

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

***In-vitro*-Analyse der Glutamin-Restriktion im murinen Modellsystem L929
sowie des Einflusses potentieller caloric restriction mimetics
auf das Plattenepithelkarzinom HNSCC**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Leslie Peter
aus Schmalkalden**

Würzburg, April 2023

Referent: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. Thomas Müller

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2024

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Das orale Plattenepithelkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Therapie	2
1.1.3	Grundlagen der Autophagie	3
1.1.4	Kalorienrestriktion	6
1.1.5	Methionin-Restriktion.....	16
1.1.6	Caloric restriction mimetics	17
1.1.7	Spermidin.....	18
1.2	Krebsstoffwechsel und Therapieansätze	20
1.3	Die Rolle von Glutamin im Krebsstoffwechsel	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	23
2	<i>Material und Methoden</i>	24
2.1	Materialien	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Nachweismittel/Reagenzien	26
2.1.4	Zellkulturmedien.....	28
2.1.5	Antikörper.....	28
2.1.6	Verwendete Lösungen und Puffer	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur und Passage	30
2.2.2	Erstellen von Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Wirkstoffen.....	31
2.2.3	Kristallviolett-Assay.....	32
2.2.4	Datenverarbeitung und Auswertung	33
2.2.5	Optische Kontrolle der Morphologie	34
2.2.6	Digitalmikroskopie ImageXpress Pico	34
2.2.7	Gewinnung von Zelllysaten.....	34
2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	35
2.2.9	Western Blot.....	35
2.2.10	Massenspektrometrie.....	37

3	<i>Ergebnisse</i>	41
3.1	Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter dem Einfluss ausgesuchter Polyamine	41
3.1.1	Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT und HeLa unter Einfluss von Spermidin und Spermin.....	41
3.1.2	Optische Analyse der Zellviabilität.....	44
3.1.3	Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25 unter Einfluss von Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin	46
3.2	Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa unter dem Einfluss von Glutamin	49
3.2.1	Proliferationsverhalten unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von drei Tagen .	49
3.2.2	Proliferationsverhalten unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen .	50
3.3	Analysen der Autophagie-Induktion unter Methionin-Restriktion und Spermidin-/Spermin-Inkubation	52
3.4	Analyse des metabolischen Profils der murinen Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion mittels Massenspektrometrie (LC-MS)	56
3.4.1	Untersuchung metabolischer Veränderungen in der Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen.....	57
3.4.2	Metabolischer Fingerabdruck der Glutamin-Restriktion nach 48 h.....	72
4	<i>Diskussion</i>	74
4.1	Antiproliferativer Effekt der Polyamine Spermidin und Spermin auf das Wachstum humaner und muriner Zelllinien	74
4.2	Keine Autophagie-Induktion durch exogenes Spermidin	75
4.3	Autophagie-Induktion durch Methionin-Restriktion	76
4.4	Unterschiede bei der Wirkung der Vorläufer Putrescin und N-Acetylputrescin im Vergleich zu Spermidin und Spermin auf die Proliferation	77
4.5	Antiproliferativer Effekt der Glutamin-Restriktion	78
4.6	Massenspektrometrische Analyse des Metaboloms der Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion	79
4.6.1	Maßgebliche Beeinflussung des Aminosäurestoffwechsels	79
4.6.2	Rückgang der Nukleotidsynthese	80

4.6.3	Eignung der Glutamin-Restriktion zur Induktion des Low-Energy-Metabolismus (LEM).....	82
4.6.4	Umleitung des Glutamins in den Citratzyklus	85
4.6.5	Warburg-Effekt	86
4.6.6	Geringerer Anstieg der Carnitine unter Glutamin-Restriktion.....	87
4.6.7	Cystinanstieg unter Glutamin-Restriktion	89
4.6.8	Zusammenfassung der massenspektrometrischen Analyse	90
4.7	Ausblick.....	92
5	Zusammenfassung.....	94
6	Literaturverzeichnis	95

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Danksagung

V Lebenslauf

VI Eigene Veröffentlichungen

VII Gesamtübersicht der Ergebnisse der LC-MS

1 Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom (oral squamous cell carcinoma, OSCC) ist der häufigste maligne Tumor der Mundhöhle und eine der zehn häufigsten Krebsarten weltweit (Panarese et al., 2019, Rivera, 2015). Mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 45 bis 50 % – bedingt durch die hohe Rezidivrate und das hohe Lymphknotenmetastasierungsrisiko – und jährlich 145.000 Todesfällen stellt das OSCC ein zunehmendes Problem für die globale Gesundheit dar (Zhang et al., 2019b, Rivera, 2015). Ursächlich für Therapieresistenz, Rückfall und Fernmetastasierung sind u. a. die Transition von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und die Erzeugung von Krebsstammzellen (Pai et al., 2019, Sayed et al., 2011). In dem mehrstufigen Entstehungsprozess werden physiologische orale Keratinozyten durch abträgliche Faktoren verlängert, sodass dies zu einem Ungleichgewicht der intrazellulären Mikroumgebung und genetischen Veränderungen führt (Zhang et al., 2019b). Diese maligne Transformation einer einzigen Vorläuferzelle setzt durch deren klonale Expansion eine Kaskade in Gang, welche zu der Ausbildung einer Krebspopulation führt (Feller et al., 2013). Da die maligne Vorläuferzelle die Fähigkeit zu besitzen scheint, sich unbegrenzt zu teilen und zudem eine begrenzte Apoptoserate aufweist, ist es ihr möglich, lange zu leben und stetiges Wachstum zu generieren (Feller et al., 2013, Feller et al., 2010, Wicha et al., 2006). Die bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung von OSCC sind der Tabak- und Alkoholkonsum, die einen synergistischen Effekt zeigen (Koontongkaew, 2013, Rivera, 2015, Döbrossy, 2005). Das Risiko für die Entstehung eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) ist bei Rauchern zehnmal höher als bei Nierauchern (Jethwa and Khariwala, 2017). Auf den Alkohol- und Zigarettenkonsum sind mindestens 75 % der Tumoren im Kopf-Hals-Bereich zurückzuführen (Hashibe et al., 2007). Alkohol wirkt als lokaler und systemischer Risikofaktor, da er mit erhöhter Durchlässigkeit der Mundschleimhaut, Auflösung von Lipidkomponenten des Epithels, Epithelschwund, Störung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese und Reparaturmechanismen sowie Leberbeeinträchtigungen in Verbindung steht und durch seine genotoxische und mutagene Wirkung die Anfälligkeit für Infektionen und Neoplasien fördert (Reidy et al., 2011). Im Ergebnis einer systematischen Überprüfung des Zusammenhangs zwischen

humanen Papillomaviren (HPV) und dem Auftreten von OSCC sowie potentiell malignen Erkrankungen wie oraler Leukoplakie, oralem Lichen planus oder epithelialer Dysplasie konnte eine signifikante kausale Beziehung festgestellt werden (Syrjänen et al., 2011). Weitere ätiologische Faktoren sind Mangelernährung, der Konsum von Betelnüssen, genetische Disposition, mangelnde Zahn- und Mundhygiene sowie chronische Entzündungen (Lucenteforte et al., 2009, Chang et al., 2013, Pérez-Sayáns et al., 2009).

1.1.2 Therapie

Im frühen Stadium kann OSCC mit einer Behandlung, die eine Modalität umfasst (Operation oder Radiatio), therapiert werden, wohingegen Patienten, die an einer fortgeschrittenen Erkrankung leiden (> 66 %) mit einer multimodalen Therapie behandelt werden müssen, welche eine Operation, Chemotherapie, biologische Therapie und Strahlentherapie beinhalten kann (Lindemann et al., 2018). Eine große Bedeutung hat insbesondere die rekonstruktive Chirurgie für die Lebensqualität der Patienten nach vollständiger Ausräumung des malignen Gewebes (Lefebvre, 2005). Cisplatin-basierte Therapien gelten als effektiv und zählen zu den Standardbehandlungsoptionen (Lefebvre, 2005). Eine Behandlung, die die Wirkstoffe Andrographolid und Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin, DDP) kombiniert, führte *in vitro* und *in vivo* zu einem gehemmten Tumorwachstum durch verstärkte Apoptose (Chen et al., 2017). Es zeigte sich in einer Studie, die im Jahr 2008 im „New England Journal of Medicine“ veröffentlicht wurde, dass eine Chemotherapie mit Cetuximab, einem monoklonalen Antikörper, plus Platin-Fluorouracil das Gesamtüberleben gegenüber der Chemotherapie auf Platinbasis plus Fluorouracil allein erheblich verbesserte, wenn diese Therapie als Erstbehandlung bei Patienten mit einem metastasierenden oder rezidivierenden Plattenepithelkarzinom des Kopfes oder Halses erfolgte (Vermorken et al., 2008). Die Behandlungspläne werden auf Basis des TNM-Stadiums, der Lokalisation und des allgemeinen Gesundheitszustandes erstellt und sind abhängig von der biologischen und molekularen Pathogenese (Lindemann et al., 2018). Das Identifizieren verlässlicher Biomarker wie viralen Onkoproteinen oder dem Tumorsuppressorgen p16 ist bedeutend für die Erstellung individueller Behandlungspläne (Lindemann et al., 2018). Eine Untersuchung der Signalwege, die den onkogenen Phänotyp der Protein 53 (p53)-Mutation steuern, ist ebenfalls von Bedeutung bei der Personalisierung der Krebsbehandlung und besonders wichtig, da bei OSCC-Patienten Mutationen des für das Tumorsuppressorprotein p53 kodierenden Gens TP53 die am häufigsten auftretenden Genmutationen sind (Neskey et al., 2015). Sie verleihen Tumorzellen invasivere Eigenschaften und korrelieren mit einer Tumorresistenz gegenüber der Strahlentherapie und Chemotherapie sowie einer

schlechteren Überlebensbilanz und einer höheren Metastasierungsrate im Vergleich zu Patienten mit Niedrigrisiko-Mutationen (Lindemann et al., 2018). Die im Folgenden genauer beschriebenen Prozesse der Autophagie könnten bei der Prävention und Therapie von OSCC eine entscheidende Rolle spielen.

1.1.3 Grundlagen der Autophagie

Autophagie findet in allen eukaryotischen Zellen von der Hefe bis zum Menschen statt (Klionsky et al., 2016). Der Begriff Autophagie, der sich von der griechischen Bedeutung „sich selbst verzehrend“ ableitet, beschreibt den Abbau- und Verwertungsprozess zelleigener Bestandteile, welcher bei der Entfernung fehlgefalteter oder agglomerierter Proteine, geschädigter Organellen wie Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und Peroxisomen sowie der Beseitigung intrazellulärer Pathogene bedeutsam ist (Glick et al., 2010). Dieser Überlebensmechanismus schützt vor Genominstabilität und spielt eine Schlüsselrolle bei der Prävention von Krankheiten wie Krebs, Neurodegeneration, Kardiomyopathie, Diabetes, Lebererkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionen. Diverse physiologische Signale und Stresssituationen können Autophagie induzieren. Es entstehen Autophagosomen, welche abzubauenendes Material binden, das dann in neu gebildeten Kompartimenten abgebaut wird (Nakatogawa et al., 2009). Die drei zu unterscheidenden Arten der Autophagie sind Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie, wobei die Makroautophagie im Folgenden genauer beschrieben wird.

Bei dieser wird zunächst *de novo* eine doppelmembrangebundene Struktur gebildet, Autophagosom oder autophagische Vakuole genannt, um das Zytoplasma zu binden. Daraufhin verschmelzen die Vakuolenmembran und ein Lysosom miteinander, sodass der Inhalt in das Organellenlumen abgegeben wird, wo er abgebaut wird und die entstehenden Makromoleküle recycelt werden (Abbildung 1). Während bei der Hefe das Protein Atg8 (Autophagy-related protein 8) eine Schlüsselrolle im autophagischen Prozess bei der Verlängerung der Phagophormembran einnimmt (Nakatogawa et al., 2007, Xie et al., 2008), spielt bei Säugetieren LC3B (light chain 3B), eines der acht gefundenen Atg8-Orthologe, eine entscheidende Rolle (Weidberg et al., 2010). Beim Menschen werden drei Mitglieder der LC3-Familie unterschieden: LC3A, LC3B und LC3C (He et al., 2003). Diese werden posttranslational modifiziert, wobei die Form LC3-II (LC3A-II, LC3B-II und LC3C-II) eine der Hauptkomponenten der Autophagosomenmembran darstellt (Koukourakis et al., 2015). Die nach der Synthese der leichten Kette 3 (LC3) gebildete zytosolische Form LC3-I wird in die

membrangebundene Form LC3-II umgewandelt, welche über die Konjugation an Phosphatidylethanolamin (PE) in der Autophagosomenmembran zu finden ist (Kabeya et al., 2000, Kabeya et al., 2004). Daher korreliert die Menge an LC3-II mit der Menge an Autophagosomenmembranen (Kabeya et al., 2000). LC3-II kann also als Marker für die Autophagie genutzt werden (Mizushima, 2004). Abbildung 1 verdeutlicht die Prozesse der Autophagie.

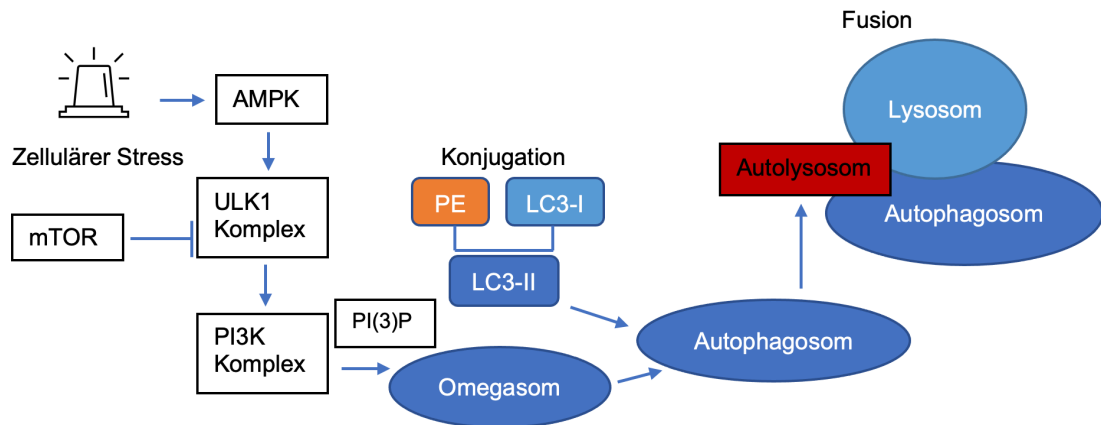


Abbildung 1: Prozesse der Autophagie (modifiziert nach Chang et al., 2020). Zellulärer Stress, der durch Nährstoffmangel, DNA-Schäden, oxidativen Stress, Hypoxie etc. ausgelöst werden kann, aktiviert über die Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängige Kinase (AMPK) die ULK1 (Unc-51-like Kinase 1)- und PI3K-Proteinkomplexe. Der PI3K-Komplex ist für die Synthese von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) verantwortlich, welches für die Omegasombildung erforderlich ist. Über die Konjugation von PE an LC3-II erfolgt die Einlagerung in die Autophagosomenmembran. Durch die Fusion von Lysosom und Autophagosom entsteht das Autolysosom und der intrazelluläre Gehalt an Abfallprodukten wird recycelt.

Über MAP1LC3B/LC3B (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1 leichte Kette 3 β) und PE in den Membranen kann die Autophagie durch Interaktion mit Proteinen, die ein LC3-interagierendes Motiv (LC3-interacting region, LIR) aufweisen, reguliert werden (Noh et al., 2016). Ein solches LIR-Motiv weist etwa das Phosphatidylethanolamin-Bindungsprotein 1 (PEBP1) auf, bindet so PE-unkonjugiertes LC3 und bewirkt bei einer Überexpression die Inhibition der Autophagie durch mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1)-Aktivierung (Noh et al., 2016).

Es wird angenommen, dass Sequestosom 1 (p62) mithilfe von LC3 polyubiquitinierte Proteinaggregate mit autophagischen Prozessen verknüpft, sodass die Aggregate abgebaut werden können (Bjørkøy et al., 2005). Diese p62-Körper sind Ubiquitin-enhaltende Proteinaggregate, die membranfrei oder membranbegrenzt sein können

und durch Autophagie abgebaut werden, weshalb die Autophagie-Inhibition deren Spiegel erhöht (Bjørkøy et al., 2005).

Im Zusammenhang mit Krebs kann die Autophagie sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Auswirkungen haben, wie Shintani et al. (2004) in einer Übersicht darlegen. Zum einen wirkt Autophagie als Tumorsuppressor, kann am programmierten Zelltod von Krebszellen beteiligt sein, deren Größe begrenzen, beschädigte Organellen, die freie Radikale erzeugen und Mutationen fördern, eliminieren und somit das Krebswachstum inhibieren (Shintani and Klionsky, 2004). Zum anderen können sich die Tumorzellen den protektiven Überlebensmechanismus zunutze machen, sodass die Autophagie das Überleben bei Nährstoffmangel ermöglicht, den Zelltod verhindert und dem Tumor gegenüber therapeutischen Behandlungen eine gewisse Resistenz verleiht (Shintani and Klionsky, 2004). Jene Erkenntnisse unterstreichen die Ambivalenz dieses zellulären Prozesses bei der Krebstherapie.

TOR (target of rapamycin) reguliert das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Autophagie als Reaktion auf zellphysiologische Bedingungen und Umweltstress und beeinflusst die Induktion der Autophagie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* negativ (Jung et al., 2010, Noda and Ohsumi, 1998). Eine Zugabe des TOR-Inhibitors Rapamycin führt zur Induktion der Autophagie, selbst in Zellen, die in nährstoffreichem Medium wachsen (Noda and Ohsumi, 1998). Die unter Nährstoffmangel inhibierte Aktivität von TOR ist als ein entscheidender Faktor für die Autophagie-Induktion bei Eukaryoten bekannt (Noda and Ohsumi, 1998, Scott et al., 2004). Während in Hefen die TOR-Aktivität durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Stickstoff und Kohlenstoff reguliert wird, beeinflussen in vergleichbarer Weise die Glukose- und Aminosäurespiegel die TOR-Aktivität in Säugetierzellen (Wullschleger et al., 2006). Da die zelluläre Aufnahme von L-Glutamin durch SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5) für die Aktivierung von mTOR1 von Bedeutung ist, werden durch den Verlust der SLC1A5-Funktion das Zellwachstum gehemmt und die Autophagie stimuliert (Nicklin et al., 2009). Der bidirektionale Transporter SLC7A5/SLC3A2, der für die Regulation der Sekretion von L-Glutamin aus den Zellen und den Transport von L-Leucin/essentiellen Aminosäuren in die Zellen verantwortlich ist, ist die molekulare Grundlage für die Sensitivität gegenüber L-Glutamin (Nicklin et al., 2009). Neben mTORC2 ist mTORC1 einer der beiden möglichen Proteinkomplexe der in Säugetieren vorkommenden Serin/Threonin-Kinase mTOR und homolog zum Hefegen TOR. Um mTORC1 zu aktivieren, bewirkt SLC1A5 zunächst einen Anstieg der intrazellulären L-Glutamin-

Konzentration, woraufhin SLC7A5/SLC3A2 intrazelluläres L-Glutamin als Effluxsubstrat verwendet, um die L-Leucin-Aufnahme aus dem Extrazellularraum zu regulieren (Nicklin et al., 2009). Formen von zellulärem Stress wie Sauerstoff- und Energiemangel induzieren ebenfalls Autophagie, indem das Stressreaktions-REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1)-Gen mTOR negativ reguliert (Sofer et al., 2005).

Ein potentielles therapeutisches Ziel zur Kontrolle des Fortschreitens des OSCC könnte die von OSCC-Zellen exprimierte Menge an Liganden des Transmembranrezeptors RANK (Receptor Activator of NF- κ B ligands, RANKL) sein, welche eine autophagosomenbezogene Genexpression von LC3-II-, Atg5 (Autophagy related protein 5)-, Beclin1- und PI3KC3 (phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit type 3)-mRNA (messenger ribonucleic acid) stimulieren (Sambandam et al., 2016). Es findet also eine Autophagosomenbildung in OSCC-Zellen statt, wobei die Tumorzellen große Mengen an autophagiebezogenen Genen, die mit Langlebigkeit assoziiert sind, exprimieren. Trotz der zellschützenden Funktion der Autophagie, die dazu dient, den Zelltod unter physiologischen Bedingungen zu verhindern, wird ihr Selbstreparaturmechanismus von Krebszellen genutzt, um sich der Krebstherapie entgegenzustellen (Patil et al., 2015).

1.1.4 Kalorienrestriktion

Die Rolle der Kalorienreduktion (caloric restriction, CR) bei der Krebsprävention beschäftigt die Wissenschaft schon seit über 100 Jahren und wurde erstmals 1909 durch Moreschi beschrieben, der ein vermindertes Krebswachstum in unterernährten Mäusen feststellte, wohingegen transplantierte Krebszellen in *ad libitum* gefütterten Mäusen deutlich besser wuchsen (Kritchevsky, 2001). Spätere Studien zeigten, dass CR die Lebensdauer diverser Modellorganismen wie Mäusen (Weindruch et al., 1986), Hefe (Guarente, 2005), Drosophila (Partridge et al., 2005), Würmern (Houthoofd and Vanfleteren, 2006) und Rhesusaffen (Colman et al., 2009) verlängern kann. CR konnte in Tiermodellen neuroprotektive Mechanismen stärken und so das Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen verzögern (Mattson et al., 2002) sowie positive Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System zeigen (Weiss and Fontana, 2011) und könnte somit in einer älter werdenden Gesellschaft die Chance bieten, vitaler zu altern und insgesamt zu einer gesünderen Bevölkerung beitragen. CR bedeutet eine Reduktion der täglichen Energieaufnahme um 10 bis 30 % bei gleichzeitig ausreichender Protein- und Mikronährstoffzufuhr. CR induziert einen Low-Energy-Metabolismus (LEM), in welchem sich die Zelle auf die wesentlichen lebenserhaltenden Prozesse konzentriert

und dabei keine Energie für Proliferations- und Wachstumsvorgänge aufwendet. Die molekularen Mechanismen des LEM werden im Folgenden (Abbildung 2) erläutert:

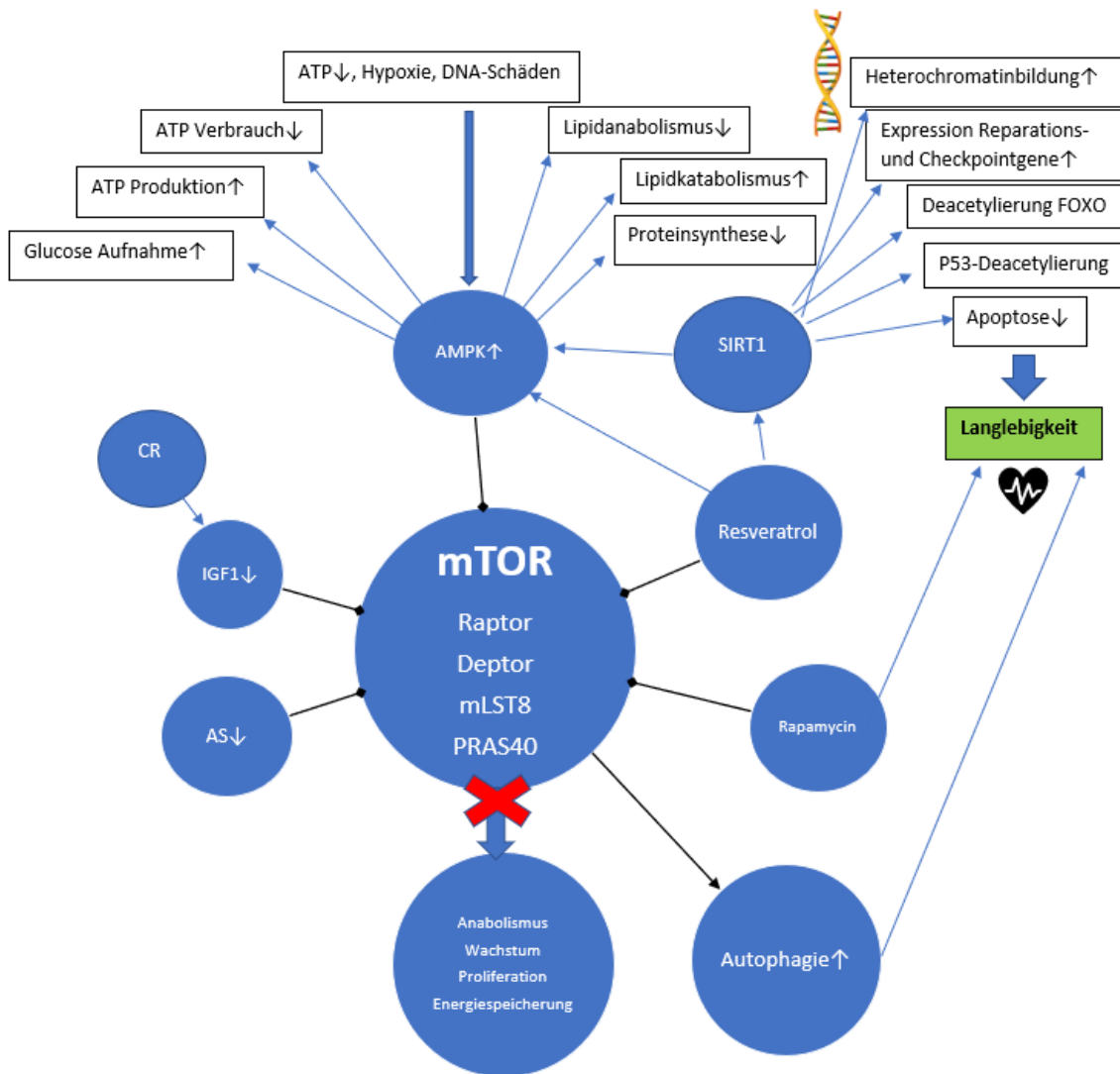


Abbildung 2: Low-Energy-Metabolismus. Die Darstellung verdeutlicht die molekularen Prozesse im LEM: Nahrungsknappheit und damit einhergehender ATP-Mangel, Hypoxie und DNA-Schäden bewirken eine durch AMPK vermittelte Inhibition der molekularen Schaltstelle zwischen anabolen und katabolen Prozessen mTORC1. Die mTOR-Inhibition ist auch direkt und indirekt über Resveratrol sowie Rapamycin, einen gesenkten IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)-Spiegel und Aminosäure (AS)-Restriktion möglich. Der aus den Bestandteilen Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) und mTOR bestehende mTORC1 enthält zudem die inhibitorischen Untereinheiten PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kDa) und DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein). Die mTOR-Inhibition induziert die Autophagie und inhibiert Wachstum, Proliferation, Anabolismus und Energiespeicherung. SIRT1 (Sirtuin 1), ein Vertreter der Sirtuine, kann durch Resveratrol aktiviert werden und vermittelt die p53-Deacetylierung, Heterochromatinbildung, Deacetylierung der Forkhead-Box-Protein class O (FOXO)-Transkriptionsfaktoren und eine gesteigerte Expression von DNA-Reparaturgenen. Somit trägt SIRT1 wie auch die Autophagie zur Langlebigkeit bei.

1.1.4.1 mTOR-Inhibition induziert LEM

Die Serin/Threonin-Kinase mechanistic target of rapamycin (mTOR) bildet die katalytische Untereinheit von mTOR Komplex 1 (mTORC1) und mTOR Komplex 2 (mTORC2) (Saxton and Sabatini, 2017). Wesentliche Bestandteile des mTORC1 sind Raptor (zuständig für die Substratrekrutierung), mLST8 und mTOR sowie die inhibitorischen Untereinheiten PRAS40 und DEPTOR, welche konkret Raptor inhibieren (Saxton and Sabatini, 2017, Kim et al., 2002, Wang et al., 2007, Peterson et al., 2009). Als molekulare Schaltstelle zwischen anabolen und katabolen Prozessen besitzt mTORC1 die Fähigkeit, mithilfe von nährstoffsensorischen Signalproteinen wie der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) den Stoffwechsel an Nahrungsknappheit bzw. Nahrungsüberfluss anzupassen (Ben-Sahra and Manning, 2017). Da sich mTORC2 insbesondere dahingehend von mTORC1 unterscheidet, dass dieser statt Raptor das Rapamycin-unempfindliche Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) ausweist, wird mTORC1, aber nicht mTORC2 durch Rapamycin gehemmt (Saxton and Sabatini, 2017, Jacinto et al., 2004, Sarbassov et al., 2004). Rapamycin ist eine wirksame Möglichkeit, mTORC1 auf pharmakologischem Weg zu inhibieren, wodurch der LEM induziert wird und ist somit in der Lage, die Lebensdauer bestimmter Modellorganismen zu erhöhen (Weichhart, 2018). Neben Rapamycin gibt es noch weitere mTOR-Inhibitoren wie etwa Torin-2, welches sich in einer Studie als noch effektiver bei der mTOR-Inhibition erwies als Rapamycin, wobei eine tausendmal niedrigere Konzentration von Torin-2 im Vergleich zu Rapamycin angewendet wurde (Waetzig et al., 2021). Die Aufgaben von mTORC1 bestehen im Wesentlichen aus der Regulierung der Stoffwechselprozesse, der Förderung des anabolen Stoffwechsels sowie des Zellwachstums und der Unterdrückung der Autophagie und damit des Katabolismus, wohingegen mTORC2 die Proliferation und das Überleben durch Phosphorylierung bestimmter Proteinkinasen reguliert (Saxton and Sabatini, 2017). Während ein ausreichendes Nahrungsangebot, wachstumsfördernde Signale (z.B. Insulin), genügend Sauerstoff und Energie in Form von Glukose zur Aktivierung von mTORC1 und damit zu Wachstum und Energiespeicherung im Gewebe führen, wird mTORC1 durch Fastenperioden gehemmt, um die Ressourcen zu schonen (Saxton and Sabatini, 2017). Die durch mTORC1 erhöhte Translation des Transkriptionsfaktors HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha) fördert die Expression glykolytischer Enzyme, sodass wahrscheinlich der Einbau von Nährstoffen in neue Biomasse erleichtert wird (Saxton and Sabatini, 2017, Düvel et al., 2010). Weiterhin aktiviert mTORC1 SREBP (sterol regulatory element-binding protein), wodurch der Umsatz des

oxidativen Pentosephosphatwegs (pentose phosphate pathway, PPP) gesteigert wird, welcher Kohlenstoff aus Glukose für die Erzeugung von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (NADPH), das für Wachstum und Proliferation benötigt wird, nutzt (Saxton and Sabatini, 2017).

Ein durch Fasten und den damit einhergehenden Glukoseentzug verringertes zelluläres Energielevel, Aminosäuremangel, Hypoxie und DNA-Schäden haben zur Folge, dass die stressensitive AMPK mTORC1 sowohl durch Aktivierung von TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) als auch durch Phosphorylierung von Raptor hemmt (Gwinn et al., 2008, Inoki et al., 2003). Aktiviert wird mTORC1 hingegen durch die kleine GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) (Long et al., 2005). Die Rag-GTPasen spielen für den mTORC1-Signalweg aufgrund ihrer Aminosäuresensitivität eine besondere Rolle, denn sie gehen durch Stimulation mit Aminosäuren in ihren aktivierten Zustand über, in welchem sie Raptor binden und mTORC1 in die Nähe von Rheb an die lysosomale Oberfläche rekrutieren (Kim et al., 2008, Sancak et al., 2008). Es sind also sowohl Wachstumsfaktoren als auch Aminosäuren für die mTORC1-Aktivierung nötig, da sowohl Rag als auch Rheb im aktivierten Zustand vorliegen müssen (Saxton and Sabatini, 2017). Zudem lässt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen CR und mTOR-Signalwegen in Bezug auf die Verlängerung der Lebensspanne herstellen, da CR die Lebensspanne nicht weiter verlängert, sobald die mTOR-Signalgebung reduziert ist (Kapahi et al., 2004, Kaeberlein et al., 2005, Hansen et al., 2007, Saxton and Sabatini, 2017).

1.1.4.2 IGF-1-Senkung induziert LEM

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, führt CR zu einer Senkung von IGF-1 und somit zur Inhibition von mTOR, wodurch wiederum der LEM induziert wird. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B/mTOR (PI3K/AKT/mTOR)-Weg reguliert den Stoffwechsel, die Proliferation und das Zellüberleben, indem PI3 durch Wachstumsfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert wird und wiederum die Serin/Threonin-Kinase AKT aktiviert, welche die Aktivierung von mTOR induziert, die Proliferation stimuliert, die Apoptose hemmt und somit das Wachstum fördert (Bader et al., 2005, Darici et al., 2020, Harsha et al., 2020). Bei Brustkrebszellen treten häufig Mutationen auf, die einen Verlust der Regulatoren von AKT und dem Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) bewirken, wodurch sie unauffhaltsam proliferieren (Hernandez-Aya and Gonzalez-Angulo, 2011). IGF-1 scheint via mTOR- und FOXO-Signalgebung die Autophagie zu hemmen (Yoshida and

Delafontaine, 2020). Es zeigte sich in Untersuchungen, dass eine reduzierte Insulin/IGF-1-Signalgebung (IIS) die Langlebigkeit bei Fadenwürmern, Fruchtfliegen und Mäusen steigerte (Panowski and Dillin, 2009, Fontana et al., 2010). Erforderlich für die Steigerung der Langlebigkeit durch reduzierte IIS sind zudem der Forkhead/FOXO Transkriptionsfaktor DAF-16, welcher Gene reguliert, die an Verteidigungsaktivitäten etwa gegen Bakterien, freie Radikale und Xenobiotika beteiligt sind sowie der Hitzeschockfaktor HSF-1 (Heat Shock Transcription Factor 1), der für die Expression kleiner Hitzeschockproteine verantwortlich ist und aus dessen Überexpression eine Verlängerung der Lebensdauer von *Caenorhabditis elegans* resultiert (Fontana et al., 2010, Panowski and Dillin, 2009). Eine Studie an FOXO1-Knockout-Heterozygoten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen zeigte, dass der Transkriptionsfaktor FOXO1, der negativ durch den PI3K-AKT Signalweg reguliert wird, eine große Rolle bei der antineoplastischen Wirkung von CR zu spielen scheint, indem FOXO1-Target-Gene für Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Apoptose und Stressresistenz hochreguliert werden (Yamaza et al., 2010). Dem Wachstumshormon GH (growth hormon) kommt ebenfalls eine Bedeutung bei der Verlängerung der Lebensspanne zu, da es insbesondere in der Leber die Produktion von IGF-1 induziert (Laron, 2001). Jene Mutationen, welche bei Säugetieren die Lebensdauer maßgeblich verlängern, sind die des GH-Rezeptors GHR (growth hormon receptor) und Mutationen, die einen GH-/IGF-1-Mangel verursachen (Bartke, 2005). So ist bei Mäusen von einer Erhöhung der durchschnittlichen Lebensdauer – abhängig von der Art des endokrinen Defekts, dem Geschlecht, der Ernährung und dem genetischen Hintergrund – von 20 bis 70 % auszugehen (Mari, 2011, Bartke, 2005). Der Wachstumsfaktor IGF-1, der durch CR vermindert exprimiert wird, ist ein wichtiger Risikofaktor bei Lungen-, Brust- und Prostatakrebs, sodass CR als therapeutisches Mittel zur Senkung von IGF-1 und somit in der Krebsprävention eingesetzt werden kann (Sonntag et al., 1999).

1.1.4.3 FGF21 induziert LEM

FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) gehört der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren an, welche 23 strukturell ähnliche Proteine umfasst, die einen Einfluss auf das Zellwachstum, die Organogenese, die Differenzierung und den Stoffwechsel haben (Martínez-Garza et al., 2019, Ornitz and Itoh, 2015). Produziert wird FGF21 in der Leber, der Skelettmuskulatur, im weißen (white adipose tissue, WAT) und braunen Fettgewebe (brown adipose tissue, BAT), im Darm, in den Nieren sowie dem Pankreas (Martínez-Garza et al., 2019). FGF21 ist in der Lage, während des Fastens

die Fettsäureoxidation zu induzieren, die Gluconeogenese anzuregen, welche der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase dient sowie die Insulinsensitivität zu verbessern (Potthoff et al., 2009, Markan et al., 2014). Während in der frühen Fastenphase die hepatische Glykogenolyse die Hauptquelle für Glukose darstellt, stellen während langer Fastenzeiten die hepatische Gluconeogenese und Ketogenese Energie bereit (Martínez-Garza et al., 2019). FGF21 wirkt sowohl direkt auf seine Zielgewebe Herz, Skelettmuskulatur, Leber, WAT und BAT (Fisher and Maratos-Flier, 2016, Pérez-Martí et al., 2016) als auch indirekt über das zentrale Nervensystem (ZNS) (Potthoff and Finck, 2014). Durch FGF21 wird PGC1 α (Peroxisome-Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator-1-alpha) induziert, das für die Regulation der Gene für die Gluconeogenese verantwortlich ist und die Expression von Glukose-6-Phosphatase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Carnitin-Palmitoyltransferase 1a und Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase 2 erhöht (Potthoff et al., 2009, Inagaki et al., 2007, Fisher et al., 2011, Martínez-Garza et al., 2019). Das Protein SIRT1 aus der Familie der Sirtuine, auf die später noch genauer eingegangen wird, reguliert die Expression von FGF21 unter Nahrungsmangelbedingungen und reagiert auf den Fastenmodus mit der Deacetylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren wie PGC1 α (Martínez-Garza et al., 2019, Rodgers et al., 2005, Rodgers and Puigserver, 2007, Chang and Guarente, 2014, Boutant and Cantó, 2014).

1.1.4.4 AMPK hemmt mTOR und induziert LEM

Die AMPK ist ein Trimer, welches aus den α -, β - und γ -Untereinheiten besteht und besitzt die Fähigkeit, auf niedrige Adenosintriphosphat (ATP)-Spiegel zu reagieren, indem sie verschiedene Enzyme phosphoryliert, die den ATP-Verbrauch senken und die ATP-Produktion steigern (Herzig and Shaw, 2018). Das beim Abbau von energiereichem ATP entstehende Adenosinmonophosphat (AMP) fungiert als Sensor für Energiemangel und reguliert die Aktivität der AMPK, indem bei Vorhandensein von Energie, d. h. bei niedrigen AMP/ATP-Verhältnissen, die AMPK α -Untereinheit unphosphoryliert bleibt und dagegen bei niedrigem Energielevel und hohem AMP/ATP-Verhältnis eine erhöhte Phosphorylierung an der α -Untereinheit stattfindet (Jeon, 2016). Während AMPK den Lipidanabolismus inhibiert, indem die Synthese von Fettsäuren, Cholesterin und Triglyceriden über Phosphorylierung gehemmt wird, steigert die Kinase den Lipidkatabolismus via Aktivierung der Fettsäureaufnahme und der β -Oxidation (Jeon, 2016). Die Glukoseaufnahme in den Zellen wird durch AMPK gesteigert, indem die mRNA-Expression der Gene, welche für die Glukose-Transporter GLUT1, GLUT4 sowie

das Enzym Hexokinase 2 kodieren, erhöht wird (Zheng et al., 2001, Stoppani et al., 2002, Wu et al., 2013, Jeon, 2016). Weiterhin hemmt die AMPK bei Energiemangel die energieaufwendige Proteinsynthese, um ATP zu erhalten (Jeon, 2016). Auch die Autophagie wird durch AMPK im LEM positiv beeinflusst, da ULK1 (Unc-51-like kinase 1) direkt durch Phosphorylierung und indirekt via mTORC1-Inhibition durch Phosphorylierung von Raptor aktiviert wird (Zachari and Ganley, 2017).

1.1.4.5 Aktivierung der Sirtuine durch LEM

Weiterhin bedeutend für den LEM und die Regulation der Energiehomöostase sind die Sirtuine, eine Familie Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺)-abhängiger Deacetylasen, welche den Energiezustand via Messung des NAD⁺-Spiegels bestimmen und ihre Genexpression dementsprechend anpassen (Feige et al., 2008, Guarente, 2006, Michan and Sinclair, 2007, Yamamoto et al., 2007).

Das im Abschnitt „caloric restriction mimetics“ erwähnte Polyphenol Resveratrol kann sowohl die AMPK als auch SIRT1, den am besten untersuchten Vertreter der Sirtuine, aktivieren und schützt vor Fettleibigkeit, da es den oxidativen mitochondrialen Stoffwechsel durch Deacetylierung von PGC-1 α induziert (Baur et al., 2006, Lagouge et al., 2006, Feige et al., 2008). Das durch CR aktivierte SIRT1 fördert die Langlebigkeit bei zahlreichen Organismen von der Hefe bis zu den Säugetieren und scheint dazu in der Lage zu sein, da es unter anderem die Energiehomöostase aufrechterhält (Feige et al., 2008, Guarente, 2006). SIRT1 zeigte bei Mäusen eine neuroprotektive Wirkung (Jeong et al., 2011). Weiterhin ist SIRT1 bei Energiemangel in der Lage, die Chromatinstruktur zu verändern, indem es bestimmte Lysinreste der Histone H1, H3 und H4 deacetyliert, sodass dicht gepacktes Heterochromatin entsteht, mit dem eine Genrepression einhergeht (Michan and Sinclair, 2007, Vaquero et al., 2004). Zudem steigert SIRT1 die Überlebensfähigkeit der Zellen durch Deacetylierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren, Reduktion der Apoptose als Reaktion auf Stressreize und gesteigerte Expression von DNA-Reparaturgenen und Kontrollpunktgenen (Michan and Sinclair, 2007, Motta et al., 2004, Brunet et al., 2004). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass für den Effekt der Langlebigkeit durch CR das Vorhandensein von NAD⁺ sowie SIR2, welches für das Silencing-Protein sir2p kodiert, von entscheidender Bedeutung ist (Lin et al., 2000).

1.1.4.6 Schwächung oxidativer Schäden und Verlängerung der Lebensspanne durch CR-vermittelte Autophagie

CR senkt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den Gefäßen und schwächt so die oxidativen Schäden ab (Abbildung 3) (Csiszar et al., 2009, Guo et al., 2002). Zudem erhöhen sich durch CR die Spiegel der Antioxidantien sowie von Ascorbat in der Aorta, wodurch eine entzündungshemmende und vasoprotektive Wirkung erzielt wird (Csiszar et al., 2009). CR schwächt den altersbedingten und durch oxidativen Stress verursachten Anstieg der Expression löslicher Adhäsionsmoleküle (soluble adhesion molecules, sAMs), welche die Atherogenese fördern, in den Gefäßen von Fischer-344-Ratten ab (Zou et al., 2004). Weiterhin fördert und erhält CR die endothelschützende Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO), indem einerseits weniger NO durch die Senkung der reaktiven Sauerstoffspezies, welche von NO gebunden und so unschädlich gemacht werden können, verbraucht (Rippe et al., 2010, Csiszar et al., 2009, Zanetti et al., 2010) und andererseits der altersbedingten Senkung der endothelialen NO-Expression entgegengewirkt wird (Rippe et al., 2010, Ungvari et al., 2008). Zudem wurde an Tiermodellen gezeigt, dass CR gegen die mit dem Alter zunehmende arterielle Steifheit wirkt, indem weniger Kollagen akkumulierte und mehr Elastin und glatte Muskulatur erhalten blieben, wodurch sich die Dehnbarkeit der Gefäße verbesserte (Ahmet et al., 2011, Fornieri et al., 1999). CR hat neben der protektiven Wirkung für das Herz-Kreislauf-System auch großes Potential in der Krebstherapie via Autophagie-Induktion.

Neben Organellenschäden, Hypoxie und Entzündungsprozessen wirken Nährstoffstress (Mangel oder Überschuss) und Energiestress am stärksten modulierend auf die Autophagie-Induktion (Dikic and Elazar, 2018, He et al., 2018). Die Nährstoffmangel-induzierte Autophagie, die durch ein geringes Aminosäure- oder Kalorienangebot ausgelöst wird, kann über mTORC1 oder den AMPK-Signalweg aktiviert werden (Jewell et al., 2013, Hardie, 2011). Dies wird in Abbildung 3 ersichtlich. In den Herzen von Fischer-344-Ratten, welche ihr Leben lang eine kalorienreduzierte Diät bekamen, wurde ein vermehrtes Auftreten an autophagischen Vakuolen festgestellt, sodass CR eine kardioprotektive Wirkung zu haben scheint (Wohlgemuth et al., 2007).

Brandhorst et al. (2015), auf deren Erkenntnisse sich dieser Abschnitt beziehen soll, stellten am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* fest, dass regelmäßiges Fasten von mindestens 48 h die Lebensdauer verlängerte sowie die Stressresistenz stärkte. Bei Mäusen konnte die antikanzerogene Wirkung bei einer von den Forschern entwickelten FMD (very low calorie/low protein Fasting-Mimicking Diet) nachgewiesen

werden. Am Ende dieser Diät sanken die Blutglukoselevel gegenüber der Kontrollgruppe um 40 %, die Insulinlevel um das zehnfache, das Wachstumshormon IGF-1 um rund 45 %, wohingegen der IGF-1-Inhibitor IGFBP-1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) um das achtfache anstieg. Die Mäuse mit der FMD verloren viszerales Fett und die Größe der Nieren, des Herzens und der Leber sanken, wohingegen sich keine Größenabnahme bei Lunge, Gehirn und Milz zeigte. Die Neoplasierate bei C57BL/6-Mäusen, welche anfällig für hämatopoetische Tumoren sind, lag bei den Mäusen mit FMD bei 40 % und den Mäusen aus der Kontrollgruppe bei 67 %. Auch der altersbedingte Rückgang der Immunzellbildung, die sogenannte Immunseneszenz, konnte durch die FMD gesenkt werden und es stellte sich heraus, dass die FMD die Neurogenese der erwachsenen Mäuse förderte, sodass sich deren kognitive Leistungen verbesserten. Die Lebensdauer der Mäuse mit FMD konnte in den Versuchen um 11 % gegenüber der Kontrollgruppe verlängert werden, wobei sich insgesamt die mittlere, jedoch nicht die maximale Lebensdauer verlängerte (Brandhorst et al., 2015).

Auch in Bezug auf die hämatopoetischen Stammzellen (hematopoietic stem cells, HSC), deren Funktionen altersabhängig abnehmen, sodass sich die Immunfunktion der Organismen verringert (Rossi et al., 2005), hat dietary restriction (DR) einen positiven Effekt, indem DR die HSC-Funktion mit dem Alter aufrechterhält bzw. sogar ansteigen lässt (Ertl et al., 2008).

Es ist noch nicht geklärt, ob CR auch beim Menschen die Krebsinzidenz senken kann, aber klar ist, dass gewisse Marker, die im Zusammenhang mit Tumoren stehen, durch eine DR, welche Proteinrestriktion beinhaltet, reduziert werden können (Longo and Fontana, 2010). In der folgenden Abbildung sind die Auswirkungen und Anpassungen des Körpers auf CR dargestellt, die eine Hoch- und Herunterregulierung bestimmter Gene beinhaltet und in ihrer Gesamtheit zu einer Verringerung des Krebsrisikos sowie Gesundheit und Langlebigkeit führen.

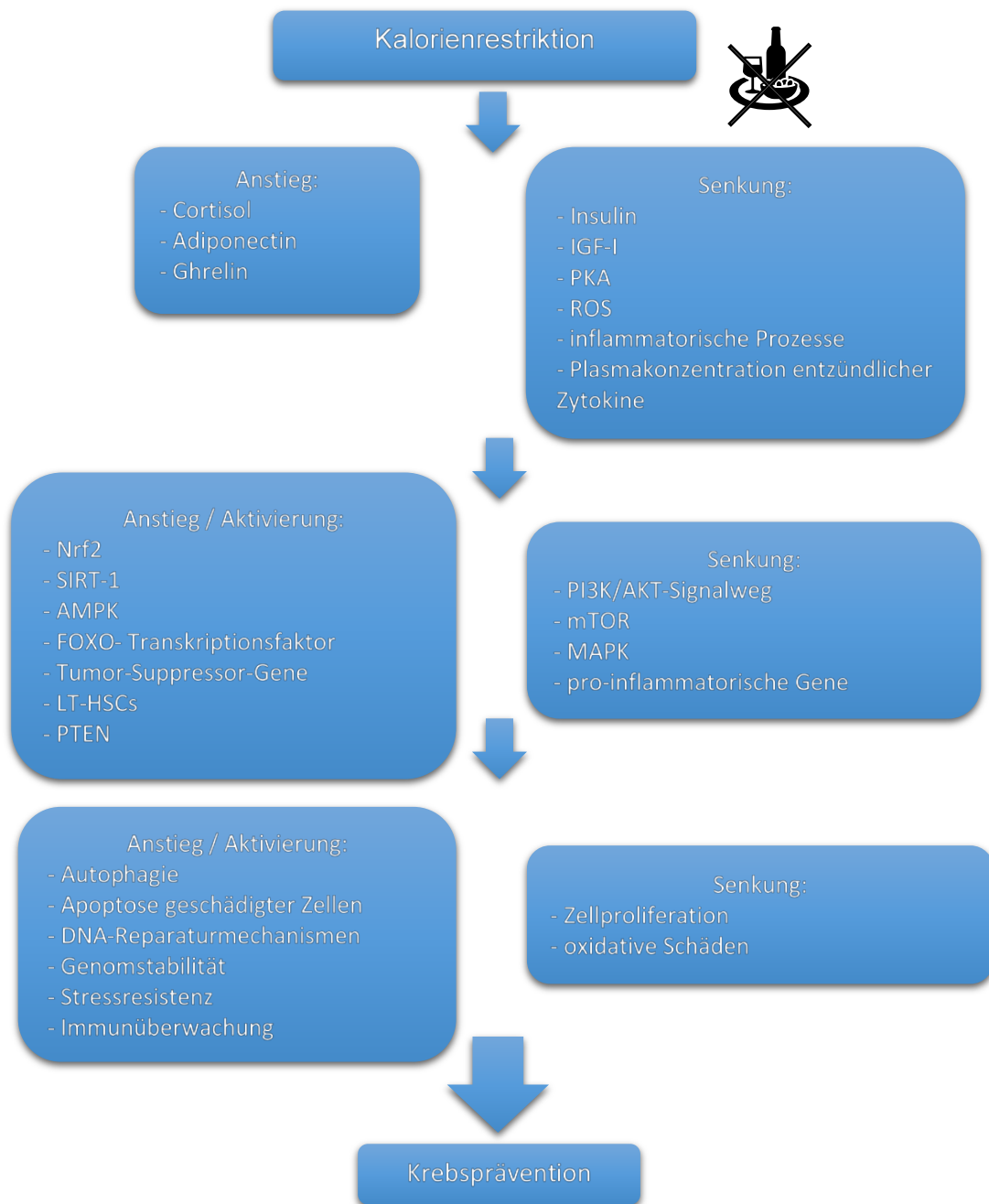


Abbildung 3: Auswirkungen der CR auf den Körper (modifiziert nach V. Longo et al. 2010). Die Abbildung veranschaulicht jene metabolischen Prozesse, die durch CR ausgelöst werden. PKA: Proteinkinase A; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; Nrf2: Nuclear Respiratory Factor 2; LT-HSC: long-term hematopoietic stem cells; MAPK: Mitogen-activated protein kinase

1.1.5 Methionin-Restriktion

Bereits ein Mangel an Methionin löst eine Inhibition von mTOR aus. Eine Art und Weise den Methioninspiegel zu messen, erfolgt über den S-Adenosylmethionin (SAM)-Sensor SAMTOR (SAM-Sensor, der die mTORC1-Aktivität reguliert). Dieser interagiert bei Methioninmangel bzw. SAM-Mangel mit dem GTPase-aktivierenden Protein GATOR1 (Gap Activity TOWard Rags 1) und hemmt so die Aktivität von mTOR (Gu et al., 2017). Viele Tumorzellen sind auf eine exogene Methioninzufuhr angewiesen (Cellarier et al., 2003, Mecham et al., 1983, Guo et al., 1993), sodass eine diätische Reduktion der schwefelhaltigen essentiellen Aminosäure Methionin positive Effekte in der Krebstherapie zeigen könnte. Zwar ist die Aufnahme von Methionin überlebensnotwendig, aber eine Begrenzung zeigte in Studien zahlreiche Vorteile für den Stoffwechsel wie etwa die Erhöhung der Insulinempfindlichkeit und des Energieverbrauchs sowie eine Senkung der Fettleibigkeit (Wanders et al., 2015, Wanders et al., 2017, Wanders et al., 2016, Ables et al., 2012, Malloy et al., 2006). Auch eine Verminderung der reaktiven Sauerstoffspezies und daraus resultierende Verringerung von oxidativem Stress (Caro et al., 2008, Pamplona and Barja, 2006, Martínez et al., 2017, Liu et al., 2017, Ying et al., 2015) sowie abnehmende entzündliche Prozesse (Wanders et al., 2014, Bárcena et al., 2018, Sharma et al., 2019) sind auf eine Methionin-Restriktion zurückzuführen. Zudem verlängerte Methionin-Restriktion in Tiermodellstudien die Lebensdauer erheblich (Orentreich et al., 1993, Miller et al., 2005).

Die molekularen Mechanismen stellen sich wie folgt dar: SAM, welches bei der Reaktion von Methionin und ATP entsteht, liegt bei Methioninmangel in reduzierter Konzentration im Zytoplasma vor und wird via SAMTOR, dem SAM-Sensor, registriert (Kitada et al., 2020). So bewirkt eine geringe Methioninzufuhr niedrige SAM-Spiegel, sodass die Proteine SAMTOR und GATOR1, welche bei hohen Methioninspiegeln durch SAM gehemmt werden, miteinander interagieren können und so mTORC1 inhibieren (Gu et al., 2017). Eine weitere Möglichkeit mTORC1 in Abhängigkeit von Methionin zu beeinflussen, ergibt sich über den Methylierungsstatus der Phosphatase 2A (PP2A) (Sutter et al., 2013, Laxman et al., 2014). Hohe SAM-Spiegel bewirken die Methylierung der katalytischen Untereinheit von PP2A, sodass PP2A aktiviert wird und wiederum mTORC1 aktiviert (Kitada et al., 2020).

In einer Studie von Halpern et al. (1974) wurden murine und humane Krebszelllinien sowie normale Zellen in methioninhaltigen und methioninfreien (+ Homocystein-Zusatz) Nährmedien kultiviert. Da normale Zellen mittels Methioninsynthese in der Lage sind,

aus Homocystein Methionin zu synthetisieren, konnten sie ihren Methioninmangel kompensieren und wuchsen uneingeschränkt (Halpern et al., 1974). Krebszellen jedoch besitzen diese Fähigkeit häufig nicht (Kokkinakis et al., 2004, Cavuoto and Fenech, 2012), da ihnen das Enzym fehlt und so war ihr Wachstum im methioninfreien Medium stark reduziert, obwohl ihnen mit Homocystein ein anderer Methylgruppendonator zur Verfügung stand (Halpern et al., 1974). Somit scheint Methionin-Restriktion eine Möglichkeit zu sein, gezielt Krebszellen in ihrem Wachstum zu beschränken.

Methionin besitzt drei wesentliche Funktionen im menschlichen Organismus, die bei Krebs eine Rolle spielen: Die bereits erwähnte Methylgruppenabgabe, die Glutathion (GSH)-Synthese und die Polyaminsynthese (Wanders et al., 2020). Obwohl Methionin als Vorläufer von Cystein für die Bildung von GSH von Bedeutung ist, zeigte eine Methionin-Restriktion bei Fischer-344-Ratten erhöhte GSH-Spiegel im Blut und somit eine Reduktion von oxidativem Stress (Maddineni et al., 2013, Richie et al., 1994), aber auch eine verringerte Konzentration in der Leber, welche wiederum über eine erhöhte antioxidative Aktivität ausgeglichen wird (Tamanna et al., 2019). Da Methionin weiterhin an der Polyaminsynthese beteiligt ist und erhöhte intrazelluläre Polyaminspiegel mit einem erhöhten Tumorwachstum in Verbindung stehen, könnte die Methionin-Restriktion ein Ansatz bei der therapeutischen Intervention sein (Thomas and Thomas, 2001). Des Weiteren spielt die DNA-Methylierung durch das aktivierte Methionin (S-Adenosylmethionin) eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Genexpression. Tumorsuppressorgene können durch Hypermethylierung innerhalb der Promotorregion inaktiviert werden, aber auch eine Hypomethylierung hat negative Folgen, da sie genomische Instabilität erzeugt (Kulis and Esteller, 2010). Da die Methylierung reversibel ist, hat eine Methionin-Restriktion das Potential, auf den Krankheitsverlauf Einfluss zu nehmen (Wanders et al., 2020).

1.1.6 Caloric restriction mimetics

Caloric restriction mimetics (CRMs) ahmen die biochemischen und funktionellen Wirkungen der CR nach, welche sich etwa in einer Reduktion der Lysinacetylierungen von zellulären Proteinen und einer Autophagie-Induktion äußern (Pietrocola et al., 2016, Madeo et al., 2014). Es sind jedoch auch CRMs bekannt, die direkt auf die Aktivität von mTOR einwirken, wie etwa Rapamycin (Harrison et al., 2009, Sinclair et al., 2019). Die Erforschung der CRMs ist deshalb so wichtig, da sie Sirtuine aktivieren, vor altersbedingten Krankheiten schützen und möglicherweise zu einer längeren Lebensdauer beitragen (Libert and Guarente, 2013). Einer der Vertreter ist das

natürliche Phenol Resveratrol, welches in einer Studie mit Mäusen, die entweder eine hochkalorische (high-calorie, HC) Diät ohne oder mit Resveratrol oder eine Standarddiät verabreicht bekamen, eine lebensverlängernde Wirkung zeigte, die Insulinempfindlichkeit und Mitochondrienanzahl erhöhte und somit die Gesundheit der Tiere verbesserte (Baur et al., 2006). Resveratrol ist damit in der Lage, den negativen gesundheitlichen Folgen einer HC-Diät entgegenzuwirken (Baur et al., 2006) und ist somit ein vielversprechendes CRM. Das zur Behandlung von Diabetes Typ II und dem Metabolischen Syndrom eingesetzte Medikament Metformin wird ebenfalls als CRM diskutiert, da es ähnliche Effekte erzielt wie Langzeit-CR inklusive Senkung der Krebsinzidenz bei Mäusen und Menschen (Dhahbi et al., 2005). Metformin erwies sich in Tierstudien als sehr effektiv bei der Unterdrückung von IGF-1 und Insulin und zeigte besonders bei den Tieren mit einer HC-Diät eine positive Wirkung (Phoenix et al., 2010). Ein weiteres CRM ist das im folgenden Abschnitt beschriebene Spermidin.

1.1.7 Spermidin

Die biogenen Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin sind in eukaryotischen Zellen an der Embryonalentwicklung, Differenzierung und Zellproliferation beteiligte Polykationen, welche in neoplastischen Zellen im Vergleich zu normalen Zellen häufig vermehrt vorkommen (Battaglia et al., 2014, Pegg, 1988). In der folgenden Abbildung wird die Synthese der Polyamine veranschaulicht:

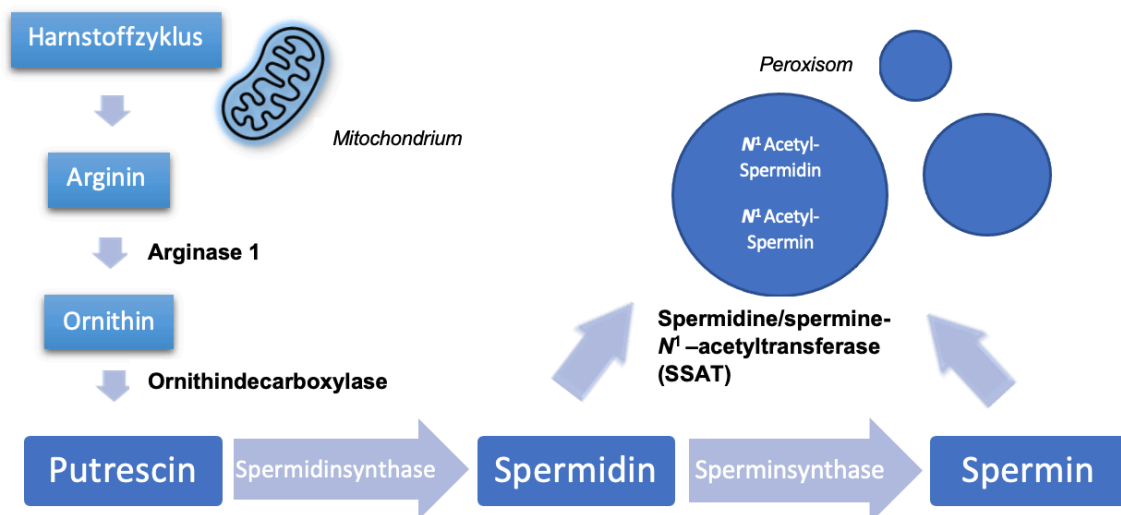


Abbildung 4: Polyaminstoffwechsel. Über Arginase 1 wird das im Harnstoffzyklus gebildete Arginin in Ornithin umgewandelt, aus dem durch Decarboxylierung das biogene Polyamin Putrescin entsteht. Mittels der Enzyme Spermidin- und Sperminsynthase erfolgt die weitere Umwandlung in Spermidin bzw. Spermin. Das Enzym Spermidine/Spermine-N1-Acetyltransferase (SSAT) baut die Polyamine ab und wird von der Menge intrazellulärer Polyamine über Rückkopplung reguliert.

Eine Studie aus dem Jahr 2018 von Chen et al., auf die sich dieser Abschnitt bezieht, stellte einen Zusammenhang zwischen Spermidin-induzierter Wachstumshemmung und Autophagie bei Gebärmutterhalskrebszellen her (Chen et al., 2018). Es wurden dazu Zellzyklus-Assays, Apoptose-Assays und Western Blots mit HeLa-Zellen durchgeführt. Laut Chen et al. reduzierte Spermidin die Proliferation von HeLa-Zellen dosisabhängig. Die mittlere inhibitorische Konzentration lag bei 121,3 μM und es wurde deutlich, dass die Lebensfähigkeit der Zellen mit steigender Konzentration und steigender Expositionsdauer abnahm. Eine erhöhte Polyamin-Konzentration im Intrazellularraum korreliert mit steigender Zellproliferation und fördert somit die Tumorgenese (Soda, 2011, Durie et al., 1977). Durch eine Erschöpfung des intrazellulären Polyamingehalts durch Polyaminsynthese-Inhibitoren oder Polyamin-Analoga kann das Wachstum von Krebszellen gehemmt werden (Thomas et al., 2016, Nowotarski et al., 2013b). Es konnte in der Studie von Chen et al. bestätigt werden, dass exogenes Spermidin das endogene Polyaminlevel senkt, indem mittels quantitativer Echtzeit-PCR (polymerase chain reaction) die mRNA-Expression bei exogener Spermidinzufuhr bestimmt wurde und dabei die mRNA der Polyamin-abbauenden Enzyme stieg und die der Polyaminsynthetisierenden Enzyme sank (Chen et al., 2018). Weiterhin wurde festgestellt, dass Spermidin die HeLa-Zellen in der S-Phase verharren ließ und so ihre Vermehrung zu hemmen scheint. Mittels Western-Blot-Analyse konnten in der Studie eine Spermidin-induzierte Apoptose und Autophagie nachgewiesen sowie der Zusammenhang zwischen den beiden Prozessen hergestellt werden, indem die Apoptoserate unter Einsatz des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin bestimmt wurde. Bei dieser Blockade wurde auch die Apoptose blockiert, was zu der Erkenntnis führte, dass Autophagie durch Förderung der Apoptose die zelluläre Proliferation hemmt (Chen et al., 2018).

Diese Erkenntnisse werden durch weitere Studien bekräftigt. So wurde festgestellt, dass exogenes Spermidin durch die Autophagie-Induktion Leberkrebs bei Mäusen unterdrücken kann (Yue et al., 2017). Biogenes 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione (HMDB) ließ zudem die Autophagie-assoziierten Proteine LC3 I/II und Beclin ansteigen und übte dabei einen antiproliferativen Effekt auf Gebärmutterhalskrebszellen aus (Tsai et al., 2016).

Mandal et al. publizierten 2013 ihre Forschungsergebnisse zum Zusammenhang zwischen Wachstum in Säugetierzellen und der Höhe körpereigener Polyaminlevel, der darin besteht, dass durch Entfernung der Polyamine Spermidin und Spermin die Translation zum Stillstand gebracht und so das Wachstum gehemmt wird. Sie

verstärkten die Expression des katabolen Schlüsselenzyms N¹-Acetyltransferase 1 (SAT1) und stellten dabei gesenkte GFP (green fluorescent protein)-Mengen fest, ohne dass dabei die Menge an entsprechender mRNA gesenkt wurde. Dies führte zu der Erkenntnis, dass nicht die Transkription, sondern die Translation durch gesenkte endogene Polyaminlevel gehemmt wird. Zudem verursachte das SAT1 kodierende Adenovirus (AdSAT1), welches einen SAT1-Anstieg bewirkt, einen raschen Verbrauch zellulären Spermidins und Spermins sowie den Stillstand der Proteinsynthese und des Zellwachstums in HEK293-Zellen (Human embryonic kidney 293 cells), auf welche dieses Virusgen übertragen wurde (Mandal et al., 2013).

Spermidin soll via Autophagie-Induktion die Lebensdauer und Gewebefunktion erheblich verbessern sowie das Altern des Immunsystems, welches durch Veränderung der Immunzellen und deren Funktionsverlust gekennzeichnet ist, aufhalten (Zhang and Simon, 2020). Ein sinkender autophagischer Fluss alternder B-Zellen, der eine erhöhte Infektanfälligkeit und Schwächung des Immunsystems bewirkt, konnte durch LC3-II Messungen bestätigt werden (Zhang et al., 2019a). Durch die Gabe von Spermidin konnte der autophagische Fluss bei alten Mäusen mit Autophagiemangel in den B-Zellen erhöht und die B-Zell-Reaktionen verbessert werden (Zhang et al., 2019a).

1.2 Krebsstoffwechsel und Therapieansätze

Um die Tumorentstehung und sein Fortschreiten zu unterstützen, passen entartete Zellen ihren Stoffwechsel an die neuen Gegebenheiten an (Vander Heiden and DeBerardinis, 2017). Ein Verständnis über die Transformation der Stoffwechselforgänge in Tumorzellen ist essentiell, um Therapieansätze zu erarbeiten. Das Phänomen der erhöhten Glukoseaufnahme und Fermentation zu Laktat – selbst bei vollständiger Funktionsfähigkeit der Mitochondrien und in Gegenwart von Sauerstoff – ist als Warburg-Effekt bekannt, allerdings ist seine Funktion noch nicht gänzlich verstanden (Liberti and Locasale, 2016). Während die Fermentation von Glukose zu Laktat ein ineffizientes Mittel zur ATP-Gewinnung im Vergleich zur mitochondrialen Atmung darstellt und ihr Nutzen für die Krebszelle somit unklar erscheint, ist die Geschwindigkeit des Glukosestoffwechsels bei der Umwandlung in Laktat um einen Faktor von 10 bis 100 gegenüber der vollständigen Oxidation der Glukose in den Mitochondrien gesteigert (Liberti and Locasale, 2016). Wie theoretische Berechnungen auf Grundlage der evolutionären Spieltheorie belegen, scheinen Zellen mit einer höheren ATP-Rate trotz geringerer Ausbeute besser mit begrenzten Energiere Ressourcen umgehen zu können, wodurch sie einen entscheidenden Überlebensvorteil erzielen (Pfeiffer et al., 2001,

Slavov et al., 2014). Da sich Krebszellen durch ein unkontrolliertes Wachstum und unendliche Teilungsraten auszeichnen, zielen therapeutische Ansätze wie die Chemotherapie genau auf diese Unterschiede zu gesunden Zellen ab. Die Folsäure-Analoga Methotrexat und Pemetrexed gehören zu den Antimetaboliten-Medikamenten, die die Nukleotidsynthese hemmen und so dem erhöhten Stoffwechselbedarf neoplastischer Zellen für die Nukleotidsynthese entgegenwirken (Walling, 2006). Ein Problem bei der Ausrichtung auf den proliferativen Stoffwechsel ist die Tatsache, dass auch gesunde Zellen wie die des Knochenmarks, der Darmkrypten und der Haarfollikel eine hohe Proliferationsrate aufweisen und so werden mit der Antimetaboliten-Therapie auch normale, sich schnell teilende Zellen geschädigt (Luengo et al., 2017). Ein weiteres Merkmal des Krebsstoffwechsels ist der hohe Glutaminverbrauch, der im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet wird.

1.3 Die Rolle von Glutamin im Krebsstoffwechsel

Es ist bekannt, dass Tumorzellen den nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel zur Energiegewinnung unter Bildung von Laktat nutzen (Warburg-Effekt). Zahlreiche Arten von Krebszellen sind zudem auf eine exogene Versorgung mit Glutamin angewiesen, obwohl die Aminosäure nicht essentiell ist und somit von Säugetieren selbst produziert werden kann (Cluntun et al., 2017). Glutamin dient dazu, reduzierten Stickstoff für Biosynthesereaktionen bereitzustellen und als Kohlenstoffquelle den Citratzyklus (auch bekannt als Zitronensäurezyklus, Tricarbonsäurezyklus, TCA oder Krebszyklus nach H. A. Krebs) mittels Glutaminolyse aufzufüllen, indem Glutamin durch hydrolytische Desaminierung mittels Glutaminase zu Glutamat und dieses mittels Glutamatdehydrogenase zu α -Ketoglutarat desaminiert wird (Cluntun et al., 2017). Glutamin ist weiterhin an der Erzeugung von Antioxidantien (GSH-Synthese) zur Bekämpfung reaktiver Sauerstoffspezies sowie an der Herstellung von nicht essentiellen Aminosäuren, Purinen, Pyrimidinen und Fettsäuren für die zelluläre Replikation beteiligt (Yang et al., 2017). In Untersuchungen mit in Kultur gezüchteten menschlichen Krebszellen zeigte sich, dass Glutamin nach Glukose der am schnellsten verbrauchte Nährstoff und der Glutaminkonsum somit unter den Aminosäuren der größte ist (Jain et al., 2012, Hosios et al., 2016). Der im Abschnitt über die Autophagie beschriebene SCL1A5-Transporter (Solute carrier family 1 member 5) scheint laut einer Studie (Qian Wang et al., 2014) in menschlichen Melanomzellen signifikant erhöht zu sein. Der SLC1A5-Inhibitor BenSer reduzierte den Leucin- und Glutamintransport in Melanomzellen deutlich, was zu einer Hemmung der mTORC1-Signalübertragung führte und die Zellproliferation wie auch das Fortschreiten des Zellzyklus in den Melanomzellen

deutlich verringerte (Wang et al., 2014). Die Stilllegung des Gens zur SLC1A5-Expression mittels small hairpin RNA (shRNA) bestätigte die Ergebnisse der Forscher, da die Glutaminaufnahme, mTORC1-Signalübertragung und das Zellwachstum sanken. Die Studie zeigt, dass sich Glutamintransporter als ein möglicher Ansatzpunkt für Krebstherapien erweisen können. Ähnliche Ergebnisse wurden an LNCaP- und PC-3-Prostatakrebs-Zelllinien, dreifach negativen Brustkrebszellen sowie Zellen des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms erzielt (Wang et al., 2015, van Geldermalsen et al., 2016, Zhang et al., 2020). Demnach scheint die Überexpression dieses neben Glutaminase und SLC7A5 für den Glutamintransport hauptverantwortlichen Membranproteins für das Tumorstadium von entscheidender Bedeutung zu sein. Altman et al. (2016) legen dar, dass die Hemmung der Glutaminolyse Krebszellen wirksam bekämpfen kann. Ein konstant hoher Glutaminspiegel bietet den Krebszellen eine sofortige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zur Unterstützung der Biosynthese, Energiebereitstellung und des zellulären Gleichgewichtszustandes, sodass sie über optimale Wachstumsbedingungen verfügen (Altman et al., 2016). Akute Stressbedingungen während Verletzungen, Entzündungen oder Sepsis sowie nach operativen Eingriffen erfordern eine große Menge an Glutamin, da dessen Verbrauch in der Niere, dem Magen-Darm-Trakt, dem Immunsystem und im entzündeten Gewebe rapide ansteigt (Lacey and Wilmore, 1990).

Laut einer 2007 von Yuneva et al. publizierten Forschungsarbeit induzierte Glutaminmangel eine Apoptose, die von der Aktivität von MYC (Myelocytomatose-Onkogen), welches bei vielen menschlichen Krebsarten abnormal exprimiert wird (Nesbit et al., 1999), abhängig war. Dagegen tötete Glukoseabbau normale menschliche Fibroblasten unabhängig von der Aktivität des ektopen MYC und ohne Apoptose-Induktion (Yuneva et al., 2007). Dabei scheint die Proteinsynthese keine Ursache für die Glutaminmangel-induzierte Apoptose zu sein, denn obwohl Glutamin als Aminosäure die Proteinsynthese der MYC-Gene beeinflusst, wurde durch das Fehlen der essentiellen Aminosäure im Kulturmedium keine Apoptose erzielt (O'Connell et al., 2003, Yuneva et al., 2007). Yuneva et al. (2007) stellten weiterhin fest, dass die durch Glutaminmangel induzierte Apoptose keine mTOR-Aktivität erforderte, da die Kinase mTOR trotz exogenen Glutaminmangels ihre Aktivität aufrechterhielt. Zudem scheint laut Yuneva et al. (2007) die Glutaminmangel-induzierte Apoptose in keinem Zusammenhang mit ATP-Mangel zu stehen, obwohl Glutamin eine der Hauptquellen zur ATP-Erzeugung darstellt. Eine geringere Synthese des nichtenzymatischen Antioxidans GSH, welches aus Glutamin gebildet wird, verursachte in dieser Studie ebenso keine Apoptose. Zudem wurde festgestellt, dass Substrate des Citratzyklus wie Oxalacetat und Pyruvat einen

Glutaminmangel ausgleichen können, um die Apoptose zu verhindern (Yuneva et al., 2007). Da die Glutamin-Kohlenstoffkette das Rückgrat des Citratzyklus-Zwischenprodukts α -Ketoglutarat bildet und Glutamin die Hauptquelle für die Substrate des Citratzyklus zu sein scheint, kommt der Aminosäure eine große Bedeutung bei der Regulierung des Citratzyklus zu, wobei Glutaminmangel insbesondere durch seine wichtige Funktion als Katalysator für Redoxreaktionen apoptotische Auswirkungen haben könnte und weniger durch die Bereitstellung von Substraten (Reitzer et al., 1979, Moreadith and Lehninger, 1984, Zielke et al., 1984, Kovacević et al., 1991, Baggetto, 1992, Petch and Butler, 1994). Während Glutaminmangel-induzierende Krebstherapien bei Tieren Erfolge zeigten, erwiesen sie sich beim Menschen als toxisch (Ahluwalia et al., 1990). Eine weitere bedeutende Erkenntnis ist, dass Glutaminmangel keinen p53-Anstieg bewirkt und somit nicht diesen Weg zur Apoptose-Induktion nutzt, wodurch erneut seine potentiell bedeutsame Rolle in der Krebstherapie untermauert wird, da jenes Protein in vielen Krebsarten mutiert und somit als Angriffspunkt wenig vielversprechend ist (Yuneva et al., 2007).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Glutamin-Restriktion als eine Form der Aminosäure-Restriktion auf das Proliferationsverhalten, den Stoffwechsel und die Morphologie der murinen Fibroblastenzelllinie L929 zu untersuchen und herauszustellen, ob diese eine geeignete Möglichkeit darstellt, um den LEM zu induzieren. Es wurde eine metabolische Analyse der L929-Zellen unter Glutamin-Restriktion im Vergleich zu einer Kontrolle (in Vollmedium inkubierte Zellen) durchgeführt, in der die wichtigsten Metaboliten untersucht werden sollten. Weiterhin sollte der Einfluss der Polyamine Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin als potentielle CRMs auf das Proliferationsverhalten der murinen Fibroblastenzelllinie L929, der humanen Kontrollzelllinien HaCaT und HeLa sowie der humanen HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25 über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht werden. Ein weiteres Ziel sollte es zudem sein, die Frage zu beantworten, ob bei ausgewählten Zelllinien, die unter Methionin-Restriktion bzw. in Spermidin/Spermin inkubiert wurden, Autophagie-assoziierte Proteine detektiert werden und somit Indizien für eine mögliche Autophagie-Induktion gefunden werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft
Absaugung	HLC	Pforzheim DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG	Pforzheim
ChemiDoc Imaging System	17001401	BIO-RAD	Feldkirchen
CO ₂ -Brutschrank	Thermo Scientific HERACELL 150i	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Digitalmikroskop	ImageXpress Pico	Molecular devices LLC	San José
Einkanalpipette	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Elektroblotter	PerfectBlue Semi- Dry Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophorese- gerät	PerfectBlue Twin S 45-1010-C	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen
Feinwaage	KB 2400-2N	Kern & Sohn GmbH	Dürrewangen
Gefrierschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riss
Hellfeld-Mikroskop	EVOS XL	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Kühlschrank	7084 311-00	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riss
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
PCR-Gerät	CFX Connect Real- Time PCR Detection System	BIO-RAD	Feldkirchen
Photometer	Tecan Infinite® F50 Absorbance Microplate Reader	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Pipetten	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettierhelfer accujet® pro	BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim

Pumpe	Vacusaft	Integra Biosciences Deutschland GmbH	Biebertal
Rollenmischer	RM 5	VWR International GmbH	Darmstadt
Spannungsgerät	250 Volt Power Supply	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen
Sterilbank	Thermo Scientific Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Ultraschall- Homogenisator	Branson Ultra-sonics	Emerson Technologies GmbH	Dietzen- bach
Vortexer	Vortexer Genie 2	Scientific Industries	Karlsruhe
Wasserbad	VWB 26	VWR International GmbH	Darmstadt
Wippschüttler	Rocking Platform	VWR International GmbH	Darmstadt
Zellmikroskop	Olympus CK40	Olympus Europa SE & Co. KG	Hamburg
Zellzähler	EVE Automatic cell counter	NanoEnTek Inc.	Seoul (Korea)
Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG	Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Materialliste

Artikel	Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft
6-Well-Platten	Nunc™ Zellkultur- Multischalen	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
96-Well-Platten	Nunc™ MicroWell™ 96-Well- Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Blotpapier	Gel-Blotting Papiere	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Blotting Substrat	Thermo Scientific™ Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
FACS Röhrchen	5 ml Tubes 75 x 12 mm	Sarstedt AG & Co. KG	Nürnberg
Falcons	50 mm Polypropylene Conical Tube 30 x 115 mm style	Corning GmbH	Kaiserslautern

Messgefäße	CASY cups 22 x 65	Omni Life Science GmbH	Bremen
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG	Hamburg
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC	GE Healthcare GmbH	München
Pasteurpipette	Kimble Chase Glass Pasteur Pipettes	Kimble Chase Germany	Meiningen
Petrischalen	Nunc™	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Pipetten	Cellstar Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen lose blau 100-1000 µl Pipettenspitzen lose kristall 0,1-10 µl	A. Hartenstein GmbH	Würzburg
Reagiergefäße	Safe Seal	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Röntgenfilme	Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare GmbH	München
Spritzenvorsatzfilter	Spritzenvorsatzfilter CA	A. Hartenstein GmbH	Würzburg
Zählkammern	EVE™ Cell Counting Slides	NanoEnTek	Seoul
Zellkulturflaschen	Nunc™ EasYFlask™ 75 cm²	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Zellschaber	Cell Scraper	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen

2.1.3 Nachweismittel/Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenz	Produktnummer	Hersteller	Herkunft
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	9592	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Aqua dest.		Hausleitung	Würzburg
DMSO (Dimethylsulfoxide)	RNBD9128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
DPBS (1 x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	14040-091	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt

FCS (fetal calf serum)	10270	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Glycin (Pulver)	0079	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Kristallviolett	42555	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
L-Methionin	M8439	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Marker Western Blot (Prestained marker)	26612	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Methanol ($\geq 99,8$ %)	322415-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Milchpulver	271-045-3	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
N-Acetylputrescin	A8784-25MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
NaCl (Pulver)	3957	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin P/S (10.000 units/ml Penicillin; 10.000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin)	15140122	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
Putrescin	P5780-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Roti®-Free Stripping Puffer 2.2 plus	3337.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1); 30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung	3029	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
SDS ultra pure $\geq 99,5$ %	2326.2	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Spermidin	S0266 - 1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Spermidin	7161.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Spermin	S4264-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Stable Glutamine 200 mM	P04-82100	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach
TEMED	2367.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Tris (Tris-hydroxymethylaminomethane) $\geq 99,8$ %	252859	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf
Trypan blue stain 0,4 %	EVH-020	NanoEnTek	Seoul
Trypsin/EDTA-Lösung	L2143	Biochrom GmbH	Berlin
Tween 20	02040162	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe

2.1.4 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Zellkulturmedien. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM/F12 (1:1 Mischung aus DMEM und Ham's F-12), MEM (Minimum Essential Medium), RPMI (Rosevell Park Memorial Institute)

Medium	Zusätze	Produktnummer	Hersteller	Herkunft
DMEM	10 % FCS 1 % P/S	41965-039	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
DMEM/F-12, HEPES	10 % FCS 1 % P/S 5 µl Hydrocortison	31330-038	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
MEM Alpha	10 % FCS 1 % P/S	22561-021	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
RPMI 1640	10 % FCS 1 % P/S	11875-101	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH	Darmstadt
RPMI 1640 Glutamin-	10 % FCS 1 % P/S	21870-076	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Schnelldorf

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper. Angabe von Primär- und Sekundärantikörpern zur Detektion Autophagie-assoziiierter Proteine

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti Kaninchen	Ziege	Dako Denmark	1 : 10.000
Anti Maus	Kaninchen	Dako Denmark	1 : 10.000
Atg5	Kaninchen	Cell Signaling	1 : 1000
Beclin-1	Kaninchen	Cell Signaling #3495	1 : 1000
LC3B	Kaninchen	Cell Signaling #2775	1 : 1000
P62	Kaninchen	Cell Signaling	1 : 1000
Tubulin-α	Maus	Thermo Scientific	1 : 2000

2.1.6 Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Blotpuffer (1 x)	100 ml Western Puffer (10 x) 700 ml dH ₂ O 200 ml Methanol 1,5 ml 20 % SDS
Kristallviolettlösung	0,5 g Kristallviolett 100 ml Methanol 400 ml dH ₂ O
Laufpuffer (1 x)	100 ml 10 x Western Puffer 900 ml dH ₂ O 5 ml 20 % SDS
Milchpulverlösung	5 g Magermilchpulver 100 ml 1 x TBS (Tris-buffered saline)
Probenpuffer	8 % Natriumdodecylphosphat (SDS) 0,1 M Dithiothreitol (DTT) 40 % Glycerol 0,2 M Tris 0,04 % Bromophenol
Sammelgelpuffer (4 x)	0,5 M Tris (30,285 g) 0,015 M SDS (2,162 g) pH 6,8 HCl 500 ml dH ₂ O
TBS (10 x)	0,02 M Tris 8 % NaCl pH 7,6
TBS Tween 0,01 %	1 l TBS (1 x) 100 µl Tween 20
Trenngelpuffer (4 x)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 HCl 500 ml dH ₂ O 144 g Glycin
Western Puffer (10 x)	30,3 g Tris 1 l dH ₂ O

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Passage

Tabelle 7: Zellpanel. Übersicht der verwendeten humanen HNSCC-Zelllinien sowie der murinen (L929) und humanen (HaCaT, HeLa) Kontrollzelllinien unter Angabe des Entnahmeorts und des benötigten Kulturmediums

Zelllinie	Gewebe	Kulturmedium
Detroit 562	Pharynxkarzinom	MEM α + 10 % FCS + 1 % P/S
FaDu	Hypopharynxkarzinom	MEM α + 10 % FCS + 1 % P/S
HaCaT	Keratinocyten (Melanom)	DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S
HeLa	Zervixkarzinom	RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S
L929	Bindegewebe (murin)	RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S
SCC25	Zungenkarzinom	DMEM/F12 (+ Hepes) + 10 % FCS + 1 % P/S
SCC9	Zungenkarzinom	DMEM/F12 (+ Hepes) + 10 % FCS + 1 % P/S

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Zellen wurden im CO₂-Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert und täglich unter dem Zellkulturmikroskop hinsichtlich ihrer Viabilität überprüft. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert (Tabelle 8) und ein Medienwechsel durchgeführt. Um eine Kontamination der Zellen zu verhindern, wurde dem Medium 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S) zugefügt. Weiterhin wurde 10 % fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) zugesetzt.

Zunächst wurde das vorhandene Medium unter der Sterilbank mit einer Glaspipette abgesaugt. Dann wurden 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) in die Zellkulturflasche gegeben, die Flasche geschwenkt und erneut abgesaugt, um tote Zellen zu entfernen. Es wurden je Flasche 3 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) auf die Zellen gegeben, um diese vom Boden zu lösen. Die Zellkulturflasche wurde für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert, danach 7 ml Medium hinzugegeben und mithilfe eines Zellschabers der gesamte Inhalt der Flasche in ein 50 ml Falcon überführt. Je nach Splitverhältnis wurde die entsprechende Menge wieder in die Zellkulturflasche überführt und 20 ml frisches Medium hinzugegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellzähler EVE™ verwendet, welcher durch vorherige Anfärbung der Zellsuspension mittels Trypanblau die lebenden Zellen quantifiziert. Dafür wurden jeweils 20 μ l Trypanblau und 20 μ l Zellsuspension gemischt und davon 10 μ l für die Messung sorgfältig in die Zählkammer des Trägers pipettiert.

Die üblichen Splitverhältnisse der verwendeten Zelllinien sind in der folgenden Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Zelllinien unter Angabe des jeweiligen Splitverhältnisses

Zelllinie	Individuelles Splitverhältnis
Detroit 562	1 : 3
FaDu	1 : 5
HaCaT	1 : 4
HeLa	1 : 10
L929	1 : 10
SCC25	1 : 2
SCC9	1 : 2,5

2.2.2 Erstellen von Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Wirkstoffen

Die Verdünnungsreihe wurde zur Untersuchung des Einflusses von Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin auf die Zellviabilität der murinen Fibroblastenzelllinie L929, der humanen Kontrollzelllinien HaCaT und HeLa sowie der humanen HNSCC-Zelllinien Detroit 562, FaDu, SCC9 und SCC25 verwendet. Die Reagenzien wurden entsprechend ihrer Löslichkeit in DMSO oder steril filtriertem destilliertem Wasser angesetzt. 200 mg Spermidin wurden in 5 ml DMSO, 145 mg Spermin in 5 ml DMSO, 161 mg Putrescin in 5 ml destilliertem Wasser und 166 mg N-Acetylputrescin in 5 ml destilliertem Wasser gelöst zur jeweiligen Herstellung einer 200 mM Stocklösung. Die Startkonzentration in den Versuchen war 10 mM.

Zu Beginn wurden 10.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24 h wurde der Überstand mit einer 8-Kanal-Pipette abgenommen. Es wurden danach in die Spalten eins bis zwölf mit Ausnahme von Spalte zwei je 100 µl frisches Medium gegeben und danach in Spalte zwei je nach Art der Verdünnungsreihe (bei log3 150 µl und bei log2 200 µl) der Wirkstoff mit einer Startkonzentration von 10 mM in Medium als Triplet pipettiert. Zur Erstellung der Verdünnungsreihe mit log3 wurden im Folgenden 50 µL aus der zweiten Reihe entnommen, eine Reihe weitergegeben, gut durchmischt, wieder 50 µL aufgenommen und erneut in die nächste Reihe weitergegeben. Dieser Vorgang wurde bis Reihe zehn wiederholt. Bei einer log2-Verdünnungsreihe vollzieht sich der gleiche Prozess, jedoch mit 100 µl statt 50 µl. Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank für einen Zeitraum von 24 h, 48 h und/oder 72 h inkubiert, täglich unter dem Mikroskop auf die Viabilität der Zellen überprüft und anschließend mittels Kristallviolett-Assay ausgewertet. Analog dazu wurde bei der Glutamin-

Verdünnungsreihe vorgegangen, jedoch mit glutaminhaltigem Medium in der zweiten Reihe in einer Konzentration von 2 mM und einer log₃-Verdünnung, sodass die Zellen der Reihe elf vollkommen glutaminfreies Medium erhielten.

Kontrolle: Um die Ergebnisse richtig zu interpretieren, ist es entscheidend zu wissen, ob die Dezimierung der Zellzahlen in einem eindeutigen Zusammenhang mit den Wirkstoffen Spermidin und Spermin steht oder ob das Lösungsmittel ebenfalls Auswirkungen auf die Zellviabilität hat und die Ergebnisse beeinflusst. Daher wurden die Versuche für L929, HaCaT und HeLa mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel für Spermidin und Spermin wiederholt sowie mit reinem DMSO ohne gelöste Wirkstoffe durchgeführt. Die Verdünnungsreihen wurden analog zu dem bereits beschriebenen Vorgehen durchgeführt, jedoch wurden die Wirkstoffe Spermidin und Spermin nicht wie zuvor beschrieben jeweils in 5 ml DMSO gelöst, sondern in destilliertem Wasser. Für die DMSO-Kontrolle wurde die Verdünnungsreihe entsprechend mit reinem DMSO ohne gelöste Wirkstoffe in der gleichen Konzentration wie in der Verdünnungsreihe der Wirkstoffe durchgeführt. Die Wirkstoffe, gelöst in destilliertem Wasser sowie das reine DMSO wurden mit einer Startkonzentration von 10 mM in Medium in einer log₃-Verdünnungsreihe pipettiert. Nach drei Tagen erfolgte die Auswertung der Ergebnisse mittels Kristallviolett-Assay.

2.2.3 Kristallviolett-Assay

Mit dem Kristallviolett-Assay (Zytotoxizitätsassay) lassen sich die relative Zellzahl sowie die Zellviabilität quantitativ erfassen. Da der Farbstoff Kristallviolett in der Lage ist, mit der DNA in lebenden Zellen zu interagieren und eine lineare Korrelation zwischen DNA-Gehalt und Farbstoffbindung besteht, wird anhand der Bestimmung der optischen Dichte (OD) eine relative Quantifizierung der Zellen ermöglicht (Noeske, 1966). Nach Ablauf des Versuchs wurde der Überstand aus der 96-Well-Platte entfernt. Dann wurden in jedes Well 50 µl Kristallviolettlösung gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Der nicht gebundene Farbstoff wurde durch drei- bis fünfmaliges Waschen in einem Eimer mit destilliertem Wasser entfernt und die Platten für 24 h luftgetrocknet. Anschließend folgte die Auswertung am Photometer. Dafür wurden 100 µl Methanol pro Well hinzugegeben und bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Mikroplatten-Reader Tecan Infinite® F50 die optische Dichte bestimmt.

2.2.4 Datenverarbeitung und Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mittels Excel und wurde in ein Liniendiagramm zur Darstellung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zugabe der jeweiligen Stoffe überführt. Dafür wurden zunächst von jedem einzelnen Wert der Background – also der Messwert, wenn sich keine Zellen am Boden der Wells, sondern nur Methanol darin befindet – abgezogen. Es wurden die Mittelwerte aus den Triplets gebildet. Zudem wurde die Standardabweichung ermittelt. Zur Berechnung der relativen Zellzahl in Prozent wurde folgende Formel verwendet:

$$\left(\frac{(M_{OD595nm} \text{ (stimulierte Zellen)} - \text{Nullwert}_{OD595nm})}{(M_{OD595nm} \text{ (Standard)} - \text{Nullwert}_{OD595nm})} \right) \times 100 = \text{rel. Zellzahl (\%)}$$

Die Errechnung der Standardabweichung in Prozent erfolgte anhand dieser Formel:

$$\left(\frac{SD_{OD595nm} \text{ (stimulierte Zellen)}}{(M_{OD595nm} \text{ (stimulierte Zellen)} - \text{Nullwert}_{OD595nm})} \right) \times \text{rel. Zellzahl (\%)} = SD (\%)$$

Die Ergebnisse der drei durchgeführten Versuche wurden jeweils graphisch dargestellt. Dazu wurden die Werte aus den drei Versuchen sowie die Prozent-Standardabweichungen jeweils gemittelt. Die gemittelte Prozent-Standardabweichung wurde wie folgt bestimmt:

$$\frac{M \text{ } SD_{OD595nm} \text{ (absolut)}}{M_{OD595nm} \text{ (absolut)} - M_{OD595nm} \text{ (\%)}} = \text{gemittelte SD (\%)}$$

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}), also die Konzentration eines Wirkstoffes, welche die Zellviabilität um 50 % senkt, wurde graphisch bestimmt, indem eine Verbindungslinie auf der y-Achse zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert gezogen wurde und ausgehend vom Mittelpunkt dieser Strecke eine Parallele zur x-Achse bis zum Schnittpunkt mit dem Graphen gelegt wurde. Von diesem Schnittpunkt aus wurde das Lot gefällt und die entsprechende Konzentration auf der x-Achse abgelesen.

2.2.5 Optische Kontrolle der Morphologie

Mit dem Hellfeldmikroskop EVOS XL wurde eine Analyse zur optischen Kontrolle der Morphologie der Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Spermidins oder Spermins durchgeführt. Untersucht wurden jeweils 10.000 Zellen/Well der Zelllinie L929, die für drei Tage mit den Wirkstoffen Spermidin oder Spermin in den Konzentrationen 10 mM; 3,33 mM und 1,11 mM inkubiert wurden. Die Wirkstoffe Spermidin bzw. Spermin wurden analog zu dem in 2.2.2 beschriebenen Verhältnis mit destilliertem Wasser verdünnt, d. h. 200 mg Spermidin und 145 mg Spermin wurden in jeweils 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Zum Vergleich wurde eine nur mit Medium stimulierte Kontrolle mit L929-Zellen herangezogen. Die mit dem Hellfeldmikroskop aufgenommenen Bilder sollten die Effekte der reinen Wirkstoffe ohne das Lösungsmittel DMSO auf die Viabilität und Morphologie der Zellen aufzeigen.

2.2.6 Digitalmikroskopie ImageXpress Pico

Mit dem ImageXpress Pico Zell-Imaging-System von Molecular Devices wurde die Zellzählung automatisch durch die Erkennung gefärbter DNA mittels Fluoreszenz durchgeführt. Verwendet wurde fluoreszierender Hoechst-Farbstoff, welcher sich durch eine gute Membrangängigkeit bei geringer Zytotoxizität auszeichnet.

2.2.7 Gewinnung von Zelllysaten

Es wurden auf 6-Well-Platten jeweils 500.000 Zellen pro Well ausgesät und für 24 h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit reinem Medium, 1 mM Spermidin oder 1 mM Spermin in Medium oder methioninfreiem Medium jeweils als Doppelwerte angesetzt. Nach 24 h und 48 h wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für eine Minute bei 14.000 rpm (revolutions per minute) pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde 110 µl Ladepuffer auf das Pellet gegeben und die Zellen mittels Ultraschalls aufgeschlossen. Die Proben wurden bei 95 °C für drei Minuten erhitzt und anschließend fünf Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Bis zum Probenauftrag wurden die Lysate bei -20 °C eingefroren.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung der Proteine der Zelllysate per SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurden die Gele wie folgt hergestellt:

Tabelle 9 Gelzusammensetzung. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von jeweils zwei Gelen; Acrylamid (Gelbildung), APS (Auslöser der radikalischen Kettenreaktion), TEMED (Katalysator).

Trenngel	Sammelgel
8,8 ml Acrylamid	2,8 ml Acrylamid
5,5 ml Trenngelpuffer	3,5 ml Sammelgelpuffer
7,8 ml dH ₂ O	7,6 ml dH ₂ O
374 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)	168 µl APS
30,8 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)	14 µl TEMED

Die Gele wurden in eine Laufkammer eingespannt und das Reservoir mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach Entfernung des Kamms wurde eine Tasche mit bis zu 20 µl Lysat beladen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde in die erste Tasche 8 µl Proteinmarker (11–250 kDa) pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 35 mA pro Gel für 40 Minuten.

2.2.9 Western Blot

Nachfolgend wurden die Proteine im Elektrobloetter bei 60 mA pro Gel für 75 Minuten auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Zum Blockieren der nichtspezifischen Bindungsstellen wurde eine 5%ige Milchpulverlösung in TBS hergestellt, in welcher die Membranen für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht mit einem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit TBS-Tween (0,05 % Tween 20) gewaschen und es erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Danach wurden die Membranen erneut gewaschen (dreimal jeweils 20 Minuten) und für den Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz mit Blotting Substrat behandelt. Der Nachweis erfolgte im ChemiDoc Imaging System.

Für jeden Primär- und Sekundärantikörper existieren spezifische Protokolle, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind.

Tabelle 10: Protokolle der verwendeten Antikörper

Antikörper	Protokoll
Tubulin- α #MS-581-P1 Thermo Scientific	<ol style="list-style-type: none"> 1) Inkubation in 10 ml 1 x TBS mit 5 μl Primärantikörper bei 4 °C über Nacht 2) 3 x 15 min in TBS-T (0,05 %) waschen 3) 1 h in 10 ml 1 x TBS mit 2 μl Sekundärantikörper Polyclonal Rabbit-Anti Mouse HRP (horseradish peroxidase); #P0260; Dako bei Raumtemperatur inkubieren 4) 3 x 15 min in TBS-T (0,05 %) waschen 5) Entwickeln
Stripping Roti®-Free Stripping- Puffer 2.2 plus Carl Roth	<ol style="list-style-type: none"> 1) 10 min in Stripping-Puffer bei Raumtemperatur inkubieren 2) 4 x 5 min mit 0,1 % TBS-T waschen 3) 1 h in 5%iger Milchpulverlösung (5 g Milchpulver in 100 ml 1 x TBS) blockieren 4) 2 x in 1 x TBS schwenken 5) Inkubation mit Primärantikörper bei 4 °C über Nacht 6) 3 x 10 min waschen mit 0,1 % TBS-T 7) 1 h Inkubation mit Sekundärantikörper bei Raumtemperatur 8) 3 x 10 min mit 0,1 % TBS-T waschen 9) Entwickeln
Anti-rabbit HRP Dako Denmark AG	<p>= Sekundärantikörper</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 1 h in 10 ml 1 x TBS mit 1,5 μl Sekundärantikörper inkubieren 2) 3 x 15 min mit 0,01 % TBS-T waschen 3) Entwickeln
Beclin 1 (D40C5) rabbit mAb #3495 Cell Signaling	<ol style="list-style-type: none"> 1) Inkubation in 10 ml 1 x TBS mit 10 μl Primärantikörper bei 4 °C über Nacht 2) 3 x 5 min in TBS-T (0,05 %) waschen 3) 1 h in 10 ml 1xTBS mit 2 μl Sekundärantikörper (Polyclonal Goat-Anti-rabbit HRP Dako) bei Raumtemperatur inkubieren 4) 3 x 5 min in 15 ml TBS-T (0,05 %) waschen 5) Entwickeln
LC3B #2775 Cell Signaling	<ol style="list-style-type: none"> 1) Inkubation in 10 ml 1 x TBS mit 10 μl Primärantikörper bei 4 °C über Nacht 2) 3 x 5 min in TBS-T (0,05 %) waschen 3) 1 h in 10 ml 1 x TBS mit 2 μl Sekundärantikörper (Polyclonal Goat-Anti-rabbit HRP Dako) bei Raumtemperatur inkubieren 4) 3 x 5 min in 15 ml TBS-T (0,05 %) waschen 5) Entwickeln
Atg5	<ol style="list-style-type: none"> 1) Inkubation in 10 ml 1 x TBS mit 10 μl Primärantikörper bei 4 °C über Nacht 2) 3 x 5 min in TBS-T (0,05 %) waschen 3) 1 h in 10 ml 1 x TBS mit 2 μl Sekundärantikörper (Polyclonal Goat-Anti-rabbit HRP Dako) bei Raumtemperatur inkubieren 4) 3 x 5 min in 15 ml TBS-T (0,05 %) waschen 5) Entwickeln

2.2.10 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (liquid chromatography-mass spectrometry, auch LC-MS) ist ein technisches Verfahren zur Analyse der Masse von Substanzen durch Ionisierung, Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis und Registrierung in einem Detektor. Verwendet wurde für die LC-MS das Dionex Ultimate 3000 Ultra High Performance Liquid Chromatographie (UHPLC)-System der Firma Thermo Fisher Scientific. Für die Evaluation der Daten wurde die Software TraceFinder V3.3, ebenfalls von Thermo Fisher Scientific, herangezogen. Das Verfahren der LC-MS ermöglicht eine Quantifizierung verschiedener Metaboliten innerhalb kürzester Zeit mit einer Flussrate von bis zu 10 ml/min bei einem Druck von maximal 620 bar. Die massenspektrometrische Analyse und Gewinnung der Primärdaten wurde von Herrn Dr. Werner Schmitz vom Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Würzburg durchgeführt.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Glutamin-Restriktion auf das Wachstum von Zellen nimmt, wurden murine Fibroblasten der Zelllinie L929 als Modellsystem verwendet. Es wurden zwei Versuche mit jeweils einer Dauer von fünf Tagen durchgeführt, das Probenmaterial gesammelt und mittels Massenspektrometer ausgewertet. Am ersten Tag erfolgte das Aussäen der Zellen mit Vollmedium auf 30 Maxi-Petrischalen – jeweils sechs Petrischalen mit einer Million Zellen für die Erntetage eins bis drei und jeweils sechs Petrischalen für die Erntetage vier und fünf mit jeweils 500.000 Zellen. Für die letzten beiden Tage wurden weniger Zellen ausgesät, um ein zu dichtes Wachstum der Zellen zu verhindern. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit glutaminfreiem oder glutaminhaltigem Medium. Frisch angesetzt wurden dafür die Medien auf der Grundlage von glutaminfreiem RPMI-1640 Medium, dem FCS und P/S und für das glutaminhaltige Medium zudem Glutamin (2 mM) zugesetzt wurden. Es wurden an jedem der fünf folgenden Tage jeweils nach 24 h sechs Schalen geerntet – drei Schalen, die mit glutaminhaltigem Medium und drei Schalen, welche mit glutaminfreiem Medium stimuliert worden waren. Dabei wurde zunächst 1 ml des Überstandes von jeder Schale entnommen und in ein Mikroreagenzgefäß überführt. Das restliche Medium wurde abgesaugt und mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes folgte die Zugabe von 3 ml Trypsin und eine Inkubation von 20 Minuten im Brutschrank. Nach Zugabe von 6 ml Medium wurden die Zellen resuspendiert und in Falcons überführt. Mittels Eve wurde die Zellzahl viermal pro Probe bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 15 ml Falcons überführt und fünf Minuten lang mit 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der

Überstand wurde so abgenommen, dass noch ca. 1 ml übrigblieb, das erhaltene Pellet darin resuspendiert, in ein Mikroreagenzgefäß überführt und für drei Minuten bei 16.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer auf eine Glaspipette gesetzten Spitze vorsichtig abgesaugt. Die gewonnenen Pellets und die abgenommenen Überstände wurden bis zur Auswertung am Massenspektrometer bei -20 °C gelagert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in der LC-MS untersuchten Substanzen. Die einzelnen Substanzen können in insgesamt 25 Stoffgruppen bzw. Stoffwechselwege eingeteilt werden.

Tabelle 11: Übersicht der untersuchten Substanzen, unterteilt in Gruppen

<p>Nicht-essentielle Aminosäuren</p> <p>Alanine Arginine Asparagine Aspartate Cysteine Glutamate Glutamine Glycine Proline Serine Tyrosine</p>	<p>Schwefel-Metaboliten</p> <p>Cystine Glutamylcysteine Cysteinylglycine GSH GSSG Cystathionine Taurine Homocysteine SAH SAM Methylthioadenosine α-Ketoglutaramate</p>
<p>Essentielle Aminosäuren</p> <p>Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Threonine Tryptophan Valine</p>	<p>Folate</p> <p>Folate N5,N10-Methylene-FH4 N10-Formyl-FH4 N5-Methyl-FH4</p>
<p>Acetylierte Aminosäuren</p> <p>N-Acetylasparagine N-Acetylaspartate N-Acetylglutamate N-Acetylmethionine</p>	<p>Choline</p> <p>Choline Acetylcholine CDP-Choline</p>
<p>Verzweigt-kettige Aminosäuren</p> <p>3-/4-Methyl-2-oxopentanoate</p>	<p>Kohlenhydrate</p> <p>Glycerol-3-P Glycerate Glucosamine Glucosamine-P NANA UDP-Glc UDP-GlcNAc UDP-Glucuronate</p>
<p>Glutamin-Metaboliten</p> <p>2-Hydroxyglutarate 5-Oxoproline</p>	<p>Glykolyse-Metaboliten</p> <p>Fructose Aldohexose Hexose-P Fructose-1,6-P2 Glycerol/-on-P Diphosphoglycerate 3-Phosphoglycerate Phosphoenolpyruvate Pyruvate Lactate</p>
<p>Lysin-Metaboliten</p> <p>Pipecolate</p>	
<p>Tryptophan-Metaboliten</p> <p>N-Formylkynurenine Kynurenine</p>	
<p>Arginin-Metaboliten</p> <p>Creatine Creatinine</p>	
<p>Polyamine</p> <p>N-Acetylputrescine</p>	

Citratzyklus-Metaboliten

Citrate
Aconitate
a-Ketoglutarate
Succinate
Fumarate
Malate

Pyrimidine

Carbamoylaspartate
Orotate
Uracil
Uridine
UMP
UDP
UTP
Cytosine
Cytidine
CMP
CDP
CTP
Thymine
dThymidine
dTMP
dTDP
dTTP

Purine

FAICAR
Adenine
Adenosine
AMP
ADP
ATP
cAMP
dAMP
dATP
ADP-Glc
Adenylosuccinate
Guanine
Guanosine
GMP
GDP
GTP
dGuanosine
Inosine
IMP
dInosine
Hypoxanthine
Xanthine
Xanthosine
Uric Acid

Harnstoffzyklus-Metaboliten

Ornithine
Citrulline
ArgSucc

CoA-Derivate

Pantothenate
CoA
Dephospho-CoA
Ac-CoA

Carnitine

Carnitine
AC-(02:0)
AC-(03:0)
AC-(04:0)
AC-(05:0)
AC-(05:1)
AC-(06:0)
AC-(06:1)
AC-(08:0)

Isoprenoide

Acetoacetate
Mevalolactone

Nicotinamide

Nicotinamide
mNAM
NAD+
NADH
NADP+
NADPH

Flavine

Riboflavin
FMN
FAD

Vitamine

Biotin
Pyridoxine
Thiamine
Thiamine-P

Pentose-Phosphat-Weg-Metaboliten

Phosphogluconate
Gluconate
Pentose-5-P
Sedoheptulose-7-phosphate

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien unter dem Einfluss ausgesuchter Polyamine

Polyamine sind bedeutsam für das Zellwachstum und die Entwicklung in Eukaryoten, da sie eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur und Membranstabilität, der Bekämpfung freier Radikale sowie der Regulierung von Ionenkanälen spielen (Pegg, 1988, Gerner and Meyskens, 2004, Matthews, 1993, Feuerstein et al., 1991, Ha et al., 1998, Kurata et al., 2006, Schuber, 1989). Während die Polyamine unter physiologischen Bedingungen über verschiedene Mechanismen und Enzyme streng reguliert werden, kann ihr Stoffwechsel bei Krankheiten einschließlich Krebs gestört sein (Pegg, 1988). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen einem dysregulierten Polyaminkatabolismus und der Karzinogenese stellt der Polyaminstoffwechsel ein mögliches Ziel in der Krebsprävention dar (Casero et al., 2018). Eine hohe intrazelluläre Polyamin-Konzentration korreliert mit einer gesteigerten Zellproliferation und der Tumorgenese (Durie et al., 1977, Soda, 2011). Es konnte bei HeLa-Zellen gezeigt werden, dass durch die Gabe von exogenem Spermidin eine Akkumulation endogener Polyamine gehemmt wird (Chen et al., 2018). Somit könnte exogenes Spermidin eine Möglichkeit sein, um die Proliferation zu hemmen.

3.1.1 Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT und HeLa unter Einfluss von Spermidin und Spermin

In den ersten Versuchen sollten die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen der Polyamine Spermidin und Spermin auf das Zellwachstum der Zelllinien L929, HaCaT und HeLa untersucht werden. Dazu wurden jeweils 10.000 Zellen/Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und am folgenden Tag eine Stimulation mit den Wirkstoffen in einer log₃-Verdünnungsreihe vorgenommen. Die relativen Zellzahlen wurden mittels Kristallviolett-Assay nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Abbildung 5 verdeutlicht die Veränderungen der relativen Zellzahl (Angabe in Prozent) in Abhängigkeit von der Konzentration der Wirkstoffe. Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration konnte bei allen drei Zelllinien ein Rückgang der relativen Zellzahl festgestellt werden.

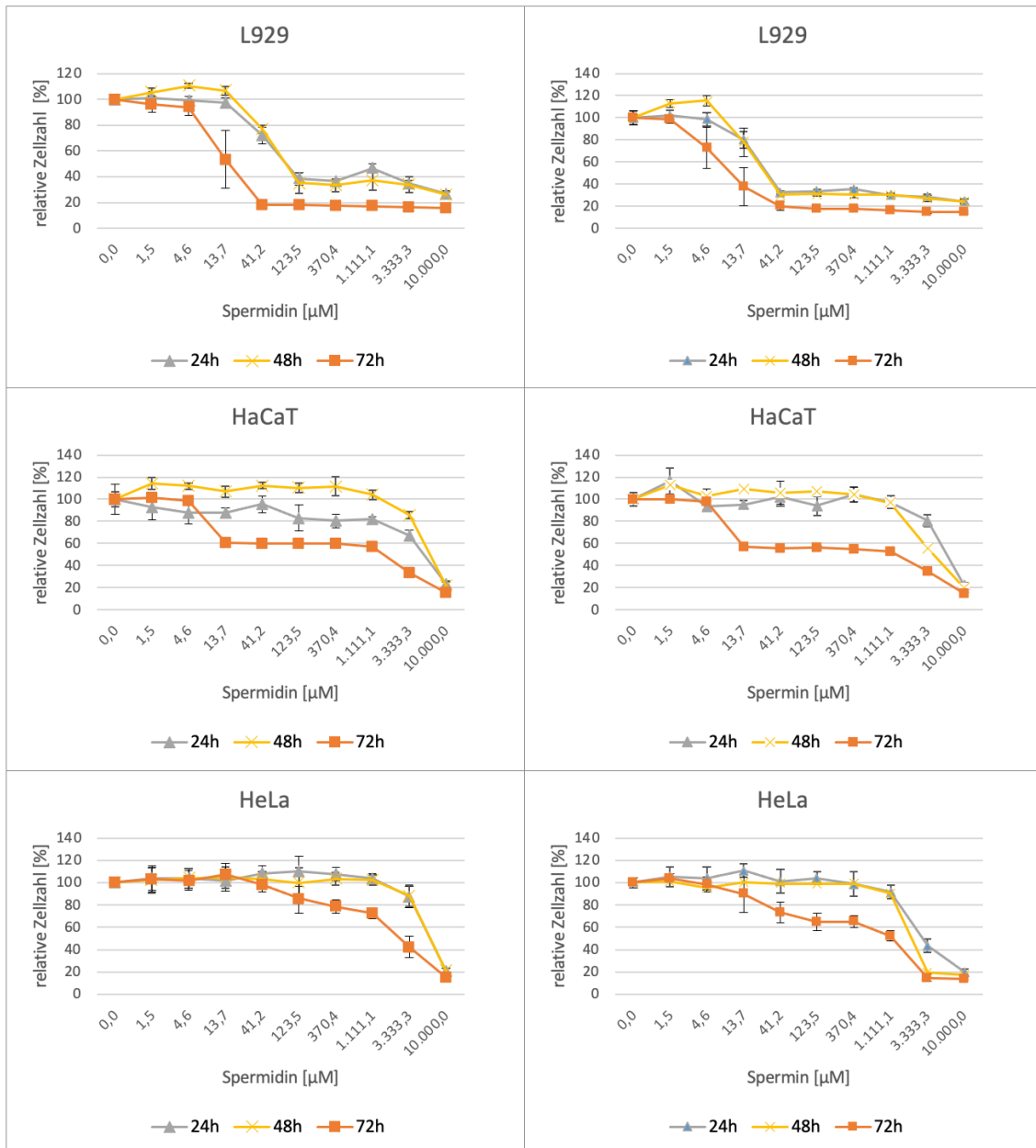


Abbildung 5: Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT und HeLa nach Spermidin-/Spermin-Inkubation. Jeweils 10.000 Zellen pro Well wurden in einer 96-Well-Platte, wie im Methodenteil beschrieben, ausgesät und am Folgetag mit den Wirkstoffen Spermidin und Spermin in absteigender Konzentration (log3-Verdünnung) inkubiert. Die Proliferation wurde nach einem, zwei und drei Tagen analysiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit der Kristallviolett-Färbung. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchsreihen (n=3).

Aus den erstellten Graphen wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt, um die Wirkung auf die einzelnen Zelllinien sowie die Effizienz der Wirkstoffe vergleichen zu können. Die IC_{50} ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 12: Mittlere inhibitorische Konzentration nach 72 h Inkubation. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Es wurden mittels Excel die Mittelwerte der Messungen sowie die Standardabweichungen bestimmt und die Gesamtergebnisse in einem Liniendiagramm zusammengefasst. Die IC_{50} wurde graphisch ermittelt.

Zelllinie	Konzentration in μ M Spermidin	Spermin
L929	12	9
HaCaT	1100	13,7
HeLa	2000	850

Mit zunehmender Inkubationsdauer waren geringere Konzentrationen notwendig, um die Zellviabilität auf 50 % zu reduzieren. Spermidin zeigte im Gegensatz zu Spermin höhere IC_{50} -Werte. Die murine Zelllinie L929 reagierte auf beide Wirkstoffe deutlich sensitiver als die beiden humanen Zelllinien. Insgesamt waren mit steigender Konzentration stufenweise sinkende Zellzahlen bei HaCaT und HeLa zu beobachten, jedoch führte bei L929 bereits eine vergleichsweise geringe Konzentration zu einem massiven Einbruch der Zellzahlen, die bei weiterer Konzentrationssteigerung auf diesem niedrigen Niveau stagnierten. Dieser Effekt ließ sich am deutlichsten nach 72 h beobachten (Abbildung 5). Die Inkubation mit Spermidin oder Spermin zeigte somit bei allen Zelllinien einen eindeutig antiproliferativen Effekt.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Kontrollen für die Zelllinien L929, HaCaT und HeLa mit reinem DMSO mit einer Startkonzentration von 10 mM in Medium sowie mit den in destilliertem Wasser gelösten Wirkstoffen Spermidin und Spermin durchgeführt, um aufzuzeigen, ob die Ergebnisse allein auf die Wirkstoffe oder aber auch auf das verwendete Lösungsmittel zurückzuführen sind. Diese Kontrollen zeigten, dass die reinen Wirkstoffe eindeutig antiproliferative Effekte auf die Zellen hatten und somit unabhängig von ihrem Lösungsmittel wirken. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, zeigten sich die Auswirkungen der Wirkstoffe bereits bei geringen Konzentrationen und in unterschiedlichem Ausmaß, wohingegen bei reinem DMSO nur Effekte bei sehr hohen Konzentrationen beobachtet werden konnten. Während sich Spermin erneut als potenter erwies, waren bei Spermidin höhere Konzentrationen nötig, um die Zellen zu dezimieren. Somit zeigten die Ergebnisse aus den Versuchen mit den in DMSO und den in destilliertem Wasser gelösten Wirkstoffen ähnliche Trends auf. Zwar ließen sich die antiproliferativen Effekte bis zu einer bestimmten Konzentration allein auf die Wirkstoffe und nicht auf das Lösungsmittel DMSO zurückführen, jedoch schien das Lösungsmittel bei Maximalkonzentration (10.000 μ M) eine zytotoxische Wirkung zu haben, sodass die Werte bei dieser Konzentration vernachlässigt werden können.

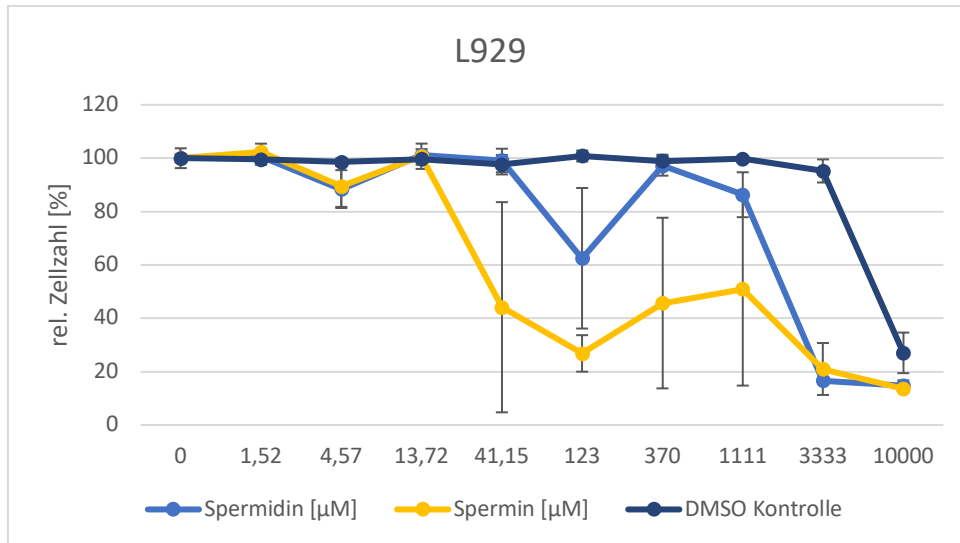


Abbildung 6: Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 nach Spermidin-/Spermin-Inkubation (gelöst in destilliertem Wasser) bzw. unter Kontrollbedingungen (DMSO-Inkubation). Jeweils 10.000 Zellen pro Well wurden in einer 96-Well-Platte, wie im Methodenteil beschrieben, ausgesät und am Folgetag mit den Wirkstoffen Spermidin und Spermin in absteigender Konzentration (log₃-Verdünnung) inkubiert. Zur Kontrolle erfolgte außerdem eine Inkubation mit DMSO in der gleichen Konzentration wie in der Verdünnungsreihe der Wirkstoffe. Die Proliferation wurde nach drei Tagen analysiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit der Kristallviolett-färbung.

3.1.2 Optische Analyse der Zellviabilität

Die Zellen wurden am Mikroskop auf ihre Morphologie und Viabilität untersucht. Ziel war es, durch die einfache optische Kontrolle Hinweise zu erhalten, ob die Zellen lediglich in ihrem Wachstum gehemmt wurden oder ob hohe Konzentrationen der reinen Wirkstoffe Spermidin oder Spermin zum Zelltod führen. Die folgenden Bilder wurden mit dem Hellfeldmikroskop EVOS XL aufgenommen und zeigen die Zelllinie L929 nach 72-stündiger Inkubation mit Spermidin oder Spermin in den Konzentrationen 10 mM; 3,33 mM und 1,11 mM. Die Abbildungen 7B bis 7G verdeutlichen die Veränderung der Morphologie der Zellen bei steigenden Spermidin-/Spermin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Während in Bild 7A ein Zellverbund an ausgebreiteten, leicht spindelförmigen Fibroblastenzellen zu sehen ist, sind in Abbildung 7B und 7C bei den höchsten Wirkstoffkonzentrationen nur noch einzelne, verkleinerte, abgerundete und im Wesentlichen nicht mehr adhärenente Zellen zu erkennen. Vor allen Dingen das Abkugeln der Zellen ist ein starkes Indiz für einen bevorstehenden Zelltod. Somit wird ersichtlich, dass die Höchstkonzentrationen nicht nur die Proliferation begrenzten, sondern die Zellen wahrscheinlich in den Zelltod gingen. Bei einer Konzentration von 1,11 mM und niedriger waren die Zellen hingegen nur in ihrer Proliferation gehemmt (7F und 7G).

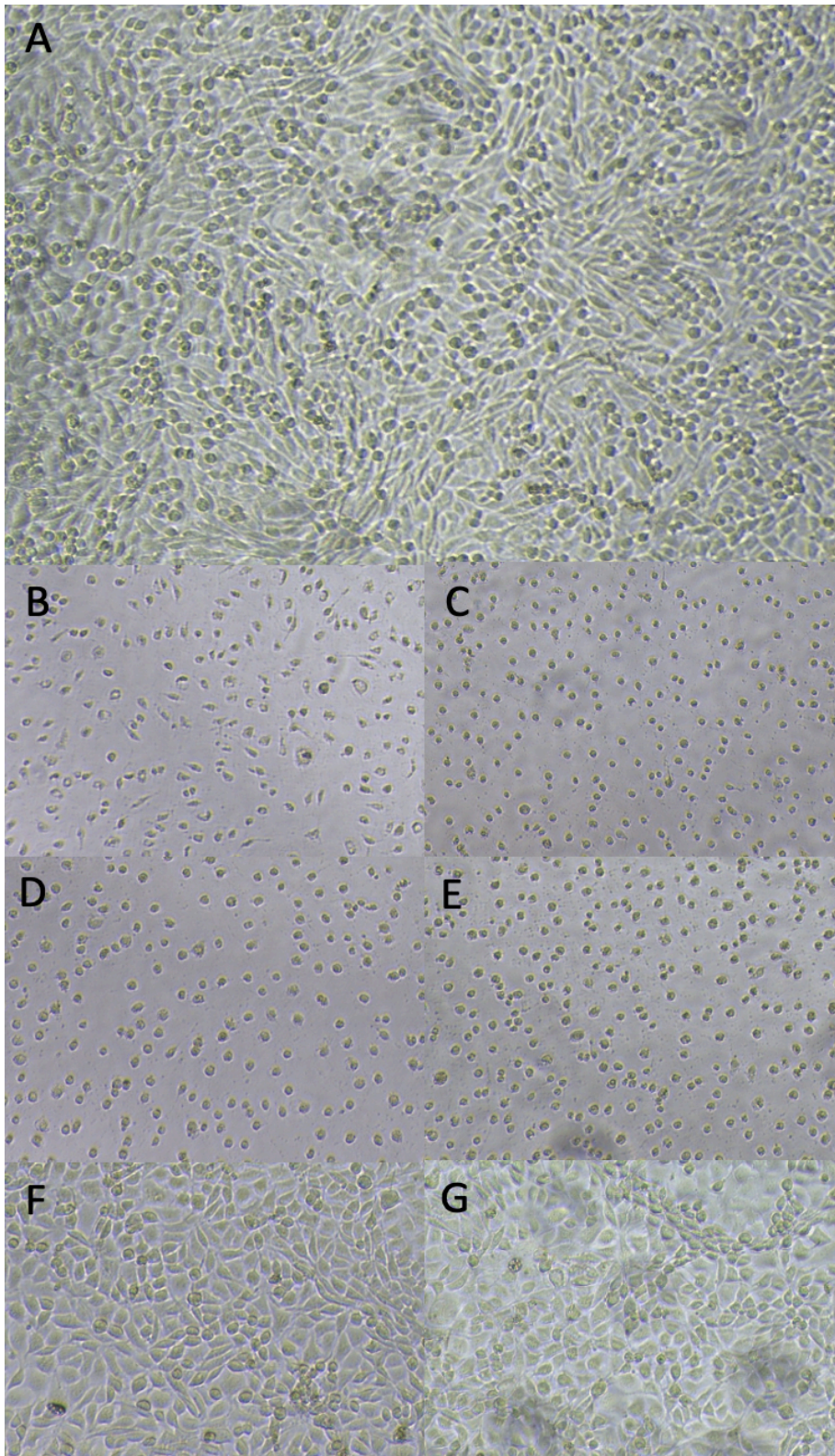


Abbildung 7: L929 unter dem Mikroskop. 10.000 Zellen/Well wurden für drei Tage mit Spermidin bzw. Spermin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. A: Kontrolle (L929 ohne Stimulation); B: 10 mM Spermidin; C: 10 mM Spermin; D: 3,33 mM Spermidin; E: 3,33 mM Spermin; F: 1,11 mM Spermidin; G: 1,11 mM Spermin.

3.1.3 Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25 unter Einfluss von Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin

Nachdem sich bei den verwendeten Modellzelllinien L929, HaCaT und HeLa eindeutige Aussagen über den Einfluss der biogenen Polyamine Spermidin und Spermin auf das Proliferationsverhalten ableiten ließen, sollten die Versuche mit weiteren Zelllinien einschließlich der humanen HNSCC-Zelllinien SCC9 und SCC25 durchgeführt werden, um aufzuzeigen, ob sich bei diesen ähnliche Effekte zeigen. Zudem sollten auch die Spermidin-Vorstufen Putrescin und N-Acetylputrescin in die Versuche einbezogen werden, um herauszustellen, ob sie eine ähnliche Wirkung auf die Viabilität der Zellen haben.

Es wurden Zellviabilitätsassays genutzt, um das Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien (L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25) nach der Stimulation mit Spermidin, Spermin, Putrescin oder N-Acetylputrescin zu analysieren. Jeweils 10.000 Zellen/Well der Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25 wurden ausgesät und mit Spermidin, Spermin, Putrescin oder Acetylputrescin für 72 h mit einer log₂-Verdünnungsreihe inkubiert und anschließend mittels Kristallviolett-Assay ausgewertet. In der folgenden Abbildung werden die Ergebnisse veranschaulicht:

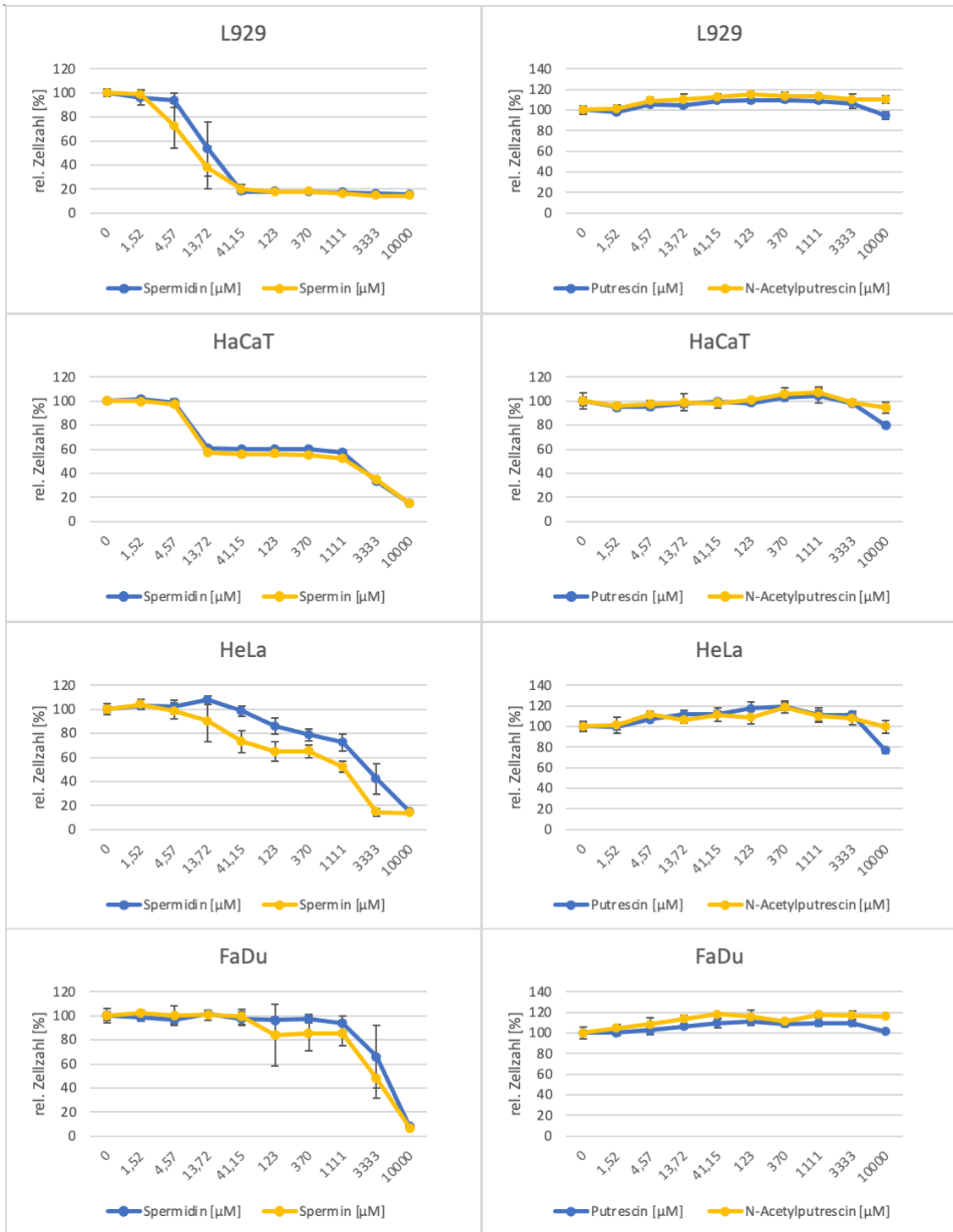




Abbildung 8: Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien nach Inkubation mit Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin. Die Zelllinien L929, HaCaT, HeLa, FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25 wurden mit 10.000 Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät, am Folgetag mit den Wirkstoffen stimuliert und für drei Tage inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die Quantifizierung der relativen Zellzahl. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und in den Abbildungen zusammengefasst (n=3).

Während die Zellzahlen nach Spermidin-/Spermin-Inkubation mit zunehmender Konzentration sanken, zeigten sich nach N-Acetylputrescin-Inkubation keine sinkenden Zellzahlen, sondern bei manchen Zelllinien sogar geringfügig proliferationssteigernde Effekte, wohingegen Putrescin bei sehr hohen Konzentrationen eine leicht antiproliferative Wirkung zu haben schien. Die leicht proliferative Wirkung N-Acetylputrescins bei Maximalkonzentration ist insbesondere bei FaDu, Detroit 562 und SCC25 in Abbildung 8 erkennbar.

Die Zellzahl verringerte sich unter Zugabe Putrescins bei HeLa um 24 %, HaCaT um 20 %, SCC9 um 11 %, SCC25 um 9 %, L929 um 6 % sowie bei Detroit 562 und FaDu um 0 %. Putrescin und N-Acetylputrescin erwiesen sich im Gegensatz zu Spermidin und Spermin als keine potenten Stoffe hinsichtlich der Inhibition der Proliferation.

3.2 Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa unter dem Einfluss von Glutamin

Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern die Zellen einen Mangel an Glutamin kompensieren können, welchen Einfluss die Glutamin-Restriktion auf ihr Proliferationsverhalten hat und ob die Zellen trotz Glutamin-Restriktion einen längeren Zeitraum überleben können. Aminosäuren und ihre Metaboliten sind sehr bedeutsam für den Stoffwechsel und erfüllen lebenswichtige Aufgaben als Bausteine von Proteinen und Enzymen. Bei der Restriktion bestimmter Aminosäuren kann der Wechsel in den LEM stattfinden (Kapitel 1.1.5 Methionin-Restriktion). Der LEM zeichnet sich u. a. durch eine Reduktion von Wachstum und Proliferation sowie eine Steigerung der Reparaturvorgänge in den Zellen aus. Um den LEM zu induzieren, kann die Restriktion einer einzigen Aminosäure ausreichend sein. Insbesondere die Restriktion der Aminosäure Methionin ist gut erforscht. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Methionin-Restriktion und ihre Auswirkung auf die Proliferation und den Metabolismus an der murinen Modellzelllinie L929 untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Glutamin-Restriktion in L929 und HeLa genauer zu untersuchen.

3.2.1 Proliferationsverhalten unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von drei Tagen

In Vorversuchen wurden zum besseren Vergleich und für die Bewertung der unterschiedlichen Messmethoden Proliferationsassays mit der bereits beschriebenen Kristallviolett-Färbung durchgeführt. Jeweils 10.000 Zellen der Zelllinien L929 oder HeLa wurden pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und ausgehend von einer Startkonzentration von 2 mM Glutamin (entspricht der Standardkonzentration im entsprechenden Vollmedium) eine log₃-Verdünnungsreihe erstellt sowie die relativen Zellzahlen nach 72 h bestimmt. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, führte die Senkung der Glutamin-Konzentration zu sinkenden relativen Zellzahlen. Ausgehend von 2 mM als Kontrollwert (100 %) sanken die relativen Zellzahlen auf etwa 60 %. Es fiel auf, dass die Zellen das fehlende Glutamin in einem Bereich von 74–0 µM über den Zeitraum von 72 h kompensieren konnten, da es in diesem Konzentrationsbereich zu keiner weiteren Senkung der Proliferation kam. Erwähnenswert ist zudem, dass die Zellen über den

untersuchten Zeitraum sogar einen völligen Glutaminentzug überlebten. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse.

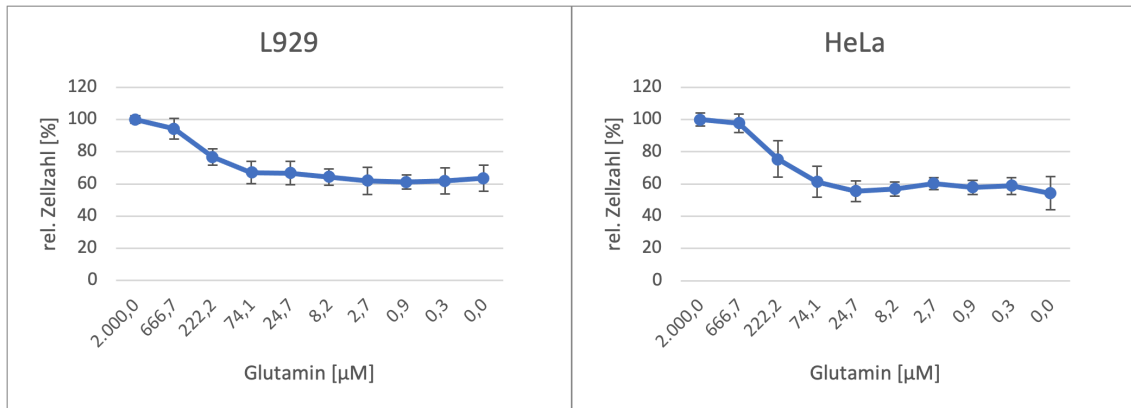


Abbildung 9: Einfluss von Glutamin auf das Proliferationsverhalten von L929 und HeLa. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kristallviolett-Assays mit Glutamin. Ausgehend von der Startkonzentration 2 mM wurde eine Glutamin-log₃-Verdünnungsreihe angefertigt. Die Zellen wurden nach drei Tagen Inkubation quantifiziert und der Versuch insgesamt dreimal durchgeführt. Die gemittelten Ergebnisse sind in den Abbildungen zusammengefasst (n=3).

3.2.2 Proliferationsverhalten unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen

Weiterhin wurden Proliferationsstudien mithilfe des hochauflösenden Digitalmikroskops Pico durchgeführt, welches mittels einer Software die automatisierte Bestimmung der absoluten Zellzahl ermöglichte. Mit dem Digitalmikroskop konnte neben der Bestimmung der absoluten Zellzahl parallel auch eine Kontrolle der Morphologie der analysierten Zellen durchgeführt werden. Die Zellzahlen der Zelllinien L929 und HeLa wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen in einer log₃-Verdünnungsreihe mit Glutamin bestimmt. Die erste Messung (0 h) wurde vor der Stimulation zur Bestimmung der Zellzahl bei Versuchsbeginn durchgeführt. Ziel dieser Proliferationsstudien war es, eine geeignete Konzentration Glutamins für die massenspektrometrischen Analysen zu finden. Dabei sollte eine möglichst geringe Konzentration herausgearbeitet werden, bei der jedoch sichergestellt ist, dass die Zellen nicht absterben. Die folgende Abbildung verdeutlicht das Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa unter Glutamin-Restriktion.

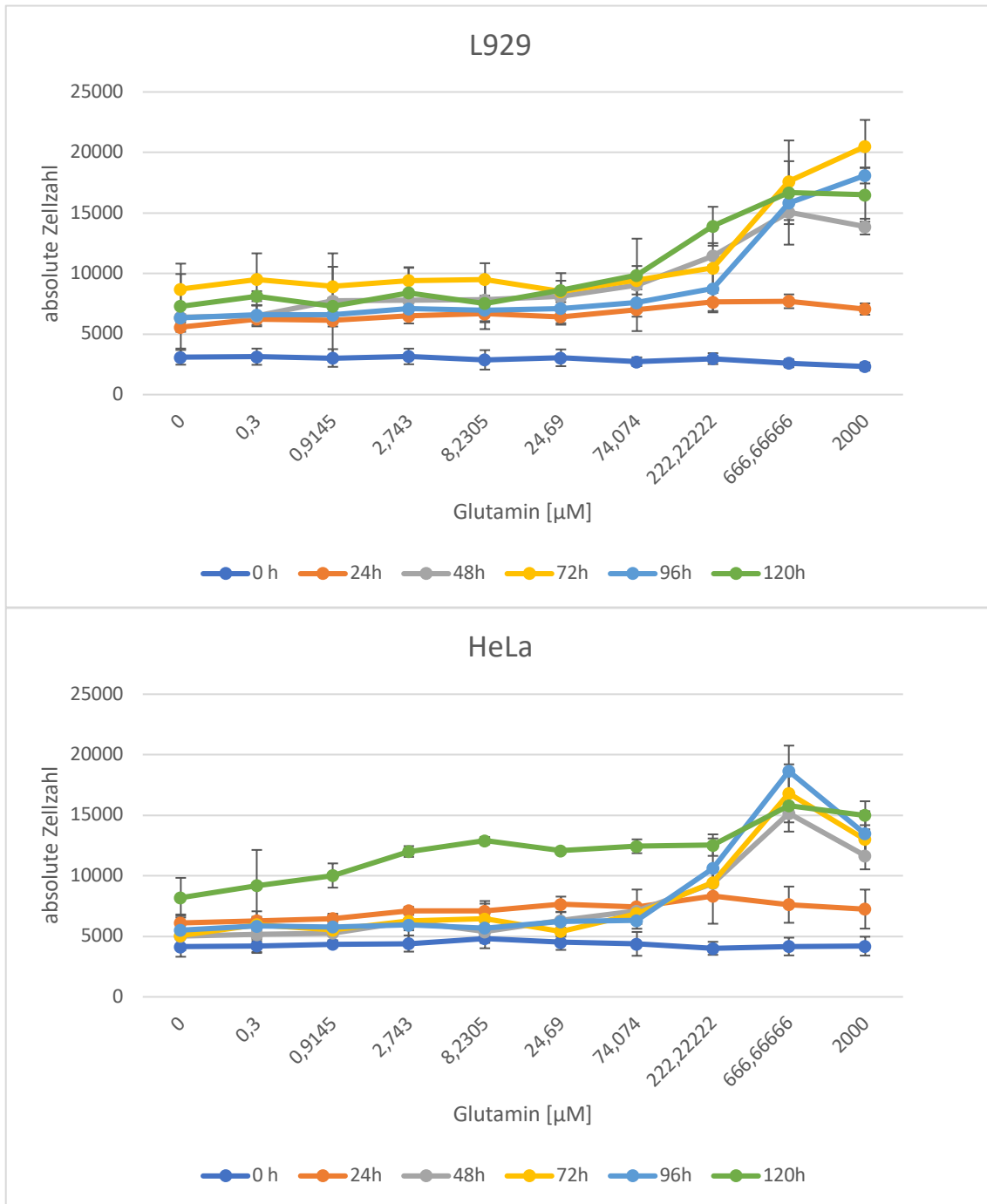


Abbildung 10: Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa unter Glutamin-Restriktion. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 h mit Glutamin in einer log₃-Verdünnung stimuliert und nach einem, zwei, drei, vier und fünf Tagen mit dem Digitalmikroskop quantifiziert. Dargestellt ist jeweils die Zusammenfassung der drei durchgeführten Versuche (n=3).

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, fand bei sinkender Glutamin-Konzentration weniger Proliferation statt. Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Inkubationsdauer. Während nach 24 h noch keine Veränderungen zu sehen waren, zeigten sich ab 48 h

Inkubationsdauer deutlich antiproliferative Effekte unter Glutamin-Restriktion. Weiterhin geht aus den Ergebnissen hervor, dass die Zellen selbst nach 120 h Inkubationsdauer unter Glutamin-Restriktion proliferierten. Somit wurde ein Mangel an Glutamin deutlich besser toleriert als ein Mangel an Methionin. Die Zellzahl-Minima lagen bei beiden Zelllinien bei 0 μM Glutamin, während die Zellzahl-Maxima nach 72 h bzw. 96 h bei den Zellen mit den höchsten Glutamin-Konzentrationen (666 μM bzw. 2000 μM) gemessen wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Zellen unter Glutamin-Restriktion deutlich weniger Proliferation stattfand, sie jedoch auch nicht abstarben. Dies galt es im Wesentlichen herauszuarbeiten, um eine geeignete Konzentration für die LC-MS zu finden. Somit stellte sich eine Konzentration von 0 μM für die Versuche mit dem Massenspektrometer als sinnvoll heraus, um die zellulären Prozesse unter Glutamin-Restriktion genauer zu untersuchen und gleichzeitig den Zelltod zu verhindern.

3.3 Analysen der Autophagie-Induktion unter Methionin-Restriktion und Spermidin-/Spermin-Inkubation

In den folgenden Experimenten wurden erste Analysen der Autophagie unter Methionin-Restriktion bzw. nach Spermidin- und Spermin-Behandlung in den Zelllinien L929 und HeLa durchgeführt, und zwar mithilfe der Autophagie-assoziierten Proteine p62, LC3B und Atg5. Als Standard wurde das Haushaltsgen Tubulin verwendet.

Lipidkonjugiertes LC3B stellt eine Möglichkeit zum Nachweis der Autophagie dar. Da zytosolisches LC3B-I mit PE zu LC3B-II konjugiert wird und das entstandene LC3B-II in die Autophagosomenmembran gelangt, dient LC3B-II als Autophagosomen-Marker (Klionsky et al., 2016). Sobald im weiteren Verlauf der Autophagie das Autophagosom mit dem Lysosom verschmilzt, wird auch LC3B-II abgebaut. Demnach gibt es zwei Möglichkeiten der Interpretation einer erhöhten LC3B-II-Bande im Western Blot. Bei der Hemmung der Autophagie wird die Verschmelzung der Autophagosomen mit den Lysosomen und somit der Abbau der Autophagosomen gehemmt, sodass LC3B-II in den Membranen akkumuliert. Andererseits kann eine starke LC3B-II-Bande auch auf einen erhöhten autophagischen Fluss schließen lassen, da vermehrt Autophagosomen entstehen und sich somit auch mehr LC3B-II in den Membranen detektieren lässt. Beide Varianten sind möglich und es bedarf daher der Untersuchung weiterer Proteine wie etwa p62, die mit der Autophagie in Verbindung stehen, um eine eindeutigere Aussage zu treffen. Durch das unterschiedliche Molekulargewicht der beiden Formen LC3B-I und LC3B-II können zwei Banden detektiert werden, wobei LC3B-I ein Molekulargewicht von

16–18 kDa und LC3B-II von 14–16 kDa aufweist. Anhand der Umwandlungsrate von LC3B-I in LC3B-II kann auf die autophagische Aktivität geschlossen werden.

Um erste Hinweise auf einen autophagischen Fluss zu erhalten, wurde mit der Detektion von LC3B-II bei HeLa-Zellen begonnen. Eine Ladekontrolle wurde mit Tubulin durchgeführt. Als Positivprobe wurde Chloroquin herangezogen, welches bei HeLa-Zellen in einer Konzentration von 100 μM die Autophagosomen-Lysosomen-Fusion hemmt. Abbildung 11 verdeutlicht den Anstieg von LC3B-II in den mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin (100 μM) behandelten Proben sowie nach 48 h in der Kontrolle (Bande zwei und vier). Die schwächste Bande zeigte sich nach 24-stündiger Methionin-Restriktion an Position fünf.

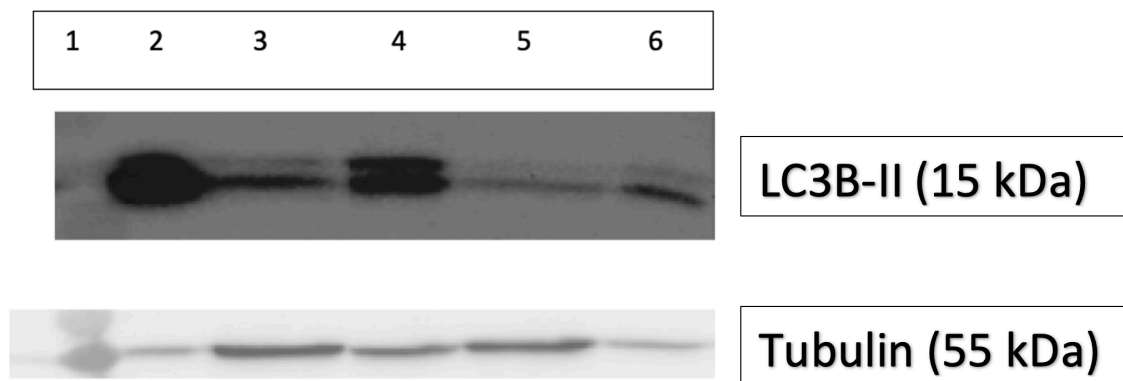


Abbildung 11: Ergebnisse Western Blot LC3B bei HeLa. 1: Marker; 2: Chloroquin 48 h; 3: Vollmedium 24 h; 4: Vollmedium 48 h; 5: Methionin– 24 h; 6: Methionin– 48 h

Der Western Blot in Abbildung 12 stimmt mit diesen Ergebnissen überein und zeigt HeLa-Zellen, die unter Methionin-Restriktion bzw. in Vollmedium inkubiert wurden. Detektiert wurden erneut LC3B-II sowie Tubulin als Ladekontrolle. Die stärksten LC3B-II-Banden wurden nach 24 h und 48 h in der Kontrolle detektiert (Bande zwei und vier). Bei gleich starker Tubulin-Bande in allen HeLa-Proben waren die schwächsten LC3B-II-Banden nach 24- und 48-stündiger Methionin-Restriktion an Position drei und fünf messbar. Anhand dieser Ergebnisse konnten erste Rückschlüsse auf eine mögliche Autophagie-Inhibition unter Kontrollbedingungen und eine Autophagie-Induktion durch Methionin-Restriktion gezogen werden. Um weitere Indizien für einen gesteigerten autophagischen Fluss unter Methionin-Restriktion zu finden, wurden weitere Autophagie-assoziierte Proteine in den Proben detektiert.

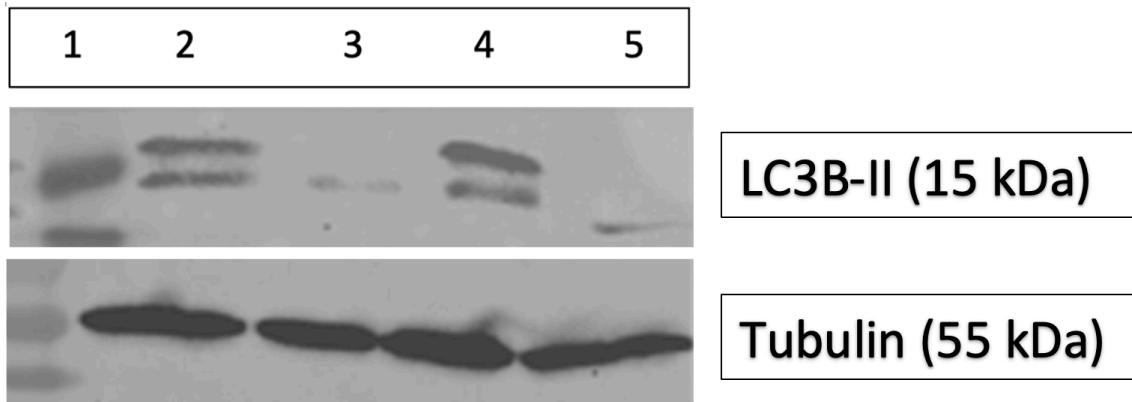


Abbildung 12: Ergebnisse Western Blot LC3B bei HeLa. 1: Marker; 2: Vollmedium 24 h; 3: Methionin– 24 h; 4: Vollmedium 48 h; 5: Methionin– 48 h

Da wie bereits erwähnt LC3B-II allein nicht ausreicht, um den autophagischen Fluss zu bestimmen, wurde p62 als ein weiteres Autophagie-assoziiertes Protein detektiert. Das Protein p62 kann als Marker für Autophagie eingesetzt werden, da es während der Autophagie abgebaut wird und daher eine Akkumulation beobachtet werden kann, wenn die Autophagie gehemmt wird (Bjørkøy et al., 2009). So zeigten sich bei den durchgeführten Western Blots mit L929 und HeLa starke Banden bei der Positivprobe mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin, da p62 akkumulierte (Abbildung 13 und 14). Die zweitstärksten p62-Banden waren bei HeLa an den Positionen drei, vier und fünf erkennbar. Hier schien die Autophagie ebenfalls gehemmt zu sein. Dagegen waren die schwächsten Banden sowohl bei L929 als auch bei HeLa nach 48-stündiger Methionin-Restriktion zu beobachten. Trotz schwächerer Tubulin-Bandenstärke bei den HeLa-Zellen an Position zwei und sechs, konnte für p62 eine ähnliche Bandenstärke bei den Proben auf Position zwei, drei, vier und fünf detektiert werden und eine im Vergleich dazu deutlich schwächere Bande nach 48-stündiger Methionin-Restriktion (Position sechs). Es ist somit von einer erhöhten autophagischen Aktivität bei den HeLa-Zellen nach 48-stündiger Methionin-Restriktion auszugehen.

Die folgenden beiden Abbildungen veranschaulichen die Expression von Atg5, p62 und dem Haushaltsgen Tubulin bei den Zelllinien L929 und HeLa.

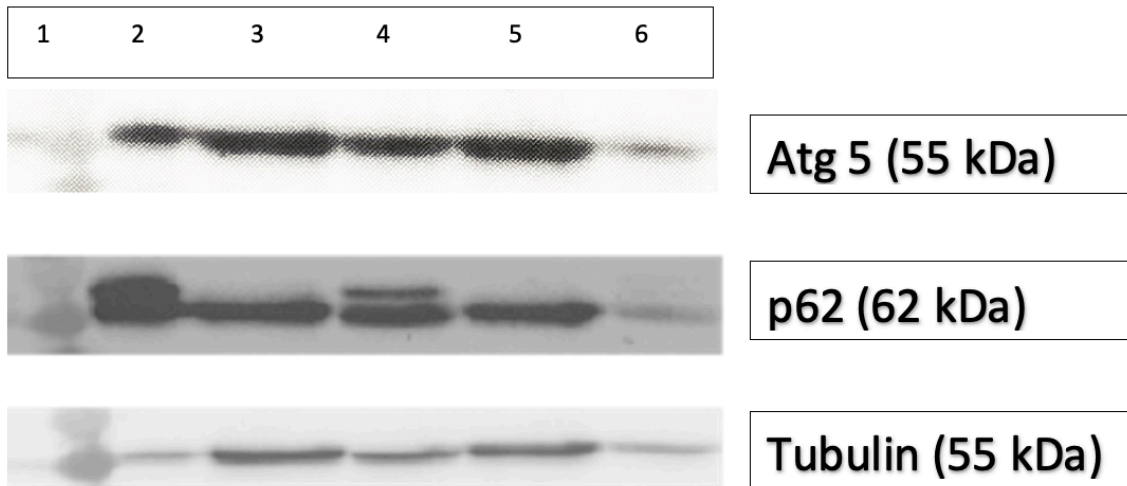


Abbildung 13: Ergebnisse Western Blot Atg5, p62 und Tubulin bei HeLa. 1: Marker; 2: Chloroquin 48 h; 3: Vollmedium 24 h; 4: Vollmedium 48 h; 5: Methionin- 24 h; 6: Methionin- 48 h

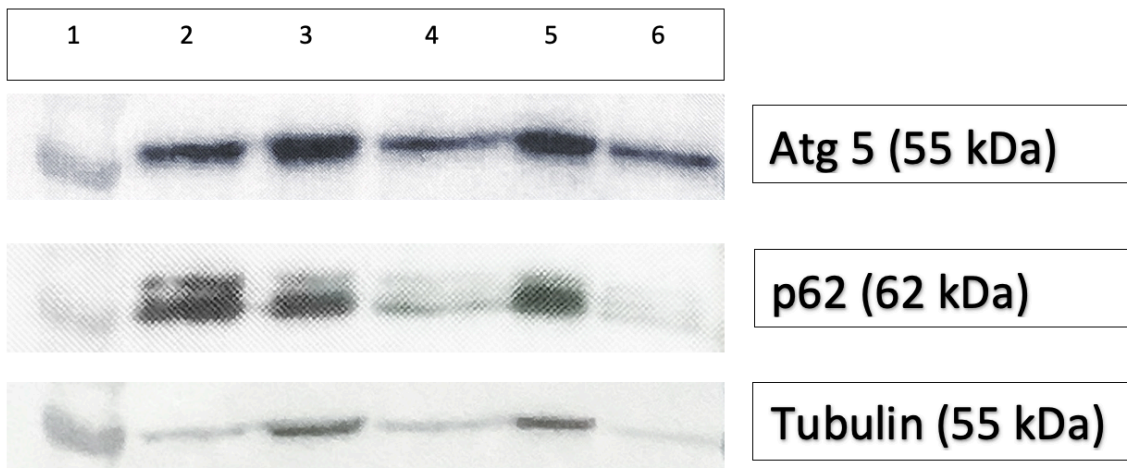


Abbildung 14: Ergebnisse Western Blot Atg5, p62 und Tubulin bei L929. 1: Marker; 2: Chloroquin 48 h; 3: Vollmedium 24 h; 4: Vollmedium 48 h; 5: Methionin- 24 h; 6: Methionin- 48 h

Das autophagiebezogene Protein Atg5 wird auch als „Wächter der Immunintegrität“ bezeichnet, da es nicht nur an der autophagischen Vesikelbildung, sondern auch am Schutz vor oxidativen Schäden, der Regulierung der antiviralen Immunantwort, der Lymphozytenentwicklung, Antigenpräsentation und Apoptose beteiligt ist (Ye et al., 2018, Pierdominici et al., 2012). Durch den Atg12-Atg5 Komplex erfolgt die Konjugation von LC3-I mit PE, sodass LC3-II entsteht (Pierdominici et al., 2012).

Aufgrund der unterschiedlichen Bandenstärke des Haushaltsgens Tubulin sowohl bei L929 als auch bei HeLa sind auch die Atg5-Banden unterschiedlich stark, da sich

stärkere Atg5-Banden bei stärkeren Tubulin-Banden zeigten. Eine Regulation von Atg5 ist anhand der Banden nicht signifikant erkennbar.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Western Blots mit HeLa-Zellen unter Einfluss von Spermidin und Spermin ersichtlich. Die Ladekontrolle zeigt, dass in allen Proben die gleichen Proteinmengen Tubulin detektiert wurden. Der Western Blot sollte daher eindeutig zu interpretieren sein. Die stärksten Banden waren eindeutig bei den Positivkontrollen mit Chloroquin erkennbar (Bande zwei und sechs). Unter Einfluss von Spermidin bzw. Spermin zeigen sich keine wesentlichen Veränderungen. Diese Ergebnisse zeigten sich auch in weiteren Western Blots mit Proben von L929- und HeLa-Zellen unter Spermidin- und Spermin-Inkubation.

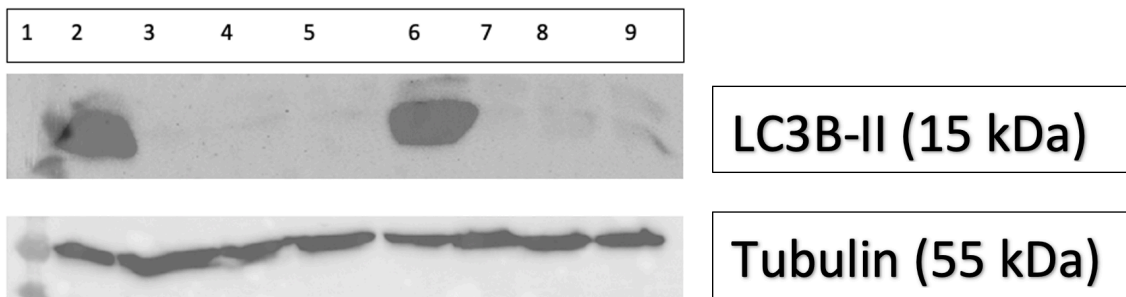


Abbildung 15: Ergebnis Western Blot LC3B und Tubulin bei HeLa. 1: Marker; 2: Chloroquin 24 h; 3: Vollmedium 24 h; 4: Spermidin 24 h; 5: Spermin 24 h; 6: Chloroquin 48 h; 7: Vollmedium 48 h; 8: Spermidin 48 h; 9: Spermin 48 h

3.4 Analyse des metabolischen Profils der murinen Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion mittels Massenspektrometrie (LC-MS)

Die murine Fibroblastenzelllinie L929 zeichnet sich durch ein adhärentes und schnelles Wachstum aus. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die murine Zelllinie L929 bereits als Modellsystem u. a. für die Analyse des Metaboloms via LC-MS etabliert, da die Zellen schnell auf eine Methionin-Restriktion reagierten (Schmitz et al., 2021). Auch für die hier durchgeführte Untersuchung der metabolischen Veränderungen durch eine Glutamin-Restriktion über fünf Tage boten sich die L929-Zellen an.

Ziel war es, den Einfluss der Glutamin-Restriktion auf den Stoffwechsel der Modellzelllinie L929 mittels LC-MS zu analysieren. So wurden die L929-Zellen in glutaminhaltigem Medium und unter Glutamin-Restriktion über fünf Tage inkubiert, die Zellen als auch die Überstände in Abständen von 24 h geerntet und mittels LC-MS

analysiert. Ausgesuchte Ergebnisse sind im Folgenden in Form von Heatmaps dargestellt. Dazu wurden die analysierten Metaboliten in funktionelle oder Stoffgruppen unterteilt. Eine Gesamtübersicht mit allen Ergebnissen befindet sich im Appendix.

Die Messung und Auswertung der primären Daten erfolgte durch Herrn Dr. Werner Schmitz in der Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg. Die Messergebnisse wurden als prozentuale Werte angegeben. Der erste Messwert der Kontrolle nach 24 h unter Vollmedium wurde als 100 % und alle anderen Werte in Relation zu diesem ersten Wert gesetzt. Die Heatmap verdeutlicht die Veränderungen mit den entsprechenden Farben und Farbabstufungen, deren Bedeutung jeweils unter der Heatmap dargestellt ist – von rot (höchster Wert), über weiß (mittlerer Wert) bis hin zu blau (niedrigster Wert).

3.4.1 Untersuchung metabolischer Veränderungen in der Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion über einen Zeitraum von fünf Tagen

In einer ersten Analyse wurden die Metaboliten in unterschiedlichen Gruppen zusammengefasst und somit die Veränderungen bedeutsamer Stoffwechselwege wie des Citratzyklus, des Harnstoffzyklus und der Glykolyse veranschaulicht. Dazu wurden die Massen der jeweils der Gruppe zugeordneten Metaboliten addiert und der Wert nach 24 h als 100 % definiert. So lassen sich Tendenzen in verschiedenen Stoffwechselwegen leicht erkennen, z. B. ob die Metaboliten des Citratzyklus abgesogen werden. Die folgende Übersicht (Abbildung 16) fasst die Summe der relativen Massen in 25 Gruppen zusammen und vermittelt einen ersten Eindruck über die Stoffwechsellage der Zellen unter Glutamin-Restriktion. Während die meisten Metaboliten in den einzelnen Stoffgruppen unter Glutamin-Restriktion rapide absanken, stiegen die Metaboliten des Harnstoffzyklus (Urea), die Purine sowie die Carnitine an. Die Carnitine stiegen in der Kontrolle grundsätzlich stärker an und zeigten unter Glutamin-Restriktion einen zyklischen Anstieg und schließlich eine Senkung auf 101 % am fünften Beobachtungstag. Einzig und allein im Harnstoffzyklus stiegen die Metaboliten der Zellen ohne Glutamin stärker als mit Glutamin, erreichten am dritten Tag einen Maximalwert von 435 %, in der Kontrolle am dritten Tag hingegen einen Wert von 114 %.

Bei den essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren war ein deutlicher Rückgang bis zum fünften Tag auf Minimalwerte von 46 % bzw. 48 % unter Glutamin-Restriktion zu verzeichnen, während die summierten Massen der Zellen in Vollmedium ihren Maximalwert nach 96 h mit 170 % bzw. 186 % erreichten. Somit stieg unter

Kontrollbedingungen intrazellulär das Aminosäure-Niveau bis zum vierten Tag stufenweise an und sank danach wieder ab, während es unter Glutamin-Restriktion bis zum fünften Tag immer weiter absank. Der gleiche Trend war bei den acetylierten Aminosäuren zu beobachten. Unter Glutamin-Restriktion wurden weiterhin besonders niedrige Werte bei den Polyaminen, BCAAs (branched chain amino acids), Isoprenoiden, Flavinen, Nicotinamiden, CoA-Derivaten, Metaboliten des PPP, Cholinen sowie Glutamin-Metaboliten gemessen. Die Ergebnisse werden im Folgenden genauer erläutert.

Cells	Full-Medium					Glutamine-Depleted				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Non Ess. Amino Acids	100	119	113	170	114	81	72	57	61	46
Ess. Amino Acids	100	108	112	186	134	91	80	90	80	48
Acet. Amino Acids	100	128	112	222	183	47	45	65	74	31
BCAAs	100	67	61	91	99	108	22	18	14	8
Glu-Metab.	100	134	143	218	154	41	43	38	37	22
Lys-Metab.	100	126	165	228	168	42	35	48	57	32
Trp-Metab.	100	89	124	322	188	65	69	122	93	74
Arg-Metab.	100	91	117	186	159	94	83	94	119	85
"S"-Metab.	100	132	108	216	118	80	72	60	64	62
Polyamines	100	52	88	92	9	107	11	4	14	7
Folates	100	173	151	805	284	41	16	11	32	67
Cholines	100	134	146	324	232	101	51	88	57	21
Carbohydrates	100	152	150	297	201	108	107	85	69	36
Glycolysis	100	231	136	257	151	97	81	85	77	50
PPP	100	272	106	228	93	78	55	29	48	17
TCA	100	127	110	153	139	138	63	45	36	26
Urea	100	398	114	144	139	403	334	435	429	348
Pyrimidines	100	282	119	517	212	56	81	71	77	42
Purines	100	627	182	2154	478	166	140	112	100	278
CoA-Deriv.	100	291	325	823	272	151	173	90	34	14
Carnitines	100	246	674	1864	2607	645	322	821	341	101
Isoprenoids	100	133	97	189	137	64	27	17	19	10
Nicotinamides	100	160	161	388	159	96	77	66	54	14
Flavines	100	152	129	332	199	19	53	29	16	13
Vitamines	100	111	132	193	207	75	71	99	93	63

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 16: Relative Mengen der 25 untersuchten Hauptgruppen unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Aminosäuren: In Abbildung 17 werden sowohl die Veränderungen der relativen Massen in den Zellextrakten (intrazellulär) als auch in den dazugehörigen Überständen (extrazellulär) dargestellt. Ein rapider Rückgang der Aminosäuren, insbesondere des Glutamins und Glutamats in den Zellen unter Glutamin-Restriktion wird deutlich. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verbraucht die mitochondriale Glutaminase eine große Menge an Glutamin zur Umwandlung in Glutamat, welches mittels Glutamatdehydrogenase zu α -Ketoglutarat verstoffwechselt wird, einem wichtigen Metaboliten des Citratzyklus. Es zeigte sich in der Auswertung der LC-MS, dass jene Zellen unter Glutamin-Restriktion eine deutlich geringere intrazelluläre Menge an Glutamat aufwiesen als die in Vollmedium inkubierten Zellen, bei welchen ein steigender Glutamatspiegel zu verzeichnen war. Während die relative Menge an Glutamat im Überstand der in Vollmedium inkubierten Zellen stark anstieg, stieg diese im glutamin-freien Medium nur sehr leicht und sank an den letzten beiden Tagen wieder ab. Der Glutamingehalt im Überstand des Vollmediums sank mit der Zeit durch den zunehmenden Verbrauch von 81 % auf 3 %, während die Zellen Glutamat nach extrazellulär sezernierten, sodass der Glutamatgehalt extrazellulär im Vollmedium von 176 % auf 223 % am vierten Tag anstieg. Aus Glutamin können neben Glutamat auch Alanin und Aspartat gebildet werden. Alanin sank intrazellulär unter Glutamin-Restriktion auf ein Minimum von 32 % am fünften Tag, während es in der Kontrolle bis auf 198 % am vierten Tag anstieg. Weiterhin trägt Glutamat zur Bildung von Prolin, Ornithin und Arginin bei. Es zeigte sich bei den Zellen unter Glutamin-Restriktion ein stufenweiser Rückgang an Arginin und Prolin, jedoch nicht an Ornithin (siehe Gesamtübersicht im Appendix). Neben Glutamat kann auch Asparagin aus Glutamin gebildet werden (Yoo et al., 2020). Der Asparagingehalt war unter Glutamin-Restriktion am dritten, vierten und fünften Tag geringer als unter Kontrollbedingungen. Er sank auf 61 % am fünften Tag, wohingegen er in der Kontrolle auf 146 % am vierten Tag anstieg. Am gravierendsten waren die Unterschiede bei der Aminosäure Cystein, deren relative Menge unter Kontrollbedingungen bis zum vierten Tag auf 352 % anstieg, wohingegen die Masse unter Glutamin-Restriktion auf 40 % zurückgegangen war. In der folgenden Abbildung sind die intra- und extrazellulären Veränderungen des Aminosäuregehalts dargestellt.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Non-Ess. Amino Acids	Alanine	100	118	100	198	116	80	63	46	48	32
	Arginine	100	107	102	141	115	71	55	61	56	40
	Asparagine	100	99	109	146	109	128	113	93	99	61
	Aspartate	100	109	71	99	58	79	46	36	53	61
	Cysteine	100	218	211	352	214	65	70	43	40	48
	Glutamate	100	112	104	156	101	28	32	32	34	29
	Glutamine	100	100	117	136	111	3	3	2	2	2
	Glycine	100	131	137	214	131	135	99	78	95	51
	Proline	100	116	103	157	103	85	79	61	64	42
	Serine	100	91	76	101	73	119	111	69	82	68
	Tyrosine	100	103	109	166	124	100	120	105	103	75
Ess. Amino Acids	Histidine	100	116	121	146	134	129	64	58	53	27
	Isoleucine	100	93	96	157	126	78	82	84	94	52
	Leucine	100	97	134	238	189	77	77	132	101	67
	Lysine	100	119	75	102	78	107	75	53	74	44
	Methionine	100	95	91	124	86	60	89	76	69	44
	Phenylalanine	100	128	145	262	156	74	70	108	78	49
	Threonine	100	133	140	255	149	149	114	115	111	60
	Tryptophan	100	89	104	226	170	50	63	96	66	36
	Valine	100	102	103	162	117	97	88	84	80	57

Medium		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Non-Ess. Amino Acids	Alanine	89	107	163	174	200	86	74	66	74	73
	Arginine	102	92	79	73	59	50	45	45	44	40
	Asparagine	115	109	101	97	87	94	88	85	83	86
	Aspartate	99	105	100	99	81	113	104	103	113	118
	Cysteine	92	57	98	60	57	96	48	39	37	38
	Glutamate	176	224	228	223	188	84	85	98	80	79
	Glutamine	81	60	30	20	3	5	1	1	2	0
	Glycine	123	128	111	110	84	84	96	116	108	112
	Proline	114	107	98	94	83	72	68	69	70	70
	Serine	83	49	19	16	9	83	59	45	58	53
	Tyrosine	108	88	55	51	29	70	63	60	65	65
Ess. Amino Acids	Histidine	75	60	43	39	27	62	54	52	54	55
	Isoleucine	73	81	63	58	29	50	53	54	66	67
	Leucine	82	68	46	39	21	62	56	52	60	59
	Lysine	116	83	57	45	24	81	71	71	73	66
	Methionine	112	91	57	53	31	71	61	58	65	67
	Phenylalanine	88	76	44	39	18	63	59	55	66	68
	Threonine	74	62	42	38	25	84	79	72	73	70
	Tryptophan	83	67	28	22	1	57	52	49	60	62
	Valine	97	90	72	67	51	67	63	62	70	72

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 17: Relative Mengen der essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Nukleotidsynthese, Purine, Pyrimidine: Sichtbar wurde der Stickstoffmangel durch die sinkenden Purin- und Pyrimidin-Syntheseraten unter Glutamin-Restriktion. Die Purin- und Pyrimidinsynthese dient als Voraussetzung für die Nukleotidsynthese und ist somit von großer Bedeutung für die Proliferation. Grundsätzlich zeigten sich die Mengen an Purinen und Pyrimidinen bei den Zellen unter Glutamin-Restriktion im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Die relative Gesamtmenge der Purine stieg im Vollmedium auf einen Maximalwert von 2154 % am vierten Tag, während die Purine unter Glutamin-Restriktion zwar auch stiegen, aber dieser Anstieg im Vergleich zur Kontrolle geringfügig war (Abbildung 16). Am vierten Tag lag der Puringehalt bei 100 % und stieg am fünften Tag auf 278 % an. Dagegen war der Trend bei den Pyrimidinen noch eindeutiger zu erkennen: Hier zeigte sich unter Glutamin-Restriktion intrazellulär ein genereller Rückgang der Massen bis auf ein Minimum von 42 % am fünften Tag und im Kontrast dazu ein deutlicher Anstieg unter Kontrollbedingungen auf ein Maximum von 517 % am vierten Tag. Für die Synthese der Pyrimidinnukleotide wird zunächst Uridinmonophosphat (UMP) hergestellt, welches in der Kontrolle am vierten Tag massiv auf 1039 % anstieg (Abbildung 18). Um UMP zu gewinnen, werden insbesondere Glutamin und Aspartat benötigt. Die relativen Mengen der aus UMP hergestellten Moleküle Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) und Cytidintriphosphat (CTP) stiegen in der Kontrolle auf 1854 % bzw. 163 % am vierten Tag und sanken unter Glutamin-Restriktion signifikant auf 4 % bzw. 2 % am fünften Tag.

Zwei einzelne Vertreter der Gruppe der Purine und Pyrimidine zeigten jedoch einen völlig gegenläufigen Trend. So etwa stieg die intrazelluläre Menge an Xanthosin unter Glutamin-Restriktion deutlich stärker an als in der Kontrolle. Aber auch Guanin erreichte mit 5080 % sein Maximum am fünften Tag ohne Glutamin, während am gleichen Tag in der Kontrolle ein deutlich geringerer Wert gemessen wurde. Bei allen anderen Vertretern war der Trend zu sinkenden relativen Mengen unter Glutamin-Restriktion eindeutig erkennbar. Der gravierendste Anstieg unter Kontrollbedingungen war bei 5-Formamidoimidazol-4-Carboxamid-Ribotid (FAICAR) mit 18.658 % nach 96 h zu beobachten.

Abbildung 18 veranschaulicht den intrazellulären Rückgang der Purine und Pyrimidine unter Glutamin-Restriktion.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	100	211	125	215	171	44	18	18	17	7
	Orotate										
	Uracil	100	107	74	133	67	52	55	32	27	26
	Uridine	100	125	201	249	225	87	73	108	87	54
	UMP	100	428	74	1.039	295	113	168	55	78	39
	UDP	100	192	63	191	53	60	107	28	38	19
	UTP	100	163	68	113	17	12	14	2	3	1
	Cytosine	100	264	221	994	692	67	162	300	331	191
	Cytidine	100	266	234	1.056	745	69	174	302	347	191
	CMP	100	597	193	1.105	354	112	233	150	166	77
	CDP	100	413	102	400	69	15	31	2	17	7
	CTP	100	271	85	163	11	3	16	0	4	2
	Thymine	100	62	95	123	101	79	46	53	35	22
	dThymidine	100	75	116	142	124	117	62	80	48	29
	dTMP	100	685	79	1.854	424	56	133	12	36	4
	dTDP	100	468	52	340	23	3	2	0	1	0
dTTP	100	182	118	158	16	3	0	0	0	0	
Purines	FAICAR	100	114	445	18.658	1.664	0	0	114	0	53
	Adenine	100	1.517	287	1.705	734	160	285	266	181	95
	Adenosine	100	675	500	1.509	1.050	244	486	337	321	115
	AMP	100	732	126	1.940	467	113	226	62	76	27
	ADP	100	220	78	256	67	51	71	19	18	9
	ATP	100	159	75	130	22	21	32	4	6	2
	cAMP	100	137	14	214	17	25	3	0	0	0
	dAMP	100	2.736	0	8.210	1.535	0	79	38	0	0
	dATP										
	ADP-Glc	100	107	93	217	88	40	42	25	20	9
	Adenylosuccinate	100	3.303	48	7.625	866	1.595	43	66	0	23
	Guanine	100	2.123	184	2.193	478	234	439	154	270	5.080
	Guanosine	100	308	319	1.171	763	150	170	201	335	280
	GMP	100	653	113	1.590	419	97	140	37	50	22
	GDP	100	241	108	249	68	54	71	16	21	9
	GTP	100	166	92	105	6	6	7	0	1	0
	dGuanosine	100	401	473	1.603	1.073	94	189	462	328	226
	Inosine	100	146	282	623	403	107	78	130	142	97
	IMP	100	130	21	129	31	48	32	4	5	0
	dInosine	100	93	226	473	359	45	42	85	64	37
Hypoxanthine	100	136	234	283	280	74	86	96	67	43	
Xanthine	100	132	240	332	327	89	97	92	62	43	
Xanthosine	100	99	132	226	184	534	573	341	315	197	
Uric Acid	100	95	102	113	91	40	28	36	29	22	

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 18: Relative Mengen der Pyrimidine und Purine unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Pyrimidine sind neben der Nukleotidsynthese auch für die Synthese von Vitamin B1 (Thiamin), welches einen Pyrimidinring enthält, notwendig. Zur Bildung des im Vitamin B1 enthaltenen Pyrimidinrings trägt Glutamin somit auch bei. Auch ein erheblicher Anstieg von Thiamin in den Zellen mit glutaminhaltigem Medium auf 327 % am fünften Tag war zu erkennen, wohingegen der Thiamingehalt im glutaminfreien Medium auf 45 % am fünften Tag absank (siehe Gesamtübersicht im Appendix). In beiden Medien zeigte sich extrazellulär ein glutaminunabhängig niedriger Thiaminspiegel.

Die relative Menge des Energiespeichers ATP schwankte in den ersten vier Tagen in der Kontrolle zwischen Werten von 75 % bis 159 % und erreichte am fünften Tag ein Minimum von 22 % (Abbildung 18). Bei den Zellen unter Glutamin-Restriktion war über die Tage eins bis fünf ein dauerhaft niedriges ATP-Niveau zwischen Werten von 2 % bis 32 % zu verzeichnen, welches seinen Tiefpunkt am fünften Tag mit 2 % erreichte. Somit hatte das Vorhandensein von Glutamin auch entscheidende Auswirkungen auf das Energielevel der Zellen. Das beim ATP-Abbau entstehende AMP stieg in der Kontrolle rapide an und erreichte sein Maximum bei 1940 % am vierten Tag. Dagegen sank der AMP-Gehalt unter Glutamin-Restriktion auf ein Minimum von 27 % am fünften Tag.

Nicotinamide: Die relativen Mengen der Vertreter der Nicotinamide stiegen grundsätzlich unter Kontrollbedingungen an, während unter Glutamin-Restriktion eine gesunkene intrazelluläre Menge an Nicotinamiden zu beobachten war. Bei der Bildung von α -Ketoglutarat aus Glutamat durch die Glutamatdehydrogenase entstehen Ammonium, NADH und NADPH, welche die Spiegel der reaktiven Sauerstoffspezies kontrollieren, dem Citratzyklus zugeführt werden und die Lipidsynthese unterstützen (Altman et al., 2016). Das Coenzym NAD^+/NADH spielt insbesondere bei Redoxreaktionen eine entscheidende Rolle, da es als Elektronenakzeptor- bzw. donor die Oxidation und Energieübertragung kontrolliert ablaufen lässt. Das im Citratzyklus entstandene NADH hat zudem eine wichtige Funktion in der Atmungskette und trägt dort zur Bildung von ATP bei.

NADH, die reduzierte Form von NAD^+ , steigt von allen determinierten Nicotinamiden am drastischsten in der Kontrolle auf einen Maximalwert von 611 % am vierten Tag an, während unter Glutamin-Restriktion ein Minimum von 6 % am fünften Tag gemessen wurde. Noch deutlicher wird der Unterschied beim Vergleich der NADP^+ -Mengen am fünften Tag: Unter Glutamin-Restriktion sank der NADP^+ -Gehalt auf ein Minimum von 1 %, wohingegen am selben Tag die 134-fache Menge unter Kontrollbedingungen gemessen wurde. Die Veränderungen sind in Abbildung 19 dargestellt.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Nicotinamides	Nicotinamide	100	115	88	226	134	100	102	72	56	40
	mNAM	100	106	94	228	132	75	32	40	29	9
	NAD+	100	174	155	287	150	88	82	60	39	16
	NADH	100	139	352	611	243	136	116	141	133	6
	NADP+	100	267	113	589	134	79	54	18	15	1
	NADPH										

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 19: Relative Mengen der Nicotinamide unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Citratzyklus (TCA) und Pentosephosphatweg (PPP): Aus der Gesamtübersicht (Abbildung 16) geht ein Rückgang der summierten Massen der Metaboliten des Citratzyklus und des PPP unter Glutamin-Restriktion hervor. Die Massen der Metaboliten beider Stoffwechselwege blieben unter Kontrollbedingungen auf einem hohen Niveau und sanken unter Glutamin-Restriktion stufenweise, wobei im PPP ein Minimum von 17 % und beim Citratzyklus von 26 % am fünften Tag gemessen wurde. In den Überständen zeigten sich die Veränderungen noch deutlicher: Die Metaboliten des Citratzyklus stiegen unter Kontrollbedingungen drastisch an und blieben unter Glutamin-Restriktion nahezu gleichbleibend niedrig. Da die Unterschiede so prägnant sind, eignen sich die beiden Stoffwechselprozesse besonders gut zur Erfassung des metabolischen Fingerabdrucks der L929-Zellen unter Glutamin-Restriktion (Kapitel 3.4.2).

Abbildung 20 veranschaulicht die Veränderungen der genannten Metaboliten in den Zellen sowie in den Medienüberständen. Der Metabolit im Citratzyklus mit dem stärksten Anstieg im Überstand unter Kontrollbedingungen war Citrat mit einem Maximum von 1392 % am fünften Beobachtungstag. Weiterhin stiegen unter Kontrollbedingungen im Überstand Aconitat, α -Ketoglutarat, Fumarat und Malat rapide an, wohingegen bei Succinat ein Rückgang auf 49 % zu beobachten war. Intrazellulär zeigten sich ähnliche Trends, wobei der Anstieg hier zyklisch war und am fünften Tag bei Succinat, Fumarat und Malat die geringsten Werte gemessen wurden. Bei den Citratzyklus-Metaboliten der Zellen unter Glutamin-Restriktion wurden grundsätzlich niedrige Massen bestimmt, wobei Citrat eine Ausnahme bildete, da es intrazellulär am ersten Tag ein Maximum von

523 % erreichte und am zweiten Tag noch immer deutlich erhöht war (197 %). Ähnlich verhielt es sich mit den Massen der PPP-Metaboliten, die sich unter Glutamin-Restriktion sowohl intra- als auch extrazellulär auf einem niedrigen Niveau befanden. Gluconat stieg jedoch im Medium leicht auf 112 % am fünften Tag.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
PPP	Phosphogluconate	100	604	75	144	19	78	27	5	36	1
	Gluconate	100	115	191	411	186	69	46	69	77	46
	Pentose-5-P	100	144	126	277	140	88	71	31	44	16
TCA	Citrate	100	179	118	151	191	523	197	92	80	51
	Aconitate	100	113	141	171	252	120	57	70	42	30
	α -Ketoglutarate	100	121	109	122	123	12	13	24	20	16
	Succinate	100	108	102	150	97	68	43	41	37	31
	Fumarate	100	105	84	131	72	46	35	24	20	13
	Malate	100	138	104	194	100	58	29	19	17	12

Medium		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
PPP	Phosphogluconate	0	0	0	0	0	0	69	0	0	0
	Gluconate	78	83	87	87	90	99	99	101	108	112
	Pentose-5-P										
TCA	Citrate	154	179	468	611	1.392	82	84	109	97	88
	Aconitate	92	135	299	311	921	79	88	106	105	116
	α -Ketoglutarate	218	349	506	549	713	93	114	101	57	35
	Succinate	73	65	58	56	49	55	51	50	50	48
	Fumarate	87	101	132	135	148	99	83	83	87	87
	Malate	105	150	278	295	395	77	78	84	88	83

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 20: Relative Mengen ausgewählter Metaboliten des Pentosephosphatwegs (PPP) und des Citratzyklus (TCA) unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Laktat, Pyruvat, Alanin: Die Metaboliten Laktat, Pyruvat und Alanin stehen in einem engen metabolischen Zusammenhang. Aus den Messungen ging ein Zuwachs an Pyruvat und Laktat sowohl unter Glutamin-Restriktion als auch unter Kontrollbedingungen hervor, wobei unter Kontrollbedingungen die extrazellulären Massen stärker anstiegen und Pyruvat dabei sein Maximum am vierten Tag bei 7808 % und Laktat sein Maximum am fünften Tag bei 522 % erreichte. Der massive Anstieg der relativen Massen Pyruvats und Laktats zeigte sich in den Überständen deutlicher als

intrazellulär. Die Zellen schienen unter Kontrollbedingungen besonders große Mengen an Pyruvat und Laktat in den Extrazellularraum zu sezernieren, während unter Glutamin-Restriktion die Metaboliten in einem geringeren Maße sezerniert wurden. Die geringsten Massen wurden bei allen drei Metaboliten intrazellulär am fünften Tag unter Glutamin-Restriktion gemessen (Abbildung 21).

Medium	Full-Medium					Glutamine - Depleted				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Alanine	89	107	163	174	200	86	74	66	74	73
Pyruvate	1.320	2.949	6.611	7.808	7.490	364	323	311	374	286
Lactate	170	324	506	503	522	104	141	182	147	161

Cells	Full-Medium					Glutamine - Depleted				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Alanine	100	118	100	198	116	80	63	46	48	32
Pyruvate	100	151	111	187	149	52	46	39	34	18
Lactate	100	129	108	393	148	74	67	42	35	20

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 21: Relative Mengen der Metaboliten Alanin, Pyruvat und Laktat extrazellulär und intrazellulär unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Carnitine: Carnitin transportiert Fettsäuren in die Mitochondrien und ist daher wichtig für die Energiegewinnung. Zudem ist dafür Coenzym A (CoA), welches die Fettsäuren zu Acyl-CoA verestert und sie so transportfähig macht, von Bedeutung. Aus der Gesamtübersicht (Abbildung 16) geht ein genereller Anstieg der Carnitine sowohl unter Glutamin-Restriktion als auch unter Kontrollbedingungen hervor. Der Anstieg ist allerdings unter Kontrollbedingungen mit einem Maximum von 2607 % an Tag fünf deutlicher als unter Glutamin-Restriktion, wobei hier das Maximum an Tag drei mit 821 % gemessen wurde und danach ein Rückgang auf 101 % an Tag fünf zu verzeichnen war. Die CoA-Derivate sanken dagegen unter Glutamin-Restriktion stufenweise auf 14 % am fünften Tag, während sie am vierten Tag ihren Maximalwert bei 823 % unter Kontrollbedingungen erreichten. Die in Abbildung 22 verwendete Bezeichnung „AC“ steht für „Acylcarnitin“, die Angabe vor dem Doppelpunkt bezieht sich auf die Anzahl der C-Atome des Acylrestes und die Angabe nach dem Doppelpunkt auf

die Anzahl der Doppelbindungen. Abbildung 22 verdeutlicht, dass auch im glutaminfreien Medium die Massen von Acetylcarnitin (AC-02:0) und der übrigen Acylcarnitine deutlich stiegen, jedoch am fünften Tag teilweise stark sanken. So zeigten sich besonders hohe Werte für Acetylcarnitin am dritten Tag (1206 %), während an diesem Tag in der Kontrolle nur ein Gehalt von 529 % gemessen wurde. Weiterhin fiel der Anstieg von Isovalerylcarnitin (AC-05:0) unter Glutamin-Restriktion auf, der ebenfalls am dritten Tag sein Maximum bei 3221 % erreichte. Grundsätzlich waren die relativen Mengen der Carnitine jedoch unter Kontrollbedingungen größer und steigerten sich mit zunehmender Inkubationsdauer, wobei am fünften Tag Werte bis zu 8540 % erreicht wurden (Octanoylcarnitin, AC-08:0). Die relative Menge Octanoylcarnitins betrug somit am fünften Tag das 244-fache der Menge unter Glutamin-Restriktion. Weiterhin steigerten sich die relativen Mengen in der Kontrolle bei Butyrylcarnitin (AC-04:0) auf das 36-fache und bei Hexanoylcarnitin (AC-06:0) auf das 33-fache im Vergleich zu der am fünften Tag gemessenen Menge unter Glutamin-Restriktion. Die geringsten Massen bei den CoA-Derivaten wurden unter Glutamin-Restriktion an den letzten beiden Tagen bei Acetyl-CoA gemessen (0 %).

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
CoA-Deriv.	Pantothenate	100	108	171	229	153	86	28	74	59	23
	CoA	100	671	459	1.431	288	194	267	32	8	5
	Dephospho-CoA	100	309	420	1.222	608	155	323	235	68	29
	Ac-CoA	100	75	250	409	38	171	75	19	0	0
Carnitines	Carnitine	100	104	413	655	709	460	148	398	241	71
	AC-(02:0)	100	211	529	937	1.328	418	440	1.206	659	175
	AC-(03:0)	100	198	410	798	1.220	220	127	305	200	113
	AC-(04:0)	100	347	1.015	2.605	3.148	909	385	930	287	88
	AC-(05:0)	100	388	1.337	2.916	2.604	2.191	1.261	3.221	849	184
	AC-(05:1)	100	219	402	965	940	182	156	210	106	65
	AC-(06:0)	100	221	522	1.523	3.166	372	171	285	267	97
	AC-(06:1)	100	332	493	1.463	1.808	174	106	527	212	79
	AC-(08:0)	100	197	949	4.913	8.540	878	99	306	250	35

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 22: Relative Mengen der CoA-Derivate und Carnitine unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert. AC-(02:0): Acetylcarnitin; AC-(03:0): Propionylcarnitin; AC-(04:0): Butyrylcarnitin; AC-(05:0): Isovalerylcarnitin; AC-(05:1): Triglylcarnitin; AC-(06:0): Hexanoylcarnitin; AC-(06:1): Hexanoylcarnitin; AC-(08:0): Octanoylcarnitin

Kohlenhydrate und Glykolyse: Die Gesamtübersicht verdeutlicht den Anstieg der relativen Massen der Kohlenhydrate sowie der Metaboliten der Glykolyse unter Kontrollbedingungen und die Senkung der intrazellulär gemessenen Massen unter Glutamin-Restriktion (Abbildung 16). Am fünften Tag sank die Masse der summierten Kohlenhydrate auf 36 %, während unter Kontrollbedingungen eine Steigerung auf 201 % zu erkennen war. Die Masse der Metaboliten der Glykolyse am Tag fünf belief sich unter Glutamin-Restriktion auf ein Drittel der an Tag fünf gemessenen Masse unter Kontrollbedingungen. Somit fand unter Glutamin-Restriktion die Glykolyse in einem geringeren Maße statt. Insbesondere intrazellulär vollzog sich unter Kontrollbedingungen eine gesteigerte Produktion des Glukose-Derivats Glucosamin auf 837 % am vierten Tag (Abbildung 23), wohingegen am selben Tag nur 69 % Glucosamin bei den Zellen ohne Glutamin gemessen wurde, da der in Glutamin enthaltene Stickstoff nicht nur für die Nukleotid- und Aminosäuresynthese, sondern auch für die Glucosamin-Gewinnung eine wichtige Quelle darstellt (Yoo et al., 2020). Dabei kann Glutamin seine Aminogruppe für D-Fructose-6-phosphat zur Verfügung stellen, sodass Glucosamin-6-phosphat entsteht. Während die Metaboliten der Glykolyse unter Kontrollbedingungen anstiegen und unter Glutamin-Restriktion absanken, war bei Fructose und Aldohexose ein Anstieg sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Glutamin-Restriktion zu beobachten. Die Werte dieser beiden Stoffe lagen dabei an den ersten vier Tagen unter Glutamin-Restriktion höher als unter Kontrollbedingungen. Abbildung 23 verdeutlicht die beschriebenen metabolischen Veränderungen.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Carbohydrates	Glycerol-3-P	100	86	60	97	42	71	36	11	26	8
	Glycerate	100	184	163	223	117	176	152	125	103	54
	Glucosamine	100	226	341	837	641	93	102	78	69	74
	Glucosamine-P	100	181	197	381	306	67	52	65	73	39
	NANA	100	154	139	278	189	97	130	92	87	56
	UDP-Glc	100	134	114	240	105	82	74	74	40	11
	UDP-GlcNAc	100	129	101	195	152	175	214	164	107	30
	UDP-Glucuronate	100	121	87	127	55	100	98	70	47	17
Glycolysis	Fructose	100	86	190	210	182	295	243	367	269	162
	Aldohexose	100	73	212	163	292	128	100	263	235	218
	Hexose-P	100	127	43	213	48	77	62	20	44	20
	Fructose-1,6-P2	100	302	181	319	104	122	130	57	70	25
	Glycerol-on-P	100	119	71	193	49	49	34	8	18	6
	Diphosphoglycerate	100	665	251	649	385	38	7	14	8	1
	3-Phosphoglycerate	100	457	106	114	66	79	71	28	43	21
	Phosphoenolpyruvate	100	202	90	135	84	57	54	13	19	5
	Pyruvate	100	151	111	187	149	52	46	39	34	18
	Lactate	100	129	108	393	148	74	67	42	35	20

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 23: Relative Mengen der Kohlenhydrate und Metaboliten der Glykolyse unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Schwefel-Metaboliten: Aus der Gesamtübersicht der summierten Massen in Abbildung 16 kann entnommen werden, dass insgesamt in der Kontrolle ein Anstieg der Schwefel-Metaboliten auf 216 % am vierten Tag zu verzeichnen war und die Zellen unter Glutamin-Restriktion am dritten Tag ein Plateau bei etwa 60 % erreichten. In der folgenden Abbildung 24 ist eine Übersicht der einzelnen Schwefel-Metaboliten dargestellt. Der Trend einer allgemeinen Abnahme an Schwefel-Metaboliten unter Glutamin-Restriktion ist ersichtlich, wobei Cystin mit einem gegenteiligen Trend auffällt: Während die Massen von Cystin in der Kontrolle an den ersten vier Tagen geringfügig abnahmen, jedoch am fünften Tag auf 203 % anstiegen, stiegen die Massen intrazellulär unter Glutamin-Restriktion kontinuierlich auf bis zu 519 % am fünften Tag an.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
"S"-Metab.	Cystine	100	72	94	79	203	111	157	257	378	519
	Glutamylcysteine	100	145	98	150	66	46	44	18	18	7
	Cysteinylglycine	100	175	121	261	81	55	38	15	15	8
	GSH	100	136	79	163	48	35	20	8	7	4
	GSSG	100	110	73	125	52	38	38	17	13	3
	Cystathionine	100	144	144	199	110	76	154	26	25	19
	Taurine	100	94	111	156	108	95	53	59	99	49
	Homocysteine	100	72	77	84	55	39	49	43	42	28
	SAH	100	253	83	242	121	78	159	46	37	33
	SAM	100	132	124	627	232	207	28	73	26	19
	Methylthioadenosine	100	124	99	255	140	153	96	92	54	24
	α -Ketoglutaramate	100	133	192	255	202	23	25	61	56	33

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 24: Relative Mengen der Schwefel-Metaboliten unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Cystin und GSH: Die intra- und extrazellulären Mengen an Glutamat und Cystin sind in Abbildung 25 dargestellt, da sie ein Austauschsystem in der Zellmembran bilden und sich die unterschiedlichen Konzentrationen in den Zellen sowie im Überstand in Abhängigkeit voneinander verändern. Näheres über das Cystin/Glutamat-Antiport-System wird in der Diskussion beschrieben. Es zeigten sich genau gegenläufige Trends bei den beiden Aminosäuren: Im Überstand der Zellen unter Kontrollbedingungen blieb die Menge an Glutamat nahezu gleichbleibend hoch und die intrazelluläre Menge an Cystin in den ersten vier Tagen gering. Dagegen blieb die Menge extrazellulären Glutamats unter Glutamin-Restriktion gering und die intrazelluläre Menge Cystins stieg zunehmend. Sowohl Glutamat als auch Cystin – das Oxidationsprodukt zweier Cystein-Moleküle – beeinflussen die Synthese von GSH, welches unter Glutamin-Restriktion auf 4 % am fünften Tag sank. Das Antioxidans wird aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet. GSH stieg in der Kontrolle leicht auf 163 % am vierten Tag an und sank danach auf 48 %.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	Glutamate	100	112	104	156	101	28	32	32	34	29
	Glutamine	100	100	117	136	111	3	3	2	2	2
	Cystine	100	72	94	79	203	111	157	257	378	519
	GSH	100	136	79	163	48	35	20	8	7	4

Medium		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	Glutamate	176	224	228	223	188	84	85	98	80	79
	Glutamine	81	60	30	20	3	5	1	1	2	0
	Cystine	72	28	8	7	6	62	51	47	51	50
	GSH	35	66	43	100	45	93	53	42	30	18

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 25: Relative Mengen der Metaboliten Glutamat, Glutamin, Cystin und GSH unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Acetoacetat: Als ein Vertreter der Ketonkörper wurde Acetoacetat untersucht. Mit der Analyse der Ketonkörper kann eine Abgrenzung des LEM zum Hungerstoffwechsel erfolgen. Wie in Abbildung 26 ersichtlich, sank die intrazellulär gemessene Menge Acetoacetats unter Glutamin-Restriktion rapide auf 12 % am fünften Tag ab, während unter Kontrollbedingungen ein höheres Niveau beobachtet werden konnte.

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	Acetoacetate	100	199	132	287	175	20	31	17	22	12

<25	<50	<99	99-110	<150	<200	<300	<400	<500	>500
-----	-----	-----	--------	------	------	------	------	------	------

Abbildung 26: Relative Menge des Ketonkörpers Acetoacetat unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Die Auswirkungen der Glutamin-Restriktion auf den Stoffwechsel waren weitreichend. Es konnten massive Veränderungen bei den Metaboliten der großen Stoffwechselwege wie etwa dem Citratzyklus oder dem Harnstoffzyklus festgestellt werden. Unter Glutamin-Restriktion wurden geringere Mengen nahezu aller Metaboliten gemessen. Dabei zeigte sich der Trend, dass die Mengen mit zunehmender Zeit immer weiter absanken und somit ihre Minima am fünften Tag erreichten. Dagegen stiegen in der Kontrolle die relativen Mengen grundsätzlich mit zunehmender Inkubationszeit an, wobei sie ihr Maximum zumeist am vierten Tag erreichten und danach wieder leicht abnahmen. Da einzelne Vertreter der untersuchten Stoffgruppen die Veränderungen unter Glutamin-Restriktion besonders gut reflektierten, wurden sie ausgewählt, um einen metabolischen Fingerabdruck der Glutamin-Restriktion zu definieren.

3.4.2 Metabolischer Fingerabdruck der Glutamin-Restriktion nach 48 h

Bereits nach 48 h konnte ein charakteristisches Stoffwechselprofil für die Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion definiert werden. Die Unterschiede zur Kontrolle waren zu diesem Zeitraum bereits eindeutig und verstärkten sich mit zunehmender Inkubationsdauer weiter, indem die Metaboliten entweder weiter zu- oder abnahmen. Sofern die Glutamin-Restriktion als eine Möglichkeit der Induktion eines LEM angesehen werden kann, könnten das für die Glutamin-Restriktion charakteristische Stoffwechselprofil in seiner Gesamtheit (großer Fingerabdruck), aber auch einzelne ausgewählte Metaboliten (kleiner Fingerabdruck) als Referenz herangezogen werden, um potentielle CRMs auf die Induktion eines LEM zu testen. Somit könnte das Stoffwechselprofil von mit potentiellen CRMs behandelten Zellen mit dem unter Glutamin-Restriktion verglichen und damit überprüft werden, ob sie einen LEM induzieren. Für eine schnelle Identifikation potentieller CRMs könnten sich bereits die Analyse und der Vergleich einzelner Vertreter als nützlich erweisen. So können der Zeit-, Kosten- und Materialaufwand durch den Verzicht auf eine massenspektrometrische Analyse minimiert und stattdessen andere Nachweisverfahren, wie spezielle Kits oder der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Nachweistest herangezogen werden, um die Metaboliten zu analysieren. In der folgenden Abbildung ist das metabolische Profil der L929-Zellen unter 48-stündiger Glutamin-Restriktion im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

Cells		48 h		Cells		48 h		
		Glut(+)	Glut(-)			Glut(+)	Glut(-)	
Non-Ess. Amino Acids	Alanine	118	63	Glycolysis	Fructose	86	243	
	Arginine	107	55		Aldohexose	73	100	
	Asparagine	99	113		Hexose-P	127	62	
	Aspartate	109	46		Fructose-1,6-P2	302	130	
	Cysteine	218	70		Glycerol/on-P	119	34	
	Glutamate	112	32		Diphosphoglycerate	665	7	
	Glutamine	100	3		3-Phosphoglycerate	457	71	
	Glycine	131	99		Phosphoenolpyruvate	202	54	
	Proline	116	79		Pyruvate	151	46	
	Serine	91	111		Lactate	129	67	
	Tyrosine	103	120		PPP	Phosphogluconate	604	27
	Ess. Amino Acids	Histidine	116			64	Gluconate	115
Isoleucine		93	82	Pentose-5-P		144	71	
Leucine		97	77	S7P		224	77	
Lysine		119	75	TCA	Citrate	179	197	
Methionine		95	89		Aconitate	113	57	
Phenylalanine		128	70		α -Ketoglutarate	121	13	
Threonine		133	114		Succinate	108	43	
Tryptophan		89	63		Fumarate	105	35	
Valine	102	88	Malate		138	29		
Purines	AMP	732	226	Ketone body	Acetoacetate	199	31	
	ADP	220	71					
	ATP	159	32					

Abbildung 27: Charakteristisches Stoffwechselprofil der Zelllinie L929 unter 48-stündiger Glutamin-Restriktion. Die Analyse erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen. Wie in „Material und Methoden“ detaillierter beschrieben, wurden 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen der Zelllinie L929 in Petrischalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit glutaminhaltigem bzw. glutaminfreiem Medium stimuliert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde aus jeder Petrischale 1 ml Überstand entnommen und von jeder Schale Zellpellets mit jeweils 1 Million Zellen gebildet, sodass an jedem Tag drei Proben Überstände und drei Proben Zellpellets je Versuchsgruppe gesammelt wurden. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert.

Unter Glutamin-Restriktion sanken die relativen Massen der meisten Aminosäuren bereits nach 48 h ab. Die universelle Energiewährung ATP sank deutlich und betrug ein Fünftel der unter Kontrollbedingungen gemessenen Menge. Die Massen nahezu aller Metaboliten der Glykolyse, des PPP sowie des Citratzyklus sanken und im Vergleich zum Hungerstoffwechsel stieg die gemessene Menge des Ketonkörpers Acetoacetat nicht an, sondern sank auf 31 %.

4 Diskussion

Wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Aminosäure-Restriktion in Form der Glutamin-Restriktion auf das Wachstum und den Metabolismus der murinen Zelllinie L929, welche in unserer Arbeitsgruppe als Modellsystem genutzt wird. Weiterhin sollte die Wirkung potentieller CRMs auf das Wachstum humaner HNSCC-Zellen (FaDu, Detroit 562, SCC9 und SCC25) und humaner Kontrollzelllinien (HaCaT und HeLa) erforscht und der Einfluss auf die Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen analysiert werden. Zur Analyse der Wirkung der Methionin-Restriktion und der beiden Polyamine Spermidin und Spermin auf die Autophagie wurden Western-Blot-Analysen mit den Antikörpern p62, LC3B und Atg5 exemplarisch an den Zelllinien L929 und HeLa durchgeführt.

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde sowohl mithilfe des Kristallviolett-Assays als auch unter Verwendung der automatisierten digitalen Mikroskopie (Pico) mit Verdünnungsreihen der Aminosäure Glutamin analysiert. Eine detaillierte Analyse der Glutamin-Restriktion wurde schließlich mithilfe der LC-MS über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse schwerpunktmäßig diskutiert.

4.1 Antiproliferativer Effekt der Polyamine Spermidin und Spermin auf das Wachstum humaner und muriner Zelllinien

Es zeigten sich in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (24 h, 48 h oder 72 h) und der Konzentration der beiden Polyamine sinkende Zellzahlen. Je länger die Zellen inkubiert wurden, umso mehr sank die relative Zellzahl. Generell schien Spermin bei geringen Konzentrationen wirksamer zu sein als Spermidin. Da sich die Frage stellte, ob die Zellen durch die Spermidin-/Spermin-Inkubation lediglich weniger proliferierten oder ein vermehrter Zelltod stattfand, wurden die Zellen stets unter dem Mikroskop auf ihre Morphologie untersucht. Dabei zeigten sich massive Veränderungen. Während sich die Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach drei Tagen Inkubation bis zu einer Konzentration von etwa 1,11 mM vital, aber weniger proliferierend zeigten, wiesen die Zellen, die höheren Konzentrationen ausgesetzt waren, zunehmend Merkmale des Zelltods auf (Abbildung 7B und 7C). Die hohen Dosierungen von Spermidin und Spermin schienen eine zytotoxische Wirkung zu haben. Die in der eingangs zitierten Studie (Chen et al., 2018) über die Spermidin-induzierte Wachstumshemmung und Apoptose via Autophagie-Aktivierung in Zervixkarzinom-Zellen erzielten Ergebnisse zeigten viele

Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen, wobei es gravierende Unterschiede in den Konzentrationen gab. So wurde nach einer 24-stündigen Spermidin-Inkubation bei den HeLa-Zellen eine mittlere inhibitorische Konzentration von 121,3 μM determiniert und bei Maximalkonzentration (200 μM) eine Reduktion der Zellviabilität auf 20 %. Dagegen ergaben unsere Messungen eine mittlere inhibitorische Konzentration bei HeLa von 6906 μM und es zeigten sich keinerlei Veränderungen bezüglich der relativen Zellzahl bei einer Konzentration von 121,3 μM nach 24 h. Nach 72 h wurde auch bei dieser geringen Konzentration eine sinkende Zellzahl gemessen, jedoch nicht nach 24 h. Die Abweichungen der beiden Ergebnisse sind weder auf den Wirkstoff (entstammen beide der Firma Sigma-Aldrich), noch auf das Lösungsmittel (DMSO) zurückzuführen. Weiterhin wurde in der Studie eine sinkende Zellviabilität bei zunehmender Inkubationszeit (es erfolgten Messungen nach 24 h, 48 h und 72 h) und zunehmender Konzentration beobachtet. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der antiproliferative Effekt der Polyamine Spermidin und Spermin bei den untersuchten Zelllinien gut beobachten ließ und die Ergebnisse mit denen aus der genannten Studie von Chen et al. (2018) korrelieren.

4.2 Keine Autophagie-Induktion durch exogenes Spermidin

In weiterführenden Experimenten sollte überprüft werden, ob durch die exogene Zufuhr von Spermidin die Autophagie in HeLa-Zellen ausgelöst werden kann. Dazu wurden Western Blots zur Detektion verschiedener Autophagie-assoziiierter Proteine mit Tubulin als internem Standard durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Western Blots allein konnten keine direkten Rückschlüsse auf eine tatsächliche Autophagie-Induktion getroffen werden. Im Vergleich zu der zuvor erwähnten Studie konnte kein eindeutiges zugunsten LC3-II verschobenes LC3-II/I Verhältnis detektiert werden. So zeigte die LC3-II-Bande nach 48-stündiger Spermidin-Inkubation keinen wesentlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Vollmedium). Unterschiedliche Proteinmengen durch ein fehlerhaftes Auftragen der Proben können als Fehlerquelle weitestgehend ausgeschlossen werden, da anhand der Tubulin-Ladekontrolle ein gleichmäßiger Auftrag ersichtlich ist (Abbildung 15). Eine mögliche Ursache für die von der Studie von Chen et al. (2018) abweichenden Ergebnisse könnten die Konzentrationsunterschiede sein. Während in der Studie (Chen et al., 2018), in der sich deutlich stärkere Banden von LC3-II, Beclin 1 und Atg5 in den Spermidin-Proben im Vergleich zur Kontrolle zeigten, mit Spermidin-Konzentrationen von 120 und 180 μM gearbeitet wurde, haben wir die Ansätze mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Es zeigte sich in unserer

Vorarbeit, dass die Zellen bei dieser Konzentration nicht abstarben, weshalb wir uns für diese Konzentration entschieden hatten.

4.3 Autophagie-Induktion durch Methionin-Restriktion

Bei der Hefe ist es möglich, ihre Langlebigkeit durch Methionin-Restriktion autophagieabhängig zu erhöhen (Ruckenstuhl et al., 2014). So zeigte sich, dass eine Stilllegung solcher Gene, die für die Autophagie unerlässlich sind, die lebensverlängernde Wirkung der Methionin-Restriktion aufhob (Ruckenstuhl et al., 2014). Daher war es das Ziel, die potentielle Autophagie-Induktion durch Methionin-Restriktion mit Western Blots zu untersuchen. Das Protein p62, welches bei verstärkter Autophagie in der Regel abgebaut wird (Bjørkøy et al., 2009) und daher als Marker für Autophagie eingesetzt werden kann, konnte in Proben der Zelllinien L929 und HeLa sowohl in der Kontrolle als auch unter Methionin-Restriktion nach einem bzw. zwei Tagen detektiert werden. In der Auswertung zeigten sich die schwächsten Banden sowohl bei HeLa als auch bei L929 nach zweitägiger Methionin-Restriktion, was auf eine mögliche Autophagie-Induktion schließen lässt. Ein Hinweis für die Autophagie-Inhibition war die bei den HeLa-Zellen vergrößerte LC3B-II-Bande nach Chloroquin-Behandlung und 48-stündiger Inkubation in Vollmedium, da Chloroquin die Autophagie hemmt und daher als Marker eingesetzt werden kann (Abbildung 11). Auch in einem weiteren Western Blot (Abbildung 12) konnte an HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die Autophagie unter Kontrollbedingungen nach 24 h und 48 h gehemmt zu sein schien, da bei diesen Proben die stärksten LC3B-II-Banden detektiert wurden. Sowohl in Abbildung 11 als auch in Abbildung 12 deutet eine verringerte LC3B-II-Bande bei 24-stündiger Methionin-Restriktion auf einen erhöhten autophagischen Fluss hin.

Auch wenn die Tubulin-Banden in manchen Western Blots eine unterschiedliche Stärke aufwiesen und daraus gewisse Abweichungen der Proteinmengen resultieren, ließen sich die Verhältnisse der Banden zueinander und im Verhältnis zu Tubulin abschätzen, da die Ergebnisse eindeutig waren. So zeigte sich beispielsweise in Abbildung 13 eine an Position zwei und sechs schwächere Tubulin-Bandenstärke und dennoch wurden an den Positionen zwei, drei, vier und fünf ähnliche Bandenstärken für p62 detektiert und eine im Verhältnis zu Position zwei deutlich schwächer ausgeprägte p62-Bande nach 48-stündiger Methionin-Restriktion. Dagegen wurde trotz geringster Tubulin-Bandenstärke an Position zwei an derselben Position die stärkste p62-Bandenstärke detektiert. Es fand somit eine eindeutige Regulation statt.

Da sich LC3B-II in der Autophagosomenmembran befindet und durch die Verschmelzung des Autophagosoms mit dem Lysosom im weiteren Verlauf der Autophagie abgebaut wird, lässt ein erhöhter LC3B-II Gehalt auf eine Akkumulation von LC3B-II in den Membranen schließen, die beispielsweise durch den Autophagie-Inhibitor Chloroquin ausgelöst wird. Dagegen deutet eine schwache LC3B-II-Bande auf einen gesteigerten autophagischen Fluss hin, da die Autophagosomen zunehmend mit den Lysosomen verschmelzen. Die Anwesenheit von Methionin verminderte den autophagischen Fluss, während die Methionin-Restriktion ihn steigerte. Diese Ergebnisse konnten mehrfach mit der Methode des Western Blots reproduziert werden, wie aus den Abbildungen elf bis vierzehn hervorgeht. Das Autophagie-assoziierte Protein Atg5 wurde sowohl bei den Zellen mit als auch bei denen ohne Methionin in weitestgehend gleicher Stärke detektiert. Dies könnte auch damit zusammenhängen, dass Atg5 neben der Autophagie noch weitere wichtige Funktionen besitzt, die möglicherweise unabhängig von Methionin sind.

4.4 Unterschiede bei der Wirkung der Vorläufer Putrescin und N-Acetylputrescin im Vergleich zu Spermidin und Spermin auf die Proliferation

Da Putrescin und N-Acetylputrescin in Spermidin und Spermin umgewandelt werden können, wurde die antiproliferative Wirkung der beiden Wirkstoffe untersucht. Um die Wirksamkeit besser vergleichen zu können, wurden die Versuche mit allen vier Polyaminen über einen Zeitraum von drei Tagen parallel durchgeführt. Die Vorläufersubstanzen Putrescin und N-Acetylputrescin zeigten keinen bzw. einen leicht proliferationssteigernden Effekt bei 10 mM. Der leicht proliferationssteigernde Effekt N-Acetylputrescins zeigte sich bei allen Zelllinien außer HaCaT, HeLa und SCC9.

Nun stellt sich die Frage, warum die Putrescin-/N-Acetylputrescin-Exposition völlig andere Ergebnisse hervorbrachte als die Spermidin-/Spermin-Exposition. Es zeigte sich in einer Studie an Darmkrebszellen, die für 24 h mit Putrescin in den Konzentrationen 100, 550 und 1000 μM inkubiert wurden, dass eine Putrescin-Exposition zu erhöhten intrazellulären Putrescinspiegeln und gesteigerter Zellproliferation führte (Farriol et al., 2001). Es fand weiterhin keine Umwandlung in die höheren Polyamine Spermidin und Spermin statt, da sich auch keine Auswirkungen auf das Enzym ODC, welches der Synthese von Putrescin dient, zeigten. Da mehr Putrescin zur Verfügung stand und nicht in Spermidin umgewandelt wurde, musste weniger Putrescin nachproduziert werden (Farriol et al., 2001). Putrescin scheint also ganz eigene Wege zu besitzen, um das

Wachstum von Krebszellen zu beeinflussen, ohne dass es dabei einer Umwandlung in Spermidin bedarf.

Um das Zellwachstum durch Putrescin zu reduzieren, muss also der intrazelluläre Gehalt gesenkt werden, indem entweder extrazellulär kein Putrescin hinzugegeben wird oder die intrazelluläre Synthese via ODC gehemmt wird. In der eingangs erwähnten Studie wurden Hinweise für eine Senkung der endogenen Polyaminlevel durch exogenes Spermidin gefunden (Chen et al., 2018). Anders als bei Spermidin und Spermin scheint eine Erhöhung des Wirkstoffs im Extrazellularraum nicht zu einer Verringerung im Intrazellularraum, sondern ebenfalls zu einer Erhöhung zu führen. Somit wären die unterschiedlichen Effekte der vier Wirkstoffe auf das Wachstum der Zellen mit den unterschiedlichen Transport- und Aufnahmemechanismen zu erklären.

Ein therapeutischer Ansatzpunkt, um die Synthese von Putrescin zu hemmen, ist die pharmakologische Inhibition des Enzyms ODC, welches ein kritisches Enzym bei der Regulierung des Zellwachstums darstellt (Nowotarski et al., 2013b). Untersuchungen der Enzymaktivität zeigten, dass ODC bei humanem Nicht-Melanom-Hautkrebs erhöht war (Elmets and Athar, 2010) und stellten einen Zusammenhang zwischen durch ODC-Induktion erhöhten Polyaminspiegeln und dem Fortschreiten von Brustkrebs (Manni et al., 1995, Manni et al., 1996) sowie Prostatakrebs (Gupta et al., 2000) her. Durch eine Inhibition der ODC kann weniger Putrescin synthetisiert werden, sodass die intrazellulären Polyaminspiegel sinken und die Proliferation gehemmt wird. Jedoch erwies sich eine alleinige Inhibition von ODC durch den Inhibitor 2-Difluormethylornithin (DFMO) als nicht wirksames Chemotherapeutikum, da DFMO eher zytostatisch als zytotoxisch wirkte und vermutlich kompensatorische Mechanismen wie etwa einen erhöhten Polyamintransport bewirkt, sodass die Folgen der ODC-Inhibition kompensiert werden konnten (Nowotarski et al., 2013a).

4.5 Antiproliferativer Effekt der Glutamin-Restriktion

Die Ergebnisse der Kristallviolett-Assays unter Glutamin-Restriktion mit den Zelllinien L929 und HeLa zeigten auf, dass nach drei Tagen ein deutlicher Rückgang der relativen Zellzahl zu verzeichnen war. Ausgehend von einer Startkonzentration von 2 mM sanken die Zellzahlen unter völliger Glutamin-Restriktion um 40 %. Somit scheinen proliferierende Zellen auf exogenes Glutamin angewiesen zu sein, um ihre Proliferation aufrechtzuerhalten. Die Ergebnisse konnten mit der automatisierten Auswertung (Pico-Assay) bestätigt werden. Hier zeigte sich in einem Beobachtungszeitraum von fünf Tagen, dass mit sinkender Glutamin-Konzentration weniger Proliferation stattfand und

sich der Effekt mit zunehmender Inkubationsdauer verstärkte. Es ist dabei jedoch hervorzuheben, dass selbst nach 120 h Glutamin-Restriktion die L929- und HeLa-Zellen noch weiter proliferierten, aber in einem deutlich geringeren Maße. Bei der optischen Kontrolle mittels Durchlichtmikroskopie zeigten sich auch nach längerer Glutamin-Restriktion keine morphologischen Auffälligkeiten, die auf einen vermehrten Zelltod schließen lassen. Somit führte selbst die vollständige Glutamin-Restriktion über den untersuchten Zeitraum nicht zum Zelltod. Dieses Erkenntnis war wichtig, um die massenspektrometrische Analyse mit der richtigen Konzentration an Glutamin durchzuführen.

4.6 Massenspektrometrische Analyse des Metaboloms der Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion

Die metabolischen Veränderungen unter Glutamin-Restriktion bei der Zelllinie L929 betreffen den Großteil der untersuchten Metaboliten. Die bedeutendsten Auswirkungen werden im Folgenden diskutiert.

- (1) Rückgang der essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren
- (2) Rückgang der Nukleotidsynthese
- (3) Induktion des LEM
- (4) Anaplerotische Reaktionen
- (5) Warburg-Effekt
- (6) Geringerer Anstieg der Carnitine
- (7) intrazellulärer Cystinanstieg

4.6.1 Maßgebliche Beeinflussung des Aminosäurestoffwechsels

Grundsätzlich war ein deutlicher Rückgang der essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren unter Glutamin-Restriktion zu beobachten. Insbesondere bei der Aminosäure Glutamat, die aufgrund der Umwandlung Glutamins in Glutamat durch das Enzym Glutaminase in enger Verbindung zum Glutaminstoffwechsel steht, war eine drastische Veränderung zu erkennen. Sowohl intrazellulär als auch im Überstand stieg der Glutamatspiegel in der Kontrolle deutlich an. Dagegen sank der Glutamatgehalt im glutaminfreien Medium wesentlich. Dies lässt sich damit erklären, dass bei Vorhandensein von Glutamin Glutamat synthetisiert wird, welches für die ATP-Synthese

zur Deckung des hohen Stoffwechselverbrauchs benötigt wird. Dagegen steht bei Glutamin-Restriktion weniger Ausgangsstoff zur Verfügung, sodass geringere Mengen an Glutamat synthetisiert werden können. Da aus Glutamin neben Glutamat auch Alanin und Aspartat gebildet werden können, die durch Transaminierung zur Synthese von nicht essentiellen Aminosäuren herangezogen werden, ist auch der intrazelluläre Rückgang der Massen dieser Aminosäuren unter Glutamin-Restriktion zu erklären.

Glutamat wird zur Synthese von Prolin und Ornithin verwendet. Ornithin kann dann in Arginin umgewandelt werden (Wise and Thompson, 2010). Es zeigte sich bei den Zellen unter Glutamin-Restriktion ein stufenweises Absinken an Arginin und Prolin, interessanterweise jedoch nicht an Ornithin. Ornithin stieg in den Zellen unter Glutamin-Restriktion drastisch an und steht damit im starken Kontrast zu den sinkenden intrazellulären Massen der anderen Metaboliten. Möglicherweise findet unter Glutamin-Restriktion eine verminderte Umwandlung von Ornithin in Arginin statt, da dafür zwei weitere Aminogruppen sowie Bicarbonat (HCO_3^-) erforderlich sind, die unter Glutamin-Restriktion vermindert vorliegen, sodass Ornithin akkumuliert. Der Anstieg an Ornithin durch seine Akkumulation unter Glutamin-Restriktion würde somit den Stickstoffmangel, der aus dem Fehlen des Stickstoffdonors Glutamin resultiert, widerspiegeln. Dies wird durch die sinkende Menge an Arginin, der stickstoffreichsten proteinogenen Aminosäure, bestätigt.

Eine weitere Erklärung für den drastischen Anstieg Ornithins unter Glutamin-Restriktion könnte ein vermehrter Aminosäureabbau zur Gewinnung von Kohlenstoff sein, der in Fibroblasten durchaus möglich ist, da sie die Enzyme Argininosuccinatsynthetase und -lyase sowie Arginase, die ansonsten hauptsächlich in der Leber vorkommen, besitzen (Heinrich et al., 2014). Durch das Vorkommen der Enzyme des Harnstoffzyklus ist somit in den Fibroblasten der Abbau von Aminosäuren zu Harnstoff möglich, wobei weiterhin Ornithin umgesetzt wird (Heinrich et al., 2014). Da Ornithin unter Glutamin-Restriktion stärker anstieg als in der Kontrolle, ist von einem vermehrten Aminosäureabbau unter Glutamin-Restriktion auszugehen.

4.6.2 Rückgang der Nukleotidsynthese

Glutamin ist maßgeblich an der Nukleotidsynthese beteiligt und liefert somit die Grundbausteine für den Aufbau von DNA und RNA. Der in Glutamin enthaltene Stickstoff trägt direkt zur *de-novo*-Synthese von Purin und Pyrimidin bei und fördert somit durch die Entstehung von Nukleosiden die Bildung wichtiger Nukleotide, welche die Proliferation und das Zellwachstum ermöglichen (Lane and Fan, 2015, Altman et al.,

2016). In der Purinsynthese werden für die Synthese von Inosinmonophosphat (IMP), dem Vorläufer von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP), zwei Moleküle Glutamin verwendet und für die weitere Umwandlung von IMP zu GMP ein Molekül Glutamin, sodass insgesamt drei Moleküle Glutamin für die Synthese von GMP nötig sind (Yoo et al., 2020, Moffatt and Ashihara, 2002). Auch in der Pyrimidinsynthese wird Glutamin verbraucht und zwar zum einen für das Enzym Carbamoylphosphat-Synthetase II und zum anderen, um aus UTP CTP zu synthetisieren (Moffatt and Ashihara, 2002). Die Carbamoylphosphat-Synthetase II bildet aus Glutamin, zwei Molekülen ATP und HCO_3^- das Molekül Carbamoylphosphat und dieses wird mit Aspartat zu N-Carbamoylaspartat umgewandelt. Carbamoylaspartat sank unter Glutamin-Restriktion auf 7 % am fünften Tag, während es auf bis zu 215 % am vierten Tag unter Kontrollbedingungen anstieg (Abbildung 18). Es konnten grundsätzlich deutliche Anstiege bei den untersuchten Substanzen der Stoffgruppe Purine und Pyrimidine, insbesondere bei AMP und GMP unter Kontrollbedingungen festgestellt werden, wohingegen die relativen Mengen dieser Stoffe unter Glutamin-Restriktion massiv absanken.

Somit wird ersichtlich, dass sich die Zellen unter Glutamin-Restriktion auf die wesentlichen lebenserhaltenden Vorgänge konzentrieren und die Energie, die sie nicht für Wachstum und Proliferation aufwenden, einsparen. Da die Nukleotidsynthese ein Ansatzpunkt in der Tumorthherapie ist, könnte die Aminosäure-Restriktion auch hier unterstützend sowie präventiv wirken. Das Problem bei der Therapie mit Folsäure-Analoga, die die Nukleotidsynthese bei Krebszellen hemmen, ist, dass sie auch andere sich schnell teilende Körperzellen wie etwa Fibroblasten schädigen und so starke Nebenwirkungen verursachen. Dagegen werden in einem durch Aminosäure-Restriktion induzierten LEM wichtige DNA-Reparatur- und Recycling-Maßnahmen induziert, Energie gespart und die Nukleotidsynthese der stark proliferierenden Zellen begrenzt, ohne dabei die gesunden Körperzellen zu beeinträchtigen. Anhand des Beispiels der Nukleotidsynthese-Beeinflussung durch Glutamin-Restriktion zeigt sich erneut die Abhängigkeit proliferierender Zellen von Glutamin.

Weiterhin werden bei der bereits erwähnten Glutaminolyse durch Bildung von Glutamat und Aspartat durch die Glutaminase und die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) Kohlenstoffatome des Aspartats für den Einbau in Purin und Pyrimidin gewonnen (Lane and Fan, 2015, Son et al., 2013). Außerdem werden durch glutaminabhängige mTOR-Wachstumssignale, die für den Aufbau der Pyrimidinmoleküle durch Einbau von

aus Glutamin stammendem Stickstoff benötigten Enzyme CAD (Carbamoyl-Phosphat-Synthetase 2, Aspartat-Transcarbamylase und Dihydroorotase) aktiviert und somit die ersten drei Schritte der *de-novo*-Pyrimidinsynthese katalysiert (Lane and Fan, 2015, Ben-Sahra et al., 2013, Altman et al., 2016). Diese Erkenntnisse sind eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Purine und Pyrimidine in der Kontrolle und die Senkung dieser beiden Nukleotidbausteine in den Zellen unter Glutamin-Restriktion. Dass die Aminosäure Aspartat einen entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus hat, belegen die eingangs erwähnten Erkenntnisse von Patel et al. (2016) über KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene)-getriebene Zellen. Diese verharren ohne Glutamin in der S-Phase, da durch das fehlende Glutamin weniger Aspartat gebildet wird, welches für die Purin- und Pyrimidinsynthese und somit die Nukleotidsynthese gebraucht wird, sodass sich die Zellen durch das Arrestieren für Medikamente, die auf die S-Phase abzielen, angreifbar machen (Patel et al., 2016). Somit könnte sich die Beeinflussung der Aspartatsynthese als ein möglicher therapeutischer Ansatz in der Krebstherapie erweisen.

4.6.3 Eignung der Glutamin-Restriktion zur Induktion des Low-Energy-Metabolismus (LEM)

Eine wichtige Frage ist, ob eindeutige Marker des LEM identifiziert und somit Belege für die Glutamin-Restriktion als eine Möglichkeit zur Induktion des LEM geliefert werden können. Im Folgenden werden die bedeutendsten Marker für einen LEM diskutiert. Diese sind (1) ein gesteigertes NAD^+/NADH -Verhältnis, (2) ein gesteigertes AMP/ATP -Verhältnis und (3) sinkende ATP-Spiegel. Weiterhin erfolgt anhand der gesunkenen Menge des Ketonkörpers Acetoacetat eine Abgrenzung zum Hungerstoffwechsel (4).

(1) Ein aussagekräftiger Marker für den LEM ist das gesteigerte NAD^+/NADH -Verhältnis, da NAD^+ bei Energiemangel ansteigt und unter anderem die Sirtuine und weitere den LEM induzierende Faktoren aktiviert. Sowohl in der Kontrolle als auch unter Glutamin-Restriktion stieg das Verhältnis von NAD^+/NADH am zweiten Tag, fiel jedoch am dritten und vierten Tag, um am fünften Tag wieder anzusteigen, wobei der Anstieg unter Glutamin-Restriktion am fünften Tag (2,7 : 1) mehr als ein vierfaches des Ausgangsverhältnisses (0,6 : 1 nach 24 h) erreichte und das Verhältnis unter Kontrollbedingungen am fünften Tag (0,6 : 1) unter dem Ausgangsverhältnis (1 : 1 nach 24 h) lag. Somit ließ sich ein gesteigertes NAD^+/NADH -Verhältnis als Marker für den LEM unter Glutamin-Restriktion nur am zweiten und fünften Tag feststellen (Tabelle 13). Das NAD^+/NADH -Verhältnis ist somit kein eindeutiger Beleg für den LEM unter

Glutamin-Restriktion. Der völlige Abfall von NADH am fünften Tag unter Glutamin-Restriktion könnte mit dem Leerlaufen des Citratzyklus zusammenhängen. Der Anstieg von NADH in der Kontrolle hingegen, der sein Maximum bei 611 % am vierten Tag erreichte, könnte mit der Bildung anaplerotischen α -Ketoglutarats aus Glutamat durch die Glutamatdehydrogenase zusammenhängen, wobei neben Ammonium und NADPH auch NADH entsteht (Altman et al., 2016). Aufgrund der geringeren Menge an Glutamat unter Glutamin-Restriktion kann diese Umwandlung nur in einem wesentlich geringeren Maße stattfinden.

Tabelle 13: NAD⁺/NADH-Verhältnis unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen

NAD ⁺ /NADH	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle	1 : 1	1,3 : 1	0,4 : 1	0,5 : 1	0,6 : 1
Glutamin–	0,6 : 1	0,7 : 1	0,4 : 1	0,3 : 1	2,7 : 1

(2) Interessant sind auch die unterschiedlichen AMP/ATP-Verhältnisse, aus denen Rückschlüsse auf die Energielevel der Zellen gezogen werden können. Dabei lässt ein niedriges AMP/ATP-Verhältnis auf ein hohes Energievorkommen in Form von ATP und ein hohes AMP/ATP-Verhältnis auf wenig vorhandene Energie schließen, da ATP zunehmend verbraucht und zu AMP verstoffwechselt wird. Die Verhältnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 14: AMP/ATP-Verhältnis unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen

AMP/ATP	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle	1 : 1	4,6 : 1	1,7 : 1	14,9 : 1	21,2 : 1
Glutamin–	5,4 : 1	7 : 1	15,5 : 1	12,7 : 1	13,5 : 1

Die Gegenüberstellung der Verhältnisse sowohl unter Glutamin-Restriktion als auch unter Kontrollbedingungen zeigt die Tendenz zu einer Steigerung des AMP/ATP-Verhältnisses auf, woraus sich schließen lässt, dass die Zellen unter beiden Bedingungen ein zunehmend niedriges Energielevel aufweisen. Die Zunahme des Verhältnisses ist am fünften Tag bei der Kontrolle (21,2 : 1) jedoch größer als unter Glutamin-Restriktion (13,5 : 1). Unter Kontrollbedingungen stieg das Verhältnis am zweiten Tag an, fiel am dritten Tag wieder, um danach am vierten und fünften Tag rapide anzusteigen. Das zunehmend sinkende Energielevel ist somit ersichtlich und erscheint im Hinblick auf den kontinuierlichen Verbrauch der im Zellkulturmedium enthaltenen Nährstoffe nachvollziehbar. Dagegen steht ein bereits am ersten Tag gegenüber der Kontrolle erhöhtes AMP/ATP-Verhältnis unter Glutamin-Restriktion, welches am zweiten

Tag weiter anstieg und am dritten Tag sein Maximum bei 15,5 : 1 erreichte. Das verringerte Energielevel zeigte sich an den darauffolgenden Tagen bei 12,7 : 1 am vierten und bei 13,5 : 1 am fünften Tag.

Der unter Glutamin-Restriktion geringer ausfallende Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrolle am vierten und fünften Tag könnte dahingehend interpretiert werden, dass in Relation zu AMP mehr ATP unter Glutamin-Restriktion vorhanden ist als unter Kontrollbedingungen und somit mehr Energie bereitsteht. Dies ist allerdings ein Trugschluss, da sich die Zellen ohne Glutamin im Energiesparmodus befinden. Dabei scheinen sie ATP zu schonen und weniger davon abzubauen, indem sie sich auf die lebenswichtigen Vorgänge konzentrieren und keine Energie für den Anabolismus aufwenden. Der innerhalb der ersten drei Tagen klar erkennbare Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses unter Glutamin-Restriktion kann als ein Zeichen für die Induktion des LEM angesehen werden.

(3) Der deutlichste Marker für den LEM ist der rapide Rückgang der universellen Energiewährung ATP unter Glutamin-Restriktion auf ein Minimum von 2 % am fünften Tag (Abbildung 18). Demgegenüber steht ein deutlich höher ausfallender ATP-Gehalt in den Zellen der Kontrolle, der jedoch ebenfalls am dritten und fünften Tag sank, aber deutlich höhere Werte als unter Glutamin-Restriktion erreichte. Eine gesunkene ATP-Menge ist typisch für den LEM, da daraus eine verminderte Aktivierung von mTOR und somit reduziert ablaufende Wachstums- und Proliferationsprozesse resultieren. Die verringerte Menge an ATP unter Glutamin-Restriktion könnte aus einer vermindert ablaufenden aeroben Glykolyse resultieren. Unter den Metaboliten der Glykolyse stiegen lediglich die Metaboliten Fructose und Aldohehexose unabhängig von den durch die unterschiedlichen Medien vorherrschenden Wachstumsbedingungen. Da Fructose in die Glykolyse über Umwandlung in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat eingeschleust werden kann, wobei es der Enzyme Fructose-1-Phosphat-Aldolase und Triosekinase bedarf, jedoch Fructose-1-Phosphat-Aldolase nur in der Leber vorkommt, könnte damit eine glutaminunabhängige Akkumulation von Fructose in den Zellen mit und ohne Glutamin zu erklären sein. Der steigende Gehalt an Aldohehexosen, zu denen D-Glukose, D-Mannose und D-Galaktose zählen, könnte damit zu erklären sein, dass die Zellen unter Glutaminmangel die Glukose schonen, indem sie weniger in die Glykolyse einschleusen, sodass weniger ATP entsteht und die Zellen so Energie sparen.

(4) Der intrazelluläre Gehalt des Ketonkörpers Acetoacetat fiel unter Glutamin-Restriktion deutlich auf ein Minimum von 12 % am fünften Tag (Abbildung 26). Da die Ketonkörper Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat unter Kohlenhydratmangel im Rahmen der Ketose ansteigen, wäre eine gesteigerte Produktion von Acetoacetat ein möglicher Hinweis für den Hungerstoffwechsel. Der niedrige Spiegel an Acetoacetat ist somit ein Zeichen dafür, dass durch die Glutamin-Restriktion kein Hungerstoffwechsel, sondern ein LEM induziert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass deutliche Hinweise für die Induktion eines LEM gefunden werden konnten.

4.6.4 Umleitung des Glutamins in den Citratzyklus

Grundsätzlich zeigte sich ein Anstieg aller Metaboliten des Citratzyklus und des PPP unter Kontrollbedingungen, wohingegen die Metaboliten – mit Ausnahme von Citrat an den ersten beiden Tagen – unter Glutamin-Restriktion sanken. Der Rückgang der Metaboliten des Citratzyklus resultiert daraus, dass Metaboliten aus dem Citratzyklus abgesogen und unter Glutamin-Restriktion nicht wieder aufgefüllt werden können.

Proliferierende Zellen nutzen Glukose-Metaboliten für anabole Prozesse und andere Quellen für die Gewinnung von Kohlenstoff wie etwa Glutamin, um den Citratzyklus durch anaplerotische Reaktionen aufzufüllen (DeBerardinis et al., 2007). Das sogenannte KRAS-Onkogen ist ein humanes Onkogen, dessen Mutation zu unkontrolliertem Wachstum führt und somit zur Krebsentstehung beiträgt (Ying et al., 2012). In KRAS-getriebenen PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma)-Zellen stellte Glutamin die Hauptkohlenstoffquelle für den Citratzyklus dar (Ying et al., 2012). Weiterhin wurde in diesen Zellen festgestellt, dass der glykolytische Fluss im PPP gesteigert wurde, aber dabei der Fluss an Metaboliten für den Citratzyklus unbeeinflusst blieb (Ying et al., 2012). Der PPP, welcher als anaboler Stoffwechselweg durch den Abbau von Glukose zur Bildung des Nukleotid-Bausteins Ribose-5-phosphat sowie des für anabole Prozesse erforderlichen NADPH beiträgt, wurde in KRAS-mutierten Zellen nur in seinem zweiten (nicht-oxidativen) Teil beeinflusst, während der erste (oxidative) Teil unbeeinflusst blieb (Ying et al., 2012, Deberardinis et al., 2008). Die proliferierenden Zellen nutzen diesen Weg, um die Glukose-Metaboliten so umzuleiten, dass sie im PPP zur Bereitstellung von Ribose-5-phosphat und somit zur Nukleotidsynthese und dem Anabolismus beitragen und für die Energiegewinnung im Citratzyklus dagegen andere Kohlenstoffquellen genutzt werden, wodurch sie vollends auf Wachstum ausgerichtet sind (Deberardinis et al., 2008). Durch die Weiterverwertung von Glutamin im

Citratzyklus und die Umleitung der Glukose, gelingt es den Zellen also einerseits die Aktivität des Citratzyklus aufrechtzuerhalten und zudem genügend $\text{NADPH} + \text{H}^+$ für die Proliferation zu produzieren (Deberardinis et al., 2008). In der Auswertung der LC-MS sind deutliche Unterschiede bei den Metaboliten des PPP bei den unterschiedlich inkubierten Zellen zu erkennen: Die gemessenen Massen der Metaboliten Phosphogluconat, Gluconat und Pentose-5-phosphat sind bei den Zellen, die über die Ressource Glutamin verfügen, deutlich höher als bei den Zellen ohne Glutamin (Abbildung 20). Dies ist damit zu erklären, dass ohne Glutamin keine Alternative zum Antrieb des Citratzyklus zur Verfügung stand und somit Glukose verwendet wurde, welche dann wiederum nicht mehr für den PPP zur Verfügung stand, sodass der PPP in einem geringeren Maße ablief.

4.6.5 Warburg-Effekt

Wie bereits in der Einleitung genauer beschrieben, stellte Otto Warburg fest, dass Tumorzellen mit ihrem erhöhten Stoffwechsel größere Mengen an Glukose aufnehmen, die sie zu Laktat abbauen, um dieses schließlich zu sezernieren (Warburg et al., 1927). Diese Stoffwechselveränderung bei Tumorzellen wird als Warburg-Effekt bezeichnet. Während normale Körperzellen in Anwesenheit von Sauerstoff in der aeroben Glykolyse 32 ATP gewinnen, liefert die anaerobe Glykolyse netto lediglich 2 ATP (Warburg et al., 1927). Da der anaerobe Modus sehr ineffizient im Hinblick auf die Energieausbeute ist, verbrauchen Tumoren so hohe Energiemengen. Der Warburg-Effekt tritt jedoch nicht nur bei Tumorzellen, sondern bei proliferierenden Zellen generell auf. Warum Tumorzellen und gesunde proliferierende Zellen den ineffizienteren Weg der Energiegewinnung nutzen und Laktat produzieren, ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine mögliche Erklärung ist die Eigenschaft Laktats, die Radioresistenz der proliferierenden Zellen zu erhöhen, da es antioxidative Eigenschaften besitzt (Groussard et al., 2000). Weiterhin wurde festgestellt, dass das Immunsystem an der Bekämpfung der Tumorzellen gehemmt wurde, indem extrazelluläres Laktat die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen hemmt und die Zytokinfreisetzung inaktiviert (Gottfried et al., 2006). Eine weitere mögliche Erklärung für die übermäßige Laktatproduktion proliferierender Zellen ist, dass der Kohlenstoff so schneller in die Biomasse eingebaut werden könnte, wodurch eine schnelle Zellteilung ermöglicht wird (Vander Heiden et al., 2009). Eine hohe und innerhalb der fünf Tage steigende Laktatsekretion in den Extrazellularraum war bei den Zellen im glutaminhaltigen Medium zu beobachten (Abbildung 21). Da sich Laktat in einer Studie (Zielke et al., 1980) als ein Hauptprodukt des Glutamin-Metabolismus in humanen Fibroblasten herausstellte, könnte die im Vergleich zu der

Inkubation in glutaminfreien Medium hohe Menge an Laktat bei der murinen Zelllinie L929 damit zu erklären sein. So stieg Laktat intrazellulär bei den in Vollmedium inkubierten Zellen auf einen Maximalwert von 393 % am vierten Tag an, während in den Zellen ohne Glutamin ein stufenweises Absinken an Laktat zu beobachten war, welches sein Minimum bei 20 % am fünften Tag erreichte. Extrazellulär stiegen die relativen Mengen Laktats am fünften Tag unter Kontrollbedingungen auf maximal 522 % an und lagen unter Glutamin-Restriktion deutlich niedriger bei 161 %.

Eine glutaminabhängige Laktat- (Brand, 1985) und Alaninsekretion als Merkmal für proliferierende Zellen wurde auch in anderen Studien festgestellt (Deberardinis et al., 2008). So wurde etwa der Energiestoffwechsel von proliferierenden und nicht-proliferierenden Rattenthymozyten verglichen und dabei gezeigt, dass bei der proliferativen Gruppe der Glukosestoffwechsel gegenüber der ruhenden Gruppe um das 53-fache gesteigert wurde und dabei 90 % der Glukose zu Laktat verstoffwechselt wurden (Brand, 1985). In einem Tumor könnte das Wachstum weiter befeuert werden, indem die gebildeten Moleküle Alanin (über die Bildung von Pyruvat) und Laktat (über den Cori-Zyklus) als Vorläufer für die hepatische Glukoneogenese verwendet werden (Deberardinis et al., 2008). Durch die Überexpression der Glutaminase und der NADP-abhängigen Malat-Decarboxylase in Tumorzellen kommt es vermehrt zur Ausschleusung von Malat aus dem Citratzyklus und dessen Umwandlung zu Pyruvat, welches zu Laktat und Alanin abgebaut wird (Deberardinis et al., 2008). Während Alanin sowohl in den Medienüberständen als auch intrazellulär unter Kontrollbedingungen anstieg, sank es unter Glutamin-Restriktion intrazellulär auf 32 % am fünften Tag. Am gravierendsten stellten sich die Veränderungen bei Pyruvat in den Überständen dar, welches Tag für Tag in der Kontrolle anstieg und sein Maximum am vierten Tag bei 7808 % erreichte, am darauffolgenden Tag jedoch leicht absank auf 7490 %. Im Vergleich dazu war die gemessene Menge am fünften Tag in den Medienüberständen unter Glutamin-Restriktion um das 26-fache verringert.

Es wird insbesondere anhand der deutlich niedrigeren Laktat- und Pyruvatspiegel ersichtlich, dass die Zellen unter Glutamin-Restriktion kaum proliferierten. Dies könnte als ein weiteres Indiz für den LEM angesehen werden.

4.6.6 Geringerer Anstieg der Carnitine unter Glutamin-Restriktion

Weiterhin von Bedeutung für den Stoffwechsel ist L-Carnitin, welches für den Fettsäuretransport in die Mitochondrien zuständig und somit Voraussetzung für die β -Oxidation und die Energiegewinnung ist. Um die langkettigen Fettsäuren zu aktivieren, ist zunächst

CoA erforderlich, da es Fettsäuren zu Acyl-CoA verestert, sodass die langkettigen Fettsäuren transportfähig gemacht und weiterverwendet werden können. Da die mitochondriale Membran jedoch für CoA undurchlässig ist, muss es durch Carnitin als Transportmittel ersetzt werden, damit die langkettigen Fettsäuren ins Innere der Mitochondrien gelangen können, wofür der Transporter OCTN2 (organic cation/carnitine transporter novel type 2) benötigt wird (Longo et al., 2006). Mithilfe des Enzyms Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) wird aus Carnitin und langkettigen Fettsäuren im Inneren der Mitochondrienmembran AC gebildet und anschließend erfolgt via Carnitin-Palmitoyl-Transferase 2 (CPT2) die erneute Konjugation der langkettigen Fettsäuren an CoA, um sie für die β -Oxidation bereitzustellen (Longo et al., 2006). In der Auswertung zeigt sich, dass die summierten Massen der Carnitine unter Glutamin-Restriktion leichter stiegen als unter normalen Bedingungen, sich jedoch am fünften Tag stark verringerten. Bei der Analyse von AC lässt sich feststellen, dass die Zellen unter Kontrollbedingungen mehr AC enthielten als unter Glutamin-Restriktion. Jedoch stieg sowohl unter normalen als auch unter restriktiven Bedingungen die Transportrate via Carnitin. In proliferierenden Zellen findet eine gesteigerte Fettsäuresynthese statt, an welcher Glutamin beteiligt ist, da es die durch die Ausschleusung von Citrat entstandene Lücke mit α -Ketoglutarat auffüllt und so genügend Metaboliten für die Fettsäuresynthese bereitstellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass geringe Mengen an Fettsäuren zu geringeren Fettsäure-Transportraten ins Mitochondrium, dem Ort der β -Oxidation, führen und somit der AC-Gehalt unter Kontrollbedingungen in L929-Zellen größer ist. Weiterhin lassen sich mögliche Erklärungen für den höheren Carnitingehalt in den Zellen mit glutaminhaltigem Medium finden. Da Carnitin entweder durch die Nahrung aufgenommen oder durch die Aminosäuren Methionin und Lysin synthetisiert werden kann, sinkt mit abfallenden Methionin- und Lysinspiegeln in den Zellen unter Glutamin-Restriktion auch die Carnitinproduktion, wodurch Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel entstehen. Zudem sanken unter Glutamin-Restriktion die Acetyl-CoA-Spiegel in den Zellen dramatisch auf 0 % an Tag vier und fünf ab. Auch die CoA-Spiegel reduzierten sich nach anfänglichem Anstieg ab dem dritten Tag deutlich. CoA, welches Adenosin enthält, für dessen Synthese die Ribose aus dem PPP herangezogen werden kann, sank unter Glutamin-Restriktion intrazellulär, da Glutamin den PPP antreibt, indem weniger Glukose für den Citratzyklus verwendet und stattdessen in den PPP geleitet wird. Somit ist bei steigendem Glutamingehalt von einem gesteigerten PPP mit Ribose-5-phosphat als Produkt auszugehen, welches für die Synthese von CoA herangezogen wird, das wiederum in Form von Acyl-CoA von Bedeutung für den Fettstoffwechsel und als

Acetyl-CoA für den Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel ist. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen aus der LC-MS. Acetyl-CoA stieg intrazellulär in den Zellen unter Kontrollbedingungen am vierten Tag auf 409 % an und sank am fünften Tag, da an Tag fünf der Glutamingehalt im Medium aufgebraucht war. Dagegen sank Acetyl-CoA in den Zellen unter Glutamin-Restriktion bereits am vierten Tag auf 0 %, da die Glykolyse vollständig durchlaufen werden musste, um Metaboliten für den Citratzyklus zu liefern, welcher nicht anderweitig aufgefüllt werden konnte und so keine Metaboliten für den PPP abgezweigt werden konnten. Somit stand weniger Ribose-5-phosphat für die Nukleotid- und Coenzym-synthese zur Verfügung. Für die CoA-Synthese ist weiterhin Pantothersäure (Vitamin B5) erforderlich, deren konjugierte Base Pantothenat in der LC-MS erfasst wurde. Die L929-Zellen in glutaminhaltigem Medium wiesen hohe Mengen Pantothenats auf, während jene Zellen in glutaminfreiem Medium geringe Mengen enthielten.

Glukose ist insbesondere für Gehirn-, Herz- und Muskelzellen die bevorzugte Energiequelle. Bei eingeschränkter Glukoseversorgung – ausgelöst etwa durch Fasten – werden alternative Energiequellen wie Fettsäuren und Ketonkörper herangezogen, wobei dem Fettsäureabbau in der β -Oxidation eine besondere Bedeutung für die Energiehomöostase in Organen wie der Leber, dem Herz und dem Skelettmuskel zukommt, da Fettsäuren von den meisten Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, direkt zur Energiegewinnung genutzt werden können (Houten and Wanders, 2010). Die in der Leber aus Fettsäuren gebildeten Ketonkörper stellen eine wichtige Energiequelle für alle Gewebe einschließlich des Gehirns dar (Houten and Wanders, 2010).

Für den Abbau der Fettsäuren wird Carnitin benötigt, welches daher in den Zellen unter Glutamin-Restriktion ansteigt, um deren Energiebedarf zu decken. Die innerhalb der Zellen unter Glutamin-Restriktion steigenden Massen der Fettsäuren sind somit ein weiteres Indiz für einen LEM.

4.6.7 Cystinanstieg unter Glutamin-Restriktion

Der intrazelluläre Anstieg von Cystin könnte mit dem Cystin/Glutamat-Antiporter-System erklärt werden, welches die oxidierte Form von Cystein Cystin im Austausch gegen Glutamat in die Zellen transportiert und so zur Bildung des geschwindigkeitsbegrenzenden Substrats Cystein in der GSH-Synthese beiträgt (Lewerenz et al., 2013). Dabei wird aus im Medium enthaltenen Glutamin intrazellulär Glutamat synthetisiert, welches im Austausch gegen Cystin an das Medium abgegeben wird (Bannai and Ishii, 1988). Mit der Feststellung, dass eine große Menge an extrazellulärem Glutamat als ein

kompetitiver Inhibitor für den Cystin-Import fungiert (Lewerenz et al., 2013), könnte der intrazelluläre Rückgang der Massen Cystins bei sinkenden Glutamin- und steigenden Glutamatspiegeln extrazellulär unter Kontrollbedingungen zu erklären sein. Die Zellen verbrauchten dabei das im Medium vorherrschende Glutamin, sodass es auf 3 % am fünften Tag absank und bildeten dabei Glutamat, welches sie nach extrazellulär sezernierten und welches somit im Medium vermehrt zu finden war (Abbildung 25). Unter Glutaminmangel-Bedingungen zeigte sich genau der gegenteilige Effekt: Kein extrazelluläres Vorkommen an Glutamin führte zu geringeren Glutamatspiegeln extrazellulär, sodass aufgrund des nötigen Antiports von Glutamat gegen Cystin als Voraussetzung für die GSH-Synthese eine vermehrte intrazelluläre Glutamatsynthese aus Metaboliten des Citratzyklus stattfand. Das gegenregulatorisch erzeugte Glutamat ist an dem gleichbleibend niedrigen Niveau intrazellulär zu erkennen, welches für den Antiport aufrechterhalten werden musste. Dadurch wurde der Cystinimport ermöglicht und die Menge Cystins stieg intrazellulär. Eine Untersuchung an humanen Lungenfibroblastenzellen ergab u. a., dass die Cystinaufnahme schneller als die Glutamat-Freisetzung erfolgte (Thomas et al., 2015). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den rapiden intrazellulären Anstieg Cystins in den unter Glutamin-Restriktion inkubierten Zellen und die dagegen deutlich geringer ausfallenden extrazellulären Massen Glutamats sein. Eine weitere Überlegung, warum sich die Massen des Cystins in den Zellen unter Glutamin-Restriktion erhöhten, könnte eine Akkumulation aufgrund einer verminderten GSH-Synthese sein. GSH, welches aus Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert wird, sank in den Zellen unter Glutamin-Restriktion auf ein Minimum von 4 % am fünften Tag ab. Dies hängt zum einen mit der verminderten Verfügbarkeit von Glutamat zusammen, könnte aber zum anderen auch mit einer verminderten Umwandlung von Cystin in Cystein begründet sein. Für die Synthese von GSH kann zwar auch direkt Cystein herangezogen werden, aber es ist auch eine Weiterverwertung des durch den Antiport gewonnenen Cystins zu Cystein möglich.

4.6.8 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Analyse

Die massenspektrometrische Untersuchung der murinen Modellzelllinie L929, welche über einen Zeitraum von fünf Tagen einer Glutamin-Restriktion ausgesetzt war, zeigte deutliche metabolische Veränderungen bei den über 150 untersuchten Metaboliten im Vergleich zur Kontrolle. Es zeigte sich, dass proliferierende Zellen auf eine exogene Glutaminzufuhr angewiesen sind und eine Glutamin-Restriktion den LEM induzieren sowie das Wachstum begrenzen kann. Aus den Erkenntnissen lässt sich die große

Bedeutung Glutamins für den Stoffwechsel und die Proliferation von L929 ableiten. Da sich eindeutige Merkmale des LEM zeigten, kann in Übereinstimmung mit den in der Einleitung dazu beschriebenen Erkenntnissen die Glutamin-Restriktion als eine Möglichkeit zur LEM-Induktion angesehen werden. So etwa sank der ATP-Gehalt massiv, das AMP/ATP-Verhältnis stieg an und teilweise zeigte sich auch ein gesteigertes NAD^+/NADH -Verhältnis, insbesondere nach einer längeren Inkubationsdauer (Tag fünf). Der Metabolismus unter Glutamin-Restriktion konnte weiterhin von einem Hungerstoffwechsel abgegrenzt werden, da ein Anstieg des Ketonkörpers Acetoacetat ausblieb. Unter Glutamin-Restriktion liefen sowohl der Citratzyklus als auch der PPP leer. Der Citratzyklus wird in Anwesenheit Glutamins durch anaplerotische Reaktionen aufgefüllt, während Glukose für anabole Zwecke genutzt wird. Dies schlug sich in den Massen der Metaboliten des PPP nieder, der Ribose-5-phosphat zur Nukleotidsynthese bereitstellt, da die Zellen hohe intrazelluläre Massen der PPP-Metaboliten unter Kontrollbedingungen, jedoch nicht unter Glutamin-Restriktion aufwiesen. Der Warburg-Effekt zeigte sich in den Zellen der Kontrolle aufgrund der hohen intrazellulären Laktat Spiegel und der immensen Laktatsekretion in den Extrazellularraum. Die Glutamin-Restriktion versetzte dagegen die Zellen in einen LEM, sodass Glukose herangezogen wurde, um den Citratzyklus anzutreiben und die Proliferation gehemmt wurde. Die im Vergleich zur Kontrolle deutlich verminderte Laktatsekretion zeigt, dass die Zellen unter Glutamin-Restriktion weniger proliferierten.

Somit konnte unter Glutamin-Restriktion eine Reduktion des Anabolismus, des Wachstums, der Proliferation sowie der Aminosäure- und somit auch der Proteinsynthese beobachtet werden. Es scheint, als würde der Stoffwechsel unter Glutamin-Restriktion insgesamt langsamer ablaufen. Der verringerte Anabolismus äußerte sich u. a. in einer deutlich verminderten Purin- und Pyrimidinsynthese und einer folglich verminderten Nukleotidsynthese.

4.7 Ausblick

In der Krebsprävention sowie ergänzend zur konventionellen Krebstherapie, bestehend aus Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie, werden neue Ansätze bezüglich des Einflusses der Ernährung sowie der Autophagie diskutiert. Autophagie kann die Entstehung von Krebs verhindern, indem sie Zellen mit chromosomaler Instabilität an ihrer Teilung hindert (Nassour et al., 2019). Hinsichtlich der Krebsprogression ist der Einfluss der Autophagie jedoch aufgrund ihrer Doppelfunktion umstritten, da sie zum einen im Frühstadium von Krebs in einer schützenden Rolle bösartige Transformationen unterdrückt und zum anderen bei etablierten Tumoren das Wachstum unterstützen kann (Lim et al., 2021). Der Nutzen des Fastens in der Krebstherapie wird kontrovers diskutiert, da Fasten mit dem Risiko einer Unterernährung sowie Sarcopenie verbunden sein kann und weil noch nicht abschätzbar ist, inwieweit die an Zell- und Tiermodellen erzielten Ergebnisse auf Krebspatienten übertragen werden können (Caccialanza et al., 2018). In dieser Arbeit konnte die proliferationsbegrenzende Wirkung der Glutamin-Restriktion als eine Form der Protein-Restriktion sowie Spermidins und Spermins als CRMs im zellulären Modellsystem gezeigt werden. Ob sich dadurch auch positive Effekte bei der Therapie des humanen Plattenepithelkarzinoms zeigen könnten, sollte zukünftig in tierexperimentellen Untersuchungen überprüft werden.

Auch wenn es zunächst widersprüchlich erscheint, dass Krebspatienten, von denen schätzungsweise die Hälfte unter Tumor-assoziiertes Kachexie leiden (Aoyagi et al., 2015), von Fastenperioden und Kalorien-/Proteinrestriktion profitieren könnten, gibt es bereits Hinweise für diese Hypothese. So zeigten *in-vivo*-Studien an Mäusen unter Glukose-Restriktion, dass die gesunden Zellen besser vor dem durch eine hochdosierte Chemotherapie ausgelösten oxidativen Stress geschützt waren als die Krebszellen (Raffaghello et al., 2008). Kurzfristiges Hungern (short-term starvation, STS) konnte Gliomzellen für eine Radio- und Chemotherapie sensibilisieren und führte dadurch *in vivo* bei Mäusen zu einem verlängerten Überleben (Safdie et al., 2012). Eine Möglichkeit, über einen langen Zeitraum Autophagie zu induzieren, ohne die Energiezufuhr drastisch zu senken, wäre das intermittierende Fasten, da dadurch täglich die Zellrecyclingprogramme ablaufen und ein Gewichtsverlust als Begleiterscheinung der CR oder des völligen Nahrungsverzichts ausbleibt. Eine Überprüfung aktueller Studien über die Auswirkungen intermittierendes Fastens auf die Prognose von Krebs zeigte, dass die Versuchsergebnisse an Nagetieren umstritten sind und schädliche Auswirkungen nicht ausgeschlossen werden können, jedoch aufgrund der aktuellen Studienlage keine eindeutige Aussage über die Effekte des intermittierenden Fastens

bei Menschen getroffen werden kann (Clifton et al., 2021). Es bedarf somit weiterer Forschung, insbesondere *in vivo*, um die Widersprüche der aktuellen Studien zu klären.

Während sich die Vorläufer Putrescin und N-Acetylputrescin als unwirksam herausstellten, waren die Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen unter Spermidin- und Spermin-Inkubation eindeutig. Für den Einsatz Spermidins und Spermins als CRMs müssen therapeutische Konzentrationen für den Menschen durch *in vivo* Studien bestimmt werden, damit eine Toxizität ausgeschlossen und ideale Plasmaspiegel der Polyamine zur Bekämpfung der Tumorzellen erreicht werden können.

Auf der Ebene des Stoffwechsels konnten mehrere Indizien für eine durch die Glutamin-Restriktion hervorgerufene Induktion des LEM geliefert werden. Ein Hinweis ist das gesteigerte NAD^+/NADH -Verhältnis am zweiten und fünften Tag unter Glutamin-Restriktion. Weiterhin deuten das im Vergleich zur Kontrolle in den ersten drei Tagen vergrößerte AMP/ATP -Verhältnis sowie der rapide Rückgang des universellen Energieträgers ATP auf 2 % am fünften Tag auf einen LEM hin. Ein weiterer Beleg für die Induktion eines LEM ist der geringe determinierte Gehalt Acetoacetats unter Glutamin-Restriktion. Die Ketonkörper Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat decken den Energiebedarf in der Ketose und sind daher in dieser Stoffwechsellumstellung vermehrt zu finden. Da Acetoacetat jedoch nicht unter Glutamin-Restriktion anstieg, kann eine Abgrenzung zum Hungerstoffwechsel angenommen werden. Eine klare Abgrenzung des durch die Glutamin-Restriktion induzierten LEM zur Ketose könnte in weiteren Forschungsarbeiten erfolgen, indem ein metabolisches Profil derselben Zelllinie unter Glukose-Restriktion erstellt, mit dem metabolischen Fingerabdruck unter Glutamin-Restriktion verglichen wird und zudem auch die Ketonkörper Aceton und β -Hydroxybutyrat analysiert werden. Zudem können durch Definition des metabolischen Fingerabdrucks unter Glutamin-Restriktion potentielle CRMs zukünftig auf ihre Wirksamkeit überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Grundsätzlich sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Glutamin-Restriktion als eine Form der Aminosäure-Restriktion auf das Proliferationsverhalten, den Stoffwechsel sowie die Morphologie der murinen Fibroblastenzelllinie L929 untersucht werden. Es sollte dabei auch gezeigt werden, ob sich Indizien für die Induktion eines LEM finden lassen. Weiterhin sollten die Polyamine Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin als CRMs diskutiert und ihr Einfluss auf das Proliferationsverhalten an sieben Zelllinien herausgestellt werden. Der antiproliferative Effekt der Polyamine Spermidin und Spermin auf das Wachstum der untersuchten Zelllinien konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, wobei sich Spermin als potenter erwies als Spermidin. Eine durch Spermidin/Spermin induzierte Autophagie konnte in den Western Blots nicht signifikant nachgewiesen werden. Putrescin und N-Acetylputrescin zeigten nur leichte Wirkungen bei hoher Dosis (10 mM). Während Putrescin einen leicht antiproliferativen Effekt hatte, zeigte N-Acetylputrescin eine leicht proliferationssteigernde Wirkung. Die Autophagie-Induktion durch Methionin-Restriktion konnte durch den Nachweis Autophagie-assoziiierter Proteine in den durchgeführten Western Blots bestätigt werden. Um regelmäßig von den positiven Effekten der Autophagie zu profitieren, wäre eine pflanzenbasierte Ernährungsweise sinnvoll und gut durchführbar, da Methionin hauptsächlich in tierischen Lebensmitteln und nur geringfügig in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommt. Ein völliger Verzicht auf Methionin ist nicht empfehlenswert, da die Aminosäure essentiell ist und somit über die Nahrung aufgenommen werden muss. Um das Methionin-Level konstant, aber niedrig zu halten, erscheint eine Bedarfsdeckung über pflanzliche Nahrung als ideal. Die an den Zelllinien L929 und HeLa durchgeführten Proliferationsstudien zeigten, dass die Zellen selbst nach fünftägiger Glutamin-Restriktion geringfügig weiter proliferierten und keinerlei Merkmale des Zelltodes aufwiesen. Die massenspektrometrische Analyse der Modellzelllinie L929, welche über einen Zeitraum von fünf Tagen einer Glutamin-Restriktion ausgesetzt war, zeigte deutliche metabolische Veränderungen bei den über 150 untersuchten Metaboliten, die auf die Induktion eines LEM schließen lassen. Es konnte ein metabolischer Fingerabdruck nach 48 h für die Zelllinie L929 unter Glutamin-Restriktion definiert werden, der zukünftig als Referenz bei der Testung potentieller CRMs herangezogen werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- ABLES, G. P., PERRONE, C. E., ORENTREICH, D. & ORENTREICH, N. 2012. Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density. *PLoS One*, 7, e51357.
- AHLUWALIA, G. S., GREM, J. L., HAO, Z. & COONEY, D. A. 1990. Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents. *Pharmacol Ther*, 46, 243-71.
- AHMET, I., TAE, H. J., DE CABO, R., LAKATTA, E. G. & TALAN, M. I. 2011. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 263-71.
- ALTMAN, B. J., STINE, Z. E. & DANG, C. V. 2016. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16, 619-34.
- AOYAGI, T., TERRACINA, K. P., RAZA, A., MATSUBARA, H. & TAKABE, K. 2015. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol*, 7, 17-29.
- BADER, A. G., KANG, S., ZHAO, L. & VOGT, P. K. 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*, 5, 921-9.
- BAGGETTO, L. G. 1992. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, 74, 959-74.
- BANNAI, S. & ISHII, T. 1988. A novel function of glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. *J Cell Physiol*, 137, 360-6.
- BÁRCENA, C., QUIRÓS, P. M., DURAND, S., MAYORAL, P., RODRÍGUEZ, F., CARAVIA, X. M., MARIÑO, G., GARABAYA, C., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. T., KROEMER, G., FREIJE, J. M. P. & LÓPEZ-OTÍN, C. 2018. Methionine Restriction Extends Lifespan in Progeroid Mice and Alters Lipid and Bile Acid Metabolism. *Cell Rep*, 24, 2392-2403.
- BARTKE, A. 2005. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology*, 146, 3718-23.
- BATTAGLIA, V., DESTEFANO SHIELDS, C., MURRAY-STEWART, T. & CASERO, R. A., JR. 2014. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids*, 46, 511-9.
- BAUR, J. A., PEARSON, K. J., PRICE, N. L., JAMIESON, H. A., LERIN, C., KALRA, A., PRABHU, V. V., ALLARD, J. S., LOPEZ-LLUCH, G., LEWIS, K., PISTELL, P. J., POOSALA, S., BECKER, K. G., BOSS, O., GWINN, D., WANG, M., RAMASWAMY, S., FISHBEIN, K. W., SPENCER, R. G., LAKATTA, E. G., LE COUTEUR, D., SHAW, R. J., NAVAS, P., PUIGSERVER, P., INGRAM, D. K., DE CABO, R. & SINCLAIR, D. A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-42.
- BEN-SAHRA, I., HOWELL, J. J., ASARA, J. M. & MANNING, B. D. 2013. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339, 1323-8.
- BEN-SAHRA, I. & MANNING, B. D. 2017. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 45, 72-82.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., PANKIV, S., ØVERVATN, A., BRECH, A. & JOHANSEN, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- BOUTANT, M. & CANTÓ, C. 2014. SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models. *Mol Metab*, 3, 5-18.

- BRAND, K. 1985. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem J*, 228, 353-61.
- BRANDHORST, S., CHOI, I. Y., WEI, M., CHENG, C. W., SEDRAKYAN, S., NAVARRETE, G., DUBEAU, L., YAP, L. P., PARK, R., VINCIGUERRA, M., DI BIASE, S., MIRZAEI, H., MIRISOLA, M. G., CHILDRESS, P., JI, L., GROSHEN, S., PENNA, F., ODETTI, P., PERIN, L., CONTI, P. S., IKENO, Y., KENNEDY, B. K., COHEN, P., MORGAN, T. E., DORFF, T. B. & LONGO, V. D. 2015. A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metab*, 22, 86-99.
- BRUNET, A., SWEENEY, L. B., STURGILL, J. F., CHUA, K. F., GREER, P. L., LIN, Y., TRAN, H., ROSS, S. E., MOSTOSLAVSKY, R., COHEN, H. Y., HU, L. S., CHENG, H. L., JEDRYCHOWSKI, M. P., GYGI, S. P., SINCLAIR, D. A., ALT, F. W. & GREENBERG, M. E. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303, 2011-5.
- CACCIALANZA, R., CEREDA, E., DE LORENZO, F., FARINA, G., PEDRAZZOLI, P. & ON BEHALF OF THE, A.-S.-F. W. G. 2018. To fast, or not to fast before chemotherapy, that is the question. *BMC Cancer*, 18, 337.
- CARO, P., GÓMEZ, J., LÓPEZ-TORRES, M., SÁNCHEZ, I., NAUDÍ, A., JOVE, M., PAMPLONA, R. & BARJA, G. 2008. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology*, 9, 183-96.
- CASERO, R. A., JR., MURRAY STEWART, T. & PEGG, A. E. 2018. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*, 18, 681-695.
- CAVUOTO, P. & FENECH, M. F. 2012. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev*, 38, 726-36.
- CELLARIER, E., DURANDO, X., VASSON, M. P., FARGES, M. C., DEMIDEN, A., MAURIZIS, J. C., MADELMONT, J. C. & CHOLLET, P. 2003. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 29, 489-99.
- CHANG, H. C. & GUARENTE, L. 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 138-45.
- CHANG, J. S., LO, H. I., WONG, T. Y., HUANG, C. C., LEE, W. T., TSAI, S. T., CHEN, K. C., YEN, C. J., WU, Y. H., HSUEH, W. T., YANG, M. W., WU, S. Y., CHANG, K. Y., CHANG, J. Y., OU, C. Y., WANG, Y. H., WENG, Y. L., YANG, H. C., WANG, F. T., LIN, C. L., HUANG, J. S. & HSIAO, J. R. 2013. Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. *Oral Oncol*, 49, 1010-7.
- CHEN, S., HU, H., MIAO, S., ZHENG, J., XIE, Z. & ZHAO, H. 2017. Anti-tumor effect of cisplatin in human oral squamous cell carcinoma was enhanced by andrographolide via upregulation of phospho-p53 in vitro and in vivo. *Tumour Biol*, 39, 1010428317705330.
- CHEN, Y., ZHUANG, H., CHEN, X., SHI, Z. & WANG, X. 2018. Spermidine-induced growth inhibition and apoptosis via autophagic activation in cervical cancer. *Oncol Rep*, 39, 2845-2854.
- CLIFTON, K. K., MA, C. X., FONTANA, L. & PETERSON, L. L. 2021. Intermittent fasting in the prevention and treatment of cancer. *CA Cancer J Clin*, 71, 527-546.
- CLUNTUN, A. A., LUKEY, M. J., CERIONE, R. A. & LOCASALE, J. W. 2017. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*, 3, 169-180.
- COLMAN, R. J., ANDERSON, R. M., JOHNSON, S. C., KASTMAN, E. K., KOSMATKA, K. J., BEASLEY, T. M., ALLISON, D. B., CRUZEN, C., SIMMONS, H. A., KEMNITZ, J. W. & WEINDRUCH, R. 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325, 201-4.

- CSISZAR, A., LABINSKY, N., JIMENEZ, R., PINTO, J. T., BALLABH, P., LOSONCZY, G., PEARSON, K. J., DE CABO, R. & UNGVARI, Z. 2009. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev*, 130, 518-27.
- DARICI, S., ALKHALDI, H., HORNE, G., JØRGENSEN, H. G., MARMIROLI, S. & HUANG, X. 2020. Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence. *J Clin Med*, 9.
- DEBERARDINIS, R. J., MANCUSO, A., DAIKHIN, E., NISSIM, I., YUDKOFF, M., WEHRLI, S. & THOMPSON, C. B. 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19345-50.
- DEBERARDINIS, R. J., SAYED, N., DITSWORTH, D. & THOMPSON, C. B. 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 54-61.
- DHAHBI, J. M., MOTE, P. L., FAHY, G. M. & SPINDLER, S. R. 2005. Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling. *Physiol Genomics*, 23, 343-50.
- DIKIC, I. & ELAZAR, Z. 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 349-364.
- DÖBROSSY, L. 2005. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*, 24, 9-17.
- DURIE, B. G., SALMON, S. E. & RUSSELL, D. H. 1977. Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 37, 214-21.
- DÜVEL, K., YECIES, J. L., MENON, S., RAMAN, P., LIPOVSKY, A. I., SOUZA, A. L., TRIANTAFELLOW, E., MA, Q., GORSKI, R., CLEAVER, S., VANDER HEIDEN, M. G., MACKEIGAN, J. P., FINAN, P. M., CLISH, C. B., MURPHY, L. O. & MANNING, B. D. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39, 171-83.
- ELMETS, C. A. & ATHAR, M. 2010. Targeting ornithine decarboxylase for the prevention of nonmelanoma skin cancer in humans. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 8-11.
- ERTL, R. P., CHEN, J., ASTLE, C. M., DUFFY, T. M. & HARRISON, D. E. 2008. Effects of dietary restriction on hematopoietic stem-cell aging are genetically regulated. *Blood*, 111, 1709-1716.
- FARRIOL, M., SEGOVIA-SILVESTRE, T., CASTELLANOS, J. M., VENEREO, Y. & ORTA, X. 2001. Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition*, 17, 934-8.
- FEIGE, J. N., LAGOUGE, M., CANTO, C., STREHLE, A., HOUTEN, S. M., MILNE, J. C., LAMBERT, P. D., MATAKI, C., ELLIOTT, P. J. & AUWERX, J. 2008. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*, 8, 347-58.
- FELLER, L., BOUCKAERT, M., CHIKTE, U. M., WOOD, N. H., KHAMMISSA, R. A., MEYEROV, R. & LENNER, J. 2010. A short account of cancer--specifically in relation to squamous cell carcinoma. *Sadj*, 65, 322-4.
- FELLER, L. L., KHAMMISSA, R. R., KRAMER, B. B. & LEMMER, J. J. 2013. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int*, 13, 31.
- FEUERSTEIN, B. G., WILLIAMS, L. D., BASU, H. S. & MARTON, L. J. 1991. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J Cell Biochem*, 46, 37-47.
- FISHER, F. M., ESTALL, J. L., ADAMS, A. C., ANTONELLIS, P. J., BINA, H. A., FLIER, J. S., KHARITONENKOV, A., SPIEGELMAN, B. M. & MARATOS-FLIER, E. 2011. Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology*, 152, 2996-3004.
- FISHER, F. M. & MARATOS-FLIER, E. 2016. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol*, 78, 223-41.
- FONTANA, L., PARTRIDGE, L. & LONGO, V. D. 2010. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328, 321-6.

- FORNIERI, C., TAPARELLI, F., QUAGLINO, D., JR., CONTRI, M. B., DAVIDSON, J. M., ALGERI, S. & RONCHETTI, I. P. 1999. The effect of caloric restriction on the aortic tissue of aging rats. *Connect Tissue Res*, 40, 131-43.
- GERNER, E. W. & MEYSKENS, F. L., JR. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*, 4, 781-92.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- GOTTFRIED, E., KUNZ-SCHUGHART, L. A., EBNER, S., MUELLER-KLIESER, W., HOVES, S., ANDREESEN, R., MACKENSEN, A. & KREUTZ, M. 2006. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, 107, 2013-21.
- GROSSARD, C., MOREL, I., CHEVANNE, M., MONNIER, M., CILLARD, J. & DELAMARCHE, A. 2000. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol (1985)*, 89, 169-75.
- GU, X., OROZCO, J. M., SAXTON, R. A., CONDON, K. J., LIU, G. Y., KRAWCZYK, P. A., SCARIA, S. M., HARPER, J. W., GYGI, S. P. & SABATINI, D. M. 2017. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 358, 813-818.
- GUARENTE, L. 2005. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev*, 126, 923-8.
- GUARENTE, L. 2006. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*, 444, 868-74.
- GUO, H. Y., HERRERA, H., GROCE, A. & HOFFMAN, R. M. 1993. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res*, 53, 2479-83.
- GUO, Z., MITCHELL-RAYMUNDO, F., YANG, H., IKENO, Y., NELSON, J., DIAZ, V., RICHARDSON, A. & REDDICK, R. 2002. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mech Ageing Dev*, 123, 1121-31.
- GUPTA, S., AHMAD, N., MARENGO, S. R., MACLENNAN, G. T., GREENBERG, N. M. & MUKHTAR, H. 2000. Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice. *Cancer Res*, 60, 5125-33.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HA, H. C., SIRISOMA, N. S., KUPPUSAMY, P., ZWEIER, J. L., WOSTER, P. M. & CASERO, R. A., JR. 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11140-5.
- HALPERN, B. C., CLARK, B. R., HARDY, D. N., HALPERN, R. M. & SMITH, R. A. 1974. The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1133-6.
- HANSEN, M., TAUBERT, S., CRAWFORD, D., LIBINA, N., LEE, S. J. & KENYON, C. 2007. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Ageing Cell*, 6, 95-110.
- HARDIE, D. G. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25, 1895-908.
- HARRISON, D. E., STRONG, R., SHARP, Z. D., NELSON, J. F., ASTLE, C. M., FLURKEY, K., NADON, N. L., WILKINSON, J. E., FRENKEL, K., CARTER, C. S., PAHOR, M., JAVORS, M. A., FERNANDEZ, E. & MILLER, R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460, 392-5.
- HARSHA, C., BANIK, K., ANG, H. L., GIRISA, S., VIKKURTHI, R., PARAMA, D., RANA, V., SHABNAM, B., KHATOON, E., KUMAR, A. P. & KUNNUMAKKARA, A. B. 2020. Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *Int J Mol Sci*, 21.

- HASHIBE, M., BRENNAN, P., BENHAMOU, S., CASTELLSAGUE, X., CHEN, C., CURADO, M. P., DAL MASO, L., DAUDT, A. W., FABIANOVA, E., FERNANDEZ, L., WÜNSCH-FILHO, V., FRANCESCHI, S., HAYES, R. B., HERRERO, R., KOIFMAN, S., LA VECCHIA, C., LAZARUS, P., LEVI, F., MATES, D., MATOS, E., MENEZES, A., MUSCAT, J., ELUF-NETO, J., OLSHAN, A. F., RUDNAI, P., SCHWARTZ, S. M., SMITH, E., STURGIS, E. M., SZESZENIA-DABROWSKA, N., TALAMINI, R., WEI, Q., WINN, D. M., ZARIDZE, D., ZATONSKI, W., ZHANG, Z. F., BERTHILLER, J. & BOFFETTA, P. 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*, 99, 777-89.
- HE, H., DANG, Y., DAI, F., GUO, Z., WU, J., SHE, X., PEI, Y., CHEN, Y., LING, W., WU, C., ZHAO, S., LIU, J. O. & YU, L. 2003. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem*, 278, 29278-87.
- HE, L., ZHANG, J., ZHAO, J., MA, N., KIM, S. W., QIAO, S. & MA, X. 2018. Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv Nutr*, 9, 493-504.
- HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Berlin Heidelberg.
- HERNANDEZ-AYA, L. F. & GONZALEZ-ANGULO, A. M. 2011. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist*, 16, 404-14.
- HERZIG, S. & SHAW, R. J. 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 121-135.
- HOSIOS, A. M., HECHT, V. C., DANAI, L. V., JOHNSON, M. O., RATHMELL, J. C., STEINHAUSER, M. L., MANALIS, S. R. & VANDER HEIDEN, M. G. 2016. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*, 36, 540-9.
- HOUTEN, S. M. & WANDERS, R. J. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis*, 33, 469-77.
- HOUTHOOFD, K. & VANFLETEREN, J. R. 2006. The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 41, 1026-31.
- INAGAKI, T., DUTCHAK, P., ZHAO, G., DING, X., GAUTRON, L., PARAMESWARA, V., LI, Y., GOETZ, R., MOHAMMADI, M., ESSER, V., ELMQUIST, J. K., GERARD, R. D., BURGESS, S. C., HAMMER, R. E., MANGELSDORF, D. J. & KLIEWER, S. A. 2007. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab*, 5, 415-25.
- INOKI, K., ZHU, T. & GUAN, K. L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577-90.
- JACINTO, E., LOEWITH, R., SCHMIDT, A., LIN, S., RÜEGG, M. A., HALL, A. & HALL, M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6, 1122-8.
- JAIN, M., NILSSON, R., SHARMA, S., MADHUSUDHAN, N., KITAMI, T., SOUZA, A. L., KAFRI, R., KIRSCHNER, M. W., CLISH, C. B. & MOOTHA, V. K. 2012. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336, 1040-4.
- JEON, S. M. 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med*, 48, e245.
- JEONG, H., COHEN, D. E., CUI, L., SUPINSKI, A., SAVAS, J. N., MAZZULLI, J. R., YATES, J. R., 3RD, BORDONE, L., GUARENTE, L. & KRAINC, D. 2011. Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med*, 18, 159-65.

- JETHWA, A. R. & KHARIWALA, S. S. 2017. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 36, 411-423.
- JEWELL, J. L., RUSSELL, R. C. & GUAN, K. L. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 133-9.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19, 5720-8.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., OSHITANI-OKAMOTO, S., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117, 2805-12.
- KAEBERLEIN, M., POWERS, R. W., 3RD, STEFFEN, K. K., WESTMAN, E. A., HU, D., DANG, N., KERR, E. O., KIRKLAND, K. T., FIELDS, S. & KENNEDY, B. K. 2005. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310, 1193-6.
- KAPAH, P., ZID, B. M., HARPER, T., KOSLOVER, D., SAPIN, V. & BENZER, S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*, 14, 885-90.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163-75.
- KIM, E., GORAKSHA-HICKS, P., LI, L., NEUFELD, T. P. & GUAN, K. L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10, 935-45.
- KITADA, M., XU, J., OGURA, Y., MONNO, I. & KOYA, D. 2020. Mechanism of Activation of Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 by Methionine. *Front Cell Dev Biol*, 8, 715.
- KLIONSKY, D. J., ABDELMOHSEN, K., ABE, A., ABEDIN, M. J., ABELIOVICH, H., ACEVEDO AROZENA, A., ADACHI, H., ADAMS, C. M., ADAMS, P. D., ADELI, K., ADHIHETTY, P. J., ADLER, S. G., AGAM, G., AGARWAL, R., AGHI, M. K., AGNELLO, M., AGOSTINIS, P., AGUILAR, P. V., AGUIRRE-GHISO, J., AIROLDI, E. M., AIT-SI-ALI, S., AKEMATSU, T., AKPORIAYE, E. T., AL-RUBEAI, M., ALBAICETA, G. M., ALBANESE, C., ALBANI, D., ALBERT, M. L., ALDUDO, J., ALGÜL, H., ALIREZAEI, M., ALLOZA, I., ALMASAN, A., ALMONTE-BECERIL, M., ALNEMRI, E. S., ALONSO, C., ALTAN-BONNET, N., ALTIERI, D. C., ALVAREZ, S., ALVAREZ-ERVITI, L., ALVES, S., AMADORO, G., AMANO, A., AMANTINI, C., AMBROSIO, S., AMELIO, I., AMER, A. O., AMESSOU, M., AMON, A., AN, Z., ANANIA, F. A., ANDERSEN, S. U., ANDLEY, U. P., ANDREADI, C. K., ANDRIEU-ABADIE, N., ANEL, A., ANN, D. K., ANOOPKUMAR-DUKIE, S., ANTONIOLI, M., AOKI, H., APOSTOLOVA, N., AQUILA, S., AQUILANO, K., ARAKI, K., ARAMA, E., ARANDA, A., ARAYA, J., ARCARO, A., ARIAS, E., ARIMOTO, H., ARIOSA, A. R., ARMSTRONG, J. L., ARNOULD, T., ARSOV, I., ASANUMA, K., ASKANAS, V., ASSELIN, E., ATARASHI, R., ATHERTON, S. S., ATKIN, J. D., ATTARDI, L. D., AUBERGER, P., AUBURGER, G., AURELIAN, L., AUTELLI, R., AVAGLIANO, L., AVANTAGGIATI, M. L., AVRAHAMI, L., AWALE, S., AZAD, N., BACHETTI, T., BACKER, J. M., BAE, D. H., BAE, J. S., BAE, O. N., BAE, S. H., BAEHRECKE, E. H., BAEK, S. H., BAGHDIGUIAN, S., BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A., et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12, 1-222.
- KOKKINAKIS, D. M., LIU, X., CHADA, S., AHMED, M. M., SHAREEF, M. M., SINGHA, U. K., YANG, S. & LUO, J. 2004. Modulation of gene expression in human central nervous system tumors under methionine deprivation-induced stress. *Cancer Res*, 64, 7513-25.

- KOONTONGKAEW, S. 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*, 4, 66-83.
- KOUKOURAKIS, M. I., KALAMIDA, D., GIATROMANOLAKI, A., ZOIS, C. E., SIVRIDIS, E., POULILIOU, S., MITRAKAS, A., GATTER, K. C. & HARRIS, A. L. 2015. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 10, e0137675.
- KOVACEVIĆ, Z., BRKLJAC, O. & BAJIN, K. 1991. Control and function of the transamination pathways of glutamine oxidation in tumour cells. *Biochem J*, 273(Pt 2), 271-5.
- KRITCHEVSKY, D. 2001. Caloric Restriction and Cancer. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47, 13-19.
- KULIS, M. & ESTELLER, M. 2010. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 70, 27-56.
- KURATA, H. T., MARTON, L. J. & NICHOLS, C. G. 2006. The polyamine binding site in inward rectifier K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 127, 467-80.
- LACEY, J. M. & WILMORE, D. W. 1990. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev*, 48, 297-309.
- LAGOUGE, M., ARGMANN, C., GERHART-HINES, Z., MEZIANE, H., LERIN, C., DAUSSIN, F., MESSADEQ, N., MILNE, J., LAMBERT, P., ELLIOTT, P., GENY, B., LAAKSO, M., PUIGSERVER, P. & AUWERX, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127, 1109-22.
- LANE, A. N. & FAN, T. W. 2015. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res*, 43, 2466-85.
- LARON, Z. 2001. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*, 54, 311-6.
- LAXMAN, S., SUTTER, B. M. & TU, B. P. 2014. Methionine is a signal of amino acid sufficiency that inhibits autophagy through the methylation of PP2A. *Autophagy*, 10, 386-7.
- LEFEBVRE, J. L. 2005. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol*, 16 Suppl 6, vi7-vi12.
- LEWERENZ, J., HEWETT, S. J., HUANG, Y., LAMBROS, M., GOUT, P. W., KALIVAS, P. W., MASSIE, A., SMOLDERS, I., METHNER, A., PERGANDE, M., SMITH, S. B., GANAPATHY, V. & MAHER, P. 2013. The cystine/glutamate antiporter system x(c)⁻ in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 18, 522-55.
- LIBERT, S. & GUARENTE, L. 2013. Metabolic and neuropsychiatric effects of calorie restriction and sirtuins. *Annu Rev Physiol*, 75, 669-84.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- LIM, S. M., MOHAMAD HANIF, E. A. & CHIN, S.-F. 2021. Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell & Bioscience*, 11, 56.
- LIN, S. J., DEFOSSEZ, P. A. & GUARENTE, L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289, 2126-8.
- LINDEMANN, A., TAKAHASHI, H., PATEL, A. A., OSMAN, A. A. & MYERS, J. N. 2018. Targeting the DNA Damage Response in OSCC with TP53 Mutations. *J Dent Res*, 97, 635-644.
- LIU, G., YU, L., FANG, J., HU, C. A., YIN, J., NI, H., REN, W., DURAIKANDIYAN, V., CHEN, S., AL-DHABI, N. A. & YIN, Y. 2017. Methionine restriction on oxidative stress and immune response in dss-induced colitis mice. *Oncotarget*, 8, 44511-44520.
- LONG, X., LIN, Y., ORTIZ-VEGA, S., YONEZAWA, K. & AVRUCH, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*, 15, 702-13.

- LONGO, N., AMAT DI SAN FILIPPO, C. & PASQUALI, M. 2006. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 142c, 77-85.
- LONGO, V. D. & FONTANA, L. 2010. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 89-98.
- LUCENTEFORTE, E., GARAVELLO, W., BOSETTI, C. & LA VECCHIA, C. 2009. Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncol*, 45, 461-7.
- LUENGO, A., GUI, D. Y. & VANDER HEIDEN, M. G. 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24, 1161-1180.
- MADDINENI, S., NICHENAMETLA, S., SINHA, R., WILSON, R. P. & RICHIE, J. P., JR. 2013. Methionine restriction affects oxidative stress and glutathione-related redox pathways in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238, 392-9.
- MADEO, F., PIETROCOLA, F., EISENBERG, T. & KROEMER, G. 2014. Caloric restriction mimetics: towards a molecular definition. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 727-40.
- MALLOY, V. L., KRAJCIK, R. A., BAILEY, S. J., HRISTOPOULOS, G., PLUMMER, J. D. & ORENTREICH, N. 2006. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell*, 5, 305-14.
- MANDAL, S., MANDAL, A., JOHANSSON, H. E., ORJALO, A. V. & PARK, M. H. 2013. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 2169-2174.
- MANNI, A., GROVE, R., KUNSELMAN, S. & ALDAZ, C. M. 1995. Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett*, 92, 49-57.
- MANNI, A., MAUGER, D., GIMOTTY, P. & BADGER, B. 1996. Prognostic influence on survival of increased ornithine decarboxylase activity in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2, 1901-6.
- MARI, D. 2011. Role of the IGF/insulin system in longevity. *Minerva Endocrinol*, 36, 181-5.
- MARKAN, K. R., NABER, M. C., AMEKA, M. K., ANDEREGG, M. D., MANGELSDORF, D. J., KLIEWER, S. A., MOHAMMADI, M. & POTTHOFF, M. J. 2014. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes*, 63, 4057-63.
- MARTÍNEZ, Y., LI, X., LIU, G., BIN, P., YAN, W., MÁZ, D., VALDIVIÉ, M., HU, C. A., REN, W. & YIN, Y. 2017. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49, 2091-2098.
- MARTÍNEZ-GARZA, Ú., TORRES-OTEROS, D., YARRITU-GALLEGO, A., MARRERO, P. F., HARO, D. & RELAT, J. 2019. Fibroblast Growth Factor 21 and the Adaptive Response to Nutritional Challenges. *Int J Mol Sci*, 20.
- MATTHEWS, H. R. 1993. Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays*, 15, 561-6.
- MATTSON, M. P., CHAN, S. L. & DUAN, W. 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev*, 82, 637-72.
- MECHAM, J. O., ROWITCH, D., WALLACE, C. D., STERN, P. H. & HOFFMAN, R. M. 1983. The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 117, 429-34.
- MICHAN, S. & SINCLAIR, D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404, 1-13.
- MILLER, R. A., BUEHNER, G., CHANG, Y., HARPER, J. M., SIGLER, R. & SMITH-WHELOCK, M. 2005. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*, 4, 119-25.

- MIZUSHIMA, N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2491-502.
- MOFFATT, B. A. & ASHIHARA, H. 2002. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 1, e0018.
- MOREADITH, R. W. & LEHNINGER, A. L. 1984. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J Biol Chem*, 259, 6215-21.
- MOTTA, M. C., DIVECHA, N., LEMIEUX, M., KAMEL, C., CHEN, D., GU, W., BULTSMA, Y., MCBURNEY, M. & GUARENTE, L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 116, 551-63.
- NAKATOGAWA, H., ICHIMURA, Y. & OHSUMI, Y. 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130, 165-78.
- NAKATOGAWA, H., SUZUKI, K., KAMADA, Y. & OHSUMI, Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 458-67.
- NASSOUR, J., RADFORD, R., CORREIA, A., FUSTÉ, J. M., SCHOELL, B., JAUCH, A., SHAW, R. J. & KARLSEDER, J. 2019. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature*, 565, 659-663.
- NESBIT, C. E., TERSAK, J. M. & PROCHOWNIK, E. V. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18, 3004-16.
- NESKEY, D. M., OSMAN, A. A., OW, T. J., KATSONIS, P., MCDONALD, T., HICKS, S. C., HSU, T. K., PICKERING, C. R., WARD, A., PATEL, A., YORDY, J. S., SKINNER, H. D., GIRI, U., SANO, D., STORY, M. D., BEADLE, B. M., EL-NAGGAR, A. K., KIES, M. S., WILLIAM, W. N., CAULIN, C., FREDERICK, M., KIMMEL, M., MYERS, J. N. & LICHTARGE, O. 2015. Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. *Cancer Res*, 75, 1527-36.
- NICKLIN, P., BERGMAN, P., ZHANG, B., TRIANTAFELLOW, E., WANG, H., NYFELER, B., YANG, H., HILD, M., KUNG, C., WILSON, C., MYER, V. E., MACKEIGAN, J. P., PORTER, J. A., WANG, Y. K., CANTLEY, L. C., FINAN, P. M. & MURPHY, L. O. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 136, 521-34.
- NODA, T. & OHSUMI, Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273, 3963-6.
- NOESKE, K. 1966. Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie*, 7, 273-287.
- NOH, H. S., HAH, Y. S., ZADA, S., HA, J. H., SIM, G., HWANG, J. S., LAI, T. H., NGUYEN, H. Q., PARK, J. Y., KIM, H. J., BYUN, J. H., HAHM, J. R., KANG, K. R. & KIM, D. R. 2016. PEBP1, a RAF kinase inhibitory protein, negatively regulates starvation-induced autophagy by direct interaction with LC3. *Autophagy*, 12, 2183-2196.
- NOWOTARSKI, S. L., WOSTER, P. M. & CASERO, R. A., JR. 2013a. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert reviews in molecular medicine*, 15, e3-e3.
- NOWOTARSKI, S. L., WOSTER, P. M. & CASERO, R. A., JR. 2013b. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med*, 15, e3.
- O'CONNELL, B. C., CHEUNG, A. F., SIMKEVICH, C. P., TAM, W., REN, X., MATEYAK, M. K. & SEDIVY, J. M. 2003. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem*, 278, 12563-73.
- ORENTREICH, N., MATIAS, J. R., DEFELICE, A. & ZIMMERMAN, J. A. 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr*, 123, 269-74.
- ORNITZ, D. M. & ITOH, N. 2015. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4, 215-66.

- PAI, S., BAMODU, O. A., LIN, Y. K., LIN, C. S., CHU, P. Y., CHIEN, M. H., WANG, L. S., HSIAO, M., YE, C. T. & TSAI, J. T. 2019. CD47-SIRP α Signaling Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness and Links to a Poor Prognosis in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cells*, 8.
- PAMPLONA, R. & BARJA, G. 2006. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 496-508.
- PANARESE, I., AQUINO, G., RONCHI, A., LONGO, F., MONTELLA, M., COZZOLINO, I., ROCCUZZO, G., COLELLA, G., CARAGLIA, M. & FRANCO, R. 2019. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. *Expert Rev Anticancer Ther*, 19, 105-119.
- PANOWSKI, S. H. & DILLIN, A. 2009. Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 259-64.
- PARTRIDGE, L., PIPER, M. D. & MAIR, W. 2005. Dietary restriction in *Drosophila*. *Mech Ageing Dev*, 126, 938-50.
- PATEL, D., MENON, D., BERNFELD, E., MROZ, V., KALAN, S., LOAYZA, D. & FOSTER, D. A. 2016. Aspartate Rescues S-phase Arrest Caused by Suppression of Glutamine Utilization in KRas-driven Cancer Cells. *J Biol Chem*, 291, 9322-9.
- PATIL, S., RAO, R. S. & RAJ, A. T. 2015. Dual Role of Autophagy in Oral Cancer. *J Int Oral Health*, 7, i-ii.
- PEGG, A. E. 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res*, 48, 759-74.
- PÉREZ-MARTÍ, A., SANDOVAL, V., MARRERO, P. F., HARO, D. & RELAT, J. 2016. Nutritional regulation of fibroblast growth factor 21: from macronutrients to bioactive dietary compounds. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 30.
- PÉREZ-SAYÁNS, M., SOMOZA-MARTÍN, J. M., BARROS-ANGUEIRA, F., REBOIRAS-LÓPEZ, M. D., GÁNDARA REY, J. M. & GARCÍA-GARCÍA, A. 2009. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep*, 22, 1277-82.
- PETCH, D. & BUTLER, M. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J Cell Physiol*, 161, 71-6.
- PETERSON, T. R., LAPLANTE, M., THOREN, C. C., SANCAK, Y., KANG, S. A., KUEHL, W. M., GRAY, N. S. & SABATINI, D. M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137, 873-86.
- PFEIFFER, T., SCHUSTER, S. & BONHOEFFER, S. 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292, 504-7.
- PHOENIX, K. N., VUMBACA, F., FOX, M. M., EVANS, R. & CLAFFEY, K. P. 2010. Dietary energy availability affects primary and metastatic breast cancer and metformin efficacy. *Breast Cancer Res Treat*, 123, 333-44.
- PIERDOMINICI, M., VOMERO, M., BARBATI, C., COLASANTI, T., MASELLI, A., VACIRCA, D., GIOVANNETTI, A., MALORNI, W. & ORTONA, E. 2012. Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. *The FASEB Journal*, 26, 1400-1412.
- PIETROCOLA, F., POL, J., VACCHELLI, E., RAO, S., ENOT, D. P., BARACCO, E. E., LEVESQUE, S., CASTOLDI, F., JACQUELOT, N., YAMAZAKI, T., SENOVILLA, L., MARINO, G., ARANDA, F., DURAND, S., SICA, V., CHERY, A., LACHKAR, S., SIGL, V., BLOY, N., BUQUE, A., FALZONI, S., RYFFEL, B., APETOH, L., DI VIRGILIO, F., MADEO, F., MAIURI, M. C., ZITVOGEL, L., LEVINE, B., PENNINGER, J. M. & KROEMER, G. 2016. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell*, 30, 147-160.
- POTTHOFF, M. J. & FINCK, B. N. 2014. Head over hepatocytes for FGF21. *Diabetes*, 63, 4013-5.
- POTTHOFF, M. J., INAGAKI, T., SATAPATI, S., DING, X., HE, T., GOETZ, R., MOHAMMADI, M., FINCK, B. N., MANGELSDORF, D. J., KLIEWER, S. A. & BURGESS, S. C. 2009. FGF21

- induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10853-8.
- RAFFAGHELLO, L., LEE, C., SAFDIE, F. M., WEI, M., MADIA, F., BIANCHI, G. & LONGO, V. D. 2008. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8215-20.
- REIDY, J., MCHUGH, E. & STASSEN, L. F. 2011. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*, 9, 278-83.
- REITZER, L. J., WICE, B. M. & KENNELL, D. 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, 254, 2669-76.
- RICHIE, J. P., JR., LEUTZINGER, Y., PARTHASARATHY, S., MALLOY, V., ORENTREICH, N. & ZIMMERMAN, J. A. 1994. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *Faseb j*, 8, 1302-7.
- RIPPE, C., LESNIEWSKI, L., CONNELL, M., LAROCCA, T., DONATO, A. & SEALS, D. 2010. Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. *Aging Cell*, 9, 304-12.
- RIVERA, C. 2015. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 11884-94.
- RODGERS, J. T., LERIN, C., HAAS, W., GYGI, S. P., SPIEGELMAN, B. M. & PUIGSERVER, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434, 113-8.
- RODGERS, J. T. & PUIGSERVER, P. 2007. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12861-6.
- ROSSI, D. J., BRYDER, D., ZAHN, J. M., AHLENIUS, H., SONU, R., WAGERS, A. J. & WEISSMAN, I. L. 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9194-9.
- RUCKENSTUHL, C., NETZBERGER, C., ENTFELLNER, I., CARMONA-GUTIERREZ, D., KICKENWEIZ, T., STEKOVIC, S., GLEIXNER, C., SCHMID, C., KLUG, L., SORGO, A. G., EISENBERG, T., BUTTNER, S., MARINO, G., KOZIEL, R., JANSEN-DURR, P., FROHLICH, K. U., KROEMER, G. & MADEO, F. 2014. Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS Genet*, 10, e1004347.
- SAFDIE, F., BRANDHORST, S., WEI, M., WANG, W., LEE, C., HWANG, S., CONTI, P. S., CHEN, T. C. & LONGO, V. D. 2012. Fasting Enhances the Response of Glioma to Chemo- and Radiotherapy. *PLOS ONE*, 7, e44603.
- SAMBANDAM, Y., SAKAMURI, S., BALASUBRAMANIAN, S. & HAQUE, A. 2016. RANK Ligand Modulation of Autophagy in Oral Squamous Cell Carcinoma Tumor Cells. *J Cell Biochem*, 117, 118-25.
- SANCAK, Y., PETERSON, T. R., SHAUL, Y. D., LINDQUIST, R. A., THOREEN, C. C., BAR-PELED, L. & SABATINI, D. M. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320, 1496-501.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SAYED, S. I., DWIVEDI, R. C., KATNA, R., GARG, A., PATHAK, K. A., NUTTING, C. M., RHYS-EVANS, P., HARRINGTON, K. J. & KAZI, R. 2011. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol*, 47, 237-43.
- SCHMITZ, W., KODERER, C., EL-MESERY, M., GUBIK, S., SAMPERS, R., STRAUB, A., KÜBLER, A. C. & SEHER, A. 2021. Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction. *Int J Mol Sci*, 22.

- SCHUBER, F. 1989. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J*, 260, 1-10.
- SCOTT, R. C., SCHULDINER, O. & NEUFELD, T. P. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev Cell*, 7, 167-78.
- SHARMA, S., DIXON, T., JUNG, S., GRAFF, E. C., FORNEY, L. A., GETTYS, T. W. & WANDERS, D. 2019. Dietary Methionine Restriction Reduces Inflammation Independent of FGF21 Action. *Obesity (Silver Spring)*, 27, 1305-1313.
- SHINTANI, T. & KLIONSKY, D. J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306, 990-5.
- SINCLAIR, P. D. D. A., LAPLANTE, P. M. D. & VOGEL, S. 2019. *Das Ende des Alterns: Die revolutionäre Medizin von morgen (Lifespan)*, DUMONT Buchverlag.
- SLAVOV, N., BUDNIK, B. A., SCHWAB, D., AIROLDI, E. M. & VAN OUDENAARDEN, A. 2014. Constant growth rate can be supported by decreasing energy flux and increasing aerobic glycolysis. *Cell Rep*, 7, 705-14.
- SODA, K. 2011. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 95.
- SOFER, A., LEI, K., JOHANNESSEN, C. M. & ELLISEN, L. W. 2005. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*, 25, 5834-45.
- SON, J., LYSSIOTIS, C. A., YING, H., WANG, X., HUA, S., LIGORIO, M., PERERA, R. M., FERRONE, C. R., MULLARKY, E., SHYH-CHANG, N., KANG, Y., FLEMING, J. B., BARDEESY, N., ASARA, J. M., HAIGIS, M. C., DEPINHO, R. A., CANTLEY, L. C. & KIMMELMAN, A. C. 2013. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*, 496, 101-5.
- SONNTAG, W. E., LYNCH, C. D., CEFALU, W. T., INGRAM, R. L., BENNETT, S. A., THORNTON, P. L. & KHAN, A. S. 1999. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: inferences from moderate caloric-restricted animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 54, B521-38.
- STOPPANI, J., HILDEBRANDT, A. L., SAKAMOTO, K., CAMERON-SMITH, D., GOODYEAR, L. J. & NEUFER, P. D. 2002. AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E1239-48.
- SUTTER, B. M., WU, X., LAXMAN, S. & TU, B. P. 2013. Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A. *Cell*, 154, 403-15.
- SYRJÄNEN, S., LODI, G., VON BÜLTZINGSLÖWEN, I., ALIKO, A., ARDUINO, P., CAMPISI, G., CHALLACOMBE, S., FICARRA, G., FLAITZ, C., ZHOU, H. M., MAEDA, H., MILLER, C. & JONTELL, M. 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*, 17 Suppl 1, 58-72.
- TAMANNA, N., KROEKER, K., BRAUN, K., BANH, S. & TREBERG, J. R. 2019. The effect of short-term methionine restriction on glutathione synthetic capacity and antioxidant responses at the whole tissue and mitochondrial level in the rat liver. *Exp Gerontol*, 127, 110712.
- THOMAS, A. G., SATTLER, R., TENDYKE, K., LOIACONO, K. A., HANSEN, H., SAHNI, V., HASHIZUME, Y., ROJAS, C. & SLUSHER, B. S. 2015. High-Throughput Assay Development for Cystine-Glutamate Antiporter (xc-) Highlights Faster Cystine Uptake than Glutamate Release in Glioma Cells. *PLOS ONE*, 10, e0127785.
- THOMAS, T. & THOMAS, T. J. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 58, 244-58.
- THOMAS, T. J., THOMAS, T., JOHN, S., HSU, H. C., YANG, P., KEINÄNEN, T. A. & HYVÖNEN, M. T. 2016. Tamoxifen metabolite endoxifen interferes with the polyamine pathway in breast cancer. *Amino Acids*, 48, 2293-302.

- TSAI, J. H., HSU, L. S., HUANG, H. C., LIN, C. L., PAN, M. H., HONG, H. M. & CHEN, W. J. 2016. 1-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione Induces G1 Cell Cycle Arrest and Autophagy in HeLa Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 17.
- UNGVARI, Z., PARRADO-FERNANDEZ, C., CSISZAR, A. & DE CABO, R. 2008. Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circ Res*, 102, 519-28.
- VAN GELDERMALSEN, M., WANG, Q., NAGARAJAH, R., MARSHALL, A. D., THOENG, A., GAO, D., RITCHIE, W., FENG, Y., BAILEY, C. G., DENG, N., HARVEY, K., BEITH, J. M., SELINGER, C. I., O'TOOLE, S. A., RASKO, J. E. & HOLST, J. 2016. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*, 35, 3201-8.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. & THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- VANDER HEIDEN, M. G. & DEBERARDINIS, R. J. 2017. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168, 657-669.
- VAQUERO, A., SCHER, M., LEE, D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & REINBERG, D. 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell*, 16, 93-105.
- VERMORKEN, J. B., MESIA, R., RIVERA, F., REMENAR, E., KAWECKI, A., ROTTEY, S., ERFAN, J., ZABOLOTNYY, D., KIENZER, H. R., CUPISSOL, D., PEYRADE, F., BENASSO, M., VYNNYCHENKO, I., DE RAUCOURT, D., BOKEMEYER, C., SCHUELER, A., AMELLAL, N. & HITT, R. 2008. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 359, 1116-27.
- WAETZIG, R., MATTHES, M., LEISTER, J., PENKIVECH, G., HEISE, T., CORBACIOGLU, S. & SOMMER, G. 2021. Comparing mTOR inhibitor Rapamycin with Torin-2 within the R1ST molecular-targeted regimen in neuroblastoma cells. *Int J Med Sci*, 18, 137-149.
- WALLING, J. 2006. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs*, 24, 37-77.
- WANDERS, D., BURK, D. H., CORTEZ, C. C., VAN, N. T., STONE, K. P., BAKER, M., MENDOZA, T., MYNATT, R. L. & GETTYS, T. W. 2015. UCP1 is an essential mediator of the effects of methionine restriction on energy balance but not insulin sensitivity. *Faseb j*, 29, 2603-15.
- WANDERS, D., FORNEY, L. A., STONE, K. P., BURK, D. H., PIERSE, A. & GETTYS, T. W. 2017. FGF21 Mediates the Thermogenic and Insulin-Sensitizing Effects of Dietary Methionine Restriction but Not Its Effects on Hepatic Lipid Metabolism. *Diabetes*, 66, 858-867.
- WANDERS, D., GHOSH, S., STONE, K. P., VAN, N. T. & GETTYS, T. W. 2014. Transcriptional impact of dietary methionine restriction on systemic inflammation: relevance to biomarkers of metabolic disease during aging. *Biofactors*, 40, 13-26.
- WANDERS, D., HOBSON, K. & JI, X. 2020. Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients*, 12.
- WANDERS, D., STONE, K. P., FORNEY, L. A., CORTEZ, C. C., DILLE, K. N., SIMON, J., XU, M., HOTARD, E. C., NIKONOROVA, I. A., PETTIT, A. P., ANTHONY, T. G. & GETTYS, T. W. 2016. Role of GCN2-Independent Signaling Through a Noncanonical PERK/NRF2 Pathway in the Physiological Responses to Dietary Methionine Restriction. *Diabetes*, 65, 1499-510.
- WANG, L., HARRIS, T. E., ROTH, R. A. & LAWRENCE, J. C., JR. 2007. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*, 282, 20036-44.
- WANG, Q., BEAUMONT, K. A., OTTE, N. J., FONT, J., BAILEY, C. G., VAN GELDERMALSEN, M., SHARP, D. M., TIFFEN, J. C., RYAN, R. M., JORMAKKA, M., HAASS, N. K., RASKO, J. E. &

- HOLST, J. 2014. Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int J Cancer*, 135, 1060-71.
- WANG, Q., HARDIE, R. A., HOY, A. J., VAN GELDERMALSEN, M., GAO, D., FAZLI, L., SADOWSKI, M. C., BALABAN, S., SCHREUDER, M., NAGARAJAH, R., WONG, J. J., METIERRE, C., PINELLO, N., OTTE, N. J., LEHMAN, M. L., GLEAVE, M., NELSON, C. C., BAILEY, C. G., RITCHIE, W., RASKO, J. E. & HOLST, J. 2015. Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol*, 236, 278-89.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*, 8, 519-30.
- WEICHHART, T. 2018. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*, 64, 127-134.
- WEIDBERG, H., SHVETS, E., SHPILKA, T., SHIMRON, F., SHINDER, V. & ELAZAR, Z. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo j*, 29, 1792-802.
- WEINDRUCH, R., WALFORD, R. L., FLIGIEL, S. & GUTHRIE, D. 1986. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr*, 116, 641-54.
- WEISS, E. P. & FONTANA, L. 2011. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1205-19.
- WICHA, M. S., LIU, S. & DONTU, G. 2006. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 66, 1883-90; discussion 1895-6.
- WISE, D. R. & THOMPSON, C. B. 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*, 35, 427-33.
- WOHLGEMUTH, S. E., JULIAN, D., AKIN, D. E., FRIED, J., TOSCANO, K., LEEUWENBURGH, C. & DUNN, W. A., JR. 2007. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Res*, 10, 281-92.
- WU, N., ZHENG, B., SHAYWITZ, A., DAGON, Y., TOWER, C., BELLINGER, G., SHEN, C. H., WEN, J., ASARA, J., MCGRAW, T. E., KAHN, B. B. & CANTLEY, L. C. 2013. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell*, 49, 1167-75.
- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R. & HALL, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471-84.
- XIE, Z., NAIR, U. & KLIONSKY, D. J. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19, 3290-8.
- YAMAMOTO, H., SCHOONJANS, K. & AUWERX, J. 2007. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, 21, 1745-55.
- YAMAZA, H., KOMATSU, T., WAKITA, S., KIJOGI, C., PARK, S., HAYASHI, H., CHIBA, T., MORI, R., FURUYAMA, T., MORI, N. & SHIMOKAWA, I. 2010. FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell*, 9, 372-82.
- YANG, L., VENNETI, S. & NAGRATH, D. 2017. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*, 19, 163-194.
- YE, X., ZHOU, X.-J. & ZHANG, H. 2018. Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9.
- YING, H., KIMMELMAN, A. C., LYSSIOTIS, C. A., HUA, S., CHU, G. C., FLETCHER-SANANIKONE, E., LOCASALE, J. W., SON, J., ZHANG, H., COLOFF, J. L., YAN, H., WANG, W., CHEN, S., VIALE, A., ZHENG, H., PAIK, J. H., LIM, C., GUIMARAES, A. R., MARTIN, E. S., CHANG, J., HEZEL, A. F., PERRY, S. R., HU, J., GAN, B., XIAO, Y., ASARA, J. M., WEISSLEDER, R., WANG, Y. A., CHIN, L., CANTLEY, L. C. & DEPINHO, R. A. 2012. Oncogenic Kras

- maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149, 656-70.
- YING, Y., YUN, J., GUOYAO, W., KAIJI, S., ZHAOLAI, D. & ZHENLONG, W. 2015. Dietary L-methionine restriction decreases oxidative stress in porcine liver mitochondria. *Exp Gerontol*, 65, 35-41.
- YOO, H. C., YU, Y. C., SUNG, Y. & HAN, J. M. 2020. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*, 52, 1496-1516.
- YOSHIDA, T. & DELAFONTAINE, P. 2020. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*, 9.
- YUE, F., LI, W., ZOU, J., JIANG, X., XU, G., HUANG, H. & LIU, L. 2017. Spermidine Prolongs Lifespan and Prevents Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma by Activating MAP1S-Mediated Autophagy. *Cancer Res*, 77, 2938-2951.
- YUNEVA, M., ZAMBONI, N., OEFNER, P., SACHIDANANDAM, R. & LAZEBNIK, Y. 2007. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol*, 178, 93-105.
- ZACHARI, M. & GANLEY, I. G. 2017. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61, 585-596.
- ZANETTI, M., GORTAN CAPPELLARI, G., BUREKOVIC, I., BARAZZONI, R., STEBEL, M. & GUARNIERI, G. 2010. Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. *Exp Gerontol*, 45, 848-55.
- ZHANG, H., ALSALEH, G., FELTHAM, J., SUN, Y., NAPOLITANO, G., RIFFELMACHER, T., CHARLES, P., FRAU, L., HUBLITZ, P., YU, Z., MOHAMMED, S., BALLABIO, A., BALABANOV, S., MELLOR, J. & SIMON, A. K. 2019a. Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. *Mol Cell*, 76, 110-125.e9.
- ZHANG, H. & SIMON, A. K. 2020. Polyamines reverse immune senescence via the translational control of autophagy. *Autophagy*, 16, 181-182.
- ZHANG, L., MENG, X., ZHU, X. W., YANG, D. C., CHEN, R., JIANG, Y. & XU, T. 2019b. Long non-coding RNAs in Oral squamous cell carcinoma: biologic function, mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*, 18, 102.
- ZHANG, Z., LIU, R., SHUAI, Y., HUANG, Y., JIN, R., WANG, X. & LUO, J. 2020. ASCT2 (SLC1A5)-dependent glutamine uptake is involved in the progression of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 122, 82-93.
- ZHENG, D., MACLEAN, P. S., POHNERT, S. C., KNIGHT, J. B., OLSON, A. L., WINDER, W. W. & DOHM, G. L. 2001. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol (1985)*, 91, 1073-83.
- ZIELKE, H. R., SUMBILLA, C. M., SEVDALIAN, D. A., HAWKINS, R. L. & OZAND, P. T. 1980. Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol*, 104, 433-41.
- ZIELKE, H. R., ZIELKE, C. L. & OZAND, P. T. 1984. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc*, 43, 121-5.
- ZOU, Y., JUNG, K. J., KIM, J. W., YU, B. P. & CHUNG, H. Y. 2004. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. *Faseb j*, 18, 320-2.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AC	Acylcarnitin
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atg 8 bzw. 5	Autophagy related protein 8 bzw. 5
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
CR	caloric restriction
CRM	caloric restriction mimetic
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	dietary restriction
FCS	fetal calf serum
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
FMD	Fasting-Mimicking Diet
FOXO	Forkhead-Box-Protein class O
GH	growth hormon
GMP	Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion

HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
KRAS-Onkogen	kirsten rat sarcoma viral oncogene
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LC3	light chain 3
LEM	Low-Energy-Metabolismus
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
OSCC	oral squamous cell carcinoma
P/S	Penicillin-Streptomycin
P53	Protein p53
P62	Sequestosom 1
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin

Abkürzungsverzeichnis

PI3K/AKT/mTOR	Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Proteinkinase B/mTOR
PP2A	Phosphatase 2 A
PPP	pentose phosphate pathway
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
ROS	reactive oxygen species
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Rosevell Park Memorial Institute
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMTOR	S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway
SAT1	Acetyltransferase 1
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SIRT1	Sirtuin 1
SLC1A5 (ASCT2)	solute carrier family 1 member 5 (Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2)
TBS	TRIS-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOR	target of rapamycin
UMP	Uridinmonophosphat

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozesse der Autophagie.....	4
Abbildung 2: Low-Energy-Metabolismus.....	7
Abbildung 3: Auswirkungen der CR auf den Körper.....	15
Abbildung 4: Polyaminstoffwechsel.....	18
Abbildung 5: Proliferationsverhalten der Zelllinien L929, HaCaT und HeLa nach Spermidin-/Spermin-Inkubation.....	42
Abbildung 6: Proliferationsverhalten der Zelllinie L929 nach Spermidin-/ Spermin-Inkubation (gelöst in destilliertem Wasser) bzw. unter Kontrollbedingungen (DMSO-Inkubation).....	44
Abbildung 7: L929 unter dem Mikroskop.....	45
Abbildung 8: Proliferationsverhalten ausgewählter Zelllinien nach Inkubation mit Spermidin, Spermin, Putrescin und N-Acetylputrescin.....	48
Abbildung 9: Einfluss von Glutamin auf das Proliferationsverhalten von L929 und HeLa.....	50
Abbildung 10: Proliferationsverhalten der Zelllinien L929 und HeLa unter Glutamin-Restriktion.....	51
Abbildung 11: Ergebnisse Western Blot LC3B bei HeLa.....	53
Abbildung 12: Ergebnisse Western Blot LC3B bei HeLa.....	54
Abbildung 13: Ergebnisse Western Blot Atg5, p62 und Tubulin bei HeLa.....	55
Abbildung 14: Ergebnisse Western Blot Atg5, p62 und Tubulin bei L929.....	55
Abbildung 15: Ergebnis Western Blot LC3B und Tubulin bei HeLa.....	56
Abbildung 16: Relative Mengen der 25 untersuchten Hauptgruppen unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	58
Abbildung 17: Relative Mengen der essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	60
Abbildung 18: Relative Mengen der Pyrimidine und Purine unter Glutamin- Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	62
Abbildung 19: Relative Mengen der Nicotinamide unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	64

Abbildung 20: Relative Mengen ausgewählter Metaboliten des Pentosephosphatwegs (PPP) und des Citratzyklus (TCA) unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.	65
Abbildung 21: Relative Mengen der Metaboliten Alanin, Pyruvat und Laktat extrazellulär und intrazellulär unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.	66
Abbildung 22: Relative Mengen der CoA-Derivate und Carnitine unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.	67
Abbildung 23: Relative Mengen der Kohlenhydrate und Metaboliten der Glykolyse unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	69
Abbildung 24: Relative Mengen der Schwefel-Metaboliten unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.	70
Abbildung 25: Relative Mengen der Metaboliten Glutamat, Glutamin, Cystin und GSH unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.....	71
Abbildung 26: Relative Menge des Ketonkörpers Acetoacetat unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen (Vollmedium) in der Zelllinie L929.	71
Abbildung 27: Charakteristisches Stoffwechselprofil der Zelllinie L929 unter 48-stündiger Glutamin-Restriktion.....	73

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste	24
Tabelle 2: Materialliste	25
Tabelle 3: Reagenzien	26
Tabelle 4: Zellkulturmedien.	28
Tabelle 5: Verwendete Antikörper.....	28
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer	29
Tabelle 7: Zellpanel	30
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Zelllinien unter Angabe des jeweiligen Splitverhältnisses.....	31
Tabelle 9: Gelzusammensetzung.	35
Tabelle 10: Protokolle der verwendeten Antikörper.....	36
Tabelle 11: Übersicht der untersuchten Substanzen.....	39
Tabelle 12: Mittlere inhibitorische Konzentration nach 72 h Inkubation.....	43
Tabelle 13: NAD⁺/NADH-Verhältnis unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen.....	83
Tabelle 14: AMP/ATP-Verhältnis unter Glutamin-Restriktion und Kontrollbedingungen.....	83

IV Danksagung

Mein Dank geht zuallererst an Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander C. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie des wissenschaftlichen Labors zur Durchführung der Versuche und die Betreuung dieser Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. rer. nat. Axel Seher, Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, für die vertrauensvolle Betreuung und wertvolle Unterstützung in den letzten Jahren, das Korrekturlesen und die kritische Diskussion dieser Arbeit sowie seine verlässliche Art.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Werner Schmitz vom Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg für die massenspektrometrische Analyse am Institut bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Thomas Müller vom Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik – Botanik I für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke an alle weiteren Mitarbeiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die hilfsbereite und kollegiale Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt meinem Freund Manuel, meinen Eltern und meinen daumendrückenden Großeltern, die mich nicht nur im Verlauf dieser Arbeit, sondern während meines gesamten Studiums mit viel Verständnis unterstützt haben.

VI Eigene Veröffentlichungen

Volland, J.M.; Kaupp, J.; Schmitz, W.; Wünsch, A.C.; Balint, J.; Möllmann, M.; El-Mesery, M.; Frackmann, K.; Peter, L.; Hartmann, S.; Kübler, A.C.; Seher, A. Mass Spectrometric Metabolic Fingerprinting of 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG)-Induced Inhibition of Glycolysis and Comparative Analysis of Methionine Restriction versus Glucose Restriction under Perfusion Culture in the Murine L929 Model System. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9220. <https://doi.org/10.3390/ijms23169220>

VII Gesamtübersicht der Ergebnisse der LC-MS

Cells		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Non-Ess. Amino Acids	Alanine	100	118	100	198	116	80	63	46	48	32
	Arginine	100	107	102	141	115	71	55	61	56	40
	Asparagine	100	99	109	146	109	128	113	93	99	61
	Aspartate	100	109	71	99	58	79	46	36	53	61
	Cysteine	100	218	211	352	214	65	70	43	40	48
	Glutamate	100	112	104	156	101	28	32	32	34	29
	Glutamine	100	100	117	136	111	3	3	2	2	2
	Glycine	100	131	137	214	131	135	99	78	95	51
	Proline	100	116	103	157	103	85	79	61	64	42
	Serine	100	91	76	101	73	119	111	69	82	68
Tyrosine	100	103	109	166	124	100	120	105	103	75	
Ess. Amino Acids	Histidine	100	116	121	146	134	129	64	58	53	27
	Isoleucine	100	93	96	157	126	78	82	84	94	52
	Leucine	100	97	134	238	189	77	77	132	101	67
	Lysine	100	119	75	102	78	107	75	53	74	44
	Methionine	100	95	91	124	86	60	89	76	69	44
	Phenylalanine	100	128	145	262	156	74	70	108	78	49
	Threonine	100	133	140	255	149	149	114	115	111	60
	Tryptophan	100	89	104	226	170	50	63	96	66	36
	Valine	100	102	103	162	117	97	88	84	80	57
Acet. Amino Acids	N-Acetylaspargine	100	87	74	83	67	87	93	64	84	71
	N-Acetylaspargate	100	157	117	207	164	47	24	19	16	4
	N-Acetylglutamate	100	170	79	113	63	48	32	38	22	6
	N-Acetylmethionine	100	100	177	485	439	8	30	139	172	44
BCAAs	3-/4-Methyl-2-oxopenta	100	67	61	91	99	108	22	18	14	8
	2-Hydroxyglutarate	100	146	133	235	145	63	62	47	35	19
Glu-Metab.	5-Oxoproline	100	122	153	201	164	20	23	30	39	25
	Pipecolate	100	126	165	228	168	42	35	48	57	32
Trp Metab.	N-Formylkynurenine	100	77	93	208	172	63	73	95	75	60
	Kynurenine	100	102	156	436	205	68	65	148	111	88
Arg Metab.	Creatine	100	85	94	182	148	124	96	77	135	80
	Creatinine	100	98	139	190	170	63	70	111	103	90
"S"-Metab.	Cystine	100	72	94	79	203	111	157	257	378	519
	Glutamylcysteine	100	145	98	150	66	46	44	18	18	7
	Cysteinylglycine	100	175	121	261	81	55	38	15	15	8
	GSH	100	136	79	163	48	35	20	8	7	4
	GSSG	100	110	73	125	52	38	38	17	13	3
	Cystathionine	100	144	144	199	110	76	154	26	25	19
	Taurine	100	94	111	156	108	95	53	59	99	49
	Homocysteine	100	72	77	84	55	39	49	43	42	28
	SAH	100	253	83	242	121	78	159	46	37	33
	SAM	100	132	124	627	232	207	28	73	26	19
	Methylthioadenosine	100	124	99	255	140	153	96	92	54	24
a-Ketoglutarate	100	133	192	255	202	23	25	61	56	33	
Polyamines	N-Acetylputrescine	100	52	88	92	9	107	11	4	14	7
	Folate	100	21	39	19	47	127	35	43	129	266
Folates	N5,N10-Methylene-FH4	100	185	197	1.716	515	0	0	0	0	0
	N10-Formyl-FH4	100	236	133	620	246	33	25	1	0	0
	N5-Methyl-FH4	100	250	236	886	328	3	4	0	0	0
Cholines	Choline	100	103	105	188	93	106	36	73	52	19
	Acetylcholine	100	172	302	590	558	173	75	164	115	41
	CDP-Choline	100	129	33	195	44	24	41	27	5	2
Carbohydrates	Glycerol-3-P	100	86	60	97	42	71	36	11	26	8
	Glycerate	100	184	163	223	117	176	152	125	103	54
	Glucosamine	100	226	341	837	641	93	102	78	69	74
	Glucosamine-P	100	181	197	381	306	67	52	65	73	39
	NANA	100	154	139	278	189	97	130	92	87	56
	UDP-Glc	100	134	114	240	105	82	74	74	40	11
	UDP-GlcNAc	100	129	101	195	152	175	214	164	107	30
	UDP-Glucuronate	100	121	87	127	55	100	98	70	47	17
Glycolysis	Fructose	100	86	190	210	182	295	243	367	269	162
	Aldohexose	100	73	212	163	292	128	100	263	235	218
	Hexose-P	100	127	43	213	48	77	62	20	44	20
	Fructose-1,6-P2	100	302	181	319	104	122	130	57	70	25
	Glyceral/-on-P	100	119	71	193	49	49	34	8	18	6
	Diphosphoglycerate	100	665	251	649	385	38	7	14	8	1
	3-Phosphoglycerate	100	457	106	114	66	79	71	28	43	21
	Phosphoenolpyruvate	100	202	90	135	84	57	54	13	19	5
	Pyruvate	100	151	111	187	149	52	46	39	34	18
	Lactate	100	129	108	393	148	74	67	42	35	20
PPP	Phosphogluconate	100	604	75	144	19	78	27	5	36	1
	Gluconate	100	115	191	411	186	69	46	69	77	46
	Pentose-5-P	100	144	126	277	140	88	71	31	44	16
	S7P	100	224	34	79	26	76	77	10	33	6

Gesamtübersicht

TCA	Citrate	100	179	118	151	191	523	197	92	80	51
	Aconitate	100	113	141	171	252	120	57	70	42	30
	a-Ketoglutarate	100	121	109	122	123	12	13	24	20	16
	Succinate	100	108	102	150	97	68	43	41	37	31
	Fumarate	100	105	84	131	72	46	35	24	20	13
	Malate	100	138	104	194	100	58	29	19	17	12
Urea	Ornithine	100	200	165	262	239	1.045	827	1.137	1.021	758
	Citrulline	100	912	129	90	130	95	104	109	172	241
	ArgSucc	100	81	49	81	47	68	70	57	95	45
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	100	211	125	215	171	44	18	18	17	7
	Orotate										
	Uracil	100	107	74	133	67	52	55	32	27	26
	Uridine	100	125	201	249	225	87	73	108	87	54
	UMP	100	428	74	1.039	295	113	168	55	78	39
	UDP	100	192	63	191	53	60	107	28	38	19
	UTP	100	163	68	113	17	12	14	2	3	1
	Cytosine	100	264	221	994	692	67	162	300	331	191
	Cytidine	100	266	234	1.056	745	69	174	302	347	191
	CMP	100	597	193	1.105	354	112	233	150	166	77
	CDP	100	413	102	400	69	15	31	2	17	7
	CTP	100	271	85	163	11	3	16	0	4	2
	Thymine	100	62	95	123	101	79	46	53	35	22
	dThymidine	100	75	116	142	124	117	62	80	48	29
	dTMP	100	685	79	1.854	424	56	133	12	36	4
	dTDP	100	468	52	340	23	3	2	0	1	0
dTTP	100	182	118	158	16	3	0	0	0	0	
Purines	FAICAR	100	114	445	18.658	1.664	0	0	114	0	53
	Adenine	100	1.517	287	1.705	734	160	285	266	181	95
	Adenosine	100	675	500	1.509	1.050	244	486	337	321	115
	AMP	100	732	126	1.940	467	113	226	62	76	27
	ADP	100	220	78	256	67	51	71	19	18	9
	ATP	100	159	75	130	22	21	32	4	6	2
	cAMP	100	137	14	214	17	25	3	0	0	0
	dAMP	100	2.736	0	8.210	1.535	0	79	38	0	0
	dATP										
	ADP-Glc	100	107	93	217	88	40	42	25	20	9
	Adenylosuccinate	100	3.303	48	7.625	866	1.595	43	66	0	23
	Guanine	100	2.123	184	2.193	478	234	439	154	270	5.080
	Guanosine	100	308	319	1.171	763	150	170	201	335	280
	GMP	100	653	113	1.590	419	97	140	37	50	22
	GDP	100	241	108	249	68	54	71	16	21	9
	GTP	100	166	92	105	6	6	7	0	1	0
	dGuanosine	100	401	473	1.603	1.073	94	189	462	328	226
	Inosine	100	146	282	623	403	107	78	130	142	97
	IMP	100	130	21	129	31	48	32	4	5	0
	dInosine	100	93	226	473	359	45	42	85	64	37
Hypoxanthine	100	136	234	283	280	74	86	96	67	43	
Xanthine	100	132	240	332	327	89	97	92	62	43	
Xanthosine	100	99	132	226	184	534	573	341	315	197	
Uric Acid	100	95	102	113	91	40	28	36	29	22	
CoA-Deriv.	Pantothenate	100	108	171	229	153	86	28	74	59	23
	CoA	100	671	459	1.431	288	194	267	32	8	5
	Dephospho-CoA	100	309	420	1.222	608	155	323	235	68	29
	Ac-CoA	100	75	250	409	38	171	75	19	0	0
Camitines	Carnitine	100	104	413	655	709	460	148	398	241	71
	AC-(02:0)	100	211	529	937	1.328	418	440	1.206	659	175
	AC-(03:0)	100	198	410	798	1.220	220	127	305	200	113
	AC-(04:0)	100	347	1.015	2.605	3.148	909	385	930	287	88
	AC-(05:0)	100	388	1.337	2.916	2.604	2.191	1.261	3.221	849	184
	AC-(05:1)	100	219	402	965	940	182	156	210	106	65
	AC-(06:0)	100	221	522	1.523	3.166	372	171	285	267	97
	AC-(06:1)	100	332	493	1.463	1.808	174	106	527	212	79
AC-(08:0)	100	197	949	4.913	8.540	878	99	306	250	35	
Isoprenoids	Acetoacetate	100	199	132	287	175	20	31	17	22	12
	Mevalolactone	100	67	61	92	99	108	23	18	15	9
Nicotinamides	Nicotinamide	100	115	88	226	134	100	102	72	56	40
	mNAM	100	106	94	228	132	75	32	40	29	9
	NAD+	100	174	155	287	150	88	82	60	39	16
	NADH	100	139	352	611	243	136	116	141	133	6
	NADP+	100	267	113	589	134	79	54	18	15	1
	NADPH										
Flavines	Riboflavin	100	97	142	194	186	10	27	38	21	13
	FMN	100	192	112	374	227	0	53	6	2	10
	FAD	100	167	133	428	182	47	79	43	26	16
Vitamines	Biotin	100	84	81	97	80	77	77	88	93	68
	Pyridoxine	100	89	155	211	212	83	59	127	113	75
	Thiamine	100	160	161	272	327	65	76	82	74	45
	Thiamine-P										

<25 <50 <99 99-110 <150 <200 <300 <400 <500 >500

Gesamtübersicht

Medium		Full-Medium					Glutamine - Depleted				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Non-Ess. Amino Acids	Alanine	89	107	163	174	200	86	74	66	74	73
	Arginine	102	92	79	73	59	50	45	45	44	40
	Asparagine	115	109	101	97	87	94	88	85	83	86
	Aspartate	99	105	100	99	81	113	104	103	113	118
	Cysteine	92	57	98	60	57	96	48	39	37	38
	Glutamate	176	224	228	223	188	84	85	98	80	79
	Glutamine	81	60	30	20	3	5	1	1	2	0
	Glycine	123	128	111	110	84	84	96	116	108	112
	Proline	114	107	98	94	83	72	68	69	70	70
	Serine	83	49	19	16	9	83	59	45	58	53
	Tyrosine	108	88	55	51	29	70	63	60	65	65
	Ess. Amino Acids	Histidine	75	60	43	39	27	62	54	52	54
Isoleucine		73	81	63	58	29	50	53	54	66	67
Leucine		82	68	46	39	21	62	56	52	60	59
Lysine		116	83	57	45	24	81	71	71	73	66
Methionine		112	91	57	53	31	71	61	58	65	67
Phenylalanine		88	76	44	39	18	63	59	55	66	68
Threonine		74	62	42	38	25	84	79	72	73	70
Tryptophan		83	67	28	22	1	57	52	49	60	62
Valine		97	90	72	67	51	67	63	62	70	72
Acet. Amino Acids		N-Acetylasparagine	113	110	84	81	66	86	70	63	64
	N-Acetylaspartate	234	477	791	700	807	148	195	226	204	161
	N-Acetylglutamate	115	194	210	162	159	72	79	94	69	59
	N-Acetylmethionine	185	222	224	202	151	49	70	84	91	92
BCAAs	3-/4-Methyl-2-oxopentanoate	1.924	4.137	5.590	6.303	6.505	1.289	2.249	3.225	1.671	1.376
Glu-Metab.	2-Hydroxyglutarate	77	86	98	98	98	71	70	72	77	73
	5-Oxoproline	218	255	258	290	256	64	63	68	87	74
Lys-Metab.	Pipecolate	193	226	226	247	215	66	65	67	83	74
Trp Metab.	N-Formylkynurenine	37	41	22	14	8	33	31	31	40	38
	Kynurenine	83	82	64	56	45	71	62	51	66	67
Arg Metab.	Creatine	91	96	109	95	91	73	71	70	77	91
	Creatinine	87	84	74	64	52	65	64	63	65	67
"S"-Metab.	Cystine	72	28	8	7	6	62	51	47	51	50
	Glutamylcysteine										
	Cysteinylglycine	192	505	480	209	225	196	154	224	37	222
	GSH	35	66	43	100	45	93	53	42	30	18
	GSSG	0	15	0	12	69	25	2	37	661	0
	Cystathionine	132	175	301	308	397	95	99	122	99	81
	Taurine	75	64	35	28	15	70	65	61	65	59
	Homocysteine	120	146	197	195	166	61	58	61	63	64
	SAH	34	258	865	1.503	1.966	109	318	936	3.055	3.404
	SAM	2	27	3	88	23	119	26	17	230	8
	Methylthioadenosine	28	48	14	32	7	75	67	52	231	170
a-Ketoglutaramate	84	93	84	81	72	58	59	53	62	64	
Polyamines	N-Acetylputrescine	238	344	611	614	720	267	301	343	210	207
Folates	Folate	69	98	103	101	85	67	59	53	58	56
	N5,N10-Methylene-FH4										
	N10-Formyl-FH4										
	N5-Methyl-FH4										
Cholines	Choline	81	90	74	68	25	87	94	95	105	104
	Acetylcholine	80	80	70	67	50	68	68	66	72	71
	CDP-Choline	0	0	0	103	24	211	0	0	1.100	22
Carbohydrates	Glycerol-3-P	0	11	4	16	16	15	10	22	25	12
	Glycerate	72	82	69	68	51	93	88	87	90	92
	Glucosamine	133	118	128	82	79	110	90	95	110	81
	Glucosamine-P	75	134	279	296	337	48	22	147	181	150
	NANA	77	74	56	54	42	60	55	52	53	50
	UDP-Glc										
	UDP-GlcNAc	0	2.555	0	7.601	536	5.421	885	613	#####	272
	UDP-Glucuronate	0	272	0	375	76	231	62	108	642	72
Glycolysis	Fructose	91	82	74	67	58	69	68	67	71	71
	Aldohexose	84	62	27	22	2	60	53	48	57	55
	Hexose-P	255	207	34	60	18	302	244	194	360	259
	Fructose-1,6-P2	6	0	1	0	0	25	21	10	54	56
	Glycerol-on-P	76	108	180	159	139	89	73	102	158	77
	Diphosphoglycerate	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
	3-Phosphoglycerate	13	20	5	14	11	53	24	28	41	18
	Phosphoenolpyruvate										
	Pyruvate	1.320	2.949	6.611	7.808	7.490	364	323	311	374	286
	Lactate	170	324	506	503	522	104	141	182	147	161
PPP	Phosphogluconate	0	0	0	0	0	69	0	0	0	0
	Gluconate	78	83	87	87	90	99	99	101	108	112
	Pentose-5-P										
	S7P	0	0	0	0	117	224	0	0	4.285	0

Gesamtübersicht

TCA	Citrate	154	179	468	611	1.392	82	84	109	97	88
	Aconitate	92	135	299	311	921	79	88	106	105	116
	a-Ketoglutarate	218	349	506	549	713	93	114	101	57	35
	Succinate	73	65	58	56	49	55	51	50	50	48
	Fumarate	87	101	132	135	148	99	83	83	87	87
	Malate	105	150	278	295	395	77	78	84	88	83
Urea	Ornithine	139	160	192	229	209	759	685	709	721	715
	Citrulline	72	56	23	18	4	92	77	63	72	73
	ArgSucc	104	132	190	181	211	61	52	59	54	49
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	91	181	345	365	472	113	114	98	89	83
	Orotate										
	Uracil	104	94	72	71	57	85	75	73	80	75
	Uridine	9	4	4	5	14	27	21	36	70	85
	UMP	28	55	12	92	38	49	3	6	644	22
	UDP	0	8	1	19	7	81	4	7	342	6
	UTP										
	Cytosine	17	12	11	10	9	13	9	10	16	15
	Cytidine	4	2	2	1	5	7	5	6	11	10
	CMP	100	1.004	6.524	7.414	9.131	0	0	0	6.030	1.498
	CDP	0	0	185	205	73	0	130	0	248	48
	CTP										
	Thymine	93	64	111	136	206	110	106	128	116	122
	dThymidine	63	43	103	142	229	97	116	143	128	104
	dTMP										
	dTDP										
dTTP											
Purines	FAICAR	11	7	0	2	0	12	21	15	38	63
	Adenine	76	71	41	72	39	53	37	43	62	46
	Adenosine	10	25	5	61	53	33	16	16	142	19
	AMP	13	22	2	119	52	30	15	16	989	44
	ADP	0	8	0	30	23	41	2	9	649	12
	ATP										
	cAMP										
	dAMP										
	dATP										
	ADP-Glc										
	Adenylosuccinate										
	Guanine	120	55	125.680	226	101	123	91	13	97	127
	Guanosine	0	0	0	0	0	0	0	0	1.565	49
	GMP	0	11	0	22	35	6	0	0	2.800	29
	GDP	0	0	0	0	8	31	0	0	636	0
	GTP										
	dGuanosine										
	Inosine	62	52	45	71	22	137	53	37	100	68
	IMP										
dInosine											
Hypoxanthine	13	10	8	7	6	25	8	7	11	9	
Xanthine	91	96	97	89	91	75	80	83	106	105	
Xanthosine	83	86	101	142	138	149	209	170	983	1.190	
Uric Acid	95	89	83	79	69	37	33	32	36	33	
CoA-Deriv.	Pantothenate	48	50	46	43	35	60	54	49	54	54
	CoA										
	Dephospho-CoA										
Camitines	Ac-CoA										
	Carnitine	68	61	45	41	28	64	50	37	55	55
	AC-(02:0)	88	94	93	80	75	59	86	111	97	99
	AC-(03:0)	64	66	63	57	41	44	40	34	44	45
	AC-(04:0)	86	104	114	113	65	72	83	83	68	64
	AC-(05:0)	112	125	142	143	122	135	276	412	161	151
	AC-(05:1)	83	75	63	58	54	63	59	53	64	57
	AC-(06:0)	80	57	31	34	7	76	89	82	63	58
	AC-(06:1)	0	52	50	0	35	34	37	33	77	0
AC-(08:0)	88	124	87	71	8	123	195	253	73	25	
Isoprenoids	Acetoacetate	61	55	43	45	38	60	49	45	49	45
	Mevalolactone	1.815	3.895	5.278	5.952	6.172	1.211	2.132	3.047	1.587	1.310
Nicotinamides	Nicotinamide	88	77	55	48	27	67	58	53	60	57
	mNAM	892	3.555	14.400	14.858	23.333	1.030	2.468	4.242	3.246	3.551
	NAD+	0	763	0	1.707	926	433	159	138	1.709	112
	NADH										
	NADP+	0	0	0	0	63	0	0	0	285	0
	NADPH										
Flavines	Riboflavin	146	127	105	106	82	49	56	55	63	57
	FMN										
	FAD										
Vitamines	Biotin	103	92	82	76	68	69	65	65	66	65
	Pyridoxine	83	75	60	53	38	56	53	48	56	56
	Thiamine	69	69	74	67	58	45	44	43	45	45
	Thiamine-P										

<25 <50 <99 99-110 <150 <200 <300 <400 <500 >500