serumalbumin
Can	Canavanin
CASTOR1	cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1
CD	cluster of differentiation
(c)DNA	(complementary) deoxyribonucleic acid
CHOP	C/EBP homologous protein
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMA	chaperone-mediated autophagy
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CQ	Chloroquin
CRAB	calcium, renal insufficiency, anemia, bone lesions
CT	Computertomographie
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
(d)ATP	(Desoxy)adenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated protein degradation
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLC	free light chain
FSC	forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATOR	GAP activity towards Rags
GCN2	general control nonderepressible 2
h	Stunde/n
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCC	hepatocellular carcinoma
HCl	Salzsäure
HDAC6	Histon-Deacetylase 6
HIF-1 $\alpha$	hypoxia inducible factor 1 subunit $\alpha$
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRE1 $\alpha$	inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
LAMP-2A	lysosomal associated membrane protein 2
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3

LIR	LC3-interacting region
M	Molar
MDSC	myeloid derived suppressor cell
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MM	Multiplés Myelom
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MTOC	microtubule organizing center
mTOR(C)	mechanistic / mammalian target of Rapamycin (complex)
(m / t)RNA	(messenger / transfer) ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NBR1	neighbor of Brca1 gene
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO(S)	Stickstoffmonoxid(-Synthase)
ns	nicht signifikant
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
p-	phospho-
p62/SQSTM1	sequestosome 1
p70S6K1	70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS(T)	phosphate buffered saline (Tween)
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PE	Phosphatidylethanolamin
PERK	protein kinase RNA-like ER kinase
PI	Propidiumiodid
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmehtylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR

Rags	RAG-GTPasen
RANKL	receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
Rapa	Rapamycin
rhArg	rekombinante humane Arginase
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serin
SLAMF7	signaling lymphocytic activation molecule family member 7
SLC38A9	solute carrier 38A9
SLiM	sixty, light chain, MRI
SSC	sideward scatter
(T-)ALL	Akute lymphatische Leukämie (vom T-Zell-Typ)
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TBS(T)	tris buffered saline (Tween)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TM	Tunicamycin
Tor	Torin 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	unit
ULK1	Unc-51-like kinase 1
UPR	unfolded protein response
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
XPO1	Exportin 1
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Harnstoffzyklus und therapeutische Arginindepletion. ....	17
Abbildung 2.2: Aminosäuren L-Arginin und L-Canavanin. ....	22
Abbildung 2.3: Apoptose. ....	25
Abbildung 2.4: Entstehung von Aggresomen.....	27
Abbildung 2.5: Die UPR als Antwort auf ER-Stress.....	29
Abbildung 2.6: Autophagie.....	32
Abbildung 2.7: BAG3-assoziierte, selektive Makroautophagie. ....	33
Abbildung 2.8: Intrazelluläre Arginin-Sensoren.....	35
Abbildung 2.9: Übersicht mTOR-Akt-Signalweg. ....	39
Abbildung 4.1: Wirkung von Argininmangel und Canavanin-Supplementation auf die Viabilität der U266-Zellen. ....	67
Abbildung 4.2: Expression der Cleaved Caspase 3 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	68
Abbildung 4.3: Aggresomen in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	71
Abbildung 4.4: Wirkung von Tunicamycin auf die CHOP-Expression in NCI A2-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	72
Abbildung 4.5: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Viabilität der FD50-, NCI A2- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	75
Abbildung 4.6: Wirkung von Torin 1 auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	77
Abbildung 4.7: Wirkung von Torin 1 auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	79
Abbildung 4.8: Wirkung von Torin 1 auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	81
Abbildung 4.9: Wirkung von Torin 1 auf den autophagischen Flux in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	83
Abbildung 4.10: Wirkung von Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	84
Abbildung 4.11: Wirkung von Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	86
Abbildung 4.12: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	88

Abbildung 4.13: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	90
Abbildung 4.14: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	92
Abbildung 4.15: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Cycloheximid auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	95
Abbildung 4.16: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation..	97
Abbildung 4.17: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Thr308 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation..	99
Abbildung 4.18: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Afuresertib bzw. Akti-1/2 auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	101
Abbildung 4.19: Wirkung von Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	102
Abbildung 4.20: Wirkung von Afuresertib auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.	104
Abbildung 4.21: Wirkung von Afuresertib auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	107
Abbildung 4.22: Wirkung von Afuresertib auf die Phosphorylierung von Akt an Thr308 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	109
Abbildung 4.23: Wirkung der Kombination von Torin 1 und Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	111
Abbildung 4.24: Wirkung von Torin 1 und Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	112
Abbildung 8.1: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	155
Abbildung 8.2: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	157

Abbildung 8.3: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf den autophagischen Flux in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	158
Abbildung 8.4: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	159
Abbildung 8.5: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	160
Abbildung 8.6: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	162
Abbildung 8.7: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	163
Abbildung 8.8: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	164
Abbildung 8.9: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin auf die Viabilität der FD50-, NCI A2- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	166
Abbildung 8.10: Wirkung von Rapamycin auf die Viabilität der FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	167
Abbildung 8.11: Wirkung von Rapamycin auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	168
Abbildung 8.12: Wirkung von Rapamycin auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	169
Abbildung 8.13: Wirkung von Rapamycin auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation. ....	170
Abbildung 8.14: Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	171
Abbildung 8.15: Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.....	172

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien und Lösungen .....	41
Tabelle 3.2: Verwendete Kits.....	43
Tabelle 3.3: Verwendete Medien und Medienzusätze .....	44
Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Medien.....	44
Tabelle 3.5: Verwendete Lösungen und Puffer.....	45
Tabelle 3.6: Verwendete Primärantikörper in WB-Versuchen.....	46
Tabelle 3.7: Verwendete Primärantikörper für die IF-Färbung.....	47
Tabelle 3.8: Verwendete Sekundärantikörper in WB-Versuchen.....	47
Tabelle 3.9: Verwendete Sekundärantikörper für die IF-Färbung .....	47
Tabelle 3.10: Verwendete Primer und Sonden.....	48
Tabelle 3.11: Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	48
Tabelle 3.12: Verwendete Geräte .....	50
Tabelle 3.13: Eingesetzte Zelllinien .....	52
Tabelle 3.14: Konzentrationen häufig eingesetzter Zusätze .....	54
Tabelle 3.15: Zusammensetzung der Gele (jeweils 10 ml).....	57
Tabelle 3.16: Mastermix für die RT (pro Reaktionsansatz).....	63
Tabelle 3.17: Programmablauf der Reversen Transkription .....	63
Tabelle 3.18: Mastermix für die qRT-PCR (pro Reaktionsansatz) .....	64
Tabelle 3.19: Programmablauf der qRT-PCR.....	64
Tabelle 3.20: Signifikanzniveaus .....	65
Tabelle 3.21: DMSO-Kontrollen (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte) .....	65
Tabelle 3.22: Vergleichsbedingungen I (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte) ....	65
Tabelle 3.23: Vergleichsbedingungen II (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte) ...	66
Tabelle 3.24: Vergleichsbedingungen III (jeweils für 4 h und 8 h) .....	66
Tabelle 3.25: Vergleichsbedingungen IV (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte)..	66

## 1. Einleitung

Jährlich erhalten circa 6.500 Patienten in Deutschland die Diagnose Multiples Myelom, wobei die Patienten im Median 72 bis 74 Jahre alt sind (Wörmann et al., 2018). Es ist anzunehmen, dass die Inzidenz im Rahmen der demographischen Entwicklung weiter zunehmen wird. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate, die die Sterblichkeit der Allgemeinbevölkerung berücksichtigt, liegt im Mittel bei etwa 55% (Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2021). Durch neue Wirkstoffe, wie Proteasom-Inhibitoren (z.B. Bortezomib oder Carfilzomib), Immunmodulatoren (Lenalidomid und Pomalidomid) sowie monoklonale Antikörper (Daratumumab, Isatuximab, Elotuzumab) sowie hieraus zusammengesetzte Kombinationsprotokolle konnten die Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Dennoch gilt das Multiple Myelom weiterhin als unheilbar. Zum Goldstandard in der Therapie gehören weiterhin klassische Chemotherapeutika. Aufgrund der geringen Spezifität kommt es im Rahmen der Chemotherapie häufig zu Nebenwirkungen. Da insbesondere ältere, oftmals multimorbide Patienten betroffen sind, kommt für diese in der Regel keine Hochdosis-Chemotherapie in Frage. Daher ist die Forschung nach neuen Therapiemöglichkeiten mit geringer Toxizität, welche die gesunden Zellen nicht beeinflussen, essenziell.

Zu den „Hallmarks of Cancer“ gehört die Umstellung des Stoffwechsels der Tumorzelle. Dazu gehört für viele Tumore auch die Suppression der Argininosuccinat-Synthetase 1 (ASS1), dem Schrittmacherenzym der endogenen Arginin-Synthese (Pavlova and Thompson, 2016). Viele solide Tumore, wie unter anderem Hepatozelluläre Karzinome, Maligne Melanome und Prostatakarzinome sind Arginin-auxotroph, d. h. abhängig von der exogenen Zufuhr der Aminosäure Arginin (Delage et al., 2010). Diese Arginin-Auxotrophie konnte unsere Arbeitsgruppe auch für viele Myelomzelllinien und für die Mehrheit von primären Myelomzellen aus Patientenproben feststellen (Jacobi, 2019, Tschakert, 2020, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Systemisch kann eine Arginindepletion über die beiden Arginin-abbauenden Enzyme Arginin-Deiminase (ADI) und Arginase erzielt werden, die bereits in zahlreichen klinischen Phase I- bis III-Studien untersucht wurden (Abou-Alfa et al., 2018, Kumari and Bansal, 2021). Die Besonderheit dabei ist, dass gesunde Körperzellen in der Lage sind, aufgrund der (induzierbaren) Expression von ASS1, Arginin selbst zu synthetisieren und daher vor den toxischen Effekten einer Arginindepletions-Therapie geschützt sind (Miraki-Moud et al., 2015), wenn

ausreichend Citrullin als Substrat der ASS1 zur Verfügung steht.

Das natürliche Arginin-Analogon Canavanin ist ebenfalls in der Lage den Arginin-Metabolismus der Zelle zu stören. Zelluläre Arginin-tRNA-Synthetasen können Canavanin nicht von Arginin unterscheiden, der Einbau von Canavanin anstelle von Arginin in neu synthetisierte Proteine führt jedoch aufgrund unterschiedlicher Ladungseigenschaften zu einer Fehlfaltung der Proteine (Bence and Crooks, 2003). Die beiden metabolischen Therapiestrategien wirken synergistisch: Die Kombination von Argininmangel und Canavanin-Supplementation ist für Arginin-auxotrophe solide Tumore zytotoxisch (Vynnytska-Myronovska et al., 2012). Myelomzellen sind aufgrund ihrer meistens exzessiven Proteinsynthese besonders auf einen geordneten Ablauf des Proteinmetabolismus angewiesen. Dennoch entstehen bereits unter normalen Bedingungen zahlreiche fehlgefaltete Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (García Ruiz et al., 2022). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Kombination von ADI-PEG20-induzierter Arginindepletion und Canavanin-Supplementation effektiv das Wachstum der Myelomzellen hemmt (Jacobi, 2019, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Jedoch kam es nach einer gewissen Zeit zu einem erneuten Tumorprogress.

## 1.1 Ziel der Dissertation

Ziel dieser Arbeit ist zur Entwicklung einer neuen Behandlungsstrategie des Multiplen Myeloms, bestehend aus induziertem Argininmangel und Canavanin-Supplementation, beizutragen. Dazu soll die Wirksamkeit dieser Kombinationstherapie in einer neu etablierten Myelomzelllinie FD50-NL1 und der Standard-Myelomzelllinie U266B1 untersucht werden. Außerdem sollen die darunter beeinflussten intrazellulären Signalwege charakterisiert werden. Zudem sollen potenzielle Überlebensmechanismen der Myelomzelle unter Argininmangel und Canavanin-Applikation, wie die Induktion von Autophagie, die Bildung von Aggresomen und die ER-Stress-Antwort, untersucht werden. Dafür soll Autophagie gezielt, über Inhibition von mTORC1 (mechanistic target of Rapamycin complex 1) mittels Torin 1 bzw. Rapamycin, induziert werden. Durch das Proteinrecycling im Rahmen der Autophagie könnte kurzfristig wieder ausreichend Arginin zur Verfügung stehen. Damit könnte der Einbau von Canavanin in neu translatierte Proteine, der kompetitiv zu Arginin erfolgt (Bence et al. 2003), verhindert werden. In einem nächsten Schritt könnten potenzielle Resistenzmechanismen gezielt unterdrückt werden, um das zytotoxische Potential dieser metabolischen Therapiestrategie weiter zu verbessern.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Multiples Myelom

Beim Multiplen Myelom (MM), einem B-Zell-Lymphom, kommt es zur malignen Entartung und monoklonalen Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark mit oftmals charakteristischen Osteolysen. Selten gibt es auch extramedulläre Manifestationen. Der Begriff Plasmozytom wird in der Literatur zum Teil synonym verwendet, beschreibt jedoch einen solitär lokalisierten Plasmazellklon im Gegensatz zum disseminierten Multiplen Myelom.

Pro Jahr erhalten in Deutschland circa 6.500 Patienten die Diagnose MM (Wörmann et al., 2018). Das MM ist nach der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) die zweithäufigste hämatologische Neoplasie (Keykhaei et al., 2021). Im Median sind die Patienten bei Erstdiagnose 72 bis 74 Jahre alt (Wörmann et al., 2018).

Myelomzellen produzieren komplette monoklonale Antikörper oder Leichtketten, die auch als Paraproteine bezeichnet werden. Meist geht das MM aus einer Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) hervor (Kazandjian, 2016). Bei diesen Patienten liegt eine monoklonale Gammopathie vor, ihr Knochenmark enthält jedoch weniger als 10% klonale Plasmazellen (Röllig et al., 2015). Diese Patienten haben keine Symptome und keine Endorganschäden und sind daher nicht behandlungsbedürftig. Sie sollten jedoch regelmäßig Kontrolluntersuchungen erhalten, da das Risiko für die Entwicklung eines MM bei einem Prozent pro Jahr liegt (Röllig et al., 2015). Meist ist diese MGUS-Vorphase allerdings unerkannt und das MM erscheint bei Erstdiagnose als de novo Krankheit.

Symptomatisch werden die Patienten häufig mit Anämie, Infektneigung, Knochenschmerzen oder Niereninsuffizienz (Röllig et al., 2015). Sehr selten führt die Ablagerung von amyloidogenen Paraprotein-Leichtketten in Organen wie der Niere oder dem Herzen zu Folgeschäden wie Nieren- oder Herzinsuffizienz: es liegt dann eine Leichtketten-Amyloidose vor (Röllig et al., 2015).

Die Paraproteine sind auch diagnostisch nachweisbar: in der Serumproteinelektrophorese als sog. M-Gradient oder im Urin, wobei der Nachweis von Leichtketten als Bence-Jones-Proteinurie bezeichnet wird. Zur Diagnosestellung

erfolgt außerdem eine Knochenmarkpunktion mit anschließender histologischer und zytologischer Untersuchung. Außerdem erfolgt immer ein Low-Dose-CT des gesamten Skeletts, besser noch ein Ganzkörper-MRT. Die Diagnose MM kann gestellt werden beim Nachweis von mehr als 10% klonalen Plasmazellen im Knochenmark oder bei einem in der Biopsie festgestellten Plasmozytom und bei gleichzeitigem Vorliegen von mindestens einem SLiM-CRAB-Kriterium, welches auf die Plasmazell-Erkrankung zurückzuführen ist (Rajkumar, 2020). Die von der International Myeloma Working Group erstellten CRAB-Kriterien dienen zur Diagnostik der Endorganschäden des MM: Dazu zählen Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen (Rajkumar et al., 2014). Des Weiteren kann die Diagnose auch für Patienten gestellt werden, die die CRAB-Kriterien nicht erfüllen, wenn bei ihnen mindestens eines der folgenden SLiM-Kriterien zutrifft: 1)  $\geq 60\%$  klonale Plasmazellen im Knochenmark, 2) Freie Leichtketten (FLC: free light chain)-Ratio im Serum  $\geq 100$  (Ratio involved/uninvolved FLC), 3) mehr als eine fokale Knochenläsion im MRT (Rajkumar et al., 2014).

### 2.1.1 Therapie des Multiplen Myeloms

Anhand der SLiM-CRAB-Kriterien wird über die Behandlungsbedürftigkeit des MM entschieden, das ist der Fall, wenn bereits Endorganschäden eingetreten sind oder eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass diese eintreten (Rajkumar et al., 2014). Sind die Patienten symptomfrei und es bestehen keine Endorganschäden, kann auch eine „watch and wait“-Strategie gewählt werden (Wörmann et al., 2018). Besteht die Indikation zur Therapie, muss zunächst entschieden werden, ob die Patienten für eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation geeignet sind. Dies kommt in der Regel für Patienten unter 65 bis 70 Jahren mit guten Organfunktionen und wenig Komorbidität in Frage (Monteith et al., 2023).

In der Erstlinien-Therapie werden meist Kombinationen aus zwei oder drei Wirkstoffgruppen, wie Immunmodulatoren (Lenalidomid, Thalidomid, Pomalidomid), Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib), monoklonalen Antikörpern (Daratumumab = anti-CD38-Antikörper) und klassischen Chemotherapeutika (Melfalan, Cyclophosphamid, Doxorubicin) sowie Dexamethason, eingesetzt (Rajkumar, 2020, Monteith et al., 2023). Supportiv werden zur Therapie der MM-assozierten Knochenerkrankung die Bisphosphonate oder der



RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)-Inhibitor Denosumab angewandt (Wörmann et al., 2018).

Die Zweitlinientherapie bei Rezidiv bzw. Refraktärität wird abhängig von der Progression und Dynamik des Krankheitsverlaufs, der Vortherapie, vorliegender Komorbidität und der Präferenz des Patienten gewählt (Gengenbach et al., 2021). Dabei kommen, neben Medikamenten, die in der Erstlinie nicht verwendet wurden, weitere neue Wirkstoffe in Kombination mit den zuvor Genannten zum Einsatz. Dazu zählen zum Beispiel der Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat, der anti-SLAMF7 (signaling lymphocytic activation molecule family member 7)-Antikörper Elotuzumab, der alternative anti-CD38-Antikörper Isatuximab oder neuere Wirkstoffe wie das anti-BCMA (B-cell maturation antigen)-Antikörper-Konjugat Belantamab-Mafodotin oder der XPO1 (Exportin 1)-Inhibitor Selinexor (Ahmed and Killeen, 2023).

## 2.2 Arginin-Metabolismus

### 2.2.1 Rolle von Arginin im gesunden Organismus

Die Aminosäure Arginin ist für den Menschen semi-essenziell, d. h. der Körper ist in der Lage Arginin selbstständig zu synthetisieren, ist jedoch unter bestimmten Bedingungen auf eine zusätzliche Aufnahme über die Nahrung angewiesen.

Die körpereigene Arginin-Synthese erfolgt durch zwei Enzyme des Harnstoffzyklus: Durch das Enzym Argininosuccinat-Synthetase (ASS) entsteht aus Citrullin und Aspartat Argininosuccinat, das wiederum von der Argininosuccinat-Lyase (ASL) zu Arginin und Fumarat gespalten wird (Abbildung 2.1), (Dillon et al., 2004). Citrullin wird überwiegend vom Dünndarm synthetisiert (Werner et al., 2017). Vorwiegend in der Niere, wo die Enzyme ASS und ASL stark exprimiert werden, entstehen aus dem Citrullin dann circa zwei Gramm Arginin pro Tag (Brosnan and Brosnan, 2004). Daneben wird auch in weiteren Organen, wie z. B. in Leber oder Pankreas, mit Hilfe der beiden Enzyme Arginin synthetisiert (Marini and Didelija, 2015). Eine westliche Ernährung liefert circa vier bis fünf Gramm Arginin pro Tag, wobei die endogene Synthese des Arginins von der Citrullin-Verfügbarkeit abhängig ist und nicht von der exogenen Arginin-Zufuhr (Brosnan and Brosnan, 2004). Des Weiteren entsteht Arginin beim Abbau von körpereigenen Proteinen (Morris, 2016). Unter physiologischen Bedingungen wird ein Plasma-Arginin-Spiegel von durchschnittlich 70 - 80  $\mu\text{mol/L}$  beim Erwachsenen gemessen (Davis and Anstey, 2011).

In der kindlichen Wachstumsphase (Morris, 2016), bei bestimmten Pathologien wie der Sepsis (Davis and Anstey, 2011), dem Trauma (Costa et al., 2016) oder allgemein bei unzureichender Synthesekapazität der Nieren bzw. des Dünndarms (Morris, 2016) wird Arginin als Aminosäure essenziell und muss somit exogen zugeführt werden.

Arginin ist erforderlich zur Synthese von Proteinen und Aminosäuren, wie Prolin oder Glutamat, sowie zur Synthese von Kreatin, Harnstoff, NO (Stickstoffmonoxid), Polyaminen und Homoarginin (Morris, 2016, Patil et al., 2016). Für die Synthese dieser Stoffwechselprodukte sind hauptsächlich zunächst die Enzyme Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und Arginase verantwortlich. Die NOS katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid und Citrullin aus Arginin, während die beiden Isoenzyme Arginase I (Vorkommen: in Hepatozyten und Leukozyten), als Teil des Harnstoffzyklus, und Arginase II (Vorkommen: relativ ubiquitär in Geweben) Arginin in Ornithin und Harnstoff spalten (Costa et al., 2016). Arginin und seine Stoffwechselprodukte spielen

eine bedeutende Rolle für Zellwachstum und -proliferation und dienen zur Vasodilatation oder als Energiespeicher (Albaugh et al., 2017). Außerdem ist Arginin für die Modulation des Immunsystems wichtig (Garcia-Navas et al., 2012, Albaugh et al., 2017). Insbesondere T-Lymphozyten benötigen Arginin für ihre korrekte Funktion und Proliferation (Munder, 2009, Werner et al., 2016). Granulozyten exprimieren ebenfalls das Arginin-abbauende Enzym Arginase I (Munder et al., 2005). Folglich können Myeloische Suppressorzellen (MDSC: myeloid derived suppressor cell) als Teil des Tumormikromilieus, mittels Arginase-vermittelter Arginindepletion, die anti-tumorale T-Zell-Antwort hemmen (Grzywa et al., 2020).

### 2.2.2 Rolle von Arginin im Tumormetabolismus

Um den hohen Energiebedarf der Tumorzellen für Wachstum und Proliferation zu decken, geht die Onkogenese mit einer Umstrukturierung des zelleigenen Metabolismus einher. Hierbei nehmen Tumorzellen beispielsweise vermehrt Glucose und Aminosäuren auf und verstoffwechseln diese (Cantor and Sabatini, 2012). Zu dieser „metabolischen Programmänderung“ zählt auch der Verlust der ASS1, wodurch viele Tumoren auf die externe Verfügbarkeit von Arginin angewiesen und damit Arginin-auxotroph sind (Pavlova and Thompson, 2016). Im Tumormetabolismus sind Arginin und seine Metabolite daher ebenfalls essenziell, auch hier fördern sie anabole und proliferative Prozesse, wie die Proteinsynthese, die Angiogenese und Metastasierung (Patil et al., 2016, Albaugh et al., 2017). Tumorzellen benötigen Arginin folglich zum Überleben. Bei einem Argininmangel, bei dem die Tumorzellen nicht genug Arginin aufnehmen können, wird deren Proliferation gehemmt und letztlich tritt deren Zelltod ein (Patil et al., 2016). Zudem wurde bereits vor 30 Jahren ein regulierender Effekt von Arginin auf die Tumorentwicklung festgestellt: Eine Arginin-reiche Ernährung der Versuchstiere (Mäuse) bedingte eine Größenzunahme der Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine Arginin-freie Ernährung hemmte das Tumorwachstum (Yeatman et al., 1991).

Inwiefern der Verlust des Schrittmacherenzym der Arginin-Synthese, der ASS1, vorteilhaft wirkt, ist noch nicht ganz verstanden (Delage et al., 2010). Eine Erklärung ist, dass die fehlende ASS1-Expression die Proliferation über einen Anstieg der intrazellulären Aspartat-Spiegel und einer damit einhergehenden gesteigerten Pyrimidin-Synthese fördert (Rabinovich et al., 2015). Im Allgemeinen stellt die Suppression bzw. Nicht-Expression der ASS1 einen Proliferationsvorteil der

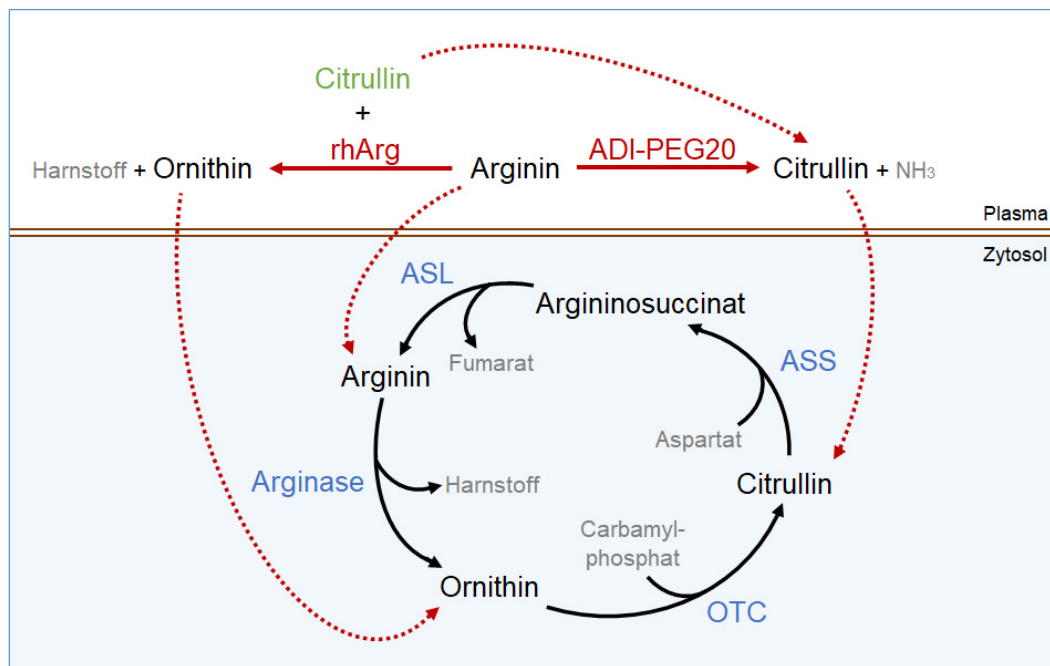
Tumorzellen dar und geht häufig mit Metastasierung, De novo-Chemoresistenz und einer schlechten Prognose einher (Delage et al., 2010, Miraki-Moud et al., 2015). Mehrere Mechanismen für eine ausbleibende Expression der ASS1 in Tumorzellen sind beschrieben, dazu gehören die Methylierung des ASS1-Promoters oder das Inaktivieren des Promoters mittels des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 subunit  $\alpha$ ), (Delage et al., 2012, Miraki-Moud et al., 2015, Long et al., 2017).

### 2.3 Therapeutische Arginindepletion

Zu den ASS1-negativen Tumoren gehören viele solide Tumore, wie Hepatozelluläre Karzinome (HCC: hepatocellular carcinoma), Maligne Melanome, Pleuramesotheliome, Prostata- und Nierenkarzinome (Delage et al., 2010, Dillon et al., 2004). Daneben sind die meisten Kolon-, Lungen-, Mamma- und Ovarialkarzinome ASS-positiv (Dillon et al., 2004). Außerdem sind viele Lymphome und die meisten Akuten Myeloischen Leukämien (AML) ASS1-negativ, was als Marker für ein Ansprechen auf eine Argininmangel-Therapie dient (Delage et al., 2012, Miraki-Moud et al., 2015, Long et al., 2017). Die ASL eignet sich jedoch nicht als ein solcher Marker, da bisher nur für das Glioblastom eine Suppression der ASL (bei meist gleichzeitiger ASS1-Suppression) bekannt ist (Syed et al., 2013).

Neben der ASS1-Suppression, kann auch die Nicht-Expression des Enzyms Ornithin-Transcarbamylase (OTC), welches die Reaktion von Ornithin zu Citrullin katalysiert (Abbildung 2.1) und vorwiegend in Leber- und Dünndarmzellen exprimiert wird, eine Arginin-Auxotrophie bedingen (Patil et al., 2016, Kumari and Bansal, 2021).

Die Verknappung plasmatischen Arginins führt in ASS1-negativen und damit Arginin-auxotrophen Tumoren zur Apoptose (Delage et al., 2010). Diese Strategie wird aktuell in diversen Studien als Krebstherapie untersucht, wobei hierzu zwei unterschiedliche Mechanismen gewählt werden, nämlich die Hemmung von Arginin-Transportern und der Einsatz Arginin-abbauender Enzyme (Kumari and Bansal, 2021). Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf der Enzym-vermittelten Arginindepletions-Therapie, da diese insbesondere in klinischen Studien bisher am besten untersucht ist.



**Abbildung 2.1 Harnstoffzyklus und therapeutische Arginindepletion.** Am Harnstoffzyklus sind die Enzyme Argininosuccinat-Synthetase (ASS), Argininosuccinat-Lyase (ASL), Arginase und Ornithin-Transcarbamylase (OTC) beteiligt. Die beiden Enzyme rekombinante humane Arginase (rhArg) und pegylierte rekombinante Arginin-Deiminase (ADI-PEG20) werden zu therapeutischen Zwecken eingesetzt, um einen Argininmangel zu induzieren. ASS-negative Tumorzellen sind auf die extrazelluläre Verfügbarkeit von Arginin angewiesen. Physiologische Zellen können Arginin aus Citrullin via ASS, die nahezu ubiquitär in allen Geweben exprimiert ist, selbst synthetisieren. Die OTC wird vorwiegend in der Leber und im Dünndarm exprimiert. Um toxische Effekte unter Arginase-vermittelter Arginindepletion in gesunden Geweben zu verhindern, muss Citrullin daher substituiert werden (eigene Abbildung nach Vorlage von (Tabe et al., 2019)).

Mit dem Enzym Asparaginase hat bereits eine Therapie, die einen spezifischen Aminosäure-Mangel induziert, Einzug in die Klinik gefunden: Sie wird zur Behandlung der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), die aufgrund der fehlenden Expression des Enzyms Asparagin-Synthetase für Asparagin auxotroph ist, angewandt (Müller and Boos, 1998).

Die Enzym-vermittelte Argininmangel-Therapie nutzt die Abhängigkeit Arginin-auxotropher Tumoren, um diese Tumorzellen gezielt zu eliminieren. In klinischen Studien finden hauptsächlich die beiden Enzyme pegylierte rekombinante Arginin-Deiminase (ADI-PEG20, EC-Nummer 3.5.3.6) und pegylierte rekombinante humane Arginase I (rhArg/rhArg1-PEG/rhArg1-PEG5000, BCT-100, EC-Nummer 3.5.3.1) Anwendung (Patil et al., 2016, Kumari and Bansal, 2021). Das erstmalig aus Mykoplasmen isolierte Enzym ADI katalysiert den Abbau von Arginin zu Citrullin und Ammoniak, während das als Teil des Harnstoffzyklus bekannte Enzym Arginase Arginin zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert (Abbildung 2.1), (Patil et al., 2016). Durch die Pegylierung verlängert sich die Plasmahalbwertszeit und die ADI-PEG20 wirkt

weniger immunogen (Mohammad et al., 2021).

Gesunde Körperzellen, z. B. Leber-, Nieren- oder Herzzellen (Husson et al., 2003), sind hingegen in der Lage die Aminosäure Arginin selbst zu synthetisieren und somit den Proteinstoffwechsel aufrechtzuerhalten, was sich u. a. in einem konstanten Körpergewicht der Mäuse unter ADI-PEG20-Behandlung widerspiegelte (Marini and Didelija, 2015). Ebenso wurde gezeigt, dass Lymphozyten in einer Argininmangel-Situation die ASS1 hochregulieren und somit aus Citrullin ihr eigenes Arginin synthetisieren können (Delage et al., 2012, Werner et al., 2017). Nach erfolgreicher AML-Therapie durch ADI-PEG20 in einem Maus-Xenograft-Modell, erholten sich die gesunden hämatopoetischen Zellen, die ASS1 exprimierten und so resistent gegenüber ADI-PEG20 waren (Miraki-Moud et al., 2015). Auch gesunde humane hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen exprimieren ASS1 und überlebten eine ADI-PEG20-Therapie in vitro (Miraki-Moud et al., 2015). Über diese Synthesemöglichkeit sind physiologische Körperzellen vor den toxischen Effekten einer ADI-PEG20-induzierten Argininmangel-Therapie geschützt. Die Verfügbarkeit von Citrullin stellt sich somit als entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Arginin-Versorgung der Zellen und damit deren Zellfunktion heraus. Citrullin entsteht beim Arginin-Abbau durch ADI-PEG20; durch das Enzym Arginase entstehen Ornithin, welches jedoch von den meisten Körperzellen nicht via OTC zu Citrullin umgesetzt werden kann, und Harnstoff (Patil et al., 2016, Couchet et al., 2021). Durch zusätzliche Gabe von Citrullin konnten toxische Effekte, wie Gewichtsverlust und Tod der Versuchstiere, die unter Arginindepletion mittels Arginase auftraten (Abbildung 2.1), verhindert werden (Mauldin et al., 2012).

### **2.3.1 Zelluläre Effekte des Enzym-induzierten Argininmangels**

Eine Enzym-vermittelte Arginindepletion behindert die NO-Synthese und dadurch die Angiogenese und hemmt damit das Tumorstadium (Patil et al., 2016). Des Weiteren wird durch Arginindepletion die Protein- und Nukleotidsynthese gehemmt (Shen et al., 2006, Kumari and Bansal, 2021). Zusätzlich kommt es in den Mitochondrien vermehrt zu oxidativem Stress, was wiederum die Funktion dieser stört und letztlich ebenfalls in Zelltod mündet (Qiu et al., 2014, Changou et al., 2014). Die enzymatische Arginindepletion kann somit über mehrere Mechanismen zytotoxisch auf die Tumorzellen wirken. Schließlich treibt sie die Zellen in Apoptose (Kapitel 2.5) oder autophagischen Zelltod (Kapitel 2.8.3).

### 2.3.2 Arginin-Deiminase (ADI)

In vitro wurde durch ADI-vermittelte Arginindepletion in Prostatakarzinom-, Pankreaskarzinom-, Melanom-, Lymphom-, Kleinzelligen Lungenkarzinom-, Glioblastom-, Mammakarzinom- und Leukämie-Zellen Apoptose induziert (Kim et al., 2009b, Bowles et al., 2008, Savaraj et al., 2010, Delage et al., 2012, Kelly et al., 2012, Syed et al., 2013, Qiu et al., 2014, Gong et al., 2000, Miraki-Moud et al., 2015).

In klinischen Phase I- bis III-Studien wurde unter Monotherapie mit ADI-PEG20 für einen Teil der Patienten mit fortgeschrittenem HCC, Melanom, Pleuramesotheliom, AML, und Kleinzelligen Lungenkarzinom eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs bis zu Teil- und Komplettremissionen beobachtet (Izzo et al., 2004, Glazer et al., 2010, Abou-Alfa et al., 2018, Ascierto et al., 2005, Ott et al., 2013, Szlosarek et al., 2017, Tsai et al., 2017, Hall et al., 2020). Die Behandlung mit ADI-PEG20 im Rahmen dieser klinischen Studien wurde insgesamt gut vertragen.

Aufgrund der begrenzten Effektivität der ADI-PEG20-Monotherapie, insbesondere in ASS1-positiven Tumoren und durch die Entwicklung von Resistenzen (Kapitel 2.3.4), wird ADI-PEG20 in Kombination mit weiteren Wirkstoffen analysiert. In klinischen Phase I- bis II-Studien wurde die Kombination von ADI-PEG20 mit klassischen Chemotherapeutika bei Patienten mit Mesotheliom, Bronchialkarzinom, mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, HCC, Gliom, AML, Melanom, Uveamelanom sowie weiteren fortgeschrittenen soliden Tumoren untersucht: Dabei schwankte die Wirksamkeit von Nicht-Ansprechen über Stabilisierung bis zu Teil- und Komplettremission und das prozentuale Ansprechen zum Teil erheblich (Beddowes et al., 2017, Szlosarek et al., 2020, Lowery et al., 2017, Harding et al., 2018, Harding et al., 2021, Hall et al., 2019, Tsai et al., 2021, Yao et al., 2021, Chan et al., 2022, Yao et al., 2022). Daneben gibt es erste Studien, die die Kombination von ADI-PEG20 mit Immuntherapeutika wie Pembrolizumab oder Nivolumab und Ipilimumab zur Therapie des Uveamelanoms und anderer solider Tumoren untersuchten (Chang et al., 2021, Kraehenbuehl et al., 2022).

### 2.3.3 Arginase

Physiologische Körperzellen und bestimmte Tumore, wie z. B. ASS-positive Kolonkarzinome, welche zumeist OTC-negativ sind, sind für eine Arginindepletions-



Therapie mit dem Enzym Arginase empfindlich (Lam et al., 2010, Agrawal et al., 2012, Alexandrou et al., 2018). Durch Arginase entsteht Ornithin, was Zellen ohne OTC nicht wieder zu Arginin metabolisieren können (Patil et al., 2016). Die Arginase ist somit wirksam gegen ASS1-negative und/ oder OTC-negative Tumore, während für die ADI nur die Expression der ASS1 eine Rolle spielt.

Die Arginase ist neben der ADI-PEG20 in ihrer Entwicklung als potenzielles Tumorthapeutikum am weitesten fortgeschritten. In vitro wirkt die Arginase-vermittelte Arginindepletion zytotoxisch auf Prostatakarzinom-, AML-, Non-Hodgkin-Lymphom- und Glioblastom-Zellen (Hsueh et al., 2012, Tanios et al., 2013, Zeng et al., 2013, Khoury et al., 2015). Sie hemmt zudem die Proliferation von HCC-, Melanom- und T-ALL-Zellen in vitro und in vivo (Cheng et al., 2007, Lam et al., 2010, Lam et al., 2009, Hernandez et al., 2010, Morrow et al., 2013).

Durch Kombination von Arginase mit klassischen Chemotherapeutika zeigten sich synergistische wachstumshemmende bzw. überlebensverlängernde Effekte in HCC- und T-ALL-Zellen in vitro (Cheng et al., 2007, Chow et al., 2012, Hernandez et al., 2010).

In klinischen Phase I und II-Studien erzielte die Monotherapie mit pegylierter rekombinanter humaner Arginase (rhArg) zur Therapie des HCC und weiterer fortgeschrittener, Arginin-auxotropher Tumoren eine gute Verträglichkeit bei moderater Tumorkontrolle (Yau et al., 2013, Yau et al., 2015, Chan et al., 2021, Cheng et al., 2021). In Kombination mit klassischen Chemotherapeutika wurde in einer Phase I-Studie mit rhArg eine gute anti-tumorale Aktivität bei fortgeschrittenem HCC und ein gutes Sicherheitsprofil festgestellt (Yau et al., 2022).

### **2.3.4 Bekannte Resistenzmechanismen einer Argininmangel-Therapie**

Eine Reihe von Faktoren wird für das eher moderate Ansprechen einer Argininmangel-Therapie in klinischen Studien diskutiert. Im Folgenden werden die häufigsten potenziellen Resistenzmechanismen einer Arginindepletions-Therapie erläutert.

Die ASS1-Expression gilt als Marker für ein potenzielles Ansprechen einer Argininmangel-Therapie (Tsai et al., 2012, Feun et al., 2012, Long et al., 2017). Unter anhaltendem Argininmangel durch ADI-PEG20 wird die Re-Expression des Argininsynthetisierenden Enzyms ASS1 in einigen Tumorzellen induziert, was einen



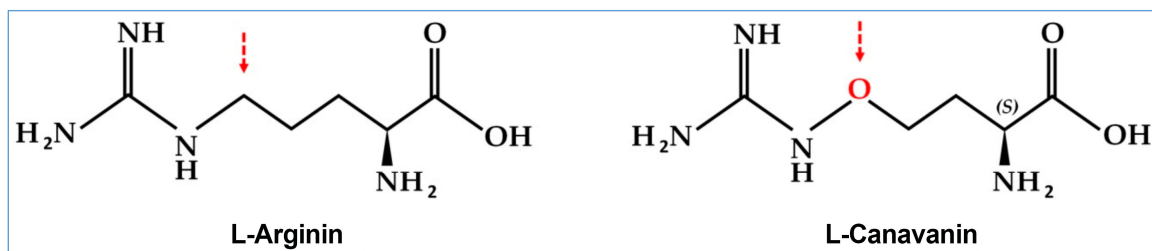
potenziellen Resistenzmechanismus der Zellen gegen die Behandlung mit ADI-PEG20 darstellt (Tsai et al., 2012, Yeh et al., 2016). In einigen Zelllinien wird als Reaktion auf Arginindepletion der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  herunterreguliert und dadurch die ASS1 wieder exprimiert (Long et al., 2017). Um gegen eine Therapie mit dem Enzym Arginase resistent zu sein, muss neben der ASS1 auch die Expression der OTC hochreguliert werden (Alexandrou et al., 2018).

ADI, als bakterielles Enzym, kann im menschlichen Organismus potenziell immunogen wirken (Albaugh et al., 2017). In klinischen Studien korrelierte die Bildung von Antikörpern gegen ADI-PEG20 mit einem verminderten Ansprechen der soliden, ASS1-negativen Tumore und der AML auf eine Argininmangel-Therapie (Glazer et al., 2010, Ott et al., 2013, Beddowes et al., 2017, Lowery et al., 2017, Harding et al., 2018, Tsai et al., 2021, Yao et al., 2021).

Außerdem existiert ein weiterer potenzieller, zelleigener Resistenzmechanismus gegen Argininmangel: In ASS1-negativen Lymphom-, Prostata- und Ovarialkarzinom-Zelllinien bedeutete die Einleitung von Autophagie (Kapitel 2.8) einen Überlebensvorteil (Kim et al., 2009b, Delage et al., 2012, Shuvayeva et al., 2014). Kurzfristig steht den Tumorzellen mittels Autophagie und dem damit einhergehenden Proteinrecycling wieder Arginin zur Verfügung (Delage et al., 2010). Anhaltender Argininmangel kann jedoch über exzessive Autophagie zum Zelluntergang führen (Chen et al., 2021a). Zudem kommt bei Nährstoffmangel das Wachstum zum Erliegen, während Autophagie induziert wird (Neufeld, 2012). Autophagie kann folglich nicht langfristig die Resistenz gegen eine Therapie mit induziertem Argininmangel in vivo erklären. Das Zellwachstum geht mit der Zunahme von Biomasse einher, wozu die Autophagie als kataboler Mechanismus im Gegensatz steht (Neufeld, 2012).

## 2.4 Kombinationstherapie von Argininmangel und Canavanin-Supplementation

Die nicht-proteinogene Aminosäure Canavanin ist ein pflanzliches Arginin-Analogon und dient insbesondere in den Samen von Hülsenfrüchtlern als Stickstoffspeicher und wirkt außerdem insektizid (Rosenthal, 1977). Da Canavanin sich von der proteinogenen Aminosäure Arginin lediglich in einer Seitengruppe unterscheidet (Abbildung 4.7), können Arginyl-tRNA-Synthetasen sie nicht von Arginin abgrenzen (Bence and Crooks, 2003). Aufgrund unterschiedlicher Ladungseigenschaften führt der Einbau von Canavanin anstelle von Arginin in neu translatierte Proteine zur Fehlfaltung und Fehlfunktion der Proteine, woraus ein zytotoxischer Effekt resultiert (Bence and Crooks, 2003, Vynnytska et al., 2011). Hierbei konkurrieren Canavanin und Arginin um die freien Bindungsstellen der tRNA, insofern wird die Stärke des toxischen Effektes wesentlich von dem Verhältnis von Canavanin zu Arginin bedingt.



**Abbildung 2.2: Aminosäuren L-Arginin und L-Canavanin.** Die roten Pfeile markieren den Unterschied in den Strukturformeln: L-Canavanin enthält ein Sauerstoffatom anstelle einer Methylengruppe (Karatsai et al., 2020).

Canavanin hemmt das Wachstum von Lungenkarzinom-, Pankreaskarzinom-, Uterussarkom- und Leukämie-Zellen in vitro (Ding et al., 1999, Swaffar et al., 1994, Swaffar and Ang, 1999, Worthen et al., 1998). Auch in einer T-ALL-Zelllinie induziert Canavanin Apoptose und wirkt somit zytotoxisch (Jang et al., 2002). In Tiermodellen für Kolonkarzinom und Leukämie zeigte Canavanin ebenfalls einen anti-proliferativen Effekt (Thomas et al., 1986, Green et al., 1980).

Durch Kombination mit Chemotherapeutika wird der zytotoxische Effekt von Canavanin auf Pankreaskarzinom-, Uterussarkom-, Leukämie-, Zervixkarzinom- und HCC-Zellen in vitro verstärkt (Swaffar et al., 1995, Worthen et al., 1998, Nurcahyanti and Wink, 2015). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls durch Kombination von Canavanin und 5-Fluoruracil für das Kolonkarzinom im Tiermodell (Swaffar et al., 1995). Daneben dient Canavanin als Strahlensensibilisator für Pankreaskarzinom-Zellen in vitro (Bence

et al., 2003).

Versuchstiere unter alleiniger Canavanin-Therapie litten jedoch unter Gewichtsverlust (Green et al., 1980, Thomas et al., 1986, Swaffar et al., 1995). Durch Reduktion der eingesetzten Canavanin-Dosis könnten diese toxischen Effekte verhindert und auch potenzielle immuntoxische Effekte, wie sie in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) nachgewiesen wurden, vermieden werden (Bence et al., 2002). Durch die Induktion eines Argininmangels wird vermehrt Canavanin anstelle von Arginin für die Synthese von Proteinen verwendet und dadurch können geringere Canavanin-Dosen eingesetzt werden (Nurcahyanti and Wink, 2016). Bei geringen Arginin-Konzentrationen wird der zytotoxische Effekt von Canavanin auf Pankreaskarzinom-, Zervixkarzinom- und HCC-Zellen *in vitro* verstärkt (Swaffar et al., 1994, Nurcahyanti and Wink, 2015). Dies wird dadurch erklärt, dass Canavanin einer größeren Konkurrenz um den Einbau in neu translatierte Proteine bei höheren Arginin-Konzentrationen ausgesetzt ist. Canavanin-Supplementation bei Argininmangel wirkt proapoptotisch für das Glioblastom, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs und weitere humane Tumorzelllinien *in vitro* (Karatsai et al., 2020, Chen et al., 2021b, Vynnytska et al., 2011). Unabhängig von der extrazellulären Citrullin-Konzentration, induziert die Kombinationstherapie von Argininmangel und Canavanin in ASS1-positiven Kolonkarzinom-Zellen Apoptose, zudem werden gesunde Kolonepithelzellen nicht beeinflusst (Kurlishchuk et al., 2016). Unter alleiniger Arginindepletion verbesserte Citrullin in einer hyperphysiologischen Konzentration hingegen das Wachstum und die Viabilität der Kolonkarzinom-Zellen in derselben Arbeit. Als Erklärungsansatz diskutierten die Autoren, dass durch Canavanin unter Arginindepletion die Erholung der überlebenden Kolonkarzinom-Zellen nach Therapieende erschwert wird.

Die Kombination von Arginase-vermittelter Arginindepletion und Canavanin hemmt das Wachstum von Leukämie-Zellen *in vitro*, *in vivo* hat sie jedoch keinen therapeutischen Effekt (Vovk et al., 2016). Für diese ASS1-positiven Leukämiezellen konnte *in vitro* durch Citrullin die Canavanin-induzierte Zytotoxizität unter Arginindepletion signifikant reduziert werden.

Durch Reduktion der eingesetzten Canavanin-Dosis und aufgrund der Fähigkeit gesunder Körperzellen, Arginin selbst zu synthetisieren (Kapitel 2.3), sind diese vor

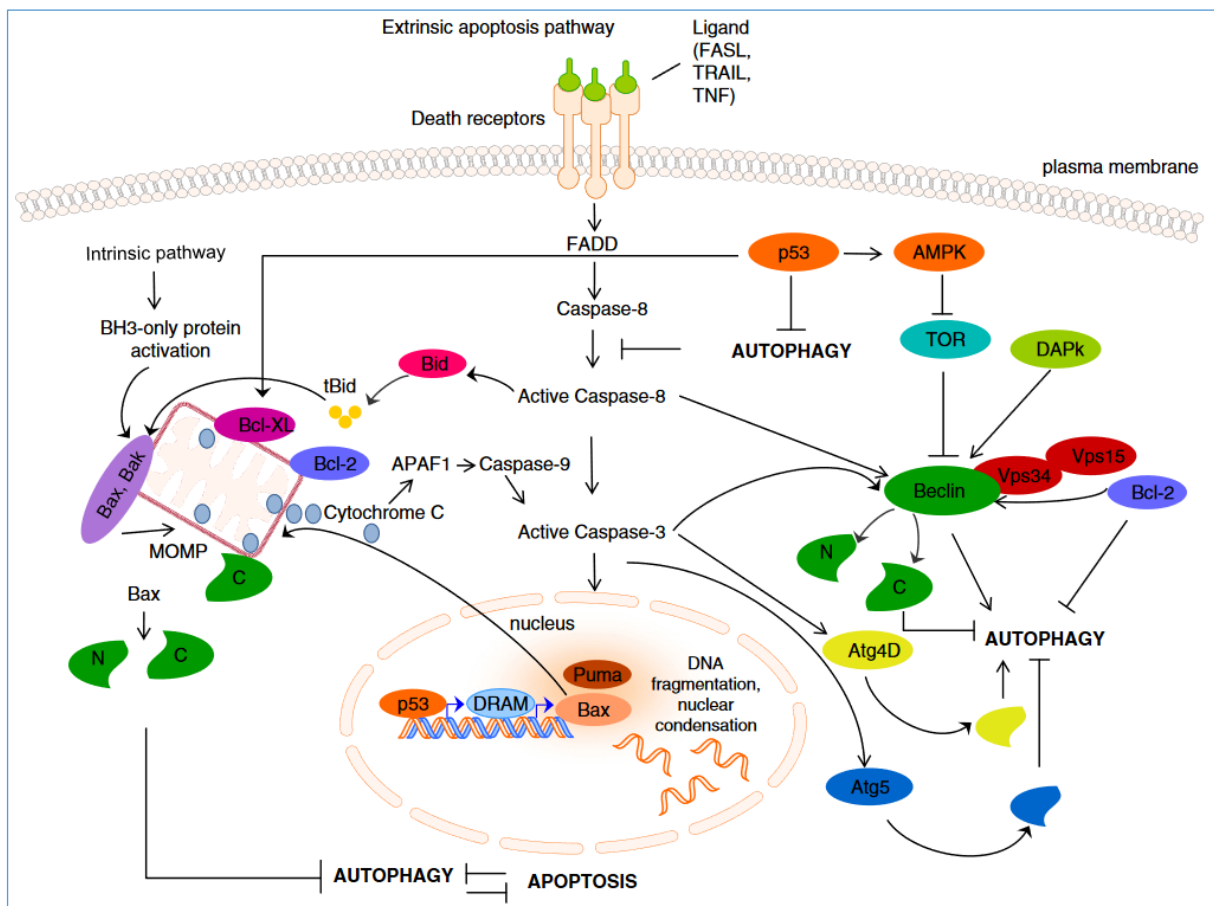
den toxischen Effekten einer Therapie mit Canavanin bei Argininmangel geschützt. In vivo zeigte die Kombinationstherapie von Arginase und Canavanin keine toxischen Effekte für die Mäuse, auch in den tumorfreien Kontroll-Mäusen nicht (Vovk et al., 2016).

Canavanin-Supplementation bei Arginindepletion potenziert die Zytotoxizität klassischer Chemotherapeutika in Arginin-auxotrophen und nicht-auxotrophen humanen Tumorzellen sowie ASS1-positiven Mammakarzinom-Zellen, die häufig resistent gegen eine alleinige Argininmangel-Therapie sind (Nurcahyanti and Wink, 2016, Nurcahyanti and Wink, 2017). Außerdem erhöht die Kombination von Arginindepletion und Canavanin die Strahlensensibilität von ASS1-positiven Kolonkarzinom- und weiteren Tumorzellen (Kurlishchuk et al., 2016, Vynnytska-Myronovska et al., 2012).

### 2.5 Apoptose

Die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod, ist ein streng regulierter Prozess der Zelle (Ferraro and Cecconi, 2007). Durch diese kontrollierte Zelluntergangsform wird lokal keine Inflammation ausgelöst (Booth et al., 2014). Apoptose kann extrinsisch über Todesrezeptoren oder intrinsisch über metabolischen Stress, Nährstoffmangel, Chemotherapeutika, Strahlung, DNA-Schädigung, Wachstumsfaktormangel und prolongierten ER-Stress induziert werden (Ferraro and Cecconi, 2007, Booth et al., 2014, Fulda and Kögel, 2015, Bhat et al., 2017). Bei der intrinsischen Apoptose (Abbildung 2.3) stimulieren diese Stresssignale BAX und BAK aus der Familie der BCL-2-Proteine (BCL-2: B-cell lymphoma 2), welche eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran induzieren, sodass proapoptotische Proteine wie Cytochrom C in das Zytoplasma gelangen (Ferraro and Cecconi, 2007, Fulda and Kögel, 2015, Bhat et al., 2017). Dort aktivieren sie das Apoptosom, ein Komplex aus dem Adapterprotein Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1) und Caspase 9, das wiederum eine Kaskade von Effektorcaspasen aktiviert, welche die finalen Schritte der Apoptose umsetzen (Ferraro and Cecconi, 2007, Fulda and Kögel, 2015). Dabei sind die Caspase 9, die Caspase 3 und die Caspase 7 die zentralen Effektorenzyme der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose (Hernandez et al., 2010, Vynnytska et al., 2011). Die Caspasen liegen als latente Enzymvorstufen in nahezu allen menschlichen Zellen vor (Boatright and Salvesen, 2003). Das Proenzym Caspase 3 hat folglich keine

enzymatische Aktivität; erst wenn es im Rahmen der Apoptose gespalten wird, entsteht das aktive Effektorenzym cleaved Caspase 3 (Walters et al., 2009). Die Apoptose geht mit einer Reihe von morphologischen Veränderungen einher, wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Kernfragmentierung und schließlich wird die Zelle in kleine Apoptosekörperchen aufgelöst (Ferraro and Cecconi, 2007, Fulda and Kögel, 2015).



**Abbildung 2.3: Apoptose.** Darstellung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Pfade und ihre Interaktion mit der Autophagie. Weitere Erläuterungen finden sich im Text (Nikoletopoulou et al., 2013).

Apoptose-Induktion konnte auch in einer Reihe von Tumorzellen unter metabolischen Therapien beobachtet werden. Unter ADI- oder rhArg-vermittelter Arginindepletion wird in Leukämie-, Pankreaskarzinom-, Melanom-, Lymphom- und Glioblastom-Zellen Caspase-abhängige Apoptose induziert (Gong et al., 2000, Hernandez et al., 2010, Bowles et al., 2008, Savaraj et al., 2010, Lam et al., 2010, Delage et al., 2012, Syed et al., 2013).

Bei Canavanin-Monotherapie kommt es in einer humanen T-ALL-Zelllinie BAX-vermittelt zu Caspase-abhängiger Apoptose (Jang et al., 2002). Durch Supplementation von Canavanin werden apoptotische Marker, wie die cleaved

Caspase 3, in arginindepletierten Karzinomzellen noch erhöht (Vynnytska et al., 2011). Auch in Kolonkarzinom- und Leukämie-Zellen wird bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation Caspase-abhängige Apoptose induziert (Kurlishchuk et al., 2016, Vovk et al., 2016).

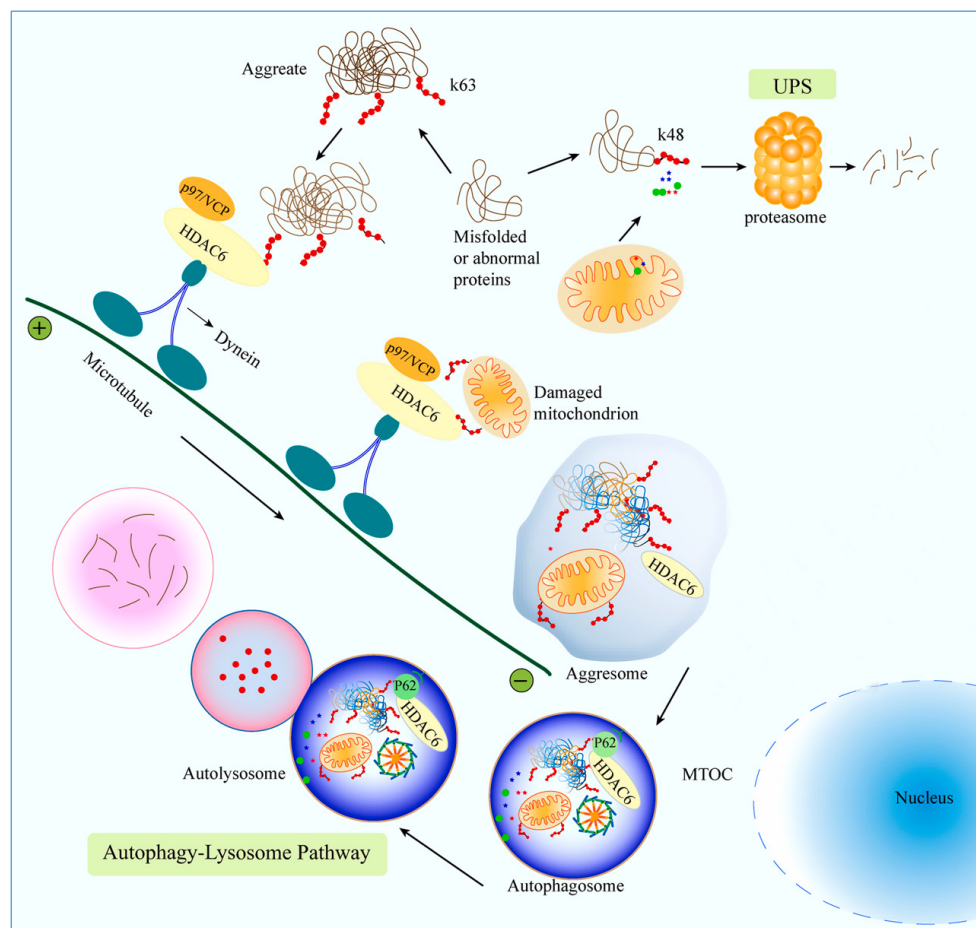
Neben der Apoptose (Typ I) existieren noch zwei weitere Formen des Zelltodes, der autophagische Zelltod (Typ II; Kapitel 2.8.3) und die Nekrose (Typ III), wobei Typ I und Typ II auch ineinander übergehen können (Booth et al., 2014).

### 2.6 Bildung von Aggresomen

Die Akkumulation von Proteinaggregaten ist assoziiert mit vielen vor allem neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Vendruscolo, 2023). Da zytoplasmatische Proteinaggregate toxisch sein können, besitzt die Zelle verschiedene Mechanismen, um diese zu eliminieren: Chaperone binden fehlgefaltete Proteine und helfen bei der korrekten Faltung dieser (Garcia-Mata et al., 2002). Ist dies nicht möglich, werden fehlgefaltete Proteine polyubiquitiniert und so für den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) markiert (Pankiv et al., 2007). Daneben gibt es alternative Abbauege wie die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (Kapitel 2.8.1). Proteasomen enthalten Proteasen und können fehlgefaltete und beschädigte Proteine degradieren (Garcia-Mata et al., 2002). Aggresomen werden gebildet, wenn die Synthesemenge an fehlgefalteten Proteinen die Leistungsfähigkeit der Proteasomen übersteigt und diese Proteine in der Folge aggregieren (Johnston et al., 1998, Corboy et al., 2005). Diese Aggregate an fehlgefalteten, meist ubiquitinierten Proteinen werden in einem geordneten Prozess (Abbildung 2.4) entlang von Mikrotubuli zum MTOC (microtubule organizing center) in der Nähe des Zellkerns transportiert (Johnston et al., 1998, Corboy et al., 2005). Dazu bindet die HDAC6 (Histon-Deacetylase 6) an die polyubiquitinierten Proteine und an Dynein-Motorproteine, die wiederum mit den Mikrotubuli interagieren und assistiert so beim Transport der Proteine zum MTOC (Kawaguchi et al., 2003). Dort akkumulieren sie zum sogenannten Aggresom, welches nicht von einer Membran umgeben, sondern von dem Intermediärfilament Vimentin umhüllt ist (Johnston et al., 1998). Neben fehlgefalteten, in der Regel ubiquitinierten Proteinen enthalten Aggresomen auch Bestandteile des UPS, wie 20S Proteasomen, Proteasom-Aktivatoren und die Chaperone HSP70 (HSP: Heat Shock Protein) und HSP90, die helfen die



Proteinaggregate zu beseitigen (Wigley et al., 1999, Garcia-Mata et al., 2002). Die restlichen Proteinaggregate werden schließlich über Autophagie (Kapitel 2.8) lysosomal abgebaut (Garcia-Mata et al., 2002). Diese Sonderform von Makroautophagie (Kapitel 2.8), bei der Proteinaggregate selektiv abgebaut werden, wird als Aggrephagie bezeichnet (Stürner and Behl, 2017). Dazu bindet das Ubiquitin-bindende Protein p62/SQSTM1 (sequestosome 1) an die polyubiquitinierten Proteine und an LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) in der Autophagosomen-Membran und führt damit zum Abbau der Proteinaggregate durch Autophagie (Pankiv et al., 2007). Das p62 Protein spielt auch eine Rolle bei der Bildung von zytoplasmatischen Proteinaggregaten (Pankiv et al., 2007, Fusco et al., 2012, Cabe et al., 2018).



**Abbildung 2.4: Entstehung von Aggresomen.** Aggregieren polyubiquitinierte Proteine in der Zelle werden diese von HDAC6 gebunden und über Dynein-Motorproteine entlang der Mikrotubuli zum MTOC transportiert, wo sich das Aggresom befindet. Es dient als intrazellulärer Speicher fehlgefalteter Proteine. Die Proteinaggregate werden schließlich über Autophagie abgebaut. Dabei dient der Autophagie-Rezeptor p62 als Adapterprotein und bindet gleichzeitig an die polyubiquitinierten Proteine und an LC3 in der Membran des Autophagosoms (modifiziert nach (Zhu et al., 2023)).

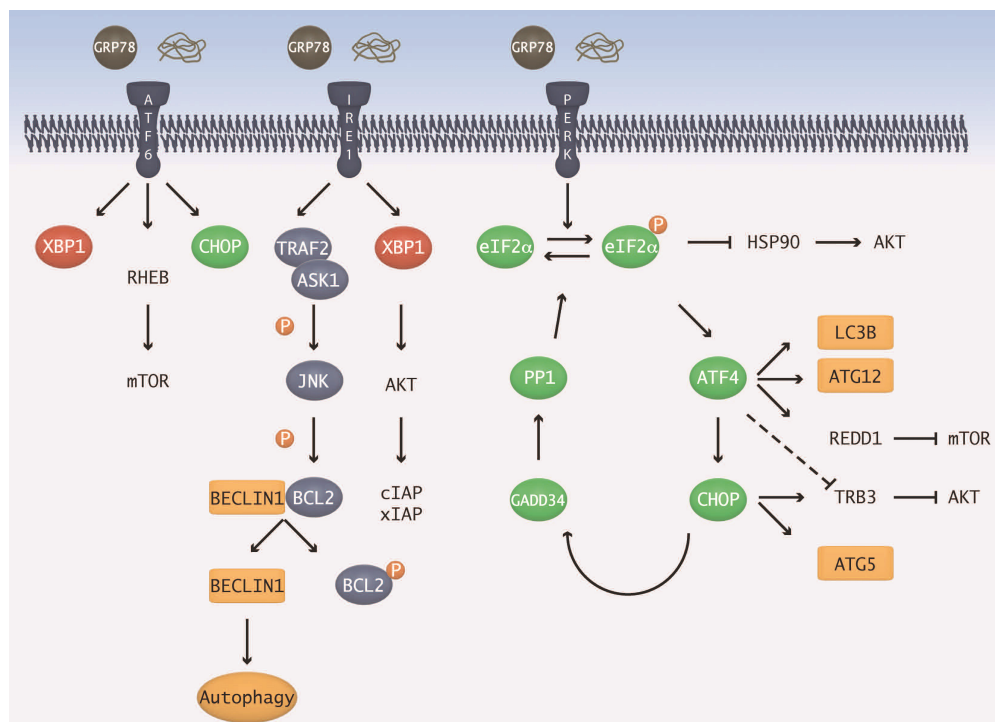
Des Weiteren werden fehlgefaltete Proteine auch durch Hemmung der Proteasomen-Aktivität zu Aggresomen zusammengeführt (Johnston et al., 1998). Unter Therapie mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib werden in Pankreaskarzinom-Zellen, in vitro and in vivo, Aggresomen gebildet (Nawrocki et al., 2006). Bortezomib ist auch zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen (Kapitel 2.1.1). Die Bildung von Aggresomen in Pankreaskarzinom-Zellen wirkt protektiv gegen Bortezomib-assoziierte Apoptose (Nawrocki et al., 2006). Wird die Bildung von Aggresomen durch Inhibition der HDAC6 gehemmt, steigert dies den zytotoxischen Effekt von Bortezomib in Pankreaskarzinom-Zellen, in vitro und in vivo (Nawrocki et al., 2006). Für das Multiple Myelom wurde ebenfalls die synergistische Wirkung von HDAC-Inhibitor und Bortezomib gezeigt (Hideshima et al., 2011). Durch diese Kombinationstherapie wird in den Myelomzellen ER-Stress-vermittelte Apoptose induziert (Moriya et al., 2015). Dieser Effekt wird auch bereits in der Klinik genutzt: Zur Therapie des Multiplen Myeloms ist der (nicht selektive) HDAC-Inhibitor Panobinostat in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason zugelassen (Richardson et al., 2016).

### 2.7 Induktion von ER-Stress

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein tubuläres Membransystem, welches essenzielle Funktionen in der Zelle, wie die Lipidsynthese, die posttranslationale Modifikation und Faltung von Proteinen, erfüllt (Hetz, 2012, Almanza et al., 2019). Besonders in sekretorischen Zellen, wie z.B. Plasmazellen, mit hoher Proteinsyntheserate, ist das ER ständig gefordert (Hetz, 2012). Bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine im ER helfen ER-Chaperone (Chambers and Marciniak, 2014). Fehlgefaltete Proteine können mit Hilfe des UPS als ER-associated protein degradation (ERAD) oder über Autophagie (Kapitel 2.8) abgebaut werden (Vincenz et al., 2013). Kann das ER die Menge an nicht bzw. fehlerhaft gefalteten Proteinen nicht mehr bewältigen, kommt es zur Induktion von ER-Stress: Dieser aktiviert wiederum die UPR (unfolded protein response), im Rahmen derer die globale Proteinsynthese reduziert wird. Außerdem wird die Expression von ER-Chaperonen und ERAD-assoziierten Proteinen erhöht, um die Faltkapazität des ERs zu steigern und den Abbau fehlgefalteter Proteine zu erleichtern (Chambers and Marciniak, 2014). Die UPR ist folglich, neben dem UPS und der Bildung von Aggresomen (Kapitel 2.6), ein weiterer Mechanismus der Zelle, um die Menge an fehlgefalteten Proteinen zu kontrollieren und somit das Überleben der Zelle zu sichern. Die UPR wird über drei



Transmembran-Proteine, die protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), den activating transcription factor 6 (ATF6) und das inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) gesteuert, die ein Übermaß an fehlgefalteten Proteinen im ER wahrnehmen und nachgeschaltete Signalkaskaden (Abbildung 2.5) in Gang setzen (Hetz, 2012). Über den PERK- und IRE1 $\alpha$ -Signalweg der UPR, kann ER-Stress auch (Makro-) Autophagie induzieren: über IRE1 $\alpha$  wird letztlich Beclin 1 aktiviert, ein essenzieller Autophagie-Regulator (Aronson and Davies, 2012). PERK dagegen aktiviert über die Transkriptionsfaktoren ATF4 und C/EBP homologous protein (CHOP) mehrere autophagy-related (ATG) proteins und LC3 (Kroemer et al., 2010). Gelingt es durch die UPR nicht, übermäßigen oder anhaltenden ER-Stress zu überwinden, wird in der Zelle die Apoptose eingeleitet: Dies geschieht durch Interaktion von ATF4 und dem proapoptischen Transkriptionsfaktor CHOP, die über PERK reguliert werden. Daneben beeinflusst CHOP auch die Expression von BCL-2, was den intrinsischen Apoptoseweg moduliert (Hetz, 2012, Bhat et al., 2017).



**Abbildung 2.5: Die UPR als Antwort auf ER-Stress.** Durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER werden die drei UPR-Transmembranproteine ATF6, IRE1 $\alpha$  und PERK aktiviert und dadurch die UPR eingeleitet. Über ER-Stress kann außerdem Autophagie induziert werden, insbesondere über den IRE1 $\alpha$ - und PERK-Pfad. Weitere Erläuterungen finden sich im Text (Aronson and Davies, 2012).

Die Beeinflussung des ER-Stress wird als Therapieoption für diverse Tumorentitäten untersucht (Almanza et al., 2019). Durch Arginindepletion wird in Leukämie-Zellen ER-Stress induziert (Garcia-Navas et al., 2012, Morrow et al., 2013). In humanen soliden

Tumorzellen wird ebenfalls unter Argininmangel ER-Stress induziert und nachgeschaltet die UPR über IRE1 $\alpha$  und ATF6 aktiviert. Dies resultierte jedoch nicht, trotz Erhöhung von CHOP, in einer erheblichen Apoptose-Induktion (Bobak et al., 2016). Der klassischen ER-Stress-Induktor Tunicamycin führte in Kolonkarzinom-Zellen in Anwesenheit von Arginin zu einem Anstieg der CHOP-Expression, eine zusätzliche Arginindepletion konnte diese jedoch nicht weiter erhöhen (Bobak et al., 2016).

Durch Einbau von Canavanin kommt es zur Fehlfaltung der neu synthetisierten Proteine (Kapitel 2.4). Arginindepletion in Kombination mit Canavanin resultierte in einem Anstieg von ER-Stress und Apoptose über erhöhte CHOP-Expression im Vergleich zu alleiniger Arginindepletion in Kolonkarzinom-Zellen (Bobak et al., 2016). Dieser zytotoxische Effekt in Zusammenhang mit ER-Stress zeigte sich auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Chen et al., 2021b).

Myelomzellen sind für das Zellüberleben besonders auf die UPR angewiesen, da sie kontinuierlich und in großer Menge Antikörper sezernieren und ihr ER daher mit hohen Mengen an sekretorischen und immer wieder auch fehlgefalteten Proteinen konfrontiert ist (Vincenz et al., 2013, García Ruiz et al., 2022). Stört man diese Stressbewältigungsmechanismen für fehlgefaltete Proteine in Myelomzellen durch Kombination des Proteasom-Inhibitors Bortezomib mit Hemmung der Bildung von Aggresomen und Autophagie, dann führt dies mittels CHOP zu ER Stress-induzierter Apoptose (Moriya et al., 2015). Auch durch die Kombinationstherapie von Bortezomib und dem Autophagie-Inhibitor Hydroxychloroquin akkumulieren fehlgefaltete Immunglobuline und steigern so ebenfalls den ER-Stress, was die Myelomzellen in Apoptose treibt (Di Lernia et al., 2020). Diese Schwachstelle von Myelomzellen therapeutisch zu nutzen, indem man die UPR, genauer den IRE1 $\alpha$ -Signalweg, durch IRE1 $\alpha$ -Inhibitoren direkt hemmt, wird derzeit untersucht (Vincenz et al., 2013, Wiese et al., 2022).

## 2.8 Autophagie - Recyclingmechanismus vs. Todesmechanismus

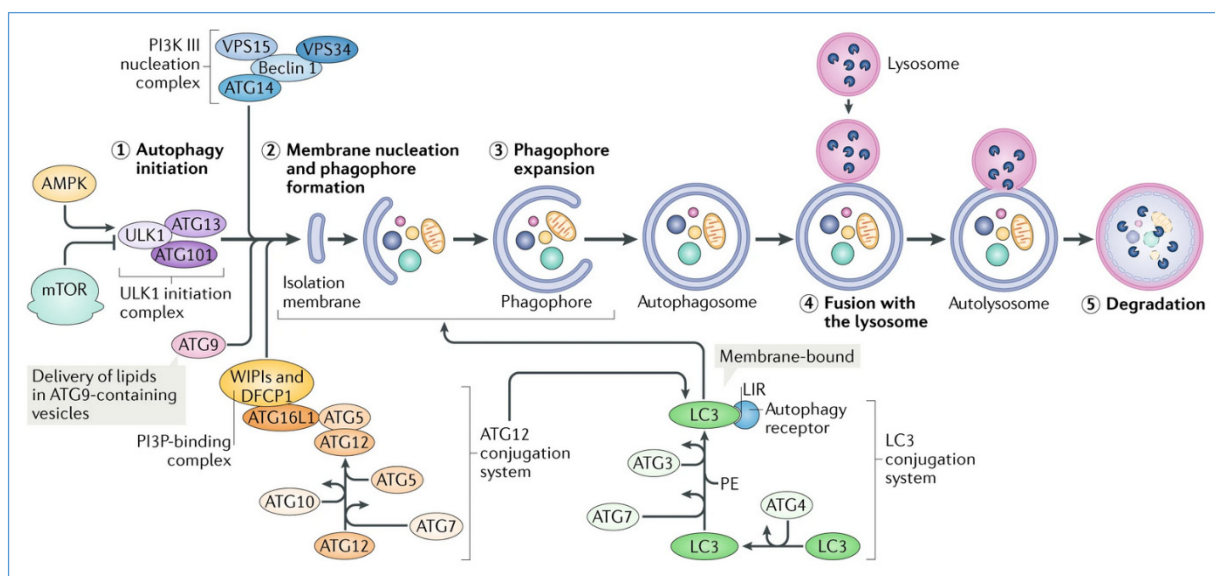
### 2.8.1 Funktion und Ablauf der Autophagie

Autophagie ist ein kataboler Prozess, der intrazelluläre, gealterte Proteine, Proteinaggregate und dysfunktionale Zellorganellen lysosomal abbaut (Johansen and Lamark, 2011, Parzych and Klionsky, 2014, Klionsky et al., 2021). Unter Stressbedingungen, wie z. B. Nährstoffmangel, wird Autophagie induziert, um metabolische Vorläufermoleküle zu gewinnen und um Zellstress durch Abbau von dysfunktionalen Proteinen und Zellorganellen zu reduzieren (Ferraro and Cecconi, 2007, Fulda and Kögel, 2015). Neben der Makroautophagie, die am besten untersucht ist und daher im Folgenden im Fokus steht, unterscheidet man noch zwei weitere Typen von Autophagie, die Mikroautophagie, und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA: chaperone-mediated autophagy) (Stürner and Behl, 2017). Bei der Mikroautophagie werden die Substrate, wie Proteine und Zellorganellen, direkt von der lysosomalen Membran aufgenommen. Wohingegen bei der CMA die Substrate über ein spezifisches Pentapeptid gezielt von HSP70 (heat shock protein 70 kDa)-Chaperonen erkannt und über LAMP-2A (lysosomal associated membrane protein 2) in die Lysosomen transloziert werden (Kaur and Debnath, 2015).

Der geordnete Ablauf der Makroautophagie (Abbildung 2.6), im Folgenden nur als Autophagie bezeichnet, wird durch ATG Proteine wie ULK1 (Unc-51-like kinase 1), Beclin 1 und ATG8/LC3 (microtubule-associated protein light chain 3, Teil der ATG8-Proteinfamilie), reguliert (Mizushima, 2010, Wesselborg and Stork, 2015). Im Rahmen der Autophagie binden die zum Abbau bestimmten Substrate zunächst über Autophagie-Rezeptoren wie p62/SQSTM1 oder NBR1 (neighbor of Brca1 gene) an ein Phagophor, eine noch zu einer Seite hin offene Doppelmembran-Struktur (Johansen and Lamark, 2011, Stürner and Behl, 2017). Über ihre LC3-interacting region (LIR) binden die Autophagie-Rezeptoren an LC3-II in der Doppelmembran (Johansen and Lamark, 2011, Pankiv et al., 2007). LC3-II entsteht über mehrere Zwischenschritte: zuerst wird pro-LC3 synthetisiert und dies zu seiner zytosolischen Form, LC3-I, modifiziert. Durch Konjugation von Phosphatidylethanolamin an LC3-I entsteht LC3-II, welches in die Membran von Autophagosomen integriert wird (Pankiv et al., 2007). Folglich ist, im Vergleich zu LC3-I, die lipidierte Form LC3-II erhöht, wenn Autophagie in der Zelle abläuft (Delage et al., 2012). Im Verlauf der Autophagie schließt sich die Doppelmembran des Phagophors, es entsteht das Autophagosom, welches die Substrate vollständig umhüllt (Stürner and Behl, 2017). Durch Fusion der äußeren

Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom wird das Auto(phago)lysosom gebildet, in dessen Inneren die innere Membran des Autophagosoms und die eingehüllten zellulären Komponenten durch lysosomale Proteasen abgebaut und deren Bestandteile über Permeasen wieder in das Zytoplasma entlassen werden (Stürner and Behl, 2017). Die beiden Proteine p62 und LC3-II der inneren Membran des Autophagosoms werden ebenfalls lysosomal abgebaut (Pankiv 2007).

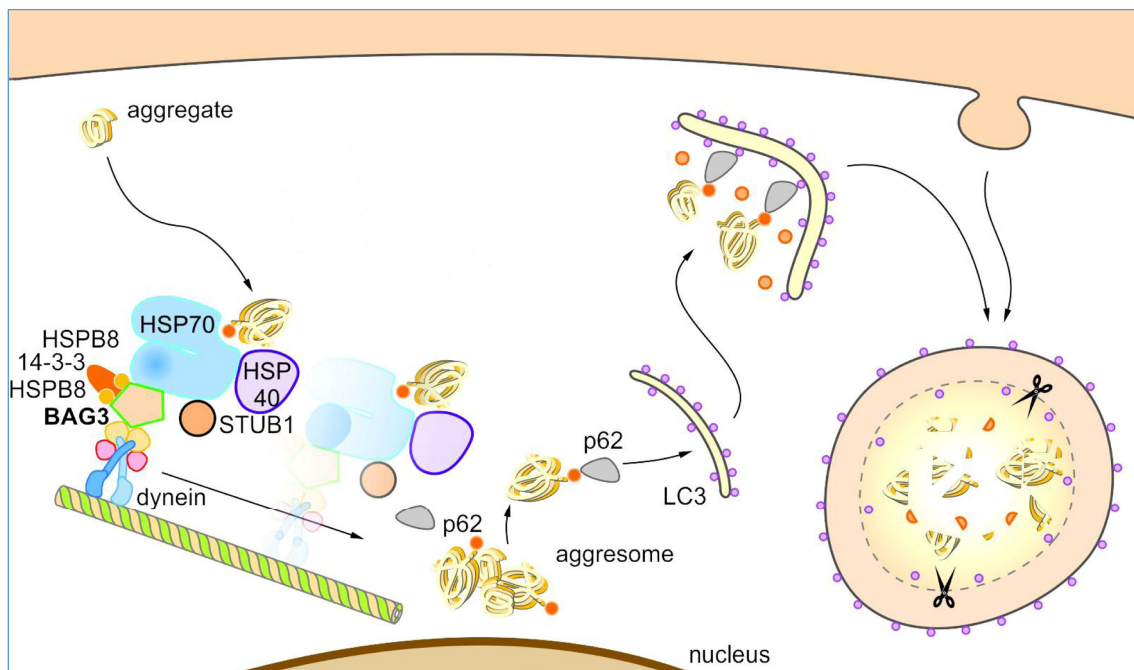
Chloroquin, ein Malariamittel, das auch zur Therapie des Lupus erythematodes und der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird und zur Therapie von Covid-19 untersucht wurde, fungiert ebenfalls als Autophagie-Inhibitor und setzt an dem zuvor genannten Mechanismus an: Es inhibiert die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom (Mauthe et al., 2018). In der Folge akkumulieren die mit LC3-II-markierten Autophagosomen, da sie nicht mehr lysosomal abgebaut werden (Delage et al., 2012).



**Abbildung 2.6: Autophagie.** Autophagie wird über verschiedene Stresssignale und Aminosäuremangel über die beiden Hauptregulationsproteine mTORC1 und AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) eingeleitet. Diese aktivieren den ULK1-Initiationskomplex. Daraufhin folgt über mehrere Zwischenschritte die Bildung eines Autophagosoms, das die abzubauenden Substrate, wie fehlgefaltete Proteine und Zellorganellen, umgibt. LC3-II ist über Phosphatidylethanolamin (PE) in die Membran des Autophagosoms integriert und bindet über Autophagie-Rezeptoren an die Substrate. Durch Fusion mit einem Lysosom entsteht das Autophagolysosom, welches dem Abbau und Recycling der Substrate dient. Der korrekte Ablauf der Autophagie wird über verschiedene ATG Proteine, die zum Teil Komplexe bilden, reguliert (Hansen et al., 2018).

Wie bereits in Kapitel 2.6 erläutert, gibt es zwischen den verschiedenen Proteinabbauenden Systemen, wie z. B. der Bildung von Aggresomen und Autophagie, Schnittpunkte. Bei akutem Zellstress und während der Zellalterung werden fehlgefaltete Proteine und Proteinaggregate durch BAG3 (BCL-2-associated

athanogene 3) erkannt, zum Aggresom transportiert und schließlich der selektiven Makroautophagie zugeführt (Minoia et al., 2014, Sherman and Gabai, 2022). Mit zunehmenden Zellalter nimmt die Aktivität des UPS ab und der BAG3-assoziierten Autophagie kommt eine größeren Rolle zu (Morawe et al., 2012, Stürner and Behl, 2017). BAG3, ein HSP70 Co-Chaperon, bildet mit den Chaperonen HSP70, HSPB8 und HSP40 einen Multi-Chaperon-Komplex, der die abzubauenen Proteine bindet (Gamerding et al., 2011, Minoia et al., 2014). Über BAG3 bindet der Komplex an Dynein und transportiert die abzubauenen Substrate entlang der Mikrotubuli zum Aggresom (Kapitel 2.6), (Gamerding et al., 2011). BAG3 interagiert dort mit dem (Makro-)Autophagie-Rezeptor p62/SQSTM1 und leitet auf diesem Weg die selektive Makroautophagie ein (Stürner and Behl, 2017). P62 bindet, wie in diesem Kapitel bereits beschrieben, an die Substrate und an LC3-II in der Autophagosomen-Membran, sodass diese schließlich über Autophagie abgebaut werden.



**Abbildung 2.7: BAG3-assoziierte, selektive Makroautophagie.** Die abzubauenen Proteinaggregate werden durch einen Multi-Chaperon-Komplex, u. a. bestehend aus BAG3, HSP70, HSPB8 und HSP40, zum Aggresom transportiert. Dazu interagiert der Komplex über BAG3 mit Dynein und transportiert die abzubauenen Substrate entlang der Mikrotubuli zum MTOC in der Nähe des Zellkerns. BAG3 in Verbindung mit p62 induziert dort die selektive Makroautophagie. Der Makroautophagie-Rezeptor p62 schafft eine Verbindung zwischen den abzubauenen Proteinen und dem Autophagosom. Nach Fusion mit einem Lysosom können die Substrate im Autophagolysosom abgebaut werden (modifiziert nach (Stürner and Behl, 2017)).

Autophagie kann auch durch ER-Stress (Kapitel 2.7) induziert werden und spielt dabei eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle (Ogata et al., 2006, Kroemer et al., 2010).

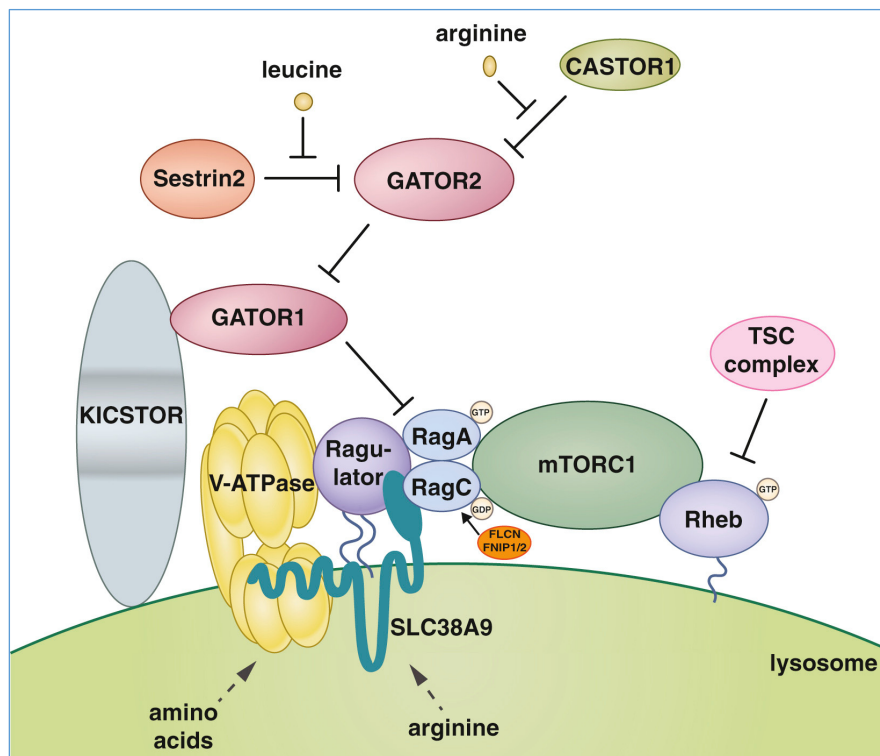
### 2.8.2 Induktion von Autophagie

Der mTORC1 (mechanistic target of Rapamycin complex 1) ist ein wichtiger Regulator der Autophagie und wird durch Nährstoffe, wie die Aminosäuren Leucin und Arginin, und Glucose aktiviert (Jewell and Guan, 2013, Nguyen et al., 2017). Weitere Details zum mTOR-Signalweg sind in Kapitel 2.9 zusammengefasst. Unter Nährstoff-reichen Bedingungen, hemmt der aktive mTORC1 den ULK1-Komplex und damit die Autophagie (Mizushima, 2010, Ryter et al., 2013).

Durch Inhibition von mTORC1 wird Autophagie induziert (Jung et al., 2010, Yan and Lamb, 2012). Der mTOR-Inhibitor Rapamycin gilt als schwacher Autophagie-Induktor (Thoreen et al., 2009). Rapamycin bildet einen Komplex mit FKBP12, und bindet dann an mTOR (Magaway et al., 2019). Torin 1, ein hochpotenter und selektiver mTOR-Inhibitor, hat einen stärkeren Einfluss auf mTORC1, da es direkt seine Kinase-Aktivität hemmt, und ist daher ein stärkerer Autophagie-Induktor als Rapamycin (Thoreen et al., 2009).

Auch ein Nährstoffmangel, wie z. B. ein Mangel an der Aminosäure Arginin, kann mTORC1 inhibieren und damit Autophagie induzieren (Savaraj et al., 2010, Yan and Lamb, 2012, Ryter et al., 2013). Der Argininmangel wird von CASTOR1 (cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1) detektiert, der wiederum GATOR2 (GATOR: GAP activity towards Rags)-abhängig (Abbildung 2.8) mTORC1 hemmt (Nguyen et al., 2017). Kolonkarzinom-Zellen unter Argininmangel leeren ihre intrazellulären Arginin-Speicher, was GCN2 (general control nonderepressible 2 kinase), einen weiteren Arginin-Sensor aktiviert und mTORC1 inhibiert (Vynnytska-Myronovska et al., 2016). GCN2 wird durch eine zunehmende Anzahl nicht beladener tRNAs bei Aminosäuremangel direkt von diesen aktiviert, was wiederum zu einer Abnahme der allgemeinen Proteinsynthese führt (Gallinetti et al., 2013). Daneben ist SLC38A9 (solute carrier 38A9), ein lysosomales Membranprotein, ein weiterer Aminosäure-Sensor, der mTORC1 aktiviert und damit indirekt die Autophagie beeinflusst (Wang et al., 2015, Rebsamen and Superti-Furga, 2016).





**Abbildung 2.8: Intrazelluläre Arginin-Sensoren.** Zytosolisches Arginin bindet an CASTOR1. Über GATOR1 werden dann die RAG-GTPasen (Rags) stimuliert. Lysosomales Arginin bindet an SLC38A9 und aktiviert ebenfalls die RAG-GTPasen. Diese wiederum rekrutieren mTORC1 zum Lysosom, wo mTORC1 Rheb-abhängig aktiviert wird (Wolfson and Sabatini, 2017).

### 2.8.3 Autophagie bei Argininmangel

Autophagie, als intrazellulärer Nährstoff-Recycling-Mechanismus, gilt als Überlebensmechanismus der (Tumor-) Zelle (Savaraj et al., 2010, Wang et al., 2014b). Wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben, führt die Inhibition von mTOR zu Autophagie. Unter Argininmangel wird mTORC1 gehemmt (Vynnytska-Myronovska et al., 2016). Außerdem wird unter Arginindepletion die AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), aufgrund sinkender ATP-Spiegel, aktiviert, die wiederum ebenfalls mTORC1 hemmt (Kim et al., 2009b, Savaraj et al., 2010).

In Prostatakarzinom- und Melanom-Zellen wird durch ADI Autophagie eingeleitet, was sich in einer Erhöhung von LC3-II widerspiegelt (Kim et al., 2009b, Kim et al., 2009a, Changou et al., 2014). Auch eine Kultivierung von Tumorzellen in Arginin-freiem Medium resultiert in einer erhöhten Phagosomen-Aktivität (Scott et al., 2000). Unter Argininmangel reagierten Jurkat T-Zellen und gesunde Spender-T-Zellen mit der Induktion von ER-Stress und nachfolgend von Autophagie, die sie vor dem Eintritt in Apoptose bewahrte (Garcia-Navas et al., 2012). Mit Hilfe von Autophagie gelingt es unter Argininmangel den Eintritt in die Apoptose zu verhindern bzw. zu verzögern (Kim

et al., 2009b). Dies wird dadurch erklärt, dass über Autophagie den Tumorzellen kurzfristig wieder Arginin zur Verfügung steht (Delage et al., 2010). Wird die ADI-induzierte Autophagie durch Chloroquin gehemmt, steigert dies den toxischen Effekt von ADI in Lymphom-Zelllinien und primären B- und T-Zell-Lymphomzellen sowie in Prostatakarzinom-, Kleinzelligen Lungenkarzinom- und Sarkom-Zellen (Delage et al., 2012, Kim et al., 2009b, Kim et al., 2009a, Kelly et al., 2012, Bean et al., 2016). Dieser Effekt wurde auch in weiteren Zelllinien, wie Leukämie, Pankreaskarzinom, Melanom, Glioblastom und Mammakarzinom erhoben, was für Autophagie als potenzielle Überlebensstrategie von Tumorzellen unter Argininmangel spricht (Gong et al., 2000, Bowles et al., 2008, Savaraj et al., 2010, Syed et al., 2013, Wang et al., 2014a).

Im Gegensatz hierzu gilt die Autophagie, neben der Apoptose, auch als alternativer Mechanismus für Zelltod (Ferraro and Cecconi, 2007, Wu et al., 2012). In Prostatakarzinom-Zellen zeigte sich unter Arginindepletion durch rhArg eine signifikante Reduktion der Viabilität, ohne signifikante Induktion von Apoptose (Hsueh et al., 2012). Andererseits wurde in diesen Zellen eine mTORC1-Hemmung durch nachgeschaltete Dephosphorylierung von 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, Kapitel 2.9.1) nachgewiesen, was für einen autophagischen Zelltod spricht (Hsueh et al., 2012). Zelllinien des Kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Prostatakarzinoms wurden unter ADI-PEG20 ebenfalls in Zelltod getrieben, aber ohne Aktivierung der Caspasen, es handelt sich dabei folglich um einen Caspase-unabhängigen Zelltod (Kelly et al., 2012, Kim et al., 2009b). Auch in Mammakarzinom-Zellen resultierte der Argininmangel in Autophagie-vermitteltem Zelluntergang: übermäßige Autophagie kann der Tumorzelle unter Argininmangel also zusätzlich schaden (Qiu et al., 2014). Eine Therapie mit ADI führte in ASS1-negativen Lymphom-Zelllinien zu Autophagie und Caspase-abhängiger Apoptose (Delage et al., 2012). Dies war auch in Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen unter rhArg der Fall (Zeng et al., 2013). Autophagie kann folglich zu zwei gegensätzlichen Effekten, nämlich Überleben oder Zelltod in einer Tumorzelle führen, abhängig von der Art des Malignoms und der Tumorprogression (Wu et al., 2012, García Ruiz et al., 2022). Die beiden Mechanismen Apoptose und Autophagie sind über intrazelluläre Signalwege miteinander verschaltet, sodass Autophagie in Caspase-unabhängigen Zelltod (d.h. autophagischen Zelltod) oder in Caspase-abhängige Apoptose münden kann (Booth et al., 2014, Fulda and Kögel, 2015, Patil et al., 2016).



#### 2.8.4 Therapeutische Möglichkeiten in Bezug auf Autophagie und mTOR-Inhibition

Autophagie ist für die Plasmazell-Entwicklung und für die Pathophysiologie des Multiplen Myeloms essenziell (Yun et al., 2017). Zudem ist, im Vergleich mit anderen Malignomen, die Autophagie beim Multiplen Myelom grundsätzlich aktiver, was durch die protektive Funktion der Autophagie beim Abbau fehlgefalteter, potenziell toxischer Proteine (Kapitel 2.7) erklärt wird (García Ruiz et al., 2022). Zusätzlich kann Autophagie als Resistenzmechanismus dienen, z. B. bei der Resistenz gegenüber Bortezomib (Yun et al., 2017).

In Myelomzellen erwies sich eine Hemmung der Autophagie mittels Chloroquin, 3-Methyladenin oder Elaiophylin als zytotoxisch (Hoang et al., 2009, Wang et al., 2017). Derzeit ist Hydroxychloroquin der einzige zugelassene Autophagie-Inhibitor; er wird aktuell weiter in klinischen Studien allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen untersucht (Chude and Amaravadi, 2017, Di Lernia et al., 2020).

Der allosterische mTOR-Inhibitor Rapamycin und seine Strukturanaloga zeigen keine signifikante Antitumor-Aktivität in vielen Tumorarten, da sie mTORC1 inkomplett hemmen, ihre Zulassung gilt daher nur zur Therapie spezifischer Tumoren und als Immunsuppressivum (Thoreen et al., 2009, Magaway et al., 2019).

Der ATP-kompetitive mTOR-Inhibitor Torin 1 induzierte in Kolonkarzinom-Zellen Autophagie und Apoptose und hemmte ihr Wachstum in vitro und in vivo (Francipane and Lagasse, 2013). Präklinische Daten der neueren mTOR-Inhibitoren sind insgesamt vielversprechend, in frühen klinischen Studien zeigten sie jedoch lediglich moderate Ansprechraten (Magaway et al., 2019).

## 2.9 mTOR-Signalweg

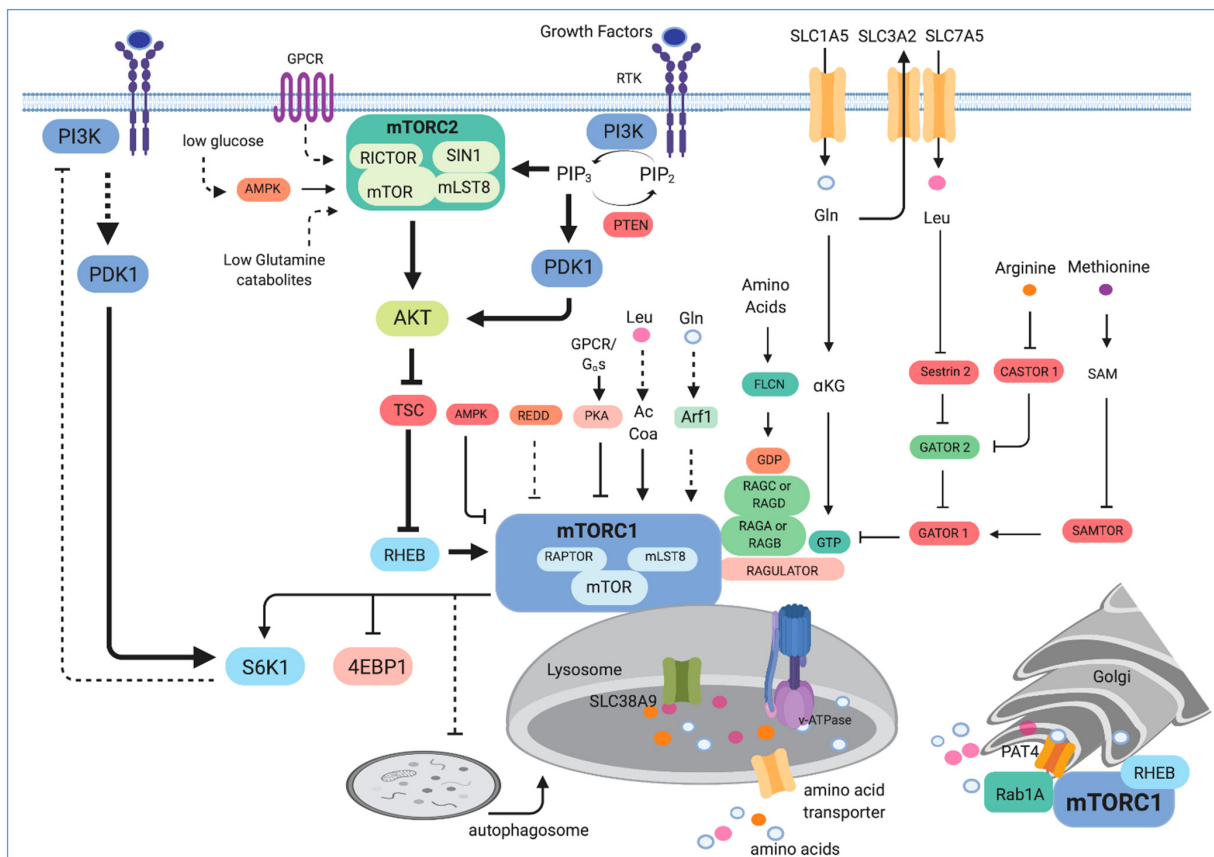
Das mechanistic target of Rapamycin (mTOR) ist essenziell für das Wachstum und den Metabolismus der Zelle (Saxton and Sabatini, 2017). Dabei kann mTOR in einem Komplex in zwei Varianten als mTORC1 und als mTORC2 vorliegen (Thoreen et al., 2009). Diese haben zwar die gleiche katalytische Untereinheit, nämlich die Proteinkinase mTOR, sonst unterscheiden sie sich jedoch in ihrem Aufbau und ihrer Funktion: mTORC1 ist zentral in die Regulation der Proteinsynthese und der Autophagie (Kapitel 2.8.2), mTORC2 und die nachgeschaltete Proteinkinase Akt (aktin transformierend) in die Proliferation und das Überleben der Zelle involviert (Bhaskar and Hay, 2007). mTOR wird durch äußere Einflüsse (Abbildung 2.9), wie Wachstumsfaktoren, den Energiestatus und Nährstoffe reguliert (Nguyen et al., 2017, Saxton and Sabatini, 2017).

### 2.9.1 mTORC1

In Malignomen, wie auch im Multiplen Myelom, ist mTORC1 oft hyperaktiviert, was zu unkontrolliertem Wachstum und aberranter Proliferation führt (Ghobrial et al., 2016, Saxton and Sabatini, 2017).

Wird die Proteinkinase mTORC1 (Abbildung 2.9) aktiviert, phosphoryliert sie die p70S6K1 (70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1) und stimuliert somit die Proteinsynthese (Ma and Blenis, 2009, Foster and Fingar, 2010). 4E-BP1 ist dem mTORC1 ebenfalls direkt nachgeschaltet; wird 4E-BP1 durch mTORC1 phosphoryliert, wird der Translationsinitiationsfaktor eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) freigegeben und die Translation wird ebenfalls angetrieben (Ma and Blenis, 2009, Qin et al., 2016). In der nicht-phosphorylierten Form bindet 4E-BP1 eIF4e und inhibiert die Translation (Qin et al., 2016). Eine Hemmung von mTORC1 hat somit eine Inhibition der Translation zur Folge.

Ein Aminosäuremangel führt folglich durch Hemmung von mTORC1 zur Dephosphorylierung der beiden Effektorproteine p70S6K1 und 4E-BP1 (Hara et al., 1998, Gallinetti et al., 2013). Dies zeigte sich auch unter rhArg- bzw. ADI-induziertem Argininmangel in Melanom- und Prostatakarzinom-Zellen (Feun et al., 2008, Kim et al., 2009b, Hsueh et al., 2012).



**Abbildung 2.9: Übersicht mTOR-Akt-Signalweg.** Der mTORC1 wird über den intrazellulären Aminosäuregehalt, registriert von verschiedenen Sensoren wie SLC38A9 oder CASTOR1, aktiviert. Wachstumsfaktoren beeinflussen direkt mTORC2 und indirekt mTORC1 über eine Aktivierung des PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt-Pfades. Das Schema gibt außerdem eine Übersicht über die verschiedenen Effektorsysteme von mTORC1 zur Regulation der Proteintranslation über die p70S6K1 (auch S6K1 genannt) und 4E-BP1 und der Autophagie (Magaway et al., 2019).

### 2.9.2 mTORC2 - Akt

Akt (ak strain transforming) und mTOR sind zwei sich gegenseitig beeinflussende Regulationsproteine der Zelle (Dan et al., 2016). In Abhängigkeit von vorgeschalteten Stimuli phosphoryliert mTORC2 die Serin-Threonin-Kinase Akt (Abbildung 2.9) und fördert somit die Proliferation und das Überleben der Zelle (Foster and Fingar, 2010). Akt wiederum beeinflusst mTORC1 (Saxton and Sabatini, 2017). Das erklärt, warum auch unter Argininmangel mTOR und die p70S6K1 gehemmt und nachgeschaltet auch Akt inaktiviert wird (Wang et al., 2020a). Akt wird über zwei potenzielle Phosphorylierungsstellen aktiviert, zum einen an Thr308 (Threonin 308) durch die PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) und zum anderen an Ser473 (Serin 473) durch mTORC2 (Dan et al., 2016).

Der PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt-mTOR Signalweg ist essenziell für die Regulation von Überleben, Wachstum, Metabolismus und Proliferation der Zelle und

PI3K/Akt ist in sehr vielen Tumoren und auch dem Multiplen Myelom ständig aktiviert (Engelman, 2009, Chapman et al., 2011). Akt spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progression des Multiplen Myeloms und in präklinischen Studien erwies sich die Akt-Inhibition als vielversprechender therapeutischer Ansatz (Keane et al., 2014). In vitro führte die Kombination des Akt-Inhibitors Afuresertib mit dem Immunmodulator Pomalidomid und Dexamethason in Myelom-Zelllinien zu Apoptose (Kinoshita et al., 2018). In einer Phase I-Studie zeigte Afuresertib eine gute Verträglichkeit und klinische Aktivität beim Multiplen Myelom (Spencer et al., 2014). Klinisch zeigte sich außerdem ein synergistischer Effekt von Afuresertib, zusammen mit Bortezomib und Dexamethason für das Multiple Myelom (Voorhees et al., 2013). Afuresertib in Kombination mit einem weiteren Proteinkinase-Inhibitor, Trametinib wurde ebenfalls in einer klinischen Phase I-Studie für Patienten mit soliden Tumoren und Multiplem Myelom untersucht (Tolcher et al., 2015). In weiteren Malignomen, wie z. B. in Pleuramesotheliom-, Merkelzellkarzinom- und Ösophaguskarzinom-Zellen wirkte Afuresertib ebenfalls zytotoxisch (Yamaji et al., 2017, Wu et al., 2021, Min et al., 2022). Zudem wurde Afuresertib in klinischen Phase I- bis II-Studien allein bzw. in Kombination zur Therapie der Langerhanszell-Histiozytose, der CLL und des Ovarialkarzinoms untersucht (Arceci et al., 2017, Chen et al., 2019, Blagden et al., 2019).

### 3. Material & Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	6752.4	Carl Roth
Afuresertib	57521	Selleckchem
Akti-1/2 (Akt Inhibitor VIII)	5773	TOCRIS
Albumin Fraktion V (BSA)	8076.4	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	A3678	Sigma-Aldrich
BD FACSFlo <sup>TM</sup>	342003	BD Biosciences
BD FACSRinse	340346	BD Biosciences
BD FAC <sup>TM</sup> Shutdown Solution	334224	BD Biosciences
BD <sup>TM</sup> FACSClean	340345	BD Biosciences
Bisbenzimid H	382061	Calbiochem <sup>®</sup>
Brij <sup>®</sup> O10	P6136	Sigma-Aldrich
Chloroform	3313.4	Carl Roth
Chloroquindiphosphat	C6628	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	C-7698	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.2	Carl Roth
dNTPs:		Qbiogene
dATP 100 mM	NTATP111	
dGTP 100 mM	NTGTP111	
dCTP 100 mM	NTCTP111	
dTTP 100 mM	NTTTP111	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich
Essigsäure 100%	3738.1	Carl Roth
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	K928.3	Roth
Formaldehyd 36,5%	F8775	Sigma-Aldrich
Glycin	3908.3	Carl Roth
Klarlack colour & go, Farbe: 101	4250587718386	essence
L-Arginin	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Canavanin	C1625	Sigma-Aldrich

Leupeptin	L2884	Sigma-Aldrich
L-Leucin	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysinmonohydrochlorid	L8662	Sigma-Aldrich
Methanol	8388.6	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	T9281	Sigma-Aldrich
Natriumazid	S-8032	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	S7920	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	S-6508	Sigma-Aldrich
Nuklease-freies Wasser	AM9932	Ambion®
Pepstatin	P5318	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626	Sigma-Aldrich
Ponceau S	5938.2	Carl Roth
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	1610376	Bio-Rad
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	1610380	Bio-Rad
Probenpuffer, Laemmli 2x Konzentrat	S3401	Sigma-Aldrich
QIAzol® Lysis Reagent	79306	QIAGEN Sciences
Rapamycin	R-5000	LC Laboratories®
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	3029.1	Carl Roth
Salzsäure rauchend 37%	4625.2	Carl Roth
Torin 1	S2827	Selleckchem
TRIS	4855.2	Carl Roth
Trypanblau Lösung, 0,4%	T8154	Sigma-Aldrich
Tunicamycin	T7765	Sigma-Aldrich
Tween® 20	9127.1	Carl Roth
Ziegenserum	CED-CL1200	CEDARLANE®
β-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth

### 3.1.2 Kits

Tabelle 3.2: Verwendete Kits

<b>Kit und seine Bestandteile</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller</b>
BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I: - 10x Annexin V Bindung Buffer - FITC Annexin V - Propidium Iodide Staining Solution	556547	BD Biosciences
DC™ Protein Assay Reagents Package: - DC™ Protein Assay Reagent A - DC™ Protein Assay Reagent B - DC™ Protein Assay Reagent S	5000116	Bio-Rad
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit: - 10x RT-Puffer - 10x RT Random Primers - 25x dNTP Mix (100 mM) - MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/μl) (EC-Nummer: 2.7.7.49)	4368813	Applied Biosystems™
OneTaq® DNA Polymerase: - 10x ThermoPol® Reaction Buffer - Taq DNA Polymerase (5000 units/ml) (EC-Nummer: 2.7.7.7)	M0267X	New England BioLabs® Inc.
Western Lightning® Plus-ECL: - Oxidizing Reagent Plus - Enhanced Luminol Reagent Plus	NEL103001EA	Perkin Elmer

### 3.1.3 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Tabelle 3.3: Verwendete Medien und Medienzusätze

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Fötale Kälberserum (FCS), dialysiert, hitzeinaktiviert	F0392	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	F7524	Sigma-Aldrich
L-Arginin, 100 mM	A-8094	Sigma-Aldrich
L-Glutamin Lösung, 200 mM	G7513	Sigma-Aldrich
L-Leucin, 100 mM	61819	Sigma-Aldrich
L-Lysinmonohydrochlorid, 100 mM	L8662	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Lösung, 10.000 Units Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin und Natriumhydrogencarbonat, ohne Arginin, Leucin, Lysin und Phenolrot	R1780	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Medium mit Natriumhydrogencarbonat, ohne L-Glutamin	R0883	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Medien

<b>Zellkulturmedium</b>	<b>Argininmangel-Medium</b>
RPMI-1640 Medium	RPMI-1640 Medium, ohne Arginin
10% FCS	10% FCS, dialysiert
1% L-Glutamin Lösung	1% L-Glutamin Lösung
1% Penicillin-Streptomycin Lösung	1% Penicillin-Streptomycin Lösung
	0,4% L-Leucin
	0,22% L-Lysinmonohydrochlorid



### 3.1.4 Lösungen und Puffer

Sofern es nicht anders angegeben ist, wurde als Lösungsmittel destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet.

Tabelle 3.5: Verwendete Lösungen und Puffer

<b>Lösung / Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer für Western Blot	5% Milchpulver in TBST
Blockierungspuffer für Western Blot (für phospho-Antikörper)	5% BSA in TBST 5% Ziegen Serum
Blottingpuffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20% Methanol
Lysepuffer zur Proteinextraktion	1% Brij <sup>®</sup> in 50 mM Tris/HCl, pH = 7,5 2,19 µM Pepstatin 2,34 µM Leupeptin 1 mM PMSF 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumorthovanadat
PBST	0,1% Tween <sup>®</sup> 20 in PBS
Ponceau S-Lösung	0,5% Ponceau S 1% Eisessig
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, pH = 6,8 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer, 10x	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1% SDS
Stripping-Puffer	2% SDS 6,25 mM Tris/HCl pH = 6,8 100 mM β-Mercaptoethanol
TBS, 10x	100 mM Tris/HCl, pH = 8 1,5 M NaCl
TBST	0,1% Tween <sup>®</sup> 20 in 1x TBS
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8 0,4% SDS
Trypanblau-Lösung	0,08% Trypanblau in 1x PBS

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primärantikörper für Western Blot (WB)-Analysen

Die beiden Antikörper gegen Caspase-3 und Cleaved Caspase-3 wurden in TBST mit 5% Milchpulver gelöst, wohingegen die restlichen Antikörper in TBST mit 5% BSA angesetzt wurden. Zu den Antikörperlösungen gegen p70 S6 Kinase und mTOR wurde zusätzlich 1% Natriumazid gegeben. Für die phosphorylierte Form eines Antigens wurde im Folgenden die Abkürzung p-Antigen verwendet.

Tabelle 3.6: Verwendete Primärantikörper in WB-Versuchen

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
4E-BP1	Kaninchen	1:4000	9644S	Cell Signaling
Akt (pan)	Kaninchen	1:2000	4691S	Cell Signaling
BAG3	Kaninchen	1:1000	10599-1-AP	proteintech®
Caspase-3	Kaninchen	1:2000	9662S	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3	Kaninchen	1:1000	9661S	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	1:5000	2118L	Cell Signaling
LC3 A/B	Kaninchen	1:1000	4108S	Cell Signaling
mTOR	Maus	1:1000	4517S	Cell Signaling
p62	Kaninchen	1:1000	5114S	Cell Signaling
p70 S6 Kinase	Maus	1:500	sc-8418	Santa Cruz
Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	9271S	Cell Signaling
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	Kaninchen	1:1000	2855S	Cell Signaling
Phospho-Akt (Thr308)	Kaninchen	1:1000	2965S	Cell Signaling
Phospho-mTOR (Ser2448)	Kaninchen	1:500	2971L	Cell Signaling
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Kaninchen	1:500	9234S	Cell Signaling
β-Tubulin	Kaninchen	1:2000	2146S	Cell Signaling

### 3.1.5.2 Primärantikörper für die Immunfluoreszenz (IF) - Färbung

Die beiden Antikörper wurden in 10% FCS gelöst.

Tabelle 3.7: Verwendete Primärantikörper für die IF-Färbung

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
p62	Kaninchen	1:200	5114S	Cell Signaling
Ubiquitin	Maus	1:200	sc-8017	Santa Cruz

### 3.1.5.3 Sekundärantikörper für WB-Analysen

Als Verdünnungspuffer wurde TBST mit 5% Milchpulver verwendet.

Tabelle 3.8: Verwendete Sekundärantikörper in WB-Versuchen

Sekundärantikörper	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:5000	7074S	Cell Signaling
Ziege Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	1:5000	sc-2005	Santa Cruz

### 3.1.5.4 Sekundärantikörper für die IF-Färbung

Die Antikörper wurden in 10% FCS gelöst.

Tabelle 3.9: Verwendete Sekundärantikörper für die IF-Färbung

Sekundärantikörper	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:200	711-165-152	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Cy <sup>TM</sup> 5 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG (H+L)	1:200	715-175-151	Jackson ImmunoResearch Laboratories

### 3.1.6 Primer und Sonden

Tabelle 3.10: Verwendete Primer und Sonden

<b>Bezeichnung Primer / Sonde</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
CHOP_ss	GAC CTG CAA GAG GTC CTG TC
CHOP_as	CTC CTC CTC AGT CAG CCA AG
CHOP_probe	[FAM] C ACC ACT CTT GAC CCT GCT T [TAMRA]
GAPDH_ss	AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT G
GAPDH_as	CAC GAT ACC AAA GTT GTC ATG GA
GAPDH_Taq	[FAM] C TGC AAC ACC TGC TTA GCA CCC [TAMRA]

Die TaqMan-Sonden und Primer für die quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) stammen von der Firma Eurofins Genomics. Die Sonden wurden am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter und mit 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher am 3'-Ende markiert.

Für die cDNA-Synthese wurden Random Primers der Firma Applied Biosystems™ (Tabelle 3.2) verwendet.

### 3.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.11: Verwendetes Verbrauchsmaterial

<b>Artikel</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller</b>
15 ml-Röhrchen	188271	greiner Bio-One
50 ml-Röhrchen	227261	
6-Well-Platte	657160	greiner Bio-One
24-Well-Platte	662160	
96 Fast PCR-Platte Halbrand	72.1981.202	Sarstedt
96 Well ELISA Microplates	655101	greiner Bio-One
96-Well-Platte, F-bottom	655180	greiner Bio-One
96-Well-Platte, U-bottom	650180	greiner Bio-One
Combitips advanced® 2,5 ml	0030089448	eppendorf
Combitips advanced® 10 ml	0030089464	
Deckgläser	631-1577	VWR™
DMSO-sichere Acrodisc® Syringe	4433	PALL

Filter		
Eppendorf Tubes® 5,0 ml	0030119.460	eppendorf
1,5 ml-Reaktionsgefäße	616201	greiner Bio-One
FACS-Röhrchen 5 ml	352008	FALCON®
Faltenfilter	4.303.240	Filtrak
Glasstic® Slide 10 mit Gitternetz zum Zählen	87144	Kova International Inc.
Klebefolie, klar	95.1994	Sarstedt
Kryovials Cryo.s™	122279	greiner Bio-One
Laboratory Film	PM-996	Parafilm®
Messpipette		greiner Bio-One
2 ml	710160	
5 ml	606180	
10 ml	607180	
25 ml	760180	
50 ml	768180	
Objekträger	J1800AMNZ	Thermo Scientific
Pipettenspitze		
10 µl	70.1130	Sarstedt
200 µl	70.760.012	Sarstedt
1000 µl	S1111-6001	Starlab
Protran™ Pure Nitrocellulose Membrane 0,2 Micron	NBA083C001EA	Perkin Elmer
Rotilabo®-Abdeckfolien für Mikrottestplatten	EN76.1	Carl Roth
SAPPHIRE PCR 8-Tube Strips	608281	greiner Bio-One
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0,2	83.1826.001	Sarstedt
Tuberkulin-Spritze	9166017V	BRAUN
20 ml Spritze BD Discardit™ II	300296	BD Biosciences
50 ml Spritze BD Plastipak™	300866	BD Biosciences
Whatman 3 mm CHR	3030-917	CE Healthcare Life Sciences
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	658175	greiner Bio-One
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	690170	

## 3.1.8 Geräte

Tabelle 3.12: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAHD	Köttermann
Blottingkammer groß	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Blottingkammer klein	Mini Trans-Blot® Cell	
ChemiDoc™ MP Imaging System	Universal Hood III	Bio-Rad
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ II	BD Biosciences
Einkanalpipetten	Pipetman Ergonomic High-Performance Transferpette® S Research	Gilson VWR BRAND eppendorf
Eismaschine	AF 10	Scotsman
Energieversorgung für Blotting-Kammer für Gelelektrophorese	PowerPac™ HC PowerPac™ 3000	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer groß	45-2020	PEQLAB
Gelelektrophoresekammer klein	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
Gerät für RT	GeneTouch TC-E-48DA	BIOER
Gerät für qRT-PCR	QuantStudio 3	appliedbiosystems
Heizblock	ThermoStat plus 1,5 ml	eppendorf
Inkubator	Function Line BB16	Heraeus
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM)	Zeiss 710	Zeiss
Kreisschüttler	KS 501 digital	IKA®
Kreisschüttler (Kühlraum)	KS 250 basic	IKA®
Thermoschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Rotator	SB3	stuart®
Kühl- und Gefrierschränke +8°C	Liebherr profi line	Liebherr
-20°C	Liebherr Premium	Liebherr

-80°C -180°C	Premium NoFrost U570 HEF® 24K	Liebherr New Brunswick Taylor-Wharton
Lichtmikroskop	AE2000	Motic
Magnetrührer	RH basic 2 MR 3001 K VMS-A	IKA® Heidolph VWR
Microplate Reader	MRXc	DYNEX Technologies
Mikrovolumen- Spektrophotometer	NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific
Millipore-Wasseraufbereitung	PURELAB Ultra	ELGA
Multipipette	Multipette® M4 HandyStep	eppendorf BRAND
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Pipettierhilfe	Pipetboy acu Pipetboy 2	Integra
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS 18	Heraeus
Tank für flüssigen Stickstoff	XL-160	Taylor-Wharton
Tischzentrifuge	3722L SPROUT™ GMC 060	Fisher Scientific Fisher Scientific LMS
Vortexer	TopMix FB15024 Vortex-Genie 2 REAX 2000 Vortex Genius 3 Vortex-Genie® 2 T SI-T256	Fisher Scientific Scientific Industries Heidolph IKA® Scientific Industries
Waage Feinwaage	L2200S ABJ 320-4NM	Sartorius KERN & Sohn
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge groß Zentrifuge klein	Heraeus Megafuge 40R Centrifuge 5417 R Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Fisher Scientific eppendorf Thermo Electron Corporation

### 3.1.9 Zelllinien

Tabelle 3.13: Eingesetzte Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Ursprung, Diagnose</b>	<b>Herkunft</b>
FD50-NL1	Knochenmark, Primäre Plasmazelleukämie	neu etablierte Zelllinie Prof. Dr. med. Markus Munder, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz
NCI-H929	Pleuraerguss, Multiples Myelom	Prof. Dr. med. Michael Hundemer, Med. Klinik V, Universitätsklinikum Heidelberg
U266B1	Peripheres Blut, Multiples Myelom	Prof. Dr. med. Martin Gramatzki, Med. Klinik III, Universitätsklinikum Erlangen

Die Zelllinie NCI-H929 wurde von Eva Amann (AG Theobald, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz) mit humanem HLA-A2.1 transfiziert.

Nachfolgend werden die FD50-NL1 als FD50 bezeichnet, die NCI-H929 mit stabiler Expression von HLA-A2.1 mit NCI A2 und die U266B1 mit U266 abgekürzt.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Zellkultur

Bei den drei eingesetzten Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen. Daher wurden sie in Flüssigkulturmedium (Tabelle 3.4) bei konstant 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sie wurden zwei Mal pro Woche gesplittet: die NCI A2-Zellen im Verhältnis 1:10, die FD50- und die U266-Zellen jeweils im Verhältnis 1:5. Das Zellkulturmedium wurde dafür zuvor auf 37°C erwärmt.

Grundsätzlich wurden alle Maßnahmen in Verbindung mit der Zellkultur unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die dafür nötigen Materialien und Chemikalien wurden entweder steril bezogen oder vor Zugabe durch entsprechende Filter sterilfiltriert.

#### 3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, wurden sie in FCS mit 10% DMSO aufgenommen und anschließend in Kryovials überführt. Diese wurden erst bei -80°C für zwei Wochen eingefroren und danach langfristig bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei Bedarf wurde ein Kryovial bei 37°C wieder aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in die fünffache Menge an Kulturmedium gegeben, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in frischem Medium unter Standardbedingungen (Kapitel 3.2.1.1) inkubiert.

### 3.2.2 Allgemeine Versuchsvorbereitung

#### 3.2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl an vitalen Zellen zu ermitteln, wurden 50 µl Trypanblau-Lösung (Tabelle 3.5) mit 50 µl Zellsuspension vermischt. Davon wurden 10 µl in eine Zählkammer des Glasstic® Slides überführt. Trypanblau kann die intakte Zellmembran nicht passieren, daher wurden nur defekte, tote Zellen blau gefärbt. Grundsätzlich wurden immer die nicht eingefärbten Zellen dreier diagonal zueinander liegenden Felder der 9-Felder-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Der sich ergebende Mittelwert wurde verdoppelt und mit 10<sup>4</sup> (Kammerkonstante gemäß Hersteller) multipliziert. Dies ergab die Lebendzellzahl pro Milliliter.

### 3.2.2.2 Versuchsansatz

Einen Tag vor dem Ansetzen des Versuchs wurde das Kulturmedium der für den Versuch eingeplanten Zellen erneuert, um den Einfluss von möglicherweise entstandenen Mangelzuständen im Kulturmedium auf die Viabilität der Zellen zu verhindern. Dazu wurde die gesamte Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das überstehende Kulturmedium wurde abgenommen. Das verbleibende Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und zurück in die Zellkulturflasche überführt.

Entsprechend der benötigten Zellzahl wurde für den Versuchsansatz eine 6-Well- oder 24-Well-Platte gewählt, sodass jeweils 1,3 Mio. Zellen in einem Milliliter Medium inkubiert werden konnten. Grundsätzlich wurde für die Versuche Arginin-freies Medium (Tabelle 3.4) verwendet. Je nach Inkubationsbedingung wurden weitere Zusätze hinzugegeben. Wenn dies in der jeweiligen Versuchsbeschreibung nicht anders angegeben ist, erfolgte die Zugabe in den Konzentrationen von Tabelle 3.14.

Tabelle 3.14: Konzentrationen häufig eingesetzter Zusätze

Zusatz	Endkonzentration	Stockkonzentration	Lösungsmittel
Afuresertib (Afu)	1 $\mu$ M	1 mM	DMSO
Akti-1/2 (Akt Inhibitor VIII)	500 nM - 40 $\mu$ M	10 mM	DMSO
Chloroquin (CQ)	50 $\mu$ M	10 mM	dH <sub>2</sub> O
Cycloheximid	1 - 200 $\mu$ M	10 mM	dH <sub>2</sub> O
L-Arginin (Arg)	1 mM	100 mM	dH <sub>2</sub> O
L-Canavanin (Can)	100 $\mu$ M	100 mM	dH <sub>2</sub> O
Rapamycin (Rapa)	500 nM	500 $\mu$ M	DMSO
Torin 1 (Tor)	500 nM	500 $\mu$ M	DMSO
Tunicamycin (TM)	10 $\mu$ l/ml	1 mg/ml	DMSO

Die Inhibitoren Torin 1 und Afuresertib und der ER-Stress-Induktor Tunicamycin waren in DMSO gelöst. Um potenzielle Effekte des DMSO auszuschließen, wurden die Zellen zum Vergleich jeweils unter einer Kontrollbedingung mit der entsprechenden DMSO-Konzentration, jedoch ohne Inhibitor, inkubiert. Diese wird im Folgenden als DMSO-Kontrolle bezeichnet.

Für Versuchsbedingungen mit Rapamycin erfolgte vor Beginn der eigentlichen Inkubationszeit noch ein Zwischenschritt. Der Empfehlung des Herstellers folgend, wurden diese Zellen zunächst 4,5 h in Zellkulturmedium (Tabelle 3.4) mit der entsprechenden Rapamycin-Dosis vorinkubiert.

Je nach für den Versuch benötigter Gesamtzellzahl und der bestimmten Lebendzellzahl pro Milliliter wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche entnommen. Dies wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das überstehende Medium wurde abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 50 µl/Well Arginin-freiem Medium resuspendiert und gleichmäßig auf die vorbereiteten Wells verteilt.

### **3.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.3.1 Isolierung von Proteinen**

Der Versuchsansatz erfolgte mit jeweils 3 x 1,3 Mio. Zellen pro Inkubationsbedingung (Kapitel 3.2.2.2). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einer Versuchsbedingung in jeweils ein 15 ml-Röhrchen pipettiert. Diese wurden 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das überschüssige Medium wurde entfernt. Das Zellpellet wurde mit einem Milliliter PBS in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 3 min bei 1800 rpm zentrifugiert und noch ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer (Tabelle 3.5) resuspendiert und konnte anschließend für einen längeren Zeitraum bei -20°C eingefroren werden.

Nach dem Auftauen wurden die Proben für 5 s gevortext und dann für 10 min auf Eis gelagert. Dies wurde noch zweimal wiederholt, um die Zellen vollständig zu lysieren. Danach wurden sie bei 4°C für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die isolierten Proteine enthielt, wurde in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben.

#### **3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteine wurden mit Hilfe des DC™ Protein Assay Reagents Package (Tabelle 3.2) quantitativ bestimmt. Grundlage dieser photometrischen Messung ist das sogenannte Lowry Assay: Kupferionen in Reagenz A werden durch das in der Probe enthaltene Protein reduziert. Diese sind dann wiederum in der Lage das Folin-

Reagenz (Reagenz B) zu reduzieren, wodurch sich eine Blaufärbung ergibt.

Um die Proteinkonzentrationen abzuschätzen, wurde eine Standardreihe in folgenden Konzentrationen an Albumin Fraktion V (BSA), jeweils mit Lysepuffer verdünnt, angelegt: 4000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml. Als Null-Wert diente reiner Lysepuffer. In ein Well einer 96-Well-Platte wurden 5 µl der einzelnen Standardkonzentrationen, jeweils als Doppelansatz, gegeben. Von den Proben wurden ebenfalls 5 µl in ein Well, jeweils als Dreifachansatz, pipettiert. Außerdem erfolgte die Zugabe von 25 µl Reagenz S und A im Verhältnis 1:50 und von 200 µl Reagenz B pro Well.

Nach 10 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Extinktion der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 690 nm im Microplate Reader MRX<sub>c</sub> gemessen. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mit dem Programm DYNEX Revelation G 3.2 bestimmt, mit dem auch der Microplate Reader bedient wurde: Das Programm berechnet die Proteinkonzentrationen anhand der Standardkurve, die sich aus den Extinktionswerten bei den bekannten Konzentrationen der Standardreihe ergibt.

#### **3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Zum Gießen des Gels wurden zunächst zwei Glasplatten mit ihren Spacern in eine Halterung gespannt. Das Trenngel (Tabelle 3.15) wurde zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit Isopropanol bedeckt. Für eine optimale Auftrennung wurde für kleine Proteine ein höherer Prozentsatz an Acrylamid und damit ein feinporigeres Gel gewählt. Nach 30 min wurde das Isopropanol mit destilliertem Wasser abgespült. Dann wurde das Sammelgel (Tabelle 3.15) über das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Bildung der Geltaschen eingesetzt. Für die kleine Gelelektrophoresekammer wurden 15 ml Trenngel und 5 ml Sammelgel und für die große Gelelektrophoresekammer 50 ml Trenngel und 10 ml Sammelgel benötigt. Nach mindestens 30 min Wartezeit zum Auspolymerisieren wurde die Gelelektrophoresekammer zusammengesetzt, mit 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 3.5) gefüllt und der Kamm entfernt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens und lagert sich an die Proteine an. Es sorgt für eine stark negative Ladung der Proteine, sodass deren eigentliche Nettoladung überdeckt wird. Zusätzlich sind die positiven Ladungen im basischen pH-Wert des Trenngels reduziert.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der Gele (jeweils 10 ml)

<b>Komponenten</b>	<b>10% Trenngel</b>	<b>12% Trenngel</b>	<b>15% Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
dH <sub>2</sub> O	4 ml	3,5 ml	2,3 ml	6,1 ml
Trenngel- / Sammelgel-Puffer	2,6 ml	2,5 ml	2,6 ml	2,5 ml
Acrylamidstammlösung, 30%	3,3 ml	4 ml	5 ml	1,3 ml
APS, 10%	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	7 µl	4 µl	10 µl

Jede Geltasche wird am Ende mit 20 µg Protein beladen. Das entsprechende Volumen, welches sich anhand der Proteinkonzentration (Kapitel 3.2.3.2) ergab, wurde mit dem gleichen Volumen an 2x Laemmli-Probenpuffer verdünnt. Dieser enthält SDS und Dithiothreitol (DTT), was in der Lage ist Disulfid-Bindungen zu lösen. Die Protein-Proben wurden dann für 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

Von dem Proteinstandard Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards zur Abschätzung der Proteingröße wurden bei einem großen Gel 10 µl und bei einem kleinen Gel 5 µl eingesetzt. Nach Anlegen einer Spannung von 80 V wanderten die negativ geladenen Proteine innerhalb des Gels in Richtung positiv geladener Anode. Nachdem die Lauffront das Sammelgel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Kleine Proteine passierten das Gel schneller, sodass sich eine Auftrennung nach der Größe ergab. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

#### 3.2.3.4 Western Blot (WB)

Nachdem die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt worden sind, wurden sie mittels Western Blot von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden in der Klemmkassette einer Blotting-Kammer, die sich in einer mit Blottingpuffer (Tabelle 3.5) gefüllten Metallwanne befand, folgende Komponenten übereinandergeschichtet: ein Schwamm, 3 Lagen Whatman-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das Gel und erneut 3 Whatman-Papiere und ein Schwamm. Für einen optimalen Protein-Transfer sollten zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen sein. Danach wurde die Kassette in eine mit Blottingpuffer gefüllte Blotting-Kammer eingesetzt. Das Blotten erfolgte bei 40 V über Nacht bei 4°C im Kühlraum.

Nach dem Blotten wurden die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung (Tabelle 3.5) rot angefärbt, um die Qualität des Proteintransfers zu

kontrollieren. Der Farbstoff wurde mit destilliertem Wasser gewegewaschen. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST (Tabelle 3.5) gewaschen und für eine Stunde in Blockierungspuffer (Tabelle 3.5) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, bevor sie erneut dreimal für 10 min in TBST gewaschen wurde.

#### 3.2.3.5 Detektion von Proteinen

Um die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran nachzuweisen, wurde diese über Nacht bei 4°C im Kühlraum in einer spezifischen Primärantikörperlösung (Tabelle 3.6) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal 10 min in TBST gewaschen und der Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 3.8) hinzugegeben. Außerdem wurde noch Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate in einer Verdünnung von 1:4000 hinzugefügt, welches an die Proteine des Proteinstandards bindet. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal 10 min in TBS gewaschen.

Nach dem Auftragen von Western Lightning® Plus-ECL (Tabelle 3.2) im Verhältnis 1:1 auf die Membran kam es zu einer Chemilumineszenz-Reaktion. Durch das Enzym Meerrettichperoxidase wird die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Dabei wird Energie in Form von Licht, proportional zur Menge des vorhandenen Proteins, abgegeben. Dieses Lichtsignal wird vom ChemiDoc™ MP Imaging System mit Hilfe der Image Lab™ Software, Version 5.0, detektiert. Die Belichtungszeit richtet sich nach dem zu detektierenden Protein. Die quantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mit ImageJ 1.50i.

Für die Bestimmung des sogenannten autophagischen Fluxes wurden die Zellen unter den gewünschten Inkubationsbedingungen und zusätzlich noch einmal unter diesen mit Chloroquin-Supplementation inkubiert. Der autophagische Flux ergibt sich als die Differenz aus der Expression von LC3A/B-II (im Verhältnis zu GAPDH) unter der jeweiligen Bedingung mit Chloroquin und der LC3A/B-II-Expression (im Verhältnis zu GAPDH) unter der entsprechenden Bedingung ohne Chloroquin zum gleichen Zeitpunkt (Klionsky et al., 2021).

### 3.2.3.6 Strippen von Western Blot-Membranen

Durch das sogenannte Strippen der Western Blot-Membranen werden schon an diese gebundene Primär- und Sekundärantikörper entfernt und die Nitrocellulose-Membran kann einer erneuten Detektion mit Antikörpern unterzogen werden. Dafür wurde die Membran nach dem Entwickeln in Stripping-Puffer (Tabelle 3.5) bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Das im Stripping-Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol löst als starkes Reduktionsmittel Disulfid-Bindungen. In Kombination mit dem Detergens SDS und der hohen Temperatur führt dies zur Denaturierung der Antikörper, die nicht mehr an das Antigen binden können. Nach 30 min wurde die Membran mehrmals in TBST gewaschen, bis der Schwefelgeruch verschwunden war. Anschließend wurde sie erneut mit Blockierungspuffer inkubiert und so weiter behandelt, wie in Kapitel 3.2.3.5 geschildert.

### 3.2.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS: fluorescence-activated cell sorting) können einzelne Zellen hinsichtlich unterschiedlicher Eigenschaften analysiert und dadurch quantitative Aussagen über die Zusammensetzung einer Zellprobe getroffen werden. Dazu werden in einer Flüssigkeitskapillare kontinuierlich Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das dabei entstehende Streulicht wird von einem Detektor registriert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC: Forward Scatter) wird durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC: Sideward Scatter) durch die Zellgranularität, bestimmt. Außerdem können verschiedene Fluoreszenzsignale gemessen werden. Das Fluorochrom kann an einen Antikörper oder an ein Protein, wie z. B. FITC Annexin V, gekoppelt sein. Annexin V ist ein Apoptose-Marker. Es bindet an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, welches nur bei apoptotischen Zellen in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran vorkommt. Ein Fluorochrom kann aber auch, wie im Falle von Propidiumiodid (PI), in die DNA interkalieren. PI kann nur poröse Zellmembranen bereits toter Zellen überwinden und ist daher ein Marker für Zelltod. Viable Zellen sind folglich Annexin- und PI-negativ.

Der Versuchsansatz erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, mit jeweils 1,3 Mio. Zellen pro Inkubationsbedingung. In Vorbereitung auf die spätere Messung wurden nach Ablauf der Inkubationszeit je Inkubationsbedingung 300  $\mu$ l Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen für die ungefärbte Probe und 300  $\mu$ l in ein weiteres Röhrchen für die spätere Färbung geerntet. Außerdem wurde pro FACS-Röhrchen ein Milliliter PBS



hinzugegeben. Nach 3 min Zentrifugieren bei 1700 rpm wurde der Überstand verworfen, erneut ein Milliliter PBS pro FACS-Röhrchen hinzugefügt und die Proben wurden nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und nur in die Röhrchen für die Färbung wurden jeweils 2 µl PI bzw. 4 µl FITC Annexin V pipettiert. Nach 15 min Inkubationszeit im Dunkeln wurden noch jeweils 400 µl 1x Annexin V Binding Buffer hinzugegeben. Die Proben wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers BD FACSCanto™ II und der BD FACSDiva™ Software analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte im Anschluss mit FlowJo™ v10.3.

#### 3.2.5 Konfokal-Mikroskopie

Im ersten Schritt erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung. Zelluläre Proteine wurden mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Im Anschluss wurden die Zellpräparate mit dem Laserstrahl eines Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (KLSM) punktweise abgefahren. Die emittierten Fluoreszenzsignale genau eines Fokuspunktes wurden detektiert und als digitale Bildpunkte aufgenommen. Diese Einzelpixel ergaben das Gesamtbild des Präparats.

Der Versuchsansatz wurde analog Kapitel 3.2.2.2, mit jeweils 7,5 x 1,3 Mio. Zellen pro Inkubationsbedingung, durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die gesamte Zellsuspension einer Inkubationsbedingung in ein 15 ml-Röhrchen pipettiert und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem Milliliter PBS in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 360 µl PBS resuspendiert und 40 µl 36,5% Formaldehyd, entsprechend einer Endkonzentration von circa 4%, zur Zellfixation hinzugegeben. Nach 8 min Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Sie konnten so für einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

Um die Permeabilität der Zellmembran für die Antikörper zu erhöhen, wurden 500 µl 90% Methanol pro Reaktionsgefäß für 6 min hinzugegeben. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µl PBST (Tabelle 3.5) in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und nochmals zentrifugiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden für eine Stunde mit 500 µl 10% FCS pro Reaktionsgefäß im Thermomixer bei 900 rpm blockiert. Nach erneutem Zentrifugieren



wurde die Blockierungslösung verworfen. Über Nacht wurden die Zellen mit 250 µl Primärantikörperlösung (Tabelle 3.7) pro Reaktionsgefäß bei 4°C im Kühlraum auf einem Rotator bei 40 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBST gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit 250 µl Sekundärantikörperlösung (Tabelle 3.9) pro Reaktionsgefäß im Thermomixer bei 900 rpm im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Diese Sekundärantikörper waren mit den Fluorochromen Cy<sup>TM</sup>3 bzw. Cy<sup>TM</sup>5 gekoppelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert und die Antikörperlösung wurde verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden 250 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid H in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden darin für 10 min im Dunkeln inkubiert, um die DNA zu markieren. Anschließend wurden sie dreimal mit PBST gewaschen.

Das verbleibende Zellpellet wurde in 14 µl Antifade (bereitgestellt von AG Behl (Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) nach eigenem Rezept) resuspendiert und davon wurde ein einzelner Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Ein Deckglas wurde aufgedrückt und seine Seiten mit Klarlack versiegelt. Die Präparate wurden bis zur Analyse mit dem KLSM im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Einzelne Ausschnitte der Präparate wurden mit dem KLSM Zeiss 710 aufgenommen. Dabei wurde der Ausschnitt mit einem Laserstrahl in der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Fluorochroms, entsprechend ein Kanal, abgefahren. Anhand der Fluoreszenzstärke wurde mit Hilfe des Programms ZEN, Version 2, eine Aufnahme aus Falschfarben konstruiert. Die erhaltenen Falschfarben-Bilder konnten im Anschluss über ImageJ 1.50i geöffnet und das Falschfarben-Bild eines Kanals einer beliebigen Farbe zugeordnet werden.

## **3.2.6 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.6.1 Isolierung von RNA**

Der Versuchsansatz und die Zellernte erfolgten mit 3 x 1,3 Mio. Zellen pro Inkubationsbedingung entsprechend Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.3.1. Der einzige Unterschied war, dass das verbleibende Zellpellet zum Schluss in einem Milliliter Phenol-haltigen QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent, statt in Lysepuffer, resuspendiert wurde. Die Proben konnten nach diesem Schritt für einen längeren Zeitraum bei -20°C eingefroren

werden.

Vor der weiteren Verarbeitung mussten die Proben vollständig aufgetaut werden. Das im QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent enthaltene Guanidinthiocyanat lysiert die Zellen und denaturiert gleichzeitig RNasen und andere Enzyme. In dem Phenol lösen sich die Proteine und ein Teil der DNA. Des Weiteren wurden den Proben 200 µl Chloroform zugegeben. Sie wurden für 15 s gevortext, bis sich die zwei Phasen vermischt hatten und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 rpm erfolgte die Phasentrennung in drei Phasen: Die untere, organische Phase enthielt die Proteine, die Interphase die DNA und die obere, wässrige Phase die RNA. Von der oberen Phase wurden 500 µl in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 500 µl Isopropanol pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei -20°C gelagert, sodass die RNA ausfällen konnte. Am nächsten Tag wurden die Proben aus dem Gefrierschrank entnommen und direkt 15 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene RNA-Pellet wurde in einem Milliliter 70% Ethanol absolut gelöst und erneut 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde das RNA-Pellet 15 min an der Luft getrocknet und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Grundsätzlich wurden alle RNA-Proben auf Eis gelagert.

#### **3.2.6.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem Mikrovolumen-Spektrophotometer NanoDrop<sup>™</sup> One ermittelt. Es misst die Absorption von UV-Licht durch 1,5 µl der Probe, welche von der Art und Konzentration des gelösten Stoffes abhängig ist. RNA absorbiert Licht einer Wellenlänge von 260 nm. Ebenfalls konnten Proteinverunreinigungen bei einer Wellenlänge von 280 nm und bei 230 nm Kontaminationen durch Phenole und Polysaccharide bestimmt werden.

#### **3.2.6.3 Reverse Transkription (RT)**

Für die Synthese der complementary DNA (cDNA) mittels Reverser Transkription wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Tabelle 3.2) verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl Mastermix (Tabelle 3.16) und 10 µl der auf 50 ng/µl verdünnten RNA in ein Tube der 8-Tube Strips pipettiert. Die RT lief im GeneTouch TC-E-48DA nach dem Programm aus Tabelle 3.17 ab. Dabei lagerten sich Random Primers an die isolierte RNA an. Sie garantierten, dass die gesamte RNA in cDNA

umgeschrieben wurde. Dies geschah mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Tabelle 3.16: Mastermix für die RT (pro Reaktionsansatz)

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
Nuklease-freies Wasser	4,7
10x RT-Puffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2
MultiScribe <sup>®</sup> Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu$ l)	0,5

Tabelle 3.17: Programmablauf der Reversen Transkription

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
Anlagerung der Primer	25	10
Reverse Transkription	37	120
Inaktivierung der RT	85	5
Kühlung	8	$\infty$

#### 3.2.6.4 Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen real-time-PCR können Abschnitte der gewonnenen cDNA selektiv quantifiziert und dadurch die Genexpression der Zellen bestimmt werden. Grundlage dieser Methode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR), welche der Amplifikation von DNA-Sequenzen dient. Dafür wird zunächst die doppelsträngige DNA denaturiert, sodass sich die Primer anlagern können. Danach folgt deren Elongation durch die Taq-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Um die gewünschten DNA-Abschnitte zu quantifizieren, wird bei der qRT-PCR, neben den beiden Primern, auch eine Sonde angelagert. Diese TaqMan-Sonde besitzt am 5'-Ende 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter und am 3'-Ende 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher. Die Fluoreszenz des Reporters wird bei intakter Sonde durch den dazugehörigen Quencher unterdrückt. Die Sonde wird während des PCR-Zyklus ausgehend vom 5'-Ende durch die Taq-Polymerase, die ebenfalls als 5'-3'-Exonuklease agiert, abgebaut. Dadurch wird der Reporter vom Quencher entfernt und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann von Detektoren am Ende eines jeden Elongationszyklus gemessen werden. Anhand des Signals wird die Genexpression nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak berechnet.

Für die qRT-PCR wurde die OneTaq® DNA Polymerase (Tabelle 3.2) verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 23 µl Mastermix (Tabelle 3.18) und 2 µl cDNA in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Abhängig von dem zu untersuchenden Gen enthielt der Mastermix die entsprechenden Primer und die dazugehörige Sonde (Tabelle 3.10). Die Wellplatte wurde mit einer Klebefolie versiegelt und in das Analyse-Gerät QuantStudio 3 eingesetzt. Die anschließende qRT-PCR lief nach dem Programm aus Tabelle 3.19 ab. Über Thermo Fisher Connect konnten die Ergebnisse der qRT-PCR im Anschluss abgerufen werden.

Tabelle 3.18: Mastermix für die qRT-PCR (pro Reaktionsansatz)

Komponente	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	14,4
10x ThermoPol® Reaction Buffer	2,5
dNTP Mix (10 mM)	1
Primer forward (10 pmol/µl)	2
Primer reverse (10 pmol/µl)	2
Sonde (10 pmol/µl)	1
Taq DNA Polymerase (5000 units/ml)	0,125

Tabelle 3.19: Programmablauf der qRT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	94	0,25	45
Anlagerung der Primer und Elongation	60	1	
Kühlung	4	∞	1

### 3.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9, GraphPad Software, San Diego. Aussagen über die statistische Signifikanz eines Ergebnisses wurden mittels one-way ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) und Sidak-Korrektur getroffen. Ab einem Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$  wurde ein Test als signifikant bezeichnet. In Tabelle 3.20 sind die berücksichtigten Signifikanzniveaus dargestellt. Ergebnisse, für die in den Diagrammen kein Signifikanzniveau angegeben wurde, sind laut statistischer Analyse nicht signifikant (ns). Der Wert „n“ gibt die Anzahl der unabhängigen Versuche an.

**Tabelle 3.20: Signifikanzniveaus**

Symbol	Beschreibung	p-Wert
***	hoch signifikant	< 0,001
**	sehr signifikant	0,001 – 0,01
*	signifikant	0,01 – 0,05
ns	nicht signifikant	≥ 0,05

In den Versuchen, in denen das Lösungsmittel des Inhibitors DMSO war, wurden zunächst die DMSO-Kontrollen betrachtet (Tabelle 3.21). Ergab die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied, erfolgte die Auswertung der eigentlichen Versuchsbedingungen nach Tabelle 3.22, Tabelle 3.23, Tabelle 3.24 oder Tabelle 3.25. Welche Tabelle zur Anwendung kommt, ist beim jeweiligen Diagramm vermerkt.

**Tabelle 3.21: DMSO-Kontrollen (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte)**

Vergleichsbedingung A	Vergleichsbedingung B
+Arg	+Arg +DMSO
-Arg +Can	-Arg +Can +DMSO

**Tabelle 3.22: Vergleichsbedingungen I (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte)**

Inkubationsbedingung A	Inkubationsbedingung B
+Arg	+Arg +Can
+Arg	-Arg
+Arg	-Arg +Can
+Arg +Can	-Arg +Can
-Arg	-Arg +Can

Tabelle 3.23: Vergleichsbedingungen II (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte)

Inkubationsbedingung A	Inkubationsbedingung B
+Arg	+Arg +Tor/+Afu
+Arg	-Arg +Can
+Arg	-Arg +Can +Tor/+Afu
+Arg +Tor/+Afu	-Arg +Can +Tor/+Afu
-Arg +Can	-Arg +Can +Tor/+Afu

Tabelle 3.24: Vergleichsbedingungen III (jeweils für 4 h und 8 h)

Inkubationsbedingung A	Inkubationsbedingung B
+Arg	+Arg +Can
+Arg	+Arg +TM/+Tor/+Afu
+Arg	-Arg
+Arg	-Arg +Can
+Arg	-Arg +Can +TM/+Tor/+Afu
+Arg +Can	-Arg +Can
+Arg +TM/+Tor/+Afu	-Arg +Can +TM/+Tor/+Afu
-Arg	-Arg +Can
-Arg	-Arg +Can +TM/+Tor/+Afu
-Arg +Can	-Arg +Can +TM/+Tor/+Afu

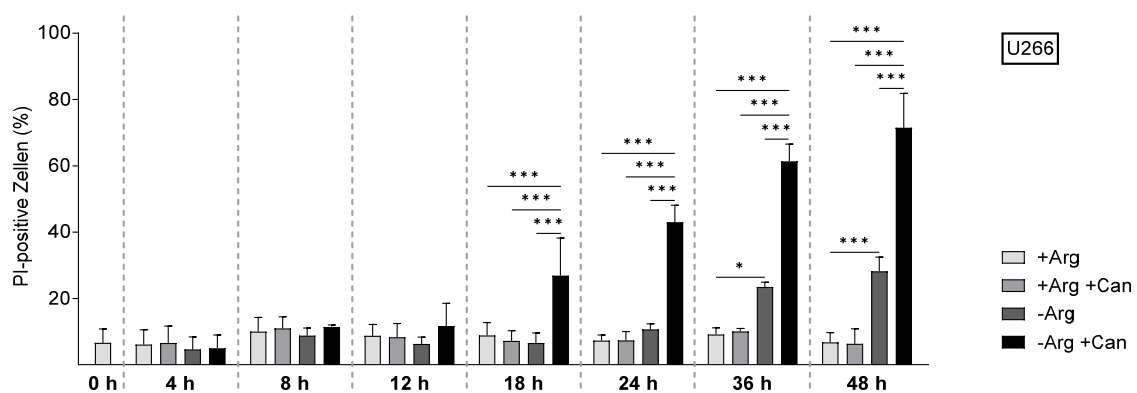
Tabelle 3.25: Vergleichsbedingungen IV (jeweils für die untersuchten Zeitpunkte)

Inkubationsbedingung A	Inkubationsbedingung B
+Arg	+Arg +Tor +Afu
+Arg	-Arg +Can
+Arg	-Arg +Can +Tor +Afu
+Arg +Tor	+Arg +Tor +Afu
+Arg +Afu	+Arg +Tor +Afu
+Arg +Tor +Afu	-Arg +Can +Tor +Afu
-Arg +Can	-Arg +Can +Tor +Afu
-Arg +Can +Tor	-Arg +Can +Tor +Afu
-Arg +Can +Afu	-Arg +Can +Tor +Afu

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Wirkt die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation zytotoxisch?

Der Einfluss der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin auf die Viabilität der U266-Myelomzellen wurde in einer durchflusszytometrischen Messung analysiert. Dazu wurden die Zellen über 48 Stunden unter Argininmangel und 100  $\mu$ M Canavanin und zum Vergleich unter alleiniger Arginindepletion und unter 1 mM Arginin mit und ohne Canavanin-Supplementation inkubiert. Nach 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden wurde jeweils der Anteil Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen bestimmt.



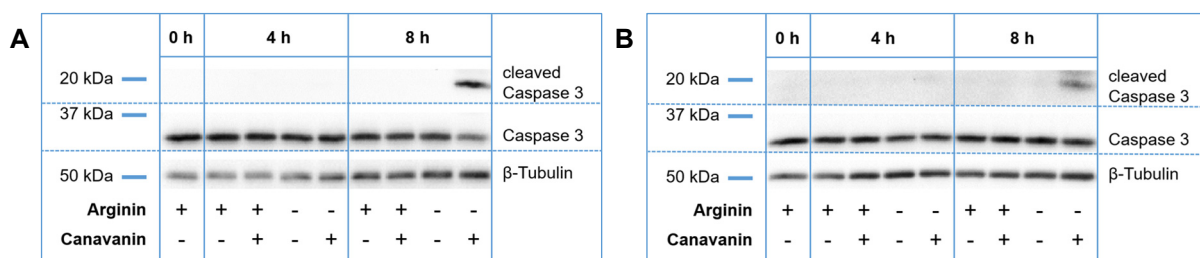
**Abbildung 4.1: Wirkung von Argininmangel und Canavanin-Supplementation auf die Viabilität der U266-Zellen.** U266-Myelomzellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg) und 100  $\mu$ M Canavanin (Can) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an PI-positiven Zellen gemessen. Die Säulen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.22. n = 3.

Innerhalb der ersten 12 Stunden war noch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationsbedingungen festzustellen (Abbildung 4.1). Innerhalb der ersten 18 Stunden lag der mittlere Anteil an PI-positiven Zellen für alle sonstigen Bedingungen unter 12%. Für die Zellen unter Argininmangel und Canavanin zeigte sich nach 18 Stunden erstmals eine deutliche Differenz. Darunter betrug der Anteil an PI-positiven, nicht mehr viablen Zellen  $26,9 \pm 11,4\%$  und unterschied sich damit signifikant von den anderen Inkubationsbedingungen. Dieser Anteil nahm über die Zeit weiter zu und war auch nach 24, 36 und 48 Stunden im Vergleich zu allen anderen Inkubationsbedingungen signifikant erhöht. Der Anteil an PI-positiven Zellen betrug nach 48 Stunden  $71,5 \pm 10,4\%$  für die Zellen unter Argininmangel und Canavanin und war damit rund 10-mal höher als unter der Kontrollbedingung mit Arginin von  $6,8 \pm 2,9\%$ . Nach 36 und 48 Stunden war außerdem ein signifikanter toxischer Effekt durch

die Arginindepletion im Vergleich zur Kontrollbedingung zu beobachten. Der Anteil an PI-positiven Zellen unter Argininmangel stieg auf  $28,2 \pm 4,3\%$  nach 48 Stunden und war damit zugleich signifikant niedriger als unter Argininmangel und Canavanin. Außerdem ist festzuhalten, dass eine alleinige Canavanin-Gabe in Anwesenheit von Arginin keine Erhöhung des Anteils PI-positiver Zellen bewirkte und somit nicht zytotoxisch war.

Des Weiteren wurde untersucht, ob durch die Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation in den FD50- und U266-Myelomzellen eine erhöhte Apoptose-Induktion auf Proteinebene nachweisbar war. Dazu wurden die Zellen ebenfalls unter der Kombinationsbehandlung und den zuvor genannten Vergleichsbedingungen inkubiert. Die intrazelluläre Expression des aktivierten Enzyms cleaved Caspase 3 nach 4 und 8 Stunden wurde mittels Western Blot analysiert.

Für die FD50-Zellen war nach 8 Stunden unter Arginindepletion und Canavanin eine hohe cleaved Caspase 3-Expression zu beobachten, die mit einer reduzierten Expressionsstärke des nicht gespaltenen Proenzym Caspase 3 einherging (Abbildung 4.2 A). Nach 4 Stunden war diese biochemische Änderung noch nicht ausgeprägt und mit den anderen Inkubationsbedingungen vergleichbar. Ein alleiniger Argininmangel bzw. die Anwesenheit von Arginin mit und ohne Canavanin induzierten nach 4 und 8 Stunden keine vermehrte Expression von cleaved Caspase 3.



**Abbildung 4.2: Expression der Cleaved Caspase 3 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin und 100  $\mu$ M Canavanin inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion der cleaved Caspase 3 und Caspase 3. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Jeweils n = 3.

Diese Beobachtungen konnten auch für die U266-Zellen festgehalten werden (Abbildung 4.2 B): Die Expression von cleaved Caspase 3 war ebenfalls nach 8 Stunden unter Argininmangel und Canavanin im Vergleich zu allen anderen



Inkubationsbedingungen deutlich erhöht. Verglichen mit den FD50-Zellen war die Bande jedoch bei deutlich längerer Belichtungszeit schwächer ausgeprägt. Alle anderen Inkubationsbedingungen führten in den U266-Zellen ebenfalls nicht zu einer vermehrten Spaltung der Caspase 3.

Insgesamt führte die Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation in den U266-Zellen zu Zelltod und in beiden Zelllinien zur Induktion von Caspase 3-Spaltung als Zeichen einer einsetzenden Apoptose. Eine alleinige Arginindepletion erwies sich nach 36 Stunden ebenfalls als zytotoxisch in den U266-Zellen, führte jedoch innerhalb von 8 Stunden in beiden Zelllinien nicht zur vermehrten Spaltung der Caspase 3.

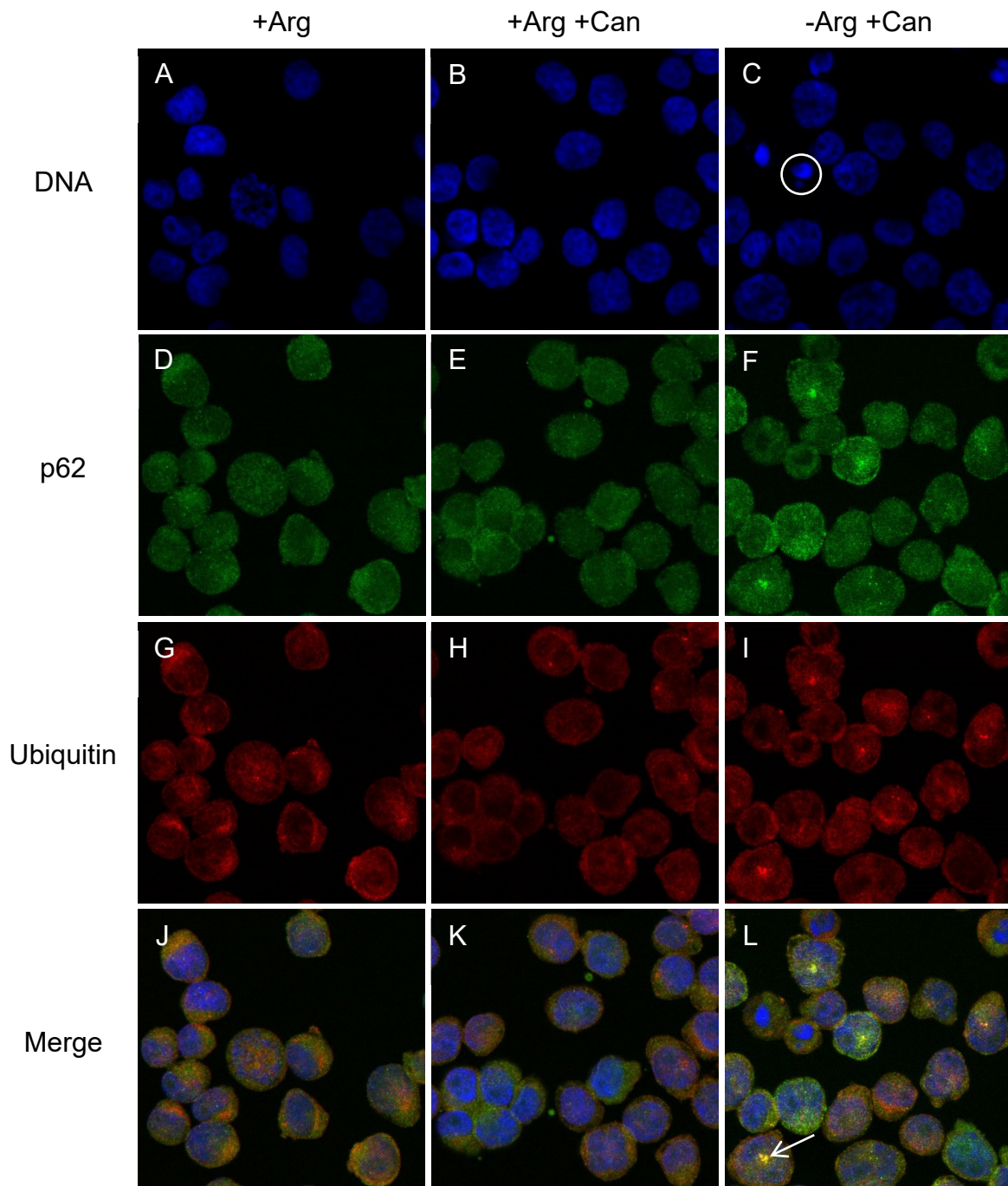
## 4.2 Werden unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation Aggresomen gebildet?

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen wurden in diesen konfokalmikroskopischen Aufnahmen FD50-Zellen auf das Vorliegen von Aggresomen analysiert. Hierzu wurden die FD50-Myelomzellen für 12 Stunden unter der Kontrollbedingung mit 1 mM Arginin, bei Canavanin-Supplementation in Anwesenheit von Arginin und unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und 100  $\mu$ M Canavanin für 12 Stunden inkubiert. Unter der letztgenannten Bedingung wurden die Zellen zum Vergleich des zeitlichen Verlaufs auch für 4 und 8 Stunden inkubiert.

Die Zellkerne waren blau gefärbt (Abbildung 4.3 A - C). Unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin waren vermehrt pyknotische, also kondensierte, fragmentierte Zellkerne zu sehen (Abbildung 4.3 C, exemplarisch umkreist). Hierbei handelte es sich um die Zellkerne apoptotischer Zellen. Die Kolo-kalisation von p62 (Abbildung 4.3 D – F, grün dargestellt) und polyubiquitinierten Proteinen (Abbildung 4.3 G – I, rot dargestellt) resultierte in einer gelben, punktförmigen Erscheinung. Dabei handelte es sich um das Aggresom einer Zelle. Aggresomen waren vermehrt, jedoch nicht in allen Zellen, unter Argininmangel und Canavanin zu beobachten (Abbildung 4.3 L, exemplarisch mit einem Pfeil markiert). In Anwesenheit von Arginin allein und bei zusätzlicher Canavanin-Gabe kam es nicht zur Bildung von Aggresomen. Apoptotische Zellen enthielten ebenfalls keine Aggresomen (mehr).

Nach 4 und 8 Stunden unter Argininmangel und Canavanin waren hingegen noch keine Aggresomen detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend reagierten die FD50-Zellen zwar unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation mit der Bildung von Aggresomen, dies war jedoch nicht in allen Zellen der Fall.

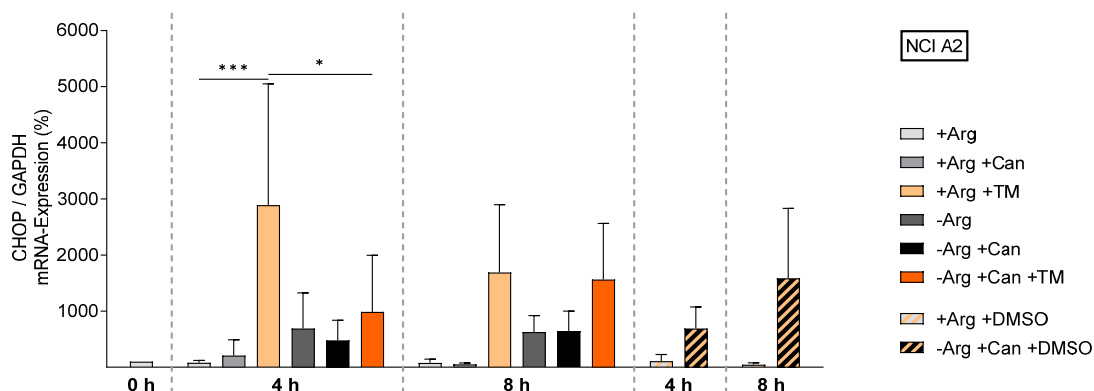


**Abbildung 4.3: Aggresomen in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden über 12 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg) und 100  $\mu$ M Canavanin (Can) inkubiert. Die Zellen wurden immunhistochemisch markiert und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. (A - C) Die Zellkerne sind blau gefärbt. In grün (D - F) ist p62 und in rot (G - I) sind polyubiquitinierte Proteine dargestellt. (J - L) Durch Überlagerung dieser drei Farbaufnahmen ergibt sich das Merge-Bild. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen. n = 4.

### 4.3 Wird unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation ER-Stress induziert?

Im Folgenden wurde untersucht, ob in den NCI A2-Zellen unter Argininmangel und Canavanin der Transkriptionsfaktor CHOP, in Folge einer Induktion von ER-Stress und der UPR, vermehrt exprimiert wird. Dazu wurden die NCI A2-Zellen über 4 und 8 Stunden mit bzw. ohne 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und 12,2  $\mu$ M des ER-Stress-Induktors Tunicamycin inkubiert. Da Tunicamycin in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1%) ergänzt. Die Expression von CHOP wurde im Anschluss auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei wurde auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

Durch Co-Inkubation mit Tunicamycin war die CHOP-Expression in Anwesenheit von Arginin nach 4 Stunden signifikant erhöht (Abbildung 4.4): sie nahm von  $79,5 \pm 41,3\%$  unter der Kontrollbedingung mit Arginin auf  $2889,9 \pm 2161,8\%$  zu. Auch nach 8 Stunden war eine Zunahme von  $78,5 \pm 66,2\%$  in Präsenz von Arginin auf  $1688,6 \pm 1209,2\%$  durch Tunicamycin zu beobachten, dieser Effekt war jedoch knapp nicht signifikant ( $p = 0,06$ ).



**Abbildung 4.4: Wirkung von Tunicamycin auf die CHOP-Expression in NCI A2-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** NCI A2-Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 12,2  $\mu$ M Tunicamycin (TM) und zur Kontrolle mit der zu Tunicamycin äquivalenten Konzentration an DMSO (1%) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. Die CHOP-mRNA-Expression wurde mittels Reverser Transkription und qRT-PCR bestimmt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der CHOP-Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression zum Zeitpunkt 0 h (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.24.  $n = 5$ , außer für +Arg +TM zum Zeitpunkt 4 Stunden:  $n = 4$  und +Arg +DMSO bzw. -Arg +Can +DMSO:  $n = 3$ .

Eine Inkubation mit Canavanin in Anwesenheit von Arginin hatte keinen Einfluss auf die CHOP-Expression. Daneben führte eine alleinige Arginindepletion nach 4 und 8 Stunden tendenziell, jedoch nicht signifikant, zu einem Anstieg der CHOP-Expression, verglichen mit der jeweiligen Kontrollbedingung. Nach 4 und 8 Stunden unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin war zwar tendenziell eine Erhöhung der CHOP-Expression auf  $476,7 \pm 359,8\%$  (4 h) bzw.  $643 \pm 356\%$  (8 h) zu beobachten, diese war jedoch im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung ebenfalls nicht signifikant. Unter der Kombinationsbehandlung (Argininmangel + Canavanin-Zugabe) stieg durch Co-Inkubation mit Tunicamycin tendenziell, jedoch nicht signifikant, die CHOP-Expression nach 4 und 8 Stunden. Im Vergleich mit der Kontrollbedingung mit Arginin ( $78,5 \pm 66,2\%$ ) war diese Erhöhung auf  $1562,9 \pm 1001,5\%$  nach 8 Stunden knapp nicht signifikant ( $p = 0,11$ ). DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die CHOP-mRNA-Expression.

Zusammenfassend reagierten die NCI A2-Zellen unter Argininmangel allein sowie in Kombination mit Canavanin mit einer Erhöhung der CHOP-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin, diese war jedoch nicht signifikant. Durch den ER-Stress-Induktor Tunicamycin wurde ein signifikanter Anstieg der CHOP-Expression in Anwesenheit von Arginin erreicht, wohingegen der Anstieg unter der Kombinationsbehandlung mit Tunicamycin nicht signifikant war.

#### **4.4 Wirkt die Inhibition von mTOR mittels Torin 1 zwecks Autophagie-Induktion protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?**

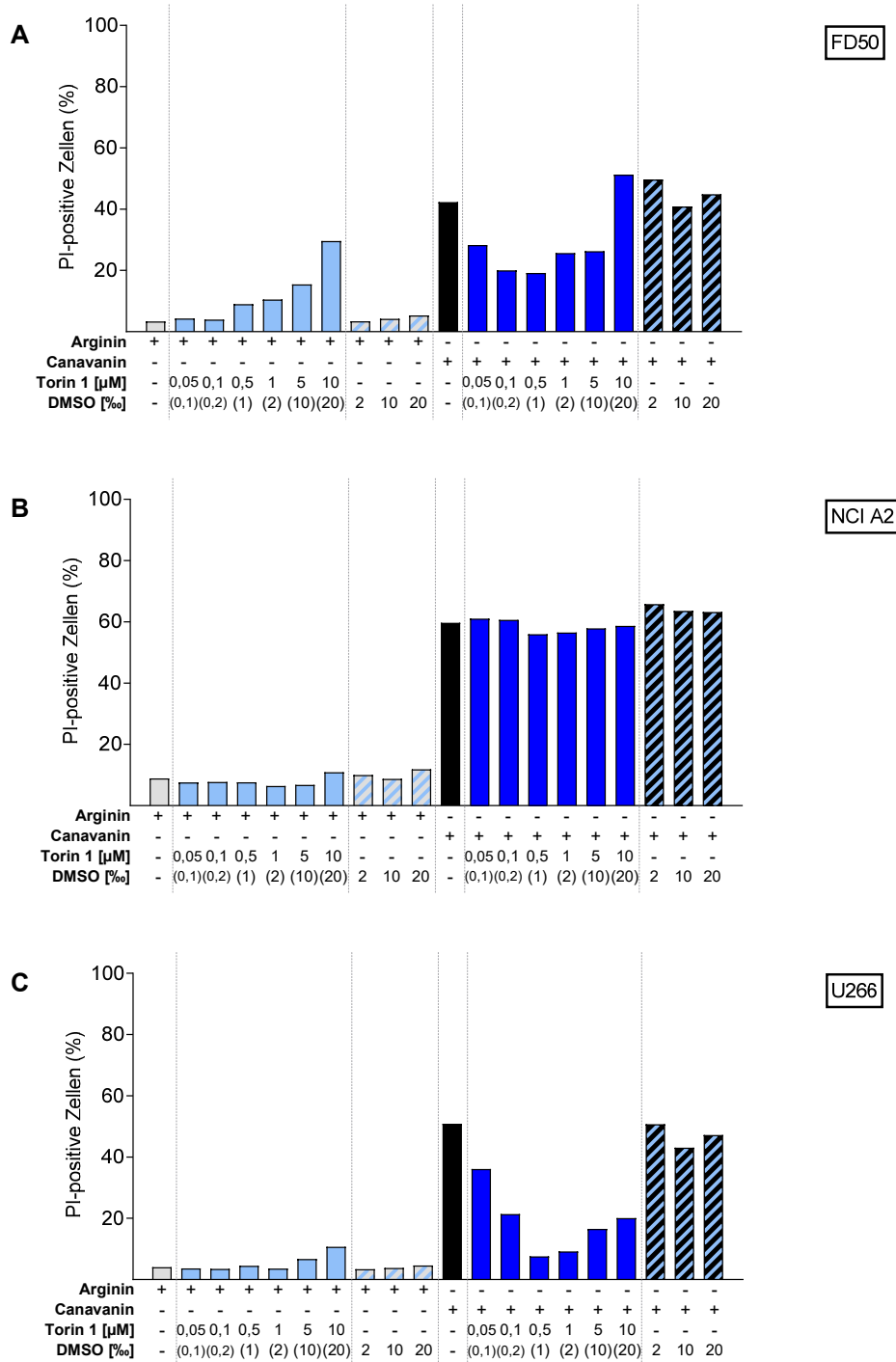
##### **4.4.1 Ergibt sich durch Torin 1 eine Verbesserung der Zell-Viabilität bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?**

###### **4.4.1.1 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen an Torin 1**

In diesen vorbereitenden Versuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des mTOR-Inhibitors Torin 1 auf das Überleben der Myelomzellen unter Argininmangel und Canavanin-Applikation analysiert. Hierzu wurden FD50-, NCI A2- und U266-Myelomzellen für 24 Stunden mit Konzentrationen von 50 nM bis 10 µM Torin 1 jeweils unter Argininmangel mit 100 µM Canavanin und zum Vergleich mit 1 mM Arginin inkubiert. Da Torin 1 in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit den drei höchsten eingesetzten Konzentrationen an DMSO (2‰, 10‰, 20‰) ergänzt. Im Anschluss wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil PI-positiver Zellen gemessen.

Zusammenfassend wirkte, bei einmaliger Durchführung des Experiments, eine Torin 1-Konzentration von 500 nM am stärksten protektiv hinsichtlich Erhalt der zellulären Viabilität, gemessen als Anteil an PI-positiven Zellen (Abbildung 4.5 A + C) und als Expressionsstärke der cleaved Caspase 3 (Anhang 8.1.1) für die Myelomzelllinien FD50 und U266 unter Argininmangel und Canavanin. Gleichzeitig zeigte sich bei dieser Konzentration kein ausgeprägter toxischer Effekt in Arginin-Anwesenheit. Auf die Zelllinie NCI A2 hatte Torin 1 in den gewählten Konzentrationen keinen hinsichtlich Viabilität protektiven Einfluss (Abbildung 4.5 B). DMSO hatte insgesamt im Wesentlichen die Viabilität der drei Zelllinien nicht beeinträchtigt. Zudem wurde für die verwendeten Konzentrationen an Torin 1 tendenziell ein hemmender Effekt auf mTOR bzw. die nachgeschalteten Proteine p70S6K1 und Akt beobachtet (Anhang 8.1.3 + 8.1.4). Eine einheitliche Aussage zur Beeinflussung der Autophagie durch Torin 1 in den unterschiedlichen Konzentrationen war nicht möglich (Anhang 8.1.2).

Für Rapamycin, einen weiteren mTOR-Inhibitor, wurden diese Effekte ebenfalls untersucht (Anhang 8.2). Er zeigte vergleichbare Tendenzen wie das verwendete Torin 1. Für die folgenden Versuche wurde Torin 1 gewählt, um potenzielle unerwünschte *off target*-Effekte durch die geringere Spezifität für mTORC1 bei Rapamycin zu vermeiden.



**Abbildung 4.5: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Viabilität der FD50-, NCI A2- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A), NCI A2- (B) und U266- (C) Myelomzellen wurden über 24 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100  $\mu\text{M}$  Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration an Torin 1 oder DMSO inkubiert. In Klammern ist jeweils die in der Torin 1-Lösung enthaltene DMSO-Konzentration angegeben. Die Säulen zeigen den Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Jeweils  $n = 1$ .

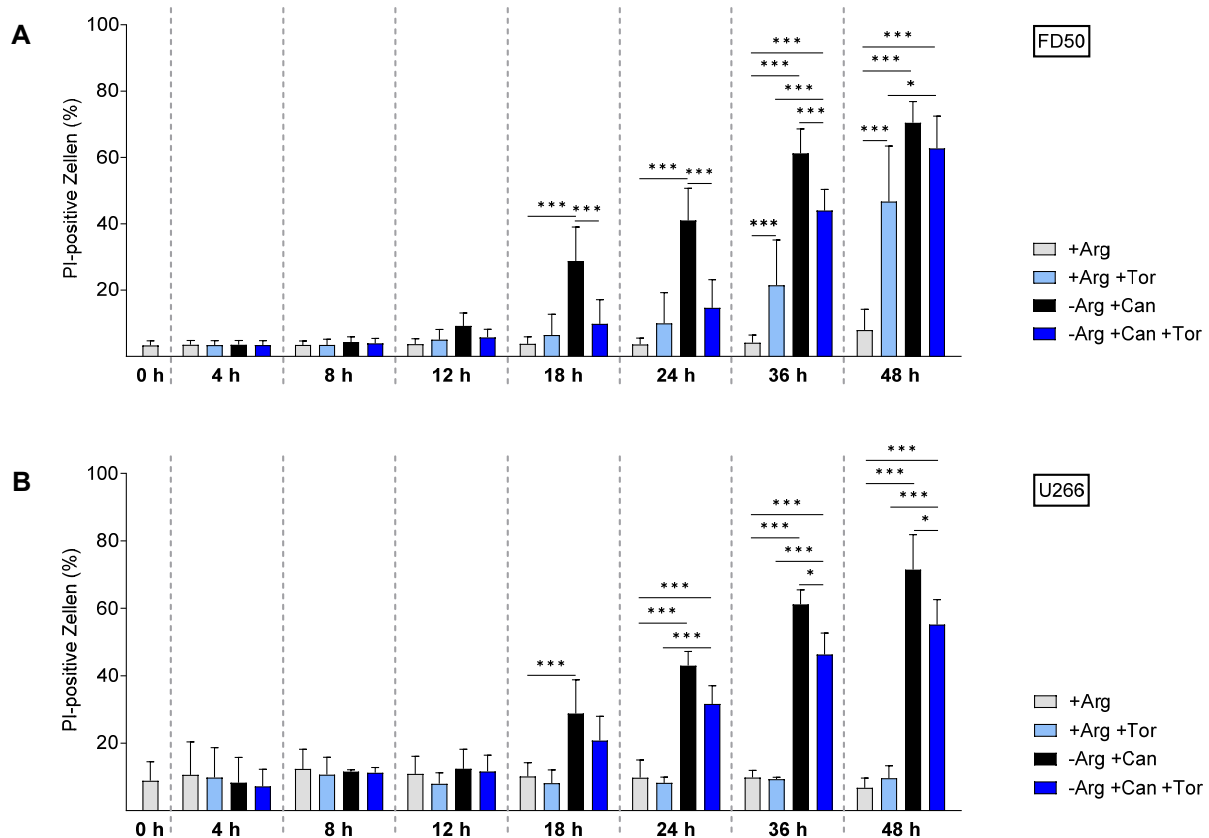


#### 4.4.1.2 Zeitkinetiken: Viabilität und Spaltung der Caspase 3 bei Applikation von Torin 1

In den Vorversuchen (Kapitel 4.4.1.1) hatte sich eine Konzentration von 500 nM Torin 1 als optimierte Viabilitäts-protective Dosis für die FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation erwiesen. Daher wurden diese im nächsten Schritt über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden unter Argininmangel und 100  $\mu$ M Canavanin und unter der Kontrollbedingung mit 1 mM Arginin und jeweils mit und ohne Zugabe von 500 nM Torin 1 inkubiert. Da Torin 1 in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰) ergänzt. Mittels durchflusszytometrischer Messung wurde dann der Anteil PI-positiver Zellen bestimmt.

Für die FD50-Myelomzellen betrug der Mittelwert des Anteils PI-positiver Zellen in den ersten 12 Stunden unter allen Inkubationsbedingungen unter 9,2% (Abbildung 4.6 A). Nach 18 Stunden war dieser unter Argininmangel und Canavanin mit  $28,8 \pm 10,3\%$  im Vergleich zu der Kontrollbedingung mit Arginin ( $3,8 \pm 2,1\%$ ) signifikant erhöht. Dies war auch nach 24, 36 und 48 Stunden der Fall. Ebenso war bereits nach 18 Stunden ein Effekt von Torin 1 zu beobachten: Die Co-Inkubation mit Torin 1 reduzierte den Anteil an PI-positiven Zellen unter Arginindepletion und Canavanin signifikant von  $28,8 \pm 10,3\%$  auf  $9,8 \pm 7,3\%$ . Dieser signifikante, protective Effekt ließ sich auch nach 24 und 36 Stunden beobachten, nach 48 Stunden jedoch nicht mehr ( $p = 0,96$ ). Dies bedingte, dass nach 18 und 24 Stunden, der Anteil PI-positiver Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation mit Torin 1 im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin nicht signifikant verschieden war. Der Anteil PI-positiver Zellen in Anwesenheit von Arginin nahm durch Torin 1 mit der Zeit zu. Nach 36 und 48 Stunden zeigte sich ein signifikanter, toxischer Effekt von Torin 1 für die Zellen mit Arginin: Der Anteil PI-positiver Zellen lag nach 36 Stunden bei  $4,2 \pm 2,3\%$  unter der argininhaltigen Bedingung im Vergleich zu  $21,5 \pm 13,7\%$  in Anwesenheit von Torin 1. Dennoch hatte Torin 1 einen signifikanten, protective Effekt für die FD50 unter Argininmangel und Canavanin nach 36 Stunden. Nach 48 Stunden erhöhte sich der Anteil an PI-positiven Zellen von  $8 \pm 6,3\%$  in Anwesenheit von Arginin auf etwa das 6-fache, nämlich  $46,7 \pm 16,8\%$  durch Co-Inkubation mit Torin 1. Außerdem war nach 36 und 48 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an PI-positiven Zellen unter Torin 1, in Anwesenheit von Arginin und auch in Abwesenheit von Arginin mit Canavanin-Supplementation, zu messen.





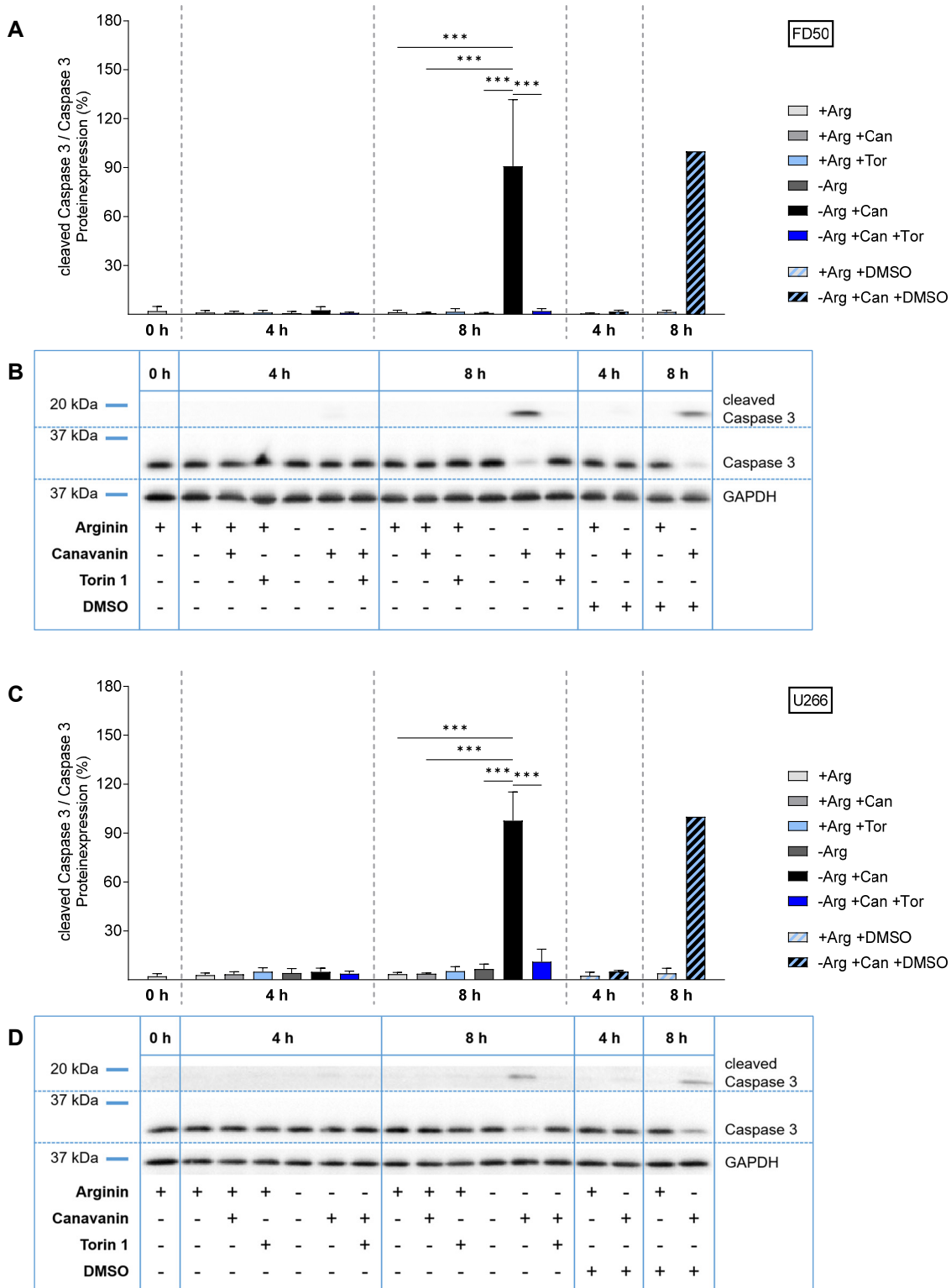
**Abbildung 4.6: Wirkung von Torin 1 auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 500 nM Torin 1 (Tor) und zur Kontrolle mit der zu Torin 1 äquivalenten Konzentration an DMSO (1%) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an PI-positiven Zellen gemessen. Die Säulen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.23. Für die DMSO-Kontrollen (Tabelle 3.21) ist  $p > 0,05$ , daher wurde zur besseren Übersicht auf deren Darstellung verzichtet. (A)  $n = 6$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 4$ . (B)  $n = 4$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 3$ .

Wie bereits in Abbildung 4.1 gezeigt, wurde durch die Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin der Anteil PI-positiver U266-Zellen nach 18, 24, 36 und 48 Stunden signifikant erhöht. Ferner wurde für die U266 ebenfalls durch Co-Inkubation mit Torin 1 der Anteil an PI-positiven Zellen unter Argininmangel und Canavanin nach 18, 24, 36 und 48 Stunden tendenziell reduziert (Abbildung 4.6 B). Nach 24 Stunden sank der Anteil so von  $43 \pm 4,2\%$  unter Argininmangel und Canavanin auf  $31,6 \pm 5,4\%$  ( $p = 0,18$ ). Nach 36 und 48 Stunden war dieser Unterschied auch signifikant, z. B. nach 36 Stunden mit einer Reduktion von  $61,2 \pm 4,3\%$  auf  $46,3 \pm 6,3\%$  durch Co-Inkubation mit Torin 1. Anders als für die FD50 wirkte Torin 1 in Anwesenheit von Arginin nicht toxisch auf die U266-Zellen.

Ebenso wurde auf Proteinebene die Induktion von Apoptose analysiert. FD50- und U266-Zellen wurden über 4 und 8 Stunden unter 1 mM Arginin und unter der Kombination von Argininmangel und 100  $\mu$ M Canavanin mit bzw. ohne Zugabe von 500 nM Torin 1 inkubiert. Da Torin 1 in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰) ergänzt. Zum Vergleich erfolgte ebenfalls eine Inkubation unter Arginindepletion und unter Canavanin-Gabe in Anwesenheit von Arginin. Dann wurde mittels Western Blot die Expression der cleaved Caspase 3 bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression der DMSO-Kontrolle bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation nach 8 Stunden normiert (= 100%).

Für beide Zelllinien war die Expression von cleaved Caspase 3 unter Argininmangel und Canavanin im Vergleich zu allen vier untersuchten Inkubationsbedingungen zum Zeitpunkt 8 Stunden signifikant erhöht. Durch Co-Inkubation mit Torin 1 wurde die Spaltung der Caspase 3 unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin praktisch vollständig verhindert: Es zeigte sich eine Reduktion der Expression der cleaved Caspase 3 nach 8 Stunden von  $90,9 \pm 40,8\%$  auf  $1,9 \pm 1,6\%$  für die FD50-Zellen (Abbildung 4.7 A, B) und von  $97,7 \pm 17,6\%$  auf  $11,1 \pm 7,8\%$  für die U266-Zellen (Abbildung 4.7 C, D). Des Weiteren war zu beobachten, dass Torin 1 in Anwesenheit von Arginin keine Apoptose induzierte und daher zum Zeitpunkt 4 und 8 Stunden für die FD50 und U266 nicht toxisch wirkte. Für beide Zelllinien zeigte DMSO keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion der cleaved Caspase 3.

Zusammenfassend erwies sich der mTOR-Inhibitor Torin 1 hinsichtlich der Viabilität und der Aktivierung der Caspase 3 als protektiv für die Zelllinien FD50 und U266 unter der Kombinationsbehandlung.

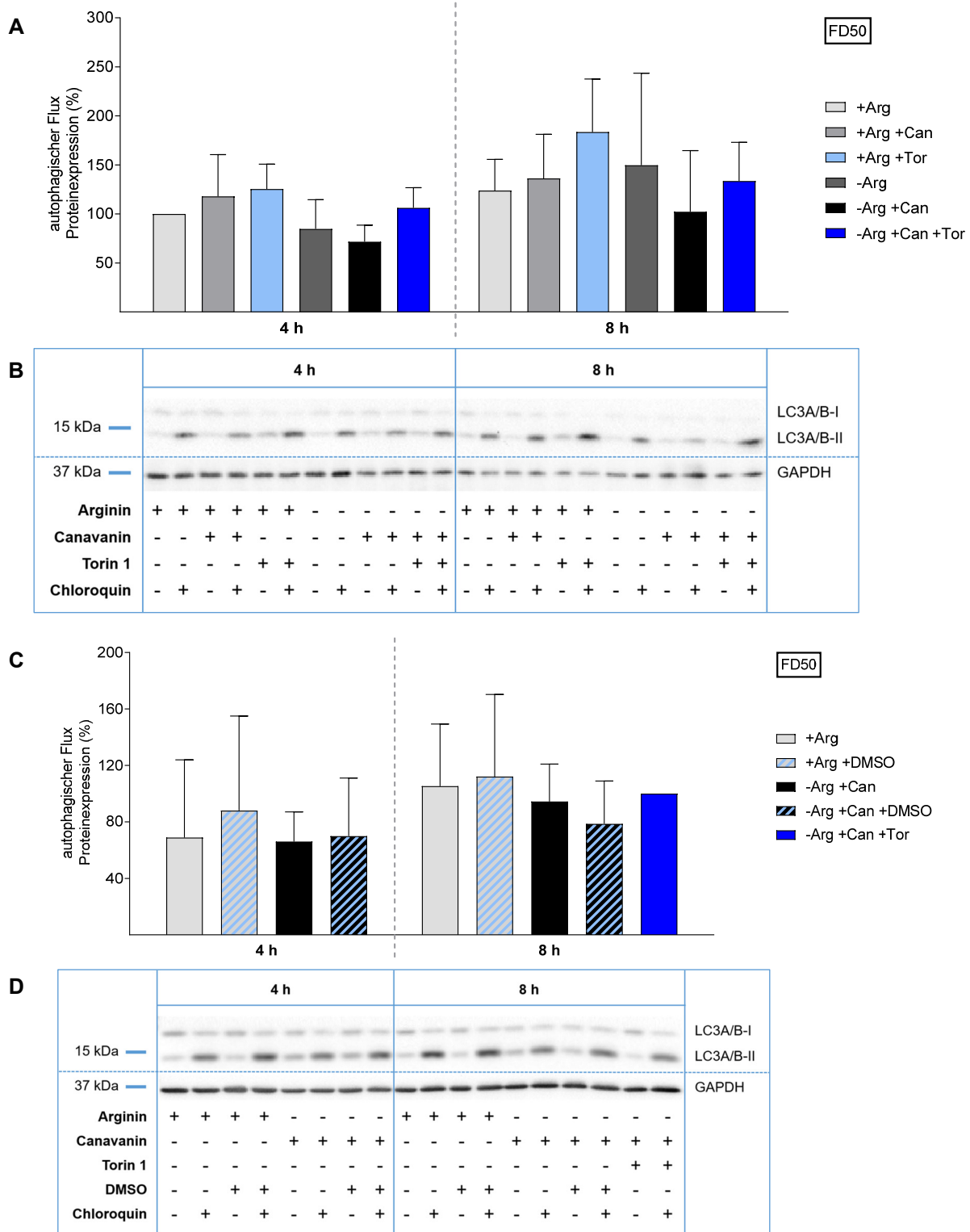


**Abbildung 4.7: Wirkung von Torin 1 auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 500 nM Torin 1 (Tor) und zur Kontrolle mit der zu Torin 1 äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der cleaved Caspase 3-Expression im Verhältnis zur Caspase 3, normiert auf das Verhältnis unter -Arg +Can +DMSO zum Zeitpunkt 8 h (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.24. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion der cleaved Caspase 3 und Caspase 3. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.

#### 4.4.2 Wird unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation und durch Torin 1 im aktuellen Modell Autophagie induziert?

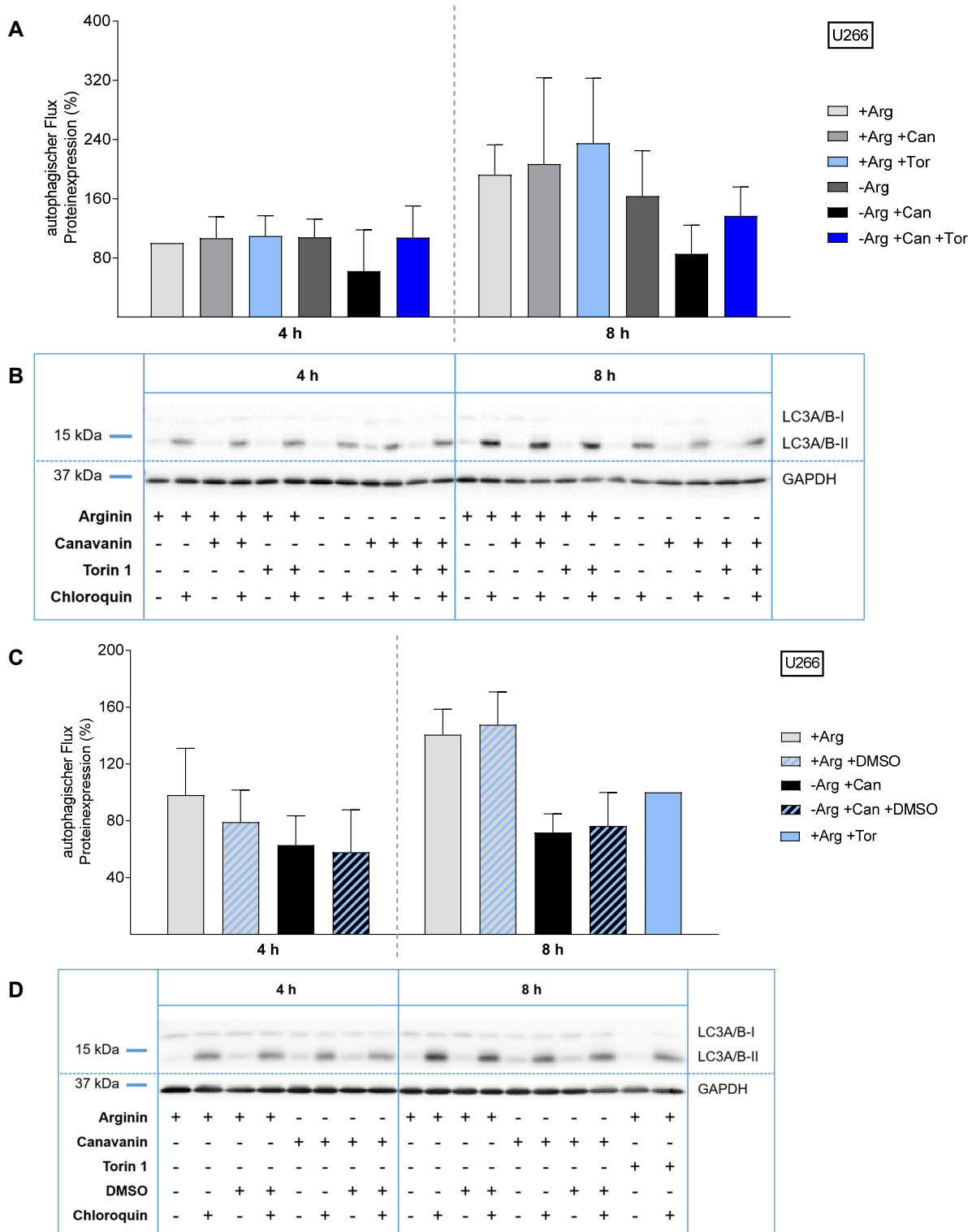
In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob Torin 1 in der die Viabilität maximal erhaltenden Konzentration von 500 nM in den Zellen Autophagie als möglichen Mechanismus dieser Protektion induziert. Hierzu wurden die FD50- und U266-Myelomzellen wie für die Caspase-Analyse (Kapitel 4.4.1.2) inkubiert. Außerdem erfolgte zusätzlich für die Bestimmung des autophagischen Fluxes eine Inkubation unter den bekannten Bedingungen jeweils mit Zugabe von 50 µM Chloroquin. Mittels Western Blot wurde dann die LC3A/B-II-, BAG3- und p62-Expression gemessen und der autophagische Flux quantifiziert (Kapitel 3.2.3.5). Dabei wurde jeweils für den autophagischen Flux auf den Flux unter der Kontrollbedingung mit Arginin nach 4 Stunden normiert (= 100%). Für die dazugehörigen DMSO-Kontrollen wurde auf den Flux unter Arginindepletion mit Canavanin-Supplementation (FD50-Zellen) bzw. in Anwesenheit von Arginin (U266-Zellen) jeweils bei Co-Inkubation von Torin 1 zum Zeitpunkt 8 Stunden normiert. Für die BAG3- und p62-Expression wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert.

Für die FD50-Zellen stieg tendenziell der autophagische Flux nach 4 und 8 Stunden durch Co-Inkubation mit Torin 1 in Anwesenheit von Arginin und unter Argininmangel mit Canavanin (Abbildung 4.8 A, B). Diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant: Beispielsweise nahm nach 8 Stunden der autophagische Flux unter der Kontrollbedingung mit Arginin von  $123,8 \pm 32\%$  auf  $183,4 \pm 54,2\%$  durch Torin 1 zu ( $p = 0,28$ ). Die Kombination aus Argininmangel und Canavanin resultierte nach beiden Zeiträumen hingegen in einer nicht signifikanten Reduktion des autophagischen Fluxes verglichen mit der Kontrollbedingung. Arginindepletion und Canavanin-Supplementation alleine in Anwesenheit von Arginin beeinflussten den autophagischen Flux nicht. DMSO zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen (Abbildung 4.8 C,D).



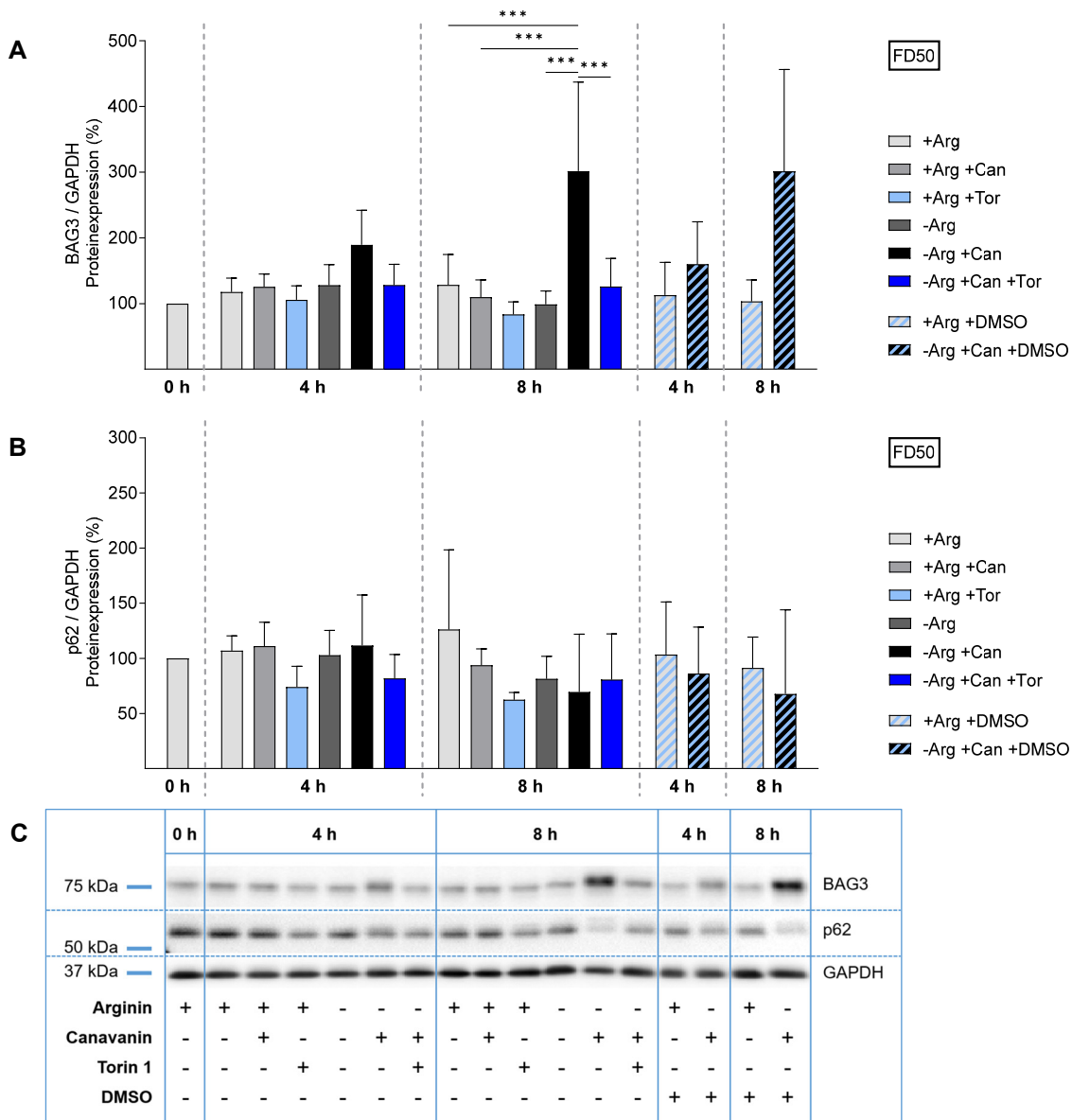
**Abbildung 4.8: Wirkung von Torin 1 auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100 µM Canavanin (Can), 500 nM Torin 1 (Tor), 50 µM Chloroquin und mit der zu Torin 1 äquivalenten Konzentration an DMSO inkubiert. (B) Die LC3A/B-II-Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (D) Gezeigt sind die dazugehörigen DMSO-Kontrollen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert des autophagischen Fluxes, normiert auf den Flux unter (A) +Arg zum Zeitpunkt 4 h (= 100%) bzw. unter (C) -Arg +Can +Tor zum Zeitpunkt 8 h (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in (A) Tabelle 3.24 und (C) Tabelle 3.21. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 4.

In den U266-Zellen zeigte sich ebenfalls ein tendenzieller Anstieg des autophagischen Fluxes nach 4 und 8 Stunden durch Co-Inkubation mit Torin 1 in Anwesenheit von Arginin und unter Argininmangel mit Canavanin (Abbildung 4.9 A, B). Diese Unterschiede waren jedoch ebenso nicht signifikant: nach 8 Stunden stieg z. B. der autophagische Flux unter Argininmangel und Canavanin von  $85,5 \pm 38,8\%$  auf  $137 \pm 38,9\%$  durch Torin 1 ( $p > 0,99$ ). Außerdem wurde ebenfalls durch die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin der autophagische Flux nach 4 und 8 Stunden nicht signifikant verringert verglichen mit der Kontrollbedingung mit Arginin: Nach 8 Stunden sank der autophagische Flux von  $192,3 \pm 40,5\%$  auf  $85,5 \pm 38,8\%$  ( $p = 0,41$ ). Durch eine alleinige Arginindepletion und Canavanin-Supplementation bei Argininpräsenz wurde der Flux nicht beeinflusst. Auch in den U266-Zellen hatte DMSO keinen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux (Abbildung 4.9 C,D).



**Abbildung 4.9: Wirkung von Torin 1 auf den autophagischen Flux in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Die Versuchsdurchführung und die statistische Analyse erfolgten für die U266-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.8. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert des autophagischen Fluxes, normiert auf den Flux unter (A) +Arg zum Zeitpunkt 4 h (= 100%) bzw. unter (C) +Arg +Tor zum Zeitpunkt 8 h (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B) Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot und (D) separat die dazugehörigen DMSO-Kontrollen. n = 3.

Außerdem wurde die BAG3- und p62-Expression untersucht.



**Abbildung 4.10: Wirkung von Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (C) Die BAG3- und p62-Expression wurden mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der BAG3- bzw. p62-Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3.

Für die FD50-Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von BAG3 auf  $301,6 \pm 135,5\%$  unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel mit Canavanin-Supplementation nach 8 Stunden im Vergleich zu den vier untersuchten anderen Inkubationsbedingungen (Abbildung 4.10). Zu beiden Zeitpunkten bedingte die Co-Inkubation mit Torin 1 der FD50-Zellen unter Kombinationsbehandlung eine Reduktion der BAG3-Expression, nur nach 8 Stunden war diese jedoch signifikant (4 h:  $p = 0,69$ ) mit einer Abnahme von  $301,6 \pm 135,5\%$  auf  $125,8 \pm 43,1\%$ . Diese lag damit auf dem Niveau der Kontrollbedingung mit Arginin von  $128,4 \pm 46,5\%$ . Nach 4 Stunden war die

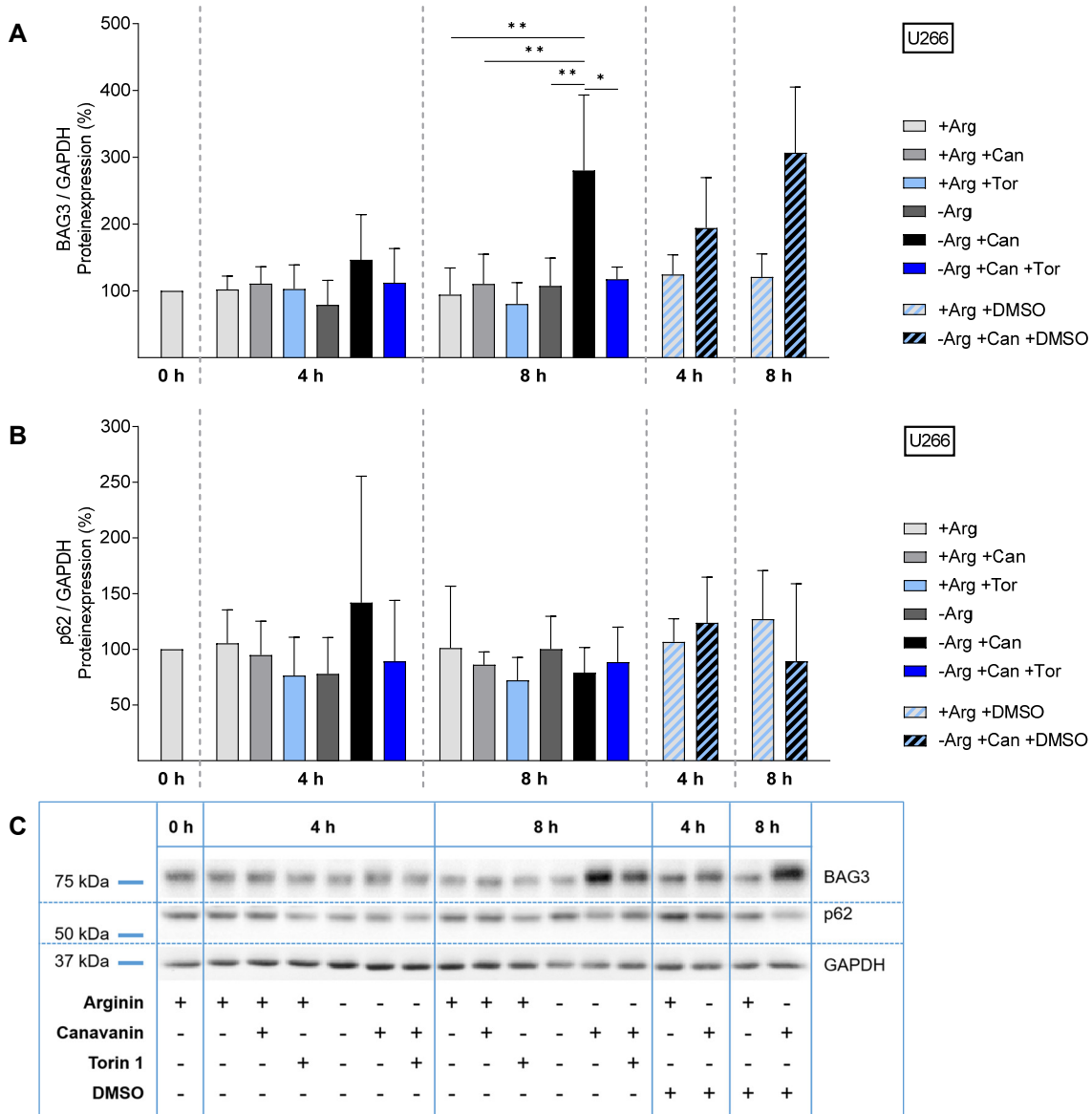


BAG3-Expression unter der Kombinationsbehandlung ebenfalls im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin von  $117,7 \pm 21,1\%$  auf  $189,5 \pm 52,6\%$  erhöht. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,42$ ). Ein alleiniger Argininmangel bzw. Canavanin-Inkubation in Anwesenheit von Arginin führten nicht zu einem Anstieg der BAG3-Expression.

Die Kombinationsbehandlung der FD50-Zellen resultierte tendenziell in einer Reduktion der p62-Expression bezogen auf die Kontrollbedingung, nach 8 Stunden sank diese von  $126,2 \pm 72,2\%$  auf  $69,5 \pm 52,4\%$  ( $p = 0,21$ ). Eine alleinige Arginindepletion und Canavanin-Supplementation bei Argininpräsenz bedingten keine signifikante Änderung der p62-Expression. Durch Co-Inkubation mit Torin 1 bei Präsenz von Arginin wurde die Expression von p62 verringert. Nach 8 Stunden war diese Reduktion von  $126,2 \pm 72,2\%$  auf  $62,5 \pm 6,5\%$  knapp nicht signifikant ( $p = 0,09$ ). Für die FD50 unter Argininmangel und Canavanin lässt sich im Vergleich zu einer zusätzlichen Co-Inkubation mit Torin 1 keine einheitliche Aussage für die beiden Zeitpunkte treffen. DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von BAG3 und p62 in den FD50-Zellen.

Bezogen auf die BAG3-Expression verhielten sich die U266-Zellen vergleichbar den FD50-Zellen (Abbildung 4.11). In den U266-Zellen war ebenso die BAG3-Expression unter der Kombinationsbehandlung nach 8 Stunden im Vergleich zu den vier untersuchten Inkubationsbedingungen auf  $280,3 \pm 112,9\%$  signifikant erhöht. Bei Co-Inkubation mit Torin 1 reduzierte sich die Expression signifikant auf  $117,5 \pm 18,3\%$ . Auch nach 4 Stunden resultierte die Co-Inkubation mit Torin 1 der U266 unter der Kombinationsbehandlung in einer Senkung der BAG3-Expression von  $146,5 \pm 67,7\%$  auf  $112,1 \pm 51,3\%$ , diese war jedoch nicht signifikant (4 h:  $p > 0,99$ ).

Für die U266-Zellen war weder durch Co-Inkubation mit Torin 1 noch unter den anderen Inkubationsbedingungen eine signifikante Modulation der p62-Expression zu beobachten. In den U266-Zellen zeigte DMSO ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von BAG3 und p62.



**Abbildung 4.11: Wirkung von Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Die Versuchsdurchführung und die statistische Analyse erfolgten für die U266-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (C) Die BAG3- und p62-Expression wurden mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der BAG3 bzw. p62 Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. n = 3.

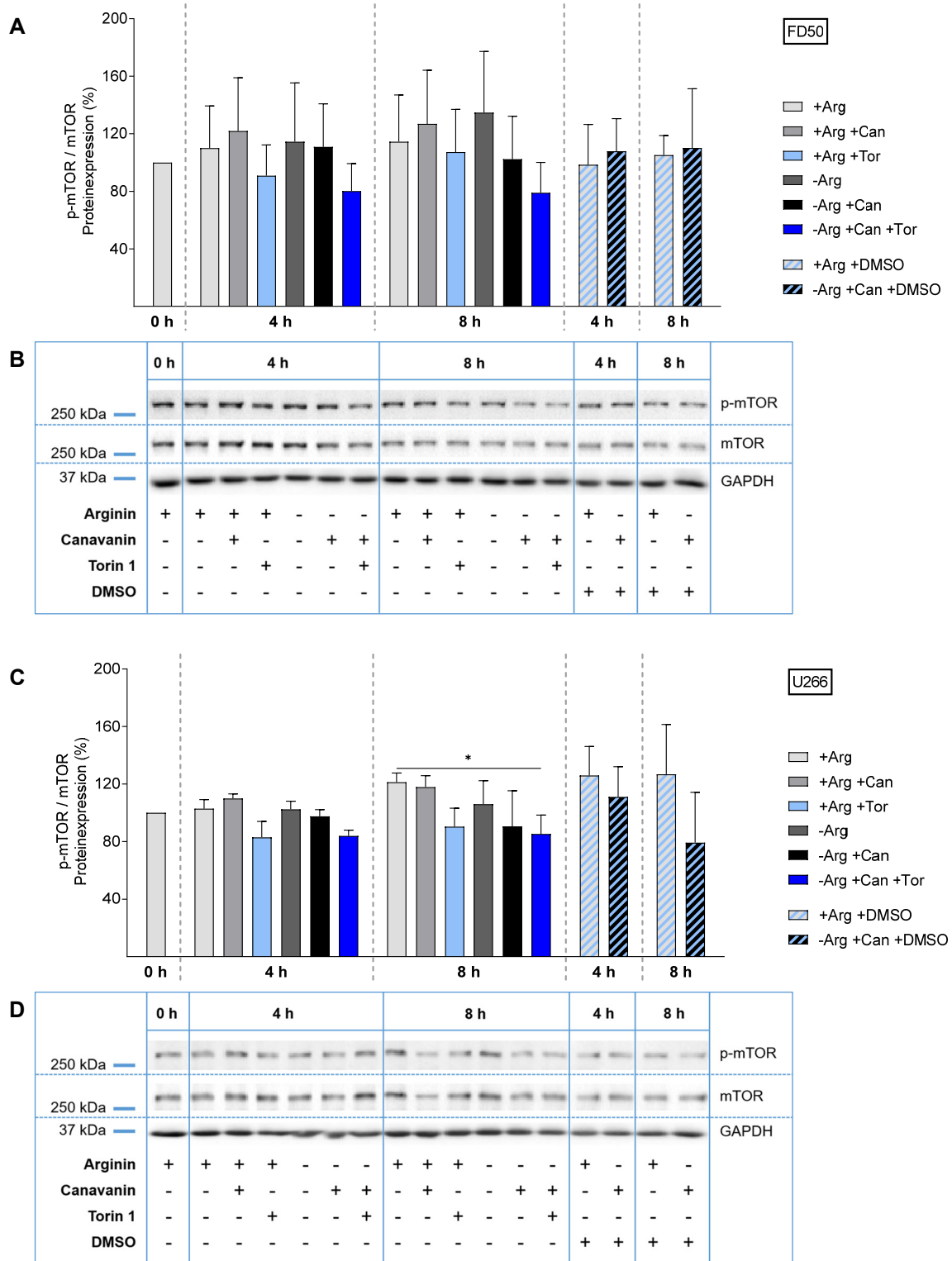
Zusammenfassend führte die Kombination von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation in den FD50- und U266-Zellen nicht zu einem signifikanten Anstieg des autophagischen Fluxes und einer Reduktion der p62-Expression als Zeichen der Makroautophagie. Auch durch Torin 1 wurde die Makroautophagie nicht induziert. Jedoch nahm die unter Arginindepletion und Canavanin signifikant erhöhte BAG3-Expression durch Co-Inkubation mit Torin 1 signifikant ab. Dies spricht dafür, dass durch Torin 1 weniger BAG3-gebundene, fehlgefaltete Proteine in der Zelle vorliegen als es unter der Kombinationstherapie der Fall ist.

#### 4.4.3 Wird durch Torin 1 im aktuellen Modell mTOR suffizient inhibiert?

Die Auswirkungen des mTOR-Inhibitors Torin 1 auf mTOR und die dem mTORC1 nachgeschaltete p70S6K1 unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen wurden im Folgenden analysiert. Hierfür wurden die FD50- und U266-Zellen wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 4.4.1.2 inkubiert. Mittels Western Blot wurde die Expression von p-mTOR (Ser2448) und p-p70S6K1 (Thr389) bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

In den FD50-Zellen hatte die An- oder Abwesenheit von Arginin bzw. Canavanin im Vergleich keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von mTOR (Abbildung 4.12 A, B). Durch Co-Inkubation mit Torin 1 wurde sowohl in Anwesenheit von Arginin als auch unter Argininmangel und Canavanin die p-mTOR-Expression in den FD50 nach 4 und 8 Stunden tendenziell vermindert. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant: Nach 4 Stunden Inkubation bewirkte Torin 1 z. B. eine Reduktion der p-mTOR-Expression von  $102,4 \pm 29,9\%$  unter Argininmangel und Canavanin auf  $79 \pm 21\%$  ( $p = 0,80$ ). DMSO hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von mTOR.

Auch in den U266-Zellen war durch Co-Inkubation mit Torin 1 in Anwesenheit von Arginin und bei Argininmangel und Canavanin die Expression von p-mTOR tendenziell nach 4 und 8 Stunden reduziert (Abbildung 4.12 C, D). Nach 8 Stunden wurde die Expression von p-mTOR von  $121,3 \pm 6,3\%$  in Anwesenheit von Arginin durch Torin 1 knapp nicht signifikant auf  $90,3 \pm 12,8\%$  reduziert (8h  $p = 0,05$ , 4h:  $p = 0,58$ ). Die Kombination von Argininmangel und Canavanin bewirkte ebenfalls eine knapp nicht signifikante Reduktion der Expression von p-mTOR nach 8 Stunden Inkubation von  $121,3 \pm 6,3\%$  auf  $90,6 \pm 24,7\%$  bezogen auf die Kontrollbedingung mit Arginin ( $p = 0,06$ ). Ein zusätzlicher Argininmangel bei Canavanin-Supplementation senkte tendenziell die Expression von p-mTOR nach 8 Stunden von  $117,8 \pm 8\%$  bei Canavanin-Gabe in Anwesenheit von Arginin auf  $90,6 \pm 24,7\%$  ( $p=0,14$ ). Ein alleiniger Argininmangel und eine alleinige Canavanin-Supplementation beeinflussten die Phosphorylierung von mTOR, im Vergleich zur Kontrollbedingung, nicht. DMSO zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p-mTOR in den U266-Zellen.

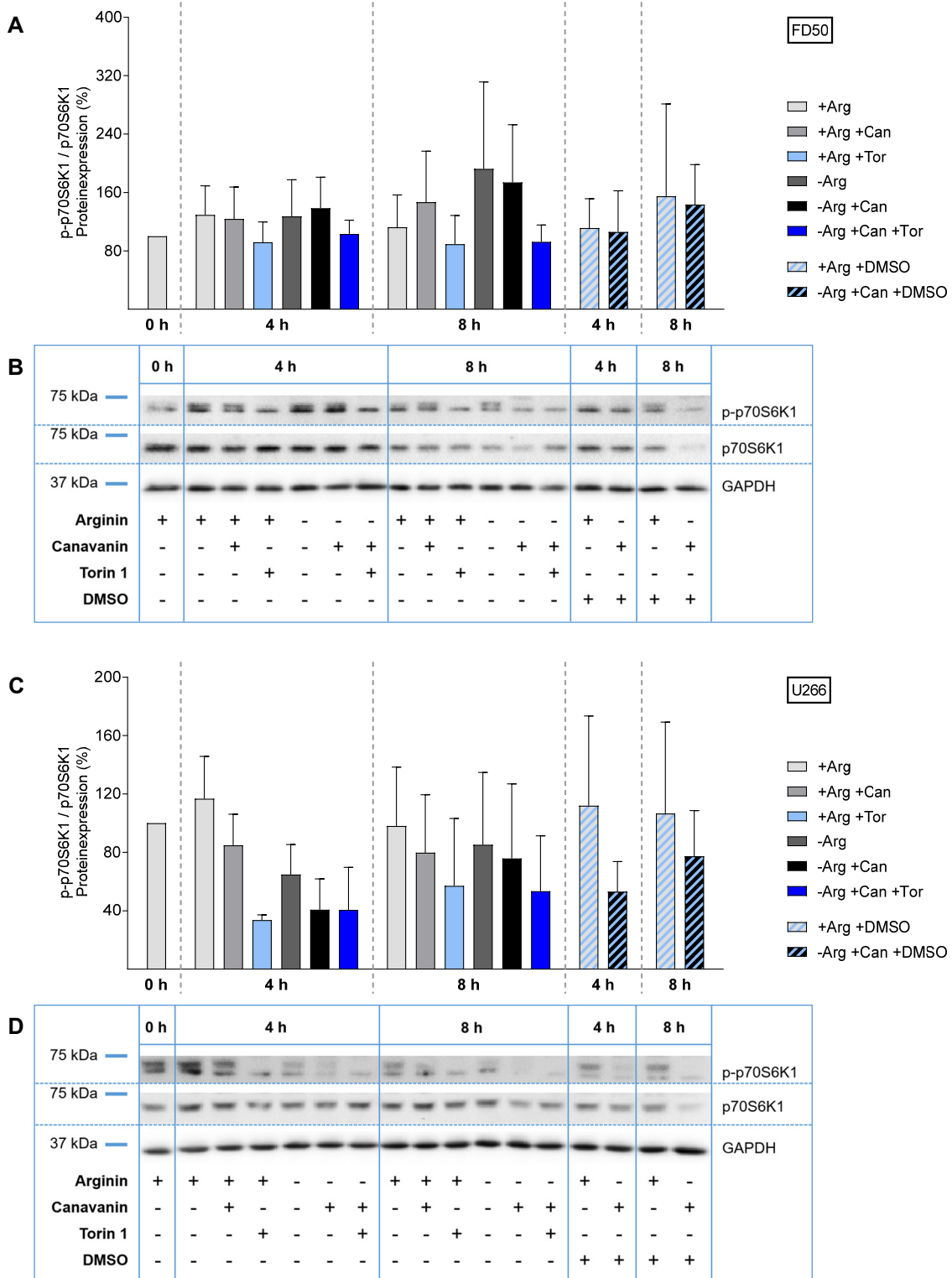


**Abbildung 4.12: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-mTOR-Expression im Verhältnis zu mTOR, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-mTOR (Ser2448) und mTOR. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.

In den FD50-Zellen reduzierte sich insgesamt tendenziell, jedoch nicht signifikant, durch Co-Inkubation mit Torin 1 die Expression von p-p70S6K1 in Anwesenheit von Arginin und bei Argininmangel mit Canavanin (Abbildung 4.13 A, B). Nach 8 Stunden nahm z. B. die Expression von p-p70S6K1 von  $173,7 \pm 79\%$  auf  $92,4 \pm 23\%$  unter Arginindepletion und Canavanin durch Supplementation von Torin 1 ab ( $p = 0,14$ ). Die An- oder Abwesenheit von Arginin bzw. Canavanin und auch von DMSO hatte in den FD50 keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p-p70S6K1.

In den U266-Zellen nahm ebenfalls durch Torin 1 tendenziell die Expression von p-mTOR bei Argininpräsenz und bei Arginindepletion mit Canavanin ab (Abbildung 4.13 C, D). Nach 4 Stunden z. B. sank die Expression von p-p70S6K1 von  $116,8 \pm 29\%$  in Anwesenheit von Arginin auf  $33,6 \pm 3,5\%$  durch Torin 1 ( $p = 0,15$ ). Durch Argininmangel und Canavanin wurde die Expression von p-p70S6K1 nach 4 Stunden von  $116,8 \pm 29\%$  bei Argininpräsenz auf  $40,7 \pm 21,1\%$  reduziert, dies war jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,25$ ). Eine Arginindepletion und Canavanin-Supplementation hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p-p70S6K1 im Vergleich zur Kontrollbedingung. In den U266-Zellen zeigte DMSO ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p-p70S6K1.

Zusammenfassend führte der mTOR-Inhibitor Torin 1 in den FD50- und U266-Zellen wider Erwarten nicht zu einer signifikanten Reduktion von p-mTOR und p-p70S6K1 im untersuchten Zeitraum. Daher erfolgte eine weitere Analyse des Phosphorylierungsstatus des dem mTORC1 nachgeschalteten Proteins 4E-BP1 (Kapitel 4.5.1).



**Abbildung 4.13: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-p70S6K1-Expression im Verhältnis zu p70S6K1, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-p70S6K1 (Thr389) und p70S6K1. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.

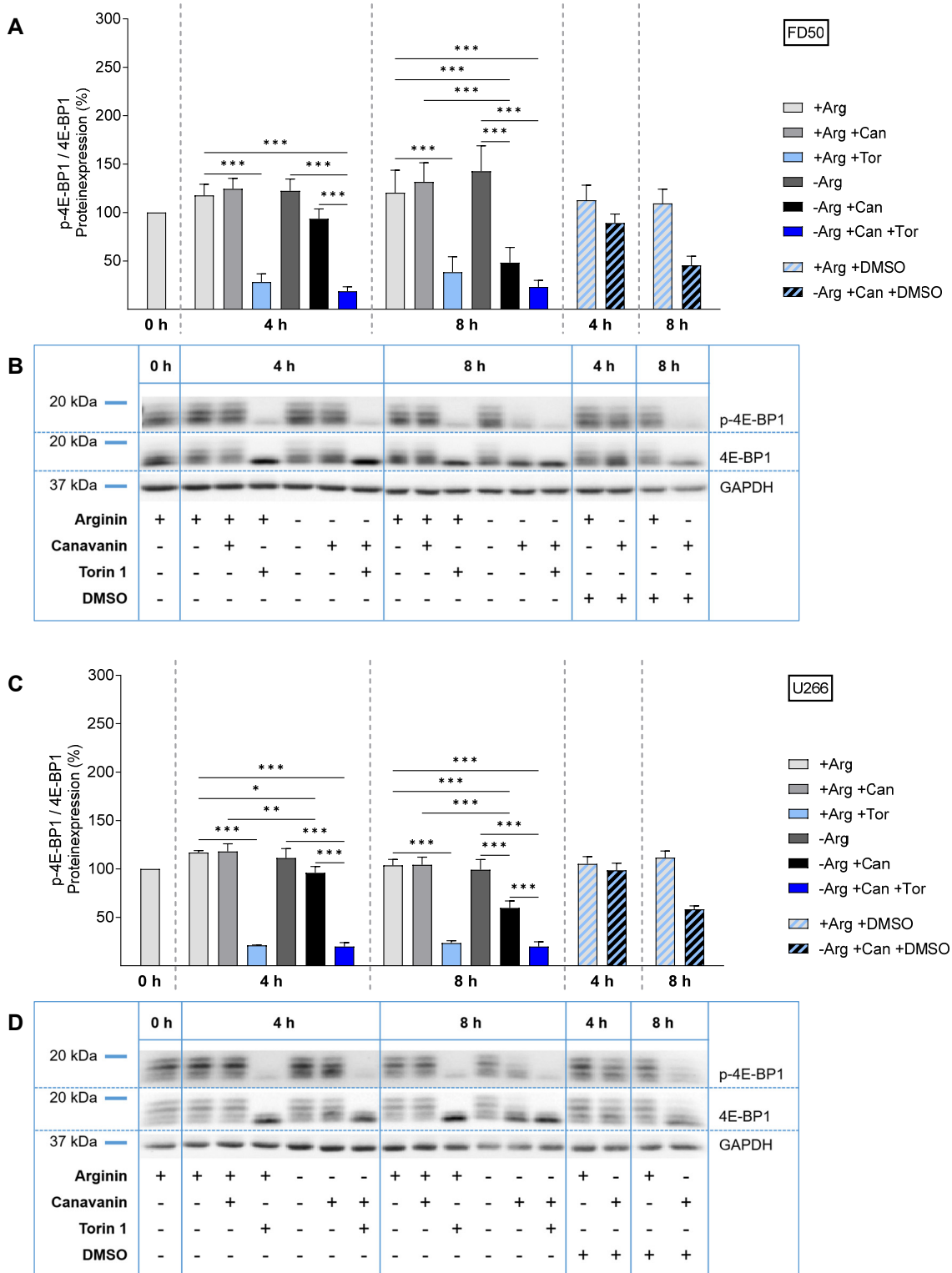
## 4.5 Einfluss der Translation auf den Toxizitätsmechanismus von Argininmangel und Canavanin-Supplementation

### 4.5.1 Wird die Translation bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation durch Torin 1 gehemmt?

Neben p70S6K1 ist auch 4E-BP1 dem mTORC1 nachgeschaltet. Der Einfluss von Torin 1 auf den Phosphorylierungsgrad des Translationsrepressorproteins 4E-BP1 wurde mit dem folgenden Experiment untersucht. Die Inkubation der FD50- und U266-Zellen erfolgte wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 4.4.1.2. Im Anschluss wurde mittels Western Blot die Expression von p-4E-BP1 (Thr37/46) bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

In den FD50-Zellen wurde durch Co-Inkubation mit Torin 1 die Expression der phosphorylierten, die Translation aktivierenden Form von 4E-BP1 unter der Kontrollbedingung mit Arginin und zusätzlich unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation nach beiden Zeiträumen signifikant verringert (Abbildung 4.14 A, B). Als einzige Ausnahme war die Reduktion von  $48,2 \pm 15,8\%$  unter der Kombinationsbehandlung auf  $23,0 \pm 6,9\%$  durch Torin 1 zum Zeitpunkt 8 Stunden knapp nicht signifikant ( $p = 0,07$ ). Die Behandlung mit Torin 1 sollte daher zu einer Hemmung der Protein-Translation führen. Außerdem war zu beobachten, dass die p-4E-BP1-Expression ebenfalls durch Argininmangel und Canavanin im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin nach 8 Stunden signifikant reduziert war; das war nach 4 Stunden noch nicht der Fall ( $p = 0,1$ ): Nach 8 Stunden war die p-4E-BP1-Expression unter Arginindepletion mit Canavanin bei  $48,2 \pm 15,8\%$  im Vergleich zu  $120,5 \pm 23,1\%$  unter der Kontrollbedingung. Ein zusätzlicher Argininmangel bei Canavanin-Supplementation reduzierte die Menge des phosphorylierten Proteins signifikant von  $131,5 \pm 19,9\%$  auf  $48,2 \pm 15,8\%$  nach 8 Stunden. Die Änderung nach 4 Stunden unter den letztgenannten Bedingungen war knapp nicht signifikant ( $p = 0,07$ ). Umgekehrt bewirkte die zusätzliche Inkubation mit Canavanin eine signifikante Reduktion von p-4E-BP1 unter Arginindepletion nach 8 Stunden; nach 4 Stunden war dieser Effekt noch nicht signifikant ( $p = 0,12$ ). Eine alleinige Canavanin-Gabe bzw. eine alleinige Arginindepletion änderten das Phosphorylierungsmuster von 4E-BP1 im Vergleich zur Kontrollbedingung hingegen nicht. DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die p-4E-BP1-Expression in den FD50-Zellen.





**Abbildung 4.14: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-4E-BP1-Expression im Verhältnis zu 4E-BP1, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-4E-BP1 (Thr37/46) und 4E-BP1. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.



Die zuvor für die FD50-Zellen gemachten Beobachtungen in Bezug auf 4E-BP1 lassen sich überwiegend auch für die U266 feststellen. Die Inhibition von mTORC1 durch Torin 1 zeigte sich auch für die U266 in einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von 4E-BP1 nach 4 und 8 Stunden sowohl unter Inkubation mit Arginin als auch unter Arginindepletion und Canavanin (Abbildung 4.14 C, D). Zum Beispiel sank die p-4E-BP1-Expression nach 4 Stunden in Anwesenheit von Arginin von  $117 \pm 1,8\%$  auf  $21 \pm 0,4\%$  durch Co-Inkubation mit Torin 1. Darüber hinaus reduzierte auch die Kombination von Argininmangel und Canavanin signifikant die Phosphorylierung von 4E-BP1 nach 4 und 8 Stunden im Vergleich zur Kontrollbedingung: Die Expression von p-4E-BP1 nahm nach 8 Stunden von  $103,6 \pm 6,2\%$  unter der Kontrollbedingung auf  $59,7 \pm 7,2\%$  ab. Des Weiteren bewirkte ein zusätzlicher Argininmangel bei Canavanin-Supplementation ebenfalls eine signifikante Reduktion von p-4E-BP1 nach 4 und 8 Stunden: Nach 8 Stunden sank die Expression von  $104,3 \pm 7,9\%$  unter Canavanin in Anwesenheit von Arginin auf  $59,7 \pm 7,2\%$  durch eine zusätzliche Arginindepletion. Auch eine zusätzliche Canavanin-Supplementation verringerte signifikant die Expression von p-4E-BP1 unter Arginindepletion nach 8 Stunden, nach 4 Stunden war dieser Effekt noch nicht signifikant ( $p = 0,15$ ). Eine alleinige Arginindepletion bzw. Canavanin-Supplementation beeinflussten die p-4E-BP1-Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin nicht. DMSO hatte keinen signifikanten Einfluss auf die p-4E-BP1-Expression der U266-Zellen.

Zusammenfassend führte Torin 1 zu einer signifikanten Reduktion von p-4E-BP1 in beiden Zelllinien. Die damit wahrscheinlich einhergehende Hemmung der Translation kommt somit als potenzieller Viabilitäts-protektiver Effekt bei Arginindepletion und Canavanin-Supplementation in Frage. Damit wurde außerdem die effektive mTORC1-Inhibition mittels Torin 1 gezeigt. Zudem wurde bereits unter Arginindepletion und Canavanin p-4E-BP1 reduziert, was für eine intrinsische Hemmung der Translation der beiden Zelllinien unter der Kombinationsbehandlung spricht.

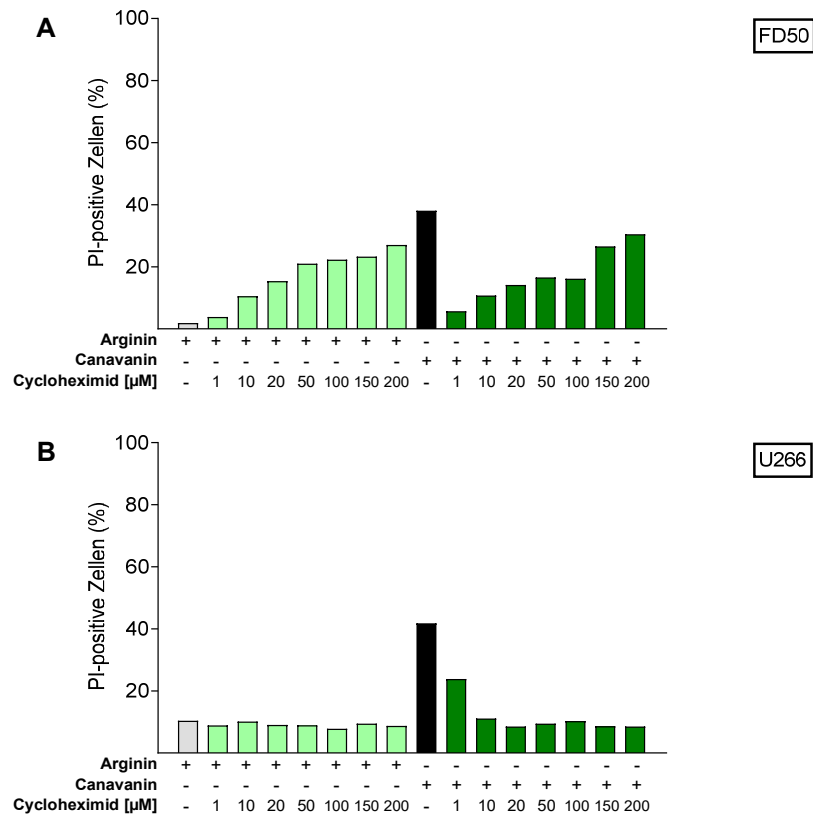
#### 4.5.2 Wirkt Cycloheximid protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?

Torin 1 führte in den FD50- und U266- Zellen zu einer besseren Viabilität unter Arginindepletion und Canavanin (Kapitel 4.4.1). Diese konnte jedoch nicht auf Autophagie zurückgeführt werden (Kapitel 4.4.2). Eine Translationshemmung, indirekt über mTORC1 und 4E-BP1 mittels Torin 1, stellte sich als potenzieller Viabilitäts-protektiver Effekt heraus. Im folgenden Versuch wurde daher analysiert, ob eine direkte Translationshemmung mittels Cycloheximid protektiv für die Zellen unter Argininmangel und Canavanin wirkt. Dafür wurden die FD50- und U266-Zellen mit bzw. ohne 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und mit Konzentrationen von 1 bis 200  $\mu$ M an Cycloheximid inkubiert. Nach 24 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil an PI-positiven Zellen gemessen.

Mit steigender Konzentration an Cycloheximid nahm in Anwesenheit von Arginin der Anteil PI-positiver FD50-Zellen zu (Abbildung 4.15 A). Unter Argininmangel und Canavanin nahm, wie aus bisherigen Analysen (Abbildung 4.6 A) bekannt, der Anteil PI-positiver Zellen deutlich zu. Durch Co-Inkubation mit Cycloheximid wurde der Anteil PI-positiver Zellen unter Argininmangel und Canavanin mit sinkender Konzentration zunehmend reduziert.

Anders als die FD50-Zellen reagierten die U266-Zellen in Anwesenheit von Arginin nicht mit einem Anstieg PI-positiver Zellen bei Inkubation mit Cycloheximid (Abbildung 4.15 B). In den U266-Zellen wurde ebenfalls durch gleichzeitige Inkubation mit Cycloheximid der Anteil PI-positiver Zellen unter Argininmangel und Canavanin deutlich gesenkt.

Zusammenfassend wirkte Cycloheximid als Translationshemmer protektiv in Bezug auf die Viabilität der beiden Zelllinien unter Arginindepletion und Canavanin-Supplementation. Bei einmaliger Durchführung des Experiments stellte sich eine Konzentration von 1  $\mu$ M Cycloheximid für die FD50-Zellen und von 10  $\mu$ M für die U266-Zellen als niedrigste die Viabilität maximal erhaltende Konzentration heraus.



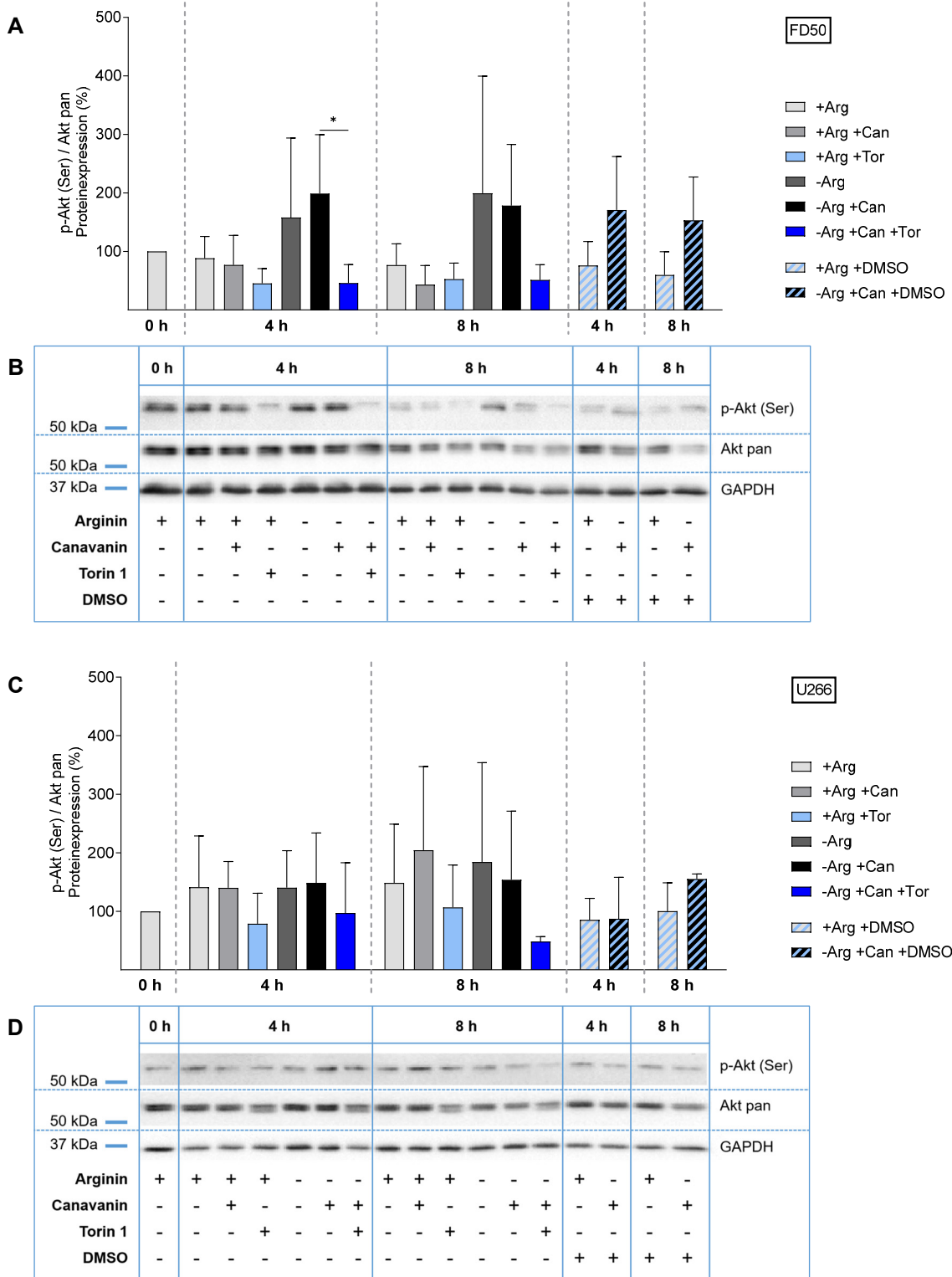
**Abbildung 4.15: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Cycloheximid auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden über 24 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100  $\mu\text{M}$  Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration von Cycloheximid inkubiert. Die Säulen zeigen den Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Jeweils  $n = 1$ .

## 4.6 Wirkt die Inhibition von Akt protektiv bezüglich Viabilität und Apoptose-Induktion unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation?

### 4.6.1 Wie beeinflusst Torin 1 den mTORC2-Signalweg in FD50- und U266-Myelomzellen?

Die Wirkung von Torin 1 auf mTORC1, für den der Inhibitor laut Datenblatt des Herstellers im Vergleich zu mTORC2 eine circa fünffach höhere Affinität aufweist, wurde bereits untersucht (Kapitel 4.4.3 + 4.5.1). Daher wurde im Folgenden analysiert, welchen Effekt Torin 1 auf das dem mTORC2 nachgeschaltete Akt in den FD50- und U266-Myelomzellen hat, wobei die Inkubation wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 4.4.1.2 erfolgte. Anschließend wurde die Expression von p-Akt (Ser473) und p-Akt (Thr308) mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

In den FD50-Zellen bewirkte die Kombination von Argininmangel und Canavanin tendenziell einen Anstieg der Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach 4 und 8 Stunden bezogen auf die Kontrollbedingung mit Arginin (Abbildung 4.16 A, B): Nach 8 Stunden stieg die Expression von p-Akt (Ser) von  $76,7 \pm 36,3\%$  auf  $178,3 \pm 104,5\%$  (4 h:  $p = 0,22$ ; 8 h:  $p = 0,34$ ). Auch ein alleiniger Argininmangel bedingte tendenziell eine erhöhte Phosphorylierung, nach 8 Stunden beispielsweise von  $199,3 \pm 200,3\%$  im Vergleich zur Kontrollbedingung ( $p = 0,36$ ). Eine Canavanin-Supplementation in Anwesenheit von Arginin führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung der Phosphorylierung von Akt an Ser473. Durch Co-Inkubation mit Torin 1 wurde die Expression von p-Akt (Ser) in den FD50-Zellen nach 4 und 8 Stunden unter Arginindepletion und Canavanin tendenziell reduziert. Dies war zum Zeitpunkt 4 Stunden signifikant mit einer Reduktion von  $198,9 \pm 100,7\%$  auf  $46,0 \pm 31,4\%$ , zum Zeitpunkt 8 Stunden jedoch knapp nicht ( $p = 0,08$ ). Unter der Kontrollbedingung mit Arginin zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der Phosphorylierung bei Torin 1-Supplementation. DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p-Akt (Ser) in den FD50-Zellen.



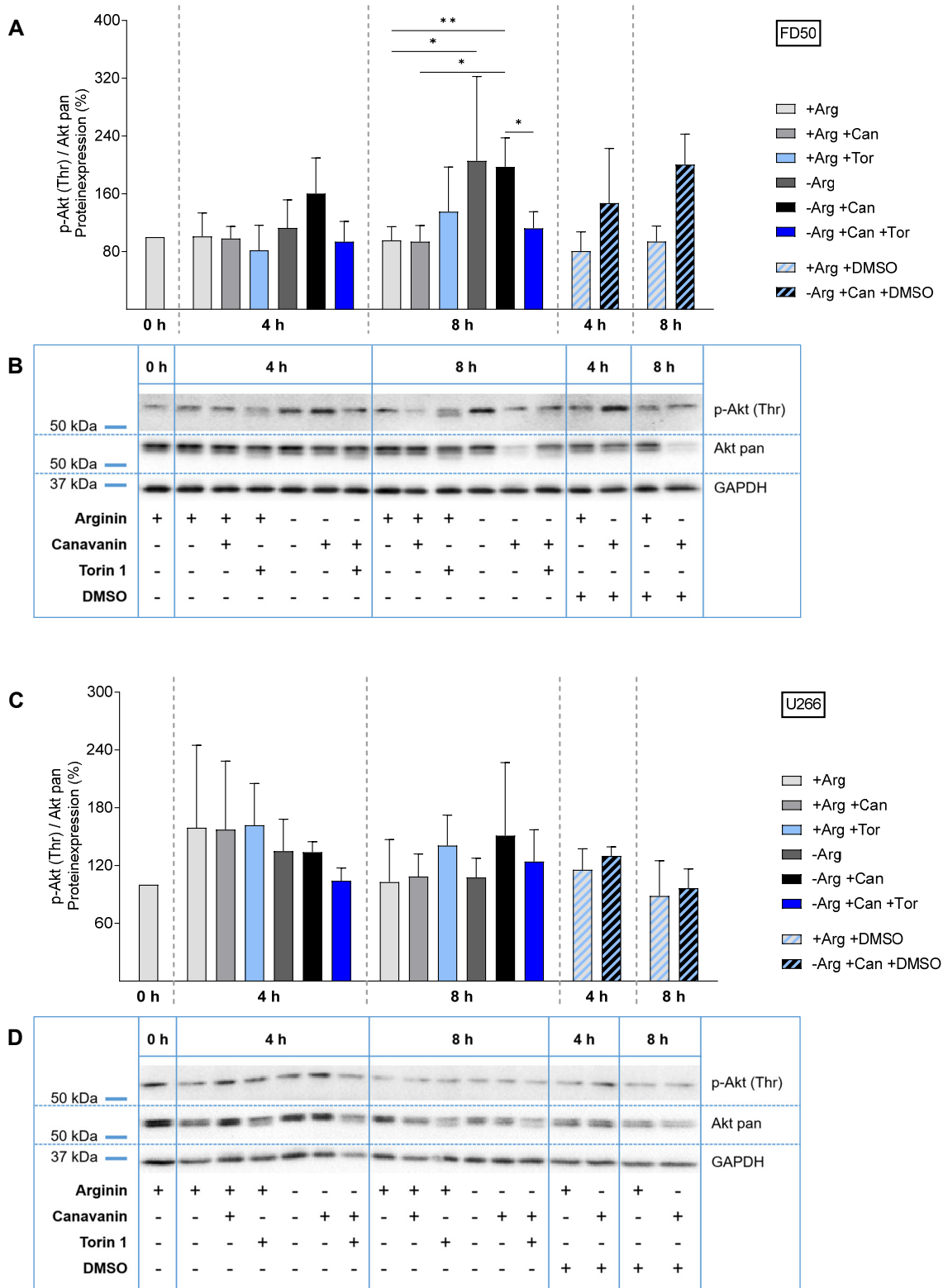
**Abbildung 4.16: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-Akt (Ser)-Expression im Verhältnis zu Akt pan, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-Akt (Ser473) und Akt pan. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.

Für die U266-Zellen resultierte eine Modulation des Mediums nicht in einer signifikanten Änderung der Phosphorylierung von Akt an Ser473 (Abbildung 4.16 C, D). Die Co-Inkubation mit Torin 1 bewirkte eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der p-Akt (Ser)-Expression, zum einen in Anwesenheit von Arginin und zum anderen auch unter Argininmangel und Canavanin. Beispielsweise nahm diese nach 8 Stunden unter Arginindepletion mit Canavanin-Supplementation von  $153,9 \pm 117,4\%$  auf  $48,3 \pm 8,4\%$  durch Co-Inkubation mit Torin 1 ab ( $p = 0,98$ ). Auch DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf p-Akt (Ser) in den U266-Zellen.

In den FD50-Zellen ergab sich für die Phosphorylierung von Akt an Thr308 eine ähnliche Ausprägung wie an Ser473. Die Kombination von Argininmangel und Canavanin bedingte nach 4 und 8 Stunden einen Anstieg der Phosphorylierung von p-Akt (Thr308) bezogen auf die Kontrollbedingung mit Arginin, dies war nach 8 Stunden auch signifikant (Abbildung 4.17 A, B): Der Phosphorylierungsgrad nahm von  $95,5 \pm 19\%$  auf  $197,3 \pm 40,2\%$  zu. Ebenfalls wurde durch alleinigen Argininmangel die Phosphorylierung zum Zeitpunkt 8 Stunden im Vergleich zur Kontrollbedingung auf  $205,6 \pm 116,7\%$  signifikant erhöht. Im Kontext einer Canavaninapplikation erhöhte ein zusätzlicher Argininmangel die p-Akt (Thr)-Expression nach 8 Stunden signifikant von  $93,4 \pm 22,6\%$  auf  $197,3 \pm 40,2\%$ . Eine zusätzliche Canavanin-Gabe in Anwesenheit von Arginin bedingte hingegen keine signifikante Änderung der p-Akt (Thr)-Expression im Vergleich zur Arginin-suffizienten Kontrollbedingung. Die Co-Inkubation mit Torin 1 resultierte in einer signifikanten Reduktion von p-Akt (Thr) von  $197,3 \pm 40,2\%$  auf  $112,1 \pm 22,8\%$  in den FD50 unter Argininmangel und Canavanin nach 8 Stunden. Nach 4 Stunden war dieser Unterschied noch nicht signifikant ( $p = 0,19$ ). DMSO hatte keinen signifikanten Einfluss auf die p-Akt (Thr)-Expression der FD50-Zellen.

Auch auf die Phosphorylierung von Akt an Thr308 war für die U266-Zellen keine eindeutige Auswirkung durch die einzelnen Inkubationsbedingungen festzustellen (Abbildung 4.17 C, D). Außerdem zeigte DMSO keinen signifikanten Einfluss auf die p-Akt (Thr)-Expression der U266-Zellen.

Zusammenfassend wurde unter Arginindepletion und Canavanin durch Torin 1 Akt in den FD50-Zellen inhibiert. In den U266 war unter den untersuchten Bedingungen keine signifikante Beeinflussung von Akt nachweisbar.



**Abbildung 4.17: Wirkung von Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Thr308 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.7. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-Akt (Thr)-Expression im Verhältnis zu Akt pan, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-Akt (Thr308) und Akt pan. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) n = 6, außer für +Arg +Can und -Arg: n = 3. (C, D) n = 3.

#### **4.6.2 Ergibt sich durch direkte Inhibition von Akt mittels Afuresertib bzw. Akti-1/2 bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation ein Überlebensvorteil?**

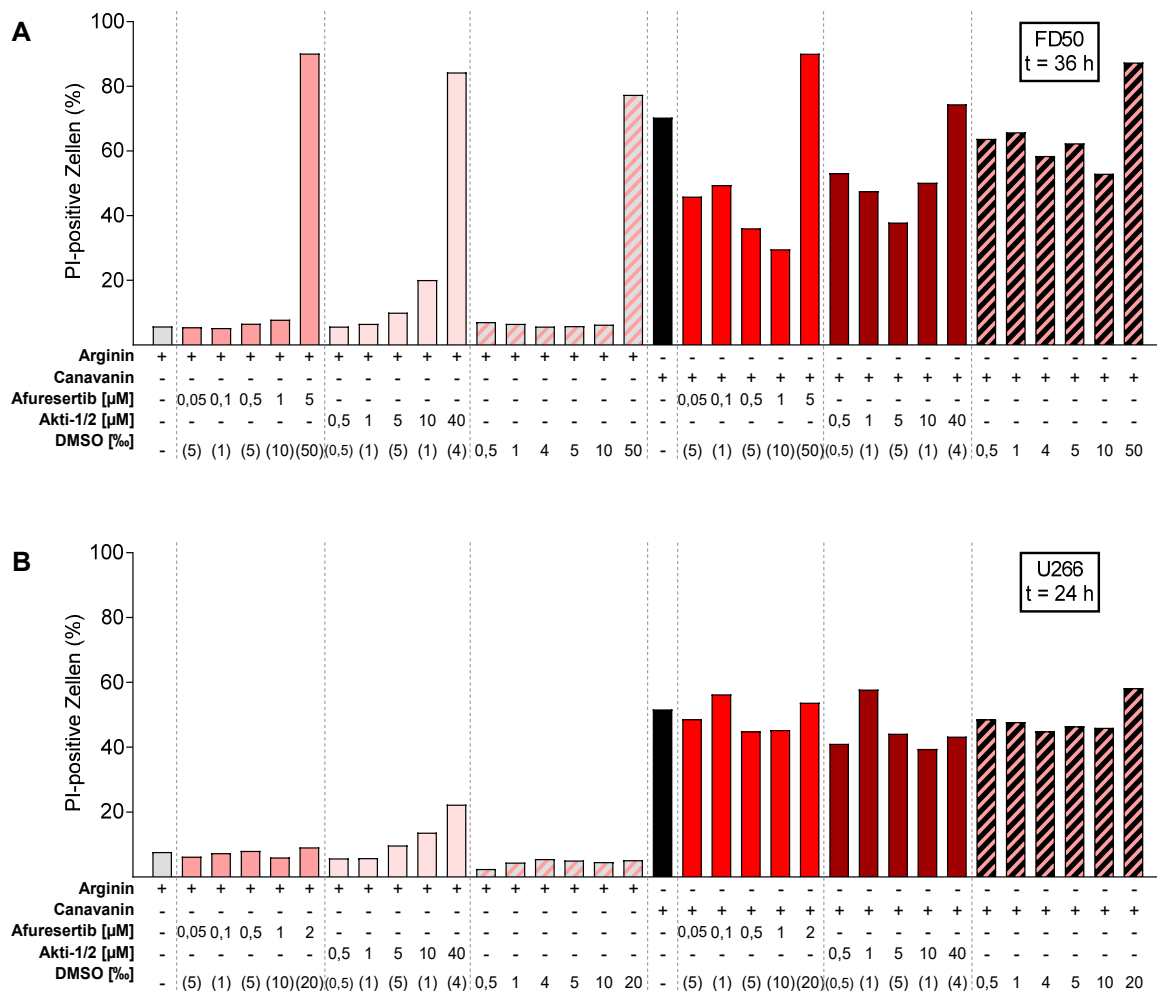
##### **4.6.2.1 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen an Afuresertib bzw. Akti-1/2**

Durch Torin 1 wurde in den FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin Akt (indirekt über mTORC2) inhibiert (Kapitel 4.6.1). Für die U266-Zellen zeigte sich währenddessen keine relevante Modulation der Akt-Phosphorylierung. In den FD50-Zellen könnte sich der protektive Effekt von Torin 1 daher zumindest teilweise auf eine Inhibition von Akt zurückführen lassen. Mit der folgenden durchflusszytometrischen Messung von Zelltod wurde daher untersucht, ob die direkte Akt-Inhibition durch Afuresertib bzw. Akti-1/2 protektiv auf die Zellen unter Arginindepletion und Canavanin wirkt. Dafür wurden die FD50- und U266-Myelomzellen über 24 bzw. 36 Stunden unter Argininmangel und Canavanin und unter der Kontrollbedingung mit Arginin jeweils mit und ohne Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Afuresertib bzw. Akti-1/2 inkubiert. Da Afuresertib bzw. Akti-1/2 in DMSO gelöst vorlagen, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit den äquivalenten Konzentrationen an DMSO ergänzt.

Für die FD50-Zellen sank nach 36 Stunden Inkubation der Anteil PI-positiver Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin durch Co-Inkubation mit Afuresertib bzw. Akti-1/2 in den meisten verwendeten Konzentrationen (Abbildung 4.18 A). Beide Akt-Inhibitoren wirkten somit protektiv hinsichtlich Viabilität für die FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung. Bei einmaliger Durchführung zeigte sich für 1  $\mu$ M Afuresertib der größte Überlebensvorteil. In Anwesenheit von Arginin wirkten Afuresertib und Akti-1/2 in den meisten Konzentrationen, und insbesondere 1  $\mu$ M Afuresertib, nicht toxisch in den FD50-Zellen. Daher wurde in den folgenden Versuchen Afuresertib in dieser Dosis eingesetzt. Zudem fand Afuresertib bereits in klinischen Studien für MM-Patienten Anwendung (Voorhees et al., 2013, Spencer et al., 2014, Tolcher et al., 2015). Für DMSO wurde eine leichte Tendenz zur Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen unter der Kombinationsbehandlung beobachtet. In den folgenden Versuchen wurde daher auch jeweils der Einfluss von DMSO untersucht. Außerdem wirkte es in hohen Dosen zytotoxisch für die FD50-Zellen.



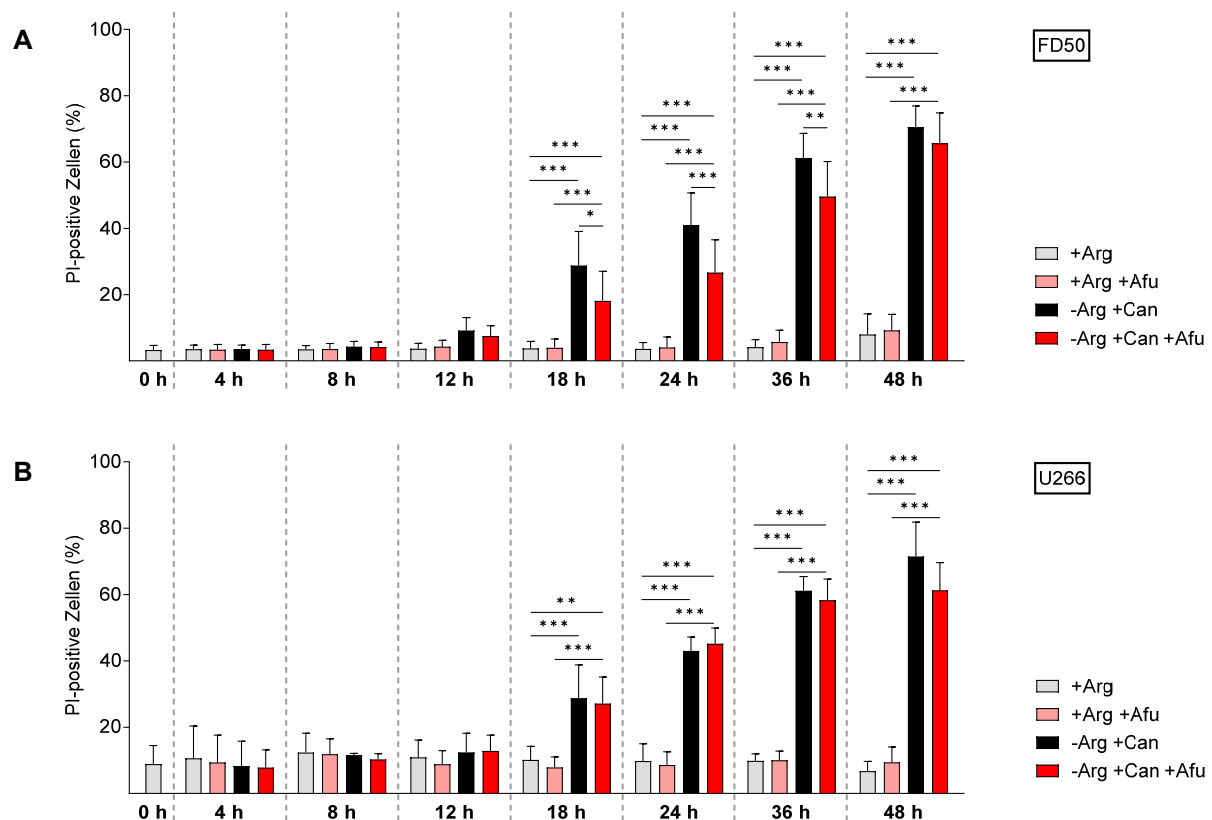
Auf die Viabilität der U266-Zellen hatte Afuresertib nach 24 Stunden Inkubation in den gewählten Konzentrationen keinen relevanten Einfluss (Abbildung 4.18 B). Durch Co-Inkubation mit Akti-1/2 wurde der Anteil PI-positiver U266-Zellen unter der Kombinationsbehandlung nur leicht reduziert. Mit zunehmender Akti-1/2-Konzentration nahm auch der Anteil PI-positiver Zellen unter Kontrollbedingungen zu. DMSO beeinflusste die Viabilität der U266 nicht.



**Abbildung 4.18: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Afuresertib bzw. Akti-1/2 auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** (A) FD50-Myelomzellen wurden über 36 Stunden und (B) U266-Myelomzellen über 24 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100  $\mu\text{M}$  Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration an Afuresertib bzw. Akti-1/2 oder DMSO inkubiert. In Klammern ist jeweils die in der Akti-Inhibitor-Lösung enthaltene DMSO-Konzentration angegeben. Die Säulen zeigen den Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Jeweils  $n = 1$ .

#### 4.6.2.2 Viabilitätsbestimmungen und Caspase 3-Spaltung von FD50- und U266-Zellen unter der optimalen Konzentration von Afuresertib: Zeitkinetiken

Für die weiteren Analysen des potenziell protektiven Effekts durch direkte Akt-Inhibition auf die Zellen unter Arginindepletion und Canavanin, wurde Afuresertib in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gewählt. FD50- und U266-Zellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden unter Argininmangel und 100  $\mu\text{M}$  Canavanin und unter der Kontrollbedingung mit 1 mM Arginin mit und ohne Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Afuresertib inkubiert. Da Afuresertib in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰) ergänzt. Im Anschluss wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil PI-positiver Zellen gemessen.

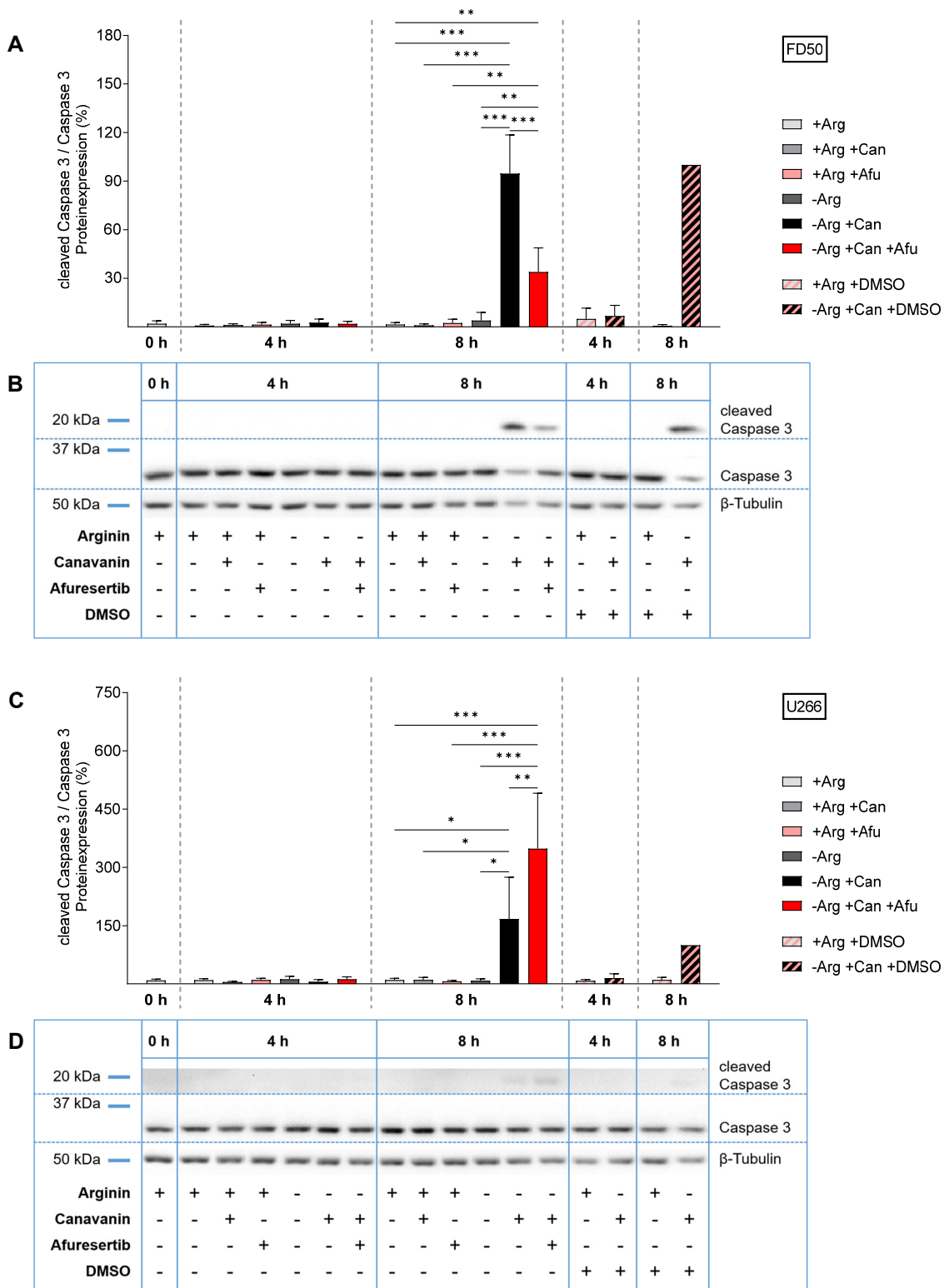


**Abbildung 4.19: Wirkung von Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu\text{M}$  Canavanin (Can), 1  $\mu\text{M}$  Afuresertib (Afu) und zur Kontrolle mit der zu Afuresertib äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an PI-positiven Zellen gemessen. Die Säulen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.23. Für die DMSO-Kontrollen (Tabelle 3.21) ist  $p > 0,05$ , daher wurde zur besseren Übersicht auf deren Darstellung verzichtet. (A)  $n = 6$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 4$ . (B)  $n = 4$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 3$ .

In den ersten 12 Stunden betrug der mittlere Anteil an PI-positiven FD50-Zellen unter allen Inkubationsbedingungen weniger als 9,2% (Abbildung 4.19 A). Nach 18 Stunden unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin nahm dieser Anteil deutlich zu und stieg mit der Zeit weiter an, wobei er sich jeweils nach 18, 24, 36 und 48 Stunden signifikant von der Kontrollbedingung mit Arginin unterschied. Nach 18, 24, 36 und 48 Stunden zeigte sich durch Co-Inkubation mit Afuresertib unter Arginindepletion und Canavanin eine Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen. Dieser Unterschied war nach 18, 24 und 36 Stunden signifikant: z. B. sank nach 24 Stunden der Anteil an PI-positiven unter Argininmangel und Canavanin von  $41 \pm 9,7\%$  auf  $26,7 \pm 9,9\%$  durch Co-Inkubation mit Afuresertib und nach 36 Stunden von  $61,2 \pm 7,4\%$  auf  $49,6 \pm 10,6\%$ . Jedoch erreichte der Anteil an PI-positiven Zellen unter Arginindepletion in Kombination von Canavanin und Afuresertib nicht das Niveau der Kontrollbedingung mit Arginin (18, 24, 36 h:  $p < 0,001$ ). Außerdem wirkte Afuresertib für die Zellen in Anwesenheit von Arginin zu keinem Zeitpunkt toxisch.

Für die U266-Zellen nahm ebenfalls der Anteil an PI-positiven Zellen unter Argininmangel und Canavanin verglichen mit der Kontrollbedingung nach 18, 24, 36 und 48 Stunden signifikant zu (Abbildung 4.19 B). Durch Co-Inkubation mit Afuresertib wurde dieser Anteil nur geringfügig und nicht signifikant verändert: Nach 48 Stunden sank er von  $71,5 \pm 10,4\%$  unter Arginindepletion mit Canavanin-Supplementation auf  $61,3 \pm 8,3\%$  ( $p = 0,7$ ). Außerdem zeigte sich für die U266 ebenfalls kein toxischer Effekt durch Afuresertib in Anwesenheit von Arginin.

Der Effekt von Afuresertib auf die Induktion von Apoptose auf Proteinebene wurde im folgenden Versuch analysiert. Dazu wurden FD50- und U266-Myelomzellen über 4 und 8 Stunden in An- und Abwesenheit von 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und 1  $\mu$ M Afuresertib inkubiert. Da Afuresertib in DMSO gelöst vorlag, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1%) ergänzt. Mittels Western Blot wurde dann die Expression der cleaved Caspase 3 bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression der DMSO-Kontrolle bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation nach 8 Stunden normiert (= 100%).



**Abbildung 4.20: Wirkung von Afuresertib auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 1  $\mu$ M Afuresertib (Afu) und zur Kontrolle mit der zu Afuresertib äquivalenten Konzentration an DMSO (1%) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der cleaved Caspase 3-Expression im Verhältnis zur Caspase 3, normiert auf das Verhältnis unter -Arg +Can +DMSO zum Zeitpunkt 8 h (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.24. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion der cleaved Caspase 3 und Caspase 3. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Jeweils n = 3.

Für die FD50-Zellen wurde auch in diesem Versuch nach 8 Stunden eine signifikant erhöhte cleaved Caspase 3-Expression unter Argininmangel und Canavanin im Vergleich zu allen anderen vier untersuchten Inkubationsbedingungen beobachtet (Abbildung 4.20 A, B). Durch Co-Inkubation mit Afuresertib wurde dieser signifikant von  $94,7 \pm 23,8\%$  auf  $33,9 \pm 14,8\%$  reduziert. Damit unterschied sich die Expression der cleaved Caspase 3 unter Argininmangel und Canavanin mit Afuresertib auch signifikant von der Expression in Anwesenheit von Arginin von  $1,4 \pm 1,2\%$  nach 8 Stunden. Durch Afuresertib wird in den FD50-Zellen in Anwesenheit von Arginin die cleaved Caspase 3 nicht induziert. DMSO zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion der cleaved Caspase 3 der FD50-Zellen.

Für die U266-Zellen war ebenfalls die cleaved Caspase 3 unter Argininmangel und Canavanin nach 8 Stunden im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin mit und ohne Canavanin-Supplementation und im Vergleich zu alleinigem Argininmangel signifikant erhöht (Abbildung 4.20 C, D). Die Co-Inkubation mit Afuresertib resultierte jedoch in einem weiteren, signifikanten Anstieg der Caspase 3-Spaltung von  $167,4 \pm 107,1\%$  auf  $348,3 \pm 142,7\%$  nach 8 Stunden. Nach 4 und 8 Stunden führte die Co-Inkubation mit Afuresertib unter der Kontrollbedingung nicht zur Induktion der cleaved Caspase 3. Auch DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die cleaved Caspase 3-Expression der U266-Zellen.

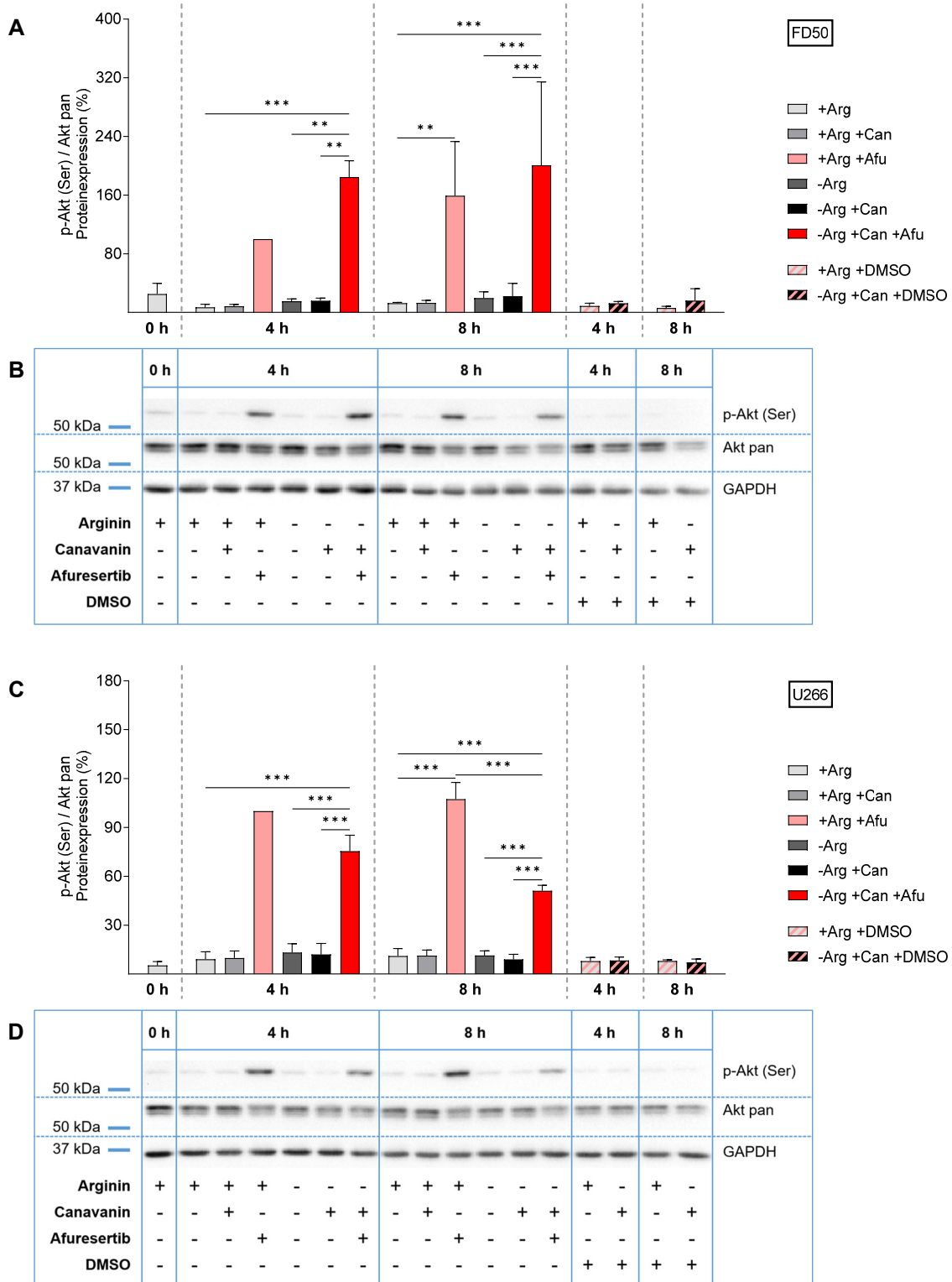
Zusammenfassend hatte Afuresertib und damit ein direkter Akt-Inhibitor für die FD50-Zellen einen hinsichtlich Viabilität und cleaved Caspase 3-Expression protektiven Effekt unter der Kombinationstherapie von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation. Für die U266-Zellen war dieser Effekt auf die Viabilität, wie aufgrund der Ergebnisse von Kapitel 4.6.1 bereits vermutet, nicht nachweisbar. Es reagierten die U266-Zellen auf eine Co-Inkubation mit Afuresertib unter der Kombinationsbehandlung jedoch mit einer Aktivierung der cleaved Caspase 3.

### 4.6.3 Wird durch Afuresertib Akt suffizient inhibiert?

Im Folgenden wurde untersucht, ob Afuresertib Akt in den beiden Myelomzelllinien suffizient inhibiert. Afuresertib ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der das aktive Zentrum von Akt und damit die Kinase-Aktivität blockiert. In der Folge wird Akt vermehrt an die Plasmamembran transloziert, was zu einer reaktiven Hyperphosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 durch PDK1 und mTORC2 führt (Kinoshita et al., 2018, Wiechmann et al., 2021). Die Inkubation der FD50- und U266-Zellen erfolgte analog der Caspase-Analyse von Kapitel 4.6.2.2. Im Anschluss wurde die Expression von p-Akt (Ser) bzw. p-Akt (Thr) mittels Western Blot bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Bedingung mit Arginin bei Afuresertib-Co-Inkubation nach 4 Stunden normiert (= 100%).

Für die FD50-Zellen war durch Co-Inkubation mit Afuresertib in Anwesenheit von Arginin und auch unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel mit Canavanin eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach 4 und 8 Stunden zu beobachten (Abbildung 4.21 A, B): Nach 8 Stunden stieg die Expressionsstärke von p-Akt (Ser) beispielsweise von  $22,1 \pm 17,5\%$  unter der Kombinationsbehandlung auf  $200,6 \pm 113,7\%$  durch Co-Inkubation mit Afuresertib. Die Hyperphosphorylierung von Akt ist das Resultat der suffizienten Hemmung von Akt durch Afuresertib. Unter den restlichen Inkubationsbedingungen ohne Afuresertib lag nur eine vergleichsweise geringe mittlere Expressionsstärke von p-Akt (Ser) von bis zu 25% vor.

Diese Beobachtungen für die FD50-Zellen ließen sich so auch für die U266-Zellen feststellen (Abbildung 4.21 C, D). Nach 4 und 8 Stunden stieg ebenfalls durch Co-Inkubation mit Afuresertib der Phosphorylierungsgrad von Akt an Ser473 sowohl in Anwesenheit von Arginin als auch in Abwesenheit von Arginin mit Canavanin-Supplementation signifikant an: z. B. nach 8 Stunden von  $9 \pm 3,1\%$  unter der Kombinationsbehandlung auf  $51,1 \pm 3,3\%$ . Unter den restlichen Inkubationsbedingungen ohne Afuresertib betrug der Mittelwert der p-Akt (Ser)-Expression bis zu 13,2%.



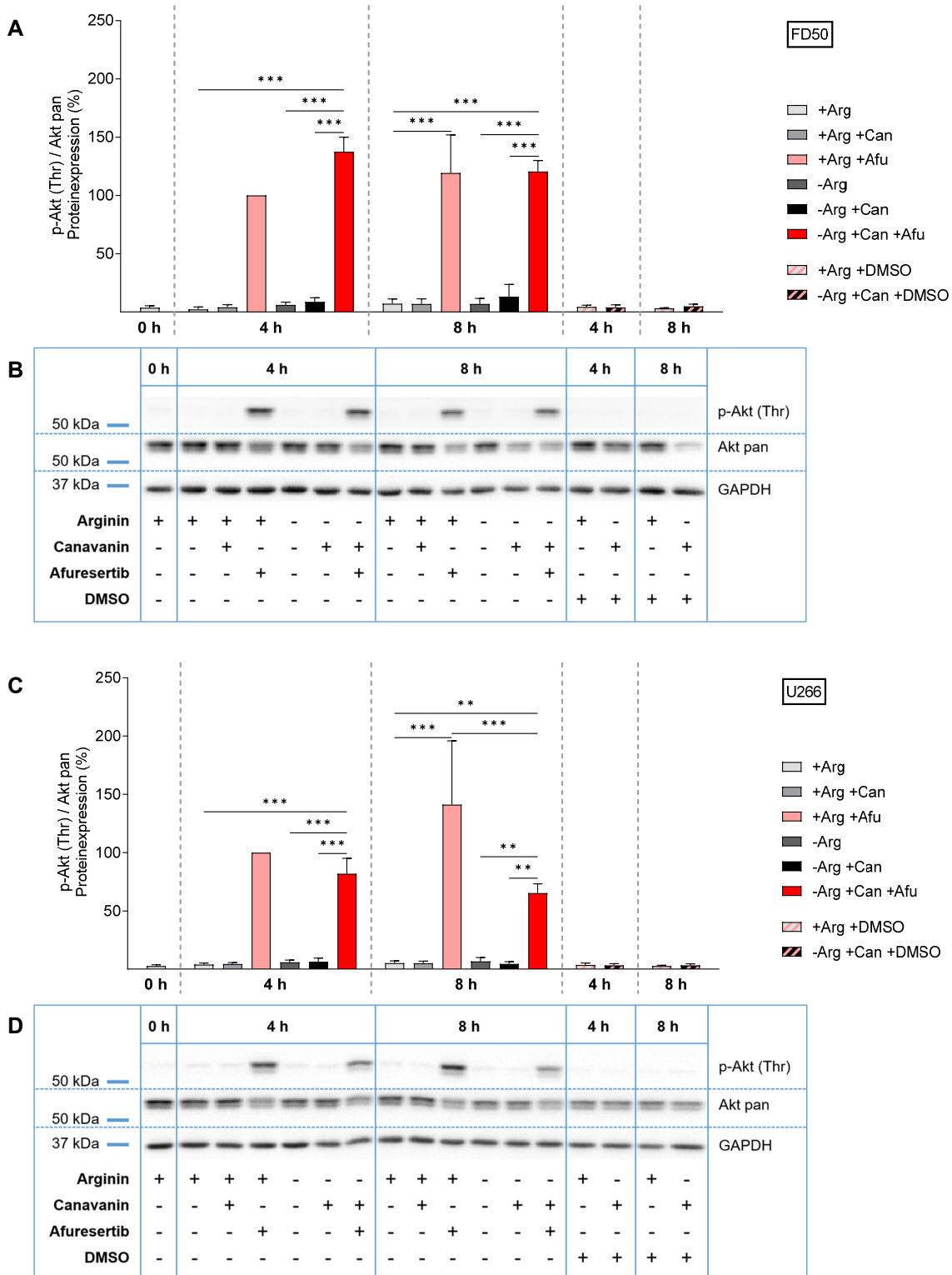
**Abbildung 4.21: Wirkung von Afuresertib auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.20. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-Akt (Ser)-Expression im Verhältnis zu Akt pan, normiert auf das Verhältnis unter +Arg +Afu zum Zeitpunkt 4 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-Akt (Ser473) und Akt pan. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Jeweils n = 3.

Auch für die Phosphorylierungsstelle an Threonin 308 zeigte sich für die FD50-Zellen eine signifikante Hyperphosphorylierung durch Co-Inkubation mit Afuresertib unter Argininpräsenz und unter Argininmangel und Canavanin nach 4 und 8 Stunden (Abbildung 4.22 A, B): exemplarisch nahm die p-Akt (Thr)-Expression nach 8 Stunden unter der Kombinationsbehandlung von  $13,2 \pm 10,4$  auf  $120,4 \pm 9,6\%$  durch Co-Inkubation mit Afuresertib zu. Die mittlere Expressionsstärke von p-Akt (Thr) unter den restlichen Bedingungen ohne Afuresertib lag bei max. 13,2%. Die für Abbildung 4.17 A beschriebene, signifikante Modulation von p-Akt (Thr) (ohne Afuresertib) in den FD50-Zellen ist hier nicht zu sehen. Dies ist in der massiven Hyperphosphorylierung von Akt (Thr) durch Afuresertib begründet, welche die sonstigen Unterschiede, wie z. B. unter Arginindepletion im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin (Abbildung 4.17 A) als marginal verschwinden lässt.

Durch Afuresertib stieg auch die p-Akt (Thr)-Expression der U266-Zellen unter der Kontrollbedingung mit Arginin und auch unter der Kombinationsbehandlung signifikant an (Abbildung 4.22 C, D): so nahm sie beispielsweise nach 8 Stunden von  $4,6 \pm 1,9\%$  unter der Kombinationsbehandlung auf  $65,3 \pm 8\%$  zu. Unter den übrigen Bedingungen ohne Afuresertib lag die Expression von p-Akt (Thr) bei max. 6,6%.

Zusammenfassend führte Afuresertib zu einer starken Inhibition von Akt in den FD50- und U266-Zellen.





**Abbildung 4.22: Wirkung von Afuresertib auf die Phosphorylierung von Akt an Thr308 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz und die statistische Analyse erfolgten für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 4.20. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der p-Akt (Thr)-Expression im Verhältnis zu Akt pan, normiert auf das Verhältnis unter +Arg +Afu zum Zeitpunkt 4 Stunden (= 100%), und die Standardabweichung in Prozent. (B, D) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit Detektion von p-Akt (Thr308) und Akt pan. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Jeweils n = 3.

#### 4.6.4 Wirkt die Kombination von Torin 1 und Afuresertib protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?

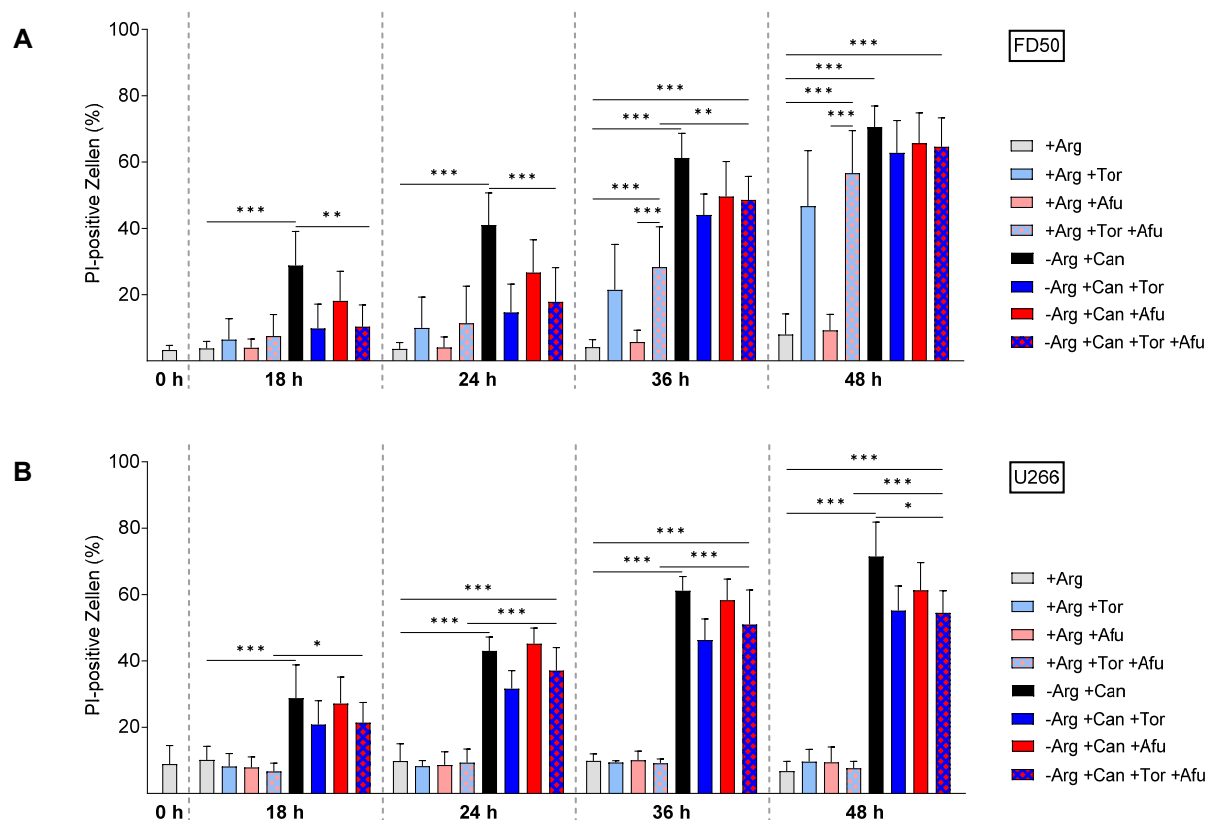
In den FD50- und U266-Zellen wurde durch Torin 1 die Viabilität bei Argininmangel und Canavanin verbessert und die Expression der cleaved Caspase 3 reduziert (Kapitel 4.4.1). In den FD50-Zellen gelang dies auch mit Afuresertib (Kapitel 4.6.2). Zudem führten beide Inhibitoren zu einer Inhibition von Akt in den FD50-Zellen (Kapitel 4.6.1 + 4.6.3). Mit dem folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Kombination der beiden Inhibitoren Torin 1 und Afuresertib auf die Viabilität der Zellen auswirkt. Dazu wurden FD50- und U266-Myelomzellen über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden in Anwesenheit von 1 mM Arginin und in Abwesenheit von Arginin mit Supplementation von 100  $\mu$ M Canavanin inkubiert. Zusätzlich erfolgte jeweils eine Co-Inkubation mit 500 nM Torin 1 und / oder 1  $\mu$ M Afuresertib unter den zuvor genannten Inkubationsbedingungen. Da Torin 1 und Afuresertib in DMSO gelöst vorlagen, wurde der Versuchsansatz um die entsprechenden DMSO-Kontrollen mit der äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰, 2‰) ergänzt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil PI-positiver Zellen gemessen. Der Einfluss einer alleinigen Torin 1- bzw. Afuresertib-Gabe auf die Viabilität der FD50 und der U266 unter der Kontrollbedingung mit Arginin bzw. unter Argininmangel und Canavanin wurde bereits erläutert (Abbildung 4.6, Abbildung 4.19) und ist daher in dieser Darstellung nicht mehr berücksichtigt.

Nach 18 und 24 Stunden war durch die gleichzeitige Inkubation mit Torin 1 und Afuresertib eine signifikante Reduktion des Anteils PI-positiver FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin zu beobachten, nach 36 Stunden jedoch nicht mehr ( $p = 0,32$ ) (Abbildung 4.23 A). Zum Zeitpunkt 24 Stunden sank dieser beispielsweise um  $17,8 \pm 10,3\%$ . Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied der Anteile PI-positiver Zellen unter Co-Inkubation mit Torin 1 oder Afuresertib mit der gleichzeitigen Inkubation beider Inhibitoren jeweils unter der Kombinationsbehandlung zu beobachten.

Nach 18 und 24 Stunden war noch kein signifikanter Einfluss der kombinierten Torin 1- und Afuresertib-Inkubation auf die Viabilität der FD50-Zellen in Anwesenheit von Arginin festzustellen. Nach 36 und 48 Stunden nahm der Anteil PI-positiver Zellen unter dieser Versuchsbedingung jedoch signifikant zu, verglichen mit der Kontrollbedingung. Gegenüber der alleinigen Co-Inkubation mit Torin 1 in Anwesenheit von Arginin unterschied er sich zu diesen Zeitpunkten nicht signifikant, jedoch

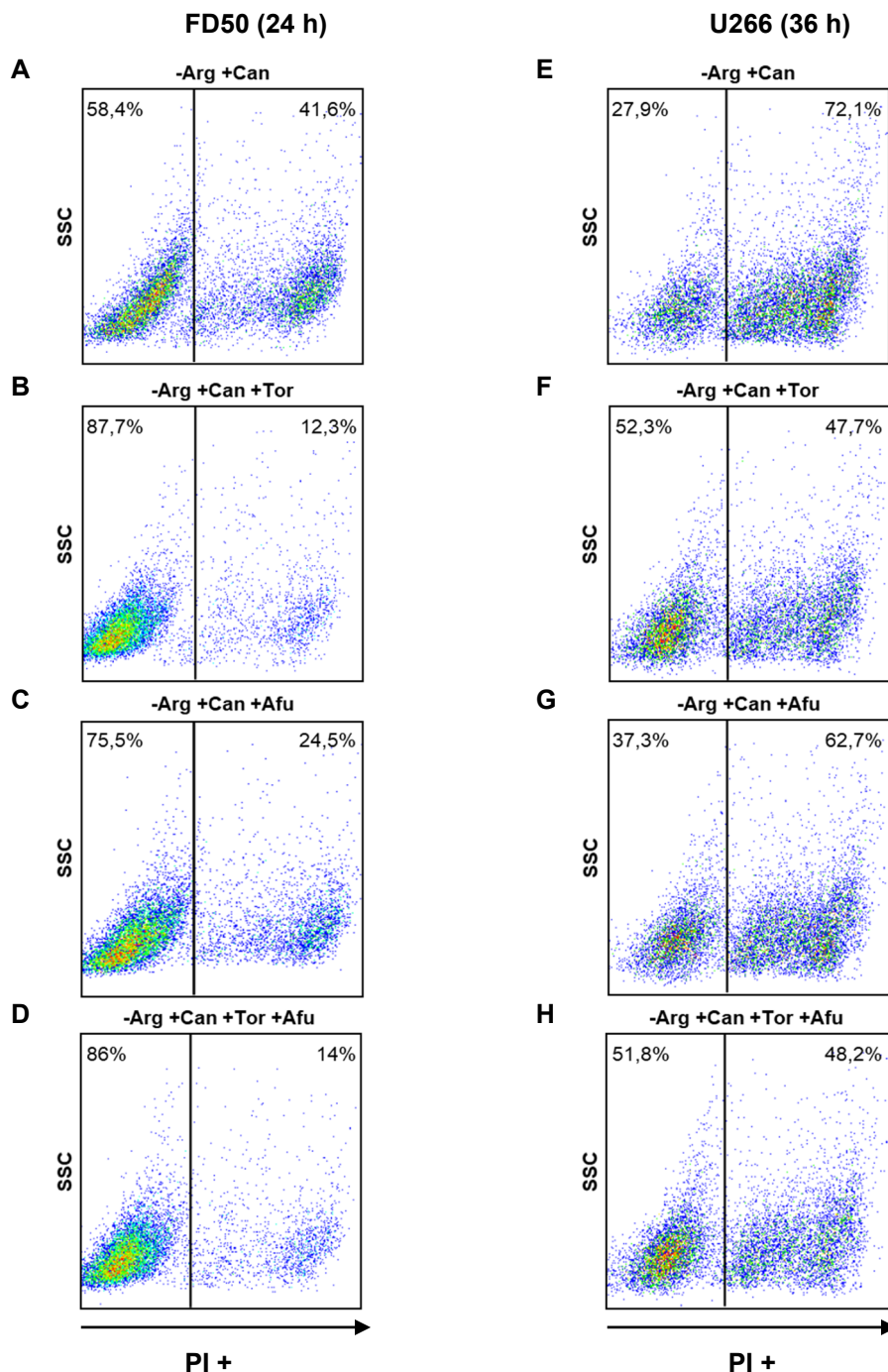
gegenüber der alleinigen Inkubation mit Afuresertib.

Für die U266-Zellen wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit Torin 1 und Afuresertib der Anteil PI-positiver Zellen unter Argininmangel und Canavanin zu allen Zeitpunkten tendenziell reduziert, jedoch war dieser Unterschied nur zum Zeitpunkt 48 Stunden signifikant (Abbildung 4.23 B). Ebenfalls unterschieden sich die Anteile an PI-positiven Zellen der alleinigen Inkubation mit Torin 1 oder Afuresertib mit der Kombination dieser Inhibitoren unter Argininmangel und Canavanin nicht signifikant voneinander. Zu allen gemessenen Zeitpunkten hatte die kombinierte Inkubation mit Torin 1 und Afuresertib keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der U266-Zellen bei Argininpräsenz.



**Abbildung 4.23: Wirkung der Kombination von Torin 1 und Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 500 nM Torin 1 (Tor), 1  $\mu$ M Afuresertib (Afu) und zur Kontrolle mit der zu Torin 1 bzw. Afuresertib bzw. der Kombination dieser Inhibitoren äquivalenten Konzentration an DMSO (1‰, 2‰) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) analysiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an PI-positiven Zellen gemessen. Die Säulen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Sidak Posttest. Die berücksichtigten Vergleichsbedingungen finden sich in Tabelle 3.25. Für die DMSO-Kontrollen (Tabelle 3.21) ist  $p > 0,05$ , daher wurde zur besseren Übersicht auf deren Darstellung verzichtet. Dies gilt ebenfalls für alle Bedingungen zu den Zeitpunkten 4, 8, und 12 Stunden, sodass auch sie nicht abgebildet sind. (A)  $n = 6$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 4$ . (B)  $n = 4$ , außer für die Inkubation über 48 Stunden:  $n = 3$ .

Abbildung 4.24 zeigt repräsentative Scatter Plots der FD50-Zellen nach 24 Stunden und der U266-Zellen nach 36 Stunden Inkubation unter der Kombinationsbehandlung und mit Co-Inkubation von Torin 1 oder Afuresertib bzw. der Kombination der beiden Inhibitoren.



**Abbildung 4.24: Wirkung von Torin 1 und Afuresertib auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Gezeigt sind repräsentative Scatter Plots (nach PI-Färbung) der Versuche von Abbildung 4.23. FD50- (linke Spalte) und U266- (rechte Spalte) Myelomzellen nach 24 bzw. 36 Stunden (h) Inkubation unter vollständiger Arginindepletion und 100  $\mu$ M Canavanin (-Arg +Can, (A + E)), in Kombination mit 500 nM Torin 1 (+Tor, (B + F)) oder 1  $\mu$ M Afuresertib (+Afu, (C + G)) oder beiden Inhibitoren (+Tor + Afu), (D + H)).

Zusammenfassend konnte zwar für die Kombination von Torin 1 und Afuresertib ein Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation in den FD50- und U266-Zellen nachgewiesen werden. Diese Kombination war jedoch einer alleinigen Torin 1-Gabe nicht überlegen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation wirkt zytotoxisch

Aufgrund eines veränderten Arginin-Metabolismus stellt die Arginindepletion eine potenzielle Therapiestrategie, insbesondere in ASS1-negativen und damit Arginin-auxotrophen Tumorzellen, dar (Tabe et al., 2019). Die anti-tumorale Wirksamkeit eines induzierten Argininmangels, u. a. durch die Arginin-abbauenden Enzyme ADI-PEG20 oder Arginase, wurde bereits präklinisch sowie in klinischen Phase I- bis III-Studien für viele verschiedene Tumorarten gezeigt (Assi and Faour, 2023). Auch in hämatologischen Neoplasien wie Leukämie- und Lymphom-Zellen erwies sich eine Arginindepletions-Therapie als wirksam (Gong et al., 2000, Hernandez et al., 2010, Morrow et al., 2013, Miraki-Moud et al., 2015, Delage et al., 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass die Proliferation von Myelomzelllinien unter Argininmangel bereits nach 24 Stunden eingeschränkt ist (Tschakert, 2020, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich auch für die Myelomzelllinie U226 eine Arginindepletion als toxisch (Kapitel 4.1). Dieser toxische Effekt wird durch Supplementation von Canavanin potenziert. Die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation führte in den U266-Zellen (Kapitel 4.1) und in der in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten FD50-Myelomzelllinie (Kapitel 4.4.1.2) effektiv zu Zelltod und bereits frühzeitig (nach 8 Stunden) zur Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose (Kapitel 4.1 + 4.4.1.2). Dies zeigt, dass die Myelomzellen innerhalb weniger Stunden unter der Kombinationsbehandlung in die Apoptose eintreten. Auch konfokalmikroskopisch waren in den FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin vermehrt pyknotische und karyorrhektische Zellkerne, als Zeichen der eingetretenen Apoptose, zu sehen (Kapitel 4.2). Dieser synergistische anti-tumorale Effekt aus Arginindepletion und Canavanin wurde bereits in verschiedenen soliden Tumoren gezeigt (Vynnytska-Myronovska et al., 2012, Kurlishchuk et al., 2016, Karatsai et al., 2020, Chen et al., 2021b). Auch in der murinen Leukämie-Zelllinie L1210 führte die Kombination von Arginase-vermittelter Arginindepletion und Canavanin zu einer Wachstumshemmung in vitro, in einer ersten in vivo-Studie hatte sie jedoch keinen therapeutischen oder – in tumorfreien Kontroll-Mäusen – toxischen Effekt (Vovk et al., 2016). Als Grund für das Nicht-Ansprechen der L1210-Zellen in vivo wurde die Expression der ASS1 diskutiert (Vovk et al., 2016). Eine Hochregulation der

ASS1 wurde bereits in einer Canavanin-resistenten humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie im Vergleich zu deren Wildtyp beobachtet (Su et al., 1981). Unsere Arbeitsgruppe konnte in einem Maus-Xenograft-Modell mit der funktionell Arginin-auxotrophen Myelomzelllinie NCI A2 zeigen, dass die Kombinationsbehandlung von ADI-PEG20 und Canavanin in einer signifikanten Zunahme der Überlebenszeit der Mäuse sowie einem verlängerten tumorfreien Überleben resultiert (Jacobi, 2019, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Die Kombinationsbehandlung hatte außerdem keine toxischen Effekte auf die Versuchstiere. Eine alleinige Monotherapie mit ADI-PEG20 bewirkte eine Verlangsamung des Tumorwachstums. Hingegen hatte eine Canavanin-Monotherapie keinen Einfluss auf das Wachstum der Xenograft-Tumoren. Diese Beobachtung ist für die aktuellen in vitro-Analysen vergleichbar: Eine alleinige Canavanin-Gabe führte nicht zum Zelltod der U266-Zellen in Anwesenheit von Arginin (Kapitel 4.1). Dies lässt sich durch die erhöhte Konkurrenzsituation mit Arginin um die Arginyl-tRNA erklären (Bence and Crooks, 2003, Igloi and Schiefermayr, 2009). Die Monotherapie mit Canavanin in Anwesenheit von Arginin bzw. ein alleiniger Argininmangel induzierten in den U266- und FD50-Zellen ebenfalls keine Zunahme der cleaved Caspase 3-Expression innerhalb der ersten 8 Stunden der Inkubationszeit (Kapitel 4.1 + 4.4.1.2). In einer Epidermoidkarzinom- und einer HCC-Zelllinie zeigte sich ebenfalls unter alleiniger Arginindepletion keine Aktivierung der Caspase 3 in den ersten 12 Stunden (Vynnytska et al., 2011). In dieser Studie war jedoch zu späteren Zeitpunkten eine Erhöhung der cleaved Caspase 3-Expression zu beobachten.



## 5.2 Bildung von Aggresomen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation

Es wurde bereits demonstriert, dass die Zytotoxizität von Canavanin hauptsächlich aus seinem Einbau in naszierende Proteine resultiert (Rosenthal et al., 1989, Swaffar and Ang, 1999, Vynnytska et al., 2011). Der tatsächliche Einbau von Canavanin in Proteine von Tumorzellen in Arginin-freiem Medium wurde für HCC- und Glioblastom-Zellen gezeigt (Knowles et al., 1975, Karatsai et al., 2020). Interessanterweise erfolgte der Abbau der aberranten, Canavanin-enthaltenden Proteine in HCC-Zellen um ein Vielfaches schneller als der der normalen Proteine (Knowles et al., 1975). Als Begründung wurde diskutiert, dass diese Proteine durch eine proteolytische Sequenz als fehlerhaft erkannt werden (Knowles et al., 1975). Dies könnte durch eine Polyubiquitin-Markierung der fehlgefalteten Proteine erklärt werden (Pankiv et al., 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation in Myelomzellen nur eine verhältnismäßig geringe Zunahme von fehlgefalteten, ubiquitinierten Proteinen bewirkt (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Die Analyse der Abbaurate der Canavanin-enthaltenden Proteine und eine parallele Quantifizierung dieser Proteine wäre daher auch für die Myelomzellen interessant. Als potenzieller Resistenzmechanismus gegen die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation könnte folglich der Abbau der fehlgefalteten Proteine eine besondere Rolle spielen. Neben dem UPS kommt dabei auch die Bildung von Aggresomen mit nachfolgender Aggrephagie und die Autophagie in Frage. In der aktuellen Arbeit wurden Aggresomen mittels Immunfluoreszenz-Färbung konfokalmikroskopisch nachgewiesen. In der Zwischenzeit wurden Methoden entwickelt, mit denen die gefärbten Aggresomen (PROTEOSTAT® Aggresome detection kit, Enzo Life Sciences) über eine Software quantifiziert werden können (Lesire et al., 2020).

In Anwesenheit von Arginin kam es durch Canavanin in den FD50-Zellen nicht zur Bildung von Aggresomen (Kapitel 4.2). Dies ergibt sich durch die erhöhte Konkurrenzsituation mit Arginin um die Arginyl-tRNA (Bence and Crooks, 2003, Igloi and Schiefermayr, 2009). Canavanin wird in Anwesenheit von ausreichend Arginin folglich nicht (in großen Mengen) in neue Proteine eingebaut, die dann z. B. über Aggrephagie abgebaut werden müssten. Dies passt auch zur Erkenntnis, dass Canavanin bei Argininpräsenz in den FD50-Zellen keine Apoptose induziert (Kapitel



4.1 + 4.4.1.2). In den FD50-Zellen waren zwar nach 12 Stunden unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation vermehrt Aggresomen zu beobachten (Kapitel 4.2). Jedoch war deren Absolutzahl ebenfalls verhältnismäßig gering und diese auch nicht in allen Zellen nachweisbar. Dies legt nahe, dass die Bildung von Aggresomen nicht einen entscheidenden protektiven Mechanismus für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung darstellen kann. Um in der Gesamtheit protektiv zu wirken, müssten vermutlich (nahezu) alle Zellen Aggresomen bilden. Dies könnte möglicherweise nach längerer Inkubationszeit der Fall sein. Allerdings zeigten die anderen Experimente dann auch einen derart hohen Anteil an nicht viablen Zellen (Kapitel 4.1 + 4.4.1.2), dass der Nachweis von Aggresomen fraglich erscheint. Möglicherweise sind andere Abbaumechanismen wie das UPS und die Autophagie ausreichend, sodass es nicht zur Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinaggregaten unter der Kombinationsbehandlung kommt. Im Folgenden (Kapitel 5.4.2) wird daher die Autophagie unter der Kombinationsbehandlung genauer betrachtet. Eine andere Erklärung für die geringe Anzahl an Aggresomen könnte sein, dass der Anteil an fehlgefalteten, Canavanin-enthaltenden Proteinen in der Myelomzelle zu gering ist. Diese verhältnismäßig geringen fehlgefalteten Proteine müssten jedoch dafür hoch toxisch sein, da unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation effektiv Zelltod induziert wird.

Die Erkenntnis, dass unter der Kombinationsbehandlung nur in wenigen Zellen Aggresomen gebildet werden, passt zu der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass der HDAC6-Inhibitor Ricolinostat nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität für die NCI A2-Myelomzellen nach 8 Stunden unter Arginindepletion und Canavanin führt (Sester, 2021, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Allerdings konnte für Ricolinostat bereits ein zytotoxischer Effekt in NCI-H929-Myelomzellen nachgewiesen werden (Mishima et al., 2015): Durch Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor Carfilzomib führte Ricolinostat zu einem beschleunigten Zelltod. Dabei verursacht Carfilzomib eine Akkumulation von aggregierten, ubiquitinierten Proteinen in Aggresomen, während Ricolinostat die Bildung von Aggresomen wiederum hemmt. Auch unter der Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin werden ubiquitinierte Proteine in Myelomzellen gebildet (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung), sodass durchaus eine erhöhte Zytotoxizität durch Ricolinostat zu erwarten gewesen wäre. Es ist daher zu empfehlen, diesen Versuch mit einer längeren Inkubationszeit der Kombinationsbehandlung mit Ricolinostat von 24 bis 48 Stunden (statt 8 Stunden)

zu wiederholen. Für eine bessere Vergleichbarkeit sollten diese Experimente ebenfalls in der FD50-Zelllinie durchgeführt werden. Zudem sollte überprüft werden, ob durch Ricolinostat in der verwendeten Konzentration die Bildung von Aggresomen effektiv gehemmt wird. Gegebenenfalls ist für einen synergistischen Effekt unter der Kombinationsbehandlung eine höhere Konzentration an Ricolinostat nötig. Eine Meta-Analyse klinischer Studien zur Therapie des rezidivierten Multiplen Myeloms ergab Ansprechraten von 38% für Ricolinostat und von 64% für Panobinostat (Gao et al., 2019). Panobinostat ist ein weiterer HDAC-Inhibitor, der bereits zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen ist (Richardson et al., 2016). Als unspezifischer HDAC-Inhibitor ist Panobinostat, neben der Hemmung der Deacetylierung von Histonen, auch in der Lage die Bildung von Aggresomen zu hemmen (Andreu-Vieyra and Berenson, 2014, San-Miguel et al., 2016, Pan et al., 2023). Folglich sollten diese Experimente (auch) mit Panobinostat durchgeführt werden, da dieser möglicherweise eine bessere Wirksamkeit in Myelomzellen zeigt. Und insbesondere da für Panobinostat bereits nachgewiesen werden konnte, dass er unter Arginindepletion die Proliferation von ASS1-negativen Pankreaskarzinom-Zellen in vitro und in vivo synergistisch hemmt (Kim et al., 2020).

### 5.3 Unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation erfolgt keine Induktion von CHOP als Teil der ER-Stress-Antwort

Myelomzellen sind aufgrund ihrer exzessiven Antikörper-Synthese für das Zellüberleben besonders auf die UPR angewiesen und neigen daher zu erhöhtem ER-Stress (Vincenz et al., 2013). In Leukämie-Zellen und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs konnte durch Arginindepletion ER-Stress induziert werden (Garcia-Navas et al., 2012, Morrow et al., 2013, Chen et al., 2021b). In humanen soliden Tumorzellen wurde ebenfalls unter Argininmangel ER-Stress induziert und nachgeschaltet die UPR über IRE1 $\alpha$  and ATF6 aktiviert, trotz Erhöhung von CHOP führte dies jedoch nicht zu einer erheblichen Apoptose-Induktion (Bobak et al., 2016). Als Grund dafür wurde eine anhaltende Aktivierung von Akt unter Arginindepletion diskutiert, die dem Eintritt in Apoptose entgegenwirkt. Durch den Einbau von Canavanin kommt es zur Fehlfaltung neu synthetisierter Proteine (Kapitel 2.4). Eine 24-stündige Inkubation unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion mit Canavanin-Supplementation resultierte dazu passend in einem Anstieg von ER-Stress und Apoptose über eine erhöhte CHOP-Expression im Vergleich zu alleiniger Arginindepletion in Kolonkarzinom-Zellen (Bobak et al., 2016). Auch in Glioblastom-Zellen und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs führte die Kombinationsbehandlung zu einer Induktion von ER- Stress und Apoptose, auch wenn die Expression von CHOP nicht höher ausfiel als unter alleiniger Arginindepletion (Karatsai et al., 2020, Chen et al., 2021b). Erklärt werden konnte dies für die Plattenepithelkarzinome mit Hilfe eines Knockdown-Modells: Dies ergab, dass der IRE1 $\alpha$ -Pfad der UPR eine wichtige Rolle für den Zelluntergang unter alleiniger Arginindepletion, jedoch nicht unter der Kombinationsbehandlung, spielt. Für den Zelltod unter der Kombinationsbehandlung erwiesen sich jedoch ATF4 und CHOP des PERK-Pfades als notwendig (Chen et al., 2021b).

In dieser Arbeit war in den NCI A2-Myelomzellen unter Argininmangel tendenziell wie erwartet eine Erhöhung der CHOP-Expression im Vergleich zu Argininpräsenz zu verzeichnen, diese war jedoch nicht signifikant (Kapitel 4.3). Im Vergleich zur alleinigen Arginindepletion war durch zusätzliche Canavanin-Supplementation kein Unterschied in der CHOP-Expression der NCI A2-Zellen nach 4 und 8 Stunden festzustellen (Kapitel 4.3). Dies passt zu den Ergebnissen für die Glioblastom-Zellen und die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Karatsai et al., 2020, Chen et al., 2021b). Im Vergleich zu Argininpräsenz war unter der Kombinationsbehandlung tendenziell eine Erhöhung der CHOP-mRNA-Expression in den NCI A2-Zellen zu

beobachten, dieser Effekt war jedoch ebenso nicht signifikant. Die in diesem Experiment vergleichsweise kurze Inkubationszeit von maximal 8 Stunden, gegenüber 24 bis 72 Stunden (Bobak et al., 2016), legt die Vermutung nahe, dass zu einem späteren Zeitpunkt unter Arginindepletion mit einer höheren CHOP-Expression zu rechnen wäre.

In zwei weiteren Myelomzelllinien (FD50, U266) wurde außerdem nach 8 Stunden unter Arginindepletion keine Apoptose-Induktion nachgewiesen (Kapitel 4.1 + 4.4.1.2). Erste signifikante toxische Effekte in den U266-Zellen unter Arginindepletion traten nach 36 Stunden auf (Kapitel 4.1). Allerdings resultierte die Kombinationsbehandlung in den FD50- und U266-Zellen, anders als eine alleinige Arginindepletion, bereits nach 8 Stunden in einer signifikanten Apoptose-Induktion (Kapitel 4.1 + 4.4.1.2). Dies konnte unsere Arbeitsgruppe auch für die NCI A2-Zellen nachweisen (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). In bereits apoptotischen Zellen (ab 8 Stunden) unter der Kombinationstherapie von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation ist mit zunehmender Zeit hingegen kein Anstieg der mRNA-Expression von CHOP zu erwarten. Sofern man die Ergebnisse der NCI A2-Zellen auf die Myelomzelllinien FD50 und U266 übertragen kann, würde dies vermuten lassen, dass die Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung (zumindest zu diesen frühen Zeitpunkten) nicht hauptsächlich über CHOP bzw. ER-Stress vermittelt ist.

Wie in den Kolonkarzinom-Zellen und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Bobak et al., 2016, Chen et al., 2021b), hatte Canavanin in Anwesenheit von Arginin keinen Einfluss auf die CHOP-Expression der NCI A2-Zellen (Kapitel 4.3). Dies lässt sich durch die erhöhte Konkurrenzsituation mit Arginin um die Arginyl-tRNA erklären (Bence and Crooks, 2003, Igloi and Schiefermayr, 2009). Da Canavanin folglich nicht (in großen Mengen) in neue Proteine eingebaut wird, die in ihrer Tertiärstruktur aberrant sind, führt dies auch nicht zur Induktion von ER-Stress.

Tunicamycin stört die Glykosylierung von Proteinen und dadurch entstehen fehlgefaltete Proteine, die wiederum zu ER-Stress und einer Aktivierung der UPR führen (Wang et al., 2020b). Dies wurde beispielsweise in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt (Wang et al., 2020b). Durch Tunicamycin wird in Kolonkarzinom-Zellen bei An- und Abwesenheit von Arginin die CHOP-Expression als Zeichen der aktivierten UPR verstärkt (Bobak et al., 2016). Dieser Effekt zeigte sich auch in den NCI A2-Zellen in Anwesenheit von Arginin (Kapitel 4.3). Die für diese Versuchsreihe geplante Positivkontrolle für eine hohe CHOP-Expression mittels

Tunicamycin war somit erfolgreich. Unter der Kombinationsbehandlung stieg zwar tendenziell die CHOP-Expression durch Co-Inkubation mit Tunicamycin, dies war jedoch nicht signifikant. Auch in diesem Fall, könnte eine längere Inkubationszeit möglicherweise in einer höheren CHOP-Expression resultieren. Dies wird durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gestützt: Tunicamycin wirkte protektiv für FD50- und NCI A2-Zellen unter der Kombinationstherapie von Argininmangel und Canavanin-Supplementation und somit waren nach 8 Stunden weniger Zellen in Apoptose gegangen (Bülbül, 2018, Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung).

## **5.4 Inhibition von mTOR mittels Torin 1 wirkt protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

### **5.4.1 Torin 1 bewirkt einen Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin- Supplementation**

Es ist bekannt, dass durch Inhibition von mTORC1 Autophagie induziert werden kann (Klionsky et al., 2021). Um Autophagie als potenziellen Resistenzmechanismus unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin zu überprüfen, sollte diese daher gezielt induziert werden. Tatsächlich war durch den mTOR-Inhibitor Torin 1 unter Arginindepletion und Canavanin der Anteil an toten FD50- und U266-Zellen signifikant verringert (Kapitel 4.4.1). Außerdem wurde durch Torin 1 die cleaved Caspase 3-Expression nach 8 Stunden auf Niveau der Kontrollbedingung mit Arginin gesenkt. Torin 1 wirkte somit protektiv und konnte zeitweise eine Resistenz für die Myelomzellen gegenüber der Kombinationsbehandlung erreichen. Dieser protektive Effekt von Torin 1 sollte in Zusammenhang mit der Kombinationsbehandlung als Besonderheit herausgestellt werden. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass durch Inhibition von mTORC1 mittels Torin 1 im aktuellen Modell mit FD50- und U266-Myelomzellen unter der Kombinationstherapie Autophagie induziert wird. Durch Autophagie hätten die Myelomzellen möglicherweise wieder ausreichend Arginin recycelt und in der Folge weniger Canavanin in naszierende Proteine eingebaut.

Es zeigten sich für die FD50-Zellen ähnliche Tendenzen auch mit Rapamycin, einem weiteren mTOR-Inhibitor (Anhang 8.2). Im Allgemeinen werden mTOR-Inhibitoren, wie Torin 1, potenziell zur anti-tumoralen Therapie eingesetzt (Badura et al., 2013, Francipane and Lagasse, 2013, Simioni et al., 2014, Magaway et al., 2019). Der toxische Effekt von 250 nM Torin (2) auf das Überleben und die Proliferation der Myelom-Zelllinie RPMI-8226 und von Leukämie-Zelllinien nach 18 Stunden Inkubation wurde bereits demonstriert (Park et al., 2016). Auch Torin 1 zeigte in Anwesenheit von Arginin in der vorliegenden Arbeit nach 36 und 48 Stunden einen signifikanten, toxischen Effekt auf die FD50-Zellen, nicht jedoch auf die U266-Zellen (Kapitel 4.4.1.2). Berücksichtigt werden sollte, dass die U266-Zelllinie von einem Myelom-Patienten stammt, der bereits vortherapiert wurde. Die Zelllinie könnte daher möglicherweise weniger empfindlich auf gewisse Therapien reagieren. Die FD50-Zelllinie stammt hingegen von einem Patienten mit Primärer Plasmazellleukämie. Zudem wurden bereits in anderen Zelllinien Torin-Resistenzen beschrieben (Park et al., 2016). Auch die NCI A2-Zellen waren in der aktuellen Arbeit gegenüber einer Torin 1-Gabe unempfindlich (Kapitel 4.4.1.1).

Zu frühen Zeitpunkten (nach 4 und 8 Stunden) bedingte Torin 1 in Anwesenheit von Arginin keine erhöhte cleaved Caspase 3-Expression und wirkte daher für die FD50- und U266-Zellen nicht toxisch (Kapitel 4.4.1.2). Nach längerer Inkubationszeit wäre in Analogie zu den durchflusszytometrischen Messungen mit einer Erhöhung der cleaved Caspase 3-Expression als Zeichen der eingetretenen Apoptose zumindest in den FD50-Zellen zu rechnen.

#### **5.4.2 Unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation und durch Torin 1 in diesem Modell keine Autophagie-Induktion**

Autophagie wird im Multiplen Myelom vor allem als Überlebensmechanismus betrachtet, welcher der Proteinhomeostase durch den Abbau fehlgefalteter Proteine dient und bei vermehrtem Proteinstress, wie z. B. durch Proteasom-Inhibitoren, induziert werden kann (Yun et al., 2017). Unter Arginindepletion kann in T-ALL-, Prostatakarzinom-, Ovarialkarzinom- und Mammakarzinom-Zellen durch Autophagie proteingebundenes Arginin recycelt werden (Kim et al., 2009b, Garcia-Navas et al., 2012, Shuvayeva et al., 2014, Wang et al., 2014a). Autophagie stellt somit einen gewissen zytoprotektiven Resistenzmechanismus dar, sie kann andererseits aber auch an der Zelltodinduktion beteiligt sein (Wu et al., 2012, García Ruiz et al., 2022). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin in den NCI A2- und FD50-Myelomzellen nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der fehlgefalteten ubiquitinierten Proteine führt (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Myelomzelle erfolgreich ihre zellulären Abbausysteme nutzt und die Canavanin-enthaltenden, fehlgefalteten Proteine abbaut. In HCC-Zellen müssen diese Canavanin-enthaltenden Proteine spezifisch als aberrant erkannt werden, da ihr Abbau um ein Vielfaches schneller erfolgt als der der normalen Proteine (Knowles et al., 1975). Zu den wichtigsten zellulären Proteinabbaumechanismen zählt die Autophagie. Diese wurde auch als potenzieller Resistenzmechanismus in dem Maus-Myelom-Modell unserer Arbeitsgruppe diskutiert: Es zeigte sich trotz guten Ansprechens unter der Kombinationsbehandlung mit ADI-PEG20 und Canavanin im Verlauf eine Progression der Xenograft-Tumoren. In den Tumor-Lysaten der Versuchstiere nach der Kombinationsbehandlung war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen eine erhöhte Expression von LC3-II nachweisbar (Jacobi, 2019, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). LC3-II als ein Bestandteil der

Autophagosomen-Membran ist erhöht, wenn Autophagie in der Zelle abläuft (Delage 2012). Dies könnte für eine erhöhte Bildung von Autophagosomen unter der Kombinationsbehandlung sprechen. Jedoch kann auch durch Hemmung der späten Autophagie, z. B. durch Chloroquin, LC3-II akkumulieren (Delage 2012). Eine verlässliche Aussage über die tatsächliche autophagische Aktivität liefert der autophagische Flux, indem man die Differenz der LC3-II-Expression in An- und Abwesenheit lysosomaler Hemmstoffe betrachtet (Mizushima et al., 2010, Klionsky et al., 2021). Ist also der autophagische Flux erhöht, dann wird vermehrt Autophagie induziert (Mizushima et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass die Kombination aus Argininmangel und Canavanin wider Erwarten keinen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux in den FD50- und U266-Zellen in vitro hatte und von der Tendenz eher mit einem reduzierten autophagischen Flux einherging (Kapitel 4.4.2). Auch die p62-Expression unter dieser Bedingung blieb unbeeinflusst.

Die beiden Autophagie-Marker LC3-II und p62 werden beide selbst über Autophagie abgebaut (Pankiv et al., 2007). Daher sinkt die Expression von intrazellulärem p62 bei zunehmender autophagischer Aktivität (Mizushima et al., 2010). Wird die Autophagie gehemmt, liegt wieder vermehrt intrazelluläres p62 vor (Pankiv et al., 2007). Durch den Einbau in Proteinaggregate kann jedoch auch vermehrt p62 vorliegen (Pankiv et al., 2007). Daher sollte p62 immer in Zusammenschau mit anderen Autophagie-Markern betrachtet werden, insbesondere auch, da seine Expression zelltypabhängig und Therapie-spezifisch ist (Klionsky et al., 2021). Wird in der aktuellen Arbeit p62 in Zusammenschau mit dem autophagischen Flux betrachtet, spricht dies dafür, dass die Kombinationsbehandlung in den beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Autophagie hat. Dies würde dazu passen, dass in Versuchen unserer Arbeitsgruppe durch Chloroquin, als Inhibitor der späten Phase der Autophagie, keine Erhöhung der Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung in den NCI A2- und FD50-Zellen erreicht wurde (Bülbül, 2018, Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Eine alleinige Arginindepletion und eine alleinige Canavanin-Supplementation bei Arginin-Suffizienz hatten ebenfalls keinen Einfluss auf den autophagischen Flux, sowie auf die p62- und die BAG3-Expression in den FD50- und U266-Zellen (Kapitel 4.4.2). Auch an dieser Stelle kann eingewendet werden, dass die Proteinspiegel nach nur 8 Stunden Inkubation untersucht wurden. Es ist daher zu empfehlen auch zu einem späteren Zeitpunkt die Autophagie zu betrachten, da eine Induktion von Autophagie theoretisch möglich ist bzw. ausgeschlossen werden sollte. Mit der Zeit nimmt jedoch



auch der Anteil an toten Zellen unter der Kombinationsbehandlung zu. Selbst wenn Autophagie zu einem späteren Zeitpunkt als Überlebensmechanismus induziert werden würde, so wäre er in diesem in vitro-Modell nicht ausreichend protektiv. Jedoch kann Autophagie auch als Zelltodmechanismus fungieren. In der Myelomzelllinie RPMI8226 wurden Autophagie und Apoptose unter Nährstoffmangel nach 6 bis 18 Stunden induziert (Zeng et al., 2012). Eine zeitabhängige Induktion sollte daher auch für die FD50- und U266-Zellen überprüft werden.

Im Gegensatz zum autophagischen Flux und der p62-Expression, resultierte die Kombination von Argininmangel mit Canavanin-Supplementation der FD50- und U266-Zellen in einer signifikant erhöhten Expression von BAG3 (Kapitel 4.4.2). BAG3 ist an der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie beteiligt (Stürner and Behl, 2017). Dies spricht für einen erhöhten Proteinstress durch die Canavanin-enthaltenden, fehlgefalteten Proteine unter der Kombinationsbehandlung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombinationsbehandlung zwar zu einer erhöhten Expression von BAG3 führt, es jedoch nicht zur vollständigen Makroautophagie kommt. In vitro scheint die Autophagie folglich als protektiver Mechanismus für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung keine Rolle zu spielen.

Es wurde bereits vielfältig demonstriert, dass durch Inhibition von mTORC1 Autophagie induziert wird (Klionsky et al., 2021). Speziell durch Torin 1 wurde in Kolonkarzinom-Zellen Autophagie induziert (Francipane and Lagasse, 2013). Durch den mTOR-Inhibitor Torin 1 wurde das Überleben der FD50- und U266-Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin signifikant verbessert (Kapitel 4.4.1.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass Torin 1 durch Induktion von Autophagie in diesem Modell protektiv wirkt. Wider Erwarten wurde mittels Torin 1 in den FD50- und U266-Zellen kein signifikanter Anstieg des autophagischen Fluxes bzw. eine signifikante Modulation der p62-Expression nachgewiesen (Kapitel 4.4.2). Auch hier könnte möglicherweise die kurze Inkubationszeit eine Rolle spielen. Jedoch zeigte sich der protektive Effekt von Torin 1 durch Reduktion der cleaved Caspase 3 bereits nach 8 Stunden. Zudem wurde innerhalb von 8 Stunden eine erfolgreiche Inhibition von mTORC1 durch Torin 1 anhand der Dephosphorylierung des nachgeschalteten 4E-BP1 demonstriert (Kapitel 4.5.1). Dies lässt vermuten, dass der protektive Mechanismus von Torin 1 unter der Kombinationsbehandlung bereits frühzeitig einsetzt. Zudem richtete sich die Wahl der eingesetzten Torin 1-

Konzentration danach, wie stark der Anteil der toten Zellen unter der Kombinationsbehandlung reduziert und nicht danach, ob Autophagie effektiv induziert wurde. Hingegen bedingte die Co-Inkubation mit Torin 1 der FD50- und U266-Zellen unter der Kombinationsbehandlung eine deutliche Reduktion der BAG3-Expression (Kapitel 4.4.2). Dies spricht dafür, dass durch Torin 1 weniger BAG3-gebundene, fehlgefaltete Proteine in der Zelle vorliegen. Eine mögliche Erklärung dafür, nämlich Autophagie als Proteinabbaumechanismus, kann anhand der bisherigen Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen werden. Um den protektiven Mechanismus von Torin 1 unter der Kombinationsbehandlung aufzuklären, ist die Betrachtung weiterer durch Torin 1 beeinflusster Signalwege notwendig. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Torin 1 als potenzieller Autophagie-Induktor, protektiv für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung wirkt. Dessen protektiver Mechanismus beruht jedoch nicht auf Autophagie.

### 5.4.3 mTORC1-Inhibition durch Torin 1

Der mTORC1-Komplex ist im Multiplen Myelom oft hyperaktiviert, was zu unkontrolliertem Wachstum und aberranter Proliferation führt (Ghobrial et al., 2016). Arginindepletion bedingte eine Hemmung von mTORC1 und damit eine Dephosphorylierung von 4E-BP1 und p70S6K in Melanom- und Prostatakarzinom-Zellen (Feun et al., 2008, Kim et al., 2009b). Ebenso bedingte die Kombination von Argininmangel und Canavanin die Dephosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 und von 4EBP1 in Glioblastom-Zellen (Karatsai et al., 2020). In dieser Arbeit hatte die An- oder Abwesenheit von Arginin bzw. Canavanin für die FD50- und U266-Myelomzellen im Vergleich wider Erwarten keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von mTOR und der p70S6K1 (Kapitel 4.4.3). Auch an dieser Stelle muss jedoch die vergleichsweise kurze Inkubationszeit berücksichtigt werden. Des Weiteren ist für die Aussage über die mTORC1-Aktivität auch eine Betrachtung von 4E-BP1 nötig (Kapitel 5.5.1).

Torin 1 ist ein potenter mTORC1-Inhibitor (Thoreen et al., 2009, Badura et al., 2013). Auch in der Myelom-Zelllinie RPMI-8226 und in Leukämie-Zelllinien wurde durch Torin (2) die mTORC1-Aktivität (analysiert nach 18 Stunden) gehemmt, was sich in der Dephosphorylierung der p70S6K und von 4E-BP1 widerspiegelte (Park et al., 2016). Tendenziell wurde durch Co-Inkubation mit Torin 1 in den FD50- und U266-

Myelomzellen sowohl in Anwesenheit von Arginin als auch unter Argininmangel und Canavanin der Grad an Phosphorylierung von mTOR (an Ser2448) und der dem mTORC1 nachgeschalteten p70S6K1 (an Thr389) tendenziell vermindert (Kapitel 4.4.3). Für signifikante Effekte, vor allem in Bezug auf die p70S6K1, wäre vermutlich eine längere Inkubationszeit nötig. Zum Vergleich wurde in den FD50-Zellen durch Torin 1 in Anwesenheit von Arginin erst nach 36 Stunden eine Toxizität erreicht (Kapitel 4.4.1.2). Zu erwarten wäre daher, dass zu diesem Zeitpunkt auch eine suffiziente mTORC1-Inhibition erreicht wird. Zudem muss beachtet werden, dass in den vorbereitenden Versuchen die Konzentration von 500 nM Torin 1 aufgrund des stärksten Effekts auf das Überleben der Myelomzellen gewählt wurde und nicht aufgrund der stärksten mTORC1-Inhibition. Für eine Aussage über die Funktion des mTORC1, müssen die nachgeschalteten Effektorproteine betrachtet werden: Dazu zählt neben der p70S6K1 auch 4E-BP1. Durch Torin 1 wird 4E-BP1 in Anwesenheit von Arginin und unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin signifikant dephosphoryliert (Kapitel 4.5.1). Torin 1 erfüllt somit seine Funktion als mTORC1-Inhibitor in dem präsentierten Modell. Die weitere Betrachtung von 4E-BP1 erfolgt in Kapitel 5.5.1.

## **5.5 Reduktion der Proteintranslation als Resistenzmechanismus unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

### **5.5.1 Hemmung der Translation bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation durch Torin 1**

Torin 1 wirkt in diesem Modell nicht über Induktion von Makroautophagie für die beiden Myelomzelllinien FD50 und U266 unter der Kombinationsbehandlung protektiv. Daher liegt im Folgenden noch einmal der Fokus auf der mTORC1-Aktivität. Um die Aktivität des mTORC1 und damit eine suffiziente Inhibition durch Torin 1 zu beurteilen, kann der Phosphoryierungsgrad des, dem mTORC1 nachgeschalteten, Translationsrepressorproteins 4E-BP1 und der p70S6K1 dienen (Bhaskar and Hay, 2007). Die Inhibition von mTORC1 durch Torin 1 zeigte sich für die FD50- und U266-Zellen in einer signifikanten Reduktion der phosphorylierten, inaktiven Form von 4E-BP1 sowohl unter Inkubation mit Arginin als auch unter Arginindepletion und Canavanin (Kapitel 4.5.1). Torin 1 sollte folglich in beiden Zelllinien zu einer Hemmung der Translation führen.

Eine Arginindepletion führte in Melanom-, Prostatakarzinom- und Kolonkarzinom-Zellen zu einer Hemmung der mTORC1-Aktivität und der nachfolgenden Dephosphorylierung von 4E-BP1 und p70S6K und damit einer Hemmung der Proteintranslation (Feun et al., 2008, Kim et al., 2009b, Hsueh et al., 2012, Vynnytska-Myronovska et al., 2016, Alexandrou et al., 2018). In den FD50- und U266-Zellen bedingte eine Arginindepletion wider Erwarten keine Änderung des Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 (Kapitel 4.5.1). Dies könnte durch die vergleichsweise kurze Inkubationszeit begründet sein.

Die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin senkte die p-4E-BP1 (Thr37/46)-Expression jedoch im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin signifikant (Kapitel 4.5.1). Unter der Kombinationsbehandlung reagierten die beiden Zelllinien bereits intrinsisch mit der Dephosphorylierung von 4E-BP1 und damit einer Translationshemmung. Sie hemmten also ihre eigene mTORC1-Aktivität und konsekutiv vermutlich auch die Translation. Dies stellt einen potenziellen Resistenzmechanismus dar, da die Zytotoxizität von Canavanin auf seinem Einbau in naszierende Proteine beruht (Rosenthal et al., 1989, Swaffar and Ang, 1999, Vynnytska et al., 2011). Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation in Myelomzellen keine wesentliche Zunahme von fehlgefalteten,

ubiquitinierten Proteinen bewirkt (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Dies hätte in einem verstärkten Abbau begründet sein können. So erfolgte beispielsweise der Abbau der aberranten, Canavanin-enthaltenden Proteine in HCC-Zellen um ein Vielfaches schneller als der der normalen Proteine (Knowles et al., 1975). Dies scheint aber vielmehr darin begründet zu sein, dass die Myelomzellen weniger toxische, Canavanin-enthaltende Proteine synthetisieren. Dies lässt vermuten, dass die Zellen spezifisch darauf reagieren können, dass unter der Kombinationsbehandlung toxische Proteine entstehen. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um den genauen Zytotoxizitätsmechanismus zu verstehen. Insgesamt legen die bisherigen Ergebnisse jedoch nahe, dass die Translationshemmung in den Myelomzellen nicht Teil des Toxizitätsmechanismus der Kombinationsbehandlung ist, sondern einen potenziellen Resistenzmechanismus darstellt. Diese Hypothese wird dadurch verstärkt, dass eine zusätzliche Translationshemmung durch Torin 1 für die Myelomzelllinien FD50 und U266 protektiv wirkt. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Tunicamycin über Induktion der UPR protektiv für FD50- und NCI A2-Zellen unter der Kombinationstherapie von Argininmangel und Canavanin-Supplementation wirkt (Bülbül, 2018, Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Durch Induktion der UPR wird ebenfalls die Translation inhibiert (Chambers and Marciniak, 2014). Dass durch Torin 1 und Tunicamycin tatsächlich die Translation unter der Kombinationstherapie inhibiert wird, konnte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls demonstrieren (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung).

Zusammenfassend hemmt Torin 1 in den FD50- und U266-Zellen suffizient die mTORC1-Aktivität, was sich in einer nahezu kompletten Dephosphorylierung von 4E-BP1 widerspiegelt, hat aber nur einen schwachen Effekt auf die Autophagie. Bei einer effektiven mTORC1-Inhibition, wäre ein Anstieg des autophagischen Fluxes zu erwarten gewesen (Kapitel 2.8.2). Durch Torin 1 wurden die BAG3-Spiegel jedoch signifikant reduziert, was dafür spricht, dass durch Torin 1-Applikation weniger BAG3-gebundene, fehlgefaltete Proteine in der Zelle vorliegen. Dies scheint in dem starken Effekt auf die Proteintranslation begründet zu sein: mTORC1-Inhibition führt zu einer Hemmung der Proteintranslation über 4E-BP1. Dies bedingt vermutlich, dass weniger toxische, Canavanin-enthaltende Proteine in den Myelomzelllinien produziert werden. Dies sollte in künftigen Arbeiten quantifiziert werden.

### 5.5.2 Cycloheximid bietet einen Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation

Cycloheximid, als Inhibitor der Proteinbiosynthese, schützt die arginindepletierten Tumorzellen vor dem zytotoxischen Effekt des Canavanins, indem es den Einbau von Canavanin vermindert (Vynnytska et al., 2011). In einem ersten Experiment wurde durch Co-Inkubation mit Cycloheximid konzentrationsabhängig der Anteil an toten FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin reduziert (Kapitel 4.5.2). Eine Translationshemmung mittels Cycloheximid wirkte somit wie erwartet protektiv für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin.

Dies konnte durch unsere Arbeitsgruppe auch in Zeitkinetiken für die FD50-, U266- und NCI A2-Zellen bestätigt werden: Durch Cycloheximid wurde der Anteil an PI-positiven Zellen sowie die cleaved Caspase 3-Expression unter Arginindepletion und Canavanin-Supplementation signifikant verringert (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Dieses Ergebnis passt außerdem zu den Ergebnissen der Co-Inkubation mit Torin 1. In beiden Fällen wurde durch Inhibition der Translation ein Überlebensvorteil für die Zellen unter der Kombinationsbehandlung erreicht. Die erfolgreiche Inhibition der Translation durch Cycloheximid und Torin 1 wurde ebenfalls durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Die Hemmung der Translation stellt sich folglich als potenzieller Resistenzmechanismus für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung heraus. Dadurch sollte die Anzahl an toxischen, Canavanin-enthaltenden Proteinen reduziert werden. Dies bestätigt ebenfalls, dass die Zytotoxizität von Canavanin in seinem Einbau in Proteine begründet ist (Rosenthal et al., 1989, Swaffar and Ang, 1999, Vynnytska et al., 2011). In Zusammenschau dieser Ergebnisse ergibt sich die Hypothese, dass unter der Kombinationstherapie von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation insgesamt nur wenige fehlgefaltete Proteine entstehen, die aber ungleich toxischer sind. Der effizienteste Resistenzmechanismus besteht folglich darin, zu verhindern, dass diese toxischen Proteine entstehen. Die Verfügbarkeit von Arginin wiederherzustellen, z. B. über Autophagie, erscheint dagegen weniger relevant. Dass tatsächlich weniger Canavanin-enthaltende Proteine durch Co-Inkubation mit Cycloheximid bzw. Torin 1 entstehen, sollte in zukünftigen Arbeiten verifiziert werden.

In zukünftigen Arbeiten gilt es die gewonnenen Erkenntnisse umsetzen. Dadurch ergibt sich eine neue Therapiestrategie. Dabei sollte das Ziel sein die Translation in den Myelomzellen gezielt zu stimulieren, sodass mehr toxische, Canavanin-enthaltende Proteine entstehen. Dies könnte in vitro beispielsweise mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) gelingen. In hämatopoetischen Zelllinien wurde durch PMA die Expression des Translationsrepressorproteins 4E-BP1 reduziert (Rolli-DeKunderen et al., 2003). Sollte sich dieser Ansatz in vitro als effektiv erweisen, so sollte eine Anwendung auch in in vivo-Modellen erfolgen. Dies stellt jedoch eine Herausforderung dar. Dafür sollte ein Translationsinduktor eingesetzt werden, der möglichst selektiv auf die Myelomzellen wirkt, um die Proteinhomöostase der gesunden Zellen nicht zu gefährden. Entsprechende Therapiemöglichkeiten müssten entwickelt werden. Denkbar wäre beispielsweise der Transport von PMA in einem liposomalen Nanopartikel der an CD38 auf Myelomzellen bindet (Omstead et al., 2020).

## **5.6 Inhibition von Akt wirkt für die FD50-Zellen protektiv unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

### **5.6.1 Torin 1 hemmt Akt in den FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

Da Torin 1 in der Lage ist die Aktivität beider Komplexe, also mTORC1 und mTORC2, zu hemmen (Thoreen et al., 2009, Badura et al., 2013), war es erforderlich auch den Einfluss von Torin 1 auf mTORC2 bzw. dessen Effektor-Kinase Akt zu untersuchen. Laut Datenblatt des Herstellers weist Torin 1 eine circa fünffach höhere Affinität zu mTORC1 als zu mTORC2 auf. In der Myelom-Zelllinie RPMI-8226 und in Leukämie-Zelllinien hemmte Torin (2) die Phosphorylierung von Akt an Ser473 und konnte auch somit zytotoxisch und zytostatisch wirken (Park et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit resultierte die Co-Inkubation mit Torin 1 in einer Reduktion der p-Akt (Ser473)- und auch der p-Akt (Thr308)-Expression der FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Arginindepletion und Canavanin (Kapitel 4.6.1). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht in Anwesenheit von Arginin, obwohl Torin 1 auch unter dieser Bedingung tendenziell die Phosphorylierung von Akt an Ser473 senkte. Zu erwarten wäre daher auch eine signifikante Wirkung von Torin 1 auf die p-Akt (Ser473)-Expression in Präsenz von Arginin im zeitlichen Verlauf.

Im Allgemeinen fördert die Kinase Akt im aktiven, phosphorylierten Zustand die Proliferation und das Überleben der Zelle (Foster and Fingar, 2010, Bobak et al., 2016). Torin 1 bedingte in der vorliegenden Arbeit hingegen eine Abnahme der Aktivität von Akt in den FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung. Es war daher nötig zu klären, ob der protektive Effekt von Torin 1 durch eine Inhibition von Akt zu erklären war. Zu diesem Zweck wurde in weiteren Experimenten die Wirkung des direkten Akt-Inhibitors Afuresertib auf das Überleben der FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung getestet (Kapitel 5.6.2).

Eine anhaltende Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt wurde in Tumorzellen als protektiv gegen die Einleitung von Apoptose bei Arginindepletion diskutiert (Bobak et al., 2016). Wie erwartet, nahm in den FD50-Zellen durch einen alleinigen Argininmangel und durch die Kombinationsbehandlung mit Canavanin die Phosphorylierung von Akt an Ser473 tendenziell und an Thr308 signifikant im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin zu (Kapitel 4.6.1). Die Beeinflussung von Akt unter diesen besonderen Mangelzuständen scheint jedoch zelltypabhängig zu sein. In Glioblastom-Zelllinien resultierte die Kombinationsbehandlung aus paralleler



Arginindepletion und Canavanin nach 48 Stunden Inkubation in einer Abnahme der Akt-Aktivierung, entsprechend einer Reduktion der Phosphorylierung an Ser473 (Karatsai et al., 2020). In Pankreaskarzinom-Zellen wurde nach 24 Stunden unter Argininmangel die p-Akt (Ser473)-Expression ebenfalls reduziert (Wang et al., 2020a).

Für die Myelomzelllinie U266 wurde durch Modulation des Arginin-Vorrats und Canavanin-Zugabe bzw. durch Co-Inkubation mit Torin 1 der Phosphorylierungsgrad von Akt an Ser473 und an Thr308 nicht beeinflusst. Auch an dieser Stelle sollte beachtet werden, dass die U266-Zelllinie von einem Myelom-Patienten stammt, der bereits vortherapiert wurde. Außerdem ist für die Zelllinie U266 bereits bekannt, dass sie weniger empfindlich auf einen weiteren Akt-inhibierenden Wirkstoff, nämlich Afuresertib, reagiert (Kinoshita et al., 2018).

### **5.6.2 Afuresertib inhibiert Akt in Myelomzelllinien und bewirkt einen Überlebensvorteil in den FD50-Zellen bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

Unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin-Supplementation ergab sich für die beiden Myelomzelllinien FD50 und U266 durch Torin 1 ein Überlebensvorteil (Kapitel 4.4.1). Dieser Effekt war jedoch wider Erwarten nicht auf die Induktion von Makroautophagie (Kapitel 4.4.2), sondern auf eine Hemmung der Translation zurückzuführen (Kapitel 4.5.1). Es zeigte sich jedoch für die FD50-Zellen eine Hemmung der Akt-Aktivität durch Torin 1 unter der Kombinationsbehandlung (Kapitel 4.6.1). Mit Hilfe des direkten Akt-Inhibitors Afuresertib sollte daher überprüft werden, ob eine Inhibition von Akt tatsächlich protektiv für die FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung wirkt. In den U266-Zellen hatte Torin 1 keinen Einfluss auf die Akt-Aktivität (Kapitel 4.6.1), sodass in dieser Zelllinie der protektive Effekt von Torin 1 nicht auf einer Inhibition von Akt beruhen kann. Dass eine Hemmung von Akt einen Überlebensvorteil bieten könnte, scheint zunächst widersprüchlich, da die Kinase Akt im aktiven Zustand im Allgemeinen die Proliferation und das Überleben der Zelle fördert (Foster and Fingar, 2010, Bobak et al., 2016). So wird durch Inhibition von Akt mittels Afuresertib die Proliferation von Merkelzellkarzinom-Zellen signifikant gehemmt (Wu et al., 2021). Möglich wäre jedoch, dass Afuresertib in nicht-toxischen Konzentrationen eine Hemmung von Akt und damit der Proliferation erreicht und dies einen

Überlebensvorteil für die Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung darstellt. Für die U266-Myelomzellen wurde bereits gezeigt, dass Afuresertib auch in Anwesenheit von Arginin nur eine geringe Toxizität besitzt: Eine für die Toxizität suboptimale Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Afuresertib erzielte nach einer 72-stündigen Inkubation lediglich 7% Annexin V-positive, also apoptotische U266-Myelomzellen (Kinoshita et al., 2018).

Der ATP-kompetitive Inhibitor Afuresertib blockiert das aktive Zentrum von Akt und damit die Kinase-Aktivität. Dadurch wird Akt vermehrt an die Plasmamembran transloziert, wo sie durch PDK1 und mTOR an Threonin 308 und Serin 473 reaktiv hyperphosphoryliert wird (Kinoshita et al., 2018, Wiechmann et al., 2021). Auch für die FD50- und U266-Zellen wurde eine suffiziente Inhibition der Akt-Aktivität mittels 1  $\mu\text{M}$  Afuresertib durch die signifikante Hyperphosphorylierung von Akt an Serin 473 und an Threonin 308, in Anwesenheit von Arginin und auch unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel mit Canavanin, bestätigt (Kapitel 4.6.3).

Für die FD50-Zellen zeigte sich tatsächlich ein zeitweise protektiver Effekt durch Co-Inkubation mit Afuresertib unter der Kombinationsbehandlung in Bezug auf den Anteil an toten Zellen und die cleaved Caspase 3-Spiegel (Kapitel 4.6.2.2). Jedoch erreichte der Anteil an PI-positiven Zellen bzw. der cleaved Caspase 3-Spiegel unter Arginindepletion in Kombination mit Canavanin und Afuresertib nicht das Niveau der Kontrollbedingung mit Arginin. Dies war jedoch durch Co-Inkubation mit Torin 1 gelungen (Kapitel 4.4.1.2). Dies spricht dafür, dass der protektive Effekt von Torin 1 in den FD50-Zellen nicht (allein) auf der Inhibition von Akt beruhen kann.

Auf den Anteil an toten U266-Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung hatte Afuresertib wie erwartet keinen signifikanten Einfluss (Kapitel 4.6.2). Entgegen der Erwartung zeigte sich jedoch für die U266-Zellen durch Co-Inkubation mit Afuresertib ein signifikanter Anstieg der cleaved Caspase 3-Expression nach 8 Stunden unter der Kombinationsbehandlung. Zur Interpretation dieses Ergebnisses ist ein genauer Blick auf die zugrundeliegenden Blots nötig. Auf diesen sind beide Banden der cleaved Caspase 3, also unter der Kombinationsbehandlung allein und mit Co-Inkubation von Afuresertib, zum Zeitpunkt 8 Stunden trotz langer Belichtungszeit sehr schwach ausgeprägt. Dies lässt vermuten, dass unter beiden Inkubationsbedingungen (noch) keine massive Apoptose-Induktion vorliegt. Die Zelllinie U266 ist für ihre geringe Sensitivität auf eine Afuresertib-Monotherapie bekannt (Kinoshita et al., 2018). Auch

wenn Torin 1 keine Wirkung auf Akt in den U266-Zellen hatte, zeigte sich für Afuresertib jedoch eine suffiziente Inhibition von Akt (Kapitel 4.6.3).

In Anwesenheit von Arginin wirkte Afuresertib für beide Myelomzelllinien zu keinem Zeitpunkt toxisch (Kapitel 4.6.2.2). An dieser Stelle muss beachtet werden, dass sich die Wahl der eingesetzten Afuresertib-Konzentration danach richtete, womit der größte protektive Effekt erzielt wurde und nicht die höchste Toxizität (Kapitel 4.6.2.1).

### **5.6.3 Kombination von Torin 1 und Afuresertib wirkt protektiv, allerdings nicht synergistisch bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation**

Um auszuschließen, dass der protektive Effekt von Torin 1 nicht durch eine Inhibition von Akt vermittelt ist, wurde die Viabilität der Zellen auch bei einer zusätzlichen Afuresertib-Co-Inkubation verglichen. Für die FD50- und U266-Zellen wurde durch die Kombination der beiden Inhibitoren Torin 1 und Afuresertib eine zeitabhängige, signifikante Reduktion des Anteils PI-positiver Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin erreicht (Kapitel 4.6.4). Der protektive Effekt der Kombination der beiden Inhibitoren ging jedoch nicht über den durch Torin 1 erzielten Überlebensvorteil hinaus. Es ergab sich durch die Kombination also folglich kein Synergismus in Bezug auf das Überleben der Myelomzellen unter der Kombinationsbehandlung. Dies spricht dafür, dass der protektive Effekt von Torin 1 unter der Kombinationsbehandlung hauptsächlich auf der mTORC1-Hemmung und der damit einhergehenden Inhibition der Proteintranslation beruht. Auch die Toxizität der kombinierten Torin 1- und Afuresertib-Inkubation war mit derjenigen unter Torin 1 allein in den FD50-Zellen in Anwesenheit von Arginin vergleichbar, während sie in den U266-Zellen nicht toxisch wirkte (Kapitel 4.6.4).

## 6. Zusammenfassung

Für verschiedene Tumorentitäten zeigte die systemische Arginindepletion in klinischen Phase I- bis III-Studien nur moderate Ansprechraten (Chen et al., 2021a). Die Kombination mit dem Arginin-Analogon Canavanin bedingte eine massive Zunahme der Zytotoxizität der Arginindepletion in Tumorzellen *in vitro* (Vynnytska et al., 2011, Karatsai et al., 2020, Chen et al., 2021b). Gesunde Zellen sind dagegen vor den toxischen Effekten dieser Therapie geschützt, da sie fähig sind die Aminosäure Arginin durch Expression des Enzyms ASS1 selbst zu synthetisieren (Mauldin et al., 2012, Kurlishchuk et al., 2016). In den ersten *in vivo*-Experimenten zeigten sich Leukämie-Zellen jedoch als resistent gegen die Kombinationsbehandlung aus Arginindepletion und Canavanin (Vovk et al., 2016). In dem Myelom-Xenograft-Modell unserer Arbeitsgruppe wurde hingegen das Überleben der Versuchstiere unter der Kombinationsbehandlung signifikant verlängert, letztlich kam es jedoch auch da zu einem erneuten Tumorwachstum (Jacobi, 2019, Jacobi et al., Manuskript in Vorbereitung). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit potenzielle biochemische Mechanismen der Zytotoxizität und Resistenz der Kombinationsbehandlung aus Argininmangel und Canavanin-Supplementation in Myelomzellen untersucht.

Die Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin-Supplementation stellt eine vielversprechende, metabolische Therapiestrategie für ASS1-negative Myelomzellen dar: Sie erwies sich als hocheffektiv in der Therapie von FD50- und U266-Myelomzelllinien. Unter der Kombinationsbehandlung kam es zu Zeichen von Proteinstress in FD50-Zellen, wie der Bildung von Aggresomen. Trotz bekannter ER-Stress-Aktivierung (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung), führte sie in den NCI A2-Zellen nicht zu einer wesentlichen CHOP-Erhöhung. Dies spricht dafür, dass ER-Stress nicht der Haupttoxizitätsmechanismus der Kombinationstherapie von Arginindepletion und Canavanin-Supplementation ist. Es zeigte sich ein massiver Anstieg des an der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie beteiligten Co-Chaperons BAG3, als Zeichen eines vermehrten Anfalls BAG3-gebundener, fehlgefalteter Proteine unter der Kombinationsbehandlung. Makroautophagie wurde unter der Kombinationstherapie wider Erwarten nicht aktiviert. Durch Autophagie hätte den Myelomzellen vorübergehend wieder ausreichend Arginin zur Verfügung stehen können, sodass diese durch eine erhöhte Konkurrenzsituation nicht auf Canavanin angewiesen wären. Vorstellbar ist, dass die Myelomzellen *in vivo* aufgrund der sukzessiven, enzymatischen Arginindepletion eine deutlich längere Adaptationszeit

haben und somit die Autophagie als Arginin-Recyclingmechanismus eine größere Rolle spielen könnte.

Auch durch den mTOR-Inhibitor Torin 1 wurde in diesem Modell überraschenderweise keine relevante Autophagie induziert. Dennoch wirkte Torin 1 protektiv für die beiden Myelomzelllinien FD50 und U266 unter der Kombinationsbehandlung. Dessen Überlebensmechanismus beruhte nicht auf Autophagie, sondern auf einer Hemmung der Translation und zumindest in den FD50-Zellen möglicherweise auch über eine Hemmung von Akt. Eine direkte Inhibition von Akt mittels Afuresertib wirkte ebenfalls protektiv für die FD50-Zellen, jedoch nicht für die U266-Zellen. Die Kombination der beiden Inhibitoren brachte jedoch keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Co-Inkubation mit Torin 1. Torin 1 führte ebenfalls zu einer verminderten BAG3-Expression als Zeichen für einen geringeren Anfall fehgefalteter, BAG3-gebundener Proteine.

Auch unter der Kombinationsbehandlung, ohne Zugabe weiterer Inhibitoren, konnte eine Hemmung der Translation über 4E-BP1 beobachtet werden. Die Translationshemmung mittels Cycloheximid zeigte ebenfalls einen Überlebensvorteil in beiden Zelllinien. Dies wird dadurch erklärt, dass durch Hemmung der Proteintranslation weniger toxische, Canavanin-enthaltende Proteine entstehen. Die Hemmung der Translation durch Cycloheximid wurde durch ergänzende Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (Kapitel 5.5.1 + 5.5.2) bestätigt (Windschmitt et al., Manuskript in Vorbereitung). Dies legt insgesamt die Vermutung nahe, dass bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation nicht massenhaft fehlgefaltete, toxische Proteine, sondern verhältnismäßig wenige, jedoch dafür hoch toxische Proteine entstehen. Das spricht auch dafür, dass die Zytotoxizität von Canavanin durch seinen Einbau in Proteine und nicht nur durch seine intrazelluläre Präsenz inkl. Beeinflussung anderer Stoffwechselwege begründet ist. Wird Canavanin beispielsweise anstelle von Arginin in das aktive Zentrum von Enzymen eingebaut, geht dies mit deren Funktionsabnahme bzw. -verlust einher (Dzimbova et al., 2013). Folglich ist der effektivste Resistenzmechanismus, um diese Therapie-induzierte Toxizität abzuwenden, die Synthese der Canavanin-enthaltenden, toxischen Proteine zu verhindern. Diese Translationshemmung leiten die Myelomzellen bereits intrinsisch ein. Dies scheint jedoch nicht auszureichen, um die Toxizität ausreichend zu antagonisieren, was mit der exogenen Verstärkung der Translationshemmung durch Torin 1 und Cycloheximid gelingt.

## 7. Literaturverzeichnis

- ABOU-ALFA, G. K., QIN, S., RYOO, B. Y., LU, S. N., YEN, C. J., FENG, Y. H., LIM, H. Y., IZZO, F., COLOMBO, M., SARKER, D., BOLONDI, L., VACCARO, G., HARRIS, W. P., CHEN, Z., HUBNER, R. A., MEYER, T., SUN, W., HARDING, J. J., HOLLYWOOD, E. M., MA, J., et al. 2018. Phase III randomized study of second line ADI-PEG 20 plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*, 29, 1402-1408.
- AGRAWAL, V., WOO, J. H., MAULDIN, J. P., JO, C., STONE, E. M., GEORGIU, G. & FRANKEL, A. E. 2012. Cytotoxicity of human recombinant arginase I (Co)-PEG5000 in the presence of supplemental L-citrulline is dependent on decreased argininosuccinate synthetase expression in human cells. *Anticancer Drugs*, 23, 51-64.
- AHMED, A. & KILLEEN, R. B. 2023. Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- ALBAUGH, V. L., PINZON-GUZMAN, C. & BARBUL, A. 2017. Arginine-Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol*, 115, 273-280.
- ALEXANDROU, C., AL-AQBI, S. S., HIGGINS, J. A., BOYLE, W., KARMOKAR, A., ANDREADI, C., LUO, J. L., MOORE, D. A., VISKADURAKI, M., BLADES, M., MURRAY, G. I., HOWELLS, L. M., THOMAS, A., BROWN, K., CHENG, P. N. & RUFINI, A. 2018. Sensitivity of Colorectal Cancer to Arginine Deprivation Therapy is Shaped by Differential Expression of Urea Cycle Enzymes. *Sci Rep*, 8, 12096.
- ALMANZA, A., CARLESSO, A., CHINTHA, C., CREEDICAN, S., DOULTSINOS, D., LEUZZI, B., LUÍS, A., MCCARTHY, N., MONTIBELLER, L., MORE, S., PAPAIOANNOU, A., PÜSCHEL, F., SASSANO, M. L., SKOKO, J., AGOSTINIS, P., DE BELLEROCHE, J., ERIKSSON, L. A., FULDA, S., GORMAN, A. M., HEALY, S., et al. 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *Febs j*, 286, 241-278.
- ANDREU-VIEYRA, C. V. & BERENSON, J. R. 2014. The potential of panobinostat as a treatment option in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*, 5, 197-210.
- ARCECI, R. J., ALLEN, C. E., DUNKEL, I. J., JACOBSEN, E., WHITLOCK, J., VASSALLO, R., MORRIS, S. R., PORTNOY, A., REEDY, B. A., SMITH, D. A., NOBLE, R., MURNANE, A., CORNFELD, M., RODRIGUEZ-GALINDO, C., HEANEY, M. L., MCCLAIN, K. & VAISELBUH, S. 2017. A phase IIa study of afuresertib, an oral pan-AKT inhibitor, in patients with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*, 64.
- ARONSON, L. I. & DAVIES, F. E. 2012. DangER: protein ovERload. Targeting protein degradation to treat myeloma. *Haematologica*, 97, 1119-30.
- ASCIERTO, P. A., SCALA, S., CASTELLO, G., DAPONTE, A., SIMEONE, E., OTTAIANO, A., BENEDEUCE, G., DE ROSA, V., IZZO, F., MELUCCI, M. T., ENSOR, C. M., PRESTAYKO, A. W., HOLTSBERG, F. W., BOMALASKI, J. S., CLARK, M. A., SAVARAJ, N., FEUN, L. G. & LOGAN, T. F. 2005. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J Clin Oncol*, 23, 7660-8.
- ASSI, G. & FAOUR, W. H. 2023. Arginine deprivation as a treatment approach targeting cancer cell metabolism and survival: A review of the literature. *Eur J Pharmacol*, 953, 175830.
- BADURA, S., TESANOVIC, T., PFEIFER, H., WYSTUB, S., NIJMEIJER, B. A.,



- LIEBERMANN, M., FALKENBURG, J. H., RUTHARDT, M. & OTTMANN, O. G. 2013. Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8, e80070.
- BEAN, G. R., KREMER, J. C., PRUDNER, B. C., SCHENONE, A. D., YAO, J. C., SCHULTZE, M. B., CHEN, D. Y., TANAS, M. R., ADKINS, D. R., BOMALASKI, J., RUBIN, B. P., MICHEL, L. S. & VAN TINE, B. A. 2016. A metabolic synthetic lethal strategy with arginine deprivation and chloroquine leads to cell death in ASS1-deficient sarcomas. *Cell Death Dis*, 7, e2406.
- BEDDOWES, E., SPICER, J., CHAN, P. Y., KHADEIR, R., CORBACHO, J. G., REPANA, D., STEELE, J. P., SCHMID, P., SZYSZKO, T., COOK, G., DIAZ, M., FENG, X., JOHNSTON, A., THOMSON, J., SHEAFF, M., WU, B. W., BOMALASKI, J., PACEY, S. & SZLOSAREK, P. W. 2017. Phase 1 Dose-Escalation Study of Pegylated Arginine Deiminase, Cisplatin, and Pemetrexed in Patients With Argininosuccinate Synthetase 1-Deficient Thoracic Cancers. *J Clin Oncol*, 35, 1778-1785.
- BENCE, A. K., ADAMS, V. R. & CROOKS, P. A. 2003. L-Canavanine as a radiosensitization agent for human pancreatic cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 244, 37-43.
- BENCE, A. K. & CROOKS, P. A. 2003. The mechanism of L-canavanine cytotoxicity: arginyl tRNA synthetase as a novel target for anticancer drug discovery. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18, 383-94.
- BENCE, A. K., WORTHEN, D. R., ADAMS, V. R. & CROOKS, P. A. 2002. The antiproliferative and immunotoxic effects of L-canavanine and L-canaline. *Anticancer Drugs*, 13, 313-20.
- BHASKAR, P. T. & HAY, N. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev Cell*, 12, 487-502.
- BHAT, T. A., CHAUDHARY, A. K., KUMAR, S., O'MALLEY, J., INIGO, J. R., KUMAR, R., YADAV, N. & CHANDRA, D. 2017. Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response and mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1867, 58-66.
- BLAGDEN, S. P., HAMILTON, A. L., MILESHKIN, L., WONG, S., MICHAEL, A., HALL, M., GOH, J. C., LISYANSKAYA, A. S., DESILVIO, M., FRANGOU, E., STRONACH, E. A., GOPALAKRISHNA, P., MENIAWY, T. M. & GABRA, H. 2019. Phase IB Dose Escalation and Expansion Study of AKT Inhibitor Afuresertib with Carboplatin and Paclitaxel in Recurrent Platinum-resistant Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*, 25, 1472-1478.
- BOATRIGT, K. M. & SALVESEN, G. S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 725-31.
- BOBAK, Y., KURLISHCHUK, Y., VYNNYTSKA-MYRONOVSKA, B., GRYDZUK, O., SHUVAYEVA, G., REDOWICZ, M. J., KUNZ-SCHUGHART, L. A. & STASYK, O. 2016. Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 70, 29-38.
- BOOTH, L. A., TAVALLAI, S., HAMED, H. A., CRUICKSHANKS, N. & DENT, P. 2014. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell Signal*, 26, 549-55.
- BOWLES, T. L., KIM, R., GALANTE, J., PARSONS, C. M., VIRUDACHALAM, S., KUNG, H. J. & BOLD, R. J. 2008. Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. *Int J Cancer*, 123, 1950-5.
- BROSNAN, M. E. & BROSNAN, J. T. 2004. Renal arginine metabolism. *J Nutr*, 134, 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
- BÜLBÜL, Y. 2018. (unveröffentlicht) *Die Rolle des ER Stress und der Autophagie unter Arginindepletion und Canavaninsupplementierung in humanen Myelomzellen.*

- Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- CABE, M., RADEMACHER, D. J., KARLSSON, A. B., CHERUKURI, S. & BAKOWSKA, J. C. 2018. PB1 and UBA domains of p62 are essential for aggresome-like induced structure formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 503, 2306-2311.
- CANTOR, J. R. & SABATINI, D. M. 2012. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*, 2, 881-98.
- CHAMBERS, J. E. & MARCINIAK, S. J. 2014. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C657-70.
- CHAN, P. Y., PHILLIPS, M. M., ELLIS, S., JOHNSTON, A., FENG, X., ARORA, A., HAY, G., COHEN, V. M. L., SAGOO, M. S., BOMALASKI, J. S., SHEAFF, M. T. & SZLOSAREK, P. W. 2022. A Phase 1 study of ADI-PEG20 (pegargininase) combined with cisplatin and pemetrexed in ASS1-negative metastatic uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 35, 461-470.
- CHAN, S. L., CHENG, P. N. M., LIU, A. M., CHAN, L. L., LI, L., CHU, C. M., CHONG, C. C. N., LAU, Y. M., YEO, W., NG, K. K. C., YU, S. C. H., MOK, T. S. K. & CHAN, A. W. H. 2021. A phase II clinical study on the efficacy and predictive biomarker of pegylated recombinant arginase on hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*.
- CHANG, K. Y., CHIANG, N. J., WU, S. Y., YEN, C. J., CHEN, S. H., YEH, Y. M., LI, C. F., FENG, X., WU, K., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. S., WU, B. W., GAO, J., SUBUDHI, S. K., KASEB, A. O., BLANDO, J. M., YADAV, S. S., SZLOSAREK, P. W. & CHEN, L. T. 2021. Phase 1b study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) plus Pembrolizumab in advanced solid cancers. *Oncoimmunology*, 10, 1943253.
- CHANGOU, C. A., CHEN, Y. R., XING, L., YEN, Y., CHUANG, F. Y., CHENG, R. H., BOLD, R. J., ANN, D. K. & KUNG, H. J. 2014. Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 14147-52.
- CHAPMAN, M. A., LAWRENCE, M. S., KEATS, J. J., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., SCHINZEL, A. C., HARVIEW, C. L., BRUNET, J. P., AHMANN, G. J., ADLI, M., ANDERSON, K. C., ARDLIE, K. G., AUCLAIR, D., BAKER, A., BERGSAGEL, P. L., BERNSTEIN, B. E., DRIER, Y., FONSECA, R., GABRIEL, S. B., HOFMEISTER, C. C., et al. 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471, 467-72.
- CHEN, C. I., PAUL, H., LE, L. W., WEI, E. N., SNITZLER, S., WANG, T., LEVINA, O., KAKAR, S., LAU, A., QUEAU, M., JOHNSTON, J. B., SMITH, D. A. & TRUDEL, S. 2019. A phase 2 study of ofatumumab (Arzerra®) in combination with a pan-AKT inhibitor (afuresertib) in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Lymphoma*, 60, 92-100.
- CHEN, C. L., HSU, S. C., ANN, D. K., YEN, Y. & KUNG, H. J. 2021a. Arginine Signaling and Cancer Metabolism. *Cancers (Basel)*, 13.
- CHEN, O., MANIG, F., LEHMANN, L., SOROUR, N., LÖCK, S., YU, Z., DUBROVSKA, A., BAUMANN, M., KESSLER, B. M., STASYK, O. & KUNZ-SCHUGHART, L. A. 2021b. Dual role of ER stress in response to metabolic co-targeting and radiosensitivity in head and neck cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, 78, 3021-3044.
- CHENG, P. N., LAM, T. L., LAM, W. M., TSUI, S. M., CHENG, A. W., LO, W. H. & LEUNG, Y. C. 2007. Pegylated recombinant human arginase (rhArg-peg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res*, 67, 309-17.
- CHENG, P. N. M., LIU, A. M., BESSUDO, A. & MUSSAI, F. 2021. Safety, PK/PD and



- preliminary anti-tumor activities of pegylated recombinant human arginase 1 (BCT-100) in patients with advanced arginine auxotrophic tumors. *Invest New Drugs*.
- CHOW, A. K., NG, L., SING LI, H., CHENG, C. W., LAM, C. S., YAU, T. C., CHENG, P. N., FAN, S. T., POON, R. T. & PANG, R. W. 2012. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 12, 1233-43.
- CHUDE, C. I. & AMARAVADI, R. K. 2017. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci*, 18.
- CORBOY, M. J., THOMAS, P. J. & WIGLEY, W. C. 2005. Aggresome formation. *Methods Mol Biol*, 301, 305-27.
- COSTA, B. P., MARTINS, P., VERÍSSIMO, C., SIMÕES, M., TOMÉ, M., GRAZINA, M., PIMENTEL, J. & CASTRO-SOUSA, F. 2016. Argininemia and plasma arginine bioavailability - predictive factors of mortality in the severe trauma patients? *Nutr Metab (Lond)*, 13, 60.
- COUCHET, M., BREUILLARD, C., CORNE, C., RENDU, J., MORIO, B., SCHLATTNER, U. & MOINARD, C. 2021. Ornithine Transcarbonylase - From Structure to Metabolism: An Update. *Front Physiol*, 12, 748249.
- DAN, H. C., ANTONIA, R. J. & BALDWIN, A. S. 2016. PI3K/Akt promotes feedforward mTORC2 activation through IKK $\alpha$ . *Oncotarget*, 7, 21064-75.
- DAVIS, J. S. & ANSTEY, N. M. 2011. Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, 39, 380-5.
- DELAGE, B., FENNEL, D. A., NICHOLSON, L., MCNEISH, I., LEMOINE, N. R., CROOK, T. & SZLOSAREK, P. W. 2010. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer*, 126, 2762-72.
- DELAGE, B., LUONG, P., MAHARAJ, L., O'RIAIN, C., SYED, N., CROOK, T., HATZIMICHAEL, E., PAPOUDOU-BAI, A., MITCHELL, T. J., WHITTAKER, S. J., CERIO, R., GRIBBEN, J., LEMOINE, N., BOMALASKI, J., LI, C. F., JOEL, S., FITZGIBBON, J., CHEN, L. T. & SZLOSAREK, P. W. 2012. Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis*, 3, e342.
- DI LERNIA, G., LEONE, P., SOLIMANDO, A. G., BUONAVOGLIA, A., SALTARELLA, I., RIA, R., DITONNO, P., SILVESTRIS, N., CRUDELE, L., VACCA, A. & RACANELLI, V. 2020. Bortezomib Treatment Modulates Autophagy in Multiple Myeloma. *J Clin Med*, 9.
- DILLON, B. J., PRIETO, V. G., CURLEY, S. A., ENSOR, C. M., HOLTSBERG, F. W., BOMALASKI, J. S. & CLARK, M. A. 2004. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer*, 100, 826-33.
- DING, Y., MATSUKAWA, Y., OHTANIFUJITA, N., KATO, D., DAO, S., FUJII, T., NAITO, Y., YOSHIKAWA, T., SAKAI, T. & ROSENTHAL, G. A. 1999. Growth inhibition of A549 human lung adenocarcinoma cells by L-canavanine is associated with p21/WAF1 induction. *Jpn J Cancer Res*, 90, 69-74.
- DZIMBOVA, T. A., MILANOV, P. B. & PAJPAANOVA, T. I. 2013. Long-lasting effects of oxy- and sulfoanalogues of L-arginine on enzyme actions. *J Amino Acids*, 2013, 407616.
- ENGELMAN, J. A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9, 550-62.
- FERRARO, E. & CECCONI, F. 2007. Autophagic and apoptotic response to stress

- signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 462, 210-9.
- FEUN, L., YOU, M., WU, C. J., KUO, M. T., WANGPAICHITR, M., SPECTOR, S. & SAVARAJ, N. 2008. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer. *Curr Pharm Des*, 14, 1049-57.
- FEUN, L. G., MARINI, A., WALKER, G., ELGART, G., MOFFAT, F., RODGERS, S. E., WU, C. J., YOU, M., WANGPAICHITR, M., KUO, M. T., SISSON, W., JUNGBLUTH, A. A., BOMALASKI, J. & SAVARAJ, N. 2012. Negative argininosuccinate synthetase expression in melanoma tumours may predict clinical benefit from arginine-depleting therapy with pegylated arginine deiminase. *Br J Cancer*, 106, 1481-5.
- FOSTER, K. G. & FINGAR, D. C. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem*, 285, 14071-7.
- FRANCIPANE, M. G. & LAGASSE, E. 2013. Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. *Oncotarget*, 4, 1948-62.
- FULDA, S. & KÖGEL, D. 2015. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, 34, 5105-13.
- FUSCO, C., MICALÈ, L., EGOROV, M., MONTI, M., D'ADDETTA, E. V., AUGELLO, B., COZZOLINO, F., CALCAGNÌ, A., FONTANA, A., POLISHCHUK, R. S., DIDELOT, G., REYMOND, A., PUCCI, P. & MERLA, G. 2012. The E3-ubiquitin ligase TRIM50 interacts with HDAC6 and p62, and promotes the sequestration and clearance of ubiquitinated proteins into the aggresome. *PLoS One*, 7, e40440.
- GALLINETTI, J., HARPUTLUGIL, E. & MITCHELL, J. R. 2013. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J*, 449, 1-10.
- GAMERDINGER, M., KAYA, A. M., WOLFRUM, U., CLEMENT, A. M. & BEHL, C. 2011. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep*, 12, 149-56.
- GAO, X., SHEN, L., LI, X. & LIU, J. 2019. Efficacy and toxicity of histone deacetylase inhibitors in relapsed/refractory multiple myeloma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Exp Ther Med*, 18, 1057-1068.
- GARCIA-MATA, R., GAO, Y. S. & SZTUL, E. 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic*, 3, 388-96.
- GARCIA-NAVAS, R., MUNDER, M. & MOLLINEDO, F. 2012. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy*, 8, 1557-76.
- GARCÍA RUIZ, O., SÁNCHEZ-MALDONADO, J. M., LÓPEZ-NEVOT, M., GARCÍA, P., MACAUDA, A., HERNÁNDEZ-MOHEDO, F., GONZÁLEZ-SIERRA, P. A., MARTÍNEZ-BUENO, M., PÉREZ, E., REYES-ZURITA, F. J., CAMPA, D., CANZIAN, F., JURADO, M., RODRÍGUEZ-SEVILLA, J. J. & SAINZ, J. 2022. Autophagy in Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*, 14.
- GENGENBACH, L., GRAZIANI, G., REINHARDT, H., RÖSNER, A., BRAUN, M., MÖLLER, M. D., GREIL, C., WÄSCH, R. & ENGELHARDT, M. 2021. Choosing the Right Therapy for Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) in Consideration of Patient-, Disease- and Treatment-Related Factors. *Cancers (Basel)*, 13.
- GHOBRAL, I. M., SIEGEL, D. S., VIJ, R., BERDEJA, J. G., RICHARDSON, P. G., NEUWIRTH, R., PATEL, C. G., ZOHREN, F. & WOLF, J. L. 2016. TAK-228 (formerly MLN0128), an investigational oral dual TORC1/2 inhibitor: A phase I dose escalation study in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, or Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol*, 91, 400-5.

- GLAZER, E. S., PICCIRILLO, M., ALBINO, V., DI GIACOMO, R., PALAIA, R., MASTRO, A. A., BENEDEUCE, G., CASTELLO, G., DE ROSA, V., PETRILLO, A., ASCIERTO, P. A., CURLEY, S. A. & IZZO, F. 2010. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 28, 2220-6.
- GONG, H., ZÖLZER, F., VON RECKLINGHAUSEN, G., HAVERS, W. & SCHWEIGERER, L. 2000. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*, 14, 826-9.
- GREEN, M. H., BROOKS, T. L., MENDELSON, J. & HOWELL, S. B. 1980. Antitumor activity of L-canavanine against L1210 murine leukemia. *Cancer Res*, 40, 535-7.
- GRZYWA, T. M., SOSNOWSKA, A., MATRYBA, P., RYDZYNSKA, Z., JASINSKI, M., NOWIS, D. & GOLAB, J. 2020. Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front Immunol*, 11, 938.
- HALL, P. E., LEWIS, R., SYED, N., SHAFFER, R., EVANSON, J., ELLIS, S., WILLIAMS, M., FENG, X., JOHNSTON, A., THOMSON, J. A., HARRIS, F. P., JENA, R., MATYS, T., JEFFERIES, S., SMITH, K., WU, B. W., BOMALASKI, J. S., CROOK, T., O'NEILL, K., PARASKEVOPOULOS, D., et al. 2019. A Phase I Study of Pegylated Arginine Deiminase (Pegargiminase), Cisplatin, and Pemetrexed in Argininosuccinate Synthetase 1-Deficient Recurrent High-grade Glioma. *Clin Cancer Res*, 25, 2708-2716.
- HALL, P. E., READY, N., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. S., VENHAUS, R. R., SHEAFF, M., KRUG, L. & SZLOSAREK, P. W. 2020. Phase II Study of Arginine Deprivation Therapy With Pegargiminase in Patients With Relapsed Sensitive or Refractory Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 21, 527-533.
- HANSEN, M., RUBINSZTEIN, D. C. & WALKER, D. W. 2018. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 579-593.
- HARA, K., YONEZAWA, K., WENG, Q. P., KOZLOWSKI, M. T., BELHAM, C. & AVRUCH, J. 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*, 273, 14484-94.
- HARDING, J. J., DO, R. K., DIKA, I. E., HOLLYWOOD, E., UHLITSKYKH, K., VALENTINO, E., WAN, P., HAMILTON, C., FENG, X., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J., LI, C. F., O'REILLY, E. M. & ABOU-ALFA, G. K. 2018. A phase 1 study of ADI-PEG 20 and modified FOLFOX6 in patients with advanced hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*, 82, 429-440.
- HARDING, J. J., YANG, T. S., CHEN, Y. Y., FENG, Y. H., YEN, C. J., HO, C. L., HUANG, W. T., EL DIKA, I., AKCE, M., TAN, B., COHEN, S. A., MEYER, T., SARKER, D., LEE, D. W., RYOO, B. Y., LIM, H. Y., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. S., O'REILLY, E. M., QIN, S., et al. 2021. Assessment of pegylated arginine deiminase and modified FOLFOX6 in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Results of an international, single-arm, phase 2 study. *Cancer*.
- HERNANDEZ, C. P., MORROW, K., LOPEZ-BARCONS, L. A., ZABALETA, J., SIERRA, R., VELASCO, C., COLE, J. & RODRIGUEZ, P. C. 2010. Pegylated arginase I: a potential therapeutic approach in T-ALL. *Blood*, 115, 5214-21.
- HETZ, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 89-102.
- HIDESHIMA, T., RICHARDSON, P. G. & ANDERSON, K. C. 2011. Mechanism of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological

- basis of synergy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*, 10, 2034-42.
- HOANG, B., BENAVIDES, A., SHI, Y., FROST, P. & LICHTENSTEIN, A. 2009. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Mol Cancer Ther*, 8, 1974-84.
- HSUEH, E. C., KNEBEL, S. M., LO, W. H., LEUNG, Y. C., CHENG, P. N. & HSUEH, C. T. 2012. Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. *J Hematol Oncol*, 5, 17.
- HUSSON, A., BRASSE-LAGNEL, C., FAIRAND, A., RENOUF, S. & LAVOINNE, A. 2003. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem*, 270, 1887-99.
- IGLOI, G. L. & SCHIEFERMAYR, E. 2009. Amino acid discrimination by arginyl-tRNA synthetases as revealed by an examination of natural specificity variants. *Febs j*, 276, 1307-18.
- IZZO, F., MARRA, P., BENEDEUCE, G., CASTELLO, G., VALLONE, P., DE ROSA, V., CREMONA, F., ENSOR, C. M., HOLTSBERG, F. W., BOMALASKI, J. S., CLARK, M. A., NG, C. & CURLEY, S. A. 2004. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol*, 22, 1815-22.
- JACOBI, B. 2019. *Interferenz mit dem Argininstoffwechsel als neue Therapiestrategie beim Multiplen Myelom*. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- JACOBI, B., WINDSCHMITT, J., TSCHAKERT, L., LEUCHTNER, N., ECHCHANNAOUI, H., DESUKI, A., KUERZER, L., HABERMEIER, A., ANTUNES, E., AMANN, E., BOMALASKI, J., CLOSS, E., THEOBALD, M. & MUNDER, M. Manuskript in Vorbereitung. Interfering with arginine metabolism as a new treatment strategy for multiple myeloma. Mainz: III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- JANG, M. H., JUN, D. Y., RUE, S. W., HAN, K., PARK, W. & KIM, Y. H. 2002. Arginine antimetabolite L-canavanine induces apoptotic cell death in human Jurkat T cells via caspase-3 activation regulated by Bcl-2 or Bcl-xL. *Biochem Biophys Res Commun*, 295, 283-8.
- JEWELL, J. L. & GUAN, K. L. 2013. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci*, 38, 233-42.
- JOHANSEN, T. & LAMARK, T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7, 279-96.
- JOHNSTON, J. A., WARD, C. L. & KOPITO, R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143, 1883-98.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- KARATSAI, O., SHLIAHA, P., JENSEN, O. N., STASYK, O. & REĐOWICZ, M. J. 2020. Combinatory Treatment of Canavanine and Arginine Deprivation Efficiently Targets Human Glioblastoma Cells via Pleiotropic Mechanisms. *Cells*, 9.
- KAUR, J. & DEBNATH, J. 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 461-72.
- KAWAGUCHI, Y., KOVACS, J. J., MCLAURIN, A., VANCE, J. M., ITO, A. & YAO, T. P. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, 115, 727-38.
- KAZANDJIAN, D. 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*, 43, 676-681.
- KEANE, N. A., GLAVEY, S. V., KRAWCZYK, J. & O'DWYER, M. 2014. AKT as a therapeutic target in multiple myeloma. *Expert Opin Ther Targets*, 18, 897-915.
- KELLY, M. P., JUNGBLUTH, A. A., WU, B. W., BOMALASKI, J., OLD, L. J. & RITTER,



- G. 2012. Arginine deiminase PEG20 inhibits growth of small cell lung cancers lacking expression of argininosuccinate synthetase. *Br J Cancer*, 106, 324-32.
- KEYKHAEI, M., MASINAEI, M., MOHAMMADI, E., AZADNAJAFABAD, S., REZAEI, N., SAEEDI MOGHADDAM, S., REZAEI, N., NASSERINEJAD, M., ABBASI-KANGEVARI, M., MALEKPOUR, M. R., GHAMARI, S. H., HAGHSHENAS, R., KOLIJI, K., KOMPANI, F. & FARZADFAR, F. 2021. A global, regional, and national survey on burden and Quality of Care Index (QCI) of hematologic malignancies; global burden of disease systematic analysis 1990-2017. *Exp Hematol Oncol*, 10, 11.
- KHOURY, O., GHAZALE, N., STONE, E., EL-SIBAI, M., FRANKEL, A. E. & ABIHABIB, R. J. 2015. Human recombinant arginase I (Co)-PEG5000 [HuArgI (Co)-PEG5000]-induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human glioblastoma cells. *J Neurooncol*, 122, 75-85.
- KIM, R. H., BOLD, R. J. & KUNG, H. J. 2009a. ADI, autophagy and apoptosis: metabolic stress as a therapeutic option for prostate cancer. *Autophagy*, 5, 567-8.
- KIM, R. H., COATES, J. M., BOWLES, T. L., MCNERNEY, G. P., SUTCLIFFE, J., JUNG, J. U., GANDOUR-EDWARDS, R., CHUANG, F. Y., BOLD, R. J. & KUNG, H. J. 2009b. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res*, 69, 700-8.
- KIM, S. S., XU, S., CUI, J., PODDAR, S., LE, T. M., HAYRAPETYAN, H., LI, L., WU, N., MOORE, A. M., ZHOU, L., YU, A. C., DANN, A. M., ELLIOTT, I. A., ABT, E. R., KIM, W., DAWSON, D. W., RADU, C. G. & DONAHUE, T. R. 2020. Histone deacetylase inhibition is synthetically lethal with arginine deprivation in pancreatic cancers with low argininosuccinate synthetase 1 expression. *Theranostics*, 10, 829-840.
- KINOSHITA, S., RI, M., KANAMORI, T., AOKI, S., YOSHIDA, T., NARITA, T., TOTANI, H., ITO, A., KUSUMOTO, S., ISHIDA, T., KOMATSU, H. & IIDA, S. 2018. Potent antitumor effect of combination therapy with sub-optimal doses of Akt inhibitors and pomalidomide plus dexamethasone in multiple myeloma. *Oncol Lett*, 15, 9450-9456.
- KLIONSKY, D. J., ABDEL-AZIZ, A. K., ABDEL-FATAH, S., ABDELLATIF, M., ABDOLI, A., ABEL, S., ABELIOVICH, H., ABILDGAARD, M. H., ABUDU, Y. P., ACEVEDO-ARZENA, A., ADAMOPOULOS, I. E., ADELI, K., ADOLPH, T. E., ADORNETTO, A., AFLAKI, E., AGAM, G., AGARWAL, A., AGGARWAL, B. B., AGNELLO, M., AGOSTINIS, P., et al. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17, 1-382.
- KNOWLES, S. E., GUNN, J. M., HANSON, R. W. & BALLARD, F. J. 1975. Increased degradation rates of protein synthesized in hepatoma cells in the presence of amino acid analogues. *Biochem J*, 146, 595-600.
- KRAEHNBUHL, L., HOLLAND, A., ARMSTRONG, E., O'SHEA, S., MANGARIN, L., CHEKALIL, S., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. S., ERINJERI, J. P., BARKER, C. A., FRANCIS, J. H., WOLCHOK, J. D., MERGHOUB, T. & SHOUSHARI, A. N. 2022. Pilot Trial of Arginine Deprivation Plus Nivolumab and Ipilimumab in Patients with Metastatic Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*, 14.
- KROEMER, G., MARIÑO, G. & LEVINE, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40, 280-93.
- KUMARI, N. & BANSAL, S. 2021. Arginine depriving enzymes: applications as emerging therapeutics in cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, 88, 565-594.

- KURLISHCHUK, Y., VYNNYTSKA-MYRONOVSKA, B., GROSSE-GEHLING, P., BOBAK, Y., MANIG, F., CHEN, O., MERKER, S. R., HENLE, T., LOCK, S., STANGE, D. E., STASYK, O. & KUNZ-SCHUGHART, L. A. 2016. Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. *Oncotarget*, 7, 73292-73308.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAM, T. L., WONG, G. K., CHONG, H. C., CHENG, P. N., CHOI, S. C., CHOW, T. L., KWOK, S. Y., POON, R. T., WHEATLEY, D. N., LO, W. H. & LEUNG, Y. C. 2009. Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett*, 277, 91-100.
- LAM, T. L., WONG, G. K., CHOW, H. Y., CHONG, H. C., CHOW, T. L., KWOK, S. Y., CHENG, P. N., WHEATLEY, D. N., LO, W. H. & LEUNG, Y. C. 2010. Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, 366-76.
- LESIRE, L., CHAPUT, L., CRUZ DE CASAS, P., ROUSSEAU, F., PIVETEAU, C., DUMONT, J., POINTU, D., DÉPREZ, B. & LEROUX, F. 2020. High-Throughput Image-Based Aggresome Quantification. *SLAS Discov*, 25, 783-791.
- LONG, Y., TSAI, W. B., WANG, D., HAWKE, D. H., SAVARAJ, N., FEUN, L. G., HUNG, M. C., CHEN, H. H. & KUO, M. T. 2017. Argininosuccinate synthetase 1 (ASS1) is a common metabolic marker of chemosensitivity for targeted arginine- and glutamine-starvation therapy. *Cancer Lett*, 388, 54-63.
- LOWERY, M. A., YU, K. H., KELSEN, D. P., HARDING, J. J., BOMALASKI, J. S., GLASSMAN, D. C., COVINGTON, C. M., BRENNER, R., HOLLYWOOD, E., BARBA, A., JOHNSTON, A., LIU, K. C., FENG, X., CAPANU, M., ABOU-ALFA, G. K. & O'REILLY, E. M. 2017. A phase 1/1B trial of ADI-PEG 20 plus nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 123, 4556-4565.
- MA, X. M. & BLENIS, J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 307-18.
- MAGAWAY, C., KIM, E. & JACINTO, E. 2019. Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells*, 8.
- MARINI, J. C. & DIDEIJA, I. C. 2015. Arginine depletion by arginine deiminase does not affect whole protein metabolism or muscle fractional protein synthesis rate in mice. *PLoS One*, 10, e0119801.
- MAULDIN, J. P., ZEINALI, I., KLEYPAS, K., WOO, J. H., BLACKWOOD, R. S., JO, C. H., STONE, E. M., GEORGIU, G. & FRANKEL, A. E. 2012. Recombinant human arginase toxicity in mice is reduced by citrulline supplementation. *Transl Oncol*, 5, 26-31.
- MAUTHE, M., ORHON, I., ROCCHI, C., ZHOU, X., LUHR, M., HIJLKEMA, K. J., COPPES, R. P., ENGEDAL, N., MARI, M. & REGGIORI, F. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14, 1435-1455.
- MIN, B., WANG, Y., LIANG, F., WANG, C. X., WANG, F. & YANG, Z. 2022. The Protective Mechanism of Afuresertib against Esophageal Cancer. *Dis Markers*, 2022, 1832241.
- MINOIA, M., BONCORAGLIO, A., VINET, J., MORELLI, F. F., BRUNSTING, J. F., POLETTI, A., KROM, S., REITS, E., KAMPINGA, H. H. & CARRA, S. 2014. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy*, 10, 1603-21.

- MIRAKI-MOUD, F., GHAZALY, E., ARIZA-MCNAUGHTON, L., HODBY, K. A., CLEAR, A., ANJOS-AFONSO, F., LIAPIS, K., GRANTHAM, M., SOHRABI, F., CAVENAGH, J., BOMALASKI, J. S., GRIBBEN, J. G., SZLOSAREK, P. W., BONNET, D. & TAUSSIG, D. C. 2015. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood*, 125, 4060-8.
- MISHIMA, Y., SANTO, L., EDA, H., CIRSTEAN, D., NEMANI, N., YEE, A. J., O'DONNELL, E., SELIG, M. K., QUAYLE, S. N., ARASTU-KAPUR, S., KIRK, C., BOISE, L. H., JONES, S. S. & RAJE, N. 2015. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol*, 169, 423-34.
- MIZUSHIMA, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 132-9.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-26.
- MOHAMMAD, M. A., DIDELIJA, I. C., STOLL, B., NGUYEN, T. C. & MARINI, J. C. 2021. Pegylated arginine deiminase depletes plasma arginine but maintains tissue arginine availability in young pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 320, E641-e652.
- MONTEITH, B. E., SANDHU, I. & LEE, A. S. 2023. Management of Multiple Myeloma: A Review for General Practitioners in Oncology. *Curr Oncol*, 30, 4382-4401.
- MORAWE, T., HIEBEL, C., KERN, A. & BEHL, C. 2012. Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46, 41-54.
- MORIYA, S., KOMATSU, S., YAMASAKI, K., KAWAI, Y., KOKUBA, H., HIROTA, A., CHE, X. F., INAZU, M., GOTOH, A., HIRAMOTO, M. & MIYAZAWA, K. 2015. Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int J Oncol*, 46, 474-86.
- MORRIS, S. M., JR. 2016. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr*, 146, 2579s-2586s.
- MORROW, K., HERNANDEZ, C. P., RABER, P., DEL VALLE, L., WILK, A. M., MAJUMDAR, S., WYCZECHOWSKA, D., REISS, K. & RODRIGUEZ, P. C. 2013. Anti-leukemic mechanisms of pegylated arginase I in acute lymphoblastic T-cell leukemia. *Leukemia*, 27, 569-77.
- MÜLLER, H. J. & BOOS, J. 1998. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol*, 28, 97-113.
- MUNDER, M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*, 158, 638-51.
- MUNDER, M., MOLLINEDO, F., CALAFAT, J., CANCHADO, J., GIL-LAMAIGNERE, C., FUENTES, J. M., LUCKNER, C., DOSCHKO, G., SOLER, G., EICHMANN, K., MÜLLER, F. M., HO, A. D., GOERNER, M. & MODOLELL, M. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 105, 2549-56.
- NAWROCKI, S. T., CAREW, J. S., PINO, M. S., HIGHSHAW, R. A., ANDTBACKA, R. H., DUNNER, K., JR., PAL, A., BORNMANN, W. G., CHIAO, P. J., HUANG, P., XIONG, H., ABBRUZZESE, J. L. & MCCONKEY, D. J. 2006. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 66, 3773-81.
- NEUFELD, T. P. 2012. Autophagy and cell growth--the yin and yang of nutrient responses. *J Cell Sci*, 125, 2359-68.
- NGUYEN, T. P., FRANK, A. R. & JEWELL, J. L. 2017. Amino acid and small GTPase regulation of mTORC1. *Cell Logist*, 7, e1378794.
- NIKOLETOPOULOU, V., MARKAKI, M., PALIKARAS, K. & TAVERNARAKIS, N. 2013.

- Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3448-3459.
- NURCAHYANTI, A. D. & WINK, M. 2015. Cytotoxic potentiation of vinblastine and paclitaxel by L-canavanine in human cervical cancer and hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine*, 22, 1232-7.
- NURCAHYANTI, A. D. & WINK, M. 2016. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ*, 4, e1542.
- NURCAHYANTI, A. D. & WINK, M. 2017. L-Canavanine Potentiates Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 17, 206-211.
- OGATA, M., HINO, S., SAITO, A., MORIKAWA, K., KONDO, S., KANEMOTO, S., MURAKAMI, T., TANIGUCHI, M., TANII, I., YOSHINAGA, K., SHIOSAKA, S., HAMMARBACK, J. A., URANO, F. & IMAIZUMI, K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26, 9220-31.
- OMSTEAD, D. T., MEJIA, F., SJOERDSMA, J., KIM, B., SHIN, J., KHAN, S., WU, J., KIZILTEPE, T., LITTLEPAGE, L. E. & BILGICER, B. 2020. In vivo evaluation of CD38 and CD138 as targets for nanoparticle-based drug delivery in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 13, 145.
- OTT, P. A., CARVAJAL, R. D., PANDIT-TASKAR, N., JUNGBLUTH, A. A., HOFFMAN, E. W., WU, B. W., BOMALASKI, J. S., VENHAUS, R., PAN, L., OLD, L. J., PAVLICK, A. C. & WOLCHOK, J. D. 2013. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs*, 31, 425-34.
- PAN, D., MOUHIEDDINE, T. H., UPADHYAY, R., CASASANTA, N., LEE, A., ZUBIZARRETA, N., MOSHIER, E. & RICHTER, J. 2023. Outcomes with panobinostat in heavily pretreated multiple myeloma patients. *Semin Oncol*, 50, 40-48.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., ØVERVATN, A., BJØRKØY, G. & JOHANSEN, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- PARK, S., SIM, H. & LEE, K. 2016. Rapamycin-resistant and torin-sensitive mTOR signaling promotes the survival and proliferation of leukemic cells. *BMB Rep*, 49, 63-8.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PATIL, M. D., BHAUMIK, J., BABYKUTTY, S., BANERJEE, U. C. & FUKUMURA, D. 2016. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*, 35, 4957-72.
- PAVLOVA, N. N. & THOMPSON, C. B. 2016. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23, 27-47.
- QIN, X., JIANG, B. & ZHANG, Y. 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, 15, 781-6.
- QIU, F., CHEN, Y. R., LIU, X., CHU, C. Y., SHEN, L. J., XU, J., GAUR, S., FORMAN, H. J., ZHANG, H., ZHENG, S., YEN, Y., HUANG, J., KUNG, H. J. & ANN, D. K. 2014. Arginine starvation impairs mitochondrial respiratory function in ASS1-deficient breast cancer cells. *Sci Signal*, 7, ra31.
- RABINOVICH, S., ADLER, L., YIZHAK, K., SARVER, A., SILBERMAN, A., AGRON, S., STETTNER, N., SUN, Q., BRANDIS, A., HELBLING, D., KORMAN, S., ITZKOVITZ, S., DIMMOCK, D., ULITSKY, I., NAGAMANI, S. C., RUPPIN, E. &



- EREZ, A. 2015. Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*, 527, 379-383.
- RAJKUMAR, S. V. 2020. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 95, 548-567.
- RAJKUMAR, S. V., DIMOPOULOS, M. A., PALUMBO, A., BLADE, J., MERLINI, G., MATEOS, M. V., KUMAR, S., HILLEGASS, J., KASTRITIS, E., RICHARDSON, P., LANDGREN, O., PAIVA, B., DISPENZIERI, A., WEISS, B., LELEU, X., ZWEEGMAN, S., LONIAL, S., ROSINOL, L., ZAMAGNI, E., JAGANNATH, S., et al. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15, e538-48.
- REBSAMEN, M. & SUPERTI-FURGA, G. 2016. SLC38A9: A lysosomal amino acid transporter at the core of the amino acid-sensing machinery that controls MTORC1. *Autophagy*, 12, 1061-2.
- RICHARDSON, P. G., HUNGRIA, V. T., YOON, S. S., BEKSAC, M., DIMOPOULOS, M. A., ELGHANDOUR, A., JEDRZEJCZAK, W. W., GUENTHER, A., NAKORN, T. N., SIRITANARATKUL, N., SCHLOSSMAN, R. L., HOU, J., MOREAU, P., LONIAL, S., LEE, J. H., EINSELE, H., SOPALA, M., BENGOU DIFA, B. R., CORRADO, C., BINLICH, F., et al. 2016. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone in previously treated multiple myeloma: outcomes by prior treatment. *Blood*, 127, 713-21.
- ROBERT KOCH-INSTITUT & GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13 ed. Berlin.
- ROLLI-DERKINDEREN, M., MACHAVOINE, F., BARABAN, J. M., GROLLEAU, A., BERETTA, L. & DY, M. 2003. ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. *J Biol Chem*, 278, 18859-67.
- RÖLLIG, C., KNOP, S. & BORNHÄUSER, M. 2015. Multiple myeloma. *Lancet*, 385, 2197-208.
- ROSENTHAL, G. A. 1977. Nitrogen allocation for L-Canavanine synthesis and its relationship to chemical defense of the seed. *Biochem Syst Ecol*, 5, 219-220.
- ROSENTHAL, G. A., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1989. L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation. *J Biol Chem*, 264, 13693-6.
- RYTER, S. W., CLOONAN, S. M. & CHOI, A. M. 2013. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells*, 36, 7-16.
- SAN-MIGUEL, J. F., EINSELE, H. & MOREAU, P. 2016. The Role of Panobinostat Plus Bortezomib and Dexamethasone in Treating Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A European Perspective. *Adv Ther*, 33, 1896-1920.
- SAVARAJ, N., YOU, M., WU, C., WANGPAICHITR, M., KUO, M. T. & FEUN, L. G. 2010. Arginine deprivation, autophagy, apoptosis (AAA) for the treatment of melanoma. *Curr Mol Med*, 10, 405-12.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCOTT, L., LAMB, J., SMITH, S. & WHEATLEY, D. N. 2000. Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells. *Br J Cancer*, 83, 800-10.
- SESTER, L. 2021. *Canavanin-induzierte Zytotoxizität in Myelomzellen: Untersuchungen zu Wirkmechanismen unter Arginindepletion*. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- SHEN, L. J., BELOUSSOW, K. & SHEN, W. C. 2006. Modulation of arginine metabolic pathways as the potential anti-tumor mechanism of recombinant arginine

- deiminase. *Cancer Lett*, 231, 30-5.
- SHERMAN, M. Y. & GABAI, V. 2022. The role of Bag3 in cell signaling. *J Cell Biochem*, 123, 43-53.
- SHUVAYEVA, G., BOBAK, Y., IGUMENTSEVA, N., TITONE, R., MORANI, F., STASYK, O. & ISIDORO, C. 2014. Single amino acid arginine deprivation triggers pro-survival autophagic response in ovarian carcinoma SKOV3. *Biomed Res Int*, 2014, 505041.
- SIMIONI, C., CANI, A., MARTELLI, A. M., ZAULI, G., TABELLINI, G., MCCUBREY, J., CAPITANI, S. & NERI, L. M. 2014. Activity of the novel mTOR inhibitor Torin-2 in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential to prevent Akt reactivation. *Oncotarget*, 5, 10034-47.
- SPENCER, A., YOON, S. S., HARRISON, S. J., MORRIS, S. R., SMITH, D. A., BRIGANDI, R. A., GAUVIN, J., KUMAR, R., OPALINSKA, J. B. & CHEN, C. 2014. The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. *Blood*, 124, 2190-5.
- STÜRNER, E. & BEHL, C. 2017. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci*, 10, 177.
- SU, T. S., BOCK, H. G., O'BRIEN, W. E. & BEAUDET, A. L. 1981. Cloning of cDNA for argininosuccinate synthetase mRNA and study of enzyme overproduction in a human cell line. *J Biol Chem*, 256, 11826-31.
- SWAFFAR, D. S. & ANG, C. Y. 1999. Growth inhibitory effect of L-canavanine against MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells is not due to conversion to its toxic metabolite canaline. *Anticancer Drugs*, 10, 113-8.
- SWAFFAR, D. S., ANG, C. Y., DESAI, P. B. & ROSENTHAL, G. A. 1994. Inhibition of the growth of human pancreatic cancer cells by the arginine antimetabolite L-canavanine. *Cancer Res*, 54, 6045-8.
- SWAFFAR, D. S., ANG, C. Y., DESAI, P. B., ROSENTHAL, G. A., THOMAS, D. A., CROOKS, P. A. & JOHN, W. J. 1995. Combination therapy with 5-fluorouracil and L-canavanine: in vitro and in vivo studies. *Anticancer Drugs*, 6, 586-93.
- SYED, N., LANGER, J., JANCZAR, K., SINGH, P., LO NIGRO, C., LATTANZIO, L., COLEY, H. M., HATZIMICHAEL, E., BOMALASKI, J., SZLOSAREK, P., AWAD, M., O'NEIL, K., RONCAROLI, F. & CROOK, T. 2013. Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma. *Cell Death Dis*, 4, e458.
- SZLOSAREK, P. W., PHILLIPS, M. M., PAVLYK, I., STEELE, J., SHAMASH, J., SPICER, J., KUMAR, S., PACEY, S., FENG, X., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J., MOIR, G., LAU, K., ELLIS, S. & SHEAFF, M. 2020. Expansion Phase 1 Study of Pegargiminase Plus Pemetrexed and Cisplatin in Patients With Argininosuccinate Synthetase 1-Deficient Mesothelioma: Safety, Efficacy, and Resistance Mechanisms. *JTO Clin Res Rep*, 1, 100093.
- SZLOSAREK, P. W., STEELE, J. P., NOLAN, L., GILLIGAN, D., TAYLOR, P., SPICER, J., LIND, M., MITRA, S., SHAMASH, J., PHILLIPS, M. M., LUONG, P., PAYNE, S., HILLMAN, P., ELLIS, S., SZYSZKO, T., DANCEY, G., BUTCHER, L., BECK, S., AVRIL, N. E., THOMSON, J., et al. 2017. Arginine Deprivation With Pegylated Arginine Deiminase in Patients With Argininosuccinate Synthetase 1-Deficient Malignant Pleural Mesothelioma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 3, 58-66.
- TABE, Y., LORENZI, P. L. & KONOPLEVA, M. 2019. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood*, 134, 1014-1023.
- TANIOS, R., BEKDASH, A., KASSAB, E., STONE, E., GEORGIU, G., FRANKEL, A. E. & ABI-HABIB, R. J. 2013. Human recombinant arginase I(Co)-PEG5000

- [HuArgI(Co)-PEG5000]-induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 37, 1565-71.
- THOMAS, D. A., ROSENTHAL, G. A., GOLD, D. V. & DICKEY, K. 1986. Growth inhibition of a rat colon tumor by L-canavanine. *Cancer Res*, 46, 2898-903.
- THOREEN, C. C., KANG, S. A., CHANG, J. W., LIU, Q., ZHANG, J., GAO, Y., REICHLING, L. J., SIM, T., SABATINI, D. M. & GRAY, N. S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 284, 8023-32.
- TOLCHER, A. W., PATNAIK, A., PAPADOPOULOS, K. P., RASCO, D. W., BECERRA, C. R., ALLRED, A. J., ORFORD, K., AKTAN, G., FERRON-BRADY, G., IBRAHIM, N., GAUVIN, J., MOTWANI, M. & CORNFELD, M. 2015. Phase I study of the MEK inhibitor trametinib in combination with the AKT inhibitor afuresertib in patients with solid tumors and multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 75, 183-9.
- TSAI, H. J., HSIAO, H. H., HSU, Y. T., LIU, Y. C., KAO, H. W., LIU, T. C., CHO, S. F., FENG, X., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. S., KUO, M. C. & CHEN, T. Y. 2021. Phase I study of ADI-PEG20 plus low-dose cytarabine for the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Med*, 10, 2946-2955.
- TSAI, H. J., JIANG, S. S., HUNG, W. C., BORTHAKUR, G., LIN, S. F., PEMMARAJU, N., JABBOUR, E., BOMALASKI, J. S., CHEN, Y. P., HSIAO, H. H., WANG, M. C., KUO, C. Y., CHANG, H., YEH, S. P., CORTES, J., CHEN, L. T. & CHEN, T. Y. 2017. A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients. *Sci Rep*, 7, 11253.
- TSAI, W. B., AIBA, I., LONG, Y., LIN, H. K., FEUN, L., SAVARAJ, N. & KUO, M. T. 2012. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res*, 72, 2622-33.
- TSCHAKERT, L. 2020. *Kombination von Arginindepletion mit dem Argininanalogon Canavanin als innovative Therapiestrategie beim Multiplen Myelom*. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- VENDRUSCOLO, M. 2023. Thermodynamic and kinetic approaches for drug discovery to target protein misfolding and aggregation. *Expert Opin Drug Discov*, 1-11.
- VINCENZ, L., JÄGER, R., O'DWYER, M. & SAMALI, A. 2013. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*, 12, 831-43.
- VOORHEES, P. V., SPENCER, A., SUTHERLAND, H. J., O'DWYER, M. E., HUANG, S.-Y., STEWART, K., CHB, CHARI, A., ROSENZWIEG, M., NOOKA, A., ROSENBAUM, C., HOFMEISTER, C., SMITH, D. A., ANTAL, J. M., SANTIAGO-WALKER, A., GAUVIN, J., OPALINSKA, J. B. & S., T. 2013. Novel AKT inhibitor afuresertib in combination with bortezomib and dexamethasone demonstrates favorable safety profile and significant clinical activity in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 122, 283.
- VOVK, O. I., CHEN, O. I., IGUMENTSEVA, N. I., SENCHUK, O. Y., BARSKA, M. L., SYBIRNA, N. O. & STASYK, O. V. 2016. Effects of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. *Ukr Biochem J*, 88, 45-55.
- VYNNYTSKA-MYRONOVSKA, B., BOBAK, Y., GARBE, Y., DITTFELD, C., STASYK, O. & KUNZ-SCHUGHART, L. A. 2012. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. *Int J Cancer*, 130, 2164-75.
- VYNNYTSKA-MYRONOVSKA, B. O., KURLISHCHUK, Y., CHEN, O., BOBAK, Y.,

- DITTFELD, C., HÜTHER, M., KUNZ-SCHUGHART, L. A. & STASYK, O. V. 2016. Arginine starvation in colorectal carcinoma cells: Sensing, impact on translation control and cell cycle distribution. *Exp Cell Res*, 341, 67-74.
- VYNNYTSKA, B. O., MAYEVSKA, O. M., KURLISHCHUK, Y. V., BOBAK, Y. P. & STASYK, O. V. 2011. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anticancer Drugs*, 22, 148-57.
- WALTERS, J., POP, C., SCOTT, F. L., DRAG, M., SWARTZ, P., MATTOS, C., SALVESEN, G. S. & CLARK, A. C. 2009. A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochem J*, 424, 335-45.
- WANG, G., ZHOU, P., CHEN, X., ZHAO, L., TAN, J., YANG, Y., FANG, Y. & ZHOU, J. 2017. The novel autophagy inhibitor elaiophyllin exerts antitumor activity against multiple myeloma with mutant TP53 in part through endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 18, 584-595.
- WANG, H., LI, Q. F., CHOW, H. Y., CHOI, S. C. & LEUNG, Y. C. 2020a. Arginine deprivation inhibits pancreatic cancer cell migration, invasion and EMT via the down regulation of Snail, Slug, Twist, and MMP1/9. *J Physiol Biochem*, 76, 73-83.
- WANG, S., TSUN, Z. Y., WOLFSON, R. L., SHEN, K., WYANT, G. A., PLOVANICH, M. E., YUAN, E. D., JONES, T. D., CHANTRANUPONG, L., COMB, W., WANG, T., BAR-PELED, L., ZONCU, R., STRAUB, C., KIM, C., PARK, J., SABATINI, B. L. & SABATINI, D. M. 2015. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*, 347, 188-94.
- WANG, Y., ZHANG, L., HE, Z., DENG, J., ZHANG, Z., LIU, L., YE, W. & LIU, S. 2020b. Tunicamycin induces ER stress and inhibits tumorigenesis of head and neck cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *Am J Transl Res*, 12, 541-550.
- WANG, Z., SHI, X., LI, Y., FAN, J., ZENG, X., XIAN, Z., WANG, Z., SUN, Y., WANG, S., SONG, P., ZHAO, S., HU, H. & JU, D. 2014a. Blocking autophagy enhanced cytotoxicity induced by recombinant human arginase in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*, 5, e1563.
- WANG, Z., SHI, X., LI, Y., ZENG, X., FAN, J., SUN, Y., XIAN, Z., ZHANG, G., WANG, S., HU, H. & JU, D. 2014b. Involvement of autophagy in recombinant human arginase-induced cell apoptosis and growth inhibition of malignant melanoma cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 2485-94.
- WERNER, A., AMANN, E., SCHNITZIUS, V., HABERMEIER, A., LUCKNER-MINDEN, C., LEUCHTNER, N., RUPP, J., CLOSS, E. I. & MUNDER, M. 2016. Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation. *Eur J Immunol*, 46, 92-103.
- WERNER, A., KOSCHKE, M., LEUCHTNER, N., LUCKNER-MINDEN, C., HABERMEIER, A., RUPP, J., HEINRICH, C., CONRADI, R., CLOSS, E. I. & MUNDER, M. 2017. Reconstitution of T Cell Proliferation under Arginine Limitation: Activated Human T Cells Take Up Citrulline via L-Type Amino Acid Transporter 1 and Use It to Regenerate Arginine after Induction of Argininosuccinate Synthase Expression. *Front Immunol*, 8, 864.
- WESSELBORG, S. & STORK, B. 2015. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*, 72, 4721-57.
- WIECHMANN, S., RUPRECHT, B., SIEKMANN, T., ZHENG, R., FREJNO, M., KUNOLD, E., BAJAJ, T., ZOLG, D. P., SIEBER, S. A., GASSEN, N. C. & KUSTER, B. 2021. Chemical Phosphoproteomics Sheds New Light on the Targets and Modes of Action of AKT Inhibitors. *ACS Chem Biol*, 16, 631-641.
- WIESE, W., SIWECKA, N., WAWRZYNKIEWICZ, A., ROZPEDEK-KAMIŃSKA, W., KUCHARSKA, E. & MAJSTEREK, I. 2022. IRE1 $\alpha$  Inhibitors as a Promising



- Therapeutic Strategy in Blood Malignancies. *Cancers (Basel)*, 14.
- WIGLEY, W. C., FABUNMI, R. P., LEE, M. G., MARINO, C. R., MUALLEM, S., DEMARTINO, G. N. & THOMAS, P. J. 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol*, 145, 481-90.
- WINDSCHMITT, J., SCHINDERA, A., BÜLBÜL, Y., SESTER, L., JACOBI, B., HIEBEL, C., BEHL, C., THEOBALD, M. & MUNDER, M. Manuskript in Vorbereitung. The massive anti-tumoral effect of arginine depletion in combination with canavanine supplementation in multiple myeloma cells is induced by synthesis of highly toxic protein stress and can be reversed by blocking protein translation. Mainz: III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- WOLFSON, R. L. & SABATINI, D. M. 2017. The Dawn of the Age of Amino Acid Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell Metab*, 26, 301-309.
- WÖRMANN, B., DRIESSEN, C., EINSELE, H., GOLDSCHMIDT, H., GUNSILIUS, E., KORTÜM, M., KRÖGER, N., LUDWIG, H., MÜGGE, L.-O., NAUMANN, R., PRITZKULEIT, R., RÖLLIG, C., SCHEID, C., TAVERNA, C., WEISEL, K. & WEIßINGER, F. 2018. *Multiples Myelom* [Online]. Available: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html> [Accessed 27.05.2023].
- WORTHEN, D. R., CHIEN, L., TSUBOI, C. P., MU, X. Y., BARTIK, M. M. & CROOKS, P. A. 1998. L-Canavanine modulates cellular growth, chemosensitivity and P-glycoprotein substrate accumulation in cultured human tumor cell lines. *Cancer Lett*, 132, 229-39.
- WU, J. H., LIMMER, A. L., NARAYANAN, D., DOAN, H. Q., SIMONETTE, R. A., RADY, P. L. & TYRING, S. K. 2021. The novel AKT inhibitor afuresertib suppresses human Merkel cell carcinoma MKL-1 cell growth. *Clin Exp Dermatol*, 46, 1551-1554.
- WU, W. K., COFFELT, S. B., CHO, C. H., WANG, X. J., LEE, C. W., CHAN, F. K., YU, J. & SUNG, J. J. 2012. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene*, 31, 939-53.
- YAMAJI, M., OTA, A., WAHIDUZZAMAN, M., KARNAN, S., HYODO, T., KONISHI, H., TSUZUKI, S., HOSOKAWA, Y. & HANIUDA, M. 2017. Novel ATP-competitive Akt inhibitor afuresertib suppresses the proliferation of malignant pleural mesothelioma cells. *Cancer Med*, 6, 2646-2659.
- YAN, L. & LAMB, R. F. 2012. Amino acid sensing and regulation of mTORC1. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 621-5.
- YAO, S., JANKU, F., KOENIG, K., TSIMBERIDOU, A. M., PIHA-PAUL, S. A., SHI, N., STEWART, J., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J., MERIC-BERNSTAM, F. & FU, S. 2022. Phase 1 trial of ADI-PEG 20 and liposomal doxorubicin in patients with metastatic solid tumors. *Cancer Med*, 11, 340-347.
- YAO, S., JANKU, F., SUBBIAH, V., STEWART, J., PATEL, S. P., KASEB, A., WESTIN, S. N., NAING, A., TSIMBERIDOU, A. M., HONG, D., PIHA-PAUL, S. A., SHI, N., JOHNSTON, A., BOMALASKI, J. & FU, S. 2021. Phase 1 trial of ADI-PEG20 plus cisplatin in patients with pretreated metastatic melanoma or other advanced solid malignancies. *Br J Cancer*, 124, 1533-1539.
- YAU, T., CHENG, P. N., CHAN, P., CHAN, W., CHEN, L., YUEN, J., PANG, R., FAN, S. T. & POON, R. T. 2013. A phase 1 dose-escalating study of pegylated recombinant human arginase 1 (Peg-rhArg1) in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*, 31, 99-107.
- YAU, T., CHENG, P. N., CHAN, P., CHEN, L., YUEN, J., PANG, R., FAN, S. T., WHEATLEY, D. N. & POON, R. T. 2015. Preliminary efficacy, safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and quality of life study of pegylated

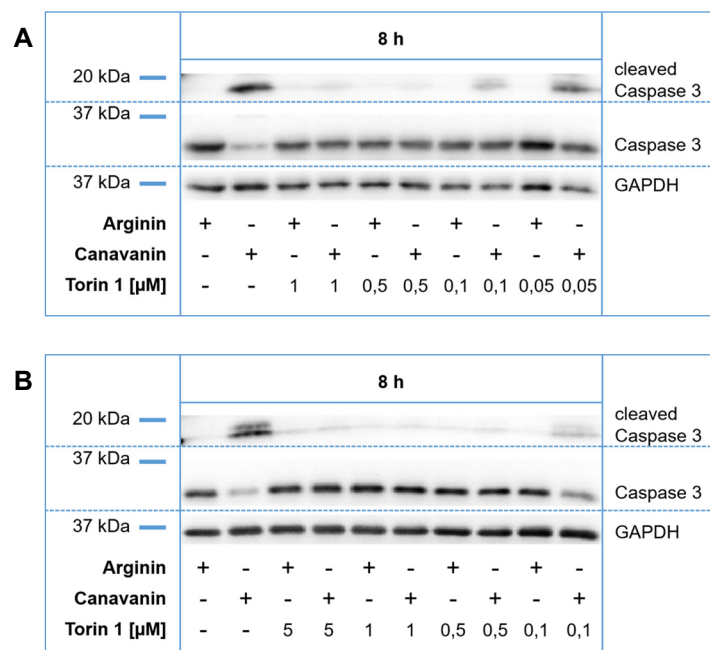
- recombinant human arginase 1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*, 33, 496-504.
- YAU, T., CHENG, P. N. M., CHIU, J., KWOK, G. G. W., LEUNG, R., LIU, A. M., CHEUNG, T. T. & NG, C. T. 2022. A phase 1 study of pegylated recombinant arginase (PEG-BCT-100) in combination with systemic chemotherapy (capecitabine and oxaliplatin)[PACOX] in advanced hepatocellular carcinoma patients. *Invest New Drugs*, 40, 314-321.
- YEATMAN, T. J., RISLEY, G. L. & BRUNSON, M. E. 1991. Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor. *Arch Surg*, 126, 1376-81; discussion 1381-2.
- YEH, T. H., CHEN, Y. R., CHEN, S. Y., SHEN, W. C., ANN, D. K., ZARO, J. L. & SHEN, L. J. 2016. Selective Intracellular Delivery of Recombinant Arginine Deiminase (ADI) Using pH-Sensitive Cell Penetrating Peptides To Overcome ADI Resistance in Hypoxic Breast Cancer Cells. *Mol Pharm*, 13, 262-71.
- YUN, Z., ZHICHAO, J., HAO, Y., OU, J., RAN, Y., WEN, D. & QUN, S. 2017. Targeting autophagy in multiple myeloma. *Leuk Res*, 59, 97-104.
- ZENG, R., HE, J., PENG, J., CHEN, Y., YI, S., ZHAO, F. & CUI, G. 2012. The time-dependent autophagy protects against apoptosis with possible involvement of Sirt1 protein in multiple myeloma under nutrient depletion. *Ann Hematol*, 91, 407-17.
- ZENG, X., LI, Y., FAN, J., ZHAO, H., XIAN, Z., SUN, Y., WANG, Z., WANG, S., ZHANG, G. & JU, D. 2013. Recombinant human arginase induced caspase-dependent apoptosis and autophagy in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Cell Death Dis*, 4, e840.
- ZHU, Y., FENG, M., WANG, B., ZHENG, Y., JIANG, D., ZHAO, L., MAMUN, M. A. A., KANG, H., NIE, H., ZHANG, X., GUO, N., QIN, S., WANG, N., LIU, H. & GAO, Y. 2023. New insights into the non-enzymatic function of HDAC6. *Biomed Pharmacother*, 161, 114438.

## 8. Anhang

### 8.1 Einsatz von Torin 1 in unterschiedlichen Konzentrationen

#### 8.1.1 Einfluss von Torin 1 auf die Induktion von Apoptose bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation

Die Versuche der folgenden Kapitel dienen als Ergänzung zur Dosisfindung von Torin 1, zusammen mit den durchflusszytometrischen Messungen des protektiven Effektes von Torin 1 auf die Viabilität der FD50- und U266-Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin-Supplementation (Kapitel 4.4.1.1). Um zu untersuchen, ob Torin 1 auch die Induktion von Apoptose auf Proteinebene beeinflusst, wurden FD50- und U266-Myelomzellen 8 Stunden in Anwesenheit von 1 mM Arginin und unter Argininmangel mit 100  $\mu$ M Canavanin inkubiert. Die Torin 1-Zugabe erfolgte in Konzentrationen von 50 nM bis 1  $\mu$ M für die FD50-Zellen bzw. von 100 nM bis 5  $\mu$ M für die U266-Zellen. Im Anschluss wurde mittels Western Blot die cleaved Caspase 3-Expression untersucht.



**Abbildung 8.1: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A) und U266- (B) Myelomzellen wurden für 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration an Torin 1 inkubiert. Gezeigt ist jeweils der dazugehörige Western Blot mit Detektion der cleaved Caspase 3 und der Caspase 3. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Jeweils n = 1.

Wie bereits in Abbildung 4.2 gesehen, resultierte für die FD50-Zellen und die U266-Zellen eine Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin in einer ausgeprägten cleaved Caspase 3-Expression. Alle gewählten Torin 1-Konzentrationen

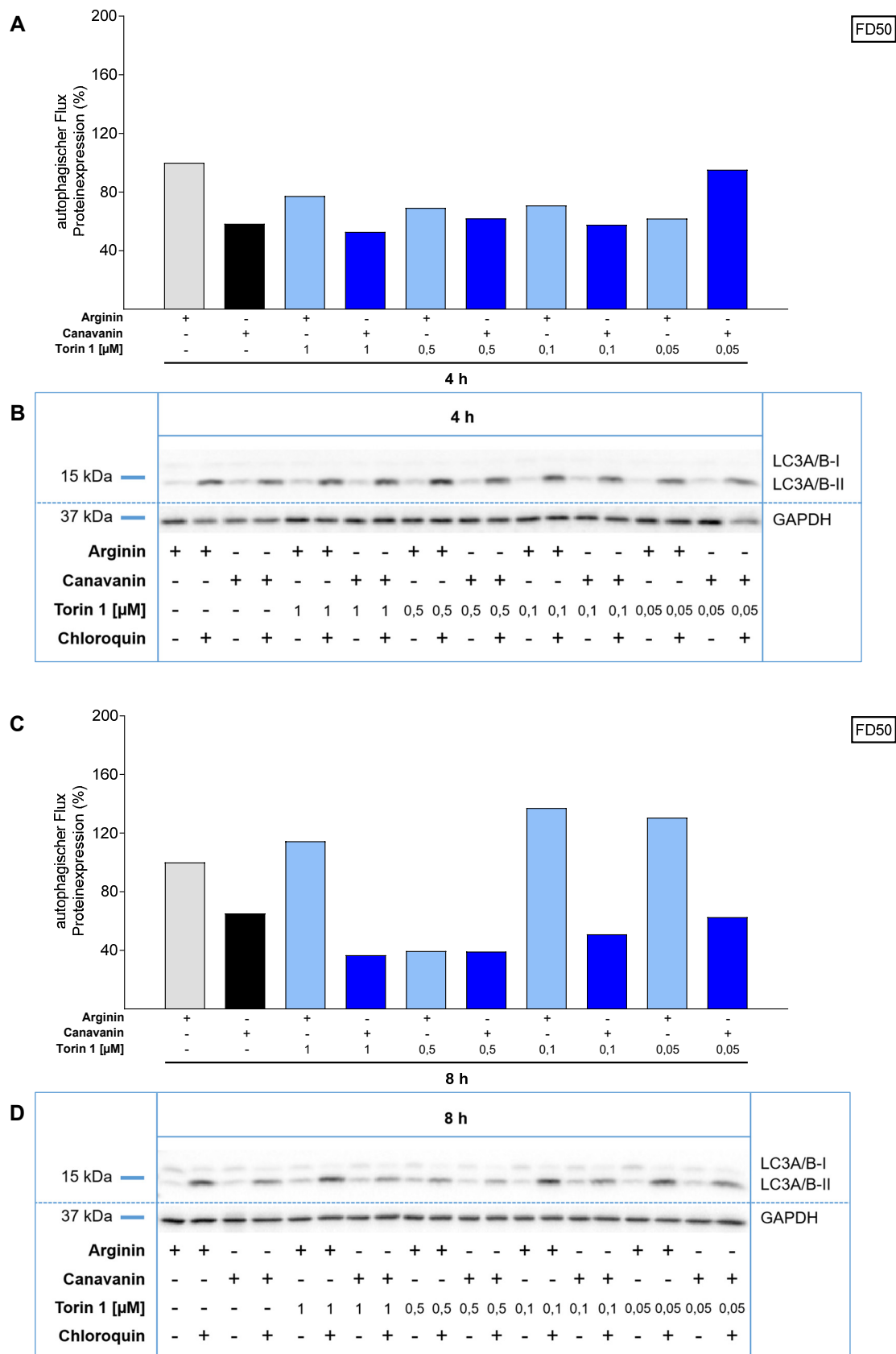
bewirkten eine Reduktion der cleaved Caspase 3-Expression in den FD50-Zellen (Abbildung 8.1 A) und U266-Zellen (Abbildung 8.1 B). Für keine der gewählten Torin 1-Konzentrationen wurde eine vermehrte Caspase 3-Spaltung in Anwesenheit von Arginin festgestellt.

### **8.1.2 Wird durch Torin 1 im aktuellen Modell Autophagie induziert?**

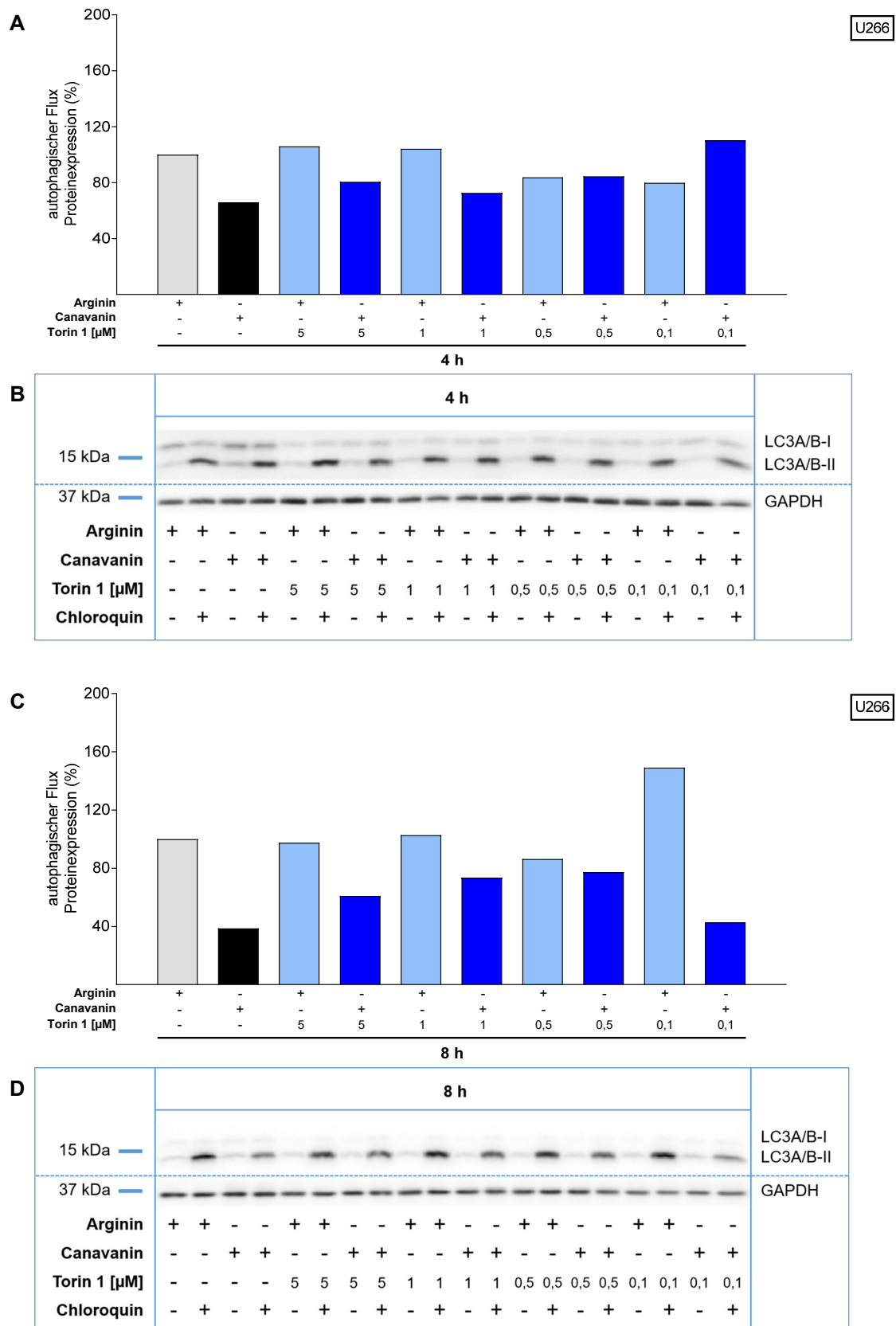
Die folgenden Versuche gehen der Frage nach, ob Torin 1 in den verwendeten Konzentrationen Autophagie induziert und darauf dessen protektiver Effekt für die Myelomzellen unter Argininmangel und Canavanin beruhen könnte. Hierfür wurden die FD50- und U266-Myelomzellen wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 8.1.1 über 4 und 8 Stunden inkubiert. Nur für die Bestimmung des autophagischen Fluxes mussten die Zellen zusätzlich unter den bekannten Bedingungen jeweils mit Supplementation von 50  $\mu$ M Chloroquin inkubiert werden. Die LC3A/B-II-, BAG3- und p62-Expression wurde dann mittels Western Blot bestimmt und der autophagische Flux, wie in Kapitel 3.2.3.5 erläutert, berechnet. Dabei wurde jeweils für den autophagischen Flux auf den Flux unter der Kontrollbedingung mit Arginin nach 4 bzw. 8 Stunden normiert (= 100%). Für die BAG3- und p62-Expression wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden bzw. 8 Stunden normiert (= 100%).

In beiden Zelllinien ist keine einheitliche Aussage in Bezug auf die Regulation des autophagischen Flux (FD50-Zellen: Abbildung 8.2, U266-Zellen: Abbildung 8.3), der p62- und der BAG3-Expression (FD50-Zellen: Abbildung 8.4, U266-Zellen: Abbildung 8.5) durch Torin 1 in den gewählten Konzentrationen bei Argininpräsenz und in Abwesenheit von Arginin mit Supplementation von Canavanin möglich.

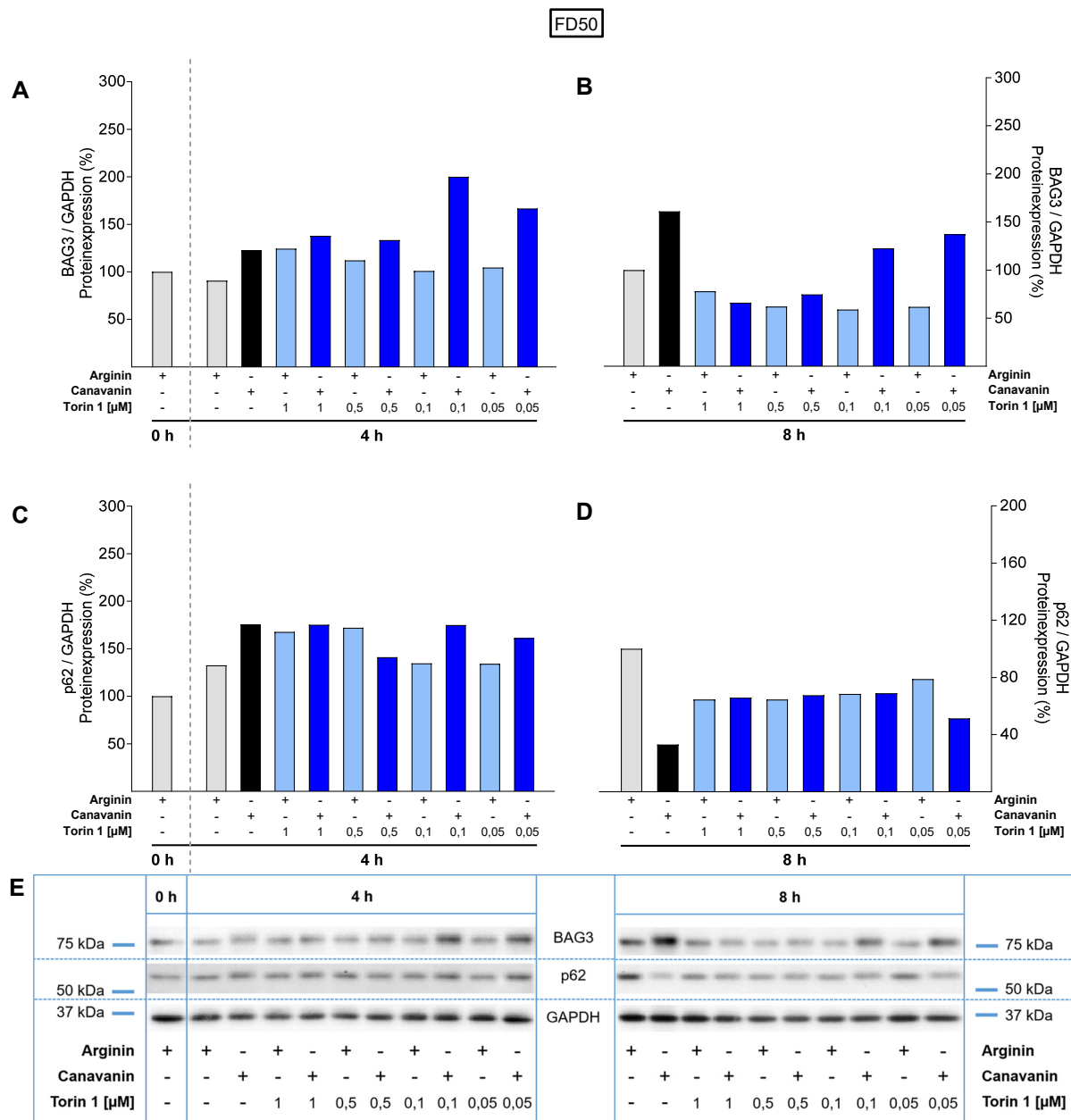




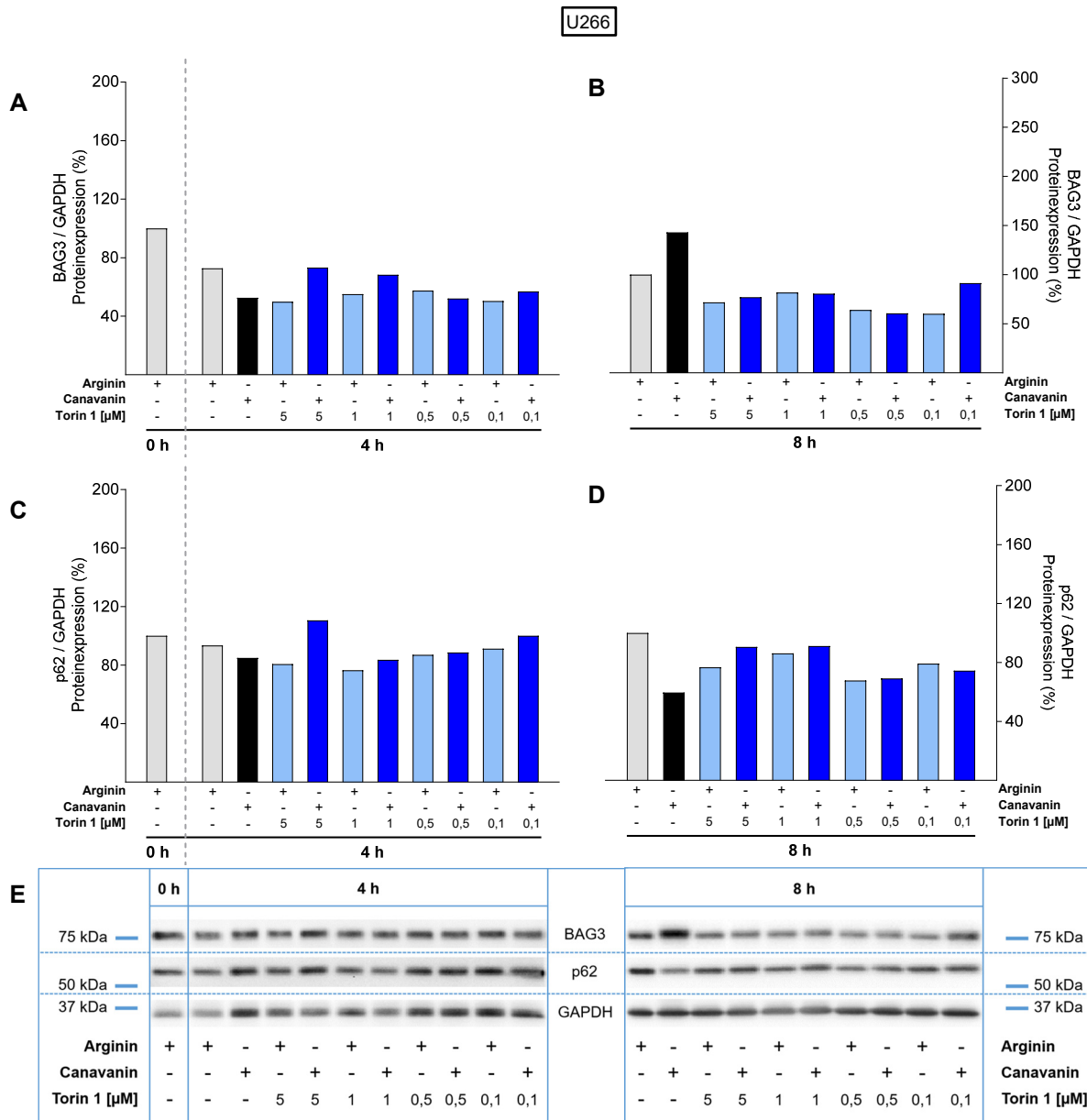
**Abbildung 8.2: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden für 4 (A, B) und 8 (C, D) Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100 μM Canavanin, 50 μM Chloroquin und der jeweils angegebenen Konzentration an Torin 1 inkubiert. (B, D) Die LC3A/B-II-Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Wert des autophagischen Fluxes, normiert auf den Flux unter +Arginin (= 100%). n = 1.



**Abbildung 8.3: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf den autophagischen Flux in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Die Versuchsdurchführung erfolgte für die U266-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 8.2. (A, C) Die Säulen repräsentieren den Wert des autophagischen Fluxes, normiert auf den Flux unter +Arginin (= 100%). (B, D) Gezeigt sind die dazugehörigen Western Blots. n = 1.



**Abbildung 8.4: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden für 4 (A, C, E) und 8 (B, D, E) Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100 μM Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration an Torin 1 inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. (E) Die BAG3- und p62-Expression wurden mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A - D) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der BAG3- bzw. p62-Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression (A, C) zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%) bzw. (B, D) unter +Arginin zum Zeitpunkt 8 Stunden (= 100%). n = 1.

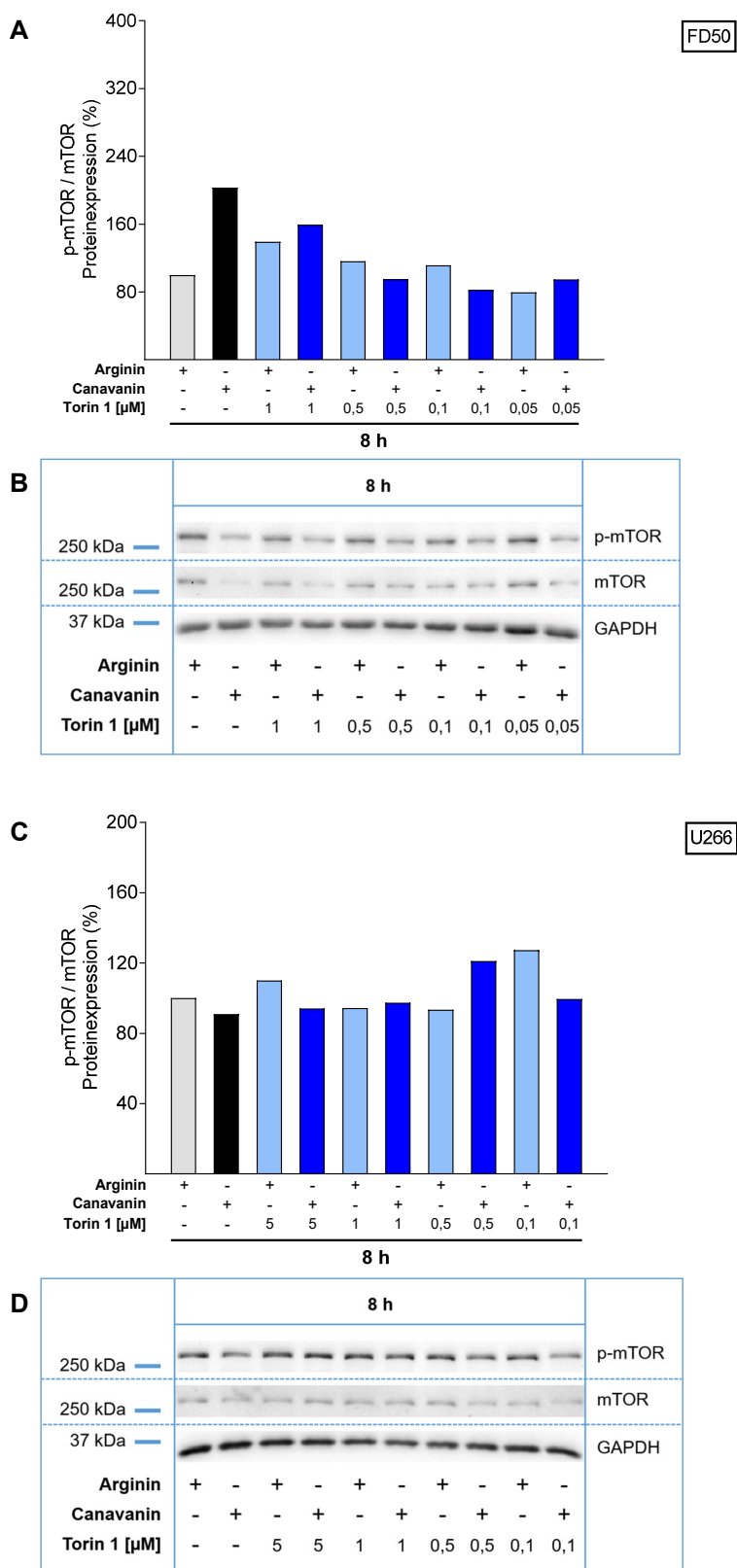


**Abbildung 8.5: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die BAG3- und p62-Expression in U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Die Versuchsdurchführung erfolgte für die U266-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 8.4. (A - D) Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der BAG3- bzw. p62-Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression (A, C) zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%) bzw. (B, D) unter +Arginin zum Zeitpunkt 8 Stunden (= 100%). (E) Gezeigt sind die dazugehörigen Western Blots. n = 1.

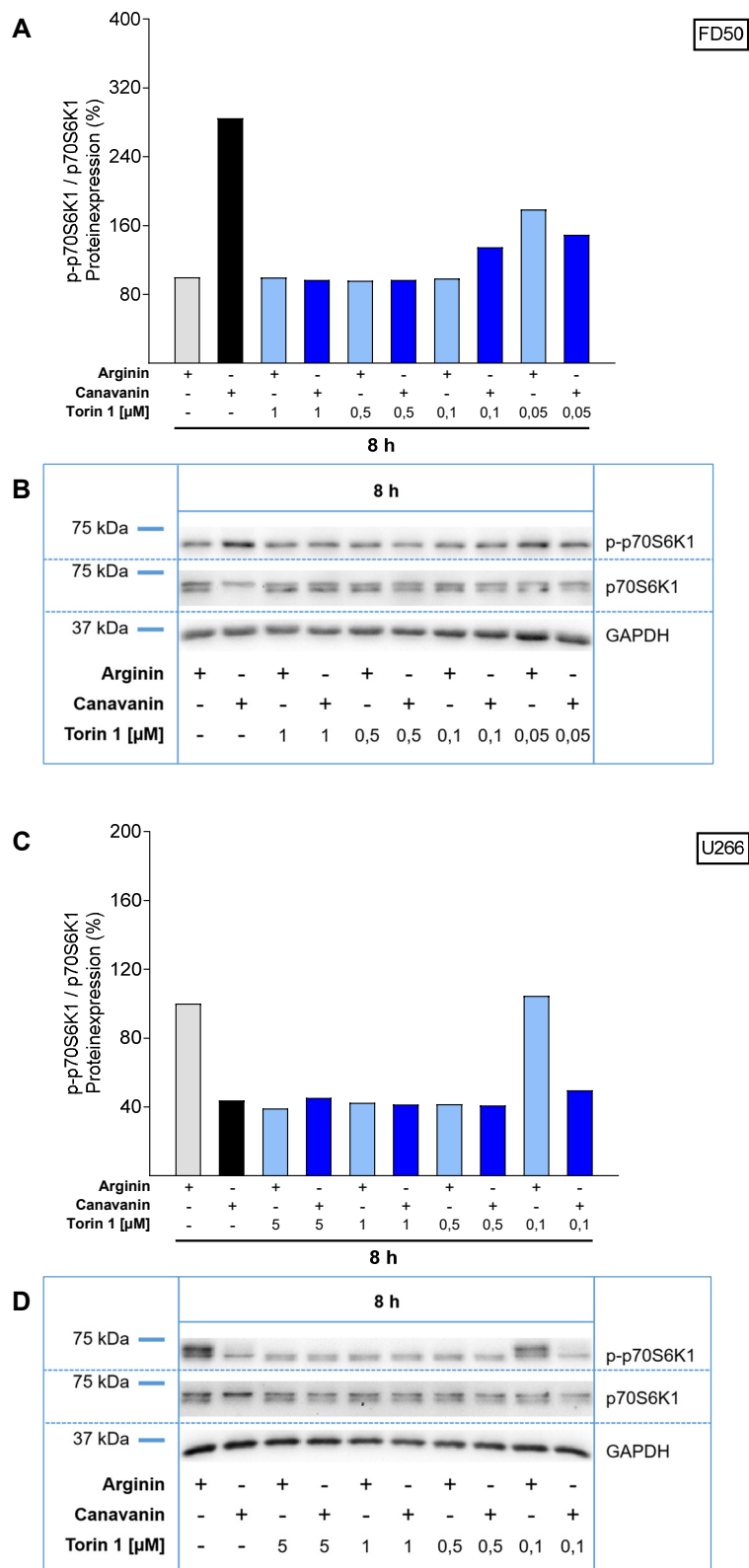
### 8.1.3 Findet durch Torin 1 eine effektive mTOR-Inhibition statt?

Mit den folgenden Versuchen wurde analysiert, wie sich das Phosphorylierungsmuster von mTOR und von der dem mTORC1 nachgeschalteten p70S6K1 durch Torin 1 in verschiedenen Konzentrationen unter den bekannten Inkubationsbedingungen ändern. Dazu wurden die FD50- und U266-Zellen wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 8.1.1 inkubiert und mittels Western Blot wurde die Expression an p-mTOR (Ser2448) und p-p70S6K1 (Thr389) bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin normiert (= 100%).

Zusammenfassend zeigte sich für beide Zelllinien bei einmaliger Durchführung der Experimente für die verwendeten Torin 1-Konzentrationen teilweise eine Reduktion der p-mTOR- (Abbildung 8.6) bzw. p-p70S6K1-Expression (Abbildung 8.7), wie sie für eine suffiziente mTORC1-Inhibition durch Torin 1 zu erwarten gewesen wäre. Zum Teil waren die erzielten Effekte jedoch nicht mit der Erwartung an einen mTOR-Inhibitor vereinbar. Diese Effekte hatten sich jedoch in Kapitel 4.4.3 nicht als signifikant herausgestellt.



**Abbildung 8.6: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 8.1. (A, C) Die Säulen repräsentieren die p-mTOR-Expression im Verhältnis zu mTOR, normiert auf das Verhältnis unter +Arginin zum Zeitpunkt 8 Stunden (= 100%). (B, D) Gezeigt ist jeweils der dazugehörige Western Blot mit Detektion von p-mTOR (Ser2448) und mTOR. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Jeweils n = 1.

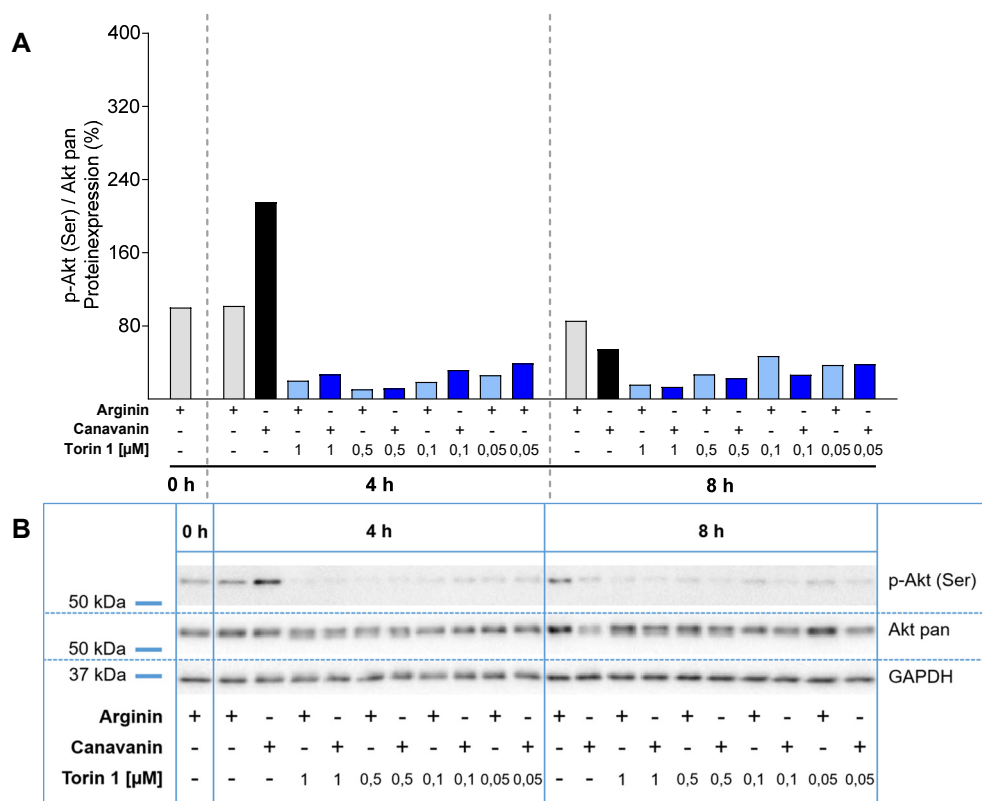


**Abbildung 8.7: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte für die FD50- (A, B) und U266- (C, D) Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 8.1. (A, C) Die Säulen repräsentieren die p-p70S6K1-Expression im Verhältnis zu p70S6K1, normiert auf das Verhältnis unter +Arginin zum Zeitpunkt 8 Stunden (= 100%). (B, D) Gezeigt ist jeweils der dazugehörige Western Blot mit Detektion von p-p70S6K1 (Thr389) und p70S6K1. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Jeweils n = 1.

### 8.1.4 Wie beeinflusst Torin 1 den mTORC2-Signalweg?

Nach der Wirkung auf mTORC1 (Kapitel 8.1.2), wurde die Auswirkung von Torin 1 auf mTORC2 bzw. auf das nachgeschaltete Protein Akt im folgenden Kapitel analysiert. Zur Bestimmung der Expression von p-Akt (Ser473) mittels Western Blot wurden die FD50-Zellen wie für die Caspase-Analyse von Kapitel 8.1.1 über 4 und 8 Stunden inkubiert. Dabei wurde auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

In den FD50-Zellen resultierte die Co-Inkubation mit Torin 1 in allen verwendeten Konzentrationen nach 4 und 8 Stunden (Abbildung 8.8) in einer Reduktion der Phosphorylierung der Serin 473-Stelle von Akt sowohl unter der Kontrollbedingung mit Arginin als auch unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel mit Canavanin. Wie erwartet führte Torin 1 somit zu einer Reduktion der p-Akt (Ser)-Expression als Zeichen der mTORC2-Inhibition.



**Abbildung 8.8: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Torin 1 auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473 in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte für die FD50-Myelomzellen analog der Beschreibung von Abbildung 8.4. (A) Die Säulen repräsentieren die p-Akt (Ser)-Expression im Verhältnis zu Akt pan, normiert auf das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%). (B) Gezeigt ist ein Western Blot mit Detektion von p-Akt (Ser473) und Akt pan. Als Ladekontrolle diente GAPDH. n = 1.



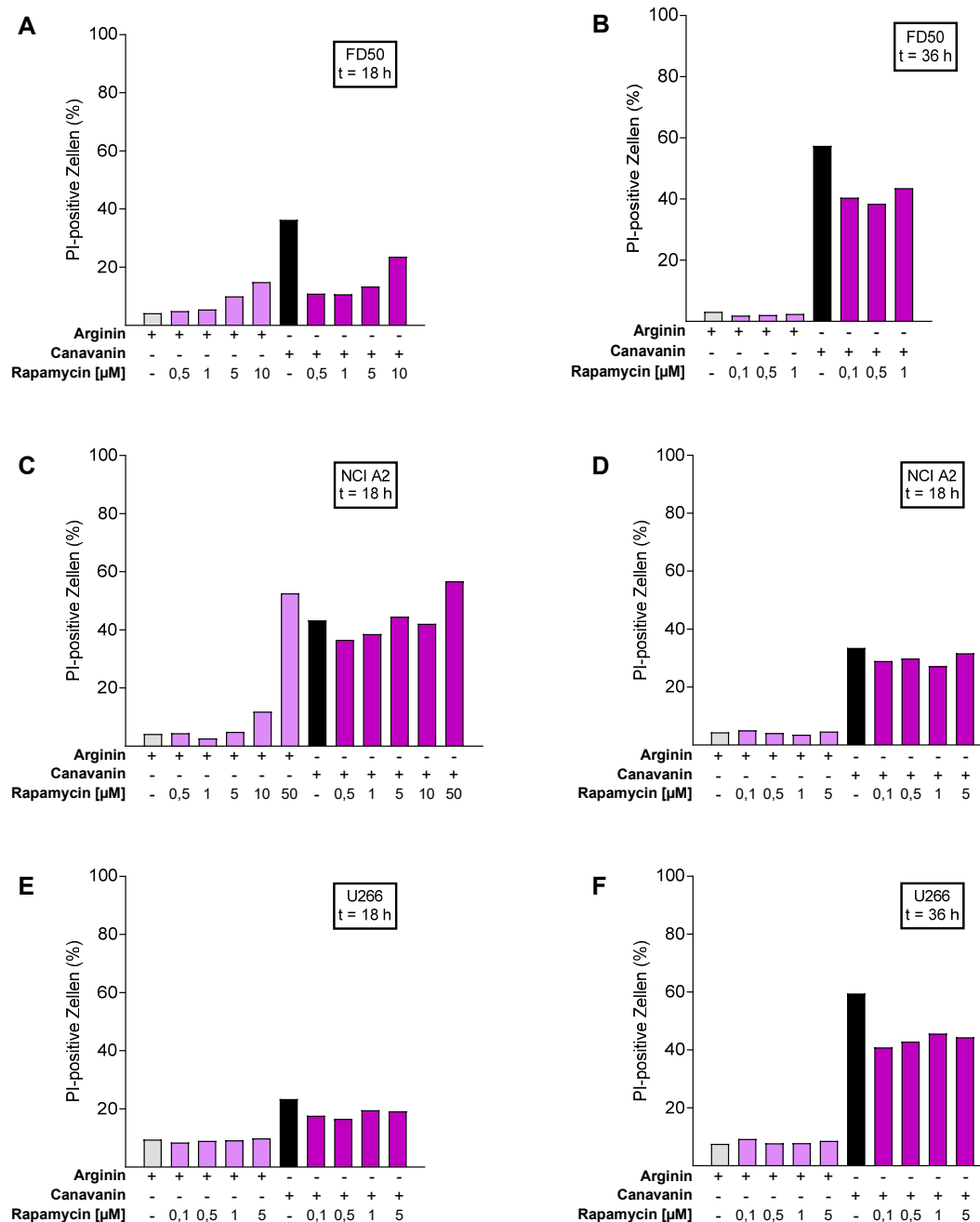
## **8.2 Wirkt die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin zwecks Autophagie-Induktion protektiv bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?**

### **8.2.1 Ergibt sich durch Rapamycin ein Überlebensvorteil bei Argininmangel und Canavanin-Supplementation?**

Im Folgenden wurde der Einfluss eines weiteren mTOR-Inhibitors, nämlich Rapamycin, getestet. Dazu wurden FD50-, NCI A2- und U266-Myelomzellen für 18 oder 36 Stunden mit Konzentrationen zwischen 100 nM bis 50  $\mu$ M des mTOR-Inhibitors Rapamycin jeweils unter Argininmangel und 100  $\mu$ M Canavanin und zum Vergleich mit 1 mM Arginin inkubiert. Anschließend wurde der Anteil PI-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Bedingungen mit Rapamycin erfolgte für alle Versuche des Kapitels 8.2, der Empfehlung des Herstellers folgend, jeweils eine 4,5-stündige Vorinkubation mit der entsprechenden Rapamycin-Konzentration unter argininhaltigen Bedingungen.

Zusammenfassend wirkte für die beiden Zelllinien FD50 (Abbildung 8.9 A + B) und U266 (Abbildung 8.9 E + F) Rapamycin in einer Konzentration von 500 nM am stärksten protektiv bei einer Inkubation unter Argininmangel und Canavanin. Außerdem zeigten sich bei dieser Rapamycin-Konzentration keine toxischen Effekte auf die Viabilität der Zellen unter der Kontrollbedingung mit Arginin. Auf die NCI A2-Zellen hatte Rapamycin tendenziell keinen protektiven Einfluss in Bezug auf das Überleben unter der Kombinationsbehandlung (Abbildung 8.9 C + D).

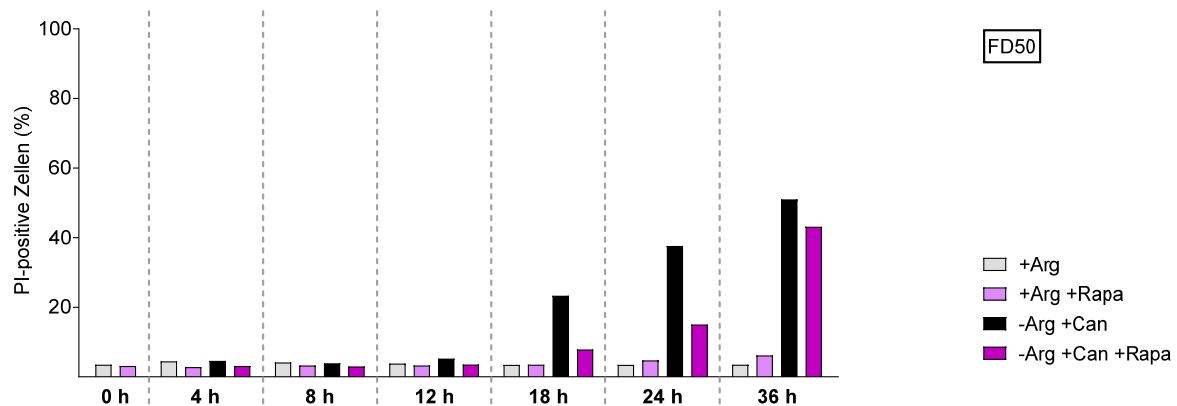
Die DMSO-Konzentration der gewählten Rapamycin-Konzentration von 500 nM entspricht der DMSO-Konzentration für 500 nM Torin 1. In den nun folgenden Versuchen durfte auf die Analyse einer DMSO-Kontrolle verzichtet werden, da bereits gezeigt wurde, dass DMSO auf die untersuchten Proteinexpressionen bzw. auf die Viabilität in dieser Konzentration keinen signifikanten Einfluss gegenüber einer Inkubation ohne DMSO in Anwesenheit von Arginin bzw. unter Argininmangel und Canavanin hatte.



**Abbildung 8.9: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin auf die Viabilität der FD50-, NCI A2- und U266-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50- (A, B), NCI A2- (C, D) und U266- (E, F) Myelomzellen wurden über den angegebenen Zeitraum t in Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und der jeweils angegebenen Konzentration an Rapamycin inkubiert. Für die rapamycinhaltigen Bedingungen erfolgte jeweils eine Vorinkubation mit der entsprechenden Rapamycin-Konzentration unter +Arginin über 4,5 Stunden. Die Säulen zeigen den Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Jeweils n = 1.

Um den protektiven Effekt von Rapamycin auf die Viabilität der FD50 im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden FD50-Myelomzellen über 4, 8, 12, 18, 24 und 36 Stunden in Anwesenheit von 1 mM Arginin, in Abwesenheit von Arginin und Supplementation von 100  $\mu$ M Canavanin und jeweils mit und ohne 500 nM Rapamycin inkubiert.

Im Zeitraum von 0 bis einschließlich 12 Stunden war der durchschnittliche Anteil der PI-positiven Zellen unter allen Inkubationsbedingungen in etwa gleich hoch (Abbildung 8.10). Nach 18, 24 und 36 Stunden nahm der Anteil toter Zellen unter der Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin im Vergleich zu der Kontrollbedingung mit Arginin zu. Die Co-Inkubation mit Rapamycin unter der Kombinationsbehandlung senkte diesen Anteil, insbesondere nach 18 und 24 Stunden. Außerdem war zu beobachten, dass 500 nM Rapamycin auch nach 36 Stunden für die FD50-Zellen unter argininhaltigen Bedingungen nicht toxisch wirkten. In dieser einmalig durchgeführten, durchflusszytometrischen Messung hatten 500 nM Rapamycin, ebenso wie bereits der mTOR-Inhibitor Torin 1, einen protektiven Effekt auf die Viabilität der FD50 unter Arginindepletion und Canavanin.

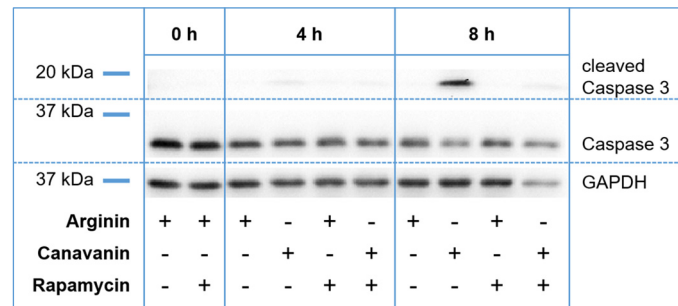


**Abbildung 8.10: Wirkung von Rapamycin auf die Viabilität der FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden über 4, 8, 12, 18, 24 und 36 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can) und 500 nM Rapamycin (Rapa) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) analysiert. Für die rapamycinhaltigen Bedingungen erfolgte jeweils eine Vorinkubation mit der entsprechenden Rapamycin-Konzentration unter +Arginin über 4,5 Stunden. Die Säulen zeigen den Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. n = 1.

Als korrespondierende Analyse auf Proteinebene diente der Nachweis der cleaved Caspase 3 im Western Blot. Dazu wurden FD50-Myelomzellen über 4 und 8 Stunden in An- und Abwesenheit von 1 mM Arginin, 100  $\mu$ M Canavanin und 500 nM Rapamycin inkubiert.

Wie bereits bekannt (Abbildung 4.2 A, Abbildung 4.7 A, Abbildung 8.1 A), resultierte die Kombinationsbehandlung von Argininmangel und Canavanin in einer deutlich erhöhten Expression der cleaved Caspase 3 nach 8 Stunden im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Arginin (Abbildung 8.11). Durch Rapamycin wurde die Expression der cleaved Caspase 3 nach 8 Stunden unter Kombinationsbehandlung so

weit gesenkt, dass dieses Caspase 3-Spaltprodukt fast nicht mehr detektierbar war. Folglich zeigte sich auch für Rapamycin (n = 1), neben Torin 1, einen vor Apoptose schützenden Effekt auf die FD50-Zellen unter der Kombinationsbehandlung. Nach 4 Stunden Inkubation war cleaved Caspase 3 unter allen Inkubationsbedingungen fast nicht detektierbar.

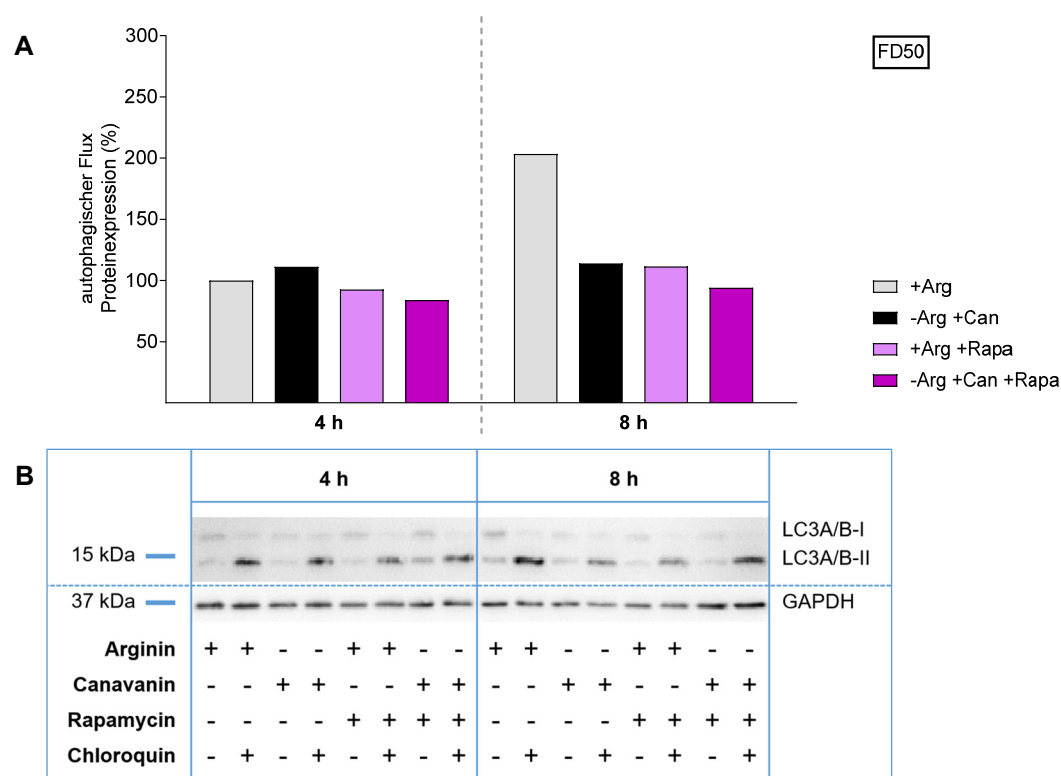


**Abbildung 8.11: Wirkung von Rapamycin auf die cleaved Caspase 3-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100 µM Canavanin (Can) und 500 nM Rapamycin (Rapa) inkubiert bzw. zu Beginn des Experiments (0 h) lysiert. Für die rapamycinhaltigen Bedingungen erfolgte jeweils eine Vorinkubation mit der entsprechenden Rapamycin-Konzentration unter +Arg über 4,5 Stunden. Gezeigt ist der dazugehörige Western Blot mit Detektion der cleaved Caspase 3 und Caspase 3. Als Ladekontrolle diente GAPDH. n = 1.

Zusammenfassend zeigte sich auch für Rapamycin ein protektiver Effekt in Bezug auf die Viabilität und die Apoptose-Induktion in den FD50-Zellen.

### 8.2.2 Wird durch Rapamycin Autophagie induziert?

Für die FD50-Zellen wurde ebenfalls überprüft, ob durch 500 nM Rapamycin Autophagie induziert wird. Zur Bestimmung des autophagischen Fluxes wurden FD50-Zellen analog der Caspase-Analyse (Kapitel 8.2.1) inkubiert und unter jeder Inkubationsbedingung zusätzlich noch einmal mit Supplementation von 50  $\mu$ M Chloroquin. Die LC3A/B-II, BAG3- und p62-Expression wurde dann mittels Western Blot bestimmt und der autophagische Flux wie bereits erwähnt (Kapitel 3.2.3.5) berechnet. Dabei wurde für den autophagischen Flux auf den Flux unter der Kontrollbedingung mit Arginin nach 4 Stunden normiert (= 100%). Für die BAG3- und p62-Expression wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

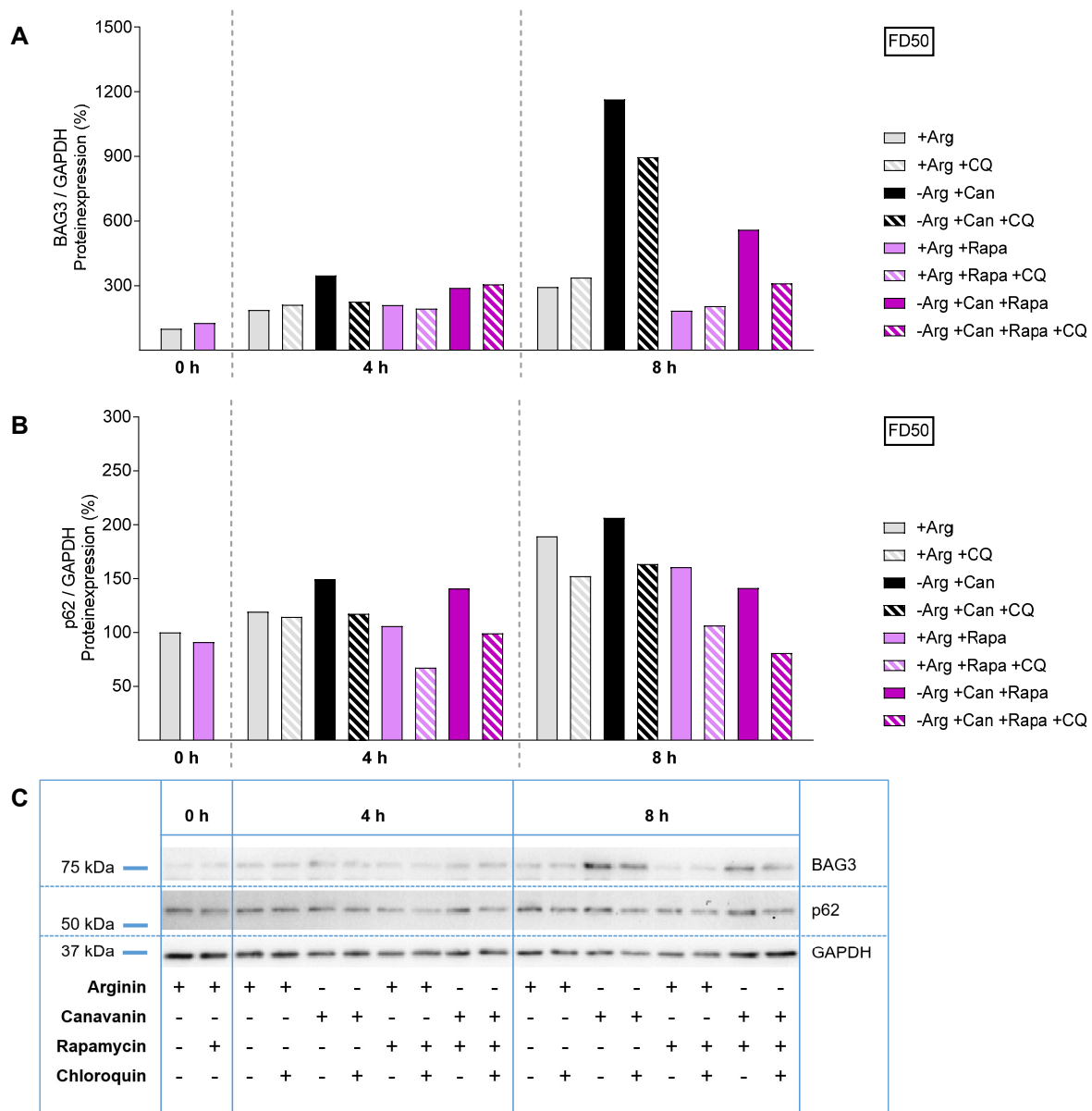


**Abbildung 8.12: Wirkung von Rapamycin auf den autophagischen Flux in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** FD50-Myelomzellen wurden für 4 und 8 Stunden in Medium mit (+) bzw. ohne (-) 1 mM Arginin (Arg), 100  $\mu$ M Canavanin (Can), 500 nM Rapamycin (Rapa) und 50  $\mu$ M Chloroquin (CQ) inkubiert. (B) Die LC3A/B-II-Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A) Die Säulen repräsentieren den Wert des autophagischen Fluxes, normiert auf den Flux unter +Arg zum Zeitpunkt 4 Stunden (= 100%). n = 1.

In den FD50-Zellen wurde der autophagische Flux (Abbildung 8.12) und auch die p62-Expression (Abbildung 8.13 B, C) durch Rapamycin in Anwesenheit von Arginin und unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation tendenziell reduziert. Ebenso wurde die BAG3-Expression durch Rapamycin unter den zuvor genannten

Bedingungen größtenteils reduziert (Abbildung 8.13 A, C). Die chloroquinhaltigen Bedingungen wurden nur zur Bestimmung des autophagischen Fluxes angefertigt. Eine Aussage über die Autophagie anhand von BAG3 und p62 wurde anhand der Chloroquin-freien Bedingungen getroffen (Abbildung 8.13).

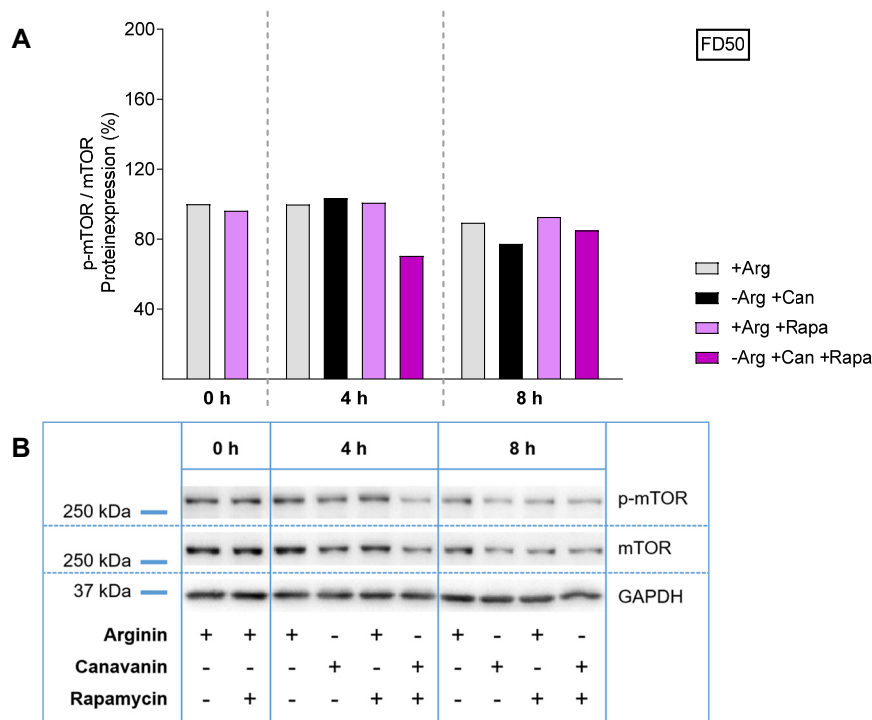
Zusammenfassend konnte auch für Rapamycin keine einheitliche Aussage bezüglich der Induktion von Autophagie in den FD50-Zellen getroffen werden.



**Abbildung 8.13: Wirkung von Rapamycin auf die BAG3- und p62-Expression in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte analog der Beschreibung von Abbildung 8.12 (C) Die BAG3- und p62-Proteinexpression wurden mittels Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (A, B) Die Säulen repräsentieren die BAG3- bzw. p62-Expression im Verhältnis zu GAPDH, normiert auf die Expression von +Arg zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%). n = 1.

### 8.2.3 Wird durch Rapamycin mTOR inhibiert?

Für den mTOR-Inhibitor Rapamycin wurde ebenfalls untersucht, wie sich die Phosphorylierung von mTOR und der nachgeschalteten p70S6K1 ändern. Die Inkubation der FD50-Zellen erfolgte analog der Caspase-Analyse von Kapitel 8.2.1. Anschließend wurde mittels Western Blot die Expression von p-mTOR (Ser2448) und p-p70S6K1 (Thr389) bestimmt. Dabei wurde jeweils auf die Expression unter der Kontrollbedingung mit Arginin zum Zeitpunkt 0 Stunden normiert (= 100%).

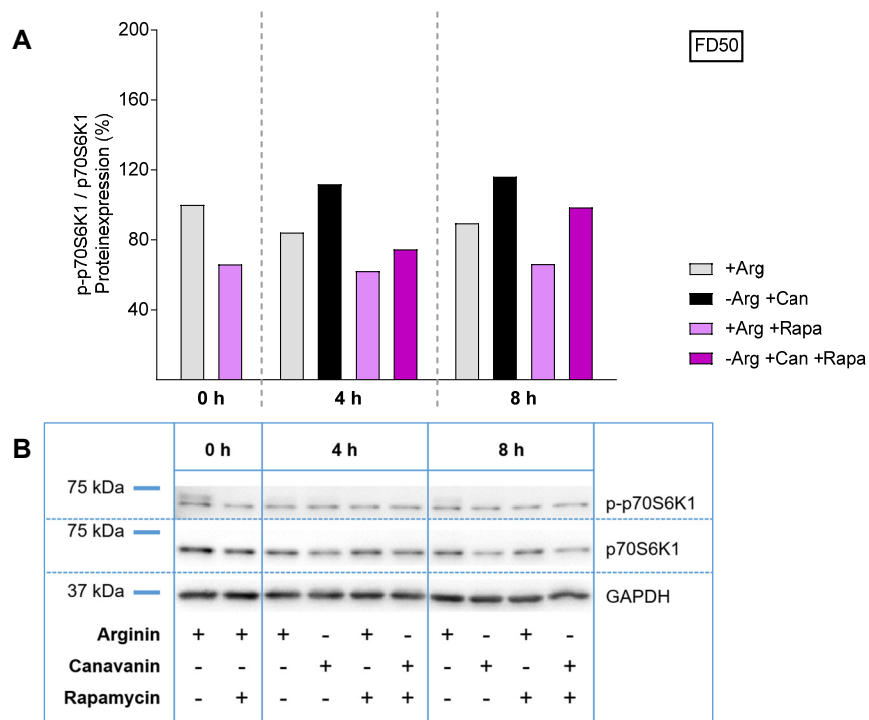


**Abbildung 8.14: Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von mTOR in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte analog der Beschreibung von Abbildung 8.11. (A) Die Säulen repräsentieren die p-mTOR-Expression im Verhältnis zu mTOR, normiert auf das Verhältnis unter +Arg zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%). (B) Gezeigt ist der dazugehörige Western Blot mit Detektion von p-mTOR (Ser2448) und mTOR. Als Ladekontrolle diente GAPDH. n = 1.

Nach 4 und 8 Stunden beeinflusste Rapamycin die Phosphorylierung von mTOR in Anwesenheit von Arginin nicht (Abbildung 8.14). Hingegen wurde die Expression von p-mTOR nach 4 Stunden für die FD50 unter Argininmangel und Canavanin durch Rapamycin reduziert, so wie man es von einem mTOR-Inhibitor erwarten würde. Nach 8 Stunden jedoch nahm die Phosphorylierung von mTOR unter den genannten Bedingungen leicht zu.

Insgesamt zeigte sich zu allen untersuchten Zeitpunkten durch Rapamycin sowohl in Anwesenheit von Arginin als auch unter Argininmangel und Canavanin eine Reduktion

von p-p70S6K1 als Zeichen der mTORC1-Inhibition (Abbildung 8.15).



**Abbildung 8.15: Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung von p70S6K1 in FD50-Zellen unter Argininmangel und Canavanin-Supplementation.** Der Versuchsansatz erfolgte analog der Beschreibung von Abbildung 8.11. (A) Die Säulen repräsentieren die p-p70S6K1-Expression im Verhältnis zur p70S6K1, normiert auf das Verhältnis unter +Arg zum Zeitpunkt 0 Stunden (= 100%). (B) Gezeigt ist der dazugehörige Western Blot mit Detektion von p-p70S6K1 (Thr389) und p70S6K1. Als Ladekontrolle diente GAPDH. n = 1.



## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Realisierung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater [REDACTED] [REDACTED] bedanken, der mir ermöglichte meine Promotionsarbeit in seinem Labor anzufertigen. Insbesondere danke ich ihm für die konstruktiven Ansätze zum weiteren Verlauf meines Projektes und für die Unterstützung bei der Vorbereitung des Vortrages für die Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO).

Des Weiteren möchte ich [REDACTED] danken für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonders großes Dankeschön geht an [REDACTED] für die professionelle Einarbeitung, Betreuung und fachliche Unterstützung meiner Dissertation. Zudem konnte ich mich stets auf eine schnelle sowie zuverlässige Rückmeldung in der Schreibphase verlassen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe [REDACTED] bedanken. Besonders erwähnen möchte ich [REDACTED] für die technische Hilfe und moralische Stütze.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe [REDACTED] [REDACTED] für die Möglichkeit ihr LSM zu nutzen.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie, die mir großes Vertrauen schenkt und mir den Freiraum lässt, meine persönlichen Träume zu erfüllen.

Zuletzt möchte ich mich bei der [REDACTED] [REDACTED] und [REDACTED] [REDACTED] bedanken. Dank deren großzügigen Stipendiums konnte ich mich während meines Forschungsjahres komplett auf den experimentellen Teil meiner Dissertation fokussieren.