

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Kübler**

**In vitro-Analyse der Auswirkungen einer Methioninrestriktion auf die
Proliferation von Myelomzellen des murinen Modellsystems MPC11 und der
humanen Zelllinien L363 und KMS12-BM**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Maximilian Friedrich Völter
aus
Aalen**

Würzburg, Dezember 2023



Referent: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Müller

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2024

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Multiple Myelom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Pathogenese und klinisches Bild.....	2
1.1.3	Therapie und Prognose.....	3
1.2	Methionin und Methioninzyklus.....	4
1.3	Die Methioninrestriktion.....	5
1.3.1	Proteinbiosynthese.....	6
1.3.2	Energiestoffwechsel.....	6
1.3.3	Polyaminsynthese.....	7
1.3.4	Transmethylierungen.....	7
1.3.5	Transsulfurierungen.....	8
1.3.6	Folsäurezyklus und Nukleotidsynthese.....	8
1.4	Transsulfurierungen und Cysteinrestriktion.....	9
1.5	„Low-Energy-Metabolismus“.....	9
1.6	Stand der Wissenschaft und Forschungsfragen.....	10
1.7	Ziel der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material.....	15
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Kultivierung und Ernte der Zellen.....	18
2.2.2	Zellzählungen.....	18
2.2.3	Proliferationsassays mit Pico.....	21
2.2.4	Liquidchromatografie-Massenspektrometrie (LC/MS).....	24
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Proliferationsverhalten der MM-Zelllinien – Wachstumskurven.....	27
3.1.1	Wachstumskurven der murinen MM-Zelllinie MPC11.....	27
3.1.2	Wachstumskurven der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM.....	28
3.2	Einfluss der AS-Konzentrationen.....	30

3.2.1	Verdünnungsreihen der murinen MM-Zelllinie MPC11	30
3.2.2	Verdünnungsreihen der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM	31
3.3	Kompensation der MetR bzw. CysR – Substitutionsversuche.....	33
3.3.1	Kompensation in der murinen MM-Zelllinie MPC11	34
3.3.2	Kompensation in den humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM.....	35
3.4	Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR	38
3.4.1	Veränderungen im Methioninzyklus und gekoppelten Stoffwechselwegen	38
3.4.2	Veränderungen in Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung	40
3.4.3	Veränderungen im AS-Stoffwechsel.....	41
3.4.4	Veränderungen im Purin-/Pyrimidinstoffwechsel.....	42
4	Diskussion	45
4.1	Ergebnis 1: Sowohl die MetR als auch die CysR hemmen die Proliferation der MM-Zellen	45
4.2	Ergebnis 2: Die MM-Zellen sind von exogener Methionin- bzw. Cysteinzufuhr abhängig.....	47
4.3	Ergebnis 3: Die MetR induziert einen LEM in den MPC11-Zellen.....	49
4.3.1	Analyse des Methioninzyklus und gekoppelter Stoffwechselwege	50
4.3.2	Analyse der Stoffwechselwege zur Energiegewinnung	51
4.3.3	Analyse des AS-Stoffwechsels.....	53
4.3.4	Analyse des Purin-/Pyrimidin-Stoffwechsels.....	54
4.3.5	Vergleich mit dem Metabolom von L929-Zellen unter MetR	54
4.4	Ausblick.....	55
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis.....	60
7	Appendix.....	68
7.1	Metabolomanalyse	68
7.2	Abkürzungsverzeichnis	72
7.3	Abbildungsverzeichnis	74
7.4	Tabellenverzeichnis	75
7.5	Danksagung.....	76

7.6	Lebenslauf	Error! Bookmark not defined.
7.7	Publikationen.....	77
7.8	Eidesstattliche Erklärung	78

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems, bei der es zu einer malignen monoklonalen Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark mit in der Folge gesteigerter Sekretion von Immunglobulinen kommt (Kumar et al. 2017). Die typische Symptomatik wird unter dem englischen Akronym CRAB für Hyperkalzämie (engl. calcium elevation), Niereninsuffizienz (engl. renal insufficiency), Anämie (engl. anemia) und Knochenläsionen (engl. bone lesions) zusammengefasst (Cowan et al. 2022) und äußert sich klinisch am häufigsten mit Schmerzen, Schwäche und Infektanfälligkeit (Kyle et al. 2003). Auch wenn die Behandlungsmöglichkeiten und -ergebnisse in den letzten Jahren stetig verbessert wurden, gilt die Erkrankung weiterhin als schwierig heilbar (Nishimura et al. 2020) und die Patienten versterben meist an Blutungen, Infektionen oder Nierenversagen (Oshima et al. 2001).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das MM ist mit 10-15% die zweithäufigste hämatologische Erkrankung und für 15-20% aller Todesfälle im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen im Speziellen bzw. 2% aller Todesfälle im Zusammenhang mit Krebs im Allgemeinen verantwortlich (Derlin und Bannas 2014). Die Inzidenz der Erkrankung lag in Deutschland im Jahr 2018 bei etwa 2800 Frauen und 3500 Männern, die 5-Jahres-Prävalenz betrug ca. 10.000 bei beiden Geschlechtern. Betroffen sind vor allem Menschen in höherem Lebensalter (Erdmann et al. 2021).

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht eindeutig geklärt. Risikofaktoren sind ein hohes Alter, männliches Geschlecht, die Zugehörigkeit zu Menschen mit dunkler Hautfarbe und eine familiäre Häufung (Erdmann et al. 2021). Als Vorstufen gelten die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz und das smoldering multiple myeloma. Sie unterscheiden sich durch die Konzentrationen von Plasmazellen und Paraproteinen im Blut und lassen sich vom MM durch das Fehlen typischer klinischer Symptome abgrenzen (Ho et al. 2020). Die Progressionsrate hin zu einem MM beträgt bei der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz 1% pro Jahr, beim smoldering multiple myeloma liegt sie mit 10% pro Jahr deutlich höher (Rajkumar 2016). Auch wenn die genauen Auslöser unbekannt sind, werden akkumulierte genetische Schäden als die Ereignisse angesehen, die zu Veränderungen des Genoms und somit zur Entstehung des MM führen, wobei grundsätzlich zwischen primären Veränderungen, die zur Entartung der Zelle führen, und sekundären Veränderungen, die zur Progression der

Krankheit beitragen, unterschieden wird (Prideaux et al. 2014). Die primären Veränderungen werden wiederum in zwei Entitäten aufgeteilt, die etwa mit gleicher Häufigkeit auftreten. Die hyperdiploide Form ist durch mehrfache Trisomien ungeradzahligter Chromosomen gekennzeichnet, wobei der letztendlich zur Krebsentstehung führende Mechanismus noch nicht geklärt ist (Barwick et al. 2019). Die nicht-hyperdiploide Form hingegen ist durch Translokationen charakterisiert, die den Lokus der schweren IgH-Kette der Immunglobuline betreffen und deshalb Onkogene, beispielsweise Cycline der D-Reihe, Transkriptionsfaktoren wie MAF und dessen Homolog B oder das MMSET-Gen, unter dem Einfluss des IgH-Enhancers überexprimiert werden (Saxe et al. 2019). Zu den sekundären Veränderungen zählen im engeren Sinne Deletionen und Amplifikationen bestimmter Chromosomenabschnitte. In der Konsequenz kommt es zur vermehrten Expression von Onkogenen oder zum Verlust von Tumorsuppressorgenen (Manier et al. 2017).

1.1.2 Pathogenese und klinisches Bild

Die typische Symptomatik des MM wird, wie bereits erwähnt, unter dem englischen Akronym CRAB zusammengefasst (Cowan et al. 2022). Sind die im Knochenmark befindlichen Plasmazellen maligne entartet, stören sie die Knochenhomöostase durch Hemmung der Osteoblasten und Stimulation der Osteoklasten, entweder direkt oder durch ihre Wechselwirkung mit den umliegenden Zellen des Knochenmarks (Panaroni et al. 2017). Einige der beteiligten Faktoren wurden bereits identifiziert, Osteoblasten-hemmende Faktoren sind unter anderem DKK-1, sFRP-3 und HGF, Osteoklasten-stimulierende sind RANKL, MIP-1 α , TNF- α und IL-6 (Walker et al. 2014). Das dadurch entstehende Milieu begünstigt die Proliferation der maligne veränderten Zellen und führt zum Abbau des Knochens, die typischen Läsionen und Hyperkalzämie sind die Folge (Mukkamalla und Malipeddi 2021). Als ehemalige Plasmazellen sezernieren die MM-Zellen massenhaft Immunglobuline, sogenannte Paraproteine, die im Blut und/oder Urin nachweisbar sind (Maniatis 1998). Hierbei lässt sich zwischen der Bildung kompletter Immunglobuline, bestehend aus der schweren H-Kette des Typs IgG (~65%) oder IgA (~20%) und vorwiegend der leichten L-Kette des Typs κ , seltener λ , und inkompletter Immunglobuline, die nur aus einer leichten Kette bestehen und als Bence-Jones-Proteine bezeichnet werden, unterscheiden (Sedlacek 2013). Die Resorptionskapazität der Nieren wird durch die hohe Menge der Paraproteine überschritten, weshalb sie innerhalb des Tubulussystems ausfallen und dieses obstruieren, was letztendlich zu einer Entzündung und Ruptur des Tubulus mit

beeinträchtigt Nierenfunktion führt (Heher et al. 2013). Aufgrund des invasiven Wachstums infiltriert und zerstört das MM das Knochenmark und stört das Heranreifen der Blutzellen durch Sekretion verschiedener Zytokine, wie z.B. TRAIL, Fas-Ligand, BMP-2 und TGF- β (Bouchnita et al. 2016). Dadurch kommt es zu der häufig auftretenden Anämie, die durch die mit den Nierenschäden einhergehende beeinträchtigte Erythropoetinproduktion weiter verstärkt wird (Koury 2014), aber auch zur Thrombozytopenie mit erhöhter Blutungsneigung führt (Oshima et al. 2001).

Klinisch leiden die Patienten unter Schmerzen, Schwäche und Infekten, was einerseits durch die pathologischen Veränderungen, andererseits durch die bei der Behandlung des MM eingesetzten Chemotherapie verursacht wird (Kyle et al. 2003). Die häufigsten Todesursachen sind Blutungen (~33%), Infektionen (~20%) und Nierenversagen (~15%) (Oshima et al. 2001).

1.1.3 Therapie und Prognose

Die Therapie ist hoch patientenspezifisch und berücksichtigt neben dem Alter, dem Gesundheitszustand, Begleiterkrankungen und der Möglichkeit zur autologen Stammzelltransplantation auch die Einteilung in Standard- und Hochrisikopatienten (Landgren und Iskander 2017). Die hauptsächlich verwendeten Medikamente sind Alkylanzien wie Melphalan und Cyclophosphamid, Kortikosteroide wie Dexamethason und Prednisolon, Immunmodulatoren wie Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid sowie Proteasominhibitoren wie Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib, darüber hinaus kommen auch andere Pharmazeutika wie beispielsweise monoklonale Antikörper gegen den CD38-Rezeptor zum Einsatz (Rajkumar 2020). Weitere supportive therapeutische Maßnahmen richten sich nach den bereits beschriebenen Symptomen und umfassen beispielsweise Diuretika zur Behandlung der Hyperkalzämie, Plasmapherese zur Behandlung der Niereninsuffizienz und Erythropoetin zur Behandlung der Anämie (Kumar et al. 2017). Gegen die ossären Komplikationen werden standardmäßig Bisphosphonate wie Pamidronat oder Zolendronsäure eingesetzt (Mhaskar et al. 2017). Diese stellen in der Zahnheilkunde und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie einen bedeutenden Risikofaktor für das Auftreten Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen dar, da sie die Knochenheilung und Angiogenese nach chirurgischen Eingriffen verschlechtern (Ruggiero et al. 2022).

Zur Einschätzung der Prognose des MM sind einige Aspekte zu berücksichtigen, etwa das Alter und der Gesundheitszustand des Patienten, die Tumorlast, das Ansprechen des Patienten auf die Therapie sowie die als besonders aussagekräftig zu wertenden

genetischen Veränderungen (Corre et al. 2021). Diesbezüglich korrelieren vor allem die Mutationen t(4;14), t(14;16), del17, del1p, amp1q sowie p53-Mutationen mit einer schlechten Prognose. Patienten, die eine oder mehrere dieser Veränderungen aufweisen, gelten als Hochrisikopatienten (Baysal et al. 2020). Um die vielen verschiedenen, die Prognose beeinflussenden Faktoren besser handhabbar zu machen, haben diverse Institutionen unterschiedliche Modelle zur Risikostratifizierung entwickelt. Die international myeloma working group zum Beispiel gibt die Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit niedrigem Risiko mit über 10 Jahren, die von Hochrisikopatienten nur mit 2 Jahren an (Hanbali et al. 2017).

1.2 Methionin und Methioninzyklus

Methionin ist eine schwefelhaltige, essenzielle Aminosäure (AS), d.h. sie kann vom menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert, jedoch im Rahmen des Methioninzyklus wiedergewonnen werden (Parkhitko et al. 2019). Sanderson et al. bieten eine Übersicht über den Methioninzyklus: Methionin selbst ist als proteinogene AS an der Proteinbiosynthese beteiligt und ein wichtiger Energiesensor. Im Methioninzyklus wird es in einem ersten Schritt durch die Methyladenosintransferase 2A (MAT2A) Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig zu S-Adenosylmethionin (SAM) adenyliert. SAM ist für die Synthese von protein- und genomstabilisierenden Polyaminen unentbehrlich und zudem der universelle Donator für die Übertragung von Methylgruppen (sog. Transmethylierungen) durch Methyltransferasen (MT) innerhalb der Zelle. In diesen Reaktionen entsteht aus SAM zunächst S-Adenosylhomocystein (SAH), das durch die Adenosylhomocysteinase (AHCY) weiter zu Homocystein (HCY) hydrolysiert wird. HCY kann durch die Methioninsynthase (MS) erneut Vitamin-B12-abhängig zu Methionin remethyliert werden, wobei zugleich Tetrahydrofolat für den Folsäurezyklus und die Nukleotidsynthese bereitgestellt wird, oder für Transsulfurierungen verwendet werden, bei denen über das Zwischenprodukt Cystein das für das Redoxgleichgewicht wichtige Reduktionsmittel Glutathion (GSH) entsteht. Bei der Polyaminsynthese anfallendes Methylthioadenosin (MTA) kann in mehreren Zwischenschritten über die Methylthioadenosinphosphorylase (MTAP) wieder zu Methionin recycelt werden (Sanderson et al. 2019). Einige Mikroorganismen, nicht jedoch Säugetiere, sind außerdem in der Lage, Methionin aus Homoserin (HSE) zu bilden (Hondorp und Matthews 2006). Eine Übersicht liefert Abb. 1.

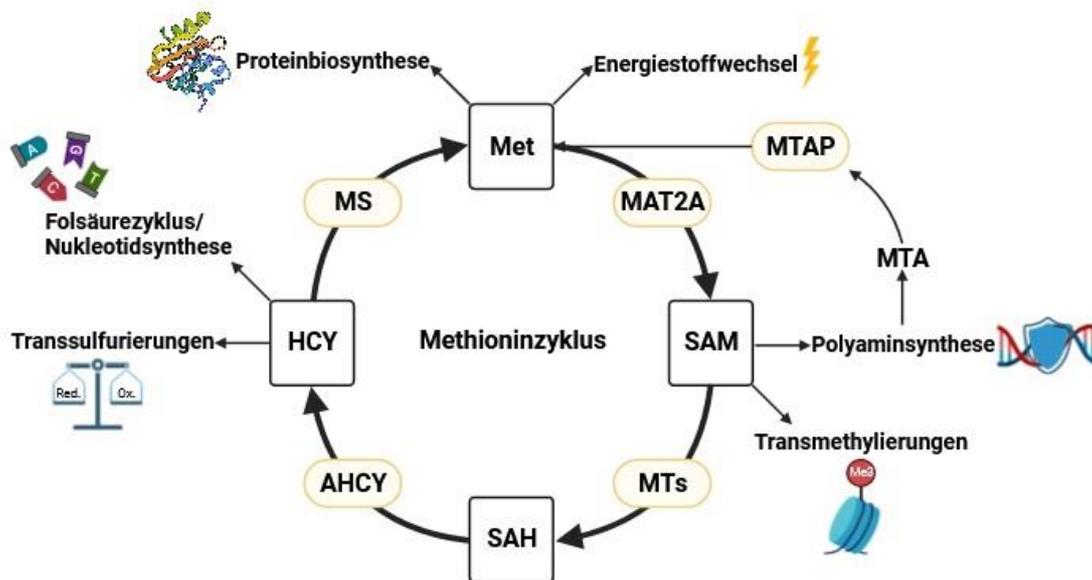


Abb. 1: *Methioninzyklus*

Methionin spielt eine Rolle in der Proteinbiosynthese und dem Energiestoffwechsel. Wird es durch die MAT2A zu SAM adenyliert und in der Polyaminsynthese verwendet, kann anfallendes MTA wieder durch die MTAP zu Methionin regeneriert werden. Wird die Methylgruppe des SAM von einer MT auf ein anderes Molekül übertragen, entsteht SAH. Dieses kann durch die AHCY zu HCY hydrolysiert werden. HCY kann in den Transsulfurierungen zu Cystein umgewandelt oder durch die Vitamin B12-abhängige MS erneut zu Methionin methyliert werden. In letzterem Fall übernimmt es eine Methylgruppe aus dem Folsäurezyklus, wodurch in diesem Tetrahydrofolat entsteht, welches für die Nukleotidsynthese bedeutend ist.

1.3 Die Methioninrestriktion

Bereits 1959 erkannten Sugimura et al., dass mit dem Walkertumor infizierte Ratten ein langsames Tumorstadium aufwiesen, wenn ihrer Ernährung Methionin fehlte (Sugimura et al. 1959). Inzwischen hat sich die Methioninrestriktion (MetR), also die Reduktion des für die Zelle verfügbaren Methionins, aufgrund ihrer vielen Möglichkeiten und Chancen in der Wissenschaft etabliert. Sie weist zahlreiche Gemeinsamkeiten mit der Kalorienrestriktion (CR) auf, die zuverlässig in vielen Spezies von Hefepilzen über Würmer, Fliegen und Nagetieren bis hin zu Rhesusaffen die Lebenserwartung verlängert und die Gesundheit verbessert, indem sie altersassoziierten Krankheiten wie neurodegenerativen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorbeugt, die Entstehung von Krebs sowie dessen Wachstum hemmt und auch positiven Einfluss auf den menschlichen Stoffwechsel zeigt (Green et al. 2022). Diese Effekte konnten auch für die MetR nachgewiesen werden (Ogawa et al. 2022; Kaiser 2020; Jelleschitz et al. 2022). Möglicherweise macht die MetR auch einen Teil der gesundheitsfördernden Auswirkungen veganer Ernährung aus, da Methionin vor allem in tierischen Proteinen zu finden ist (McCarty et al. 2009). Die Wirkmechanismen der MetR sind vielfältig,

komplex und noch nicht abschließend erforscht. Es folgt eine aktuelle Übersicht, die sich an der Funktion des Methionins und seiner Metabolite aus dem Methioninzyklus orientiert.

1.3.1 Proteinbiosynthese

Wie alle proteinogenen AS ist auch Methionin an der Proteinbiosynthese beteiligt. Allerdings nimmt es dabei eine Sonderstellung ein, da die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen stets durch eine mit Methionin beladene tRNA initiiert wird. Das hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Synthese von Methionin die energieaufwändigste aller AS ist, und ihr Vorkommen somit als Signal für eine ausreichende Energiereserve gilt, was Voraussetzung für die Einleitung der Proteinbiosynthese ist (Bhattacharyya und Varshney 2016). In der Tat zeigen Proteomanalysen von methioninabhängigen A101D-Zellen einen starken Rückgang an für die Translation benötigten Proteinen unter MetR (Garg et al. 2023). Da Zellen des MM eine 2,5-fache Proteinbiosyntheserate im Vergleich zu normalen Plasmazellen aufweisen und äußerst sensibel auf die Hemmung derselben mit Omacetaxin reagieren (Walker et al. 2021), ist eine krebshemmende Wirkung der MetR über den Weg der Proteinbiosyntheseinhibition auch im MM durchaus denkbar.

1.3.2 Energiestoffwechsel

Bei der Vermittlung der Wirkung der MetR scheint die Inhibition des Proteinkomplexes mechanistic target of rapamycin (mTOR) eine zentrale Rolle zu spielen (Lee et al. 2015). mTOR reguliert Zellmetabolismus und -wachstum in Abhängigkeit von intra- und extrazellulären Signalen. Großen Einfluss hat dabei die der Zelle zur Verfügung stehende Energie: ist ausreichend Energie vorhanden, steigt auch die mTOR-Aktivität, in der Folge erhöht sich die Stoffwechselrate, Wachstum und Proliferation nehmen zu, Autophagieprozesse werden gehemmt (Inoki et al. 2012). Allerdings ist eine erhöhte mTOR-Aktivität mit einem erhöhten Erkrankungs- und Krebsrisiko sowie abnehmender Lebenserwartung assoziiert, folglich ist die Inhibition des Komplexes ein Angriffspunkt in der Krebstherapie (Mao et al. 2022). Die MetR ist auf verschiedenen Wegen in der Lage mTOR zu hemmen. Sie führt zu einem Anstieg des Wachstumsfaktors FGF-21, der die Expression von IGF-1 reduziert, sodass dessen Serumkonzentration abnimmt (Lees et al. 2014). Der Wachstumsfaktor IGF-1 bindet an den membranständigen Rezeptor IGF-1R der Zelle und aktiviert mTOR sowohl über den MAPK als auch den PI3K/PKB-Signalweg (Jung und Suh 2014). Durch das Sinken der IGF-1-Konzentration

nimmt die mTOR-Aktivität deshalb ab. Weiterhin kommt es unter MetR zu einer Aktivierung des Enzyms Adenosinmonophosphatkinase (AMPK) (Wang et al. 2019a). Die AMPK gilt als Kontrollpunkt des Energiehaushalts und ist bei Energiemangel in der Lage, mTOR zu hemmen (Inoki et al. 2012). Dies geschieht zum einen über die direkte Phosphorylierung des mTOR-regulierenden RAPTOR-Proteins, zum anderen über die Aktivierung von TSC2, das die GTPase Funktion von RHEB verstärkt, sodass dieses die Fähigkeit verliert, mTOR zu aktivieren (Jewell und Guan 2013). Damit mTOR an dessen Wirkungsort, der lysosomalen Membran, transloziert und damit aktiviert werden kann, müssen zuvor die GTPasen der Rag-Familie RagA/B bzw. RagC/D durch GTPasen-aktivierende Proteine aktiviert werden (Sancak et al. 2008). Für RagA/B ist dies GATOR1. GATOR1 wird unter MetR durch das Protein SAMTOR inhibiert, wodurch mTOR inaktiv bleibt (Gu et al. 2017).

1.3.3 Polyaminsynthese

Polyamine haben vielfältige Aufgaben, die vornehmlich dem Schutz der Zelle dienen. Sie sind an der Stabilisierung und Organisation des Genoms beteiligt, tragen zu Zellproliferation und -differenzierung bei und haben Einfluss auf die Immunantwort. Auf der anderen Seite fördern sie in bereits entarteten Zellen das Wachstum und schaffen ein den Tumor förderndes Milieu, dementsprechend weisen Krebszellen häufig stark erhöhte Polyaminkonzentrationen auf (Holbert et al. 2022). In diesem Zusammenhang zeigen Inhibitoren der Polyaminsynthese wie α -Difluoromethylornithin oder des Polyaminimports wie AMXT-1501 vielversprechende krebshemmende Eigenschaften am diffusen intrinsischen Pongliom im Tiermodell (Khan et al. 2021). Möglicherweise kann auch die MetR das Krebswachstum durch eine Hemmung der Polyaminsynthese verlangsamen, wie andere Autoren mutmaßen (Wanders et al. 2020).

1.3.4 Transmethylierungen

SAM ist der universelle Methylgruppendonator der Zelle. Methylierungsreaktionen an der DNA können bestimmte Abschnitte aktivieren oder deaktivieren und beeinflussen somit maßgeblich das Genexpressionsmuster. In Krebszellen sind häufig Abschnitte für Tumorsuppressorgene hypermethyliert und inaktiv, während Abschnitte für Onkogene hypomethyliert und in der Folge stark überexprimiert werden - so auch im MM (Muylaert et al. 2022). Viele Krebszellarten sind aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels methioninabhängig und auf eine exogene Methioninzufuhr angewiesen. Sie weisen einen über den Methioninzyklus nicht zu kompensierenden erhöhten Bedarf an dieser

AS auf, was als „Hoffman-Effekt“ bezeichnet und mit einem gesteigerten Bedarf an SAM für überschießende Methylierungsreaktionen begründet wird. Der „Hoffman-Effekt“ ist typisch für maligne Zellen und sein Vorliegen daher ein Indiz für einen im Vergleich zu gesunden Zellen andersartigen Stoffwechsel, der durch die MetR ausgenutzt werden kann (Hoffman et al. 2019). Zwar konnte keine Literatur in Bezug auf die Methioninabhängigkeit von MM-Zellen gefunden werden, allerdings deuten die übermäßigen Methylierungsreaktionen (Muylaert et al. 2022) und erhöhte Konzentrationen des zur Adenylierung von Methionin zu SAM benötigten Enzyms MAT2A (Wang et al. 2023) auf einen erhöhten Bedarf an SAM auch im MM hin.

1.3.5 Transsulfurierungen

In den Transsulfurierungen wird HCY aus dem Methioninzyklus über die Zwischenstufe Cystathionin zu Cystein und im weiteren Verlauf zu GSH, einem für die Zelle wichtigen Antioxidans, umgesetzt. Da es sich hierbei größtenteils um die Verstoffwechslung einer anderen AS handelt, wird dieser Weg in einem eigenen Abschnitt (siehe „1.4 Transsulfurierungen und Cysteinrestriktion“) behandelt.

1.3.6 Folsäurezyklus und Nukleotidsynthese

Die aus einem Purin- oder Pyrimidingerüst bestehenden Nukleinbasen sind die Grundbausteine der Nukleoside, Nukleotide und Nukleinsäuren und finden als RNA bei der Proteinbiosynthese oder als DNA innerhalb des Genoms zahlreiche Verwendung (Berg et al. 2018). Die Methylgruppe des Pyrimidinnukleotids Thymin entstammt dem der Folsäure abgeleiteten 5,10-Methylentetrahydrofolat. Nachdem dessen Methylgruppe zur Bildung von dTMP durch die Thymidilatsynthase auf dUMP übertragen wurde, muss das übrig gebliebene Dihydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat reduziert und anschließend unter Abgabe der Methylgruppe an HCY wieder zu Tetrahydrofolat demethyliert werden, um dem Folsäurezyklus erneut zur Verfügung zu stehen (Berg et al. 2018; Froese et al. 2019). Eine unter der Wirkungsschwelle liegende Dosis von 5-Fluorouracil, einem die Thymidilatsynthase inhibierenden Chemotherapeutikum, führte erst durch Kombination mit einer MetR zu einem gehemmten Tumorwachstum in Mäusen mit eingepflanzten kolorektalen CRC11-Krebszellen und massenspektrometrische Untersuchungen in Mäusen und Menschen unter MetR zeigten eine Abnahme von Metaboliten des Nukleotidstoffwechsels (Gao et al. 2019). Da MM-Zellen als entartete Antikörperproduzenten eine hohe Proteinsyntheserate mit entsprechendem Bedarf an RNA für die Transkription aufweisen und als stark proliferierende Krebszellen auf eine

andauernde DNA-Replikation angewiesen sind (Gandolfi et al. 2017), könnte sich die MetR eventuell auch über einen Einfluss auf den Folsäure- bzw. Nukleotidstoffwechsel krebshemmend auswirken.

1.4 Transsulfurierungen und Cysteinrestriktion

Neben Methionin existieren weitere AS, für die eine erhöhte Abhängigkeit in Krebszellen vorliegen kann, darunter auch Cystein (Garcia-Bermudez et al. 2020). Cystein ist neben Methionin die zweite proteinogene schwefelhaltige AS und wird zum größten Teil in Form von Cystin über den Cystin/Glutamat-Antiporter xCT aufgenommen, kann aber darüber hinaus auch durch Transsulfurierung aus von Methionin abgeleitetem HCY oder dem Abbau von Proteinen gewonnen werden und spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Antioxidantien (Combs und DeNicola 2019). Diese neutralisieren im Zellstoffwechsel anfallende oxidierende Verbindungen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die mit Zellbestandteilen wie DNA, Proteinen und Lipiden reagieren und mit Krebsentstehung und -wachstum im Zusammenhang stehen (Liou und Storz 2010). Krebszellen profitieren bis zu einem gewissen Grad von hohen ROS-Konzentrationen, da sie die Erkrankung vorantreiben und Apoptose verhindern, müssen jedoch toxische Konzentrationen vermeiden (Moloney und Cotter 2018). Dafür passen sie ihr antioxidatives System entsprechend an und sind deshalb verstärkt auf Cystein angewiesen, umgekehrt sinkt die Antioxidantienkonzentration bei insuffizientem Cysteinangebot, wodurch die hohen ROS-Konzentrationen nicht mehr aufgefangen werden können, oxidative Schäden zunehmen und letztendlich zu einer nicht-apoptotischen Form des Zelltods, der sog. Ferroptose, führen (Aggarwal et al. 2019). Neben dem erhöhten Cysteinbedarf vieler Krebszellen scheinen hämatopoetische MM-Zellen Cystein zudem nur eingeschränkt aus Methionin regenerieren zu können, was sie für eine Restriktion dieser AS besonders anfällig macht (Starheim et al. 2016). Die Gemeinsamkeit der AS Cystein und Methionin als schwefelhaltige AS, die enge Verknüpfung von Methioninzyklus und Cysteinsynthese, die beeinträchtigte Cystein-Synthesefähigkeit hämatopoetischer Zellen sowie der Umstand, dass für beide AS bereits Abhängigkeiten in Krebszellen festgestellt wurden, macht die grundsätzliche Untersuchung einer Cysteinrestriktion (CysR) im Rahmen dieser Arbeit interessant.

1.5 „Low-Energy-Metabolismus“

Krebszellen benötigen neben ausreichend Nährstoffen vor allem genügend Energie für ihren auf Produktion von Biomasse und Teilung ausgelegten Metabolismus (Pavlova et

al. 2022). In unserer Arbeitsgruppe unterscheiden wir zwischen einem „High-Energy-Metabolismus“ (HEM), der durch Wachstum und Proliferation bei ausreichenden Ressourcen gekennzeichnet ist, und einem „Low-Energy-Metabolismus“ (LEM), bei dem die Zellteilung und das Wachstum stagnieren, die Zelle aber weiterhin vollkommen vital ist. Die MetR ist eine Möglichkeit, einen LEM zu induzieren, wie an murinen L929-Fibroblasten gezeigt werden konnte (Schmitz et al. 2021a). Dabei scheint der Zellzyklus unter MetR in der späten S/G2-Phase zu arretieren (Hoffman und Yano 2019). Ein LEM kann auch durch eine CR ausgelöst werden sowie durch Pharmaka, die eine CR imitieren, sogenannte Caloric-Restriction-Mimetics (CRMs) (Vidoni et al. 2021). Dazu gehören beispielsweise mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin, nichtsteroidale Antirheumatika wie Acetylsalicylsäure und das Biguanid Metformin (Madeo et al. 2019). In Myelomzellen ist ein durch Metformin ausgelöster LEM durch einen Zellzyklusarrest (anders als unter MetR jedoch in der G0/G1-Phase) mit verstärkter Autophagie ohne Apoptose gekennzeichnet (Wang et al. 2018). Ein LEM ist sowohl in Krebszellen anzustreben, da Proliferation und Wachstum gehemmt werden, als auch in gesunden Zellen, da Autophagieprozesse dem Erhalt und der Reparatur derselben dienen (Galluzzi et al. 2015). Siehe Abb. 2.

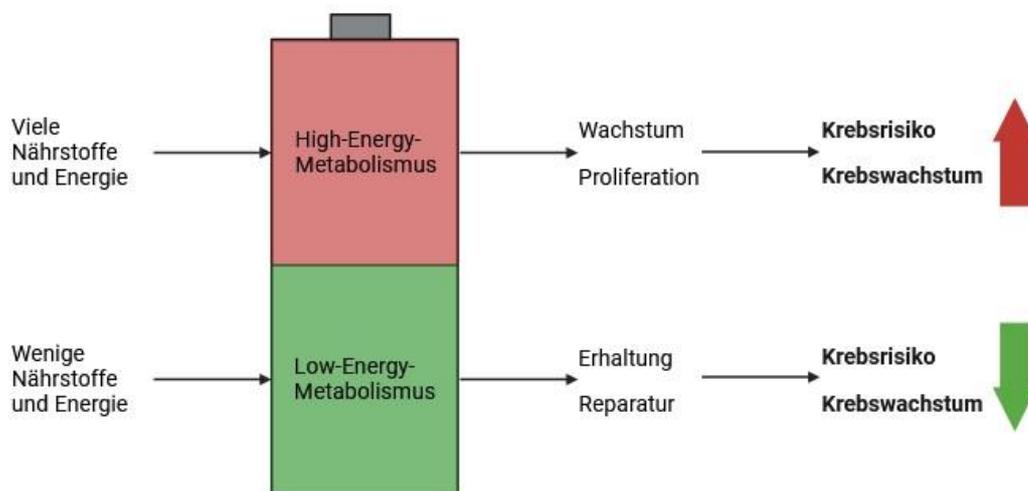


Abb. 2: *High- und Low-Energy-Metabolismus*

Der LEM kann beispielsweise durch CR oder MetR induziert werden und vermindert das Krebsrisiko und -wachstum.

1.6 Stand der Wissenschaft und Forschungsfragen

Um zu klären, ob die Restriktion der AS Methionin und/oder Cystein ein erfolgversprechender Ansatz in Bezug auf die Therapie des MM sein kann, werden im Folgenden aus der bisher aufgeführten Theorie für die vorliegende Arbeit relevante

Forschungsfragen abgeleitet und mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft abgeglichen. Eine Übersicht bietet Tab. 1.

Forschungsfrage 1: *Hat die MetR oder CysR einen Einfluss auf das Wachstum der murinen MM-Zelllinie MPC11 bzw. der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM?*

Die MetR wurde bereits in zahlreichen Krebszelllinien untersucht. Ein umfassendes Review aus dem Jahr 2020 listet 22 Studien zum Thema MetR in Krebszellen auf, Zelllinien des MM finden hierin keine Erwähnung (Wanders et al. 2020). Die krebshemmende Wirkung der diätetischen MetR ist bereits seit langem bekannt (Sugimura et al. 1959). Neben der diätetischen Restriktion finden auch pharmakologische Ansätze Anwendung. Die enzymatische Spaltung des Methionins durch das Enzym Methioninase ist eine Möglichkeit, die Verfügbarkeit für die Zelle einzuschränken. Methioninase wurde bereits an Prostata- und Ovarialkarzinompatienten angewandt, die Autoren berichten von einem Rückgang von Tumormarkern bei ausbleibenden Nebenwirkungen (Han et al. 2020), allerdings verbesserte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten nicht (Endicott et al. 2021). Eine Alternative stellt die Blockade des Transporters SLC7A5/SLC3A2 dar, über den Methionin zusammen mit anderen AS in die Zelle aufgenommen wird (Massaro et al. 2020). Bei einer Inhibition des Transporters mit JPH203 konnte eine Wachstumshemmung in Krebszellen und Xenografts nachgewiesen werden (Kanai 2022).

Bezüglich der CysR ist bekannt, dass verschiedene Krebszelllinien auf die extrazelluläre Anwesenheit von Cystein angewiesen sind. Neben der direkten Reduktion des Cysteinanteils im Medium können die Gabe des Enzyms Cyst(e)inase – das als Substrat sowohl Cystin als auch Cystein spalten kann – oder des Pharmakons Sulfasalazin die Verfügbarkeit der AS für die Zelle einschränken (Garcia-Bermudez et al. 2020). Cyst(e)inase führte zum Untergang humaner Krebszellen der akuten myeloischen Leukämie, nicht jedoch gesunder hämatopoetischer oder Progenitorzellen (Jones et al. 2019), konnte das Tumorstadium in Allo- bzw. Xenografts von Prostata- und Brustkrebs hemmen, sowie die mediane Überlebenszeit von Mäusen, die an einer Krankheit litten, die der chronischen lymphatischen Leukämie des Menschen ähnelt, verdoppeln (Cramer et al. 2017). Sulfasalazin blockiert den Cystin-Glutamat Antiporter xCT und besitzt krebswachstumshemmende Eigenschaften, experimentell wurde das Medikament bereits einem an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten verabreicht. Bei gleichzeitiger Hydroxyurea-Chemotherapie kam es dabei zu einer

Abnahme der Leukämiezelllast, sodass das Zytostatikum sogar vorerst pausiert werden konnte (Pardieu et al. 2022).

Forschungsfrage 2: *Kann eine MetR oder CysR von der murinen MM-Zelllinie MPC11 bzw. den humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM über endogene Stoffwechselwege kompensiert werden?*

Zahlreiche Krebszelllinien unterliegen dem „Hoffman-Effekt“, d.h. sie sind von exogener Methioninzufuhr abhängig und können eine MetR nicht durch Wiedergewinnung von Methionin im Methioninzyklus kompensieren; begründet wird dies mit einem erhöhten Bedarf an SAM für Methylierungsreaktionen (Hoffman et al. 2019). Ein Review aus 2020 bietet eine Übersicht über 47 Zelllinien und deren Wachstumseigenschaften unter MetR, darunter befinden sich die humane monozytische Leukämie-Zelllinie J111 sowie die murine lymphatische Leukämie-Zelllinie L1210, die ebenfalls zu den hämatologischen Krebszelllinien gehören und als methioninabhängig ausgewiesen werden, jedoch kein Hinweis auf Zelllinien des MM (Kaiser 2020). Allerdings wurden in MM-Zellen erhöhte Konzentrationen des zur Bildung von SAM aus Methionin verantwortlichen Enzyms MAT2A gefunden und liefern damit Evidenz für einen ebenfalls erhöhten Bedarf an SAM im MM (Wang et al. 2023).

Ob eine CysR durch Substitution von Metaboliten des Methioninzyklus kompensiert werden kann, ist weniger gut untersucht. Die Verbindung der Cysteinsynthese zum Methioninzyklus lässt dies möglich erscheinen. In diesem Kontext konnte eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe aus 2021 nachweisen, dass die murine Zelllinie L929 eine MetR unter Substitution von HCY oder SAM kompensieren kann, eine CysR jedoch nicht (Schmitz et al. 2021b). MM-Zellen scheinen nicht oder nur sehr eingeschränkt fähig zu sein, Cystein aus Methionin zu synthetisieren (Starheim et al. 2016).

Forschungsfrage 3: *Wie wirkt sich die MetR auf den Stoffwechsel der MPC11-Zellen aus: ist die Induktion eines LEM wahrscheinlich?*

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte ein LEM unter MetR in murinen L929-Fibroblasten bei ausbleibender Proliferation ohne Zelluntergang nachgewiesen werden. Auf metaboler Ebene waren dabei ein Anstieg von Acetoacetat sowie ein Absinken von Kreatin, Spermidin, Glutathiondisulfid (GSSG) und dem Quotienten aus Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP charakteristisch (Schmitz et al. 2021a). Eine Studie

aus 2019 untersuchte die Auswirkungen einer 3-wöchigen MetR sowohl auf unterschiedliche Mausmodelle als auch auf den Menschen mittels Massenspektrometrie, dabei zeigte sich eine Abnahme von Metaboliten des Methioninzyklus sowie der Transsulfurierungen und des Nukleotidstoffwechsels (Gao et al. 2019). Für die humane Leukämiezelllinie IMS-M2 liegt eine Metabolomanalyse unter Hemmung des xCT-Transporters i.S.e. CysR vor, auch hier kam es u.a. zu einer Abnahme der Transsulfurierungen (Pardieu et al. 2022).

Tab. 1: *Stand der Wissenschaft*

Übersicht über den Stand der Wissenschaft zu den Forschungsschwerpunkten dieser Arbeit.

✓: Studien liegen vor. ?: keine Studien gefunden.

Modell	Restriktion (MetR bzw. CysR)	Kompensation (der MetR bzw. CysR)	Metabolomanalyse (unter MetR bzw. CysR)
MPC11	MetR: ?	MetR: ?	MetR: ?
	CysR: ?	CysR: ?	CysR: ?
L363	MetR: ?	MetR: ?	MetR: ?
	CysR: ?	CysR: ?	CysR: ?
KMS12-BM	MetR: ?	MetR: ?	MetR: ?
	CysR: ?	CysR: ?	CysR: ?
in vitro (andere Zelllinien)	MetR: ✓	MetR: ✓	MetR: ✓
	CysR: ✓	CysR: ✓	CysR: ✓
in vivo	MetR: ✓	MetR: ?	MetR: ✓
	CysR: ✓	CysR: ?	CysR: ?

1.7 Ziel der Arbeit

Etwa ein Fünftel aller Todesfälle aufgrund hämatologischer Erkrankungen gehen auf das MM zurück, die zweithäufigste Krebserkrankung des blutbildenden Systems (Derlin und Bannas 2014). Die Malignität geht mit schweren Symptomen einher, die standardmäßige Chemotherapie hat oft gravierende Nebenwirkungen und die Heilungschancen sind gering (Cowan et al. 2022). Forschungen zu alternativen oder ergänzenden Behandlungsmethoden sind daher notwendig. Die MetR bzw. CysR sind einfach anzuwendende Verfahren, die mit vielversprechenden Ergebnissen bereits an Menschen mit anderen Krebserkrankungen untersucht wurden (Han et al. 2020; Pardieu

et al. 2022). Deshalb wird in dieser Arbeit anhand der murinen MPC11- bzw. den humanen L363- und KMS12-BM-Zelllinien des MM untersucht, ob diese auf eine MetR und/oder CysR ansprechen. Aufbauend auf bisheriger Forschung wird diesbezüglich zuerst die grundlegende Wirksamkeit der MetR und CysR überprüft. Weiterhin wird der Frage nachgegangen, ob eine Kompensation der Restriktionen über endogene Stoffwechselwege möglich ist, oder ob die Zellen von der exogenen Zufuhr der AS abhängen. Außerdem werden Metabolomveränderungen der MPC11-Zellen unter MetR massenspektrometrisch untersucht und eingeordnet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die murine MM-Zelllinie MPC11 stammte von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. Die humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM stammten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ), Braunschweig. Die weiteren verwendeten Materialien sind in Tab. 2 bis Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 2: Zellkulturmedien und -zusätze

Antibiotikum, Penicillin (10.000 U/mL)/ Streptomycin (10.000 µg/mL)	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Nährmedium, fötales Kälberserum	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Salzlösung, DPBS	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Zellkulturmedium, DMEM (1x) hoher Glukosegehalt	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Zellkulturmedium, DMEM (1x) hoher Glukosegehalt ohne Glutamin, Methionin, Cystin	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Zellkulturmedium, RPMI 1640 (1x)	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Zellkulturmedium, RPMI 1640 (1x) ohne Glutamin, Methionin, Cystin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt

Tab. 3: Färbemittel

Coomassie Brilliant Blau G 250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA
Trypanblau 0,4%	NanoEntek, Seoul, Südkorea

Tab. 4: AS und Vitamine

D-Homoserin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
DL-Homocystein	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
L-Cystein	Merck (SAFC), Darmstadt
L-Glutamin	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
L-Homoserin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
L-Methionin	Merck (SAFC), Darmstadt
S-Adenosylmethionin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Vitamin B12	Merck (Supelco), Darmstadt

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatten, MicroWell Platten 96-Well Format	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Petrischalen, 60/15 mm, 100/20 mm, 145/20 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, 100-1000 μ L	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, epT.I.P.S Standard 20-300 μ L	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, Pipetman diamond tips D10 0,1-10 μ L	Gilson Inc., Middleton, USA
Reaktionsgefäße, Safeseal	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten, 10 mL und 25 mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zählkammern, EVE cell counting slides	NanoEntek, Seoul, Südkorea
Zellkulturflaschen, 175 cm ²	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

Tab. 6: Geräte

Absorptions-Mikroplatten-Reader, Infinite F50	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Automatisches Absaugsystem, AA 04	HLC by Ditabis, Pforzheim
Brutschrank, Heracell 150i	ThermoFisher Scientific (Thermo Scientific), Waltham, USA
digitales Bildgebungssystem, EVOS XL Core	ThermoFisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA
Kühl-/Gefrierschrank, Liebherr Mediline LKexv 3910 bzw. LGex 3410	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach a.d. Riß
Laborwaage, Kern KB 500-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Magnetrührgerät, Heidolph MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Ko. KG, Schwabach
Mehrkanalpipette, Eppendorf Research plus 10-100µL 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroliterpipetten, Eppendorf Research plus 0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop, CK40	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg
Pipettierhelfer, accu-jet pro	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Präzisionswaage, Kern ABS	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Schüttelwasserbad, GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank, Safe 2020	ThermoFisher Scientific (Thermo Scientific), Waltham, USA
Ultraschallgerät, Branson SLPe	Branson de Mexico, Nuevo Laredo, Mexiko
Vibrationsmischer, Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zelluläres imaging-System, imageXpress Pico	Molecular Devices, San Jose, USA
Zellzählgerät, EVE automated cell counter	NanoEntek, Seoul, Südkorea
Zentrifuge, 5242	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

2.2 Methoden

Im Folgenden wird erläutert, wie die Experimente aufgebaut und durchgeführt worden sind. Statistische Berechnungen des Mittelwerts und der Standardabweichung erfolgten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel der Firma Microsoft, Version 2203.

2.2.1 Kultivierung und Ernte der Zellen

Alle Zelllinien wurden in Flaschen mit einer Fläche von 175 cm² kultiviert. Die Kultivierung der murinen MM-Zelllinie MPC11 erfolgte in DMEM, die humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM in RPMI 1640, jeweils mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin. Das Passagieren der Zellen fand je nach Zelldichte alle 3-4 Tage unter sterilen Bedingungen statt. Nach dem Lösen der Zellen vom Flaschenboden mittels Zellschaber wurde die Suspension in ein 50 mL Falcon überführt, sorgfältig durchmischt und die Zellen im Anschluss am EVE automated cell counter gezählt. Abhängig von der Zelllinie wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension zurück in die Flasche gegeben und mit im Wasserbad auf 37 °C erwärmten Medium aufgefüllt, sodass sich bei den MPC11 ein Verhältnis von Zellsuspension zu Medium von 1:10, bei L363 von 1:5 und bei KMS12-BM von 1:3 einstellte. Dieses Verhältnis wurde bei besonders starkem oder schwachem Wachstum, entsprechend der Zellzählung, angepasst.

2.2.2 Zellzählungen

a) EVE automated cell counter

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden 20 µL Zellsuspension mit 20 µL Trypanblau 0,4% gemischt, 10 µL davon in die Zählkammer eines EVE cell counting slides gegeben und anschließend die Zellzahl pro mL sowie die Zellviabilität mit dem EVE-Zellzähler durch eine automatische Bildanalyse bestimmt. Die am Gerät eingestellten Parameter lauteten: Sensitivität 4, minimale Größe 8 µm, maximale Größe 40 µm, Rundheit 75%.

b) imageXpress Pico

Um das Proliferationsverhalten von Zellen zu bestimmen, wurde die absolute Zellzahl mittels automatisierter digitaler Mikroskopie bestimmt. Dieses Verfahren kam standardmäßig bei der Auswertung der 96-Wells-Mikrotiterplatten zum Einsatz. Dazu wurden die zu untersuchenden Wells, die stets 100 µL Medium enthielten, mit 10 µL einer 1:200 verdünnten 10 mg/mL Hoechst 33342-Stocklösung für 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und danach am Pico untersucht. Dafür wurden die vom Gerät zu Beginn der Messungen automatisch ermittelten Einstellungen optimiert, bis sich die Bildgebung der Fluoreszenzmikroskopie und die tatsächlich erkannten Zellen mehrfach reproduzierbar übereinanderlegen ließen (siehe Abb. 3 bis Abb. 6). Dabei ist zu bedenken, dass der für die Analyse verwendete Farbstoff Hoechst 33342 auch tote

Zellen anfärbt (Crowley et al. 2016). Diese können im Pico beispielsweise an angefärbter, kondensierter DNA erkannt werden. Auch deshalb mussten die Einstellungen der Software bei jeder Messung kontrolliert und ggf. angepasst werden, damit diese Zellen nicht mitgezählt wurden. Um einen Referenzwert zu Beginn eines Versuches zu erhalten, wurde zu Beginn des Versuchs eine Zellzählung zum Zeitpunkt 0 h (im Folgenden t_0 genannt) durchgeführt. Damit lässt sich die Frage beantworten, ob verminderte Zellzahlen unter Restriktionsbedingungen im Mittel aus einem gehemmten Wachstum oder einem vermehrten Zelltod resultieren: liegen die Zahlen über t_0 , aber unter der Kontrolle, wurde das Wachstum gehemmt. Liegen die Zahlen unter t_0 , sind seit Versuchsbeginn Zellen abgestorben. Die Versuche wurden so vorbereitet, dass erst die Hälfte des erforderlichen Volumens eines Mediums mit der zweifachen für den Versuch erwünschten Konzentration eines Stoffes in den Wells vorgelegt und in einem weiteren Schritt mit dem gleichen Volumen des Mediums ohne den zu untersuchenden Stoff, dafür aber mit der erforderlichen Zellzahl, im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde. Dieses Vorgehen war notwendig, da es sich bei den untersuchten Zelllinien um Suspensionszellen handelt und diese in den Mikrotiterplatten nicht adhären. Ein Bebrüten unter Ausbildung eines Zellrasens mit anschließendem Medienwechsel war daher nicht möglich.

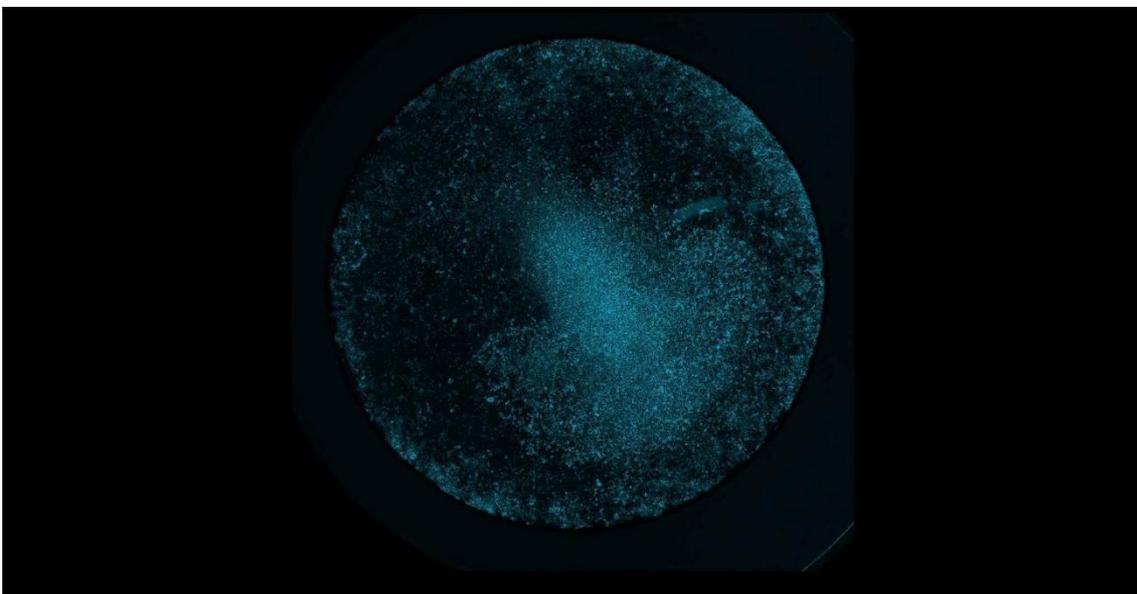


Abb. 3: *Fluoreszenzmikroskopie der MPC11-Zellen.*
Darstellung einer exemplarischen Well, Färbung mit Hoechst 33342.

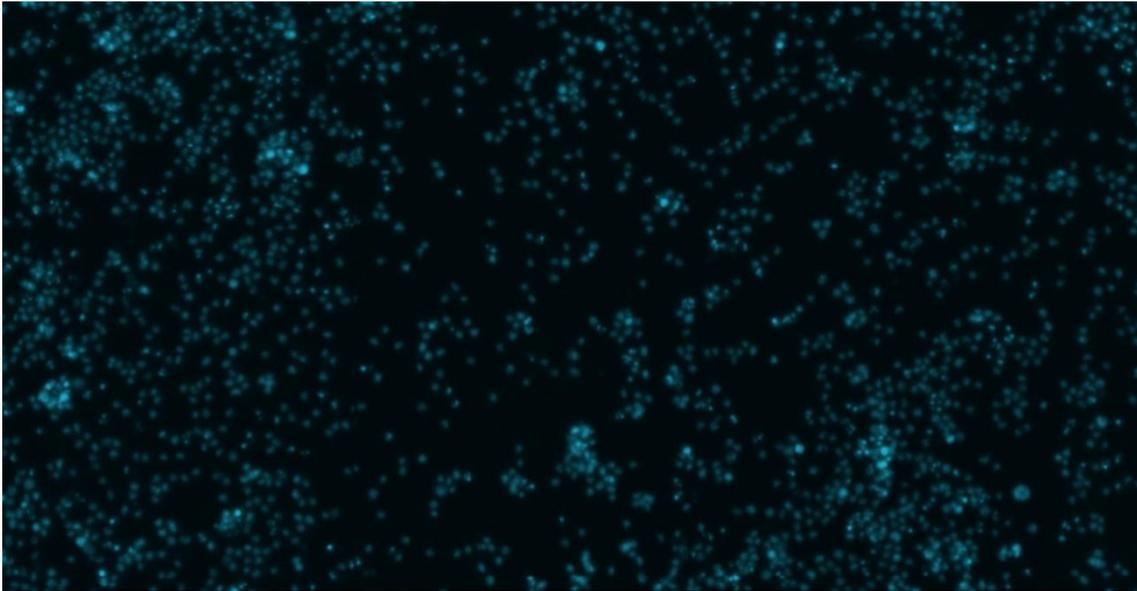


Abb. 4: *Vergrößerter Ausschnitt des in Abb. 3 dargestellten Bildes*
Die blau fluoreszierenden Zellen sind zu erkennen.

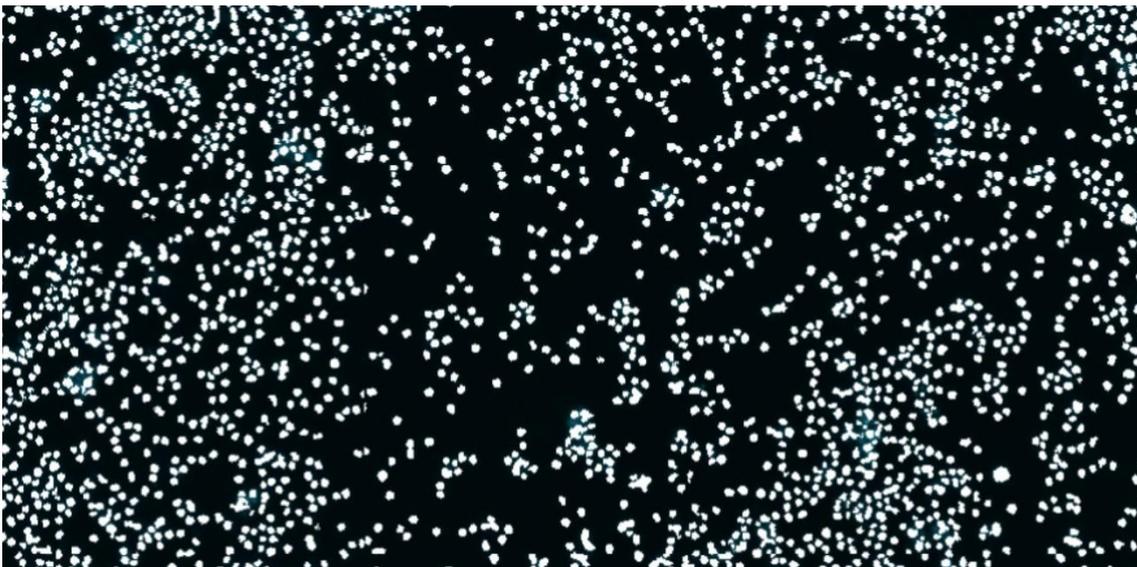


Abb. 5: *Derselbe Ausschnitt wie in Abb. 4, Zellerkennung durch Software.*
Die Einstellungen der Software wurden so angepasst, dass die hier von der Software weiß markierten Zellen die blau fluoreszierenden Zellen überlagerten. Somit wurde der Fehler einer falsch niedrigen Zählung durch Nichterkennen gefärbter Zellen verringert.

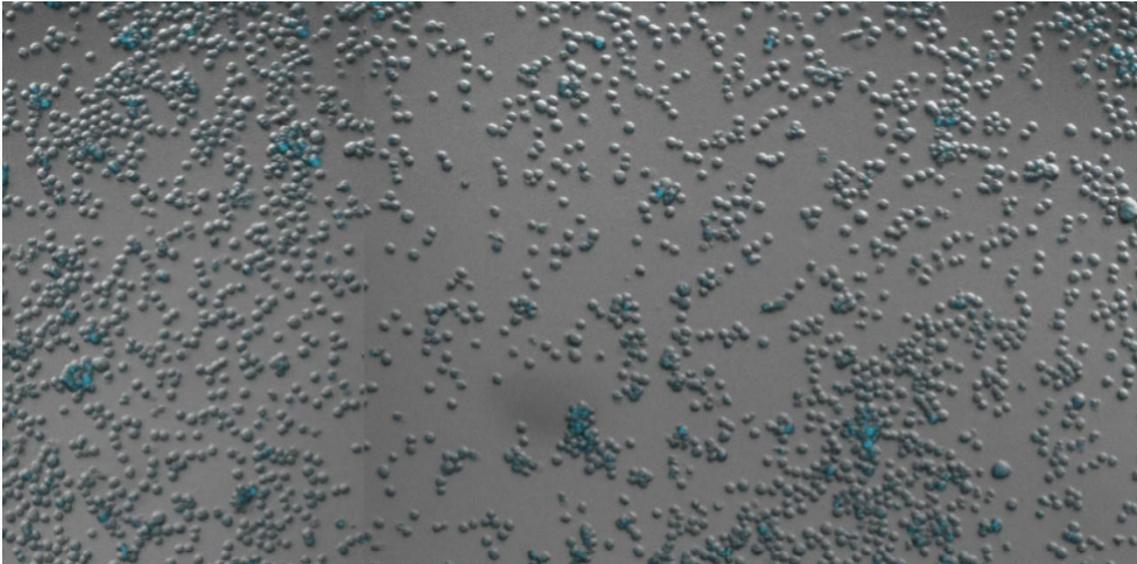


Abb. 6: Derselbe Ausschnitt wie in Abb. 4, Hellfelddarstellung.

Mit Hilfe der Hellfelddarstellung konnte die Morphologie der Zellen beurteilt und geprüft werden, ob die blau fluoreszierenden Partikel tatsächlich den gefärbten Zellen entsprachen. Somit wurde der Fehler einer falsch hohen Zählung, etwa durch Erkennen toter Zellen, verringert.

2.2.3 Proliferationsassays mit Pico

Für die Proliferationsassays (Wachstumskurven, Verdünnungsreihen und Substitutionsversuche) wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells jeweils 10.000 Zellen in 100 μ L Medium pro Well ausgesät. Ausgehend von den Medien ohne Methionin, Cystin und Glutamin wurden diese den Versuchen entsprechend modifiziert, sodass die Zusammensetzung grundsätzlich den Herstellerangaben für das Vollmedium (DMEM: 30 mg/L Methionin, 63 mg/L Cystein, 580 mg/L Glutamin. RPMI 1640: 15 mg/L Methionin, 50 mg/L Cystein, 300 mg/L Glutamin) entsprach (Thermo Fisher Scientific 2021a, 2021b), mit dem Unterschied, dass auf die zu restriktierende AS verzichtet und zusätzlich 10% fötales Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugegeben wurde. Die Zelllinie MPC11 wurde in DMEM, die Linien L363 und KMS12-BM in RPMI 1640 kultiviert. Unmittelbar nach Vorbereitung der Versuche wurde eine erste Referenzmessung t_0 durchgeführt, anschließend wurden die Platten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Tageswerte wurden in Triplikaten angesetzt und die Zelllinien L363 und KMS12-BM nach 24 h, 72 h und 120 h, die Zelllinie MPC11 zusätzlich nach 48 h und 96 h am Pico ausgewertet. Dabei fehlte den Versuchsgruppen entweder Methionin (MetR), Cystein (CysR) oder beide AS (MetR/CysR). Die Gruppe mit Methionin und Cystein entsprechend dem Vollmedium diente als Kontrolle.

Die Verdünnungsreihen für die MetR bzw. CysR wurden in Duplikaten angesetzt, ausgehend von den Konzentrationen des Vollmediums in sieben Schritten log₂ verdünnt und nach 72 h am Pico ausgewertet. Als Kontrollen fungierten der Ansatz mit der Ausgangskonzentration entsprechend dem Vollmedium und ein Ansatz unter absoluter Restriktion. Die Berechnung der IC₅₀ erfolgte mit dem Onlinetool der Firma Bioquest (AAT Bioquest 2021).

Die Kompensationsversuche wurden in Triplikaten angesetzt. Um einen Mangel des MS-Cofaktors Vitamin B12 auszuschließen, wurden die Medien mit 1,5 µM desselben versetzt. Weiterhin fehlte den Versuchsgruppen entweder Methionin oder Cystein, dafür wurden 800 µM der potenziellen Methioninvorstufen DL-HCY (MetR/HCY bzw. CysR/HCY), D- und L-HSE (MetR/HSE bzw. CysR/HSE) oder SAM (MetR/SAM bzw. CysR/SAM) hinzugegeben. Nach 72 h wurden die Zellen mittels Pico gezählt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz mit den AS-Konzentrationen entsprechend dem Vollmedium und ein Ansatz unter absoluter Restriktion ohne Vorstufen (MetR bzw. CysR).

Die Versuche wurden pro Versuchsgruppe und Zelllinie dreimal wiederholt, sodass sich bei den Tageswerten und Kompensationsversuchen für jeden Wert eine Probengröße von n = 9, bei den Verdünnungsreihen von n = 6 ergibt. Für eine schematische Darstellung der Versuchsaufbauten siehe Abb. 7 bis Abb. 9.

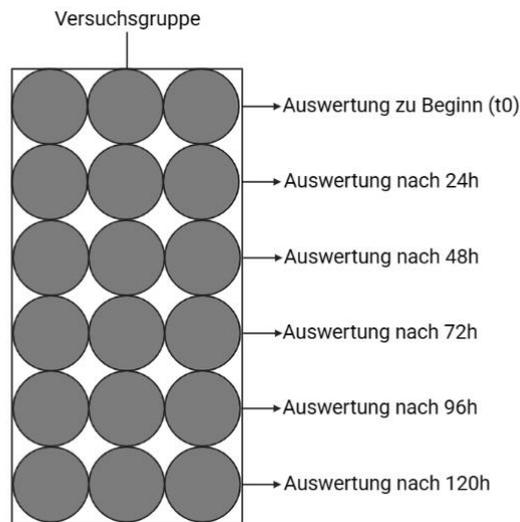


Abb. 7: Versuchsaufbau für die Wachstumskurven

Ausschnitt einer 96-Well-Platte mit schematischem Versuchsaufbau für eine der vier Tageswertgruppen: Die Kontrolle enthielt sowohl Methionin als auch Cystein entsprechend dem Vollmedium, MetR/CysR enthielt weder Methionin noch Cystein, MetR enthielt kein Methionin und CysR kein Cystein. Jedes Well enthielt 100 μ L Medium und zu Beginn 10.000 Zellen. Die Reihen mit je drei Wells wurden im Falle von L363 und KMS12-BM nach 0 h (t_0), 24 h, 72 h und 120 h und bei MPC11 zusätzlich nach 48 h und 96 h ausgewertet. Für jede Gruppe und Zelllinie wurden die Versuche dreimal durchgeführt, somit ergibt sich für jeden Einzelwert eine Probengröße von $n = 9$.

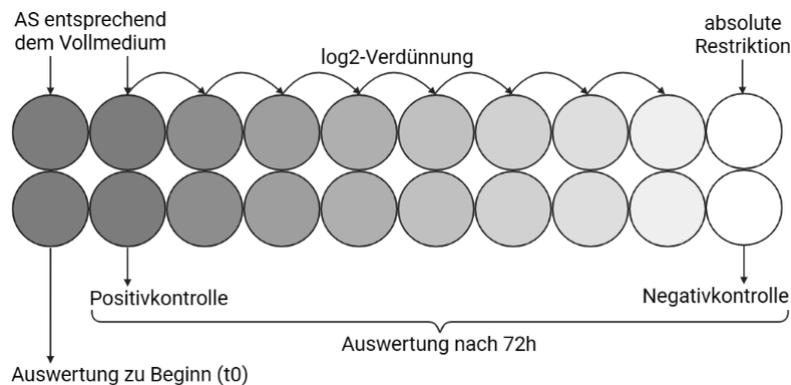


Abb. 8: Versuchsaufbau für die Verdünnungsreihen

Ausschnitt einer 96-Well-Platte mit schematischem Versuchsaufbau für eine \log_2 -Verdünnungsreihe unter MetR oder CysR. Als Kontrollen dienten die Wells mit den AS entsprechend den Konzentrationen des Vollmediums und die Wells unter absoluter Restriktion. Jedes Well enthielt 100 μ L Medium und zu Beginn 10.000 Zellen. Zwei der Wells wurden zur Ermittlung des Anfangswertes t_0 direkt nach Ansetzen des Versuches ausgewertet, die übrigen Wells nach 72 h. Für jede Gruppe und Zelllinie wurden die Versuche dreimal durchgeführt, somit ergibt sich für jeden Einzelwert eine Probengröße von $n = 6$.

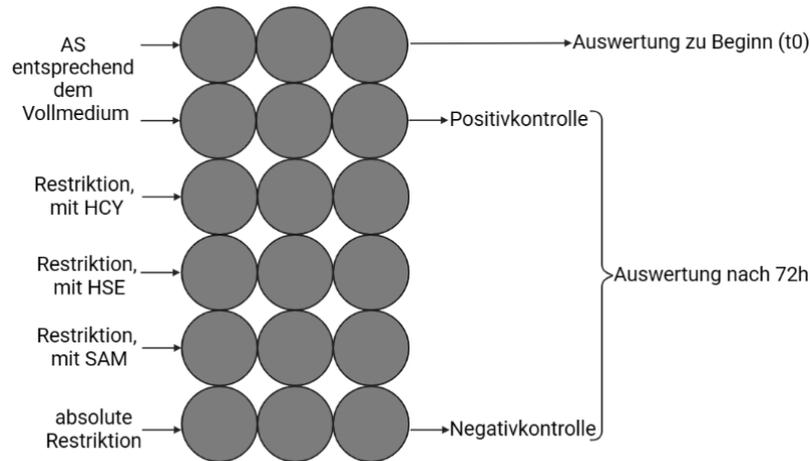


Abb. 9: Versuchsaufbau für die Kompensationsversuche

Ausschnitt einer 96-Well-Platte mit schematischem Versuchsaufbau für einen Kompensationsversuch unter MetR oder CysR bei gleichzeitiger Substitution der potenziellen Vorstufen HCY, HSE und SAM. Als Kontrollen dienen die Wells mit den AS entsprechend den Konzentrationen des Vollmediums und die Wells unter absoluter Restriktion. Jedes Well enthielt 100 μ L Medium und zu Beginn 10.000 Zellen. Drei der Wells wurden zur Ermittlung des Anfangswertes t_0 direkt nach Ansetzen des Versuches ausgewertet, die übrigen Wells nach 72 h. Für jede Gruppe und Zelllinie wurden die Versuche dreimal durchgeführt, somit ergibt sich für jeden Einzelwert eine Probengröße von $n = 9$.

2.2.4 Liquidchromatografie-Massenspektrometrie (LC/MS)

Mittels LC/MS wurden die Veränderungen im Metabolom der Zelllinie MPC11 unter MetR untersucht. Hierfür wurden für jeden Versuchstag getrennt voneinander je drei große Petrischalen mit 2.000.000 Zellen in 25 mL Medium mit entweder 30 mg/L entsprechend der Konzentration des Vollmediums (Kontrolle) oder 0,5 mg/L (MetR) Methionin angesetzt und für 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Ernte der Zellen, indem diese mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischalen gelöst, in ein Falcon überführt und bei 1500 g für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde ggf. reduziert, um die Konzentration der Zellen pro mL anzupassen. Diese musste zwischen $6,7 \cdot 10^5$ und $4 \cdot 10^6$ Zellen pro mL liegen, damit ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß ausreichend für die später erforderlichen 1.000.000 Zellen war und gleichzeitig der genaueste Messbereich des EVE cell counters eingehalten wurde (NanoEntek 2013), siehe Tab. 7. Auch Proben, bei denen die Menge des Mediums nicht angepasst werden musste, wurden zentrifugiert, um ein vergleichbares Vorgehen einzuhalten. Anschließend wurden die Zellen wieder im Medium resuspendiert und die Konzentration der Zellsuspension viermal pro Probe am EVE cell counter bestimmt. Das Volumen, welches die 1.000.000 Zellen enthielt, wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und bei 15 kRCF für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand komplett abgesaugt und das Zellpellet bei -20 °C eingefroren. Für eine

Übersicht siehe Abb. 10. Nach drei Versuchsreihen erfolgte die Metabolomanalyse mittels LC/MS durch Herrn Dr. Werner Schmitz am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg. Bei der Auswertung wurden nur relevante Ergebnisse mit einer Signalqualität von 3 oder besser berücksichtigt (beste Qualität 1, schlechteste Qualität 6). Die hierbei verwendeten Materialien und Methoden können im Appendix („7.1 Metabolomanalyse“, Tab. 12) eingesehen werden.

Tab. 7: *Reduktion des Mediumüberstands der Proben für die LC/MS*

Erforderliche Reduktion des Überstandes vor der Zellzählung. Da die Zellzahlen pro mL zu Beginn des Versuchs und unter MetR aufgrund des gehemmten Wachstums auch im späteren Verlauf zu gering für den Messbereich des EVE cell counters und außerdem die Flüssigkeitsmenge, die 1 Million Zellen enthielt, zu groß für ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß waren, musste die Flüssigkeitsmenge nach Zentrifugation entsprechend der Tabelle reduziert werden. 25 mL zu Beginn waren notwendig, damit die Zellen der Kontrolle nicht aufgrund des starken Wachstums durch Nährstoffmangel abstarben.

<i>Zeit der Ernte nach Stunden</i>	<i>Reduktion des Überstandes auf:</i>
24 h	Kontrolle: 2 mL MetR: 2 mL
48 h	Kontrolle: 7,5 mL MetR: 2mL
72 h	Kontrolle: keine Reduktion notwendig MetR: 5 mL
96 h	Kontrolle: keine Reduktion notwendig MetR: 5 mL
120 h	Kontrolle: keine Reduktion notwendig MetR: 5 mL

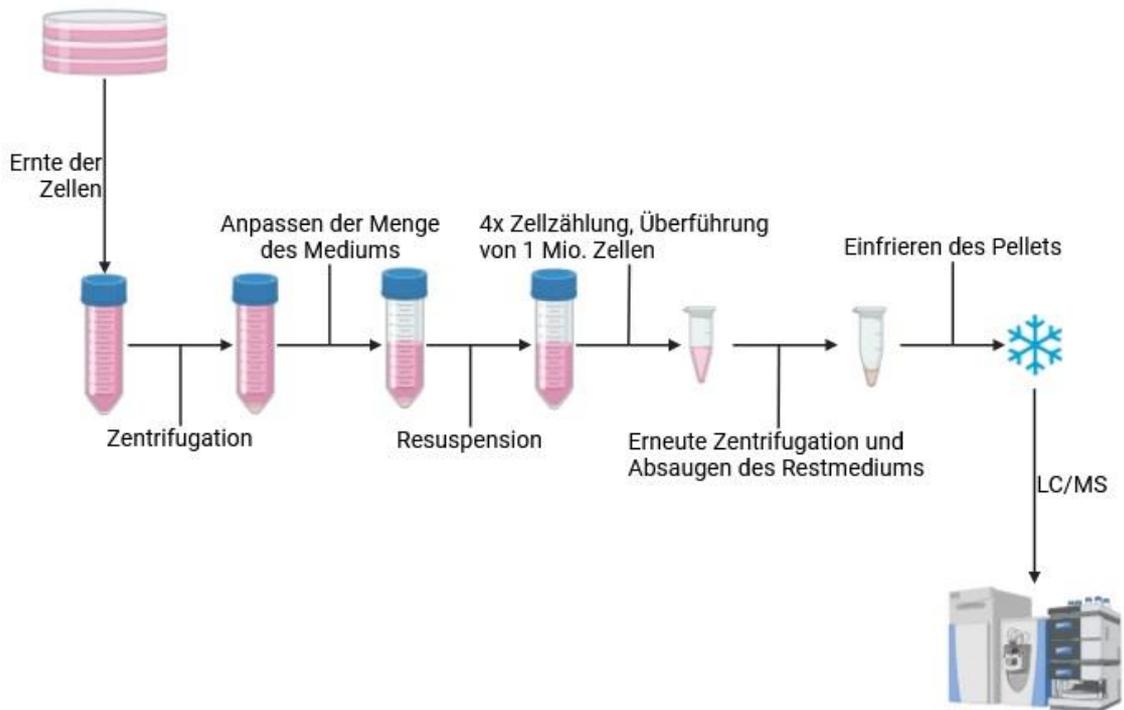


Abb. 10: Zellgewinnung für die LC/MS

Ernte nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h, jeweils drei Ansätze der Kontrolle und drei Ansätze der MetR, die zu Beginn 2 Mio. Zellen in 25 mL Medium enthielten. Erste Zentrifugation mit 1500 g für 5 min., zweite Zentrifugation bei 15 kRCF für 5 min. Die Medienmenge musste je nach Wachstum der Zellen an den Messbereich des EVE cell counters angepasst werden. Eingefroren wurde bei -20°C.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer MetR bzw. CysR auf das Wachstum und den Stoffwechsel der murinen MM-Zelllinie MPC11 sowie der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM untersucht. Dazu wurden zu Beginn Wachstumskurven und Verdünnungsreihen in Abhängigkeit der beiden AS erstellt. Weiterhin war von Interesse, ob die Zelllinien von exogener Methionin- bzw. Cysteinzufuhr abhängig sind, oder ob sie einen Mangel über endogene Stoffwechselwege und Substitution von entsprechenden Vorstufen kompensieren können. Zuletzt wurden Veränderungen des Metaboloms der MPC11-Zellen unter MetR mittels massenspektrometrischer Analyse untersucht, um mögliche Metabolite zu identifizieren, die sich gegebenenfalls zur Etablierung eines charakteristischen „metabolen Fingerabdrucks“ eignen. Die gesamten Ergebnisse können im Appendix („**Error! Reference source not found.** Metabolomanalyse“, Tab. 13) eingesehen werden.

3.1 Proliferationsverhalten der MM-Zelllinien – Wachstumskurven

Methionin ist eine essenzielle AS und kann von Säugetieren nicht de-novo synthetisiert, Cystein hingegen prinzipiell aus HCY und Serin hergestellt werden (Sanderson et al. 2019). Jedoch ist unklar, inwieweit dieser Weg eine Rolle in den untersuchten Zellen spielt, da er normalerweise vor allem in Pankreas, Leber und Nieren abläuft (Kaiser 2020), in hämatopoetischen Zellen dagegen nicht oder nur eingeschränkt (Starheim et al. 2016). Deshalb sollte zunächst geklärt werden, wie sich eine MetR und/oder CysR auf die Proliferation der verwendeten MM-Zelllinien auswirkt.

Hierfür wurde das Wachstum der Zellen unter MetR und/oder CysR alle 24 h über einen Zeitraum von 120 h untersucht und Wachstumskurven erstellt. Die Zelllinie wurde in Vollmedium (Kontrolle) und unter Restriktion von Methionin (MetR), Cystein (CysR) oder beidem (MetR/CysR) inkubiert. Die absoluten Zellzahlen der untersuchten Zelllinien wurden mit Hilfe des Pico bestimmt und das Wachstum anschließend zusätzlich relativ zum Anfangswert t_0 berechnet.

3.1.1 Wachstumskurven der murinen MM-Zelllinie MPC11

Signifikante Veränderungen der Zellzahl zeigten sich bei den Wachstumskurven unter MetR/CysR und CysR nach 24 h, unter MetR und in der Kontrolle nach 48 h. Im Verlauf waren die Werte von MetR/CysR und CysR während der gesamten Versuchsdauer ähnlich, MetR sank im Vergleich weniger stark. Nach 120 h waren in der Kontrollgruppe ungefähr die 5-fache Menge Zellen (512%) relativ zum Ausgangswert t_0 (100%)

enthalten, unter Restriktionsbedingungen sanken die Werte unter t0 (MetR/CysR 41%, MetR 58%, CysR 44%) (Abb. 11).

MPC11

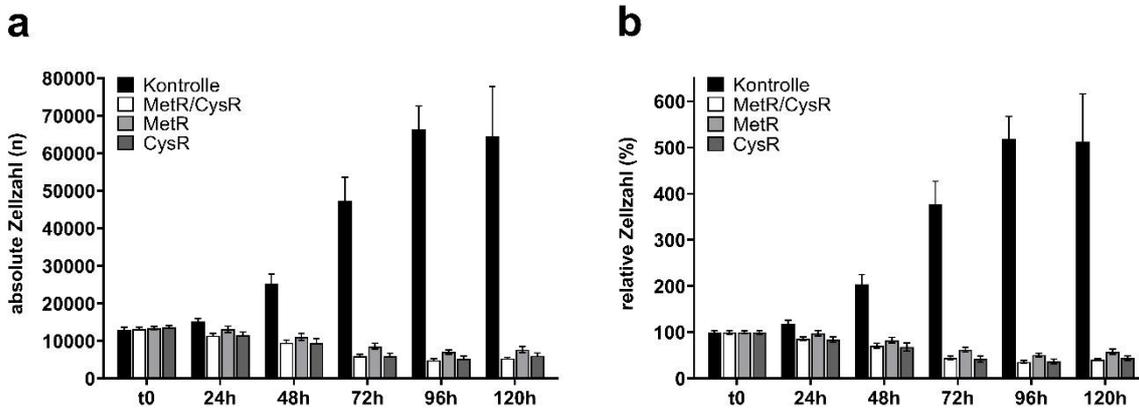


Abb. 11: Wachstumskurven der murinen MPC11-Zellen

Unter MetR und/oder CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a) und relativ zum Anfangswert t0 (b).

3.1.2 Wachstumskurven der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM

Bei den Wachstumskurven der Zelllinie L363 waren erste Effekte in MetR/CysR und CysR nach 24 h, in der Kontrolle und MetR nach 72 h messbar. Die Entwicklung der Zellzahlen zeigte in MetR/CysR und CysR während des gesamten Versuchs vergleichbare Werte, unter MetR war die Reduktion schwächer ausgeprägt. Nach 120 h hatten sich die Zellen in der Kontrolle (174%) bezogen auf den Ausgangswert t0 (100%) annähernd verdoppelt und unter Restriktionsbedingungen auf z.T. unter die Hälfte reduziert (CysR/MetR 30%, MetR 50%, CysR 29%) (Abb. 12).

L363

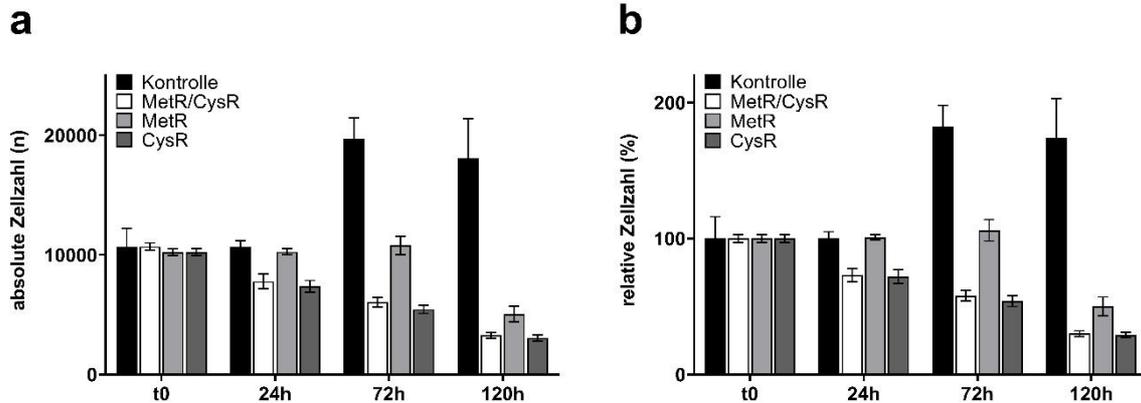


Abb. 12: Wachstumskurven der humanen L363-Zellen

Unter MetR und/oder CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a) und relativ zum Anfangswert t0 (b).

In der Zelllinie KMS12-BM wurden Auswirkungen auf das Zellwachstum unter MetR/CysR und CysR nach 24 h, in der Kontrolle und unter MetR nach 72 h sichtbar. Unter MetR/CysR war der antiproliferative Effekt über die Zeit am stärksten, gefolgt von CysR. In MetR war der Rückgang der Zellzahlen am geringsten. Relativ zum Ausgangswert t0 (100%) enthielt die Kontrolle nach 120 h etwa doppelt so viele Zellen (184%), unter Restriktionsbedingungen hatten sich die Werte ungefähr halbiert (MetR/CysR 49%, MetR 58%, CysR 46%) (Abb. 13).

KMS12-BM

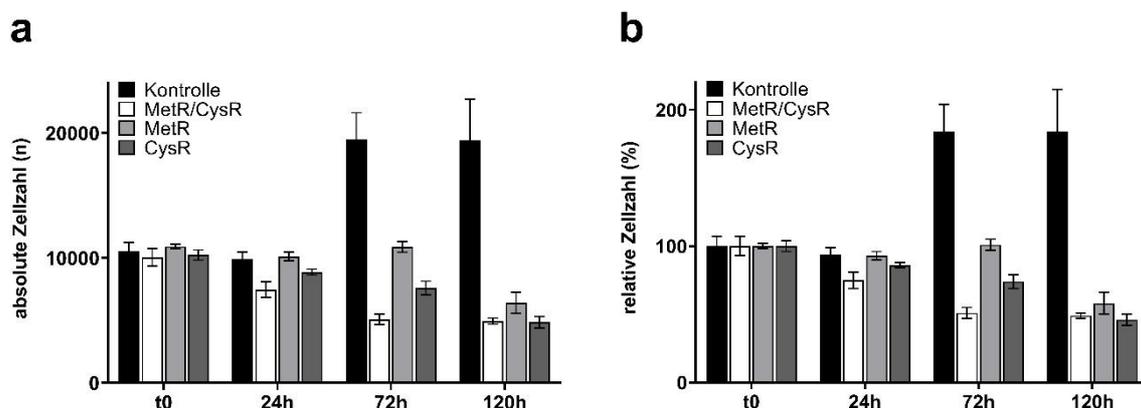


Abb. 13: Wachstumskurven der humanen KMS12-BM-Zellen

Unter MetR und/oder CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a) und relativ zum Anfangswert t0 (b).

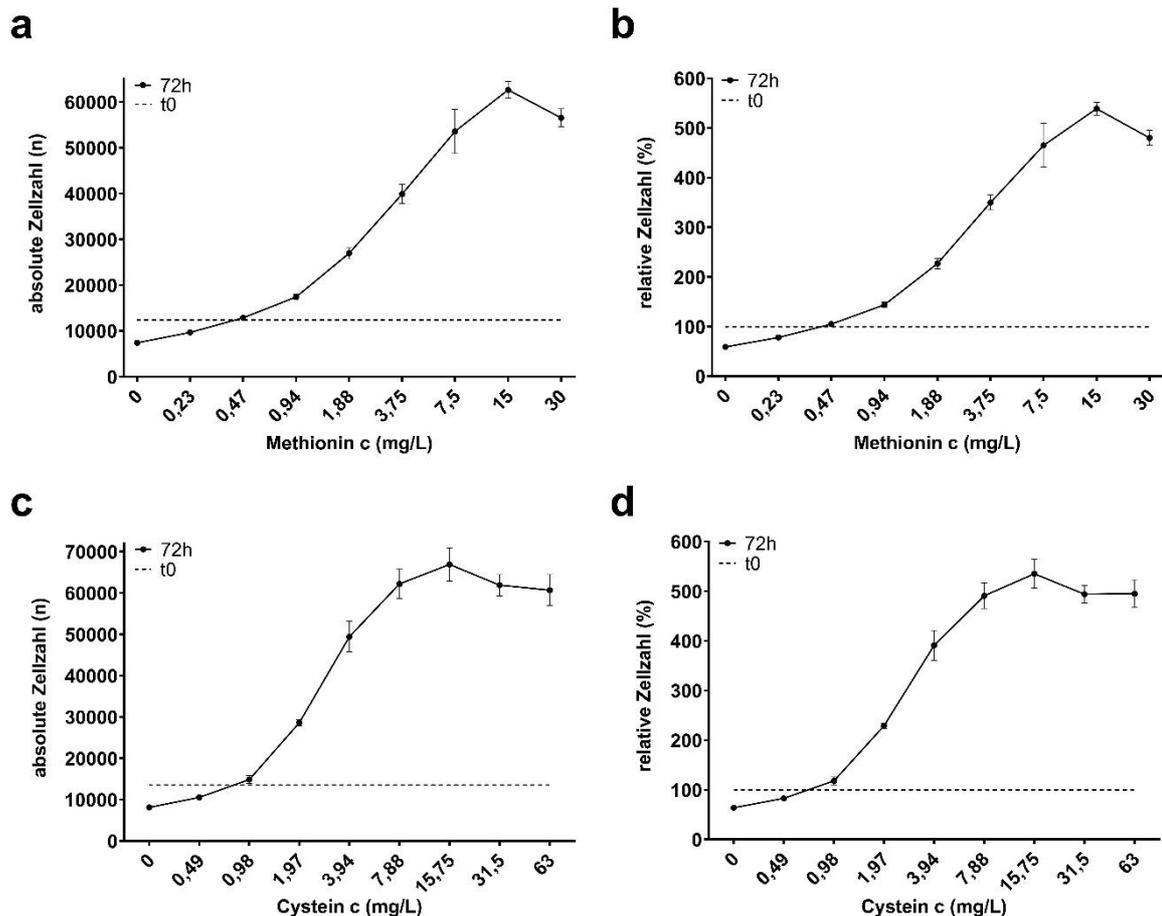
3.2 Einfluss der AS-Konzentrationen

Um den Einfluss der Methionin- bzw. Cysteinkonzentration auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen unter MetR bzw. CysR erstellt. Hierbei sollten die Grenzwerte der AS-Konzentrationen gefunden werden, ab denen die Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Zudem sollte die geringste Konzentration ermittelt werden, bei der die Zellzahl im Vergleich zum Ausgangswert nicht sinkt und somit im Mittel potenziell keine Zellen absterben. Hierfür wurden die AS ausgehend von der Konzentration des Vollmediums \log_2 verdünnt und nach 72 h die absolute Zellzahl mit Hilfe des Pico ermittelt.

3.2.1 Verdünnungsreihen der murinen MM-Zelllinie MPC11

In den Verdünnungsreihen ergab sich ein vermindertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle (MetR 480%, CysR 495%) unter MetR in den Ansätzen ab 3,75mg/L (350%), unter CysR ab 3,94mg/L (391%). Der letzte Wert der Konzentration, bei der noch mehr Zellen enthalten waren als zu Beginn t_0 des Versuchs (100%), lag unter MetR bei 0,47mg/L (105%), unter CysR bei 0,98mg/L (118%). Der IC50-Wert betrug bei der MetR 2,76mg/L, bei der CysR 2,49mg/L (Abb. 14).

MPC11

Abb. 14: \log_2 -Verdünnungsreihen der murinen MPC11-Zellen

Unter MetR bzw. CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t_0 (b und d).

3.2.2 Verdünnungsreihen der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM

Bei der L363-Zelllinie sank die Zellzahl in den \log_2 -Verdünnungsreihen unter MetR ab 0,94mg/L (206%), unter CysR ab 3,13mg/L (215%) unter die Kontrolle (MetR 266%, CysR 371%). Der letzte Wert, bei dem kein Rückgang der Zellzahlen unter den Anfangswert t_0 (100%) zu verzeichnen und somit nicht von einem Absterben der Zellen auszugehen war, lag unter CysR bei 1,56mg/L (102%), unter MetR kam dies auch bei völliger Abwesenheit von Methionin nicht vor. Der IC50-Wert lag unter MetR bei 0,7mg/L, unter CysR bei 3,16mg/L (Abb. 15).

L363

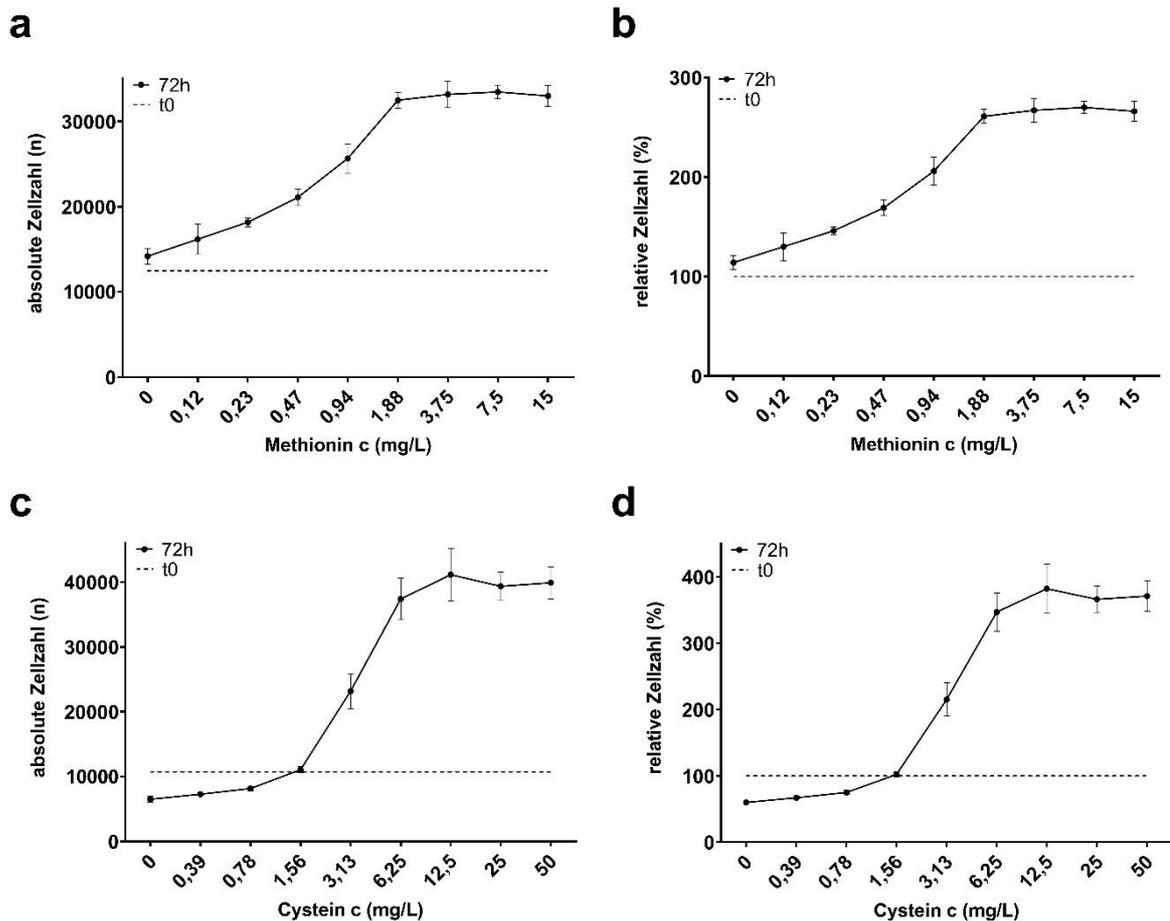
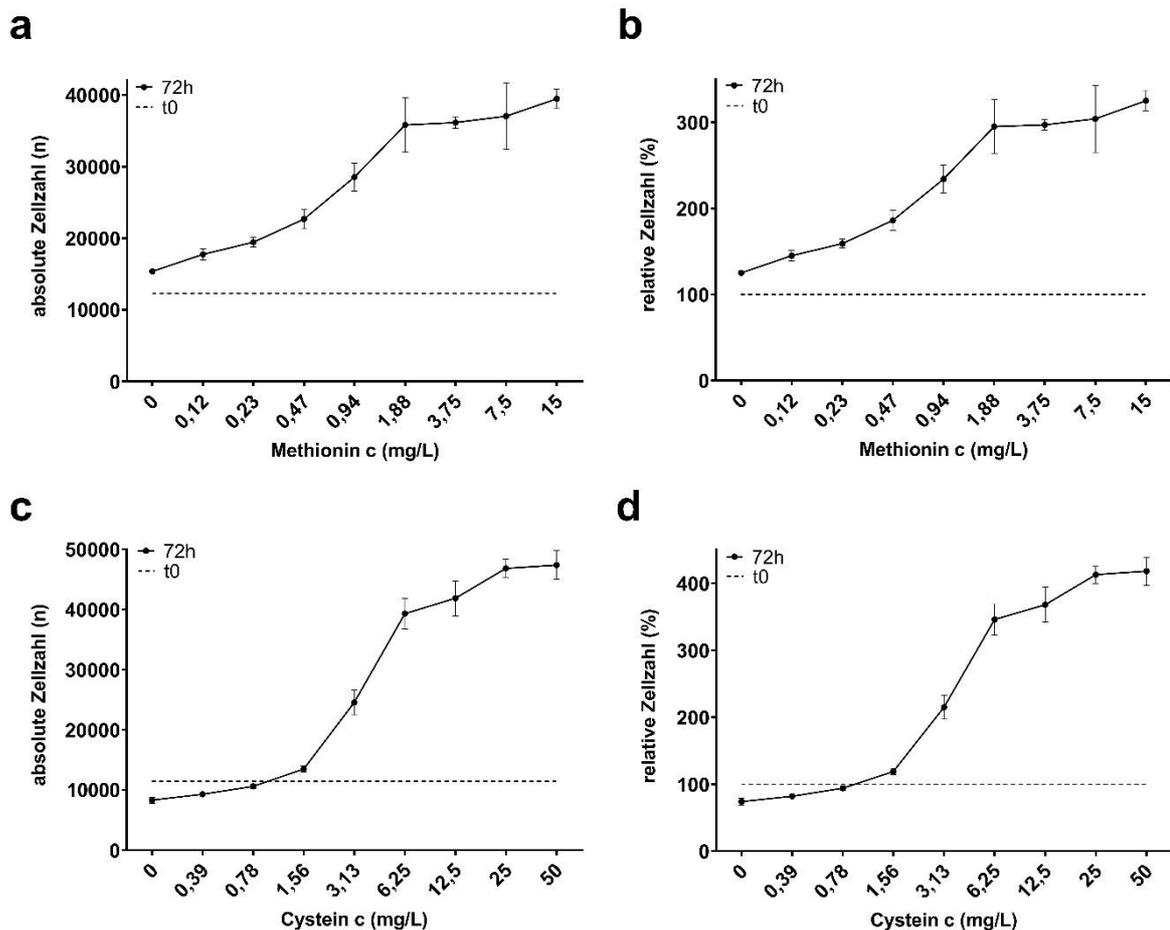


Abb. 15: *log2*-Verdünnungsreihen der humanen L363-Zellen.

Unter MetR bzw. CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t0 (b und d).

Die Zellzählung in den Verdünnungsreihen der KMS12-BM-Zellen fiel unter MetR in den Ansätzen ab 3,75mg/L (297%), unter CysR ab 12,5mg/L (368%) geringer aus als in der Kontrolle (MetR 325%, CysR 418%). Auch hier lagen die Zellzahlen unter MetR stets über dem Ausgangswert t0 (100%), sodass die Zellen mutmaßlich nicht zugrunde gingen, unter CysR war dies noch bis zu einer Konzentration von 1,56mg/L (119%) der Fall. Unter MetR ergab sich eine IC50 von 0,77mg/L, unter CysR von 3,6mg/L (Abb. 16).

KMS12-BM

Abb. 16: \log_2 -Verdünnungsreihen der humanen KMS12-BM-Zellen.

Unter MetR bzw. CysR, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t_0 (b und d).

3.3 Kompensation der MetR bzw. CysR – Substitutionsversuche

Methionin und Cystein kommen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Stoffwechselwegen vor. Sie sind Vorstufen zahlreicher Metabolite und können auf verschiedenen Synthesewegen von den Zellen endogen regeneriert werden (Sanderson et al. 2019). Allerdings weisen Krebszellen häufig einen gesteigerten Methionin- und Cysteinbedarf auf und sind deshalb auf die zusätzliche exogene Zufuhr dieser AS angewiesen (Garcia-Bermudez et al. 2020). Die Kompensationsversuche sollten nachweisen, ob die MM-Zelllinien die Auswirkungen einer MetR oder CysR bei gleichzeitiger Substitution potenzieller Vorstufen der AS endogen kompensieren können. Hierfür wurden die Zellen in verschiedenen Medien inkubiert, denen entweder Methionin oder Cystein fehlte und die stattdessen HCY (MetR/HCY bzw. CysR/HCY),

HSE (MetR/HSE bzw. CysR/HSE) oder SAM (MetR/SAM bzw. CysR/SAM) enthielten. Die Konzentrationen der AS in der Kontrolle entsprach denen des Vollmediums. Nach 72 h wurde die absolute Zellzahl mittels Pico gemessen, die Daten grafisch dargestellt und ausgewertet.

3.3.1 Kompensation in der murinen MM-Zelllinie MPC11

Unter MetR war die Zellzahl im Falle von MetR/HCY (69%) und MetR/HSE (57%) nach 72 h geringer als zu Beginn (t₀) (100%) mit nur geringen Unterschieden zu MetR (76%). Einzig unter MetR/SAM fand ein Wachstum statt (134%), das aber deutlich unter der Kontrolle (664%) lag. Unter CysR unterschritten die Zellen sowohl in CysR/HCY (38%), CysR/HSE (39%) als auch CysR/SAM (34%) den Anfangswert t₀ (100%) und lagen nach 72 h alle auf dem Niveau von CysR (42%). Die Kontrolle (587%) hingegen wuchs stark an (Abb. 17).

MPC11

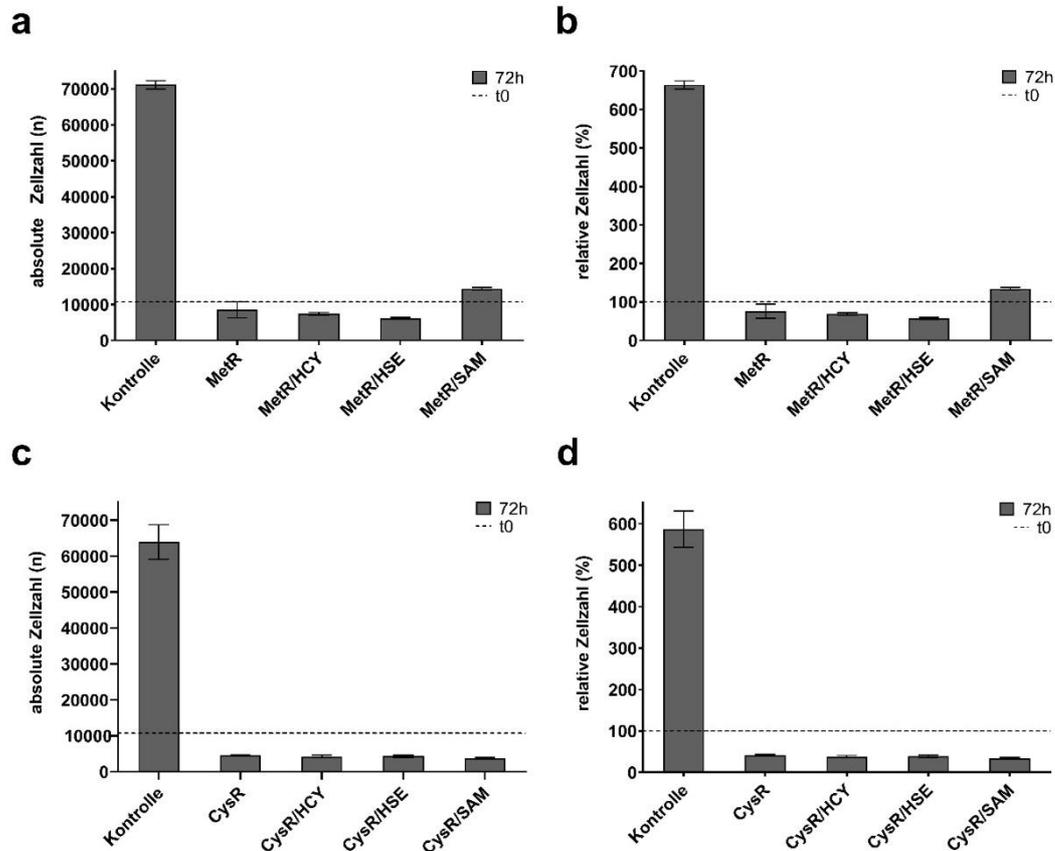


Abb. 17: Kompensationsversuche der murinen MPC11-Zellen

Unter MetR bzw. CysR bei gleichzeitiger Substitution der potenziellen Vorstufen HCY, HSE und SAM, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t0 (b und d).

3.3.2 Kompensation in den humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM

Bei den Versuchsgruppen der L363-Zellen konnte sowohl unter MetR als auch CysR einzig in MetR/HCY (171%) bzw. CysR/HCY (157%) ein leichtes Wachstum und somit eine geringe Kompensation festgestellt werden, die in beiden Fällen jedoch nicht den Stand der zugehörigen Kontrollen (MetR 364%, CysR 212%) erreichte. Unter MetR lagen die Zellzahlen in MetR/HSE (106%) und MetR/SAM (96%) auf Höhe von MetR (106%) und entsprachen weitestgehend der Menge zum Zeitpunkt t0 (100%). Auch unter CysR waren die Zellzahlen in CysR/HSE (58%) und CysR/SAM (63%) mit CysR (58%) vergleichbar, allerdings waren in diesen Fällen ca. 40% weniger Zellen vorhanden als zu t0 gemessen (100%) (Abb. 18).

L363

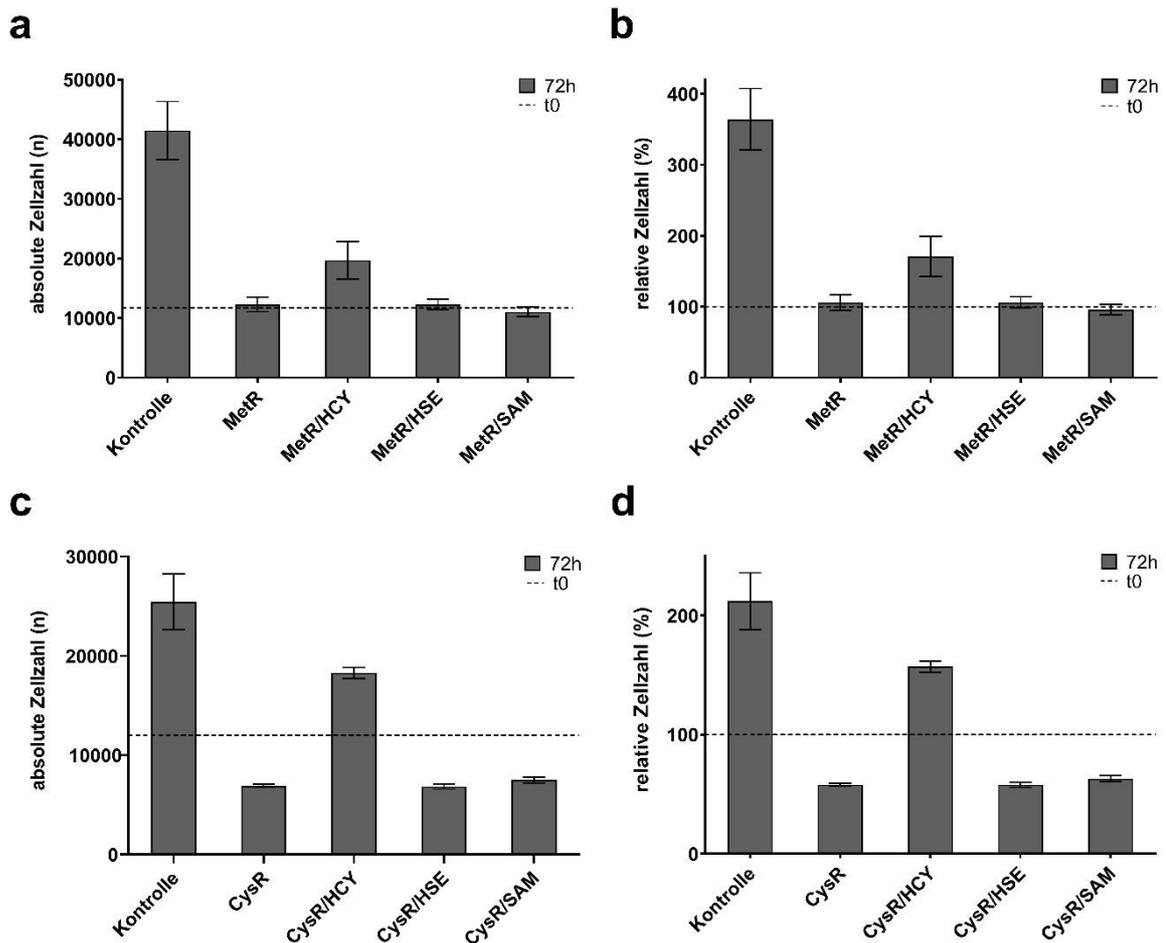


Abb. 18: Kompensationsversuche der humanen L363-Zellen

Unter MetR bzw. CysR bei gleichzeitiger Substitution der potenziellen Vorstufen HCY, HSE und SAM, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t0 (b und d).

Auch in Bezug auf KMS12-BM waren unter MetR und CysR nur die Zellen in MetR/HCY (163%) bzw. CysR/HCY (154%) in der Lage zu wachsen, wenn auch eingeschränkt im Vergleich zu den Kontrollen (MetR 276%, CysR 334%). Unter MetR stagnierten MetR/HSE (102%), MetR/SAM (93%) und MetR (103%) ungefähr auf dem Niveau der zum Versuchsbeginn durchgeführten Zählung t0 (100%). Unter CysR lagen CysR/HSE (56%) und CysR/SAM (60%) etwa gleichauf mit CysR (57%), die Zellzahlen waren allerdings im Vergleich zur Anfangszählung t0 (100%) um ca. 40% geringer (Abb. 19).

KMS12-BM

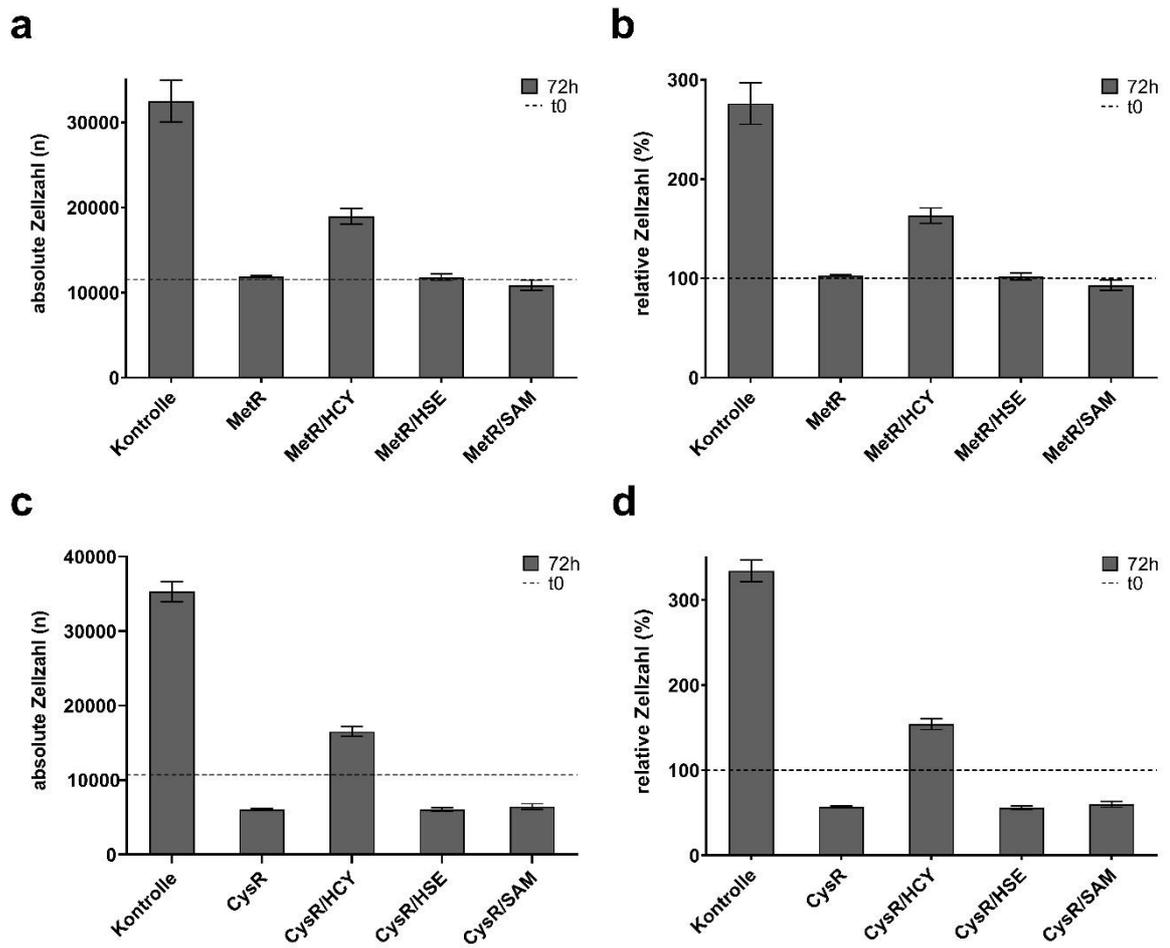


Abb. 19: *Kompensationsversuche der humanen KMS12-BM-Zellen*

Unter MetR bzw. CysR bei gleichzeitiger Substitution der potenziellen Vorstufen HCY, HSE und SAM, Darstellung der Zellzahlen absolut (a und c) und relativ zum Anfangswert t0 (b und d).

3.4 Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR

Grundsätzlich hat eine MetR großen Einfluss auf den Metabolismus. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits das metabolische Profil unter MetR für die murine Fibroblastenzelllinie L929 erstellt. Hierfür wurde der Stoffwechsel dieser Zellen unter Restriktionsbedingungen massenspektrometrisch untersucht und charakteristische Veränderungen als „metaboler Fingerabdruck“ definiert (Schmitz et al. 2021a). In diesem Sinne wurde die MM-Zelllinie MPC11 in dieser Arbeit auf vergleichbare Weise analysiert. Dafür wurden die Zellen entweder unter MetR in Medium mit 0,5mg/L Methionin oder unter Kontrollbedingungen mit 30mg/L Methionin entsprechend dem Vollmedium über 24h bis 120h kultiviert und das Metabolom anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert. Um die Zellgesundheit zu dokumentieren, wurden für jeden Tag Aufnahmen mit Hilfe des digitalen Bildgebungssystems EVOS erstellt. Bis 72 h fanden sich kaum morphologische Veränderungen, die für einen übermäßigen Zelluntergang sprachen, ab 96 h nahmen jedoch Auffälligkeiten wie stark geschrumpfte Zellen zu (Abb. 20). Nachfolgend werden ausgesuchte Ergebnisse der Metabolomanalyse dargestellt (für eine Gesamtübersicht siehe Appendix „**Error! Reference source not found.** Metabolomanalyse**Error! Reference source not found.**“).

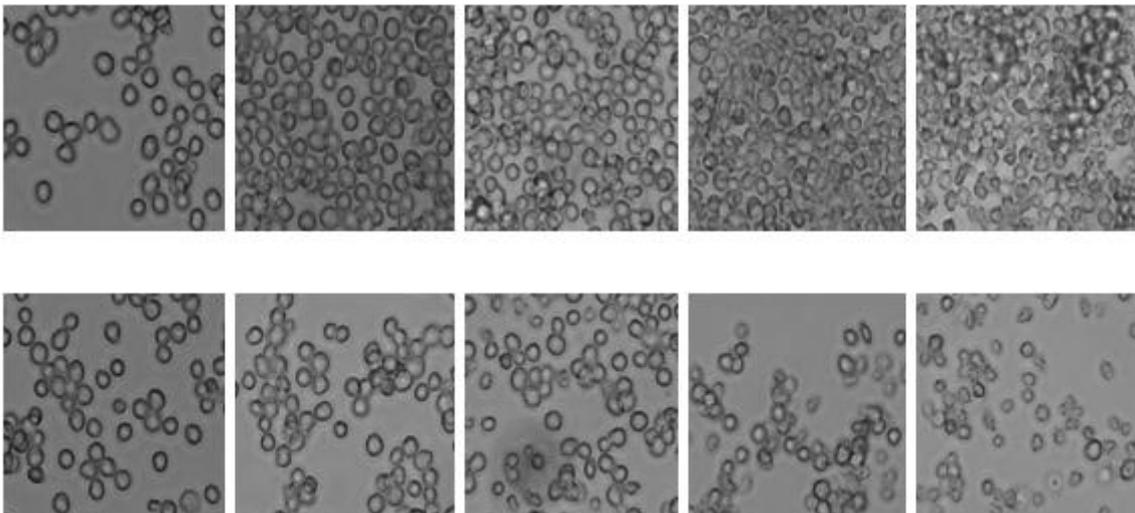


Abb. 20: Aufnahmen mit EVOS

Exemplarische Aufnahmen der Versuchsreihe mit MPC11-Zellen für die LC/MS, mit EVOS in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Obere Reihe Kontrolle, untere Reihe MetR 0,5mg/mL. V.l.n.r.: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h.

3.4.1 Veränderungen im Methioninzyklus und gekoppelten Stoffwechselwegen

In diesem Abschnitt wird auf die Metabolite des Methioninzyklus Methionin, SAM, SAH und HCY, die Polyamine sowie das bei deren Synthese anfallende und zur Regeneration

von Methionin nutzbare MTA und die aus dem Methioninzyklus abzweigenden Transsulfurierungen eingegangen (Sanderson et al. 2019).

In Bezug auf Methionin selbst war vor allem die Effektivität der MetR von Interesse, die auf metaboler Ebene durch die niedrige Methioninkonzentration (2%) reflektiert wurde. Auf die Funktionen des Methionins als Energiesensor und für die Proteinbiosynthese wird an den entsprechenden Stellen eingegangen (siehe Ergebnisse „3.4.2 Veränderungen in Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung“ und „3.4.3 Veränderungen im AS-Stoffwechsel“).

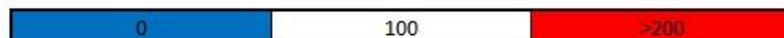
Das aus Methionin gebildete SAM ist für Transmethylierungen und die Polyaminsynthese von Bedeutung. Über Transmethylierungen kann das Genexpressionsmuster beeinflusst werden, dabei wird SAM zu SAH umgewandelt (Sanderson et al. 2019). In entarteten, stoffwechselaktiven MM-Zellen nehmen diese Reaktionen zu (Muylaert et al. 2022) und es finden sich höhere Level des Enzyms MAT2A, das die Umwandlung von Methionin in SAM katalysiert (Wang et al. 2023). Weiterhin sehen Hoffman et al. die Methioninabhängigkeit vieler Krebszelllinien in einem erhöhten Bedarf an SAM begründet (Hoffman et al. 2019). Es fiel auf, dass die Konzentrationen der beiden Metaboliten SAM und SAH unter MetR früher und bis 120 h auch stärker sanken als in der Kontrolle. SAM fiel unter MetR bereits nach 24 h deutlich ab und war nach 120 h nahezu vollständig metabolisiert (3%), gleiches gilt für SAH (1%). Das bei Transmethylierungen aus SAM entstehende SAH wird anschließend durch die AHCY zu HCY hydrolysiert, welches über die MS zu Methionin regeneriert oder aber in den Transsulfurierungen über mehrere Zwischenstufen, u.a. Cystathionin, zu Cystein umgesetzt werden kann. MM-Zellen scheinen allerdings nicht oder nur eingeschränkt in der Lage zu sein, Cystein aus HCY herzustellen (Starheim et al. 2016). In der LC/MS sanken die Konzentrationen des Cystathionins (6%) stark ab, die des Cystins, der Disulfid-Form des Cysteins, hingegen waren deutlich erhöht (893%).

Cystein wiederum ist Ausgangspunkt für das Reduktionsmittel GSH und als solches für den Redoxhaushalt von Bedeutung, da es Zellbestandteile vor schädlicher Oxidierung schützt, indem es selbst zu GSSG oxidiert wird (Sanderson et al. 2019). Einige Krebszellen weisen eine Cysteinabhängigkeit auf, deren Ursächlichkeit in einem erhöhten Bedarf für die GSH-Produktion zum Abfangen oxidierender Verbindungen gesehen wird, die im aktiven Krebszellstoffwechsel vermehrt anfallen (Garcia-Bermudez et al. 2020). Während GSH zuletzt sehr niedrige Werte erreichte (0%), fielen die hohen Konzentrationen des GSH bis 72 h auf (271%).

Die Stellung der Polyamine ist ambivalent, auf der einen Seite wirken sie genomstabilisierend und zytoprotektiv, auf der anderen Seite stehen sie im Verdacht, das Überleben von bereits entarteten Tumorzellen zu fördern (Holbert et al. 2022). Eine Inhibition der Polyaminsynthese oder des -imports zeigte krebshemmende Wirkungen im diffusen intrinsischen Pongliom (Khan et al. 2021). Auch eine über die Herunterregulierung der Polyaminsynthese vermittelte Wirkung der MetR wird diskutiert (Wanders et al. 2020). In der Metabolomanalyse zeigte sich bei den Polyaminen bis auf einen Ausreißer des Spermidins bei 72 h kein wesentlicher Unterschied zur Kontrolle. Das in der Polyaminsynthese anfallende MTA kann zur Regeneration des Methionins genutzt werden. Unter MetR wies MTA schon in der ersten Messung sehr niedrige Konzentrationen auf und war zuletzt nur noch mit 2% vertreten. Eine Übersicht liefert Tab. 8.

Tab. 8: *Methioninzyklus und gekoppelte Stoffwechselwege der MPC11-Zellen unter MetR*
Angaben prozentual zur Kontrolle nach 24h, entsprechend 100%.
Zykl.: Zyklus. Trans-S.: Transsulfurierungen

Verbindung		Kontrolle					MetR				
Klasse	Name	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
Met-Zykl.	Met	100	124	119	91	74	42	29	22	6	3
	SAH	100	94	71	49	26	28	27	22	9	1
	SAM	100	133	104	8	11	20	10	1	12	3
Polyamine	Spermidin	100	41	21	83	45	68	50	179	81	46
	Spermin	100	86	66	80	80	91	104	111	94	93
MTA-Zykl.	MTA	100	46	40	42	25	7	2	3	2	2
Trans-S.	Cystin	100	140	85	99	208	186	270	211	508	893
	Cystathionin	100	111	71	17	4	28	33	40	12	6
	GSH	100	115	98	50	10	87	87	73	3	0
	GSSG	100	83	85	47	18	149	184	271	64	16



3.4.2 Veränderungen in Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung

Die hauptsächlich von der Zelle genutzte Energiequelle ist die Glukose, die in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut und anschließend unter aeroben Bedingungen in Form von Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust oder unter anaeroben Bedingungen zu Laktat umgesetzt wird. Alternativ können zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetat verbunden werden, ein Ketonkörper, auf den bei Bedarf zurückgegriffen werden kann. Eine weitere Möglichkeit zur schnellen, allerdings nur kurzzeitigen Energieregeneration ist die Dephosphorylierung von Kreatinphosphat zu Kreatin (Berg et al. 2018). Eine MetR kann über eine gesteigerte Aktivität der AMPK (Wang et al. 2019a) und über das

Sensorprotein SAMTOR (Gu et al. 2017) zu einer Inhibition des Proteinkomplexes mTOR führen, der maßgeblichen Einfluss auf die Regulierung des Energiehaushalts hat (Inoki et al. 2012).

Bei den Metaboliten der Glykolyse unter MetR zeigt sich nach 120 h sowohl eine deutliche Abnahme des Hexose- (48%) und Glyceralphosphats (4%) nach 96 h als auch der Endprodukte Pyruvat (69%) und Laktat (49%) nach 24 h. Die Auswertung des Citratzyklus hingegen erbrachte keine wesentlichen Unterschiede der Metabolitkonzentrationen in der Kontrolle bzw. unter MetR, in beiden Gruppen nahmen diese über die Zeit in vergleichbarem Maße ab. Kreatin hingegen sank deutlich ab (10%), während die Konzentrationen dessen Abbauproduktes Kreatinin sich kaum unterschieden. Acetoacetat wiederum stieg unter MetR stark an (252%) (Tab. 9).

Tab. 9: *Energiestoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR*
Angaben prozentual zur Kontrolle nach 24h, entsprechend 100%.
a-KG: alpha-Ketoglutarat. -P: -Phosphat.

Verbindung		Kontrolle					MetR				
Klasse	Name	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
Glykolyse	Hexose-P	100	124	217	654	713	192	122	200	24	48
	Glyceral-P	100	171	200	385	385	176	123	83	0	4
	Pyruvat	100	155	318	169	99	70	67	48	65	69
	Laktat	100	114	272	349	333	72	58	57	51	49
Citratzykl.	(Iso-)Citrat	100	51	31	27	19	76	50	45	10	6
	Aconitat	100	52	44	38	44	61	98	74	52	19
	a-KG	100	118	88	26	5	81	51	35	17	17
	Succinat	100	85	63	36	17	110	109	89	27	19
	Fumarat	100	106	88	54	22	83	67	44	6	2
	Malat	100	100	83	56	23	91	65	47	4	1
Arg-Metab.	Kreatin	100	153	150	115	90	116	149	110	26	10
	Kreatinin	100	101	140	123	88	100	90	127	96	89
Ketonkörp.	Acetoacetat	100	117	156	89	55	137	134	229	244	252



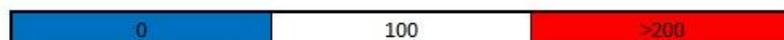
3.4.3 Veränderungen im AS-Stoffwechsel

Methionin ist über mehrere Wege mit dem AS-Stoffwechsel verbunden. Beispielsweise werden AS von der Zelle zu einem großen Teil für die energieaufwändige Proteinbiosynthese verwendet, die durch die Bindung einer mit Methionin beladenen tRNA initiiert wird (Bhattacharyya und Varshney 2016). Zudem zeigten Proteomanalysen von methioninabhängigen A101D-Zellen einen starken Rückgang an für die Translation benötigten Proteinen unter MetR (Garg et al. 2023). Außerdem weisen MM-Zellen eine 2,5-fach höhere Proteinsyntheserate als normale Plasmazellen auf und reagieren empfindlich auf eine Hemmung derselben mit Omacetaxin (Walker et al. 2021).

Unter MetR konnte eine allgemeine Reduktion der AS-Konzentrationen festgestellt werden. Bei den nicht-essenziellen AS war die Abnahme tendenziell ausgeprägter, unter MetR stieg Tyrosin bis 120 h kontinuierlich stark an (383%), bis 72 h auch Glutamin (225%), in der Kontrolle war Prolin stark erhöht (188%). Bei den essenziellen AS war das Bild heterogener, Histidin fiel hierbei am stärksten ab (8%), Valin stieg hingegen an (150%). Die Konzentrationen der übrigen AS hielten sich auf dem Referenzwert oder sanken geringfügig (Tab. 10). Auf die Veränderungen von Methionin und Cystein wurde bereits eingegangen (siehe Ergebnisse „3.4.1 Veränderungen im Methioninzyklus und gekoppelten Stoffwechselwegen“).

Tab. 10: AS-Stoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR
Angaben prozentual zur Kontrolle nach 24h, entsprechend 100%.
Abkürzungen der AS im 3-Buchstaben-Code.

Verbindung		Kontrolle					MetR				
Klasse	Name	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
nicht-essenzielle Aminosäuren	Ala	100	107	131	127	87	84	83	77	33	21
	Arg	100	89	98	87	82	108	89	85	64	70
	Asn	100	124	140	121	97	90	87	66	18	24
	Asp	100	86	44	22	15	98	110	99	45	20
	Gln	100	137	208	40	13	250	243	225	104	98
	Glu	100	97	63	25	9	95	82	72	42	20
	Gly	100	127	167	151	100	127	147	160	81	55
	Pro	100	97	176	216	188	88	92	112	83	62
	Ser	100	122	100	60	44	107	103	94	50	39
	Tyr	100	112	132	93	74	110	135	216	317	383
essenzielle Aminosäuren	His	100	109	91	54	28	115	43	54	21	8
	Ile	100	122	147	104	86	117	125	150	122	105
	Leu	100	117	134	85	69	115	110	120	93	79
	Lys	100	99	117	97	97	126	78	86	70	58
	Phe	100	121	151	113	93	117	117	139	113	100
	Thr	100	133	150	108	71	114	119	122	72	56
	Trp	100	125	148	95	63	126	129	153	116	97
	Val	100	115	135	102	84	114	125	162	148	150



3.4.4 Veränderungen im Purin-/Pyrimidinstoffwechsel

Purine und Pyrimidine stellen u.a. das Gerüst der Nukleinbasen und folglich auch der Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren und sind daher essenziell für das Überleben der Zelle. Sie werden beispielsweise als RNA im Rahmen der Proteinbiosynthese oder als DNA zur Speicherung der Erbinformation benötigt (Berg et al. 2018). MM-Zellen weisen als Antikörperproduzenten eine gesteigerte Proteinsyntheserate auf und sind als Krebszellen zudem wegen ihrer hohen Teilungsrate auf eine kontinuierliche DNA-Replikation angewiesen (Gandolfi et al. 2017). Der Methioninzyklus ist über die MS mit

dem für die Nukleotidsynthese wichtigen Folsäurezyklus verknüpft (Froese et al. 2019) und es liegen bereits Daten vor, die einen Einfluss der MetR auf den Folsäurezyklus und eine Abnahme von Metaboliten des Nukleotidstoffwechsels unter MetR belegen (Gao et al. 2019). Somit ist eine Analyse der Auswirkungen der MetR auf die Purine und Pyrimidine in den MPC11-Zellen sinnvoll.

Dabei war auffällig, dass die Konzentrationen der Metabolite sowohl in der Gruppe der Purine als auch der Pyrimidine unter MetR stärker absanken als in der Kontrolle und bei den wenigen Verbindungen, die einen Anstieg verzeichneten, war dieser unter MetR deutlich geringer. Daneben wiesen einige Verbindungen auch gegenläufige Veränderungen auf. Bei den Pyrimidine etwa waren in der Kontrolle die Konzentrationen von Carbamoylaspartat (618%), sowie von Orotat (159%), dUMP (219%) und Cytosin (129%) nach 120 h deutlich erhöht, die Messwerte unter MetR hingegen reduziert bis stark eingebrochen. Gleiches gilt für Formamidoimidazolcarboxamidribonukleotid (227%), Adenosinmonophosphat (144%), Guanosinmonophosphat (169%), Xanthin (217%) und Harnsäure (189%) bei den Purinen. Auch die für das Rückgrat der DNA wichtigen, im Pentose-Phosphat-Weg (PPW) gebildeten Pentosen waren unter MetR in weitaus geringerer Konzentration vorhanden (15%), Folsäure hingegen stieg an (154%) (Tab. 11).

Tab. 11: Purin-/Pyrimidinstoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR

Angaben prozentual zur Kontrolle nach 24h, entsprechend 100%.

AICAR: Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid. AMP: Adenosinmonophosphat.

Carb.Asp.: Carbamoylaspartat. CMP: Cytosin-Monophosphat. FAICAR: Formamidoimidazol-

Carboxamid-Ribonukleotid. FH-Metab.: Folsäure-Metabolismus. GMP: Guanosenmonophosphat.

IMP: Inosinmonophosphat. -P: -Phosphat. (d)UMP: (Desoxy-)Uridinmonophosphat.

Verbindung		Kontrolle					MetR				
Klasse	Name	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
Pyrimidine	Carb.asp.	100	34.833	33.188	1.283	618	59	56	35	8	10
	Orotat	100	1.542	1.459	272	159	80	42	14	5	2
	Uracil	100	80	138	146	115	159	153	156	34	11
	Uridin	100	59	53	49	27	76	69	87	27	13
	dUridin	100	100	144	154	211	102	65	138	159	164
	UMP	100	79	80	104	87	84	66	81	16	16
	dUMP	100	74	101	203	219	63	72	81	61	60
	Thymin	100	79	75	58	40	123	96	75	33	25
	dThymidin	100	81	69	43	21	114	84	69	26	14
	Cytosin	100	119	153	144	129	66	54	63	30	22
	Cytidin	100	87	83	57	50	102	87	96	54	31
	dCytidin	100	126	145	107	98	67	53	50	21	14
	CMP	100	99	107	110	90	93	74	76	21	20
Purine	AICAR	100	92	109	59	37	110	85	99	56	48
	FAICAR	100	290	192	181	227	351	62	98	7	17
	Inosin	100	101	98	101	68	86	85	101	60	35
	dInosin	100	130	103	80	59	111	91	39	15	6
	IMP	100	679	270	1.742	1.703	6.190	1.255	1.486	228	703
	Adenin	100	100	64	29	9	15	8	12	5	5
	Adenosin	100	132	92	64	41	98	70	54	44	72
	dAdenosin	100	1.626	3.773	1.614	6.165	317	5.205	614	1.747	902
	AMP	100	98	90	173	144	105	58	58	23	52
	Guanin	100	104	134	137	138	106	114	105	45	21
	Guanosin	100	100	102	95	71	89	87	94	50	28
	dGuanosin	100	123	104	67	58	147	99	105	71	25
	GMP	100	99	92	157	169	171	75	71	17	18
	Hypoxanthin	100	83	94	90	68	91	97	85	31	16
	Xanthin	100	110	209	313	217	137	55	53	47	58
Harnsäure	100	98	180	215	180	76	75	92	80	89	
PPW	Pentose-5-P	100	132	138	148	175	103	100	73	5	15
FH-Metab.	Folsäure	100	69	116	121	109	104	96	165	158	154



4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde analysiert, wie sich eine AS-Restriktion auf die Proliferation der humanen L363- und KMS12-BM- sowie der murinen MPC11-Zelllinie des MM auswirkt. Hierfür wurden der Einfluss einer MetR und/oder CysR auf das Wachstum der Zellen untersucht. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob eine Kompensation der Restriktionen über endogene Stoffwechselwege möglich ist oder ob die Zellen von der exogenen Zufuhr der jeweiligen AS abhängig sind. Außerdem sollten die Auswirkungen der MetR auf die MPC11-Zellen durch eine Metabolomanalyse mittels LC/MS untersucht und auf dieser Grundlage ein als Referenz für zukünftige Forschungen dienender charakteristischer „metaboler Fingerabdruck“ erstellt werden. In diesem Zusammenhang wurde auch analysiert, ob die MetR zur Induktion eines LEM führt. Die Auswertung erbrachte folgende grundlegende Ergebnisse, deren Diskussion im Anschluss erfolgt:

Ergebnis 1: *MetR und CysR haben einen antiproliferativen Effekt in den murinen MM-Zelllinie MPC11 bzw. den humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM.*

Ergebnis 2: *Die murine MM-Zelllinie MPC11 bzw. die humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM sind von exogener Methionin- und Cysteinzufuhr abhängig.*

Ergebnis 3: *Die MetR induziert auf metaboler Ebene einen LEM in der murinen MM-Zelllinie MPC11.*

4.1 Ergebnis 1: Sowohl die MetR als auch die CysR hemmen die Proliferation der MM-Zellen

Mit Hilfe von Wachstumskurven und Verdünnungsreihen der entsprechenden AS wurde das Proliferationsverhalten ausgesuchter MM-Zelllinien unter MetR und CysR untersucht (siehe Ergebnisse: „3.1 Proliferationsverhalten der MM-Zelllinien – Wachstumskurven“, Abb. 11 bis Abb. 13 sowie „3.2 Einfluss der AS-Konzentrationen“, Abb. 14 bis Abb. 16). Dabei stellte sich heraus:

- Die Zellzahlen aller Zelllinien blieben unter Restriktion deutlich hinter der Kontrolle zurück und wuchsen außerdem nie über den zum Zeitpunkt der Aussaat gemessenen Wert an.

- Unter MetR stagnierten die gemessenen Zellzahlen länger auf dem Ausgangswert als unter CysR und kombinierter MetR/CysR, bevor sie darunterfielen.
- Die CysR zeigte einen stärkeren proliferationshemmenden Effekt als die MetR und eine alleinige CysR hatte den gleichen Effekt wie die MetR/CysR zusammen (ausgenommen KMS12-BM bis 72h).
- Die MPC11-Zellen sprachen deutlicher auf die Restriktionen an als die humanen Zelllinien.

Unter Restriktionsbedingungen blieben die Zellzahlen aller Zelllinien nicht nur deutlich hinter der Kontrolle zurück, sondern wuchsen auch zu keinem Zeitpunkt über den Wert der zu Beginn ausgesäten Zellen an. Daraus lässt sich eine bereits früh eingetretene Wachstumshemmung ableiten. Diese war umso ausgeprägter, je länger die Restriktion durchgeführt wurde und je niedriger die Konzentrationen der AS war.

Weiterhin fiel auf, dass die absoluten Zellzahlen aller Zelllinien unter MetR anfänglich auf dem Niveau des Ausgangswertes stagnierten. Insbesondere bei den humanen Zelllinien war diese Stagnation sehr deutlich und dauerte bis zu 72 h an. Das stimmt mit den bisherigen Erkenntnissen der eigenen Arbeitsgruppe überein, nach denen der antiproliferative Effekt unter MetR auf einer Inhibition des Wachstums und nicht auf vermehrtem Zelltod beruht (Schmitz et al. 2021b) und ist somit ein Indikator für einen LEM.

Vergleicht man die Restriktionsformen miteinander, fällt in den Wachstumskurven der stärkere Rückgang der Zellzahlen unter CysR verglichen mit MetR auf. Das kann an einem per se höheren Bedarf der Zellen an Cystein im Vergleich zu Methionin liegen, weshalb sich der Mangel drastischer auswirkte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Verdünnungsreihen unterstützt, da die Zahlen aller Zellreihen hierbei unter CysR bereits bei höheren Konzentrationen unter das Wachstum der Kontrolle fielen als unter MetR. Da die CysR im Gegensatz zur MetR keinen LEM induziert (Schmitz et al. 2021b), ist allerdings auch ein Absterben der Zellen unter CysR nicht auszuschließen.

Bei einem Vergleich des Ansprechens der Zelllinien auf die Restriktionen fiel in MPC11 und L363 auf, dass eine alleinige CysR den gleichen Effekt hatte wie die kombinierte MetR/CysR. Das ist interessant, da es zeigt, dass die CysR nicht durch das Vorkommen von Methionin kompensiert werden kann und bekräftigt so die Aussage anderer Autoren, nach der hämatopoetische Zellen nicht oder nur eingeschränkt in der Lage sind, Cystein

aus Methionin zu synthetisieren (Starheim et al. 2016). Eine Ausnahme hierzu stellte die Zelllinie KMS12-BM dar, die bis 72 h in der Lage war, die CysR immerhin teilweise zu kompensieren. Während bei den MPC11- und den L363-Zellen der Effekt der CysR so stark zu sein scheint, dass die Auswirkungen der MetR schon nicht mehr zum Tragen kommen, liegt der Fall bei den KMS12-BM-Zellen anders. Hier verstärken sich die Effekte der MetR und CysR.

Ansonsten wiesen die L363- und KMS12-BM-Zellen eine annähernd gleichartige Reaktion auf die Restriktionen auf, wohingegen die murinen MPC11-Zellen früher und stärker ansprachen. Diesbezüglich sei auf die deutlich höhere Teilungsrate der murinen Zellen verwiesen, was sich in den Kontrollen der Versuche in der etwa zwei- bis vierfach höheren absoluten Zellzahl widerspiegelte. Das empfindlichere Ansprechen lässt sich deshalb am ehesten durch die höhere Stoffwechselrate muriner Zellen erklären (Terpstra 2001).

4.2 Ergebnis 2: Die MM-Zellen sind von exogener Methionin- bzw. Cysteinzufuhr abhängig

Um zu untersuchen, ob MPC11-, L363- oder KMS12-BM-Zellen von exogener Methionin- oder Cystein-Zufuhr abhängig sind oder eine MetR bzw. CysR über endogene Stoffwechselwege kompensiert werden kann, wurden die Kompensationsversuche unter Substitution der Metaboliten HCY, HSE und SAM durchgeführt (siehe Ergebnisse: „3.3 Kompensation der MetR bzw. CysR – Substitutionsversuche“, Abb. 17 bis Abb. 19). Dabei zeigte sich:

- MPC11 konnte unter Restriktion nur unter MetR/SAM wachsen, L363 und KMS12-BM nur unter MetR/HCY und CysR/HCY. Keine der Zelllinien konnte unter Substitution von HSE wachsen.
- Die Restriktionen konnten in keiner Versuchsgruppe vollständig kompensiert werden.

MPC11 konnte in den Versuchsgruppen nur unter MetR/SAM proliferieren, L363 und KMS12-BM nur unter MetR/HCY und CysR/HCY. Das Wachstum bei Kompensation war in allen Zelllinien deutlich geringer als in der Kontrolle, bei Substitution von HSE konnte keine der Zelllinien weiterwachsen. Letzteres entspricht dem wissenschaftlichen Erkenntnisstand, da eine Regeneration von Methionin aus HSE bisher nur in Bakterien nachgewiesen wurde (Hondorp und Matthews 2006). Bevor hingegen aus der fehlenden bzw. unvollständigen Kompensation unter Substitution von HCY oder SAM eine

Methionin- oder Cysteinabhängigkeit abgeleitet werden kann, müssen andere Faktoren in weiterführenden Versuchen ausgeschlossen werden, die u.a. für das Absinken der Zellzahlen verantwortlich sein könnten. Beispielsweise ist die Stabilität der Substituenten im Medium, die Dosis, eine eventuelle Toxizität und die ausreichende Aufnahme in die Zelle zu berücksichtigen.

Der Frage, weshalb einige Krebszellarten nicht oder nur eingeschränkt in der Lage sind unter MetR zu proliferieren, wurde bereits in der Forschungsgruppe um Hoffman et al. nachgegangen. Sie analysierten die Konzentrationen der Metabolite des Methioninzyklus einerseits unter exogener Zufuhr von Methionin und andererseits unter MetR und bemerkten, dass die untersuchten Krebszellen genauso viel oder sogar mehr Methionin synthetisierten als gesunde Zellen. Somit kamen sie zu dem Schluss, dass der Methioninzyklus intakt sei. SAM ist wesentlich als Methylgruppendonator an Transmethylierungsreaktionen beteiligt, dabei entsteht daraus SAH, welches weiter zu HCY umgesetzt wird. Bei Blockade der Hydrolyse von SAH zu HCY stellten die Autoren eine deutlich höhere Akkumulation von SAH in Methionin-abhängigen Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen fest und folgerten daraus einen für die Krebszelle nicht zu kompensierenden hohen Verbrauch von SAM für die Transmethylierungen als Ursache für die Methioninabhängigkeit, was sie als „Hoffman-Effekt“ betitelten (Hoffman et al. 2019). Forschungen in MM-Zellen zeigen zunehmende Methylierungen (Muylaert et al. 2022) und ein vermehrtes Vorkommen des zur Umwandlung von Methionin zu SAM benötigten Enzyms MAT2A und unterstützen so die Theorie eines erhöhten Bedarfs an SAM im Rahmen der Methioninabhängigkeit auch im MM (Wang et al. 2023).

Die zitierte Literatur liefert einen Erklärungsansatz, warum die MPC11-Zellen unter MetR/SAM zumindest ein wenig wachsen konnten. Dagegen geht die fehlende Kompensation der murinen Zellen unter CysR/SAM wiederum mit einer eingeschränkten Synthese von Cystein aus dem Methioninzyklus in hämatopoetischen Zellen d'accord (Starheim et al. 2016). Der Cysteinmangel kann also unabhängig vom Methioninzyklus und deshalb unabhängig von einer Substitution mit HCY oder SAM zu einem Rückgang der Zellzahlen führen. Ebenfalls nicht ungewöhnlich ist das ausbleibende Wachstum der MPC11-Zellen unter Substitution von MetR/HCY und CysR/HCY, da der Methioninbedarf in Methionin-abhängigen Krebszellen die endogene Regeneration aus HCY weit übersteigt (Wang et al. 2019b). Das Verhalten der MPC11-Zellen lässt sich also grundsätzlich mit dem „Hoffman-Effekt“ erklären, auch wenn weitere Untersuchungen notwendig sind.

Es scheint jedoch gravierende Unterschiede in den zugrundeliegenden Mechanismen für das gehemmte Wachstum in den untersuchten Zellen zu geben, denn anders als die murinen Zellen konnten die humanen Zelllinien nicht unter MetR/SAM, dafür jedoch unter MetR/HCY und CysR/HCY proliferieren.

Der fehlende Wachstumsvorteil unter Substitution von SAM in den L363- und KMS12-BM-Zellen lässt vermuten, dass ein übermäßiger SAM-Verbrauch als Ursache für die Methioninabhängigkeit hier, im Gegensatz zu den MPC11-Zellen, eine geringere Rolle spielt. Es ist jedoch nicht klar, weshalb die Zellen unter Substitution von HCY wachsen konnten, da eine Substitution von SAM weder in MetR/SAM noch in CysR/SAM zumindest ansatzweise die Proliferation der humanen Zelllinien fördert und SAM prinzipiell über SAH zu HCY umgesetzt werden kann. Möglicherweise kann das mit den Bedingungen *in vitro* erklärt werden, da das Gleichgewicht des für die Reaktion von SAH zu HCY verantwortlichen Enzyms AHCY hier, anders als *in vivo*, deutlich auf der Seite des SAH liegt und die Synthese von HCY aus SAM limitiert (Vizán et al. 2021). Da der Zusatz von SAM jedoch kein besseres Wachstum zur Folge hatte, ist der „Hoffman-Effekt“ bei den humanen Zelllinien kein ausreichender Erklärungsansatz und das Wachstum unter MetR/HCY kann somit auch nicht durch eine Umwandlung von HCY zu SAM im Methioninzyklus begründet werden. Welche Mechanismen in den humanen Zelllinien eine Rolle spielen, sollte deshalb in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden.

4.3 Ergebnis 3: Die MetR induziert einen LEM in den MPC11-Zellen

Für ihren auf Wachstum und Proliferation ausgerichteten Stoffwechsel benötigen Krebszellen Nährstoffe und Energie (Pavlova et al. 2022). In unserer Arbeitsgruppe unterscheiden wir dabei zwischen einem auf Wachstum und Zellteilung ausgerichteten HEM und einem LEM, bei dem Wachstum und Zellteilung ausbleiben, die Zelle aber auch nicht stirbt. Die MetR ist in der Lage, einen LEM zu induzieren, wie an L929-Fibroblasten gezeigt werden konnte; dabei ergaben massenspektrometrische Analysen charakteristische Veränderungen des Metaboloms, die als „metaboler Fingerabdruck“ definiert wurden und in den L929-Zellen einen Anstieg des Acetoacetats sowie ein Absinken des Kreatins, Spermidins, GSSG und ein niedriges ADP/ATP-Verhältnis umfassen (Schmitz et al. 2021a). Auch in der vorliegenden Arbeit bestätigen die Stagnation der Zellzahlen in den Wachstumskurven und Verdünnungsreihen zusammen mit den EVOS-Bildern, in denen bis 72 h keine auffälligen pathologischen

Zellmorphologien zu sehen waren, dass die MetR in den untersuchten MM-Zellen einen LEM induziert.

Um auch hier tiefergehende Kenntnisse zu den zugrundeliegenden Mechanismen zu erhalten, wurde das Metabolom der murinen MM-Zelllinie MPC11 unter MetR massenspektrometrisch mittels LC/MS untersucht. Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe ergaben sich vorwiegend im Methioninzyklus und daran gekoppelten Stoffwechselwegen, in den Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung, bei den AS sowie den Purinen und Pyrimidinen (siehe Ergebnisse „3.4 Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR“, Tab. 8 bis Tab. 11). Daher sollen ausgesuchte Metabolite der entsprechenden Gruppen im Folgenden auf ihre Eignung als charakteristische Marker für das Vorliegen eines LEM und zur Erstellung eines in diesem Sinne „metabolen Fingerabdrucks“ überprüft werden.

4.3.1 Analyse des Methioninzyklus und gekoppelter Stoffwechselwege

Unter MetR waren innerhalb des Methioninzyklus und der gekoppelten Stoffwechselwege folgende Veränderungen besonders auffällig (siehe Ergebnisse „3.4 Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR“, Tab. 8):

- Absinken von Methionin, SAH und SAM im Methioninzyklus.
- Absinken des MTA
- Anstieg des Cystins bei den Transsulfurierungen

Die niedrigen Methioninkonzentrationen bestätigten die Effektivität der MetR auf metaboler Ebene. Das aus Methionin im ersten Schritt des Methioninzyklus gebildete SAM wird vorwiegend für die Synthese der protein- und genomstabilisierenden Polyamine und als Methylgruppendonor für Transmethylierungen benötigt und kann im ersten Fall über MTA, im letzteren Fall über SAH und HCY wieder zu Methionin regeneriert werden (Sanderson et al. 2019). Obwohl erhöhte Polyaminkonzentrationen in bestehenden Malignitäten als krebsfördernd angesehen werden (Holbert et al. 2022) und eine krebshemmende Wirkung der MetR über die Hemmung der Polyaminsynthese in Betracht gezogen wird (Wanders et al. 2020), wichen die Polyaminkonzentrationen zwischen MetR und der Kontrolle kaum voneinander ab. Demnach scheint SAM auch nicht zugunsten von Transmethylierungen aus diesem Weg abgezogen worden zu sein, dennoch lagen die Konzentrationen von MTA unter MetR deutlich unter denen der Kontrolle, sodass von einer annähernd zum Erliegen gekommenen Regeneration von Methionin aus MTA auszugehen ist. Transmethylierungen steuern die Genexpression

und finden deshalb in stoffwechselaktiven Zellen vermehrt statt, dabei entsteht aus SAM nach Übertragung der Methylgruppe SAH, das Verhältnis von SAM zu SAH wird daher als Indikator für die Transmethylierungsrate verwendet und der übermäßige Bedarf an SAM von einigen Autoren als ursächlich für die Methioninabhängigkeit verschiedener Krebszellen angesehen (Hoffman et al. 2019). Zwar konnten in der Literatur keine Hinweise auf das Vorliegen des „Hoffman-Effekts“ in MM-Zellen gefunden werden, doch treten Methylierungsreaktionen in MM-Zellen verstärkt auf (Muylaert et al. 2022) und das zur Bildung von SAM notwendige Enzym MAT2A wird überexprimiert (Wang et al. 2023). Ebenso wie Methionin und MTA sanken die Konzentrationen von SAM und SAH unter der MetR drastisch ab. Zusammen weisen die niedrigen Werte der Metabolite auf eine deutliche Beeinträchtigung des Methioninzyklus hin und sind ein Indiz dafür, dass die MPC11-Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt unter MetR nicht in der Lage waren, eine hohe, auf Proliferation ausgerichtete Stoffwechselaktivität aufrecht zu erhalten. Daher sind die Veränderungen dieser Verbindungen geeignete Indikatoren für einen LEM.

Cystin besteht aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen Molekülen Cystein, welches wiederum zusammen mit den AS Glycin und Glutaminsäure zur Synthese des wichtigen Reduktionsmittels GSH genutzt werden kann (Sanderson et al. 2019). Einige Krebszellen weisen eine Cysteinabhängigkeit auf, die vermutlich auf einem erhöhten Bedarf an GSH für die Pufferung der im überaktiven Krebsstoffwechsel vermehrt anfallenden oxidierenden ROS basiert, dabei werden zwei Moleküle GSH zu einem Molekül GSSG verbunden (Combs und DeNicola 2019). Passend hierzu sanken die Konzentrationen des Zwischenmetaboliten Cystathionin und stiegen die GSSG-Werte initial stark an. Unter MetR scheinen die Krebszellen also unter vermehrtem oxidativem Stress zu stehen. Auch wenn der Anstieg des Cystins somit kein klassischer Indikator für einen LEM ist, ist er dennoch kennzeichnend für Veränderungen des Stoffwechsels der MPC11-Zellen unter MetR.

4.3.2 Analyse der Stoffwechselwege zur Energiegewinnung

Auch im Energiestoffwechsel ergaben sich markante Unterschiede in den Zellen unter MetR (siehe Ergebnisse „3.4 Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR“, Tab. 9):

- Absinken der Endprodukte Pyruvat und Laktat und Absinken der Vor- und Zwischenstufen Hexose- und Glyceralphosphat der Glykolyse
- Absinken des Kreatins

- Anstieg des Acetoacetats

Eine MetR kann über eine Reduktion des Wachstumsfaktor IGF-1 (Lee et al. 2015), eine erhöhte Aktivität der AMPK (Wang et al. 2019a) und über das Sensorprotein SAMTOR (Gu et al. 2017) zu einer Hemmung des Proteinkomplexes mTOR führen, der an der Regulation des Energiehaushalts der Zelle beteiligt ist (Inoki et al. 2012). Auch wenn eine abschließende Beurteilung der Bedeutung von mTOR an den Ergebnissen dieser Arbeit anhand der durchgeführten Versuche nicht möglich ist, so ist eine Beteiligung aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge dennoch denkbar. Unabhängig von den genauen Mechanismen ergaben sich unter MetR deutliche metabolische Veränderungen. Besonders auffällig war das starke Absinken von Metaboliten der Glykolyse unter MetR. MM-Zellen hängen besonders von der Energiegewinnung durch die Glykolyse ab (Gavriatopoulou et al. 2021), daher deuten die niedrigen Konzentrationen der damit zusammenhängenden Metabolite auf eine reduzierte Glykolyserate und damit auf einen geringeren Energiebedarf hin. Die niedrigen Laktatwerte unter MetR reflektieren die in den eingangs durchgeführten Wachstumskurven nachgewiesene Proliferationshemmung auf metabolischer Ebene, denn hohe Laktatwerte sind typisch für stark proliferierende Zellen (Liberti und Locasale 2016). Die Veränderungen der Glykolyse eignen sich also als Marker für einen LEM.

Eine weitere Möglichkeit der Zelle Energie bereitzustellen, ist die Übertragung der Phosphatgruppe von Kreatinphosphat auf ADP, wobei der Energieträger ATP und Kreatin entstehen, das bei Energieüberschuss erneut zu Kreatinphosphat regeneriert werden kann oder zum Abbauprodukt Kreatinin zerfällt, welches im Organismus über die Nieren ausgeschieden wird (Wyss und Kaddurah-Daouk 2000). Unter MetR sanken die Kreatinspiegel stark ab. Das kann auf einen erhöhten ATP-Verbrauch oder ein Nachlassen der ATP-Regeneration über diesen Weg und so auf einen herunterregulierten Energiebedarf hinweisen. Damit übereinstimmend zeigte sich auch in den bereits untersuchten L929-Zellen eine Abnahme des Kreatins unter MetR, was die Auswahl als metabolischen Marker für den LEM unterstützt.

Weiterhin war unter MetR ein starker Anstieg des Ketonkörpers Acetoacetat ersichtlich, der aus zwei Molekülen des wichtigen Energieträgers Acetyl-CoA besteht und unter anderem bei der β -Oxidation der Fettsäuren anfällt (Berg et al. 2018). Hieraus ergeben sich weitere Indizien für einen LEM, da die Zellen das Acetoacetat nicht verbrauchen, sondern speichern oder – wie auch L929-Zellen unter MetR – vermehrt Fettstoffwechsel betreiben (Schmitz et al. 2021a). Auf diese Weise passen die MPC11-Zellen ihren

Metabolismus gezielt im Sinne eines LEM an die MetR an, sodass auch Acetoacetat als Marker geeignet erscheint.

4.3.3 Analyse des AS-Stoffwechsels

Bei den AS wurden folgende Auswirkungen der MetR deutlich (siehe Ergebnisse "3.4 Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR", Tab. 10):

- Absinken der Gesamt-AS
- Die AS Tyrosin, Valin, Glutamin und Prolin entwickelten sich entgegen den Trends der anderen AS

AS können von Leber- und Muskelzellen zur Energiegewinnung genutzt werden (Berg et al. 2018), werden darüber hinaus aber vor allem für die Synthese von Proteinen benötigt, die den Großteil der Zellmasse ausmachen (Hosios et al. 2016). Methionin spielt eine besondere Rolle bei der energieaufwändigen Proteinbiosynthese, da diese durch die Bindung einer mit Methionin beladenen tRNA eingeleitet wird (Bhattacharyya und Varshney 2016). Proteomanalysen methioninabhängiger A101D-Zellen offenbarten eine Reduktion an für die Translation wichtigen Proteinen unter MetR (Garg et al. 2023). Außerdem weisen MM-Zellen eine ca. 2,5-fach höhere Proteinsyntheserate als gesunde Plasmazellen auf und reagieren empfindlich auf die Gabe des Translationsinhibitors Omacetaxin (Walker et al. 2021).

Vor diesem Hintergrund lassen sich die niedrigen AS-Konzentrationen eventuell auf einen reduzierten AS-Bedarf, bedingt durch eine nachlassende Proteinbiosynthese, zurückführen und eignen sich deswegen als Marker für den LEM. Diese Ansicht wird durch die Ergebnisse in den L929-Zellen weiter unterstützt; hier zeigte sich unter MetR ebenfalls eine starke Abnahme der AS und überdies eine Sekretion derselben in das umliegende Medium, was möglicherweise damit begründet werden kann, dass die Zelle auf diese Weise vermeintlich überflüssige AS ihrer Umgebung bzw. dem Organismus wieder zur Verfügung stellt (Schmitz et al. 2021a). Die AS Tyrosin, Valin, Glutamin und Prolin scheinen eine besondere Rolle unter MetR in MPC11-Zellen zu spielen, sie entwickelten sich entgegen den Trends der anderen AS. Die Konzentrationen von Thyrosin, Valin und Glutamin lagen unter MetR deutlich über, die Prolinspiegel hingegen weit unter denen der Kontrolle.

4.3.4 Analyse des Purin-/Pyrimidin-Stoffwechsels

Weitere analysierte Verbindungen waren die Gruppen der Purine und Pyrimidine. Hier ergaben sich folgende prägnante Unterschiede zwischen MetR und der Kontrolle (siehe Ergebnisse "3.4 „Metabolomanalyse der MPC11-Zellen unter MetR“, Tab. 11):

- Absinken der Gesamt-Purine/Pyrimidine
- Absinken des Pentose-5-Phosphats
- Anstieg der Folsäure

Nicht nur benötigt die Zelle Energie für die de-novo-Synthese der Purin- und Pyrimidinbasen, sondern auch für deren Verknüpfung mit Pentosen zu Nukleosiden und weiter mit Phosphaten zu Nukleotiden, die wiederum zu Nukleinsäuren wie DNA und Ribonukleinsäuren wie RNA verbunden werden (Berg et al. 2018). In diesem Kontext ergeben sich für Krebszellen tiefgreifende Abhängigkeiten, da sie aufgrund ihres aktiven Stoffwechsels und der hohen Teilungsrate sowohl verstärkt auf RNA, beispielsweise im Rahmen der Proteinbiosynthese, als auch auf DNA für die Replikation während der Zellteilung angewiesen sind (Gandolfi et al. 2017). Unter MetR kam es zu einem deutlichen Absinken sowohl der Purine und Pyrimidine als auch des Pentose-5-Phosphats und bei den wenigen Metaboliten, die einen Anstieg verzeichneten, war dieser geringer als in der Kontrolle. Dies stimmt generell mit den Erkenntnissen anderer Arbeiten überein, die eine Reduktion von Nukleotiden in Mäusen und dem Menschen unter MetR feststellten (Gao et al. 2019). Ergo sind die niedrigen Konzentrationen der Purine, Pyrimidine und des Pentose-5-Phosphats brauchbare Marker für einen LEM.

Folsäure muss durch die Dihydrofolat-Reduktase über Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat reduziert werden, um als Methylgruppenüberträger am Folsäurezyklus und somit an der Nukleotidsynthese teilnehmen zu können (Froese et al. 2019). Da Dosen unter der Wirkungsgrenze des auf den Folsäurezyklus wirkenden Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil erst unter zusätzlicher MetR zu einem gehemmten Tumorwachstum im Mausmodell führten, ist ein Einfluss der MetR auf den Folsäurezyklus anzunehmen (Gao et al. 2019). Insofern spricht die höhere Folsäurekonzentration unter MetR für eine geringere Verstoffwechslung derselben im für die Nukleotidsynthese wichtigen Folsäurezyklus und eignet sich deshalb als Marker für einen LEM.

4.3.5 Vergleich mit dem Metabolom von L929-Zellen unter MetR

Die beschriebenen Veränderungen des Metaboloms unter MetR reflektieren auf Grundlage der zitierten Literatur und den bereits in der murinen Fibroblasten-Zelllinie

L929 gewonnenen Erkenntnissen das Vorliegen eines LEM auf der metabolen Ebene. Dementsprechend kommen zahlreiche Metabolite als Marker für einen charakteristischen „metabolen Fingerabdruck“ in Frage. Im Vergleich mit dem bisher erbachten Nachweis in L929-Zellen stimmen die Veränderungen folgender Metabolite überein und werden daher gleichfalls als Marker für den LEM in MPC11-Zellen vorgeschlagen: ein Anstieg des Acetoacetats sowie eine Abnahme des Kreatins, der AS und der Purine und Pyrimidine (Schmitz et al. 2021a). Außerdem kann das Spektrum bei den MPC11-Zellen auf der einen Seite um einen Anstieg der Folsäure, auf der anderen um eine Reduktion von SAM, SAH und MTA des Methionin- bzw. MTA-Zyklus, des Pentose-5-Phosphats des PPW und der Endprodukte Pyruvat und Laktat sowie der Vor- und Zwischenstufen Hexose- und Glyceralphosphat der Glykolyse erweitert werden. Der starke Anstieg des Cystins lässt sich zwar nicht unmittelbar auf einen LEM zurückführen, ist aufgrund der Eindeutigkeit aber ebenfalls als charakteristische metabolische Veränderung unter MetR von Relevanz.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die MetR und CysR als geeignete Methoden zur Wachstumshemmung der MM-Zelllinien MPC11, L363 und KMS12-BM vorgestellt werden. Für weitere Anwendungsmöglichkeiten sollte in nachfolgenden Arbeiten mit Stoffen experimentiert werden, die die Verfügbarkeit von Methionin und/oder Cystein unabhängig von einer „diätetischen“ Restriktion einschränken, beispielsweise durch Elimination der AS aus dem Blut oder durch Inhibition der Aufnahme in die Zelle.

In diesem Kontext wurde bereits an dem Methionin-spaltenden Enzym Methioninase geforscht. Allerdings hat sich darunter zwar eine Reduktion der im Blut zirkulierenden Methioninmenge und bei Patienten mit Prostatakarzinom auch der Tumormarker gezeigt, es konnten jedoch keine positiven Auswirkungen auf das Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Endicott et al. 2021). Eine alternative Herangehensweise stellt die Blockade des aus einem Heterodimer bestehenden Transporters SLC7A5/SLC3A2 dar, über den Methionin zusammen mit anderen neutralen AS in die Zelle gelangt (Massaro et al. 2020). Eine Inhibition des Transporters mit JPH203 zeigte bereits wachstumshemmende Wirkungen sowohl auf Krebszellen als auch auf Xenografts (Kanai 2022). Analog zur Methioninase reduziert die Gabe von Cyst(e)inase das verfügbare Cyst(e)in, zeigte darüber hinaus aber auch vielversprechende Wirkung in humanen Brust- und Prostatakrebszellen und konnte die mediane Überlebenszeit von Mäusen, die an einer Krankheit litten, die der chronischen

lymphatischen Leukämie des Menschen ähnelt, verdoppeln (Cramer et al. 2017). Weiterhin wurde die CysR bereits durch Gabe von Sulfasalazin, einem Hemmstoff des Cysteinimports, an einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie angewendet, wobei sich ein Rückgang der Leukämiezelllast einstellte (Pardieu et al. 2022). Insgesamt stellen die vorgestellten Maßnahmen zur „nicht-dietätischen“ Restriktion also interessante Ansätze dar, deren weitere Erforschung auch in Zellen des MM angezeigt ist.

In den Kompensationsversuchen wurde deutlich, dass keine der Zelllinien in der Lage war, das Fehlen von Methionin oder Cystein aus den möglichen Vorstufen HCY, HSE oder SAM vollständig zu kompensieren. Die genauen Ursachen hierfür sind noch unklar und bedürfen weiterer Forschungsarbeit, insbesondere mit Blick auf die Frage, für welche Prozesse die AS in den Zellen in welchem Ausmaß benötigt werden. Einen Ansatzpunkt liefert die Forschung von Hoffman et al., nach deren Vorbild ggf. auch bei den MM-Zellen überschießende Transmethylierungsreaktionen als mögliche Ursache für die Methioninabhängigkeit durch Messung des anfallenden SAH bei gleichzeitiger Blockade der weiteren Hydrolyse zu HCY überprüft werden könnten (Hoffman et al. 2019). Weiterführend kann zusätzlich eine Isotopenmarkierung der AS Methionin und Cystein zum Einsatz kommen, um deren Verstoffwechslung genauer zu untersuchen (Grankvist et al. 2018), ebenso kann die Analyse des Mediums, in denen die Zellen unter MetR kultiviert wurden, hierüber weiteren Aufschluss geben (Schmitz et al. 2021a).

Die in den Wachstumskurven und Verdünnungsreihen unter MetR zu beobachtende Proliferationshemmung ohne Rückgang der Zellzahl unter den Ausgangswert für mehrere Tage belegen zusammen mit den die Zellgesundheit dokumentierenden EVOS-Bildern das Vorliegen eines LEM. In Myelomzellen ist ein durch das CRM Metformin ausgelöster LEM durch einen Zellzyklusarrest mit zunehmenden Autophagieprozessen ohne Apoptose gekennzeichnet (Wang et al. 2018). Deshalb sollten nachfolgende Arbeiten die Induktion von Autophagieprozessen prüfen, da sie auch für die zellprotektive Wirkung der MetR von Bedeutung ist (Bárcena et al. 2019) und so möglicherweise als zusätzlicher Aspekt des LEM etabliert werden könnte. Eine Möglichkeit hierzu ist beispielsweise der Nachweis des Autophagosomproteins LC3 mittels Western Blot (Singh und Bhaskar 2019). Auch das Vorliegen Apoptose-assoziiierter Verbindungen wie beispielsweise Caspasen kann mittels Western Blot nachgewiesen oder auch ausgeschlossen werden und so die Definition des LEM unter MetR präzisieren (Kashyap et al. 2021).

Die massenspektrometrische Analyse offenbarte einige charakteristische Veränderungen und gibt Hinweise auf weitere mögliche Forschungsbereiche in MM-Zellen unter MetR. In Bezug auf den Methioninzyklus könnten beispielsweise synergistische Effekte der MetR mit FIDAS-5, einem bereits in MM-Zellen erprobten Inhibitor der MAT2A (Wang et al. 2023) oder PF-06939999, einem Hemmstoff der Methyltransferase PMRT5, dem im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom bereits krebshemmende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Jensen-Pergakes et al. 2022), untersucht werden.

Da in MM-Zellen von einer eingeschränkten Synthese von zur Bildung des Reduktionsmittels GSH benötigten Cysteins aus Methionin (Starheim et al. 2016) und aufgrund des durch den Anstieg von Cystin und GSSG bestehenden Verdachts auf erhöhten oxidativen Stress in Krebszellen unter MetR auszugehen ist, könnte der Redox-Zustand der Zellen, etwa mittels Durchflusszytometrie mit Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, unter MetR gemessen werden. Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ist zellmembranpermeabel und wird intrazellulär durch Esterasen und anschließende Oxidation in das fluoreszierende Dichlorfluorescein umgewandelt, dessen Akkumulation in oxidativem Milieu einen mittels Durchflusszytometer messbaren Anstieg der Fluoreszenz bewirkt (Eruslanov und Kusmartsev 2010). An dieser Stelle sei erneut auf die bereits im Zusammenhang mit den Wachstumskurven unter CysR vorgeschlagene Erprobung von das Cysteinangebot einschränkenden Pharmaka, wie Cyst(e)inase (Jones et al. 2019; Cramer et al. 2017) oder Sulfasalazin (Pardieu et al. 2022) verwiesen.

Um den Einfluss von mTOR unter MetR zu beurteilen, kann dessen Aktivität, beispielsweise mit phosphospezifischen Antikörpern gegen dessen Substrat 4E-BP1 und Western Blotting gemessen werden (Hong und Inoki 2017).

Die Reduktion der Gesamt-AS passt zu den Ergebnissen anderer Autoren, die eine Abnahme der Proteinexpression unter MetR in A101D-Melanomzellen feststellten (Garg et al. 2023). Da MM-Zellen eine erhöhte Proteinsyntheserate aufweisen und empfindlich auf den Translationsinhibitor Omacetaxin reagieren (Walker et al. 2021), könnten die Auswirkungen auf das Überleben von MM-Zellen bei Gabe von Omacetaxin und gleichzeitiger MetR untersucht werden.

Aufgrund des Einflusses auf die Konzentrationen von Purinen und Pyrimidinen in der LC/MS und da MM-Zellen auf eine hohe RNA- und DNA-Syntheserate für die Proteinbiosynthese und die Zellteilung angewiesen sind (Gandolfi et al. 2017), eignet sich die MetR eventuell als unterstützende Maßnahme für eine beim MM zur Anwendung

kommenden Chemotherapie mit Medikamenten wie Melphalan, das als Alkylans sowohl die DNA- als auch die RNA-Synthese beeinträchtigt und so zur Apoptose der Zelle führt (Maura et al. 2021). In der Tat hat sich die Kombination aus MetR und Chemotherapeutikum bereits mehrfach als sehr wirkungsvoll erwiesen, so etwa zusammen mit Doxorubicin, 5-Flourouracil, Methotrexat, Cisplatin und einigen mehr (Kubota et al. 2023). Es konnten jedoch keine Arbeiten gefunden werden, die diese Kombination auf das MM anwendeten, insofern bietet sich hier ein neues Feld für weiterführende Forschungen an.

5 Zusammenfassung

Trotz zahlreicher medizinischer Fortschritte sind Krebserkrankungen weiterhin eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Bhupender S. Chhikara und Keykavous Parang 2023). Dabei ist das Multiple Myelom (MM) die zweithäufigste Krebserkrankung des blutbildenden Systems und für ca. 20% aller Todesfälle durch hämatologische Erkrankungen verantwortlich (Derlin und Bannas 2014). Die Krankheit gilt als schwer heilbar, die Patienten leiden unter schwerwiegenden Symptomen und die aktuelle Standardtherapie mittels hochdosierter Chemotherapeutika geht mit starken Nebenwirkungen einher (Cowan et al. 2022). Insofern besteht ein großes Interesse daran, neue und ergänzende Behandlungsmethoden zu finden. In der Forschung etablierte und bereits mit vielversprechenden Ergebnissen an Menschen mit anderen Krebserkrankungen getestete Verfahren sind die Methionin- (MetR) (Kaiser 2020) bzw. Cysteinrestriktion (CysR) (Garcia-Bermudez et al. 2020). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit in vitro überprüft, ob diese Methoden grundsätzlich einen möglichen Ansatz für die Therapie des MM darstellen. Untersucht wurden die murine MPC11- sowie die humanen L363- und KMS12-BM-Zelllinien des MM. Dabei konnte die antiproliferative Wirkung der Restriktionen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass der Mangel der Aminosäuren nicht über endogene Stoffwechselwege kompensiert werden kann, die Zellen also von der exogenen Zufuhr abhängig sind. Des Weiteren wurde das Metabolom der MPC11-Zellen unter MetR massenspektrometrisch analysiert und ein charakteristischer „metaboler Fingerabdruck“ erstellt. Die Proliferationshemmung ohne Rückgang der Zellzahlen unter den Anfangswert zusammen mit den die gesunde Morphologie der Zellen dokumentierenden EVOS-Bildern belegt das Vorliegen eines Low-Energy-Metabolismus (LEM) ohne Absterben der Zellen (Schmitz et al. 2021a). Als geeignete Marker (charakteristischer „metabolen Fingerabdruck“) für einen MetR-induzierten LEM eignen sich das bereits in L929-Zellen herauskristallisierte Absinken des Kreatins, der Aminosäuren und Purine bzw. Pyrimidine sowie der Anstieg des Acetoacetats. In den MPC11-Zellen kommen zusätzlich eine Zunahme der Folsäure und eine Abnahme des SAM, SAH und MTA aus dem Methionin- bzw. MTA-Zyklus, des Pentose-5-Phosphats aus dem Pentose-Phosphat-Weg und des Hexose- und Glyceralphosphats sowie des Pyruvats und des Laktats aus der Glykolyse hinzu. Kein klassischer Marker für einen LEM, aber aufgrund des signifikanten Anstiegs dennoch als auffällige Abweichung unter MetR zusätzlich erwähnenswert, ist der deutliche Anstieg des Cystins.

6 Literaturverzeichnis

- AAT Bioquest (2021): Quest Graph IC50 Calculator. Online verfügbar unter <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>, zuletzt geprüft am 29.01.2023.
- Aggarwal, Vaishali; Tuli, Hardeep Singh; Varol, Ayşegül; Thakral, Falak; Yerer, Mukerrem Betul; Sak, Katrin et al. (2019): Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. In: *Biomolecules* 9 (11). DOI: 10.3390/biom9110735.
- Bárcena, Clea; López-Otín, Carlos; Kroemer, Guido (2019): Methionine restriction for improving progeria: another autophagy-inducing anti-aging strategy? In: *Autophagy* 15 (3), S. 558–559. DOI: 10.1080/15548627.2018.1533059.
- Barwick, Benjamin G.; Gupta, Vikas A.; Vertino, Paula M.; Boise, Lawrence H. (2019): Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1121. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01121.
- Baysal, Mehmet; Demirci, Ufuk; Umit, Elif; Kirkizlar, Hakki Onur; Atli, Emine Ikbal; Gurkan, Hakan et al. (2020): Concepts of Double Hit and Triple Hit Disease in Multiple Myeloma, Entity and Prognostic Significance. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 5991. DOI: 10.1038/s41598-020-62885-0.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018): Stryer Biochemie. 8. Auflage. Berlin: Springer Spektrum.
- Bhattacharyya, Souvik; Varshney, Umesh (2016): Evolution of initiator tRNAs and selection of methionine as the initiating amino acid. In: *RNA biology* 13 (9), S. 810–819. DOI: 10.1080/15476286.2016.1195943.
- Bhupender S. Chhikara; Keykavous Parang (2023): Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. In: *Chem Biol Lett* 10 (1), S. 451. Online verfügbar unter <https://www.pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>.
- Bouchnita, Anass; Eymard, Nathalie; Moyo, Tamara K.; Koury, Mark J.; Volpert, Vitaly (2016): Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis. In: *American journal of hematology* 91 (4), S. 371–378. DOI: 10.1002/ajh.24291.
- Combs, Joseph A.; DeNicola, Gina M. (2019): The Non-Essential Amino Acid Cysteine Becomes Essential for Tumor Proliferation and Survival. In: *Cancers* 11 (5). DOI: 10.3390/cancers11050678.
- Corre, Jill; Munshi, Nikhil C.; Avet-Loiseau, Hervé (2021): Risk factors in multiple myeloma: is it time for a revision? In: *Blood* 137 (1), S. 16–19. DOI: 10.1182/blood.2019004309.
- Cowan, Andrew J.; Green, Damian J.; Kwok, Mary; Lee, Sarah; Coffey, David G.; Holmberg, Leona A. et al. (2022): Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. In: *JAMA* 327 (5), S. 464–477. DOI: 10.1001/jama.2022.0003.
- Cramer, Shira L.; Saha, Achinto; Liu, Jinyun; Tadi, Surendar; Tiziani, Stefano; Yan, Wupeng et al. (2017): Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. In: *Nature medicine* 23 (1), S. 120–127. DOI: 10.1038/nm.4232.
- Crowley, Lisa C.; Marfell, Brooke J.; Waterhouse, Nigel J. (2016): Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2016 (9). DOI: 10.1101/pdb.prot087205.

- Derlin, Thorsten; Bannas, Peter (2014): Imaging of multiple myeloma: Current concepts. In: *World journal of orthopedics* 5 (3), S. 272–282. DOI: 10.5312/wjo.v5.i3.272.
- Endicott, Molly; Jones, Michael; Hull, Jonathon (2021): Amino acid metabolism as a therapeutic target in cancer: a review. In: *Amino acids* 53 (8), S. 1169–1179. DOI: 10.1007/s00726-021-03052-1.
- Erdmann, Friederike; Spix, Claudia; Katalinic, Alexander; Christ, Monika; Folkerts, Juliane; Hansmann, Jutta et al. (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.
- Eruslanov, Evgeniy; Kusmartsev, Sergei (2010): Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 594, S. 57–72. DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.
- Froese, D. Sean; Fowler, Brian; Baumgartner, Matthias R. (2019): Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. In: *Journal of inherited metabolic disease* 42 (4), S. 673–685. DOI: 10.1002/jimd.12009.
- Galluzzi, Lorenzo; Pietrocola, Federico; Bravo-San Pedro, José Manuel; Amaravadi, Ravi K.; Baehrecke, Eric H.; Cecconi, Francesco et al. (2015): Autophagy in malignant transformation and cancer progression. In: *The EMBO journal* 34 (7), S. 856–880. DOI: 10.15252/embj.201490784.
- Gandolfi, Sara; Laubach, Jacob P.; Hideshima, Teru; Chauhan, Dharminder; Anderson, Kenneth C.; Richardson, Paul G. (2017): The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. In: *Cancer metastasis reviews* 36 (4), S. 561–584. DOI: 10.1007/s10555-017-9707-8.
- Gao, Xia; Sanderson, Sydney M.; Dai, Ziwei; Reid, Michael A.; Cooper, Daniel E.; Lu, Min et al. (2019): Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism. In: *Nature* 572 (7769), S. 397–401. DOI: 10.1038/s41586-019-1437-3.
- Garcia-Bermudez, Javier; Williams, Robert T.; Guarecuco, Rohiverth; Birsoy, Kivanç (2020): Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. In: *Molecular metabolism* 33, S. 67–82. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.11.011.
- Garg, Sarita; Morehead, Lauren C.; Bird, Jordan T.; Graw, Stefan; Gies, Allen; Storey, Aaron J. et al. (2023): Characterization of methionine dependence in melanoma cells. In: *Molecular omics*. DOI: 10.1039/d3mo00087g.
- Gavriatopoulou, Maria; Paschou, Stavroula A.; Ntanasis-Stathopoulos, Ioannis; Dimopoulos, Meletios A. (2021): Metabolic Disorders in Multiple Myeloma. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111430.
- Grankvist, Nina; Watrous, Jeramie D.; Lagerborg, Kim A.; Lyutvinskiy, Yaroslav; Jain, Mohit; Nilsson, Roland (2018): Profiling the Metabolism of Human Cells by Deep ¹³C Labeling. In: *Cell chemical biology* 25 (11), 1419-1427.e4. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.09.004.
- Green, Cara L.; Lamming, Dudley W.; Fontana, Luigi (2022): Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 23 (1), S. 56–73. DOI: 10.1038/s41580-021-00411-4.
- Gu, Xin; Orozco, Jose M.; Saxton, Robert A.; Condon, Kendall J.; Liu, Grace Y.; Krawczyk, Patrycja A. et al. (2017): SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor

- for the mTORC1 pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 358 (6364), S. 813–818. DOI: 10.1126/science.aao3265.
- Han, Qinghong; Tan, Yuying; Hoffman, Robert M. (2020): Oral dosing of Recombinant Methioninase Is Associated With a 70% Drop in PSA in a Patient With Bone-metastatic Prostate Cancer and 50% Reduction in Circulating Methionine in a High-stage Ovarian Cancer Patient. In: *Anticancer research* 40 (5), S. 2813–2819. DOI: 10.21873/anticancer.14254.
- Hanbali, Amr; Hassanein, Mona; Rasheed, Walid; Aljurf, Mahmoud; Alsharif, Fahad (2017): The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. In: *Advances in hematology* 2017, S. 4812637. DOI: 10.1155/2017/4812637.
- Heher, Eliot C.; Rennke, Helmut G.; Laubach, Jacob P.; Richardson, Paul G. (2013): Kidney disease and multiple myeloma. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 8 (11), S. 2007–2017. DOI: 10.2215/CJN.12231212.
- Ho, Matthew; Patel, Ashish; Goh, Chia Yin; Moscovin, Maria; Zhang, Li; Bianchi, Giada (2020): Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). In: *Leukemia* 34 (12), S. 3111–3125. DOI: 10.1038/s41375-020-01051-x.
- Hoffman, Robert M.; Stern, Peter H.; Coalson, Dennis W.; Douglas Wallace, C.; Erbe, Richard W. (2019): Altered Methionine Metabolism in Cancer Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1866, S. 13–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-8796-2_2.
- Hoffman, Robert M.; Yano, Shuya (2019): Tumor-Specific S/G2-Phase Cell Cycle Arrest of Cancer Cells by Methionine Restriction. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1866, S. 49–60. DOI: 10.1007/978-1-4939-8796-2_5.
- Holbert, Cassandra E.; Cullen, Michael T.; Casero, Robert A.; Stewart, Tracy Murray (2022): Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. In: *Nature reviews. Cancer* 22 (8), S. 467–480. DOI: 10.1038/s41568-022-00473-2.
- Hondorp, Elise R.; Matthews, Rowena G. (2006): Methionine. In: *EcoSal Plus* 2 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.7.
- Hong, S.; Inoki, K. (2017): Evaluating the mTOR Pathway in Physiological and Pharmacological Settings. In: *Methods in enzymology* 587, S. 405–428. DOI: 10.1016/bs.mie.2016.09.068.
- Hosios, Aaron M.; Hecht, Vivian C.; Danai, Laura V.; Johnson, Marc O.; Rathmell, Jeffrey C.; Steinhauser, Matthew L. et al. (2016): Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. In: *Developmental cell* 36 (5), S. 540–549. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.02.012.
- Inoki, Ken; Kim, Joungmok; Guan, Kun-Liang (2012): AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, S. 381–400. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537.
- Jelleschitz, Julia; Zhang, Yuyu; Grune, Tilman; Chen, Weixuan; Zhao, Yihang; Jia, Mengzhen et al. (2022): Methionine restriction - Association with redox homeostasis and implications on aging and diseases. In: *Redox biology* 57. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102464.

- Jensen-Pergakes, Kristen; Tatlock, John; Maegley, Karen A.; McAlpine, Indrawan J.; McTigue, Michele; Xie, Tao et al. (2022): SAM-Competitive PRMT5 Inhibitor PF-06939999 Demonstrates Antitumor Activity in Splicing Dysregulated NSCLC with Decreased Liability of Drug Resistance. In: *Molecular cancer therapeutics* 21 (1), S. 3–15. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0620.
- Jewell, Jenna L.; Guan, Kun-Liang (2013): Nutrient signaling to mTOR and cell growth. In: *Trends in biochemical sciences* 38 (5), S. 233–242. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.01.004.
- Jones, Courtney L.; Stevens, Brett M.; D'Alessandro, Angelo; Culp-Hill, Rachel; Reisz, Julie A.; Pei, Shanshan et al. (2019): Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. In: *Blood* 134 (4), S. 389–394. DOI: 10.1182/blood.2019898114.
- Jung, Hwa Jin; Suh, Yousin (2014): Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. In: *Frontiers in genetics* 5, S. 472. DOI: 10.3389/fgene.2014.00472.
- Kaiser, Peter (2020): Methionine Dependence of Cancer. In: *Biomolecules* 10 (4). DOI: 10.3390/biom10040568.
- Kanai, Yoshikatsu (2022): Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics. In: *Pharmacology & therapeutics* 230, S. 107964. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107964.
- Kashyap, Dharambir; Garg, Vivek Kumar; Goel, Neelam (2021): Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* 125, S. 73–120. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.
- Khan, Aaminah; Gamble, Laura D.; Upton, Dannielle H.; Ung, Caitlin; Yu, Denise M. T.; Ehteda, Anahid et al. (2021): Dual targeting of polyamine synthesis and uptake in diffuse intrinsic pontine gliomas. In: *Nature communications* 12 (1), S. 971. DOI: 10.1038/s41467-021-20896-z.
- Koury, Mark J. (2014): Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. In: *Blood reviews* 28 (2), S. 49–66. DOI: 10.1016/j.blre.2014.01.002.
- Kubota, Yutaro; Han, Qinghong; Aoki, Yusuke; Masaki, Noriyuki; Obara, Koya; Hamada, Kazuyuki et al. (2023): Synergy of Combining Methionine Restriction and Chemotherapy: The Disruptive Next Generation of Cancer Treatment. In: *Cancer diagnosis & prognosis* 3 (3), S. 272–281. DOI: 10.21873/cdp.10212.
- Kumar, Shaji K.; Callander, Natalie S.; Alsina, Melissa; Atanackovic, Djordje; Biermann, J. Sybil; Chandler, Jason C. et al. (2017): Multiple Myeloma, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 15 (2), S. 230–269. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0023.
- Kyle, Robert A.; Gertz, Morie A.; Witzig, Thomas E.; Lust, John A.; Lacy, Martha Q.; Dispenzieri, Angela et al. (2003): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. In: *Mayo Clinic proceedings* 78 (1), S. 21–33. DOI: 10.4065/78.1.21.
- Landgren, O.; Iskander, K. (2017): Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes. In: *Journal of internal medicine* 281 (4), S. 365–382. DOI: 10.1111/joim.12590.

- Lee, Byung Cheon; Kaya, Alaattin; Gladyshev, Vadim N. (2015): Methionine restriction and lifespan control. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1363, S. 116–124. DOI: 10.1111/nyas.12973.
- Lees, Emma K.; Król, Elżbieta; Grant, Louise; Shearer, Kirsty; Wyse, Cathy; Moncur, Eleanor et al. (2014): Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. In: *Aging cell* 13 (5), S. 817–827. DOI: 10.1111/accel.12238.
- Liberti, Maria V.; Locasale, Jason W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? In: *Trends in biochemical sciences* 41 (3), S. 211–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- Liou, Geou-Yarh; Storz, Peter (2010): Reactive oxygen species in cancer. In: *Free radical research* 44 (5), S. 479–496. DOI: 10.3109/10715761003667554.
- Madeo, Frank; Carmona-Gutierrez, Didac; Hofer, Sebastian J.; Kroemer, Guido (2019): Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. In: *Cell metabolism* 29 (3), S. 592–610. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.01.018.
- Maniatis, A. (1998): Pathophysiology of paraprotein production. In: *Renal failure* 20 (6), S. 821–828. DOI: 10.3109/08860229809045179.
- Manier, Salomon; Salem, Karma Z.; Park, Jihye; Landau, Dan A.; Getz, Gad; Ghobrial, Irene M. (2017): Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 14 (2), S. 100–113. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.122.
- Mao, Beibei; Zhang, Qi; Ma, Li; Zhao, Dong-Sheng; Zhao, Pan; Yan, Peizheng (2022): Overview of Research into mTOR Inhibitors. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (16). DOI: 10.3390/molecules27165295.
- Massaro, Chelsea; Thomas, Jenna; Ikhlef, Houssine; Dinara, Sharifa; Cronk, Sara; Moots, Holly; Phanstiel, Otto (2020): Serendipitous Discovery of Leucine and Methionine Depletion Agents during the Search for Polyamine Transport Inhibitors. In: *Journal of medicinal chemistry* 63 (6), S. 2814–2832. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00568.
- Maura, Francesco; Weinhold, Niels; Diamond, Benjamin; Kazandjian, Dickran; Rasche, Leo; Morgan, Gareth; Landgren, Ola (2021): The mutagenic impact of melphalan in multiple myeloma. In: *Leukemia* 35 (8), S. 2145–2150. DOI: 10.1038/s41375-021-01293-3.
- McCarty, Mark F.; Barroso-Aranda, Jorge; Contreras, Francisco (2009): The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy. In: *Medical hypotheses* 72 (2), S. 125–128. DOI: 10.1016/j.mehy.2008.07.044.
- Mhaskar, Rahul; Kumar, Ambuj; Miladinovic, Branko; Djulbegovic, Benjamin (2017): Bisphosphonates in multiple myeloma: an updated network meta-analysis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 12 (12), CD003188. DOI: 10.1002/14651858.CD003188.pub4.
- Moloney, Jennifer N.; Cotter, Thomas G. (2018): ROS signalling in the biology of cancer. In: *Seminars in cell & developmental biology* 80, S. 50–64. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.

- Mukkamalla, Shiva Kumar Reddy; Malipeddi, Dhatri (2021): Myeloma Bone Disease: A Comprehensive Review. In: *International journal of molecular sciences* 22 (12). DOI: 10.3390/ijms22126208.
- Muylaert, Catharina; van Hemelrijck, Lien Ann; Maes, Anke; Veirman, Kim de; Menu, Eline; Vanderkerken, Karin; Bruyne, Elke de (2022): Aberrant DNA methylation in multiple myeloma: A major obstacle or an opportunity? In: *Frontiers in oncology* 12, S. 979569. DOI: 10.3389/fonc.2022.979569.
- NanoEntek (2013): EVE(tm) User Manual V.1.6. Online verfügbar unter https://nanoentek.com/bbs/file_download.php?it_id=1547538993&wr_id=75&bf_no=1, zuletzt geprüft am 29.01.2023.
- Nishimura, Katherine K.; Barlogie, Bart; van Rhee, Frits; Zangari, Maurizio; Walker, Brian A.; Rosenthal, Adam et al. (2020): Long-term outcomes after autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. In: *Blood advances* 4 (2), S. 422–431. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000524.
- Ogawa, Takafumi; Masumura, Koji; Kohara, Yuki; Kanai, Muneyoshi; Soga, Tomoyoshi; Ohya, Yoshikazu et al. (2022): S-adenosyl-L-homocysteine extends lifespan through methionine restriction effects. In: *Aging cell* 21 (5), e13604. DOI: 10.1111/accel.13604.
- Oshima, K.; Kanda, Y.; Nannya, Y.; Kaneko, M.; Hamaki, T.; Suguro, M. et al. (2001): Clinical and pathologic findings in 52 consecutively autopsied cases with multiple myeloma. In: *American journal of hematology* 67 (1), S. 1–5. DOI: 10.1002/ajh.1067.
- Panaroni, Cristina; Yee, Andrew J.; Raje, Noopur S. (2017): Myeloma and Bone Disease. In: *Current osteoporosis reports* 15 (5), S. 483–498. DOI: 10.1007/s11914-017-0397-5.
- Pardieu, Bryann; Pasanisi, Justine; Ling, Frank; Dal Bello, Reinaldo; Penneroux, Justine; Su, Angela et al. (2022): Cystine uptake inhibition potentiates front-line therapies in acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 36 (6), S. 1585–1595. DOI: 10.1038/s41375-022-01573-6.
- Parkhitko, Andrey A.; Jouandin, Patrick; Mohr, Stephanie E.; Perrimon, Norbert (2019): Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. In: *Aging cell* 18 (6), e13034. DOI: 10.1111/accel.13034.
- Pavlova, Natalya N.; Zhu, Jiajun; Thompson, Craig B. (2022): The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. In: *Cell metabolism* 34 (3), S. 355–377. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.01.007.
- Prideaux, Steven M.; Conway O'Brien, Emma; Chevassut, Timothy J. (2014): The genetic architecture of multiple myeloma. In: *Advances in hematology* 2014, S. 864058. DOI: 10.1155/2014/864058.
- Rajkumar, S. Vincent (2016): Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. In: *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* 35, e418-23. DOI: 10.1200/EDBK_159009.
- Rajkumar, S. Vincent (2020): Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. In: *American journal of hematology* 95 (5), S. 548–567. DOI: 10.1002/ajh.25791.

- Ruggiero, Salvatore L.; Dodson, Thomas B.; Aghaloo, Tara; Carlson, Eric R.; Ward, Brent B.; Kademani, Deepak (2022): American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. In: *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 80 (5), S. 920–943. DOI: 10.1016/j.joms.2022.02.008.
- Sancak, Yasemin; Peterson, Timothy R.; Shaul, Yoav D.; Lindquist, Robert A.; Thoreen, Carson C.; Bar-Peled, Liron; Sabatini, David M. (2008): The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. In: *Science (New York, N.Y.)* 320 (5882), S. 1496–1501. DOI: 10.1126/science.1157535.
- Sanderson, Sydney M.; Gao, Xia; Dai, Ziwei; Locasale, Jason W. (2019): Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. In: *Nature reviews. Cancer* 19 (11), S. 625–637. DOI: 10.1038/s41568-019-0187-8.
- Schmitz, Werner; Koderer, Corinna; El-Mesery, Mohamed; Gubik, Sebastian; Sampers, Rene; Straub, Anton et al. (2021a): Metabolic Fingerprinting of Murine L929 Fibroblasts as a Cell-Based Tumour Suppressor Model System for Methionine Restriction. In: *International journal of molecular sciences* 22 (6). DOI: 10.3390/ijms22063039.
- Schmitz, Werner; Ries, Elena; Koderer, Corinna; Völter, Maximilian Friedrich; Wunsch, Anna Chiara; El-Mesery, Mohamed et al. (2021b): Cysteine Restriction in Murine L929 Fibroblasts as an Alternative Strategy to Methionine Restriction in Cancer Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111630.
- Sedlacek, H. H. (2013): *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen. Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten*. Berlin: De Gruyter.
- Singh, Bindu; Bhaskar, Sangeeta (2019): Methods for Detection of Autophagy in Mammalian Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2045, S. 245–258. DOI: 10.1007/7651_2018_190.
- Starheim, K. K.; Holien, T.; Misund, K.; Johansson, I.; Baranowska, K. A.; Sponaas, A-M et al. (2016): Intracellular glutathione determines bortezomib cytotoxicity in multiple myeloma cells. In: *Blood cancer journal* 6 (7), e446. DOI: 10.1038/bcj.2016.56.
- Sugimura, T.; Birnbaum, S. M.; Winitz, M.; Greenstein, J. P. (1959): Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 81 (2), S. 448–455. DOI: 10.1016/0003-9861(59)90225-5.
- Terpstra, A. H. (2001): Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. In: *The Journal of nutrition* 131 (7), S. 2067–2068. DOI: 10.1093/jn/131.7.2067.
- Vidoni, Chiara; Ferraresi, Alessandra; Esposito, Andrea; Maheshwari, Chinmay; Dhanasekaran, Danny N.; Mollace, Vincenzo; Isidoro, Ciro (2021): Calorie Restriction for Cancer Prevention and Therapy: Mechanisms, Expectations, and Efficacy. In: *Journal of cancer prevention* 26 (4), S. 224–236. DOI: 10.15430/JCP.2021.26.4.224.

- Vizán, Pedro; Di Croce, Luciano; Aranda, Sergi (2021): Functional and Pathological Roles of AHCY. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 654344. DOI: 10.3389/fcell.2021.654344.
- Walker, Rebecca E.; Lawson, Michelle A.; Buckle, Clive H.; Snowden, John A.; Chantry, Andrew D. (2014): Myeloma bone disease: pathogenesis, current treatments and future targets. In: *British medical bulletin* 111 (1), S. 117–138. DOI: 10.1093/bmb/ldu016.
- Walker, Zachary J.; Idler, Beau M.; Davis, Lorraine N.; Stevens, Brett M.; VanWyngarden, Michael J.; Ohlstrom, Denis et al. (2021): Exploiting Protein Translation Dependence in Multiple Myeloma with Omacetaxine-Based Therapy. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 27 (3), S. 819–830. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2246.
- Wanders, Desiree; Hobson, Katherine; Ji, Xiangming (2020): Methionine Restriction and Cancer Biology. In: *Nutrients* 12 (3). DOI: 10.3390/nu12030684.
- Wang, Si-Yang; Wang, Wen-Juan; Liu, Jie-Qiong; Song, Yu-Huan; Li, Ping; Sun, Xue-Feng et al. (2019a): Methionine restriction delays senescence and suppresses the senescence-associated secretory phenotype in the kidney through endogenous hydrogen sulfide. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 18 (14), S. 1573–1587. DOI: 10.1080/15384101.2019.1618124.
- Wang, Yan; Xu, Wenbin; Yan, Zixun; Zhao, Weili; Mi, Jianqing; Li, Junmin; Yan, Hua (2018): Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 37 (1), S. 63. DOI: 10.1186/s13046-018-0731-5.
- Wang, Yanmeng; Muylaert, Catharina; Wyns, Arne; Vlummens, Philip; Veirman, Kim de; Vanderkerken, Karin et al. (2023): S-adenosylmethionine biosynthesis is a targetable metabolic vulnerability in multiple myeloma. In: *Haematologica*. DOI: 10.3324/haematol.2023.282866.
- Wang, Zhenxun; Yip, Lian Yee; Lee, Jia Hui Jane; Wu, Zhengwei; Chew, Hui Yi; Chong, Pooi Kiat William et al. (2019b): Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. In: *Nature medicine* 25 (5), S. 825–837. DOI: 10.1038/s41591-019-0423-5.
- Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. (2000): Creatine and creatinine metabolism. In: *Physiological reviews* 80 (3), S. 1107–1213. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.3.1107.

7 Appendix

7.1 Metabolomanalyse

Tab. 12: *Material und Methoden der LC/MS*

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Werner Schmitz, Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg

<p><u>Material und Methoden der LC/MS</u></p> <p><u>Analysis of Water-soluble Metabolites in Cell Extracts</u> Based on MeOH/H₂O Extraction and SPE Purification Sample: 10 µl 10 µM Inhibitor or Cell Pellet. Add 590 µl 0.01 µM Lamivudine in MeOH/H₂O (80/20, v/v) Continue with "General further procedure"</p> <p><u>SPE-Columns:</u> Activate RP18 SPE-column by elution of 0.5 ml CH₃CN. Equilibrate RP18 SPE-column by elution of 0.5 ml MeOH/H₂O (80/20, v/v). <u>General further procedure:</u> - mix, ultrasound, mix - Centrifuge (2 min. max rpm) - Transfer supernatant to equilibrated RP18 SPE-column (Collect eluate in Eppendorf) - add another 150 µl MeOH/H₂O (80/20, v/v) to the column - Evaporate eluate of RP18 SPE-column in SpeedVac.</p> <p><u>LC/MS-Analysis of Water Soluble Metabolites</u> Tune-File: 210521_HILIC Instrument Method: 211004_HILIC_Pos</p> <p><u>Sample preparation for LC/MS-Analysis:</u> The dry sample extracts were redissolved in: 75 µl 5 mM NH₄OAc in acetonitrile/water (50/50, v/v) For LC/MS analysis, 15 µl supernatant was transferred to LC-vials.</p> <p><u>LC parameters:</u> Mobile phase A consisted of 5 mM NH₄OAc in acetonitrile/water (40/60, v/v), and mobile phase B consisted of 5 mM NH₄OAc in acetonitrile/water (95/5, v/v). After application of 3 µl sample to the BEH Amide column (at 30 °C), the LC gradient program was: 100% solvent B for 2 min, followed by a linear decrease to 10% solvent B within 23 min, then maintaining 10% B for 16 min, then returning to 100% B in 2 min and 7 min 100% solvent B for column equilibration before each injection. The flow rate was maintained at 200 µL/min. The eluent was directed to the ESI source of the QE-MS from 2.5 min to 38.0 min after sample injection.</p> <p><u>MS Scan Parameters:</u> Scan Type: Full MS in Pos./Neg. Mode Scan Range: 69.0 - 1000 m/z Resolution: 70,000 AGC-Target: 3E6 Maximum Injection Time: 200 ms</p> <p><u>HESI Source Parameters:</u> Sheath gas flow rate: 20 Auxiliary gas flow rate: 1 Sweep gas flow rate: 0 Spray voltage: 3.0 kV Capillary temperature: 320 °C S-lens RF level: 50.0 Aux Gas Heater temperature: 120 °C</p> <p><u>Data Evaluation:</u> Peaks corresponding to the calculated monoisotopic metabolite masses (MIM +/- H+ ± 3 mMU) were integrated using TraceFinder V3.3 software (Thermo Scientific, Bremen, Germany).</p> <p><u>Materials:</u> Ultrapure water was obtained from a Millipore water purification system (Milli-Q Merck Millipore, Darmstadt, Germany). HPLC-MS Solvents, LC-MS NH₄OAc, standards and reference compounds were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The equipment used for LC/MS analysis was a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC system hyphenated with a Q Exactive mass spectrometer (QE-MS) equipped with a HESI probe (Thermo Scientific, Bremen, Germany). UPLC-Column: XBridge Premier BEH Amide (2.5 µm particles, 100 x 2.1 mm) (Waters, Ireland)</p>

Tab. 13: Alle Messwerte der Metabolomanalyse

Alle Messwerte der massenspektrometrischen Analyse der MPC11-Zellen unter MetR, relativ zum Wert der Kontrolle nach 24 h (entspricht 100%).

Verbindung		Kontrolle					MetR				
Klasse	Name	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
non-ess. AA	Ala	100	107	131	127	87	84	83	77	33	21
non-ess. AA	Arg	100	89	98	87	82	108	89	85	64	70
non-ess. AA	Asn	100	124	140	121	97	90	87	66	18	24
non-ess. AA	Asp	100	86	44	22	15	98	110	99	45	20
non-ess. AA	Glu	100	97	63	25	9	95	82	72	42	20
non-ess. AA	Gln	100	137	208	40	13	250	248	223	104	98
non-ess. AA	Gly	100	127	167	151	100	127	147	160	81	55
non-ess. AA	Pro	100	97	176	216	188	88	92	112	83	62
non-ess. AA	Ser	100	122	100	60	44	107	103	94	50	39
non-ess. AA	Tyr	100	112	132	93	74	110	135	218	317	383
ess. AA	His	100	109	91	54	28	115	43	54	21	8
ess. AA	Ile	100	122	147	104	86	117	125	150	122	105
ess. AA	Leu	100	117	134	85	69	115	110	120	93	79
ess. AA	Lys	100	99	117	97	97	126	78	86	70	58
ess. AA	Met	100	124	119	91	74	42	29	22	6	3
ess. AA	Phe	100	121	151	113	93	117	117	139	113	100
ess. AA	Thr	100	133	150	108	71	114	119	122	72	56
ess. AA	Trp	100	125	148	95	63	126	129	153	116	97
ess. AA	Val	100	115	135	102	84	114	125	162	148	150
Ac-AA	Ac-Asn	100	72	80	94	107	95	132	248	265	311
Ac-AA	Ac-Asp	100	64	94	140	225	115	480	329	283	131
Ac-AA	Ac-Glu	100	74	47	29	12	83	77	69	20	6
Ac-AA	Ac-Gly	100	97	109	117	109	105	123	164	119	118
Ac-AA	Ac-Lys	100	100	58	136	232	87	59	83	79	64
Ac-AA	Ac-Met	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Ac-AA	Ac-Orn	100	113	145	115	96	104	112	133	99	84
Ac-AA	Ac-Phe	100	77	89	88	62	100	155	283	138	96
Ac-AA	Ac-Ser	100	95	63	26	9	91	80	70	35	15
Glu-AA	GluAla	100	112	75	114	160	83	63	85	22	6
Glu-AA	GluArg	100	87	52	69	93	109	54	65	17	4
Glu-AA	GluAsn	100	103	91	107	150	116	136	155	56	25
Glu-AA	GluAsp	100	75	69	64	51	106	121	154	67	24
Glu-AA	GluGln	100	136	117	67	82	154	152	201	80	57
Glu-AA	GluGlu	100	98	51	37	33	104	87	89	23	22
Glu-AA	GluGly	100	91	68	56	46	99	78	74	25	11
Glu-AA	GluLys	100	98	75	95	119	111	66	71	31	12
Glu-AA	GluMet	100	193	104	22	383	82	9	3	2	4
Glu-AA	GluPro	100	97	69	52	29	71	69	53	10	3
Glu-AA	GluSer	100	111	88	89	101	88	83	89	33	14
Glu-AA	GluThr	100	115	73	64	80	88	82	95	30	11
Glu-AA	GluTyr	100	96	104	157	203	70	47	40	13	5
Glu-AA	GluVal	100	110	71	108	193	85	81	115	64	29
Glu-Metab.	5-Oxoproline	100	136	218	223	218	99	149	278	332	384
Pro-Metab.	4-Hydroxyproline	100	137	166	123	78	103	119	118	68	74
Pro-Metab.	GlyPro	100	133	116	121	102	74	71	54	23	11
Arg-Metab.	Dimethylarginine	100	77	75	83	78	67	20	15	9	7
Arg-Metab.	Guanidinoacetate	100	294	351	289	208	176	213	157	103	68
Arg-Metab.	Guanidinosuccinate	100	124	161	118	98	125	134	178	150	136
Arg-Metab.	Creatine	100	153	150	115	90	116	149	110	26	10
Arg-Metab.	Creatinine	100	101	140	123	88	100	90	127	96	89
His-Metab.	Methylhistidine	100	120	107	72	46	94	38	52	42	23
His-Metab.	Carnosine	100	89	137	124	112	96	94	143	132	110
His-Metab.	Urocanic acid	100	106	80	72	78	95	79	80	66	86
Ser Metab.	Choline	100	80	75	49	30	88	59	52	13	5
Ser Metab.	Acetylcholine	100	132	152	114	69	134	106	84	28	16
Lys-Metab.	5-Hydroxylysine	100	133	224	191	130	124	99	101	35	14
Lys Metab.	Pipecolic Acid	100	137	214	227	222	99	148	278	346	378
Lys-Metab.	Amino adipic Acid	100	86	80	48	27	98	98	96	45	36
Phe Metab.	Phenyllactate	100	89	249	677	1.041	55	50	114	65	52
Phe Metab.	Hydroxyphenylpyruvate	100	59	49	49	46	72	65	69	43	40
Phe Metab.	Vanillylmandelate	100	48	31	24	23	63	52	45	24	21
Phe Metab.	Homovanillate	100	109	225	482	443	72	78	130	67	49
Trp Metab.	N-Formylkynurenine	100	241	255	32	41	254	273	120	178	131
Trp Metab.	Kynurenine	100	144	217	95	120	142	120	28	105	96
Trp Metab.	Kynurenate	100	90	102	137	121	108	82	167	106	107
Trp-Metab.	3-Hydroxykynurenine	100	182	294	126	104	217	140	112	170	166
Trp-Metab.	5-Hydroxytryptophane	100	189	241	149	145	196	309	345	597	758
Trp-Metab.	5-Hydroxyindoleacetate	100	93	111	140	129	78	35	40	9	3
Trp Metab.	Quinolinic Acid	100	90	149	173	147	83	59	114	129	142
"S"-Metabs	CysGly	100	163	126	42	4	101	110	66	0	0
"S"-Metabs	Cystine	100	140	85	99	208	186	270	211	508	893
"S"-Metabs	Homocystine	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
"S"-Metabs	Cysteine-S-sulfate	100	82	115	115	108	89	89	121	124	140
"S"-Metabs	Methionine sulfoxide	100	109	88	73	74	52	48	37	14	12

Appendix

"S"-Metabs	Cystathionine	100	111	71	17	4	28	33	40	12	8
"S"-Metabs	GSH	100	115	98	50	10	87	87	73	3	0
"S"-Metabs	GSSG	100	83	85	47	18	149	184	271	64	16
"S"-Metabs	Hypotaurine	100	178	208	137	73	82	48	20	3	4
"S"-Metabs	Taurine	100	180	244	120	76	101	93	76	52	94
"S"-Metabs	SAH	100	94	71	49	26	28	27	22	9	1
"S"-Metabs	SAM	100	133	104	8	11	20	10	1	12	3
Yang Cycle	Methylthioadenosine	100	46	40	42	25	7	2	3	2	2
Yang Cycle	a-Keto-glutaramate	100	97	157	175	175	100	101	154	183	187
Polyamines	Spermidine	100	41	21	83	45	68	50	179	81	46
Polyamines	N-Acetylspermidine	100	452	1,590	21	281	177	547	2,031	1,492	1,321
Polyamines	Spermine	100	86	66	80	80	91	104	111	94	93
Carbohydrates	Erythritol	100	36	36	44	30	56	53	79	22	20
Carbohydrates	Erythronic acid	100	83	94	90	68	91	97	85	31	16
Carbohydrates	dRibose-P	100	96	121	78	54	114	106	203	192	224
Carbohydrates	Ribitol	100	80	67	42	53	86	62	67	43	35
Carbohydrates	Aldohexose	100	103	130	57	34	130	120	191	205	204
Carbohydrates	Fructose	100	88	161	168	169	75	64	78	84	89
Carbohydrates	Fucose	100	116	158	98	123	106	73	72	83	59
Carbohydrates	Gluconolactone	100	87	87	69	46	106	97	195	172	182
Carbohydrates	Gluconate	100	136	112	70	77	133	81	76	49	31
Carbohydrates	Glucosamine	100	99	125	76	66	121	123	184	208	244
Carbohydrates	GlcNAc	100	82	81	70	51	118	147	301	133	63
Carbohydrates	GlcNAc-sulfate	100	69	106	156	147	90	85	153	151	156
Carbohydrates	Neuraminic acid	100	133	93	65	42	98	71	54	44	73
Carbohydrates	NANA	100	125	156	111	98	121	171	338	509	534
Carbohydrates	UDP-GlcNAc	100	258	147	165	118	738	142	591	83	47
Glycolysis	Hexose-P	100	124	217	654	713	192	122	200	24	48
Glycolysis	Glycerol/-on-P	100	171	200	385	385	176	123	83	0	4
Glycolysis	Pyruvate	100	155	318	169	99	70	67	48	65	69
Glycolysis	Lactate	100	114	272	349	135	72	58	57	51	49
Glycerol Metabs	Glycerate	100	48	34	22	21	59	46	34	22	18
Glycerol Metabs	Glycerol-3-P	100	140	167	287	123	120	93	133	9	17
Glycerol Metabs	GPC	100	143	113	89	258	140	150	154	80	60
Glycerol Metabs	GPEA	100	138	110	88	93	113	92	77	33	39
Glycerol Metabs	GPI	100	209	311	282	149	103	159	211	81	43
Glycerol Metabs	GPS	100	228	207	94	101	192	280	221	91	36
Phospholipid Prec.	Phosphocholine	100	122	95	53	99	298	104	61	85	81
Acylcarnitines	Carnitine	100	145	138	97	47	140	67	39	3	1
Acylcarnitines	AC-(02:0)	100	99	345	671	881	338	80	290	528	719
Acylcarnitines	AC-(03:0)	100	86	239	435	723	112	104	196	521	448
Acylcarnitines	AC-(04:0)	100	162	396	312	222	155	382	352	280	273
Acylcarnitines	AC-(05:0)	100	320	769	675	372	142	873	808	377	299
Acylcarnitines	AC-(05:1)	100	254	471	500	413	135	420	381	212	146
Carboxylic Acids	Acetoacetate	100	117	156	89	55	137	134	229	244	252
Carboxylic Acids	Glutaric acid	100	84	97	88	64	100	99	98	47	30
Carboxylic Acids	Hydroxymethylglutarate	100	107	135	68	44	130	124	201	212	214
PPP	Pentose-5-P	100	132	138	148	175	103	100	73	5	15
PPP	Sedoheptulose-7-P	100	408	1,092	1,281	4,691	689	348	878	4	87
TCA Cycle	Citrate/Isocitr.	100	51	31	27	19	76	50	45	10	6
TCA Cycle	Aconitate	100	52	44	38	44	61	98	74	52	19
TCA Cycle	a-Ketoglutarate	100	118	88	26	5	81	51	35	17	17
TCA Cycle	Succinate	100	85	63	36	17	110	109	89	27	19
TCA Cycle	Fumarate	100	106	88	54	22	83	67	44	6	2
TCA Cycle	Malate	100	100	83	56	23	91	65	47	4	1
Urea Cycle	Citrulline	100	120	150	105	90	107	125	143	122	106
Urea Cycle	ArgSucc	100	127	103	84	37	89	78	38	7	3
Urea Cycle	Ornithine	100	79	119	125	92	94	127	127	98	113
Urea Cycle	Homo-arginine	100	81	91	86	77	104	54	49	38	29
Pyrimidines	Carbamoylaspartate	100	34,833	33,188	1,283	618	59	56	35	8	10
Pyrimidines	Orotate	100	1,542	1,459	272	159	80	42	14	5	2
Pyrimidines	Dihydroorotate	#DIV/0!									
Pyrimidines	UMP	100	79	80	104	87	84	66	81	16	16
Pyrimidines	CMP	100	99	107	110	90	93	74	76	21	20
Pyrimidines	dUMP	100	74	101	203	215	63	72	81	61	60
Pyrimidines	Cytidine	100	87	83	57	50	102	87	96	54	31
Pyrimidines	5-Methylcytidine	100	143	113	89	258	140	150	154	80	60
Pyrimidines	Cytosine	100	119	153	144	129	66	54	63	30	22
Pyrimidines	dCytidine	100	126	145	107	98	67	53	50	21	14
Pyrimidines	dThymidine	100	81	69	43	21	114	84	69	26	14
Pyrimidines	Thymine	100	79	75	58	40	123	96	75	33	25
Pyrimidines	Uridine	100	59	53	49	27	76	69	87	27	13
Pyrimidines	dUridine	100	100	144	154	231	102	65	138	159	164
Pyrimidines	Uracil	100	80	138	146	115	159	153	156	34	11
Purines	AICAR	100	92	109	59	37	110	85	99	56	48
Purines	FAICAR	100	290	192	181	227	351	62	98	7	17
Purines	IMP	100	679	270	1,742	1,703	6,190	1,255	1,488	228	703
Purines	AMP	100	98	90	173	144	105	58	58	23	52
Purines	GMP	100	99	92	157	169	171	75	71	17	18
Purines	Adenine	100	100	64	29	9	15	8	12	5	8
Purines	Adenosine	100	132	92	64	41	98	70	54	44	72

Purines	Methyladenosine	100	127	79	33	68	125	80	46	91	49
Purines	dAdenosine	100	1,628	3,773	1,614	6,185	317	3,205	614	1,747	908
Purines	Guanine	100	104	134	137	138	106	114	105	45	21
Purines	Guanosine	100	100	102	95	71	89	87	94	50	28
Purines	dGuanosine	100	123	104	67	58	147	99	105	71	25
Purines	Inosine	100	101	98	101	68	86	85	101	60	35
Purines	Methylinosine	100	85	130	109	122	92	54	50	33	25
Purines	dInosine	100	130	103	80	59	111	91	39	15	6
Purines	Hypoxanthine	100	83	94	90	68	91	97	85	31	16
Purines	Xanthine	100	110	209	313	217	137	55	53	47	58
Purines	Xanthosine	100	107	227	337	327	97	71	109	133	172
Purines	Xanthurenic Acid	100	76	60	82	51	100	75	48	6	1
Purines	Uric Acid	100	98	180	215	180	76	75	92	80	89
FH-Metabs	Folate	100	69	116	121	109	104	96	165	158	154
Nicotinamides	Nicotinate	100	65	59	59	43	81	73	93	42	33
Nicotinamides	Nicotinamide	100	72	88	109	80	74	95	116	48	34
Flavines	Riboflavin	100	112	140	118	127	103	111	76	82	72
Flavines	FAD	100	356	406	482	627	247	153	93	168	45
Vitamins	Pantothenate	100	117	100	62	48	100	96	81	58	47
Vitamins	Pyridoxal	100	100	118	69	62	101	95	54	38	17
Vitamins	Pyridoxine	100	116	148	111	92	121	60	76	64	50
Vitamins	Thiamine	100	85	108	107	94	105	80	105	61	44
Vitamins	Thiamine-P	100	118	268	273	107	81	174	189	80	57



7.2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AHCY	<i>Adenosylhomocysteinase</i>
AMPK	<i>Adenosinmonophosphatkinase</i>
AS	<i>Aminosäure</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
CR	<i>Kalorienrestriktion</i>
CRMs	<i>Caloric-Restriction-Mimetics</i>
CysR	<i>Cysteinrestriktion</i>
DMSZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
GSSG	<i>Glutathiondisulfid</i>
HCY	<i>Homocystein</i>
HEM	<i>High-Energy-Metabolismus</i>
HSE	<i>Homoserin</i>
LC/MS	<i>Liquidchromatografie/Massenspektrometrie</i>
LEM	<i>Low-Energy-Metabolismus</i>
MAT2A	<i>Methyladenosintransferase 2A</i>
MetR	<i>Methioninrestriktion</i>
MM	<i>Multiples Myelom</i>
MS	<i>Methioninsynthase</i>
MT	<i>Methyltransferase</i>
MTA	<i>Methylthioadenosin</i>
MTAP	<i>Methylthioadenosinphosphorylase</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
PPW	<i>Pentose-Phosphat-Weg</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
SAH	<i>S-Adenosylhomocystein</i>
SAM	<i>S-Adenosylmethionin</i>
t0	<i>Zellzählung zum Zeitpunkt 0 h</i>

Tab. 14: *Nomenklatur der AS*
Abkürzungen der AS im 3-Buchstaben-Code.

nicht-essenzielle AS	Alanin	Ala
	Arginin	Arg
	Asparagin	Asn
	Asparaginsäure	Asp
	Cystein	Cys
	Glutamin	Gln
	Glutaminsäure	Glu
	Glycin	Gly
	Prolin	Pro
	Serin	Ser
	Tyrosin	Tyr
essenzielle AS	Histidin	His
	Isoleucin	Ile
	Leucin	Leu
	Lysin	Lys
	Methionin	Met
	Phenylalanin	Phe
	Threonin	Thr
	Tryptophan	Trp
	Valin	Val

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Methioninzyklus</i>	5
Abb. 2: <i>High- und Low-Energy-Metabolismus</i>	10
Abb. 3: <i>Fluoreszenzmikroskopie der MPC11-Zellen</i>	19
Abb. 4: <i>Vergrößerter Ausschnitt des in Abb. 3 dargestellten Bildes</i>	20
Abb. 5: <i>Derselbe Ausschnitt wie in Abb. 4, Zellerkennung durch Software</i>	20
Abb. 6: <i>Derselbe Ausschnitt wie in Abb. 4, Hellfelddarstellung</i>	21
Abb. 7: <i>Versuchsaufbau für die Wachstumskurven</i>	23
Abb. 8: <i>Versuchsaufbau für die Verdünnungsreihen</i>	23
Abb. 9: <i>Versuchsaufbau für die Kompensationsversuche</i>	24
Abb. 10: <i>Zellgewinnung für die LC/MS</i>	26
Abb. 11: <i>Wachstumskurven der murinen MPC11-Zellen</i>	28
Abb. 12: <i>Wachstumskurven der humanen L363-Zellen</i>	29
Abb. 13: <i>Wachstumskurven der humanen KMS12-BM-Zellen</i>	29
Abb. 14: <i>log₂-Verdünnungsreihen der murinen MPC11-Zellen</i>	31
Abb. 15: <i>log₂-Verdünnungsreihen der humanen L363-Zellen</i>	32
Abb. 16: <i>log₂-Verdünnungsreihen der humanen KMS12-BM-Zellen</i>	33
Abb. 17: <i>Kompensationsversuche der murinen MPC11-Zellen</i>	35
Abb. 18: <i>Kompensationsversuche der humanen L363-Zellen</i>	36
Abb. 19: <i>Kompensationsversuche der humanen KMS12-BM-Zellen</i>	37
Abb. 20: <i>Aufnahmen mit EVOS</i>	38

Abb. 1, Abb. 2, Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10 wurden mit Biorender.com erstellt.

Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6 wurden mit Pico imageXpress aufgenommen.

Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19 wurden mit GraphPad Prism erstellt.

Abb. 20 wurde mit dem digitalen Bildgebungssystem EVOS aufgenommen.

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: <i>Stand der Wissenschaft</i>	13
Tab. 2: <i>Zellkulturmedien und -zusätze</i>	15
Tab. 3: <i>Färbemittel</i>	15
Tab. 4: <i>AS und Vitamine</i>	15
Tab. 5: <i>Verbrauchsmaterialien</i>	16
Tab. 6: <i>Geräte</i>	17
Tab. 7: <i>Reduktion des Mediumüberstands der Proben für die LC/MS</i>	25
Tab. 8: <i>Methioninzyklus und gekoppelte Stoffwechselwege der MPC11-Zellen unter MetR</i>	40
Tab. 9: <i>Energiestoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR</i>	41
Tab. 10: <i>AS-Stoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR</i>	42
Tab. 11: <i>Purin-/Pyrimidinstoffwechsel der MPC11-Zellen unter MetR</i>	44
Tab. 12: <i>Material und Methoden der LC/MS</i>	68
Tab. 13: <i>Alle Messwerte der Metabolomanalyse</i>	69
Tab. 14: <i>Nomenklatur der AS</i>	73

Tab. 1 wurde mit Biorender.com erstellt

Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 12, Tab. 14 wurden mit Microsoft Word erstellt.

Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11, Tab. 13 wurden mit Microsoft Excel erstellt.

7.5 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. C. Kübler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die Möglichkeit der Promotion bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. A. Seher, dem Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. W. Schmitz vom Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Würzburg für die gute Zusammenarbeit und die massenspektrometrische Analyse sowie an Herrn Prof. Dr. T. Müller vom Lehrstuhl für Botanik I der Universität Würzburg für das Mitwirken im Betreuungskomitee.

Mein Dank gilt weiterhin Frau M. Schleyer, die stets eine hilfsbereite Ansprechpartnerin war und für reibungslose Abläufe im Labor sorgte.

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Promotion unterstützt und so zu einem erfolgreichen Abschluss derselben beigetragen haben.

7.6 Publikationen

Bereits veröffentlicht:

Schmitz, Werner; Ries, Elena; Koderer, Corinna; Völter, Maximilian Friedrich; Wunsch, Anna Chiara; El-Mesery, Mohamed et al. (2021b): Cysteine Restriction in Murine L929 Fibroblasts as an Alternative Strategy to Methionine Restriction in Cancer Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111630.

In Arbeit:

Maximilian Friedrich Völter, Werner Schmitz, Mohamed El-Mesery, Anna Chiara Wunsch, Corinna Koderer, Lena Wiesner, Alexander Christian Kübler and Axel Seher: Metabolic Silencing via Methionine- and Cysteine-Based Amino Acid Restriction in Murine MPC-11 Cells Reveals a Potential New Strategy for Multiple Myeloma Therapy

7.7 Eidesstattliche Erklärung

"Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate sind kenntlich gemacht und nachgewiesen."

Ort, Datum, Unterschrift