

**Molekulare Mechanismen der OSMI-1-
und/oder V-9302-induzierten
Wachstumshemmung von Hepatomazellen
und Lebertumoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna-Lena Dwillies
aus Hamburg

Düsseldorf, Februar 2026

aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Professor Dr. Tom Lüdde
2. Professor Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das Organ Leber	1
1.1.1 Anatomische Struktur und zelluläre Zusammensetzung	1
1.1.2 Metabolische Zonierung der Leber.....	3
1.1.3 Glutamin- und Ammoniakstoffwechsel der Leber.....	4
1.1.3.1 Glutamin-Aufnahme in die Leber	4
1.1.3.2 Bildung von Glutamin in der Leber	6
1.1.3.3 Abbau von Glutamin in der Leber.....	6
1.1.4 Aufnahme, Bildung und Speicherung von Glukose durch die Leber.....	7
1.2 Der Hexosamin-Biosynthese-Signalweg	8
1.3 Protein- <i>O</i> - und - <i>N</i> -GlcNAcylierung	9
1.4 Das hepatozelluläre Karzinom	11
1.5 Metabolische Veränderungen bei Leberkrebs.....	12
1.5.1 Veränderungen im Glutamin-Stoffwechsel.....	12
1.5.2 Veränderungen im Glukose-Stoffwechsel.....	14
1.5.3 Protein- <i>O</i> -GlcNAcylierung bei HCC.....	16
1.6 Ziel der Arbeit	17
2. Materialien und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Kultivierung und Isolation von Zellen	25
2.2.2 Zellzahlbestimmung.....	26
2.2.3 Koloniebildungsassay.....	27
2.2.4 Fluorimetrische Zelldichtemessung.....	28
2.2.5 Mikroskopie	28
2.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Viabilität	30
2.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Aufnahme von Kynurenin	31
2.2.5.3 Immunfluoreszenzanalysen	31

2.2.6	Mausexperimente und Tierhaltung	32
2.2.6.1	Das Allograft-Modell	32
2.2.6.2	Das HDI-Modell	32
2.2.6.3	Experimentelle Behandlung der Tiere	34
2.2.6.4	Serum-Messung.....	35
2.2.6.5	Organeinbettung in Paraffin	36
2.2.6.6	Herstellen von Gewebeschnitte.....	36
2.2.6.7	Färben der Paraffinschnitte	36
2.2.7	Proteinisolation	38
2.2.8	Proteinbestimmung	39
2.2.9	Western-Blot-Analyse	39
2.2.10	Massenspektrometrische Quantifizierung von Glutamin und Glutamat	41
2.2.11	RNA-Isolation.....	43
2.2.12	cDNA-Synthese	43
2.2.13	Quantitative PCR.....	44
2.2.14	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.3	Bildanalyse.....	46
2.4	Software und Online-Ressourcen	47
2.5	Statistische Testung	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für die Viabilität von den Hepatomazelllinien Huh7 und HepG2	49
3.2	Wirkungen der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Expression, Lokalisation und Proteinspiegel von ASCT2 in Huh7- und HepG2-Zellen	61
3.3	Wirkungen der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und/oder von LAT1/SNAT2 auf die mRNA- und Proteinspiegel von LAT1 in Huh7- und HepG2-Zellen.....	68
3.4	Weitere Aminosäuretransporter	69
3.5	Glutamin- und Kynurenin-Uptake	70
3.6	Effekt der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Glutaminsynthetase und die Glutaminolyse in Huh7- und HepG2-Zellen.....	72
3.7	Effekte einer Hemmung von GLUT1 in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Viabilität von Huh7- und HepG2-Zellen.....	73
3.8	Wirksamkeit von OSMI-1 und V-9302 auf das Wachstum von Hepatomazellen <i>in vivo</i>	78
3.8.1	Effekte von OSMI-1 und V-9302 auf das Tumorwachstum im Allograft-Modell	78
3.8.2	Untersuchungen zur Lebertoxizität von OSMI-1 und V-9302 in der Maus	80
3.8.3	Effekte von OSMI-1 und V-9302 auf das Wachstum von Lebertumoren im HDI-Modell	80
3.8.4	Untersuchungen zur Lebertoxizität von OSMI-1 und V-9302 in der Maus	83

3.8.5	Nachweis von T- und B-Zellen und Makrophagen in der Leber mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten HDI-Mäusen	83
3.8.6	Metabolische Zonierung in der Leber mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelter HDI-Mäuse.....	85
4.	Diskussion.....	87
4.1	Rolle von Glutamin für die durch Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und/oder des Aminosäuretransports vermittelte Wachstums- und Viabilitätsreduktion.....	87
4.2	Beeinflussung des Glukosetransports durch Protein-O-GlcNAcylierungshemmung	95
4.3	Potenzielle Behandlungsresistenz-vermittelnde metabolische Veränderungen in mit OSMI-1 und V-9302 behandelter Hepatomazellen.....	96
4.4	Wirkungen von OSMI-1 und V-9302 auf experimentell in Mäusen induzierte Leberzelltumore.....	96
4.5	Zusammenfassung.....	99
4.6	Ausblick	99
5.	Referenzen.....	101
6.	Abbildungsverzeichnis	109
7.	Tabellenverzeichnis.....	112
8.	Eidesstaatliche Erklärung	V
9.	Danksagung	VI

Zusammenfassung

Die O-GlcNAcylierung spezifischer Proteinspezies steigert die Proliferation von Krebszellen durch Umstellung des Energiestoffwechsels auf anaerobe Glykolyse und Glutaminolyse. Der dadurch gesteigerte Bedarf an Glucose, Glutamin und weiteren Aminosäuren wird u.a. durch Hochregulation der Transporter GLUT1, ASCT2 und LAT1 gedeckt. Inwieweit die O-GlcNAcylierung diese Veränderungen vermittelt, ist nicht vollständig verstanden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung durch OSMI-1 in Hepatomazellen *in vitro* die Proteinspiegel des Glukosetransporters GLUT1 und der Glutaminsynthetase zelltypspezifisch in HepG2-Zellen steigert und in Huh7-Zellen verringert. Demgegenüber wurden die Proteinspiegel von ASCT2 und LAT1 und der Glutaminase gleichsam reduziert. Die intrazellulären Glutamin- und Glutamatspiegel und die Glutaminaufnahme wurden hierdurch jedoch nicht verringert, sondern blieben unverändert in Huh7- und wurden gesteigert in HepG2-Zellen. Wurde unter diesen Bedingungen außerdem LAT1 und SNAT2 durch V-9302 inhibiert, wurde nicht nur eine Proliferationshemmung, sondern eine nicht identifizierbare Form des Zelltods induziert. Dabei konnten die Zelltodformen Apoptose, Nekroptose, Pyroptose und Ferroptose ausgeschlossen werden. Das Wachstum isolierter Maushepatozyten wurde durch OSMI-1 und V-9302 hingegen nicht beeinträchtigt. Eine ähnliche Zelltod-induzierende Wirkung konnte auch erzielt werden, wenn in den mit OSMI-1 inkubierten Zellen zusätzlich der Glukosetransporter GLUT1 durch STF-31 gehemmt wurde. Die durch OSMI-1+V-9302 herbeigeführten wachstumshemmenden Wirkungen auf Hepatomazellen konnten in einem Allograft- und in einem Onkogen-induzierten Tumormodell bestätigt werden. Dabei blieb unklar, ob die Reduktion der Tumormasse Folge einer Wachstumsinhibition oder von Zelltodinduktion ist. In beiden Modellen wurden keine Hinweise auf toxische Wirkungen der Behandlung in den Mäusen gefunden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine durch Protein-O-GlcNAcylierungshemmung induzierte Beeinträchtigung von ASCT2, LAT1 und der Glutaminase Hepatomazellen sensibilisiert gegenüber toxischen Wirkungen einer Inhibierung von Glukose- und weiteren Aminosäuretransportern.

Die in Tumor-Mausmodellen beobachteten, durch OSMI-1- und V-9302-induzierten wachstumshemmenden Wirkungen auf Hepatomazellen deuten auf die potenzielle Eignung dieser Kombinationsbehandlung zur Therapie von Leberkrebs hin.

Abstract

O-GlcNAcylation of specific protein species increases the proliferation of cancer cells by switching energy metabolism to anaerobic glycolysis and glutaminolysis. This leads to an increased demand for glucose, glutamine, and other amino acids is met, among other things, by upregulation of the transporters GLUT1, ASCT2, and LAT1. The extent to which *O*-GlcNAcylation contributes to these changes remains unclear.

The results of the present study show that inhibition of protein *O*-GlcNAcylation by OSMI-1 in hepatoma cells *in vitro* increases the protein levels of the glucose transporter GLUT1 and glutamine synthetase in a cell type-specific manner in HepG2 cells and decreases them in Huh7 cells. In contrast, the protein levels of ASCT2, LAT1, and glutaminase were reduced. However, intracellular glutamine and glutamate levels and glutamine uptake were not reduced but remained unchanged in Huh7 cells and increased in HepG2 cells. When LAT1 and SNAT2 were also inhibited by V-9302 under these conditions, not only was proliferation inhibited, but an unidentifiable form of cell death was induced. The forms of cell death apoptosis, necroptosis, pyroptosis, and ferroptosis could be ruled out.

However, the growth of isolated mouse hepatocytes was not affected by OSMI-1 and V-9302. A similar cell death-inducing effect was observed when the glucose transporter GLUT1 was additionally inhibited by STF-31 in cells incubated with OSMI-1. The growth-inhibiting effects of OSMI-1+V-9302 on hepatoma cells were confirmed in an allograft and an oncogene-induced tumor model. It remained unclear whether the reduction in tumor mass was a result of growth inhibition or cell death induction. In both models, no evidence of toxic effects of the treatment was found in the mice.

In summary, the results indicate that protein *O*-GlcNAcylation inhibition-induced impairment of ASCT2, LAT1, and glutaminase sensitizes hepatoma cells to the toxic effects of glucose and other amino acid transporter inhibition.

The growth-inhibiting effects on hepatoma cells induced by OSMI-1 and V-9302 observed in tumor mouse models indicate the potential suitability of this combination treatment for the therapy of liver cancer.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v).....	Volumenprozent
°C.....	Grad Celsius
Abb.....	Abbildung
Akt.....	Proteinkinase B
Alb.....	Albumin
ALP.....	Alkalische Phosphatase
ALT.....	Alanin-Amino-Transferase, Alanin-Amino-Transferase
APS.....	Ammonium persulfat
AS.....	Aminosäure
ASCT2.....	Alanin-Serin-Cystein Transporter 2
AST.....	Aspartat-Aminotransferase
ATP.....	Adenosintriphosphat
AZ.....	Aktenzeichen
Bili.....	Bilirubin
BPTES.....	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide
BS.....	L-Benzylserin
BSA.....	Bovine Serum Albumine Fraction V
bzw.....	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CCC.....	Gallengangskarzinom
cDNA.....	komplementäre DNA
cm.....	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT.....	Cycle threshold
DAB.....	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DON.....	6-Diazo-5-oxo-L-norleucine
dsDNA.....	doppelsträngige DNA
DTT.....	Dithiothreitol
EBSS.....	Earle's Balanced Salt Solution
ECL.....	Enhanced Chemiluminescence
EDTA.....	Ethyldiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
EMT.....	epithelial-mesenchymale Transition
ER.....	endoplasmatischen Retikulum
FBS.....	Fetal Bovine Serum
FITC.....	Fluorescein Isothiocyanate
g.....	G-Kraft
g/l.....	gramm/Liter
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAT1/2.....	Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase 1/2
GI.....	growth inhibition

GlcNAc.....	N-Acetylglucosamin
GlcNAc-1P	N-Acetylglucosamin-1-Phosphat
GlcNAc-6P	-Acetylglucosamin-6-Phosphat
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Gln.....	Glutamin
GLS	Glutaminase
Glu.....	Glutamat
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT2	Glukosetransporter 2
GNA1/GNPNAT1	Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase
GNK	N-Acetyl-D-Glucosamin-Kinase
GPNA.....	L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid
GS.....	Glutaminsynthetase, Glutaminsynthetase
GSDMD.....	Gasdermin D
GSDME	Gasdermin E
HBS.....	Hexosamin-Biosynthese-Signalweg
HBSS.....	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HHU.....	Heinrich-Heine-Universität
HIER.....	Heat-Induced Epitope Retrieval
HIF	Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor
HRE.....	Hypoxia Response Element
HRP	Horseradish Peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IHC.....	Immunhistochemisch
IRS1/2.....	Insulinrezeptor-Substrate
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
KG.....	Körpergewicht
KI	Künstliche Intelligenz
KO	Knockout
l	Liter
LAT1	L-Typ Aminosäure Transporter 1
LB	Luria-Bertani
Lc-BP	L-cis Hydroxyprolin Biphenyl Ester
LDHA	Laktatdehydrogenase
LEF1.....	Lymphoid Enhancer-binding Factor 1
mA/cm ²	Milliampere pro Quadratcentimeter
Mg ²⁺	Magnesium
MGAT	N-Acetylglucosamin-Transferasen
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
Na ⁺	Natrium
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NaCl.....	Natriumchlorid
NH ₂	Aminogruppe

NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
nm.....	Nanometer
OGA.....	O-GlcNAcase
OGT.....	O-GlcNAc-Transferase
OSMI-1.....	O-GlcNAc transferase inhibitor 1
OST.....	Oligosaccharyltransferase
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1.....	Programmed Cell Death Protein 1
PEG.....	Polyethylenglycol, Polyethylenglykol
PenStrep.....	Penicillin / Streptomycin
PFK1.....	Phosphofruktokinase
PGM3/AGM1.....	Phosphoglucomutase
PI.....	Propidium Iodid
PNGase-F.....	Peptide-N-Glycosidase F
qPCR.....	quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR
RCC.....	Nierenzellkarzinom
rcf.....	relative Zentrifugalkraft
RNA.....	Ribonukleinsäure
rpm.....	rounds per minute
SDS.....	Sodium Dodecyl Sulfate, Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE.....	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SK-Hep.....	Sloan-Kettering-Hepatomzelllinie
SNAT1.....	Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporter 1
SNAT2.....	Sodium-Coupled Neutral Amino Acid Transporter 2
SR-SIM.....	Super-Resolution-Structured-Illumination-Mikroskopie
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T.....	Tris-buffered saline with Tween20
TCA.....	Tricarbonsäurezyklus
TCF1.....	T-cell-specific transcription factor 1
TCF4.....	T-cell factor 4
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAP/AGX1.....	UDP-N-Acetylhexosamin-Pyrophosphorylase
UDP-GlcNAc.....	UDP-N-Acetylglucosamin
UPLC-MS/MS.....	Ultra Performance Liquid Chromatography-Massenspektrometry
UTP.....	Uridintriphosphat
UV-VIS.....	Ultraviolett- und sichtbarer Bereich
V.....	Volt
VHL.....	Von-Hippel-Lindau
wt.....	Wildtyp
z.B.....	zum Beispiel
µg.....	Mikrogramm
µM.....	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Das Organ Leber

1.1.1 Anatomische Struktur und zelluläre Zusammensetzung

Die Leber liegt mittig im rechten Oberbauch unter dem Zwerchfell. Sie ist ein 1,3 bis 1,8 kg schweres Organ und macht ca. 2 bis 3 % des Körpergewichtes aus (1). Sie ist die größte exokrine Drüse (2) und das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers (3, 4).

Die Leber ist in vier unterschiedlich große Leberlappen unterteilt, von denen Lobus dexter und sinister größer sind als Lobus caudatus und quadratus (Abb. 1) (2). Darüber hinaus wird die Leber in acht Segmente (I-VIII) unterteilt. Durch die Leber fließen pro Minute ca. 1500 ml Blut. Siebzig Prozent dieses Blutes stammt aus der Pfortader und dreißig aus der Leberarterie (1). Das venöse Blut der Pfortader hat zuvor Magen, Dünndarm, Dickdarm, Mastdarm, Milz und Bauchspeicheldrüse passiert und transportiert unter anderem dort in das Blut abgegebene Nährstoffe. Innerhalb der Leber verästeln sich die großen Gefäße in viele kleine und bilden dadurch das Sinusoidsystem, welches die Hepatozyten mit Sauerstoff versorgt. Die Sinusoide durchziehen die sogenannten Periportalfelder, welche durch mehrere aneinander angrenzende Leberläppchen (Lobuli hepatis) gebildet werden. Diese haben einen Durchmesser von 1 bis 2 mm und weisen eine sechseckige Struktur auf. Die Leber beherbergt davon insgesamt mehr als 500000 Stück. Die einzelnen Läppchen sind dabei durch Bindegewebszüge voneinander getrennt. Das Blut verlässt die Leber wieder über die untere Hohlvene (Venae hepaticae) (2). In den Periportalfeldern verlaufen außerdem die intrahepatischen Gallengänge, welche die Galle in die Gallenblase transportieren (2). Die Gallenkapillaren werden durch Einstülpungen der Wände zweier gegenüberliegender Hepatozyten gebildet (Abb. 1). Die Gallenblase befindet sich an der Unterseite des rechten Leberlappens zwischen dem großen rechten Leberlappen und dem Lobus caudatus. Sie ist 8 bis 12 cm groß und dient der Speicherung von Galle. Sie ist im nüchternen Zustand mit 40 bis 50 ml gefüllt und wird nach Nahrungsaufnahme vollständig geleert (5). Die Strömungsrichtung der Galle ist der des Blutes entgegengesetzt (2). Die Leber ist maßgeblich an der Verdauung beteiligt. Sie synthetisiert Gallensäuren aus Cholesterin, welche entscheidend für die Emulgierung

und Absorption von Fetten im Dünndarm sind. Zusammen mit anderen Substanzen wie Bilirubin und Cholesterin bilden sie die Galle, die über den Gallengang in den Darm abgegeben wird (6).

Zellulär lässt sich die Leber in zwei Hauptzelltypen unterteilen: Parenchym- und Nicht-Parenchymzellen. Zu den Parenchymzellen zählen die Hepatozyten und Cholangiozyten, die etwa 60 % (7) bzw. 5 % (8) der Leberzellpopulation ausmachen. Hepatozyten übernehmen zentrale metabolische Funktionen, während die Cholangiozyten als epitheliale Zellen die Gallenwege auskleiden und durch die Sekretion von Bikarbonat und Wasser wesentlich zur Alkalisierung und Verdünnung der Galle beitragen. Dadurch sind sie maßgeblich an der Modifikation und dem Transport der Galle beteiligt (Abb. 1) (1).

Die Nicht-Parenchymzellen setzen sich hauptsächlich aus sinusoidalen Endothelzellen (bis zu 20 %), Kupffer-Zellen (bis zu 12 %), hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen; bis zu 8 %) und Pit-Zellen (<2 %) zusammen (Abb. 1) (7). Endothel- und Kupffer-Zellen kleiden gemeinsam die Wände der Lebersinusoiden aus. Kupffer-Zellen sind leberspezifische Makrophagen und spielen eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunabwehr, indem sie kontinuierlich über die Pfortader eintreffende, potenziell pathogene Mikroorganismen aus dem Gastrointestinaltrakt phagozytieren und eliminieren (9). Die Pit-Zellen stellen eine seltene Population von natürlichen Killerzellen dar, die gemeinsam mit den Kupffer-Zellen immunologische Funktionen wie z.B. die zytotoxische Abwehr von virusinfizierten Zellen in der Leber ausüben (7). Die hepatischen Sternzellen befinden sich im Raum von Disse, der zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten liegt. Sie dienen primär als Speicher für Vitamin A und Lipide. Unter pathologischen Bedingungen, insbesondere bei chronischen Leberschädigungen, können sie zu myofibroblastenartigen Zellen transdifferenzieren und sind maßgeblich an der Entstehung einer Leberfibrose beteiligt (7).

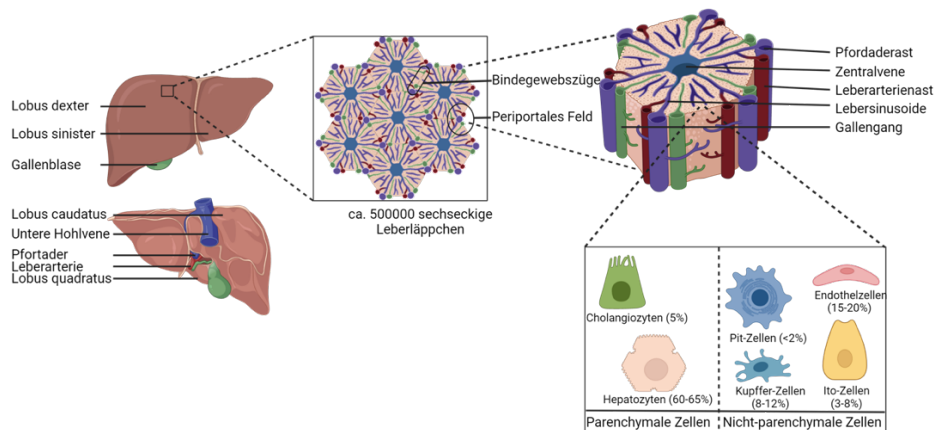


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Leber (Erstellt mit BioRender.com).

1.1.2 Metabolische Zonierung der Leber

Der Aufbau des Lebergewebes sowie die daraus resultierende, heterogene Versorgung der Hepatozyten mit Blutbestandteilen - darunter Sauerstoff, Nährstoffe und Hormone - führen zu einer funktionellen Spezialisierung der Hepatozyten. Diese funktionelle Differenzierung ist die Grundlage der sogenannten „metabolischen Zonierung“ der Leber. Man unterscheidet dabei drei Zonen innerhalb des Leberläppchens (Abb. 2) (10).

Die sauerstoffreiche Zone 1 wird von den periportalen Hepatozyten gebildet, die sich in unmittelbarer Nähe des Portalfeldes mit den Ästen der Pfortader und Leberarterie befinden (11). Diese Zone ist primär für oxidative Stoffwechselprozesse zuständig, darunter die Gluconeogenese, die β -Oxidation von Fettsäuren und die Harnstoffsynthese. Darüber hinaus erfolgt hier die Synthese einer Vielzahl von Plasmaproteinen, wie Albumin sowie Akute-Phase-Proteinen, einschließlich des C-reaktiven Proteins (11, 12).

Die Zone 2, die intermediäre Zone, liegt zwischen der periportalen und der perivenösen Region und weist funktionelle Übergangseigenschaften auf. Die Stoffwechselaktivität in dieser Zone kombiniert Merkmale sowohl der Zone 1 als auch der Zone 3 (7, 13).

Die sauerstoffarme Zone 3 wird von den perivenösen Hepatozyten gebildet, die in unmittelbarer Nähe zur Zentralvene lokalisiert sind. Diese Zone ist spezialisiert auf die Lipogenese, also die Synthese von Fettsäuren aus Glukose (14). Ebenso ist sie maßgeblich an der Biotransformation beteiligt (14). Hier werden eine Vielzahl körpereigener Substanzen (z. B. Häm, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone) sowie körperfremder

Stoffe (z. B. Xenobiotika und Arzneimittel) modifiziert. Diese Prozesse dienen der Entgiftung und der Bioaktivierung von Substanzen (14, 15).

Die funktionelle Zonierung der Leber manifestiert sich auch im Glutamin-Stoffwechsel (16). Die unterschiedlichen hepatozytären Kompartimente, die primär für den Glutamin-Aufbau bzw. -Abbau verantwortlich sind, werden im folgenden Kapitel detailliert dargestellt.

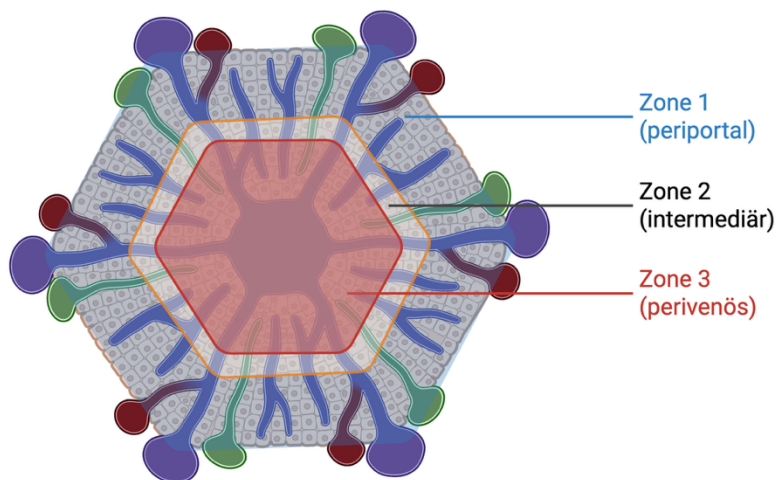


Abbildung 2: Schematische Darstellung der metabolischen Zonierung der Leber (Erstellt mit BioRender.com).

1.1.3 Glutamin- und Ammoniakstoffwechsel der Leber

1.1.3.1 Glutamin-Aufnahme in die Leber

Glutamin ist die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure (AS) im Blut. Der Transport von Glutamin durch Zellmembranen kann über verschiedene Aminosäuretransporter erfolgen, die je nach Zelltyp und metabolischem Zustand variieren (17). Die wichtigsten Glutamin-Transporter sind der Alanin-Serin-Cystein Transporter 2 (ASCT2), der L-Typ Aminosäure Transporter 1 (LAT1), der Natrium-gekoppelte Transporter für neutrale Aminosäuren 1 (SNAT1) und der Natrium-gekoppelte Transporter für neutrale Aminosäuren 2 (SNAT2) (Abb. 3) (18).

In der Leber erfolgt die Glutamin-Aufnahme unter physiologischen Bedingungen maßgeblich über den SNAT2 (Genname: *SLC38A2*), welcher in den Hepatozyten exprimiert wird. Es handelt sich um einen Na^+ -abhängigen Transporter für neutrale AS. Neben

Glutamin transportiert er Alanin und Glycin. Unter bestimmten Umständen kann SNAT2 bei nicht ausreichender Versorgung mit AS zur Aufrechterhaltung der AS-Homöostase kompensatorisch hochreguliert werden (19, 20).

Der ASCT2 (Genname: SLC1A5) wird unter physiologischen Bedingungen nur von einer kleinen Subpopulation von Hepatozyten der periportalen Zone exprimiert. In Fastenzeiten oder bei Ammoniakbelastung unterstützt er den SNAT2, welcher den Hauptteil des Glutamin-Transports in den Hepatozyten übernimmt (20). Er ist ein Na⁺-abhängiger Austauschtransporter, bei dem die Aufnahme von Glutamin an die von Natrium gekoppelt ist. Im Gegenzug exportiert er andere neutrale AS wie Alanin, Serin und Cystein aus der Zelle heraus (Abb. 3) (21).

Zusätzlich zu der seit langem bekannten plasmamembranständigen Form des ASCT2 zeigen neuere Untersuchungen, dass eine alternativ gespleißte Form der *SLC1A5*-mRNA für ein trunkiertes ASCT2-Protein translatiert, welches in Mitochondrien lokalisiert ist (22, 23). Die mitochondriale Lokalisation der trunkierten Proteinvariante wird durch eine N-terminale mitochondriale Zielsequenz vermittelt (22). Im Vergleich zur plasmamembranständigen Isoform von ASCT2, die aus 541 AS besteht und in glykosylierter Form ein Molekulargewicht von etwa 60 bis 75 kDa aufweist, handelt es sich bei *SLC1A5_var* um eine verkürzte Variante mit 339 AS und einem entsprechenden Molekulargewicht von ca. 38 bis 40 kDa (22).

SNAT1 wird durch das Gen *SLC38A1* kodiert. Er transportiert, wie ASCT2, seine Substrate Na⁺-abhängig. Dazu gehören neben Glutamin die neutralen AS Serin und Alanin. Im Vergleich zu SNAT2 ist er schwächer in der Leber exprimiert und sein Expressionsniveau ist weniger stark durch Faktoren wie Hormone, Stress und die Nährstoffversorgung beeinflusst (Abb. 3) (24, 25).

Der LAT1 (Genname: *SLC7A5*) ist ein Na⁺-unabhängiger, bidirektionaler Antipor-ter für neutrale AS und transportiert neben Glutamin Leucin, Phenylalanin und Tyrosin. Die Transportrichtung hängt dabei vom Konzentrationsgradienten ab (Abb. 3). Unter bestimmten Umständen kann LAT1 zur Kompensation einer nicht ausreichenden Versorgung mit den AS und zur Aufrechterhaltung der AS-Homöostase hochreguliert werden. In der Leber wird er unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert (20, 26, 27).

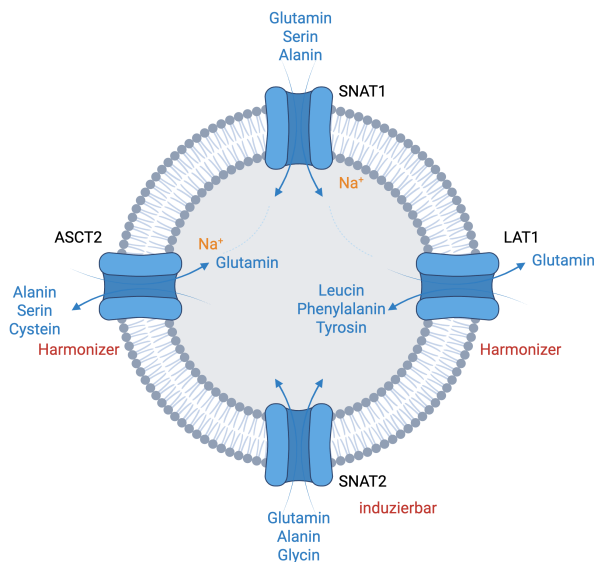


Abbildung 3: Aminosäuretransporter (20) (Erstellt mit BioRender.com).

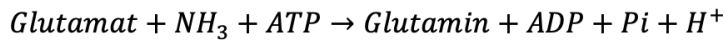
1.1.3.2 Bildung von Glutamin in der Leber

Neben der Aufnahme von Glutamin aus dem Pfortaderblut durch die oben genannten Transporter (Abb. 3) wird Glutamin von der Leber auch selbst gebildet. Dies geschieht in den perivenös gelegenen Hepatozyten, die auch als Scavenger-Zellen bezeichnet werden (28). Diese Zellen exprimieren die Glutaminsynthetase (GS) und bilden Glutamin (Gln) aus Glutamat (Glu) und Ammoniak (NH_3) unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) (Abb. 4 - Reaktionsgleichung 1 und Abb. 5). Die Reaktion dient dazu, Ammoniak, der nicht im vorgeschalteten Harnstoffzyklus fixiert wurde, aus dem Blut zu eliminieren (1, 16, 29).

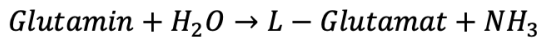
1.1.3.3 Abbau von Glutamin in der Leber

Parallel zur Bildung wird Glutamin in der Leber durch Glutaminolyse abgebaut. Dieser Prozess wird von Glutaminase (GLS) Typ 2 katalysiert (Abb. 5). Chemisch betrachtet handelt es sich hierbei um eine Deaminierung, bei der eine Aminogruppe (NH_2) vom Glutamin abgespalten und NH_3 freigesetzt wird (Abb. 4 - Reaktionsgleichung 2) (30).

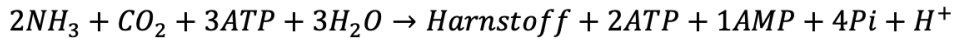
Diese Reaktion findet im Leberazinus in den periportalen Hepatozyten statt und dient der Steigerung der Effektivität der Ammoniakentgiftung im Harnstoffzyklus (31). Das freigesetzte Ammoniak wird in den Mitochondrien der Leberzellen im Harnstoffzyklus (Ornithinzyklus) zu Harnstoff fixiert und darüber anschließend über die Nieren ausgeschieden (Abb. 4 - Reaktionsgleichung 3) (32-35).



Reaktionsgleichung 1: GS katalysierte Bildung von Glutamin in der Leber



Reaktionsgleichung 2: GLS katalysierte Deaminierung von Glutamin in der Leber



Reaktionsgleichung 3: Nettogleichung des Harnstoffzyklus zur hepatischen Ammoniakentgiftung

Abbildung 4: Reaktionsgleichungen zur Glutaminsynthese, Glutaminolyse und der Harnstoffsynthese.

Diese Besonderheit des gleichzeitigen Abbaus und der nachgeschalteten, kompensatorischen Neubildung des Glutamins im gleichen Organ wird auch als interzellulärer Glutamin-Zyklus bezeichnet (36).

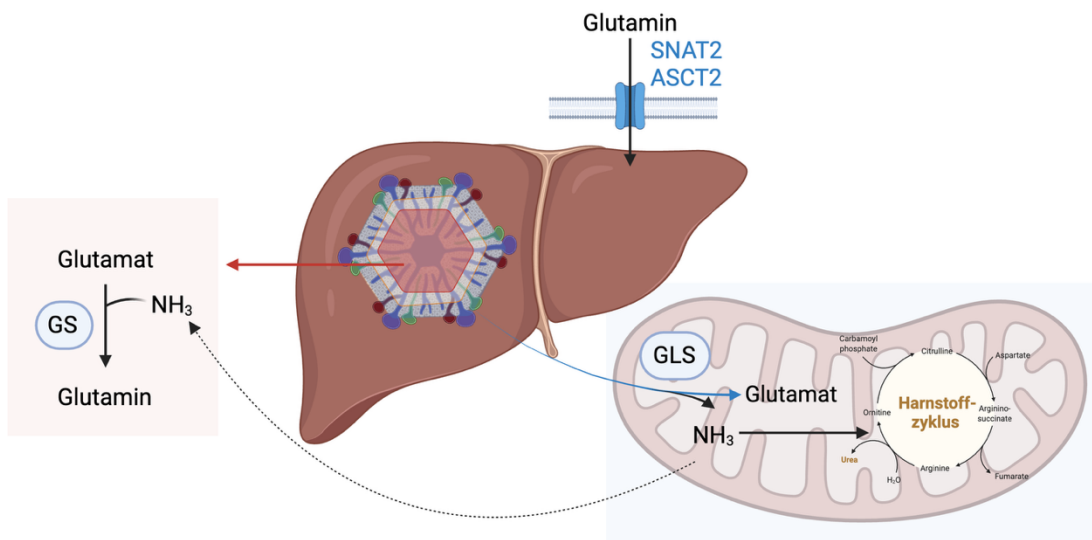


Abbildung 5: Schematische Übersicht des Glutamin-Stoffwechsels in der Leber (Erstellt mit BioRender.com).

1.1.4 Aufnahme, Bildung und Speicherung von Glukose durch die Leber

Die Leber spielt eine bedeutende Rolle für die Glukosehomöostase und somit für die Energieversorgung des Körpers (37). Durch die bedarfsentsprechende Aufnahme oder Speicherung von Glukose reguliert sie den Blutzuckerspiegel (38, 39).

Die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Leber erfolgt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich über den Glukosetransporter 2 (GLUT2). Der GLUT2 ist an der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert und kann den bidirektionalen Transport von Glukose bewerkstelligen. Dabei ist die Transportrichtung abhängig

von der Intrahepatischen- und Blutglukosekonzentration und folgt dem Konzentrationsgradienten (40).

Der Glukosetransporter 1 (GLUT1) ist ein hoch-affiner Glukosetransporter, der unter physiologischen Bedingungen in der Leber kaum exprimiert wird. Eine Induktion kann jedoch unter pathophysiologischen Zuständen wie z. B. zellulärem Stress oder Hypoxie erfolgen (41). Er sorgt unabhängig von der Blutglukosekonzentration für eine kontinuierliche Zufuhr von Glukose (40).

Neben der Aufnahme bildet die Leber, zur Sicherstellung einer kontinuierlichen Versorgung, Glukose *de novo* auch selbst. Dies geschieht über die Glukoneogenese (42). Dafür kann sie außerdem Glukose in Form von Glykogen speichern und dieses bei Bedarf wieder über die Glykogenolyse freisetzen (40, 43).

1.2 Der Hexosamin-Biosynthese-Signalweg

Der Hexosamin-Biosynthese-Signalweg (HBS) ist ein Nebenweg der Glykolyse, der etwa 2-5 % der aufgenommenen Glukose verarbeitet. Er führt zur Bildung von UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), einem wichtigen Substrat für die Glykosylierung von Proteinen und Lipiden. Diese Modifikation beeinflusst viele zelluläre Prozesse wie Signalweiterleitung, Genexpression, Zellteilung und Stoffwechselregulation (Abb. 6). Da in den HBS Produkte des Kohlenhydrat-, Fett- und Nukleinsäure-Stoffwechsels eingehen, wird ihm eine zentrale Rolle als Nutrient-Sensor in Zellen zugesprochen. Er ist mit Krankheiten wie Diabetes, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (44, 45).

Der HBS beginnt mit der Aufnahme von Glukose in die Zelle durch spezifische Transporter. Im Zytosol wird Glukose unter ATP-Verbrauch durch eine Hexokinase-Reaktion zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, welches anschließend Isomerase-vermittelt in Fruktose-6-Phosphat überführt wird (44). Dieses Zwischenprodukt kann sowohl in die Glykolyse als auch in den HBS eintreten, wobei etwa 95 % des Fruktose-6-Phosphats in der Glykolyse weiterverwendet werden. Ein Schlüsselenzym des HBS ist die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase 1/2 (GFAT1/2), die Fruktose-6-Phosphat unter Verbrauch von Glutamin in Glucosamin-6-Phosphat umsetzt (44). Glucosamin kann auch über Transporter in die Zelle gelangen und dort unter Verwendung von ATP durch die *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Kinase (GNK) ebenfalls für die Synthese von Glucosamin-6-Phosphat verwendet werden. Dieses Produkt dient als Substrat für den weiteren Verlauf

des Signalwegs. Die nachfolgende Acetylierung von Glucosamin-6-Phosphat zu *N*-Acetylglucosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6P) erfolgt durch die Glucosamin-6-Phosphat-*N*-Acetyltransferase (GNA1/GNPAT1) unter Verwendung von Acetyl-CoA aus dem Fettsäuremetabolismus (Abb. 6) (44). Anschließend erfolgt die isomerisierende Umlagerung von GlcNAc-6P zu *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphat (GlcNAc-1P) durch das Enzym Phosphoglucomutase (PGM3/AGM1). GlcNAc-1P wird in einer Uridintriphosphat (UTP)-abhängigen Reaktion durch die UDP-*N*-Acetylhexosamin-Pyrophosphorylase (UAP/AGX1) zu UDP-GlcNAc umgesetzt (44). Für eine schematische Darstellung der genannten Prozesse siehe Abbildung 6.

1.3 Protein-*O*- und -*N*-GlcNAcylierung

Der im HBS entstandene Zucker UDP-GlcNAc dient sowohl als Substrat für die *N*- wie auch die *O*-glykosidische Verknüpfung von Glucosamin an Aminosäurereste von Proteinen. Durch diese posttranslationalen Modifikationen können die Eigenschaften der dadurch modifizierten Proteine in spezifischer Weise beeinflusst werden (46).

Die *N*-Glykosylierung ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der im endoplasmatischen Retikulum (ER) initiiert und im Golgi-Apparat fortgeführt wird (47). Dieser Vorgang erfolgt unter Beteiligung verschiedener spezifischer Enzyme, die schrittweise Modifikationen der glykosylierten Proteine katalysieren. Im ER erfolgt sie durch die Oligosaccharyltransferase (OST), im Golgi-Apparat durch die zur Familie der *N*-Acetylglucosamin-Transferasen (MGAT) zählenden *N*-Acetylglucosaminyltransferasen, Galactosyltransferasen und Sialyltransferasen (47, 48). Die *N*-Glykosylierung erfolgt insbesondere bei Plasmamembranproteinen (49).

Die Protein-*O*-Glykosylierung erfolgt demgegenüber im Zytosol, im Zellkern sowie in den Mitochondrien und wird durch jeweilige Organellen-spezifische Isoformen der *O*-GlcNAc-Transferase (OGT) katalysiert. Hier wird *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) über eine *O*-glykosidische Bindung an Serin- und Threoninresten von Proteinen angehängt. Die *O*-GlcNAcylierung ist reversibel, da die *O*-GlcNAcase (OGA) *O*-GlcNAc-Reste wieder von den Proteinen entfernt (44). Das dabei freiwerdende GlcNAc kann im HBS in die aktive Form UDP-GlcNAc überführt werden und steht damit für die OGT erneut als Substrat zur Verfügung (44).

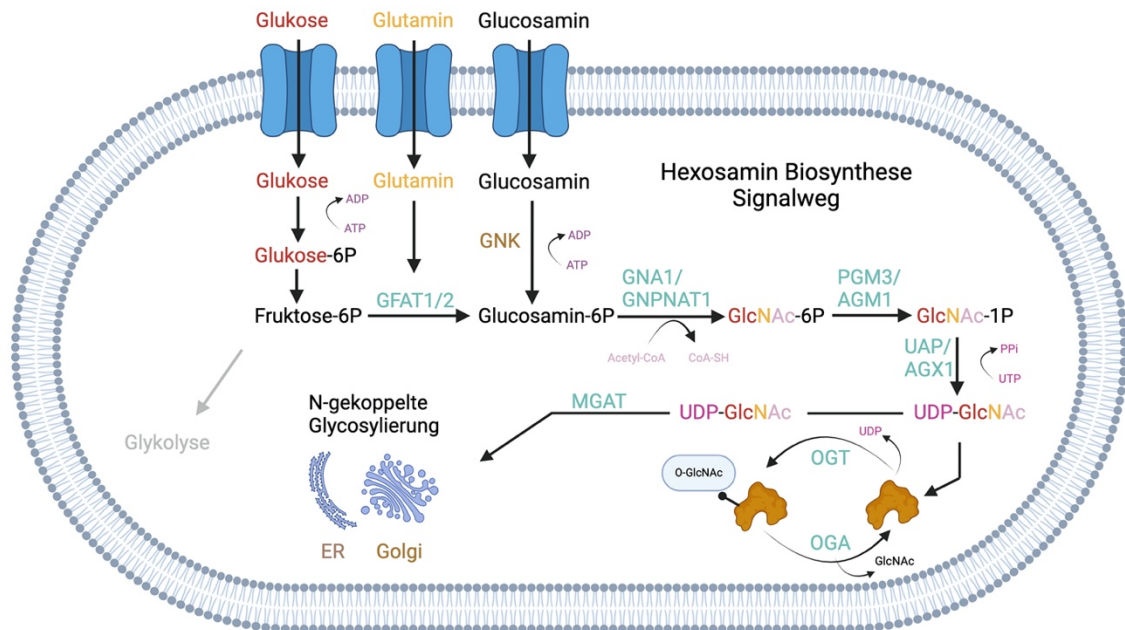


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Hexosamin Biosynthese Signalwegs (44) (Erstellt mit Bio-Render.com).

Der Hexosamin-Biosyntheseweg (HBS) beginnt mit der Aufnahme von Glukose und deren Umwandlung zu Fruktose-6-Phosphat. Letzteres wird durch Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Transaminase 1/2 (GFAT1/2) unter Verbrauch von Glutamin zu Glucosamin-6-Phosphat umgesetzt. Alternativ kann Glucosamin auch direkt durch N-Acetyl-D-Glucosamin-Kinase (GNK) eingebracht werden. Über Glucosamin-6-Phosphat-N-Acetyltransferase (GNA1/GNPAT1) entsteht N-Acetylglucosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6P), das durch Phosphoglucomutase (PGM3/AGM1) in N-Acetylglucosamin-1-Phosphat (GlcNAc-1P) und schließlich durch UDP-N-AcetylhexosaminPyrophosphorylase (UAP/AGX1) in UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) überführt wird. UDP-GlcNAc dient als zentrales Substrat für die N-Glycosylierung im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat, sowie für die reversible O-Glycosylierung im Zytosol, Zellkern und Mitochondrien durch O-GlcNAc-Transferase (OGT) und O-GlcNAcase (OGA) (44).

Metabolite aus den unterschiedlichen Energie- und Biosynthese-Stoffwechselwegen sind Substrate des HBS, in dem UDP-GlcNAc synthetisiert wird. Somit wird die Synthese von UDP-GlcNAc und damit auch die Protein-O-GlcNAcylierung durch die Verfügbarkeit dieser Substrate determiniert (44). Folglich kann die Protein-O-GlcNAcylierung ein intrazellulärer Sensor für die Versorgungssituation der Zelle mit Energiesubstraten sein (44).

Unter physiologischen Bedingungen trägt die O-GlcNAcylierung zum Beispiel zur Feinabstimmung der Insulinwirkung bei. Sie beeinflusst die Aktivität von Schlüsselproteinen wie Insulinrezeptor-Substraten (IRS1/2) und Akt, wodurch die Insulinsignalkaskade moduliert wird. Eine ausgewogene O-GlcNAcylierung unterstützt die Insulinsensitivität und fördert die Glukoseaufnahme in peripheren Geweben (50, 51). Genauer beschrieben konkurriert sie mit der Phosphorylierung an regulatorischen Serin- und

Threoninresten der IRS-Proteine und kann so die Insulin-Signalkaskade abschwächen, was sich negativ auf die Insulinwirkung und -ausschüttung auswirken kann (52, 53).

Durch Mangel oder Überschuss von Nährstoffen induzierter Stress kann die Faltung von Proteinen stören. Wird diese Nährstoffsituation durch entsprechend veränderte UDP-GlcNAc-Spiegel registriert, kann eine dadurch veränderte Protein-O-GlcNAcylierung Korrekturmechanismen aktivieren, die eine korrekte Faltung ermöglichen (54).

1.4 Das hepatozelluläre Karzinom

Durch die zahlreichen Funktionen der Leber sind verschiedenste pathophysiologische Veränderungen möglich, welche zu erheblichen Problemen führen können. In den letzten Jahren haben diese Veränderungen in den westlichen Ländern an Bedeutung gewonnen. Dies hängt unter anderem mit einem ungesunden Lebensstil zusammen. Aber auch andere Ursachen wie genetische Veränderungen oder Umwelteinflüsse können unterschiedlichste krankhafte Veränderungen hervorrufen (1, 55).

Zusammen mit dem Gallengangskarzinom (CCC) zählt das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zu den primären Lebertumoren und gilt als die fünfthäufigste Krebserkrankung weltweit (1, 5). Die Inzidenz liegt bei Frauen bei ca. 5 pro 100.000 und bei Männern bei ca. 13 pro 100.000. Dabei steigt die Häufigkeit dieser Erkrankung stetig an. Als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC zählt die Zirrhose. Daher wird Patienten mit bekannter Leberzirrhose empfohlen alle 6 Monate die Leber mittels Sonographie auf das Vorhandensein eines HCC zu untersuchen (1, 56).

Klinisch symptomatisch wird das HCC oftmals erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Dabei treten unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Schmerzen im Oberbauch oder Nachtschweiß auf (3). Die Behandlung eines HCCs ist abhängig von der Ätiologie der Erkrankung (z.B. HCC auf dem Boden einer Zirrhose) und vom Stadium der Erkrankung (Abb. 7). Dabei unterscheidet man die Stadien 0, A, B, C und D. In den frühen Stadien (0, A und B) wird der Tumor oftmals ablatiert oder die zuführenden Gefäße werden embolisiert. Der Tumor wird ausschließlich resektiert, wenn keine Zirrhose vorliegt, da ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines Rezidivs besteht. Als einzige kurative Therapie gilt daher die Transplantation. Im Stadium eines metastasierenden nicht mehr kurativ behandelbaren HCCs (C und D) ist eine medikamentöse Therapie angeraten (3). Hier stehen unterschiedliche Tyrosinkinase-Inhibitoren und

Immuntherapien zur Verfügung. Die Überlebensdauer der Patienten fällt in Abhängigkeit des Fortschritts der Erkrankung und damit mit zunehmendem Stadium progressiv ab: Während in Stadium B eine mittlere Überlebenszeit von ca. 2,5 Jahren erwartet wird, sinkt diese auf ca. 10 Monate in Stadium C ab. Ab Stadium D beträgt die mittlere Überlebenszeit schließlich nur noch 3 Monate (3).

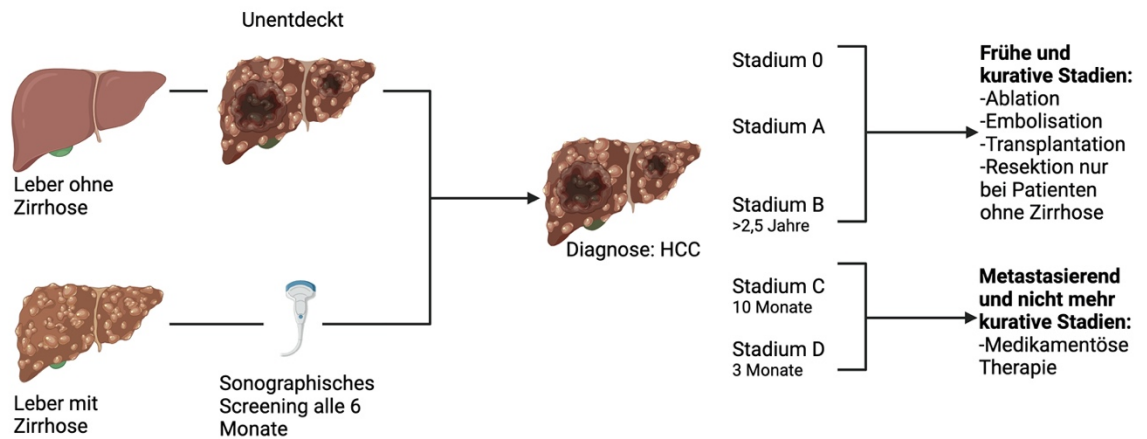


Abbildung 7: HCC-Stadien und Therapien (erstellt mit BioRender.com).

1.5 Metabolische Veränderungen bei Leberkrebs

Die in Tumoren auftretenden metabolischen Veränderungen im Aminosäure-, Fett- und Glukosestoffwechsel werden in der Gesamtheit häufig als „metabolische Reprogrammierung“ bezeichnet (57). Sie ist ein zentrales Merkmal des HCC und trägt hier wesentlich zur Tumorentstehung, -progression und -therapieresistenz bei (58).

1.5.1 Veränderungen im Glutamin-Stoffwechsel

Die metabolische Reprogrammierung beim HCC geht mit einer verstärkten Glutaminolyse einher (59). Dabei wird Glutamin zu Glutamat und Ammonium (NH_4^+) hydrolysiert. Ersteres wird von der Glutamatdehydrogenase für die Synthese von α -Ketoglutarat genutzt, welches nachfolgend für die Synthese von Reduktionsäquivalenten und Biosynthesevorstufen in den Tricarbonsäurezyklus (TCA) eingespeist wird. Diese Anpassung ermöglicht es den Tumorzellen toxischen Wirkungen von oxidativem Stress zu widerstehen und verstärkt zu proliferieren (60).

Um den erhöhten Bedarf an Glutamin-, aber auch weiterer AS decken zu können, werden in HCCs die Aminosäuretransporter ASCT2, LAT1 sowie SNAT1/2 hochreguliert (20, 60). Dies betrifft auch die weiter oben beschriebene mitochondriale Variante des ASCT2 (SLC1A5_var) (22). Diese Variante unterliegt der transkriptionellen Kontrolle durch den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF-2 α , der unter hypoxischen Bedingungen, welche oft im Tumormilieu vorliegen, an ein Hypoxia Response Element (HRE) im SLC1A5-Promoter bindet und so die Expression von SLC1A5_var steigert (22).

Die starke Abhängigkeit der Tumorzellen von der Aufnahme von Glutamin macht die entsprechenden Transporter zu potenziellen Angriffspunkten für therapeutische Interventionen bei Leberkrebspatienten (43). Der ASCT2 ist hierbei von besonderem Interesse, da er in Leberkrebszellen häufig überexprimiert wird (61) und dies mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden ist (Abb. 8) (62).

Eine pharmakologische Inhibition von ASCT2 kann das Wachstum von Glutamin-abhängigen Tumoren vermindern und stellt somit eine potenzielle Therapieoption dar. Dies wurde experimentell an Sloan-Kettering-Hepatomzellen (SK-Hep) in einem Versuchsansatz gezeigt, in dem ASCT2-mRNA durch dafür spezifische siRNA herunterreguliert wurde (63). Die Transportaktivität des ASCT2 kann jedoch auch durch eine Reihe von Verbindungen vermindert werden.

Eine dieser Substanzen ist L-Benzylserin (BS), ein synthetisches Aminosäurederivat, das den ASCT2 kompetitiv inhibiert (64). Die Hemmwirkung ist dabei jedoch nicht selektiv und exklusiv auf den ASCT2 beschränkt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten von BS mit den jeweiligen Substraten hemmt es auch andere Aminosäuretransporter der SLC-Familie wie z.B. *SLC1A4* (64). Darüber hinaus liegt die Affinität von BS für den ASCT2 im millimolaren Bereich und eine effektive Hemmung erfordert den Einsatz großer Mengen (64, 65). Diese Eigenschaften machen BS für die Therapie beim Menschen ungeeignet (61).

Neben BS wirken auch L- γ -Glutamyl-p-nitroanilid (GPNA) und L-cis Hydroxyprolin Biphenyl Ester (Lc-BP) hemmend auf den ASCT2-vermittelten Transport von Glutamin (66, 67). Entgegen früheren Annahmen ist GPNA kein spezifischer ASCT2 Hemmstoff. Er hat zahlreiche Off-target-Effekte und hemmt z.B. auch den ASCT1 und LAT1 (68). Der IC₅₀-Wert beträgt 1000 μ M, was - ähnlich wie bei der Anwendung von BS - den Einsatz hoher Konzentrationen erfordert und dadurch die Unspezifität erhöht (69).

Demgegenüber zeigt Lc-BPE eine erheblich höhere Spezifität und Selektivität ASCT2 zu binden und dessen Transportfunktion zu hemmen (67). Der IC_{50} -Wert liegt hier im niedrigen Mikromolarbereich, was den Einsatz kleiner Mengen des Inhibitors ermöglicht und so die Selektivität steigert (67).

Neben den genannten Verbindungen wurde initial auch V-9302 als ASCT2-Hemmstoff beschrieben (69). Hier liegt der IC_{50} -Wert bei 9,6 μ M, was eine spezifische Inhibition (48) erwarten lässt. Neuere Studien zeigen jedoch, dass V-9302 nicht den ASCT2, sondern LAT1 und SNAT2 hemmt (20). Dennoch inhibiert er insgesamt effektiv die zelluläre Glutamin-Aufnahme und supprimiert das Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo*. Dies ist möglicherweise Folge einer Aminosäure-Dyshomöostase, die auf die Hemmung von SNAT2 und LAT1 zurückzuführen ist (20). Derzeit existieren keine spezifischen und hochaffinen ASCT2-Hemmstoffe, die klinisch eingesetzt werden können (20).

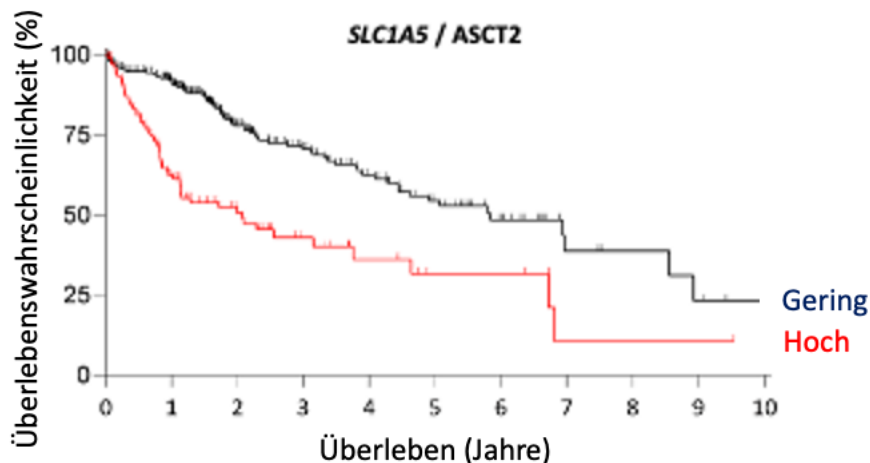


Abbildung 8: Klinische Relevanz des SLC2A5(70).

Kaplan-Meier-Plot-Analysen der mRNA-Spiegel von SLC2A5 und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit Leberkrebs. Die SLC2A5-Werte wurden als niedrig ($n=259$) oder hoch ($n=106$) eingestuft, wobei der Cut-off-Werte von 7,13 Fragmenten pro Kilobase Exon pro Million Reads verwendet wurde. Die statistische Analyse wurde mit dem Log-Rank-Test durchgeführt; die P-Werte sind in den jeweiligen Grafiken angegeben. Datenquelle: Der Human Protein Atlas ([proteintlas.org](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105281-SLC1A5/pathology/liver+cancer); <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105281-SLC1A5/pathology/liver+cancer>)

1.5.2 Veränderungen im Glukose-Stoffwechsel

In den Zellen des HCC findet eine gesteigerte anaerobe Glykolyse unter aeroben Bedingungen statt, ein Phänomen, das als aerobe Glykolyse bzw. Warburg-Effekt bekannt ist (71). Dabei wird Glukose, selbst bei ausreichender Sauerstoffverfügbarkeit, bevorzugt zu Laktat metabolisiert. Diese metabolische Umstellung erlaubt eine rasche, aber

ineffiziente ATP-Synthese und liefert Vorstufen für die Nukleotid-, Aminosäure- und Lipidbiosynthese (71). Im Vergleich zu den 30 bis 32 ATP-Molekülen, die aus der oxidativen Phosphorylierung hervorgehen (38), sind es bei der anaeroben Glykolyse lediglich zwei (72).

Der erhöhte Glukosebedarf des HCC wird dabei insbesondere über den GLUT1 gedeckt. Während unter physiologischen Bedingungen in Hepatozyten primär GLUT2 exprimiert wird, zeigt sich bei malignen Transformationen - insbesondere beim HCC - eine signifikante Hochregulation von GLUT1 (43). GLUT1 zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Glukose sowie eine weitgehend konzentrationsunabhängige, konstitutive Transportaktivität aus, wodurch auch bei niedrigen extrazellulären Glukosespiegeln eine effektive Glukoseaufnahme möglich wird (40, 41, 73).

In Übereinstimmung damit ist eine hohe GLUT1-Expression mit einer geringeren Überlebensprognose assoziiert (Abb. 9). Solche Tumore weisen ein hohes Metastasierungspotential und eine größere Resistenz gegenüber Therapien (z.B. Chemotherapie) auf (40).

Diese Beobachtungen machen GLUT1-Inhibitoren für die spezifische Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen therapeutisch relevant (40). Eine vielversprechende Verbindung ist hierbei der GLUT1-Hemmstoff STF-31. Bislang existieren keine Befunde zu einer wachstumshemmenden Wirkung von STF-31 beim HCC, aber zu Von-Hippel-Lindau (Gen von VHL-Tumorsuppressor) -defizienten Nierenzellkarzinomen (RCC). Bei diesen Tumorzellen wird die Transkription von GLUT1 in Folge einer Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) gesteigert. Die Inkubation der RCC-Zellen mit STF-31 vermindert die Glykolyse sowie die ATP-Produktion und führt letztlich zum Zelltod (41).

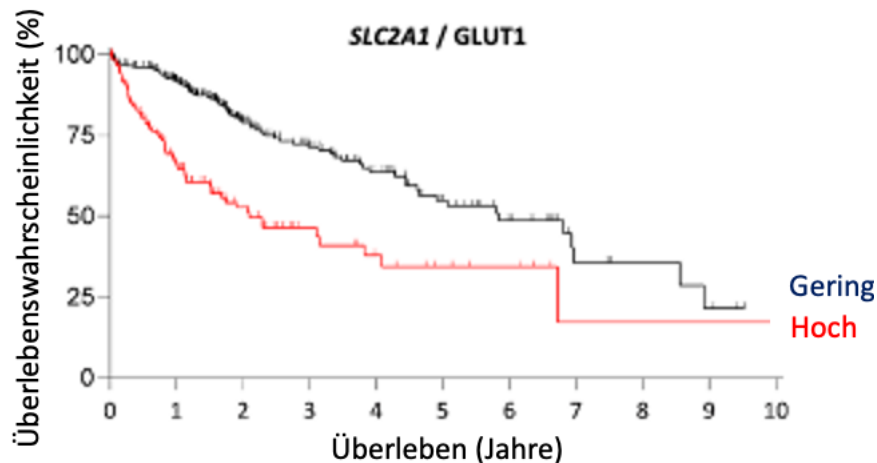


Abbildung 9: Klinische Relevanz des SLC2A1 (74).

Kaplan-Meier-Plot-Analysen der mRNA-Spiegel von SLC2A1 und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit Leberkrebs. Die SLC2A1-Werte wurden als niedrig ($n=243$) oder hoch ($n=122$) eingestuft, wobei ein Cut-off-Wert von 1,71 Fragmenten pro Kilobase Exon pro Million Reads verwendet wurde. Die statistische Analyse wurde mit dem Log-Rank-Test durchgeführt; der P-Wert ist in der Grafik angegeben. Datenquelle: Der Human Protein Atlas (Human Protein Atlas [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org); <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117394-SLC2A1/pathology/liver+cancer>)

1.5.3 Protein-O-GlcNAcylierung bei HCC

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die O-GlcNAcylierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und c-Myc die aerobe Glykolyse („Warburg-Effekt“) im HCC steigert. Hierüber wird die Transkription von GLUT1 sowie der Glykolyseprotein HK2, Phosphofruktokinase (PFK1) und Laktatdehydrogenase (LDHA) gesteigert (75). Diese gesteigerte transkriptionelle Aktivität ist Folge einer durch die O-GlcNAcylierung vermittelte Stabilisierung der Transkriptionsfaktoren und dadurch bedingter nukleärer Akkumulation (76).

Im Einklang damit wurde beim HCC eine Hochregulation der OGT beobachtet, welche mit einer gesteigerten Protein-O-GlcNAcylierung einhergeht (77). Diese Hyper-O-GlcNAcylierung fördert außerdem die Zellproliferation, induziert Apoptose-Resistenz und begünstigt die Metastasierung (78). Letzteres resultiert aus der O-GlcNAcylierung von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin sowie des Signalmoleküls β -Catenin (79, 80). Die O-GlcNAcylierung von E-Cadherin beeinträchtigt dessen Transport an die Zellmembran, wodurch die Ausbildung funktioneller Adhäsionskontakte zwischen Epithelzellen gestört wird. Die resultierende Schwächung der Zell-Zell-Adhäsion begünstigt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und erleichtert die Invasion umliegender Gewebe (80). Gleichzeitig wird β -Catenin durch O-GlcNAcylierung vor seinem proteasomalen Abbau geschützt. Dies geschieht durch eine kompetitive Verdrängung der Phosphorylierung an einem regulatorischen Threoninrest, die normalerweise seine

Ubiquitinierung und Degradation auslöst. Infolge der Stabilisierung akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und transloziert vermehrt in den Zellkern, wo es als Transkriptions-Koaktivator die Expression proliferations- und metastasfördernder Gene (TCF4, LEF1, TCF1) induziert (79). In Übereinstimmung damit korreliert die OGT-Expression auch mit der Tumorgröße, dem Grading und mit einer schlechten Prognose (1).

Eine Hemmung der OGT und damit der Protein-*O*-GlcNAcylierung durch *OSMI-1 hat einen* anti-proliferativen Effekt auf das Wachstum der HCC-Zelllinie HepG2 (81), reaktiviert apoptotische Signalwege und reduziert hierüber die Tumorzell-Viabilität (82). Andere Studien zeigen außerdem, dass eine *OSMI-1*-vermittelte OGT-Inhibition synergistisch mit Immuntherapien (z. B. anti-PD-1 (78)) wirkt. Auch die gleichzeitige Gabe von *OSMI-1* und Metformin (83) oder Chemotherapeutika verstärkt den therapeutischen Effekt gegenüber der jeweiligen Einzelbehandlung (81).

Parallel zur Hochregulation der OGT wird beim HCC auch eine verminderte OGA-Aktivität beobachtet, die auch ursächlich sein kann für die im Tumor beobachtete gesteigerte Protein-*O*-GlcNAcylierung (84).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, potenzielle Effekte einer OGT-Hemmung auf die Viabilität und das Wachstum maligne-transformierter Hepatozyten *in vitro* zu untersuchen und zugrundeliegende molekulare Mechanismen zu identifizieren. Anhand der hier gemachten Beobachtungen sollte eine Second Hit-Strategie gewählt werden, mit dem Ziel die wachstumsinhibierende Wirkung der OGT-Hemmung synergistisch zu verstärken und die Zahl behandlungsresistenter Zellen zu minimieren.

Nachfolgend werden die an Zellkulturen beobachteten Wirkungen der Einzel- und der kombinierten Behandlung an zwei unterschiedlichen HCC-Tiermodellen im Hinblick auf ihre *in vivo* Übertragbarkeit überprüft.

2. Materialien und Methoden

Dieser Abschnitt beschreibt alle in dieser Arbeit angewandten Methoden und die dazugehörigen Materialien.

2.1 Materialien

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits, Reagenzien, Geräte, Primer, Antikörper, Inhibitoren sowie Zelllinien aufgelistet.

Chemikalien und Substanzen	Firma	Katalog-Nr.
16 % Formaldehyde Solution	Thermo	28908
2-Amino-2-norbomanecarboxylic acid (BCH)	Sigma	A7902
Aceton	VWR Chemicals	20.165.323
Acrylamide 4K - Solution (30 %) - Mix 29:1	AppliChem	A0951,1000
Agarose (SeaKem LE Agarose)	Lonza	50004
AGE1	BioLabs	R0552L
Amphotericin B	PAN Biotech	P06-01050
Ampicillin	Carl Roth	K029.1
Antikörperverdünnungspuffer	Wellmed BV	B1-31CW
Ammonium persulfat (APS)	Sigma	A3678
BamHI	BioLabs	R0136S
Bovine Serum Albumine Fraction V (BSA)	Roche	10735108001
cOmplete Tabletten	Roche	11697498001
Crystal Violet	Sigma	C0775
CutSmart Puffer	BioLabs	B7204S
Dako Hematoxylin	Dako	CS700
ECL Western Blotting Substrate	Promega	W1015
Dimethyl sulfoxid	Carl Roth	A994.2
Dimethyl sulfoxid (Braunglas)	Sigma	D2650
DMEM- w.L-Glutamin w/o. Sodium Pyruvate	PAN Biotech	P04-03550
DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX-I	Gibco	31331-028
DMEM/F-12 ohne Glutamin	Sigma	D6421
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Sigma	FG4815
EBSS 1x ohne Phenolrot	gibco	14155-048
EBSS mit Phenolrot	gibco	24010-043
EcoRI	BioLabs	R0101S
Ethyldiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M	Appllichem	131669
Ethanol 96 %	Otto Fischar GmbH	11193427

Ethanol absolute	VWR Chemicals	20821.330
Ethanol euro denatured 70 %	Technisolv	85.825.360
FBS Supreme	PAN Biotech	P30-3031
Fettstift ImmEdge Pen	vector Lab.	H-4000
Glutaraldehyd	Sigma	G7651
Glycerol	Sigma	G6279
Hämatoxylin Lösung	Sigma	GHS316
HBSS (1x)	gibco	14025-050
HD Green Plus DNA Stain	Instas Science Imaging	ISII
Histofix	Carl Roth	P087.3
Hoechst34580	invitrogen	H21486
Isofluran	Piramal	PZN09714675
Isopropanol	Merck	1.096.342.511
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius	6948822.00.0
Kynurenin	Sigma	K8625
L-Glutamic acid γ -monohydroxamate	Sigma	G2253
L-Glutamin	Sigma	G7513
L-Glutamine- ¹³ C	Merck	605166
LB Agar (Lennox)	Sigma	X965.1
LB-Medium (Luria/Miller)	Sigma	X968.2
PrecisionPlus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad	161-0374
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific	SM0403
Mausfutter (Haltung)	ssniff	-
Methanol	VWR Chemicals	20.847.320
MitoTracker Deep Red	invitrogen	M22426
NaCl	Merck	1.06504.1000
Ncol	BioLabs	R0193S
Neo-Clear	Sigma	1.098.435.000
Neo-Mount	Sigma	1.090.160.100
Nhel-HF	BioLabs	R3131S
Normal Goat Serum	vector Laboratories	S-1000
Normal Horse Serum	vector Laboratories	S-2000
Nuklease freies Wasser	Promega	P119E
PBS ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺	gibco	14190-144
Polyethylenglycol (PEG) 300	MedChem	HY-Y0873
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Gibco	15140-122
PNGase-F	Roche	11365 193001
Propidiumiodid	Sigma	P4864
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	5000006
Salzsäure rauchend 37 %	Merck	1.003.172.500
SDS	Sigma	74255
Sybr Green	Promega	A600A
TAE	Appllichem	A1691

TEMED	Sigma	T9281
Triton X-100	sigma	T8787
Trypsin/EDTA (1x) 0,05 %/0,02 %	Cytogen	10-023
Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 %	PAN BioTech	P10-020100
Tryptan blau	Sigma	T8154
Tween 20	Serva	39796.01
Tween 80	MedChem	HY-Y1891
VectaMount	VectaMount	H-5000
Vitro-Clud	R.Langenbrinck GmbH	04-0001
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth	8070.2
Williams Medium E	Sigma	W4128
Xhol	BioLabs	R0146S
Xylol	Sigma	534056

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen.

Kits	Firma	Katalog-Nr.
DAB-Kit	Cell Signaling	8059S
HiSpeed Plasmidkit	Quiagen	12663
Mycoplasmen Set (Venor GeM One Step)	Minery Biolabs	11-8100
Rneasy Mini Kit (250)	Quiagen	74106
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Quiagen	27106
QuantiTect Reverse Transcription Kit (200)	Quiagen	205313
QuantiTect RT Kit (200)	Quiagen	205313
QuiaShredder	Quiagen	79656

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Verbrauchsmaterial/Material	Firma
Ceramic Bead Media 1,4 mm	Omni International
Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm, 1000 mm)	Greiner Cellstar
TC-Schalen 100 Cell+ 1000 mm	Sarstedt AG & Co. KG
6/12-Well Platten	TPP
4-Well Platten (Glas)	ibidi
4-Well Platten (Plastik)	ibidi
6/24/96-Well Platten	Greiner Cellstar
60mm Dish	Cellstar
Abocath-T 24G	Venisystems ICU Medical
Deckglas	Hecht Assistent
Einbettkassetten	CellPath
Falcons (15 ml und 50 ml)	Greiner Cellstar
Hamolten Spritze	Hamilton
Handschuhe S	WRP
35 mm μ -Dish high (Glas)	ibidi
35 mm μ -Dish (Plastik)	ibidi

Impfröhrchen	Falcon
Injekt Luer Solo	Braun
Insulinspritzen rot 0,3 ml U-100	BD-Micro-Fine
IVC-Käfige	zoonlab
Kamm für Gelelektrophorese	Sigma
Kryotubes	Sarstedt AG & Co. KG
Kryotubes bunt	Sarstedt AG & Co. KG
Küvetten	Sarstedt AG & Co. KG
Sterican Kanülen (lila, braun, gelb)	Braun
Linieal	SCHREIB WELT
Luer Lock Solo 3 ml Omnifixv Spritzen	Braun
Dish Glass bottom 60 mm No. 0	MaTek Corporation
Amersham Protran 0,45 µm NC Membran	Cytiva
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems
Microscope Cover Glasses Deckgläser	Marienfeld
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH&Co. KG
Objektträger	KP
Parafilm	amcor
PCR-Ständer	Sarstedt
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Präparationsbesteck	Carl Roth
S1 Kiste	Zarges
Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Schraubröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG
Serumröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG
Spritze (10 ml, 20 ml, 50 ml)	Braun
Sterilfilter 0,2 µm 32 mm	PALL Life Sciences
Sterilisationsband	Carl Roth
Stickstoffhandschuhe	KCL Honeywell
Stripetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturflasche 75 cm ²	TPP
Zellschaber	SPL

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Materialien.

Gerät	Firma	Name
Absauger	Cel Media	Aspir8 basic
Analysewaage	Sartorius	CP153-OCE
BeadRuptor	OMNI International, Inc.	Bead Ruptor 12
Cell Observer	Carl Zeiss AG	Observer.Z1
CO ₂ Kammer	Medres	GasDocUnit
Computer qPCR	Dell by Life Technologies	Optiplex XE2
Confocal-Mikroskop	Carl Zeiss AG	LSM880
Cycler	Eppendorf	Mastercycler gradient

Detektionsgerät	Bio-Rad	ChemiDoc MP
Detektionsgerät	Cytiva	Amersham ImageQuant800
Drucker Kassetten	Primera	Signature
Drucker Objektträger	Primera	Signature
Drucker Spektrometer	Amersham Biosciences	DPU-414
Färbeautomat	Leica	Autostainer XL
Feinwaage	Kern	ACS 320-4
Festplatte	WD-Elements	-
Fluorimeter	Thermo	Fluoroskan Ascent FL
Große Zentrifuge	Hettich	Rotina 420R
Große Zentrifuge	Beckman Coulter	Allegra X-15R Centrifuge
Handykamera	Apple	Iphone 12pro
Heizblock	Eppendorf	ThermoMixer F1.5
Heizkammer	Thermo	HERATherm
Inkubator	Thermo	Heracell 150i
Inkubator für Schnitte	New Brunswick	Galaxy 14 S
Kryotom	Leica	CM3050S
Kühlplatte	Pfmmedical	-
Kühlschrank	Liebherr	MediLine
Laufkammer	Bio-Rad	Subcell GT
LifeCellImaging	Life Technologies	EVOS FI Auto
Magnetrührer	Heidolph	MR3001
Microtom	Leica	HistoCore ultiCut
Mikroskop	Zeiss	Axioscope 5
Mikroskop	Zeiss	AxioVert.A1+AxioCam
Mikroskop	Zeiss	Axio Vert.A1
Mikrowelle	Bosch	-
Mikrowelle	Siemens	-
Minus 80er	VIP ECO Natural Refrigerants	-
Nanodrop	Thermo	2000
Perfusionspumpe	Abimed Gilson	Minipuls 3
Ph-Meter	Mettler Toledo	320
Pipettboy	Eppendorf	Easypet 3
Roller	Stuart	Roller mixer SRT9
Schüttelinkubator	GFL	3031
Serummessgerät	AxonLab _ HORIBA Medical	Pentra 400
Slidescanner	Leica	APERIO AT2
Spektrometer	Amersham Biosciences	Ultrospec 2100 pro
Sterilbank	Labogene	Scanlaf Mars
Stromquelle	Biometra	Standard Power Pack P25
Tierschränke	ZoomLab	-
Ultraschallbad	Elma	Elmasonic S10
Ultraschallstab	Hielscher	UP50H

USB-Stick	SanDisk	-
ViiA7 (2x)	AB applied biosystems	ViiA7
Vortexer	Heidolph	Reax 2000
Waage	Kern	440-49N
Wasserbad	JULABO	TW20
Wasserbad (Microtom)	Leica	HI1210
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5424 R
Zentrifuge 96-Well-Platten	Hettich	Universal 30 RF

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Primer	Spezies	Sequenz (5'-3')
ASCT2	Mensch	fw ¹ : CTC GAT TCG TTC CTG GAT CTT rv ² : GTT CCG GTG ATA TTC CTC TCT TC
ASCT2	Maus	fw ¹ : CTGCCTGTGAAGGACATCTCCT rv ² : CTCGGCATCTTGGTTCGATCCA
Glut1	Mensch	fw ¹ : TTGCAGGCTTCTCCAAGTGGAC rv ² : CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG
HPRT1	Mensch	fw ¹ : GCG TCG TGA TTA GCG ATG ATG AAC rv ² : CCT CCC ATC TCC TTC ATG ACA TCT
LAT1	Mensch	fw ¹ : GCCACAGAAAGCCTGAGCTTGA rv ² : ATGGTGAAGCCGATGCCACACT
SNAT1	Mensch	fw ¹ : CTTTGGAGCCACCTCTCTACAG rv ² : ACCAGGCTGAAAATGTCTCTTCC
SNAT2	Mensch	fw ¹ : AGCCAACAGCTCTTGTACTCTGC rv ² : GGAAGAACAGCAGGATGACAGAC

Tabelle 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer der Firma Eurofins.

Zelllinie / Bakterien	Firma	Kat.-Nr.
E.coli(StellarCompetentCells)	TaKaRa	ST0213
Hepa1-6	ATCC	1830
HepG2	Japanese Collection of Research Biore-sources Cell Bank	JCRB1054
Huh7	Japanese Collection of Research Biore-sources Cell Bank	JCRB0403
MiaPaCa-2	ATCC	CRL-1420

Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme.

Inhibitor	Firma	Katalog-Nr.	Konzentration ³
BPTES	Merck	5.300.300.001	20 µM
DON	Sigma	D2141	50 µM
Ferrostatin	Sigma	SML0583	5 µM

¹ forward² reverse³ Verwendete Konzentration im Experiment

LDC 7559	MedChem	HY-111674	1/5 μ M
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma	A9165	1 mM
Nec1s	BioVision	2263-5	10 μ M
O-Benzyl-L-Serin (BS)	Thermo Scientific	B22393.06	20 mM
OSMI-1	Abcam	ab235455	20 μ M
OSMI-1	MedChem	HY-119738	20 μ M
STF-31	Sigma	SML-1108	1 μ M
V-9302	MedChem	HY-112683	5 μ M/10 μ M
zVAD	Merck	627610	25 μ M

Tabelle 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.

Erstantikörper	Firma	Katalog-Nr.	Konz. ⁴	Spezies
Anti-Na/K ATPase	Sigma	A276	1:100	Maus
ASCT2 (V501)	Cell Signaling	5345S	1:2000/1:100	Kaninchen
B220	BDBiosciences	553084	1:1000	Kaninchen
CD3	Cell Signaling	78588	1:1000	Kaninchen
Collagen IV	Cedarlane	CL50451AP	1:300	Kaninchen
CTD110.6	BioLegend	838004	1:2000	Maus
F4/80	abcam	Ab6640	1:300	Kaninchen
Glut 1	MyBioSource	MBS179154	1:100/5000	Kaninchen
Glutaminsynthetase (GS)	Sigma	G2781	1:5000	Kaninchen
LAT1	MyBioSource	MBS8291984	1:100	Kaninchen

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper.

Zweitantikörper	Firma	Katalog-Nr.	Konz. ⁴
Ziege anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt	Jackson	115-165-205	1:200
Ziege anti-Kaninchen igG, FITC-gekoppelt	Jackson Corp.	711-096-152	1:200
Pferd-anti-Kaninchen-HRP	Vector Laboratory	30026	1:10.000
Esel anti-Kaninchen-HRP	Sigma	AP182P	1:10.000
Ziege anti-Maus-HRP IgG	BioRad	1706516	1:10.000
Ziege anti-Maus-HRP IgM	BD Pharmingen	550588	1:10.000

Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.

⁴ Verwendete Verdünnung.

2.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden beschrieben.

2.2.1 Kultivierung und Isolation von Zellen

Für *in-vitro*-Versuche wurden die immortalisierten murinen HCC-Zelllinien Hepa1-6 in den Passagen 7 bis 30 sowie die humanen Hepatomazelllinien Huh7 (Passagen 25 bis 50) und HepG2 (Passage 20 bis 45) verwendet. Die Kultivierung und Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach etablierten Protokollen mit den in der Tabelle 10 beschriebenen Medien.

Zelllinien	Medien und Zusätze
Huh7	DMEM/Ham's F-12 (1:1)
	FBS Supreme
HepG2	DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX-I
	FBS Supreme
Hepa1-6	DMEM w. L-Glutamin w/o. Sodium Pyruvate
	FBS Supreme
	PenStrep
MiaPaCa-2	DMEM w. L-Glutamin w/o Sodium Pyruvate
	FBS Supreme
Kryomedium	DMEM/Ham's F-12 (1:1)
	FBS Supreme
	Dimethyl sulfoxid

Tabelle 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen und dazugehörige Kultivierungsmedien.

Für die Expansion wurden die Zellen in Kulturflaschen in dem zuvor beschriebenen Kulturmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach Erreichen der gewünschten Dichte (70 % Konfluenz) wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %, 1×) für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 vom Substrat gelöst. Die Trypsinisation wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens an Kulturmedium neutralisiert. Zur Passagierung wurde die Zelllösung im Verhältnis 1:5 mit frischem Medium verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt.

Hepatozyten Isolation

Die Isolation der Hepatozyten aus Mäusen erfolgte nach einer etablierten Zweischnitt-Kollagenaseverdau-Methode (85). Verwendet wurde ein 6 Wochen altes Wildtyp (GSDMD-KO wt, GSDME-KO wt) Weibchen der Linie 9408 (Projekt: O50/20) und zusätzlich zwei Wildtyp Weibchen der Linie 1976 (GsdmD-D88A wt) im selben Alter (Projekt: O50/20).

Zur Vorbereitung wurden 6-Well-, 24-Well- und 10 cm-Kulturgefäße mit aus Rattenschwänzen gewonnenem Kollagen (bereitgestellt durch die technische Assistentin Stephanie Linder) beschichtet und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zunächst wurden die Tiere durch CO₂-Überdosierung euthanasiert. Nach Freilegung der Vena cava inferior wurde in ihr ein Venenverweilkatheter platziert und die Leber bei 37 °C mit Lösung I (Tab. 11) in einer Geschwindigkeit von 4 ml pro Minute für 5 Minuten perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Lösung II (Tab. 11) unter gleichen Bedingungen. Nach Entnahme der Leber wurde das Gewebe unter sterilen Bedingungen mithilfe eines Zellschabers mechanisch vereinzelt, durch einen Cell Strainer (70 µm) filtriert und die Zellen dreimal mit je 15 ml William's E Medium bei 500×g und 4 °C gewaschen.

Die Hepatozyten wurden anschließend in 10 ml Kulturmedium (Tab. 11) resuspendiert, mittels Neubauerzählkammer gezählt und in einer Zelldichte von 1,5 Millionen Zellen/Platte (10 cm Platte), 300.000 Zellen/Well (6-Well Platte) bzw. 150.000 Zellen/Well (24-Well Platte) ausgesät und nach Adhäsion mit frischem Medium versorgt.

Puffer/Medien	Bestandteile
Perfusionslösung I	EBSS ohne Ca/Mg, 0,5 mM EDTA
Perfusionslösung II	EBSS mit Ca/Mg, 10 mM HEPES, 0,02 % Kollagenase II (m/v) 0,004 % Trypsin Inhibitor (m/v)
William's E Medium	10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin

Tabelle 11: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien für die Hepatozyten Isolation.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzählung wurde eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau hergestellt. Davon wurden 10 µL auf eine Neubauer-Zählkammer (Abb. 10) pipettiert. Die vitalen (ungefärbten) und nicht-vitalen (blau gefärbten) Zellen wurden unter dem

Mikroskop differenziert und die Anzahl vitaler Zellen in vier großen Quadraten ausgezählt (Abb. 10). Die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat wurde berechnet und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, die Zellkonzentration pro Milliliter wie folgt bestimmt:

$$\left(\frac{a+b+c+d}{4} \right) = x * 10 * 10^4 / ml.$$

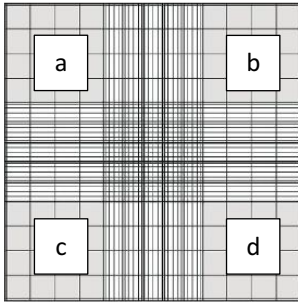


Abbildung 10: Darstellung der Neubauer Zählkammer(86).

2.2.3 Koloniebildungsassay

Mithilfe des Koloniebildungsassays wird die Proliferation von Tumorzellen über einen langen Beobachtungszeitraum gemessen. Durch Aussaat einer geringen Anzahl von Zellen auf einer großen Wachstumsfläche, können die aus identischen Klonen hervorgegangenen Kolonien quantifiziert werden (87).

Für die Koloniebildungsassays wurden 100 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach einer Kultivierungsdauer von 2 bis 3 Stunden waren die Zellen adhärent und das Medium wurde durch frisches Medium ohne oder mit den jeweils angegebenen Substanzen ersetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Bildung mikroskopisch klar erkennbarer Kolonien. Der Zeitraum variiert je nach Zelllinie (bis 20 Tage). Die jeweilige tatsächliche Kultivierungsdauer ist in den entsprechenden Abbildungen angegeben und im korrespondierenden Text beschrieben.

Am Ende der Kultivierung wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen und anschließend mit 1 ml Crystal Violet-Lösung (0,5 % in 6 % Glutaraldehyd) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und gefärbt. Die Platten wurden zweimal mit je 2 ml Leitungswasser gespült und anschließend in ein mit Leitungswasser gefülltes Becherglas getaucht. Die gewaschenen Platten wurden über Nacht getrocknet und anschließend mit einem Flachbett-Scanner gescannt. Die Bilder wurden nachfolgend mit ImageJ quantifiziert. Hierfür wurden die Bilder in binäre Masken überführt und nachfolgend die

Summe aller Pixelintensitäten gebildet. Die Werte in den mit den jeweiligen Substanzen behandelten Zellen sind dabei immer relativ angegeben zu denen der jeweiligen Kontrolle.

2.2.4 Fluorimetrische Zelldichtemessung

Für die Fluoreszenz-basierte Zellquantifizierung wurden $1,2 \times 10^4$ Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen experimentell für den jeweils angegebenen Zeitraum behandelt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und für 3 Minuten mit frisch hergestelltem 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 Minuten mit Hoechst34580 (1:5000 in PBS, Endkonzentration 0,2 µg/ml) unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 500 µl PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) pro Well zugegeben. Zur Erfassung der Hintergrundfluoreszenz wurde pro Platte ein Well ohne Hoechst34580 inkubiert.

Die Fluoreszenz wurde mit dem Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) unter Verwendung der Ascent Software (Exzitationsfilter 380 nm, Emissionsfilter 460 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals.

2.2.5 Mikroskopie

In dieser Arbeit wurden lichtmikroskopische Untersuchungen mit unterschiedlichen Mikroskopen und Mikroskopiertechniken durchgeführt.

Life-Cell-Imaging-Mikroskopie

Für die Langzeitbeobachtung lebender Zellen (mehrere Stunden bis Tage) wurde das vollautomatisierte EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific) Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop mit dazugehöriger Software ‚EVOS FL Auto 2‘ des Herstellers verwendet. Bei der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wird das gesamte Sichtfeld gleichzeitig und gleichmäßig ausgeleuchtet, wobei die gesamte Fluoreszenz - sowohl aus der Fokusebene als auch aus darüber- und darunterliegenden Schichten - detektiert wird. Daher eignet sich diese Methode insbesondere für die Analyse von Zellkulturen und dünnen Gewebeschnitten

bei niedrigerer Vergrößerung (88). Aufnahmen wurden mit einem Luft-20x Plan-Achromat-Objektiv gemacht. Dabei wurden Filter für die Exzitation und Emission verwendet, welche die Transmission von Licht der Wellenlängen 540-590 nm bzw. 580-630 nm erlaubten. Zusätzlich wurde ein Phasenkontrast-Hellfeldbild erzeugt. Die Zellen wurden während des gesamten Beobachtungszeitraums unter sterilen Bedingungen in einer Inkubationseinheit kultiviert und kontinuierlich mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C unter Verwendung des ibidi Gas Mixers versorgt.

Weitfeldfluoreszenzmikroskopie

Die Analyse fixierter und lebender Zellen wurde mit dem Weitfeldfluoreszenzmikroskop Cell Observer Z.1 (ZEISS) durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Objektive zum Einsatz, darunter ein LD LCI Plan-Apochromat 25x/0,8 Imm Korr DIC M27 mit Wasser als Immersionsmedium sowie Trockenobjektive mit 20x und 5x Vergrößerung. Die Bilder wurden mit einer AxioCam MR3 Kamera aufgenommen. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilddaten erfolgte mithilfe der ZEN blue Software (Version 3.7, ZEISS).

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird das Fluoreszenzsignal punktwise mit einem fokussierten Laser abgetastet, wobei ein Pinhole-Blenden-System außerhalb der Fokusebene liegendes Licht ausschließt. Dadurch entsteht ein kontrastreiches Bild mit hoher optischer Auflösung und geringer Hintergrundfluoreszenz. Diese Technik eignet sich besonders für dickere Proben und ermöglicht auch die Erstellung von Bilderstapeln für die Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen (89).

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde mit einem LSM 880 Mikroskop (ZEISS) durchgeführt. Zur Anregung der Fluorochrome wurden Laser der Wellenlängen 405, 488 und 543 nm verwendet. Die Emissionsfilter wurden entsprechend der Referenzdaten für DAPI, FITC und Cy3 gesetzt. Für alle Aufnahmen wurde ein Plan-Apochromat 40x/1,3 Öl-Immersionsobjektiv verwendet. Die Erfassung und Weiterverarbeitung der Bilddaten erfolgte mithilfe der Software ZEN black (Version 2.3, SP1, ZEISS).

Super-Resolution-Structured-Illumination-Mikroskopie

Super-Resolution-Structured-Illumination-Mikroskopie (SR-SIM) ermöglicht die Auflösung der Lichtmikroskopie über die Beugungsgrenze hinaus zu steigern. Dies wird durch strukturierte Beleuchtung und computergestützte Rekonstruktionstechniken möglich (90).

SR-SIM wurde mithilfe eines ELYRA PS.1-Mikroskops (ZEISS) durchgeführt. Die Proben wurden auf dem ELYRA-Mikroskop positioniert und die Bildakquisition erfolgte unter Verwendung eines Alpha Plan-Fluar 100x/1.45 M27 Öl-Immersionsobjektivs und Immersionsöls vom Typ 518 F/30 °C (ZEISS). Die Bilder wurden mithilfe der Software ZEN black (Version 3.7 Software, ZEISS) aufgenommen und entsprechend den Angaben des Herstellers prozessiert (90).

2.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Viabilität

Die Vitalität kultivierter Huh7-Zellen wurde mithilfe des EVOS FL Auto Life-Cell-Imaging Mikroskops bestimmt. Hierfür wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen auf 4-Well-Glas-Objektträgern der Firma ibidi ausgesät. Zuvor wurden die Objektträger für 30 Minuten mit FBS Supreme inkubiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die adhärennten Zellen, wie in der jeweiligen Abbildung angegeben, experimentell behandelt. Zusätzlich wurde der Kernfarbstoff Propidium Iodid (PI), welcher die Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren kann, in einer Verdünnung von 1:500 in die Wells gegeben und die Aufnahme unmittelbar danach gestartet. Pro Well wurden in einem 10-Minuten Intervall über den gesamten jeweils angegebenen Beobachtungszeitraum Aufnahmen in vier unterschiedlichen Bereichen eines jeden Wells gemacht. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden ein Video und Einzelbilder durch die Software generiert. Die Fluoreszenzintensitäten im Zeitverlauf wurden quantitativ mithilfe von ImageJ ausgewertet. Bezogen wurde die Zunahme im Zeitverlauf auf das Startbild. Es wurde aus mehreren Bildern zum selben Zeitpunkt der Mittelwert gebildet und diese Werte graphisch dargestellt.

In einem unabhängigen experimentellen Ansatz wurde die Viabilität der Zellen durch Färbung mit den Farbstoffen PI und Hoechst34580 bestimmt. Dafür wurden die Zellen wie unter 1.8.3 beschrieben ausgesät und experimentell behandelt. Anschließend wurde dem Medium PI in einer Verdünnung von 1:500 für 30 Minuten zugefügt. Nach

15 Minuten wurde zum Inkubationsmedium zusätzlich Hoechst34580 (1:5000) hinzugegeben und die Zellen für weitere 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen und 1 ml PBS auf die Zellen gegeben und mithilfe des Cell Observers von Zeiss untersucht.

2.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Aufnahme von Kynurenin

Nach der Kultivierung und experimentellen Behandlung der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und durch 300 μ l HBSS ersetzt. Zur experimentellen Kontrolle wurde einer der Proben 10 mM BCH, ein spezifischer Inhibitor des LAT1-Transporters, zugesetzt. Anschließend wurde Kynurenin in einer Endkonzentration von 200 μ M appliziert, wodurch sich das Gesamtvolumen pro Schale auf 400 μ l erhöhte. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten wurde die Aufnahme von Kynurenin durch Zugabe von 4 % Paraformaldehyd (präpariert durch Mischen von 10 ml 16 % Formaldehyd mit 30 ml PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gestoppt und die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS+0,5 % BSA gewaschen, mit 1 ml PBS benetzt und mithilfe des Cell Observers von Zeiss analysiert.

2.2.5.3 Immunfluoreszenzanalysen

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen wurden in definierter Zellzahl (MatTek 3.5 cm²: 1.25x9.6 cm² = 12x10⁴ Zellen/Schale) in glasbodigen MatTek-Schalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen experimentell behandelt und am Ende der Inkubationszeit einmal mit eiskaltem PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit eiskaltem Methanol fixiert.

Es folgten drei Waschschrte mit PBS sowie eine 30-minütige Permeabilisierung mit 5 % BSA in PBS+0,1 % Triton X-100. Der primäre Antikörper wurde in 5 % BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und der sekundäre Antikörper für 1 Stunde zugegeben. Nach abschließenden Waschschrten wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.2.6 Mausexperimente und Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) der Heinrich-Heine-Universität gehalten. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung und wurden bei einer Umgebungstemperatur von 20 bis 24 °C und einem 12 Stunden Licht- und 12 Stunden Dunkelzyklus gehalten. Gepflegt wurden die Tiere entsprechend den Bestimmungen der EU-Richtlinie 2010/63/EU. Alle durchgeführten Tierversuche wurden zuvor vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (AZ: 81-02.04.2020.A017). Sowohl die Tiere für den HDI-Versuch (C57BL/6J - männlich) als auch die Tiere für den Allograft-Versuch (Balb-c/nu - männlich) wurden bei der Firma Janvier im Alter von 5 bis 6 Wochen bestellt.

2.2.6.1 Das Allograft-Modell

Zum Erzeugen eines Allograft-Modells wurden 6 Wochen alten Balb/c-nu Mäusen (Firma Janvier) je 1 Millionen Hepa1-6-Zellen in 50 µl PBS subkutan durch Injektion in die Flanke unter sterilen Bedingungen transplantiert. Nachfolgend wurden die Tiere für 3 Wochen weitergehalten und einmal wöchentlich in Augenschein genommen sowie gewogen.

2.2.6.2 Das HDI-Modell

Den 6 Wochen alten C57BL/6J Mäusen (Firma Janvier) wurden zu Erzeugung eines HCCs durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion (HDI) die Okogene c-myc und Nras^{G12} in Kombination mit der Transposase SB13 injiziert.

Hierfür wurden die Tiere mit Isofluran in einer Narkosekammer narkotisiert und nachfolgend das Onkogen/ Transposase-Gemisch appliziert. Einer 20 g schweren Maus wurden 25 µg des Onkogen-Plasmides und 5 µg der Transposase intravenös in 2 ml isotonischer Kochsalzlösung über die Schwanzvene injiziert.

Generierung der Plasmide

Die verwendeten Plasmide stammen aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. Lars Zender aus dem Department of Internal Medicine VII des Universitätsklinikums Tübingen, Deutschland und wurden von Herrn Dr. Mirco Castoldi zur Verfügung gestellt.

Zur Vermehrung der Plasmide wurden *E. coli* Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 40 µl kompetente Bakterien mit 3 µl Plasmid auf Eis gemischt, 45 Sekunden bei 42 °C inkubiert, anschließend 1 Minute auf Eis gekühlt und mit 250 µl LB-Medium (Luria/Miller) versetzt. Zur Herstellung des LB-Mediums wurden 25 g LB-Pulver in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend durch Autoklavieren sterilisiert. Nach kurzem Durchmischen der Plasmide mit dem LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C und 800 rpm. LB-Agar-Platten (Lennox) wurden mit flüssigem, warmen Agar (Ampicillin 1:1.000) begossen und bei 37 °C für 30 Minuten ausgehärtet. Auf dem abgekühlten Agar wurden 150 µl der Transformanten-haltigen Lösung ausgestrichen. Die Platten wurden nachfolgend über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Herstellung des LB-Agar-Mediums wurden 35 g LB-Agar-Pulver in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und vor der Verwendung in der Mikrowelle verflüssigt.

Am Folgetag wurden pro Plasmid drei gewachsene Kolonien ausgewählt und mit sterilen Pipettenspitzen in 4 mL LB+Ampicillin (1:10.000) inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum erfolgte die Plasmid-Isolierung mittels Qiagen MiniPrep-Kit nach Herstellerprotokoll (2 ml Kulturvolumen). Das Plasmid wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und die Konzentration per Nanodrop bestimmt.

Zur Verifikation der erfolgreichen Klonierung wurde ein Restriktionsverdau angesetzt (1 µg Plasmid+2,5 µl 10× CutSmart-Puffer+1 µl Enzym(e)), um das Vorhandensein des Inserts sowie dessen korrekte Integration in Bezug auf Länge und das Ausbleiben unerwünschter Rekombinationsereignisse zu überprüfen (Inkubation: 1,5 Stunden bei 37 °C). Die Produkte wurden in einem 1,5 % Agarosegel analysiert (125 V, 1 Stunde); 12 µl MassRuler DNA Ladder dienten als Marker. Das Gel wurde mit einem BioRad-Gerät (ChemDoc) dokumentiert. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde anschließend für 4 Minuten bei 880 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 5 µl HD Green-DNA-Farbstoff

zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend in eine Gießform mit eingesetzten Kammstücken überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur aushärten gelassen.

Für die MaxiPrep wurde die Probe mit der höchsten Plasmid-Konzentration gewählt. Die verbliebenen 2 ml Kultur wurden in 500 mL LB+Ampicillin (1:1.000) inokuliert (1 l Erlenmeyerkolben) und über Nacht (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (5.000 rcf, 10 Minuten) wurde die Präparation nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Plasmid wurde in 700 µL nukleasefreiem Wasser resuspendiert, die Konzentration gemessen und ein erneuter Testverlauf durchgeführt.

2.2.6.3 Experimentelle Behandlung der Tiere

Beim Allograft-Modell wurden 10 Tage nach Injektion der Zellen die Substanzen OSMI-1 und/oder V-9302 oder das Solvenz intraperitoneal injiziert. Die verabreichte Menge richtete sich dabei nach dem Körpergewicht der Maus und betrug bei OSMI-1 5 mg/kg Körpergewicht (KG) und bei V-9302 30 mg/kg/KG. Diese Verabreichungsmengen wurden bereits in der Literatur beschrieben (81, 91). Gelöst wurden die Inhibitoren jeweils in 10 % DMSO, 40 % PEG300, 5 % Tween80 und 45 % isotonischer Kochsalzlösung. Hierbei handelt es sich um das vom Hersteller (MedChem) empfohlene Lösungsmittel für die *in vivo*-Verwendung der Inhibitoren. Die Behandlung erfolgte dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen (Abb. 11). Zur Dokumentation des Tumorstwachstums wurde die Größe der Tumore mithilfe eines angelegten Lineals gemessen. Am Ende des Behandlungszeitraums bzw. beim Erreichen definierter Endpunkte (Tumor > 1,5 cm) wurden die Tiere durch CO₂-Überdosierung in einer dafür vorgesehenen Kammer euthanasiert und das Serum, die Leber und der subkutane Tumor entnommen. Zusätzlich wurde das Gewicht der Tiere, der Lebern und der Tumore bestimmt und das Volumen des Tumors mittels Volumetrie in einem 50 ml Messkolben ermittelt. Zur genaueren Dokumentation wurden Bilder der toten Tiere, der Lebern und der entnommenen Tumore aufgenommen.

Bei dem HDI-Modell wurde vier Wochen nach Injektion der Plasmide mit der intraperitonealen Injektion von OSMI-1, V-9302 bzw. dem Solvens begonnen. Die verabreichte Menge von OSMI-1 und V-9302 und auch das Vorgehen im Hinblick auf das Lösen der Substanzen, dem ‚Scoring‘ und der Euthanasierung der Tiere war identisch wie vorstehend beim Allograft-Experiment beschrieben (Abb. 11). Entnommen wurden Serum,

Leber, Niere, Darm und Milz der Tiere. Zusätzlich wurde das Gewicht der Tiere und der Lebern bestimmt. Zur genaueren Dokumentation wurden Bilder der entnommenen Lebern aufgenommen.

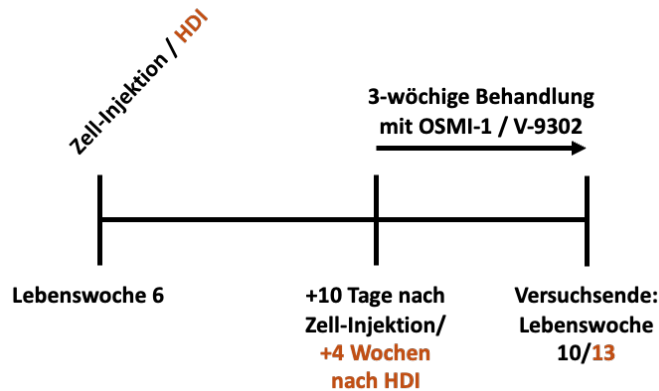


Abbildung 11: Versuchsablauf des Allograft- und HDI-Versuchs.

Die Experimente wurden im Alter von 6 Wochen begonnen. Im Allograft-Versuch erfolgte eine subkutane Zellinjektion, im HDI-Versuch die intravenöse Applikation onkogener Plasmide via Hydrodynamischer Injektion in die Schwanzvene. Die Behandlung mit den Inhibitoren OSMI-1 und/oder V-9302 bzw. Kontrolle begann 10 Tage nach Zellinjektion bzw. 4 Wochen nach HDI und erfolgte dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die Euthanasie erfolgte im Alter von 10 Wochen (Allograft) bzw. 13 Wochen (HDI).

2.2.6.4 Serum-Messung

Im Rahmen der Organentnahme wurde *post mortem* Blut aus der *Vena cava inferior* gewonnen und in Serumröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 Minuten wurde der Serumüberstand in beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Analyse im Serumanalysegerät Pentra 400 (HORIBA) wurden die Proben im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 mit 0,9 % NaCl (isotonisch) verdünnt. Die bestimmten Serumparameter sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Parameter	Abkürzung	Einheit
Alanin-Amino-Transferase	ALT	U/l
Albumin	Alb	g/dl
Alkalische Phosphatase	ALP	U/l
Aspartat-Aminotransferase	AST	U/l
Glutamatdehydrogenase	GLDH	U/l
Bilirubin	Bili	mg/dl
Urea	-	mmol/l
Kreatinin	-	μmol/l

Tabelle 12: Gemessene Serumparameter und entsprechende, vom Analysegerät, verwendete Abkürzungen und Einheiten.

2.2.6.5 Organeinbettung in Paraffin

Das jeweilig entnommene Organ wurde in beschriftete Einbettkassetten überführt und für 48 Stunden in 4 % Paraformaldehyd (Histofix) fixiert. Anschließend erfolgte die Lagerung der fixierten Proben bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei 4 °C. Zur Gewebekonservierung wurden die Proben anschließend dehydriert und in Paraffin eingebettet, um die Schnittfähigkeit und Langzeitstabilität zu gewährleisten. Durchgeführt wurde dieser Prozess von der technischen Assistentin Claudia Rupprecht.

2.2.6.6 Herstellen von Gewebeschnitte

Die Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte heruntergekühlt und anschließend mit einem Mikrotom in 3 μm dünne Schnitte geschnitten. Diese wurden in ein temperiertes Wasserbad überführt, auf zuvor beschriftete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator getrocknet.

2.2.6.7 Färben der Paraffinschnitte

Die Färbungen wurden entweder manuell oder mithilfe eines Färbeautomaten durchgeführt. Für Hämatoxylin Gegenfärbung kam der Autostainer XL (Leica Biosystems) zum Einsatz. Immunhistochemische (IHC) Färbungen wurden zusätzlich unter Verwendung des vollautomatischen Färbesystems BOND (Leica Biosystems) durchgeführt.

IHC-Färbung

Die getrockneten und entwässerten Gewebeschnitte wurden zur Antigendemaskierung (Heat-Induced Epitope Retrieval, HIER) für 30 Minuten in einem auf 98 °C erhitzten EDTA-Puffer inkubiert. Der Puffer enthält 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Tween 20 in destilliertem Wasser und wird auf pH 9 eingestellt. Die Schnitte wurden anschließend für 20 Minuten in diesem Puffer bei Raumtemperatur abgekühlt. Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Fettstift umrandet und in destilliertem Wasser gelagert.

Endogene Peroxidasen wurden durch 10-minütige Inkubation der Schnitte in einer Peroxidase-Blockierungslösung inaktiviert. Es folgten drei jeweils 5-minütige Waschschriffe mit TBS-T-Puffer (engl. Tris-buffered saline with Tween 20). Hierbei handelt es sich um einen Puffer, welcher 20 mM Tris, 150 mM NaCl und 0,05 % (v/v) Tween 20 in destilliertem Wasser enthält. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen wurden anschließend je 100 µl einer 5%igen Pferdeserum-Lösung in „Antikörperverdünner“ (im Kit enthalten) auf die Schnitte gegeben und diese 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurde der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tab. 8) in Antikörperverdünner über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten in der feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde das farblose Chromogen DAB verwendet, das durch am Sekundärantikörper gekoppelte HRP oxidiert wird (92). Dies führt zur Bildung eines braunen Niederschlags im Bereich der Antikörperbindung. Die Färbereaktion wurde mikroskopisch beobachtet und nach gut erkennbarer Färbung durch Spülung in destilliertem Wasser gestoppt.

Es folgte eine blaue Gegenfärbung der Zellkerne durch zweimaliges kurzes Eintauchen in Hämatoxilin und Abspülen für 2,5 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (Tab. 15) und wie oben beschrieben eingedeckt.

Die automatisierte IHC-Färbung erfolgte nach dem gleichen Prinzip mithilfe des BOND-Systems (Leica Biosystems) mit der Ausnahme, dass anstelle von lipophilem Xylol

das hydrophile Reagenz NeoClear verwendet wurde. Die automatisiert gefärbten Präparate wurden mithilfe des vom Automaten vorgesehenen kompatiblen Mediums eingedeckt.

2.2.7 Proteinisolation

Für die Extraktion von Proteinen wurden die kultivierten Zellen auf Eis gelagert und dreimal mit eiskaltem PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von RL-Puffer (Tab. 18, zusätzlich frisch mit 1 Tablette cComplete™ Proteaseinhibitor pro 50 ml Puffer versetzt) mit einem Zellschaber abgelöst und in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die zugegebene Menge des RL-Puffers variierte abhängig von der Größe der verwendeten Zellkulturgefäße. Für eine 10 cm Zellkulturschale wurden 300 µl Puffer eingesetzt, während für eine 6-Well-Platte 150 µl pro Well verwendet wurden. Tiefgefrorenes Gewebe wurde mit vier bis fünf Keramikkügelchen in Schraubröhrchen überführt, mit 600 µL RL-Puffer (inkl. cComplete™) versetzt und durch starkes Schütteln durch den BeadRuptor (25 Sekunden, mittlere Intensität) lysiert.

Die jeweils hergestellten Lysate wurden auf Eis zwischengelagert und dreimal für jeweils 3 Sekunden mit einem Ultraschallstab behandelt, um Zell- und Endomembranen in Lösung zu bringen. Zwischen den Ultraschallvorgängen wurden die Zellen auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 rcf für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet und das die ungelösten Bestandteile enthaltende Pellet verworfen.

Substanz	Menge (ad 200 ml ddH ₂ O)	Endkonzentration
Tris	2 ml	20 mM
NaCl	5,6 ml	140 mM
NaF	0,084 g	0,42 g/l
Na-Pyrophosphat (10xH ₂ O)	0,880 g	4,4 g/l
EDTA	400 µl	2 mM
EGTA	400 µl	2 mM
Na-Vanadat (ortho-vanadat)	0,040 g	0,2 g/l
β-Glycerophosphat	0,880 g	4,4 g/l

Tabelle 13: Zusammensetzung des Proteinlyse-Puffers (RL-Puffer).

2.2.8 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben wurden die jeweiligen Lysate 1:200 mit Bradford-Reagenz in Einwegküvetten verdünnt und die Absorption bei 595 nm in einem UV-VIS-Spektrometer gemessen. Jede Probe wurde im Triplikat gemessen. Die Absorption wurde durch vorherige Bestimmung eines Blanks (Bradford-Reagenz ohne Probenzugabe) hintergrundbereinigt.

Mithilfe einer Eichgeraden, die durch Verwendung definierter Proteinmengenstandards hergestellt wurde, wurden die zu den Absorptionswerten korrespondierenden Proteinkonzentrationen der Lysate in μg pro μl berechnet.

2.2.9 Western-Blot-Analyse

Zur Auftrennung der in den Proteinproben enthaltenen Proteinspezies wurde eine Sodi-umdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Da Sodi-umdodecylsulfat (SDS) die Eigenladungen der unterschiedlichen Proteinspezies maskiert, erfolgt bei der Gelelektrophorese die Auftrennung der Proteinspezies entsprechend ihrer Molekülmassen (93). Pro Probe wurden in Abhängigkeit des zu detektierenden Antigens zwischen 20 und 80 μg Protein mit 20 μL SDS-Laufpuffer+Dithiothreitol (DTT) versetzt und 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der SDS-Laufpuffer enthält 3,6 % SDS, 10 % Glycerol, 0,1 M Tris (pH 6,8), 0,12 % Bromphenolblau und destilliertes Wasser. Nachdem die Proben kurz (3 Sekunden) runterzentrifugiert wurden, wurden sie in die Taschen eines frisch hergestellten Polyacrylamidgels (Tab. 19) geladen. Gegebenenfalls wurden die Proben vor der Denaturierung mit PNGase F behandelt. Dazu wurden die Proben zunächst auf eine einheitliche Proteinmenge eingestellt und mit RL-Puffer auf ein Endvolumen von 30 μl angepasst. Anschließend wurden pro Probe 3 μl PNGase F zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde und 30 Minuten bei 37 °C. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Proben gemäß dem beschriebenen Protokoll denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde entsprechend dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins gewählt. Zur Glättung der Oberfläche wurde das Trenngel nach Befüllen der Kammer mit Isopropanol überschichtet und nach erfolgter Polymerisation durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem

Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet, in das bis zum Aushärten des Gels ein Kamm eingesetzt wurde.

Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und diese mit Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS in destilliertem Wasser) befüllt. Die Proben wurden mithilfe einer Hamilton-Spritze in die Gel-Taschen gegeben. Zusätzlich wurde ein Protein-Marker als Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 90 V gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde sie auf 140 V erhöht und dort belassen, bis die Lauffront im Gel den unteren Gelsaum erreicht hatte.

Substanz	10%iges Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	1,9 ml	0,66 ml
30 % Acrylamid Mix	1,7 ml	0,17 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,13 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,01 ml
10 % APS	0,05 ml	0,001 ml
TEMED	0,002 ml	0,001 ml

Tabelle 14: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die Western-Blot-Analyse.

Das Gel wurde nachfolgend nach dem Semidry-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dafür wurde ein Stapel Whatman-Papier, durchtränkt mit Transferpuffer (0,3 % SDS, 485 mM Tris und 190 mM Glycin in destilliertem Wasser), in die Blotkammer gelegt und darauf die in Wasser aktivierte und mit Transferpuffer benetzte Membran platziert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt, mit weiterem Whatman-Papier bedeckt, eingeschlossene Luftblasen durch Anpressen der Membran mit einem Roller entfernt und die Kammer dann verschlossen. Danach wurde eine Spannung von 0,8 mA/cm² Membranfläche (Länge × Breite × 0,8 mA) für 1:40 Stunden angelegt.

Anschließend wurde die Membran, um sie möglichst vollständig mit Protein abzusättigen und unspezifische Anlagerungen der Antikörper-Proteine an die Membran zu vermeiden, 30 Minuten in 5 % BSA in TBS-T (200 mM Tris und 1,5 M NaCl in destilliertem Wasser, pH 7,6) geblockt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (in 5 % BSA/TBS-T) inkubiert. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 90 Minuten mit dem Sekundärantikörper (ebenfalls 5 % BSA/TBS-T) bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurde die Membran mit einer 1:1-Mischung des ECL Western Blotting Substrats (Promega) benetzt und mittels Amersham ImageQuant800 (Cytiva) digital detektiert. Die Chemilumineszenz wurde mit Image Lab-Software densitometrisch ausgewertet.

Die Beladung der Gele/Blots mit gleichen Proteinmengen der unterschiedlichen Proben wurde durch nachfolgende Detektion der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)-Antikörper wie oben beschrieben überprüft. Die Chemilumineszenz-Signale wurden densitometrisch quantifiziert und nachfolgend auf die Intensitäten der GAPDH normalisiert. Intensitäten, die in den experimentell behandelten Proben gemessen wurden, sind relativ zur Kontrolle angegeben.

2.2.10 Massenspektrometrische Quantifizierung von Glutamin und Glutamat

Der intrazelluläre Gehalt von Glutamat und Glutamin wurde in Zelllysaten massenspektrometrisch quantifiziert. Dafür wurden HepG2- und Huh7-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Am Ende der experimentellen Behandlung wurden die Zellen entweder lysiert oder nach zweimaligem Waschen mit Glutamin-freiem Medium mit 1 mM ¹³C-markiertem L-Glutamin versetzt und für 30 Minuten weiterkultiviert. Danach wurde überschüssiges ¹³C-markiertes L-Glutamin durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, die Zellen mit RL-Puffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (Abb. 12).

Nachfolgend wurde ¹²C- und ¹³C-Glutamin und Glutamat durch Herrn Dr. rer. nat. Diran Herebian aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf massenspektrometrisch mittels Ultra Performance Liquid Chromatography-Massenspectrometry (UPLC-MS/MS) quantifiziert. Das System bestand aus einem UPLC I-Class (Waters), gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (Xevo TQ-XS, Waters). Die Ionisierung erfolgte im positiven Elektrospray-Modus. Die chromatographische Trennung wurde unter Verwendung einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z-Säule (2,1 mm × 100 mm, 2,7 µm; Santa Clara, USA) durchgeführt. Die mobile Phase A bestand aus Wasser mit 20 mM Ammoniumformiat und 0,05 % Ameisensäure. Die mobile Phase B setzte sich aus Acetonitril und Eluent

A im Verhältnis 9:1 (v/v) zusammen. Die Trennung der Analyten erfolgte durch Gradientenelution. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus.

Folgende MS/MS-Parameter wurden für die Detektion verwendet:

Gln: 147 > 84 (Quantifizierungsion), 147 > 56 (Qualifizierungsion); Glu: 148 > 84 (Quantifizierungsion), 148 > 56 (Qualifizierungsion); $^{13}\text{C}_5$ -Gln: 152 > 88 (Quantifizierungsion), 152 > 135 (Qualifizierungsion), $^{13}\text{C}_5$ -Glu: 153 > 88 (Quantifizierungsion), 153 > 135 (Qualifizierungsion), Interner Standard Gln-OMe: 161 > 84,5 m/z.

Zur Steuerung des MS/MS-Instruments und für die Datenerfassung wurde die Software MassLynx (Version 4.2; Waters, Milford, MA, USA) verwendet. Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe der Software TargetLynx XS (Waters, Milford, MA, USA). Die in den jeweiligen Proben gemessenen Werten wurde auf die jeweilige Proteinkonzentration der Lysate normalisiert.

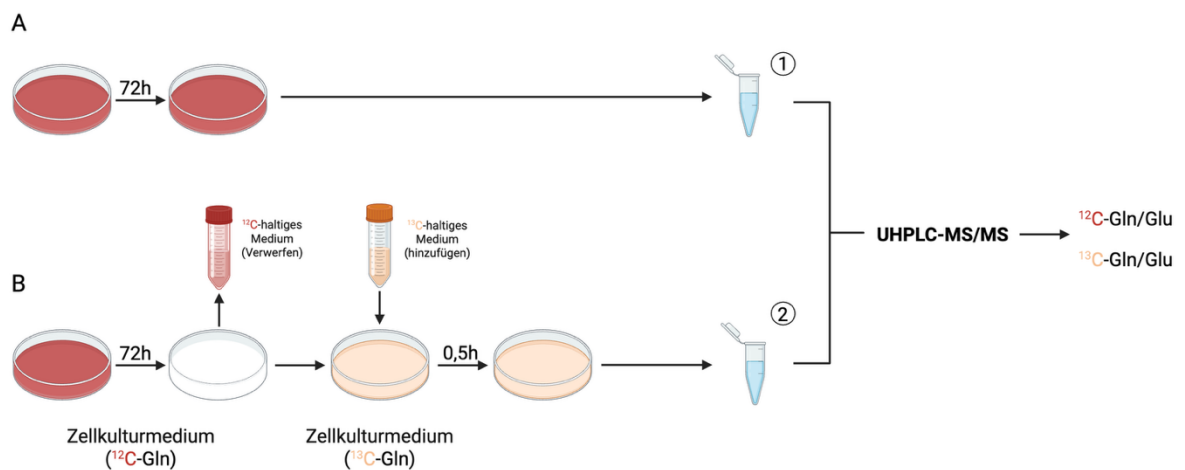


Abbildung 12: Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Analyse des ^{13}C -Glutamin-Uptakes (erstellt mit BioRender.com).

Massenspektrometrische Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in Zelllysaten von Huh7- und HepG2-Zellen. Die Zellen wurden auf 10-cm-Zellkulturschalen kultiviert und nach 72 Stunden entweder direkt geerntet (A) oder zweimal mit glutaminfreiem Medium gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 1 mM ^{13}C -Glutamin (Gln) inkubiert (B). Die Zellen wurden lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (1+2). Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse zur Quantifizierung des Gehalts an ^{12}C -Glutamin und Glutamat (Glu) nach 72 Stunden ^{12}C -Glutamin-Inkubation sowie der intrazellulären Konzentrationen von ^{12}C - bzw. ^{13}C -Glutamin und Glutamat nach 30-minütiger ^{13}C -Glutamin-Inkubation zur Bestimmung der Substrataufnahme.

2.2.11 RNA-Isolation

Zur Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) wurden die Zellen am Ende der Inkubationszeit auf Eis gelagert und dreimal mit eiskaltem PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden 150 μ L RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und die Lysate auf Eis zwischengelagert. Für die RNA-Extraktion aus gefrorenem Gewebe wurden die Proben mit vier bis fünf Keramikkügelchen in Schraubröhrchen überführt, mit 600 μ L RLT-Puffer versetzt und mittels BeadRuptor (25 Sekunden, mittlere Intensität) homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 11.000 \times g für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand auf QIAshredder-Säulen (Qiagen) gegeben. Das durchgeflossene Eluat wurde weiter für die RNA-Isolation verwendet.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Ethanol gemischt und auf RNeasy-Säulen (Qiagen) aufgereinigt. An die Membran der Säulen gebundene RNA wurde durch Zugabe von 35 μ L nukleasefreiem Wasser eluiert. Reinheit und Konzentration der erhaltenen RNA-Präparationen wurden mit dem NanoPhotometer (Implen) bestimmt. Ein A260/A280-Quotient von 1,8-2,0 wurde als Qualitätskriterium herangezogen. Proben mit einem geringen A260/A280 Quotienten wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.2.12 cDNA-Synthese

Für die komplementäre DNA-Synthese (cDNA) wurde pro Probe je 1 μ g RNA mit 2 μ L Wipeout-Buffer und nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 14 μ L eingestellt und 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 μ L eines Mastermixes (Tab. 25) zugegeben und die reverse Transkription für 30 Minuten bei 42 °C durchgeführt. Nachfolgend wurde die reverse Transkriptase durch Erhitzung der Proben auf 95 °C für 3 Minuten inaktiviert und die Transkription gestoppt. Das Reaktionsvolumen von 20 μ L wurde anschließend mit 180 μ L nukleasefreiem Wasser auf 200 μ L verdünnt, um eine Endkonzentration von 5 ng/ μ L cDNA zu erzielen.

Substanz	Menge
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT-Buffer	4 µl
RT ⁵ Primer Mix	1 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese.

2.2.13 Quantitative PCR

Die Quantifizierung von mRNA-Spezies erfolgte mittels Real-Time PCR (qPCR). Hierbei wird die Amplifikation der in DNA (Desoxyribonukleinsäure) umgeschriebenen RNA-Proben nach jedem Zyklus gemessen. Zur Detektion wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt, der ausschließlich an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die qPCR beinhaltet die Denaturierung der DNA, das Annealing der Primer an die DNA und die Elongation der Primer. An die dabei neugebildete doppelsträngige DNA bindet der Farbstoff SYBR Green, der hierdurch, mittels Laserlicht der Wellenlänge 488 nm, fluoreszent und anregbar wird. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen, welche proportional zur Menge der amplifizierten DNA ist. Nachfolgend wird die DNA-Menge in der exponentiellen Phase der Reaktion quantifiziert. In diesem Amplifikationsbereich wird die Menge der gebildeten PCR-Produkte pro Zyklus jeweils verdoppelt. Hierfür wird der sog. „*Threshold*“ bestimmt, welcher ein Schwellenwert für die Signalintensität ist, ab der diese signifikant über dem Hintergrundrauschen liegt. Der „*Threshold*“ wird automatisch von der Software des ViiA7 qPCR Cyclers bestimmt und zur Bestimmung des Ct-Werts der Proben benutzt. Pro Well wurden jeweils die in Tabelle 26 beschriebenen Substanzen und in dem dort angegebenen Volumen pipettiert.

Substanz	Menge
Primer for ⁶ (100 pmol/µl)	0,5 µl
Primer rev ⁷ (100 pmol/µl)	0,5 µl
RNase freies Wasser	2,5 µl
Template cDNA (20 ng)	4 µl
2x SYBR Green PCR Master Mix	7,5 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung je Well bei der qPCR.

⁵ Reverse Trankriptase

⁶ forward

⁷ reverse

Jede Probe wurde für eine Doppelbestimmung zweimal in eine 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde jeweils mit einer Folie zugleibt, für 1 Minute bei 1.200xg herunterzentrifugiert und mit dem ViiA 7 qPCR Cycler vermessen.

Der Ablauf des qPCR-Programms ist in Tabelle 27 beschrieben.

qPCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	50 °C	2 Minuten	40
Denaturierung	95 °C	10 Minuten	
Hybridisierung	95 °C	15 Sekunden	
Elongation	60 °C	1 Minute	

Tabelle 17: Ablauf der qPCR.

Nach Ablauf der qPCR wurden aus den zweifach gemessenen Werten Mittelwerte gebildet. Die Mittelwerte der Ziel-mRNA-Amplifikationen (Δ CT-Wert Zielgen) wurden von den Mittelwerten der ‚Housekeeper‘ (Δ CT-Wert Housekeeper) subtrahiert. Dies ergibt die Zweierpotenz ($2^{-\text{Differenz } \Delta\text{CT}}$). Dieser Wert zeigt den Expressionsunterschied. Änderungen in der Genexpression durch die Behandlungen wurden relativ zur Kontrolle bestimmt.

Selbst erstellte Primer wurden mithilfe der Datenbank PrimerBLAST auf ihre Spezifität für das Zielgen getestet. Um Artefakte durch Primer-Dimer und die Amplifikation mehrerer Gene ausschließen zu können, wurde nach Abschluss jeder qPCR die Schmelzkurve analysiert. Die doppelsträngige DNA wurde durch langsames Erhitzen zum Schmelzen gebracht und denaturiert, wodurch sich der Farbstoff SybrGreen wieder ablöst. Nach jedem Zyklus wurden die Fluoreszenzintensitäten gemessen.

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion

Vor Beginn der Zellkulturversuche wurden die Zelllinien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Kontamination mit Mykoplasmen überprüft. Hierzu wurde das kommerzielle Kit Venor® GeM OneStep (Minerva Biolabs) verwendet. Aus den Zellkulturen wurden jeweils 500 μ l des Kulturmedium-Überstandes entnommen und dieses für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend für 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (15.000xg) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Mischung bestand aus 23 µL OneStep-Mix (dem Kit beiliegend) und 2 µL Probenüberstand. Zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle entsprechend dem Protokoll des Herstellers angesetzt. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle von 2 µl Probenüberstand frisches Zellkulturmedium verwendet, bei der Positivkontrolle hingegen wurden 2 µl der dem Kit beiliegenden Kontrolllösung verwendet. Die Amplifikationsreaktion erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung der in Tabelle 28 dargestellten Bedingungen.

Zur Detektion der PCR-Produkte wurden die Proben in einem 1,5%igen Agarosegel (in TAE-Puffer mit dem DNA-Farbstoff HD Green) elektrophoretisch bei 100 Volt für 30 Minuten aufgetrennt. Als molekularer Größenstandard diente eine 100 bp-DNA-Leiter. Die Gele wurden mit dem ChemiDoc-System (Bio-Rad) aufgenommen und mittels visueller Inspektion ausgewertet.

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 Minuten	39
94 °C	30 Sekunden	
55 °C	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
4 °C	hold	

Tabelle 18: PCR-Programm der Mykoplasmen PCR.

2.3 Bildanalyse

Die unter Abschnitt 2.2.5.1 bis 2.2.5.4 beschriebenen Fluoreszenzaufnahmen wurden mittels der Analyseprogramme Arivis Cloud und ZEN Intellesis (ZEISS) ausgewertet. Diese Tools verwenden auf künstlicher Intelligenz (KI)-basierende Analysetechniken.

Arivis Cloud ist eine cloudbasierte Plattform, welche mithilfe neuronaler Netzwerke Algorithmen eine automatisierte Bildsegmentierung ermöglicht. Hierfür ist ein Training an vorhandenen Bildern erforderlich. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde mithilfe des U-Net-Modells ein semantisches Segmentierungsmodell erstellt. Hierfür wurden in ausgewählten Trainingsbildern die zu erkennenden Strukturen manuell annotiert. Basierend auf diesen Annotationen erstellte die Plattform ein Deep-Learning-Modell, das anschließend durch weitere Annotationen feinjustiert und optimiert wurde. Das so erstellte Modell wurde nachfolgend auf den gesamten Bilddatensatz

angewendet. Am Ende der Analyse wurden die erhobenen Daten in Form einer Excel-Datei exportiert.

Zusätzlich wurden ausgewählte Fluoreszenzaufnahmen mit dem KI-basierten Analysetool ZEN Intellesis untersucht, welches in der ZEN blue Mikroskopie-Software (Version 3.11) integriert ist. Hier wurde zunächst unter Verwendung eines Random-Forest-Modells ein Algorithmus durch Annotation generiert, um relevante Bereiche in den Bildern erkennen zu können. Das jeweils angewendete Modell ist im jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils erwähnt.

Die hier beschriebenen Analysen wurden in der Advanced Light Microscopy Core Facility (Ad-Light) der Medizinischen Fakultät der HHU durchgeführt.

2.4 Software und Online-Ressourcen

In Tabelle 29 sind die in dieser Arbeit genutzten Software-Programme und Online-Ressourcen aufgeführt.

Software	Firma
Amersham ImageQuant	Cytiva Version: 800
Aperio ImageScope	Leica Biosystems Version: Vers. 12.4.0.5043
arivis Cloud	Zeiss https://www.arivis.cloud/app/
Biorender	BioRender.io https://www.biorender.com/
ChatGPT	Open AI Version: Vers. 3.5
deepl	DeepL SE https://www.deepl.com/de/translator
EndNote	Clarivate Version: 21.2.0.19537
GraphPad Prism	GraphPad Version: 8.30
Image Lab	Biorad Version: 6.0.1
ImageJ	Wayne Rasband, NIH Version: Vers. 1.53
Microsoft Office	Microsoft Corporation Version: 16.98
Primer BLAST	NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on
PubMed	NCBI https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
QuantStudio 6	ThermoFisher Version: 1.7.2
QuPath	Queen's University Belfast Version: 0.4.4
SnapGene Viewer	GSL Biotech

	Version: 6.0.2
Totallab	Nonlinear Dynamics Version: TL100
ZEN blue	ZEISS Version: 3.11, SP1
ZEN Intellesis	ZEISS Version: 3.11, SP1

Tabelle 19: Verwendete Software-Programme.

2.5 Statistische Testung

Alle in dieser Arbeit dargestellten Analysen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism durchgeführt. Jede Analyse wurde mit Daten, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen bzw. Passagen (bei Zelllinien) oder Tieren) stammten, durchgeführt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte.

Der jeweils der Analyse zugrundeliegende statistische Test sowie die eingeschlossene Anzahl der Experimente sind in den jeweiligen Tabellen- oder Abbildungslegenden angegeben. In den Abbildungen sind die einzelnen Messwerte jeweils durch einen Punkt und der Mittelwert durch die Balkenhöhe veranschaulicht.

Der statistische Test wurde entsprechend der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen und der Verteilung der Daten gewählt. Das Vorliegen normalverteilter Daten nach Gauß wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Beim Vorliegen einer Normalverteilung wurden die Daten von zwei Gruppen mit dem zweiseitigen-, die von einer Gruppe mit dem one sample t-Test nach Student, analysiert. Beim Vorliegen ungleicher Varianzen wurde der t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney- bzw. der Wilcoxon-Test verwendet.

Wurden mehr als zwei normalverteilte Gruppen miteinander verglichen, wurden die Daten mittels One-way ANOVA auf das Vorliegen einer statistischen Signifikanz überprüft. In Abhängigkeit der zu vergleichenden Gruppen wurde entsprechend ein Dunnett's oder Tukey's multiple comparison post hoc-Test angewendet.

Nicht normalverteilte, ungepaarte oder gepaarte Daten wurden mittels Kruskal-Wallis bzw. Friedman-Test analysiert.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen wurde angenommen, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1 Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für die Viabilität von den Hepatomazelllinien Huh7 und HepG2

Mithilfe des Koloniebildungsassays (Kapitel 2.2.3) wurde das Wachstum und die Bildung von klonalen Kolonien von Huh7- und HepG2-Zellen über einen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen untersucht. Dabei wurden Wirkungen von Hemmstoffen der Glutaminsynthese (MSO, 3 mM), der Glutaminolyse (BPTES, 10 μ M), des Aminosäuretransports (V-9302, 5 und 10 μ M, BS, 20 mM) und der Protein-O-GlcNAcylierung (DON, 50 μ M, OSMI-1, 20 μ M) auf deren Wachstum untersucht.

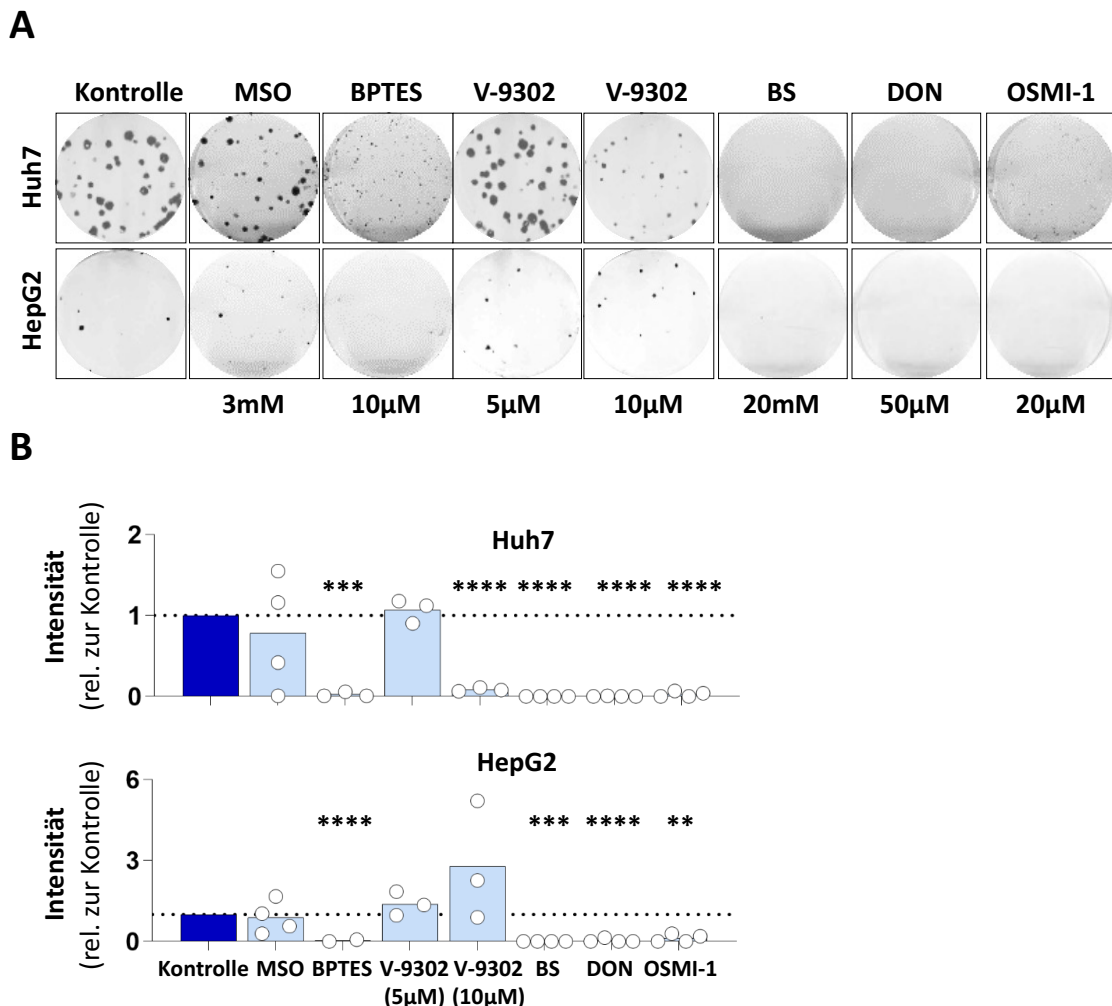


Abbildung 13: Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für die Langzeitproliferation von Huh7- und HepG2-Hepatomazellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit der jeweils angegebenen Substanzen über einen Zeitraum von 15 \pm 5 Tagen kultiviert und die Proliferation mithilfe des Koloniebildungsassays untersucht (A). Quantifizierung der angefärbten Kolonien mittels ImageJ-Software (B). Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben.

Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n = 3-4$.

Während MSO und V-9302 (5 μM) keinen Einfluss auf die Proliferation der Huh7- und HepG2-Zellen hatten, hemmte die Inkubation mit BPTES, BS, DON und OSMI-1 die Kolo-niebildung in beiden Zelllinien nahezu vollständig. In einer Konzentration von 10 μM hemmte V-9302 das Wachstum der Huh7- aber nicht der HepG2-Zellen (Abb. 13).

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass Huh7- und HepG2-Hepatoma-zellen *in vitro* unabhängig von der endogenen Glutamin-Bildung aber abhängig von der Glutaminolyse wachsen. Darüber hinaus ist das Wachstum beider Zelllinien abhängig von den Aminosäuretransportern ASCT2, LAT1 und SNAT2 und der Protein-O-GlcNAcylierung (Abb. 13).

In weiteren Experimenten wurden die Effekte der vorher genannten Hemmstoffe auf das Wachstum semikonfluent (70 %) ausgesäeter humaner (Huh7, HepG2) und muri-ner (Hepa1-6) Hepatomazellen sowie kultivierter Maushepatozyten über einen Be-obachtungszeitraum von 72 Stunden mittels Fluorimetrie (Kap. 2.2.4) quantifiziert (Abb. 14).

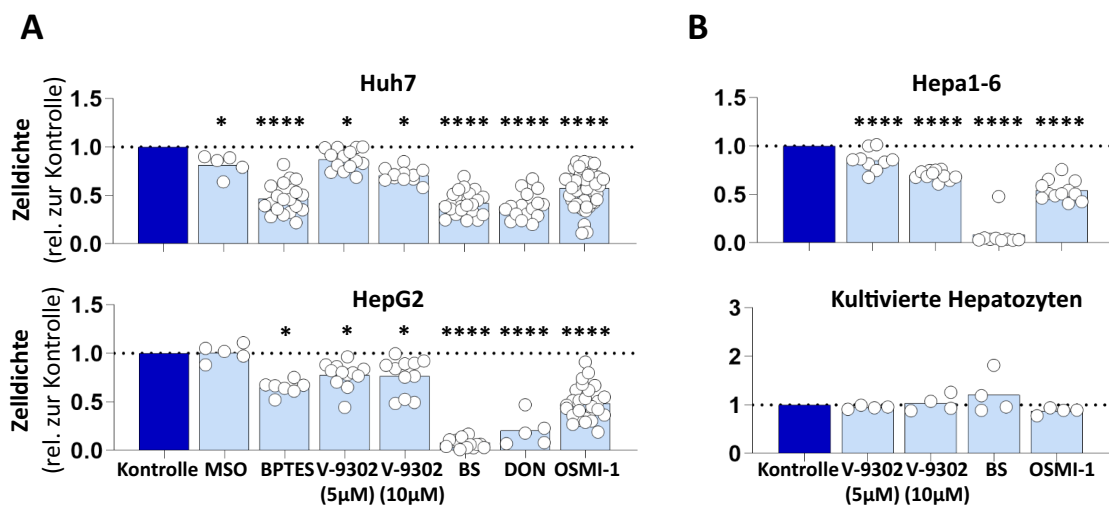


Abbildung 14: Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für das Wachstum von Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Hepatoma-zellen und kultivierter Maushepatozyten.

Huh7-, HepG2- (A) und Hepa1-6-Zellen und kultivierte murine Hepatozyten (B) wurden in An- oder Abwesenheit der angegebenen Substanzen 3 Tage kultiviert und die Populationsgröße durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert. Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n = 4-54$.

Unter den hier gewählten Bedingungen wurde das Wachstum von Huh7-Zellen geringfügig und das von HepG2-Zellen nicht durch Blockierung der endogenen

Glutaminsynthese mittels MSO, aber durch die Hemmung der Glutaminolyse (BPTES) vermindert (Abb. 14A).

Die Hemmung des LAT1/ SNAT2- oder ASCT2-abhängigen Aminosäuretransports durch V-9302 bzw. BS oder der Protein-O-GlcNAcylierung (DON und/oder OSMI-1) reduzierte die Zelldichte in Huh7- und HepG2- und Hepa1-6-Zellen, aber nicht in kultivierten Maushepatozyten (Abb. 14A, B).

Die Reduktion des Wachstums durch die in DMSO-gelösten Substanzen war in den oben genannten Untersuchungen nicht auf das Solvenz zurückzuführen (Rel. Zelldichte gegenüber unbehandelten Zellen: $1,07 \pm 0,22$ ($n=13$, $p=0,0001$) für Huh7-Zellen, $0,98 \pm 0,04$ ($n=3$, $p=0,0016$) für HepG2-Zellen und $1,01 \pm 0,18$ ($n=3$, $p=0,0102$) für Hepa1-6-Zellen).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Wachstum von Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen abhängig ist von LAT1/SNAT2, ASCT2 und der Protein-O-GlcNAcylierung.

In weiteren Experimenten wurden die wachstumshemmenden Wirkungen (growth inhibition, GI) von OSMI-1 und V-9302 auf die Hepatomazellen konzentrationsabhängig im Bereich von 0 bis 50 μM untersucht.

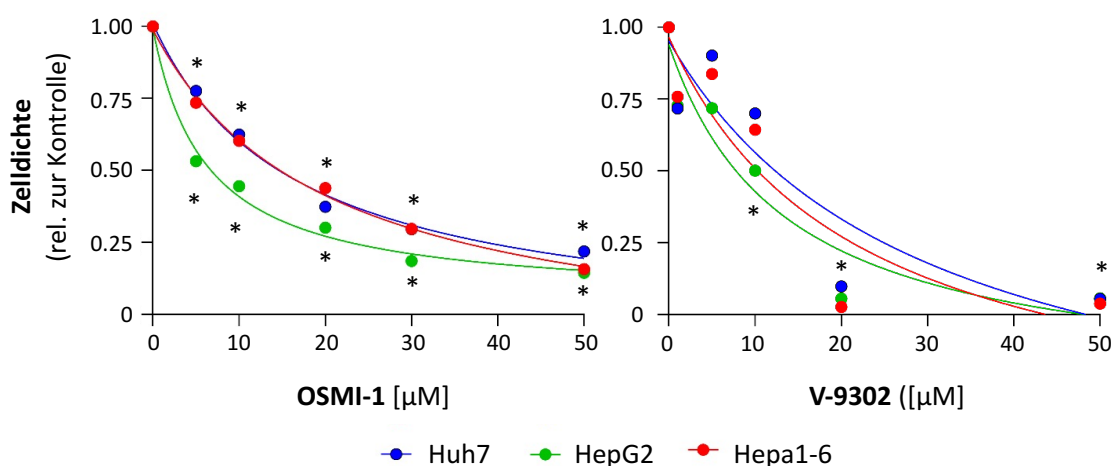


Abbildung 15: Konzentrationsabhängigkeit der Hepatomazell-wachstumshemmenden Wirkungen von OSMI-1 und V-9302.

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit der angegebenen Substanzen in den jeweiligen angegebenen Konzentrationen 3 Tage kultiviert und die Populationsgröße durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert. Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe sind durch Sterne angezeigt (Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3$.

Die ermittelten GI_{50} -Werte für OSMI-1 und V-9302 lagen bei den untersuchten Hepatomazellen durchschnittlich bei 20 bzw. 10 μM . Eine Erhöhung der OSMI-1 Konzentration oberhalb des GI_{50} reduzierte die Zelldichten nur unterproportional. Demgegenüber führte die Inkubation mit V-9302-Konzentrationen oberhalb des GI_{50} zwischen 20 und 50 μM zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Zelldichte (Abb. 15).

Zur Vermeidung der bekannten V-9302-vermittelten konzentrationsabhängigen Toxizität auf nicht-Tumorzellen (69, 94) wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob durch Kombination von OSMI-1 mit niedrigen V-9302-Konzentrationen die wachstumshemmenden Wirkungen der Einzelsubstanzen gesteigert werden können. Hierfür wurden analog zu den oben beschriebenen Untersuchungen Kolonieassays und Zelldichtemessungen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass auch die Koinkubation der Hepatomazellen mit V-9302 (5 oder 10 μM) und OSMI-1 die Koloniebildung der Huh7- und HepG2-Zellen vollständig hemmt (Abb. 16A, B).

Gegenüber den Einzelbehandlungen mit OSMI-1 und V-9302 reduzierte die Koinkubation mit beiden Substanzen die Hepatomazellendichten erheblich effektiver. In allen Hepatomazelllinien wurden additive Effekte beobachtet, wenn beide Substanzen gemeinsam verabreicht wurden (Abb. 16C). Auch durch gleichzeitige Kombination mit BS konnte die durch OSMI-1 vermittelte Reduktion der Zelldichte in Huh7-Zellen effektiv verstärkt werden. In HepG2- und Hepa1-6-Zellen waren nahezu keine Zellkerne bzw. Zellen nach Inkubation mit BS allein oder nach gemeinsamer Inkubation mit V-9302 nachweisbar (Abb. 16C).

Im Gegensatz zu den an den Hepatomazellen gemachten Beobachtungen reduzierten OSMI-1, V-9302, BS, OSMI-1+V-9302 oder OSMI-1+BS die Zelldichte kultivierter Maushepatozyten nicht.

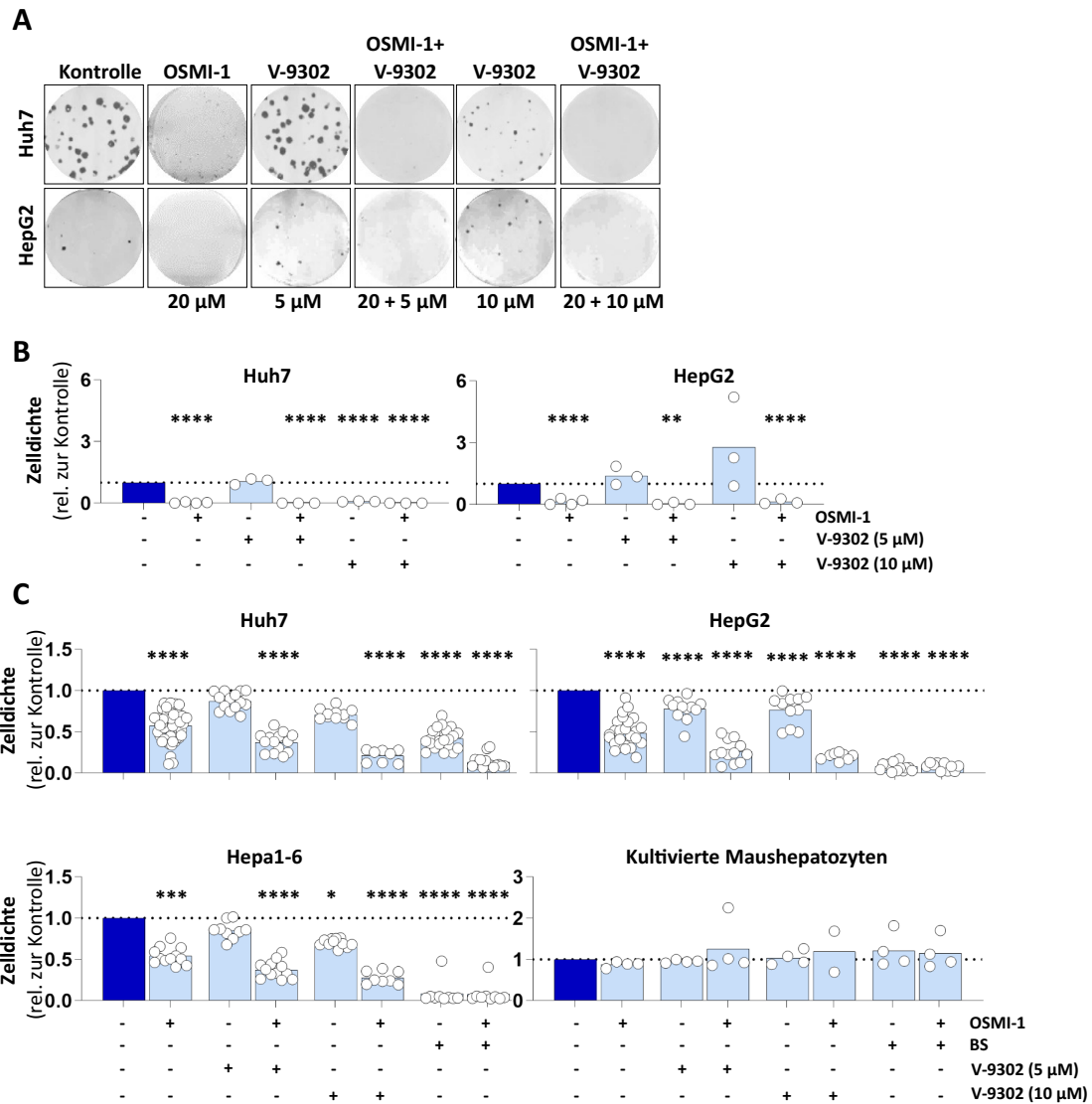


Abbildung 16: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, ASCT2 und/ oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf das Wachstum humaner und muriner Hepatomazellen und kultivierter Maushepatozyten.

Huh7-, HepG2- oder Hepa1-6-Zellen oder kultivierte Maushepatozyten wurden in An- oder Abwesenheit der jeweils angegebenen Substanzen über einen Zeitraum von 15 \pm 5 Tagen kultiviert und die Proliferation mithilfe des Koloniebildungsassays untersucht (A). Quantifizierung angefärbter Kolonien mittels ImageJ-Software (B). Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit der angegebenen Substanzen 3 Tage kultiviert und die Populationsgröße durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert (C). Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: p<0.0001, ***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05 (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), n=4-54.

Das Ausmaß der durch die gemeinsame Inkubation mit OSMI-1 und V-9302 bzw. durch BS herbeigeführten Reduktion der Hepatomazellendichte unterhalb der nach Aussaat erwartbaren Populationsgröße (Abb. 16A-C) ist prinzipiell nur durch Induktion von Zelltod erklärlich. Dies wurde exemplarisch an Huh7-Zellen mittels Live-Cell-Mikroskopie untersucht (Abb. 17).

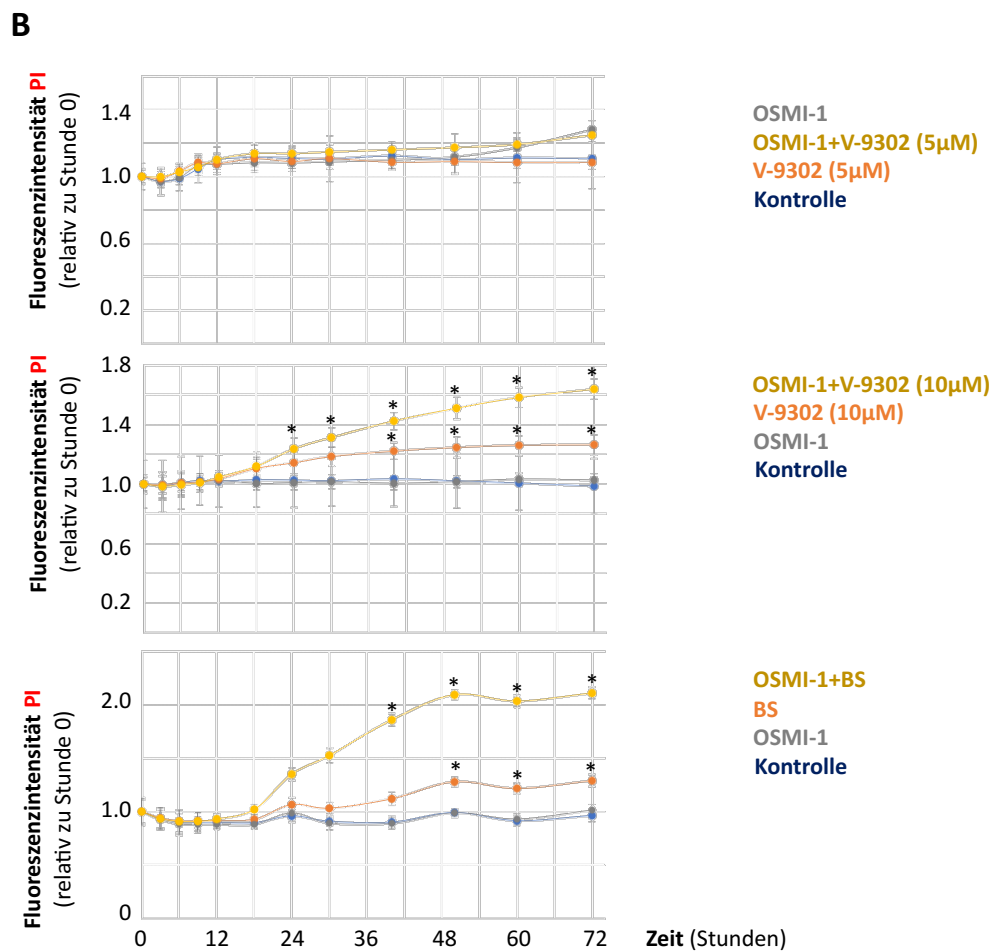
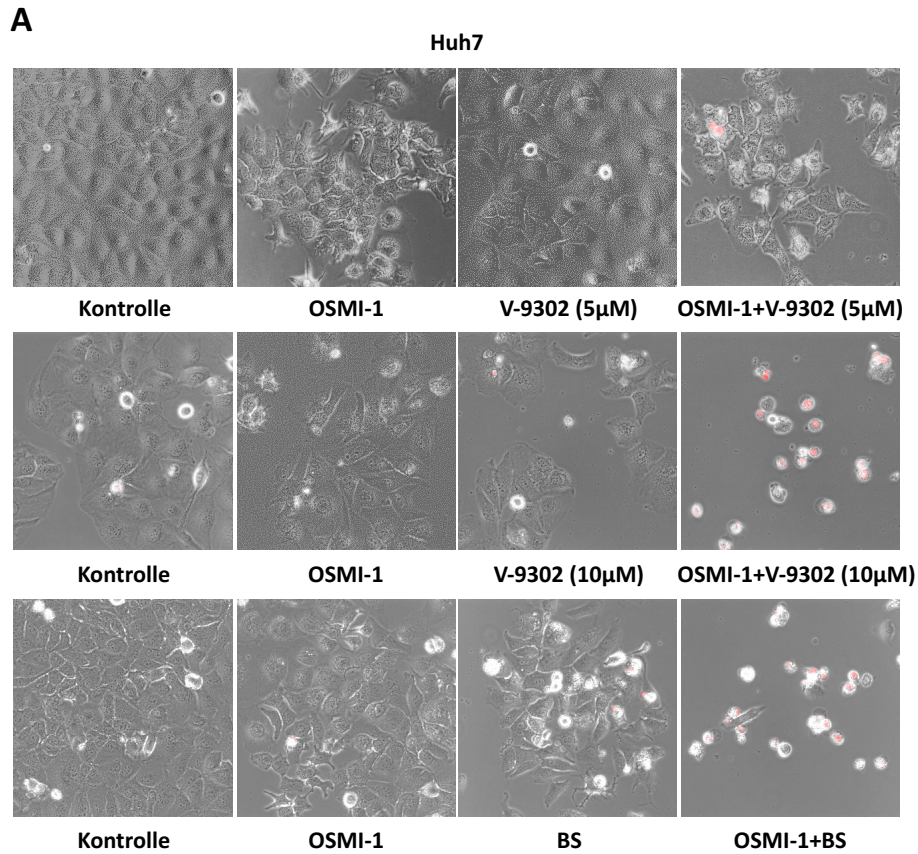


Abbildung 17: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, ASCT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf Proliferation und Induktion von Zelltod.

Huh7-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 (20 μ M), V-9302 (5, 10 μ M) oder BS (20 mM) über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert und die Viabilität und Proliferation mittels Propidiumiodid (PI) und Life-Cell-Hellfeld- und Fluoreszenz Imaging (Kap. 2.2.5) untersucht (**A**). Quantifizierung der PI-Intensität: Die unter den unterschiedlichen Bedingungen gefundene Fluoreszenzintensität ist relativ zur jeweiligen im Startbild gefundenen angegeben (**B**). *: statistisch signifikant gegenüber der Fluoreszenzintensität des Startbildes ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest, $n=3$).

Bei den mit OSMI-1 oder V-9302 (5 μ M) oder mit OSMI-1+V-9302 (5 μ M) inkubierten Zellen wurde eine verringerte Proliferation ohne nennenswerten Anstieg PI-gefärbter Zellen beobachtet (Abb. 17). Bei den mit V-9302 (10 μ M) oder mit BS inkubierten Zellen nahm die Anzahl PI-positiver Zellen demgegenüber signifikant zu. Dieser Effekt wurde erheblich verstärkt, wenn die Zellen gleichzeitig mit OSMI-1 inkubiert wurden. Zelltod wurde dabei beginnend zwischen 10 und 24 Stunden beobachtet und trat auch nachfolgend über den gesamten Untersuchungszeitraum weiter auf (Abb. 17A, B).

Die im zeitlichen Verlauf vor und bis zum Eintritt des Zelltods auftretenden morphologischen Veränderungen der Zelle zeigen charakteristische Ähnlichkeiten in Abhängigkeit davon, ob die Zellen nur mit BS oder V-9302 oder diese jeweils in Kombination mit OSMI-1 inkubiert wurden. Während die einzelbehandelten Zellen schrumpfen und optisch dichter werden (Abb. 18), bilden sich in den zusätzlich mit OSMI-1 inkubierten Zellen vakuolenartige Plasmamembranausstülpungen (Abb. 18). Die Zeiträume, in denen diese Veränderungen stattfanden, unterschieden sich deutlich voneinander: die Zellkondensation durch BS (156 ± 30 Minuten, $n=3$) erfolgte über einen längeren Zeitraum als die durch V-9302 (51 ± 15 Minuten, $n=3$), BS+OSMI-1 (76 ± 30 Minuten, $n=3$) oder V-9302+OSMI-1 (44 ± 15 Minuten, $n=3$) induzierte Plasmamembranausstülpung.

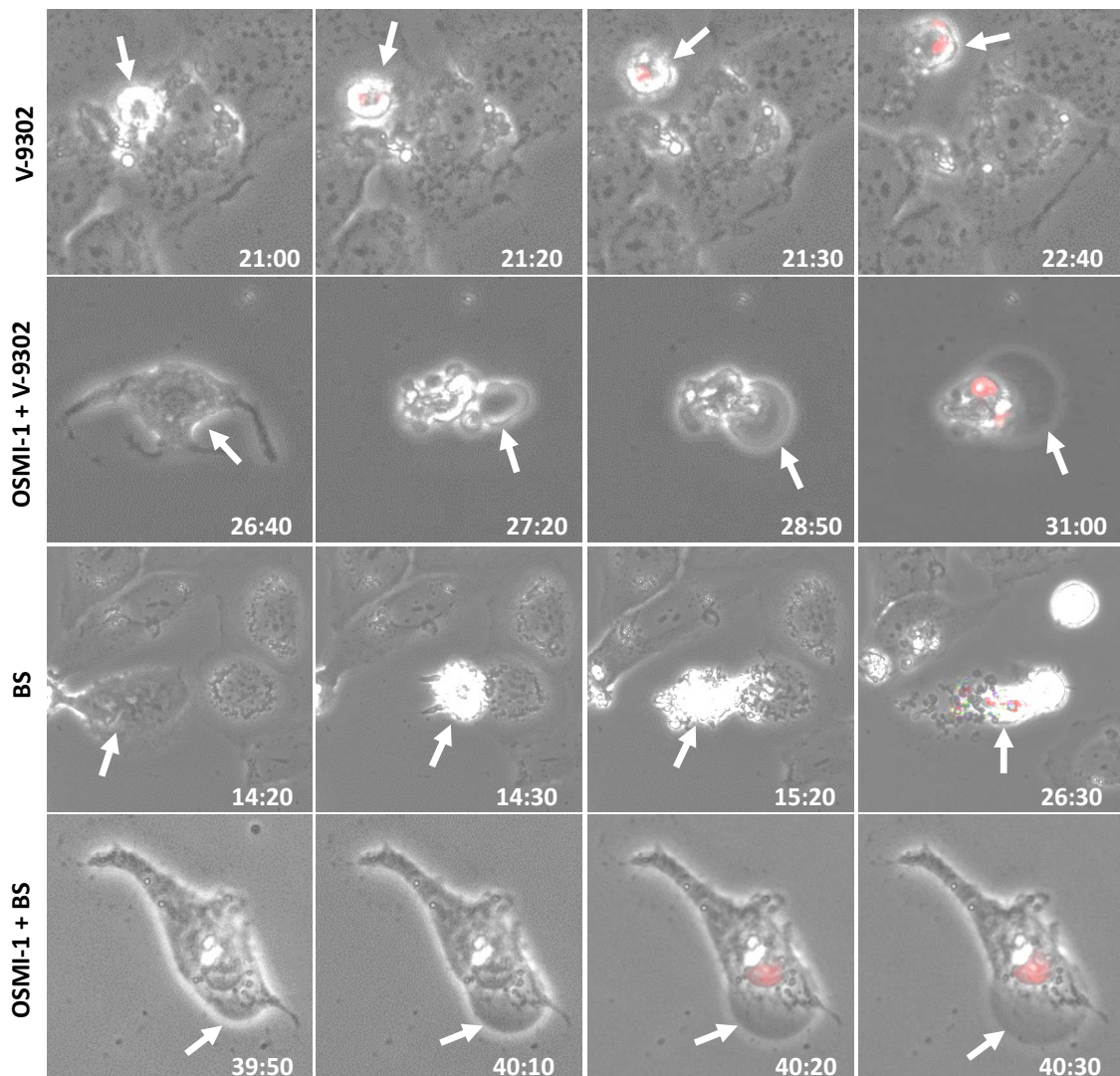
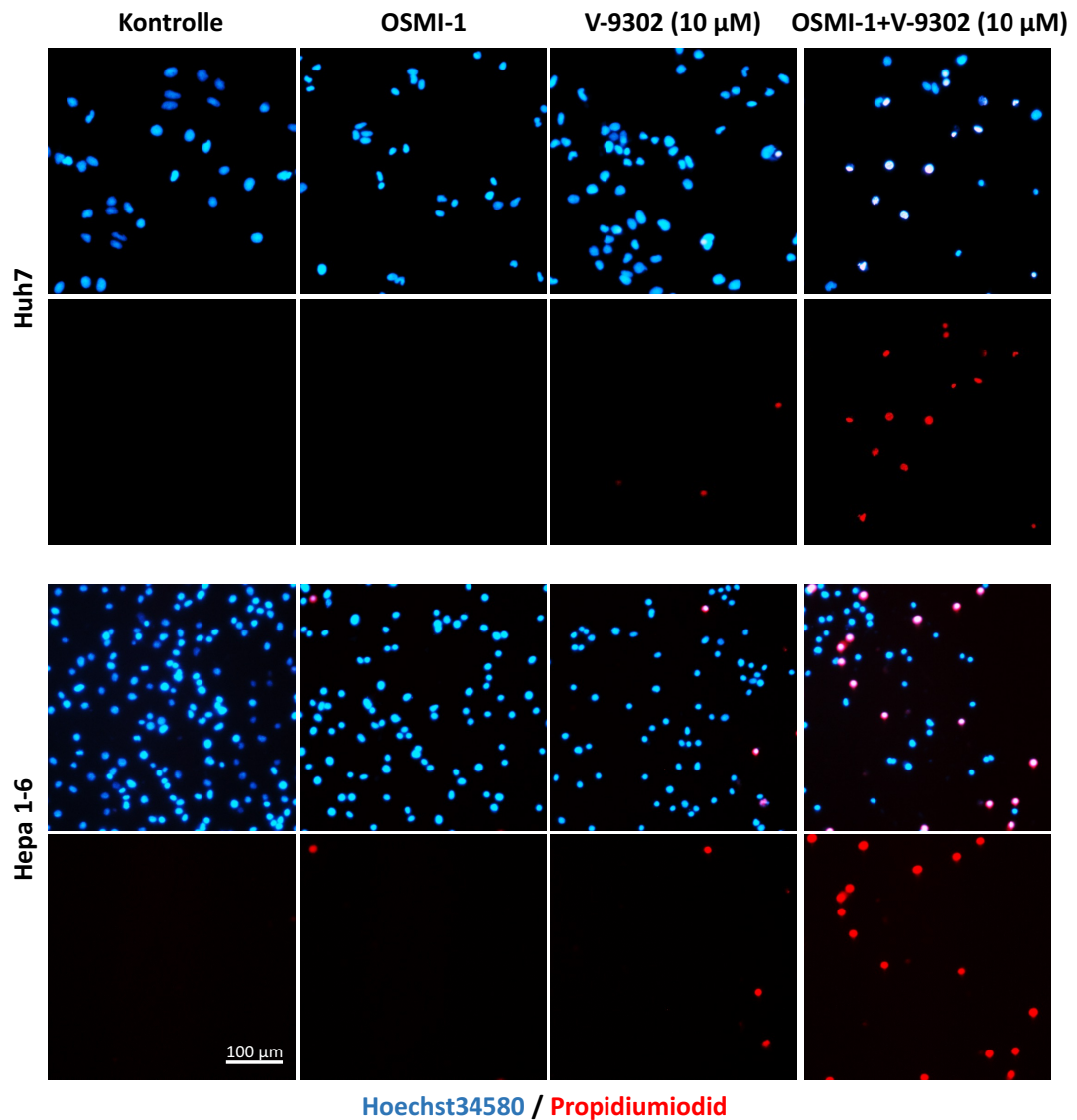


Abbildung 18: Veränderung der Zellmorphologie sterbender Huh7-Zellen.

Vergrößerte hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische (rot: PI) Bilder einer repräsentativen, mit BS, V-9302, BS+OSMI-1 oder V-9302+OSMI-1 inkubierten Huh7-Zelle (Beschreibung des Experiments: s. Abb. 17).

Das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen wurden in den Hepatomazellen fluoreszenzmikroskopisch und mit auf künstlicher Intelligenz basierter Quantifizierung analysiert (Abb. 19). Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden experimentell behandelt, da zu diesem Zeitpunkt bereits Effekte der Hemmstoffe auf die Induktion von Zelltod sichtbar waren, aber die Größe der Zellpopulation noch nicht zu stark verringert war.

A



B

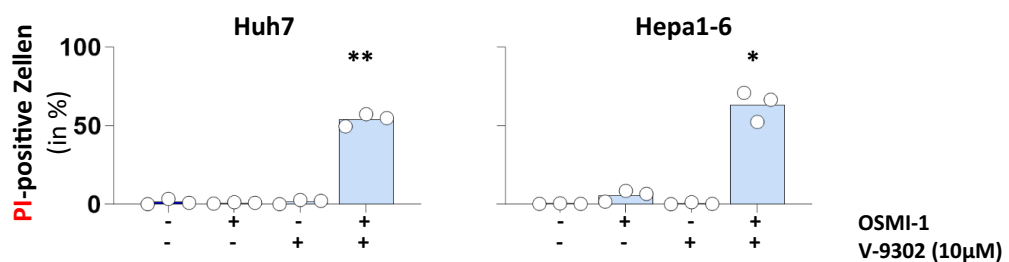


Abbildung 19: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Induktion von Zelltod.

Huh7- oder Hepa1-6-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 (20 µM) und/oder V-9302 (10 µM) über einen Zeitraum von 24 Stunden kultiviert und tote Zellen mittels Propidium-iodid (PI) und die Gesamtheit der Zellen mittels Hoechst34580 fluoreszenzmikroskopisch gemessen (A). Quantifizierung PI- und Hoechst34580-gefärbter Zellkerne mittels Intellesis (Kap. 2.3) (B). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (RM one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3$.

Zu diesem Zeitpunkt hatte die Inkubation der Huh7- und Hepa1-6-Zellen mit V-9302 die Anzahl PI-positiver Zellen geringfügig, aber nicht signifikant gesteigert (Abb. 19A). Die zusätzliche Inkubation mit OSMI-1 erhöhte hingegen den Anteil PI-positiver Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle auf über 50 % (Abb. 19B).

Diese Untersuchungen zeigen, dass OSMI-1 und V-9302 in einer Konzentration von 5 μ M das Wachstum der Hepatomazellen hemmt ohne Zelltod zu induzieren (Abb. 17, 18). Demgegenüber induzieren V-9302 (10 μ M) und BS den Zelltod, der durch OSMI-1 in beiden Fällen erheblich gesteigert wurde (Abb. 17). Der jeweils durch Koinkubation mit OSMI-1 induzierte Zelltod ging dabei mit morphologischen Veränderungen einher, die sich deutlich von denen unterschieden, die im Zuge des durch BS oder V-9302 induzierten Todes auftraten (Abb. 18). Zur weitergehenden Charakterisierung des in den Abbildungen 17-19 beobachteten Zelltods wurden Apoptose- (zVAD-fmk), Nekroptose- (Necrostatin-1s, Nec-1s), Pyroptose- (LDC7559) und Ferroptose-Hemmstoffe (Ferrostatin-1) verwendet (Abb. 20). Bei den Hepa1-6-Zellen wurde zusätzlich das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) verwendet (Abb. 21).

Keiner dieser verwendeten Hemmstoffe verminderte die durch BS, V-9302, OSMI-1, BS+OSMI-1 oder V-9302+OSMI-1-vermittelte Reduktion der Huh7-, HepG2- oder Hepa1-6-Zelldichte (Abb. 20,21). In diesen Untersuchungen wurden weder signifikante Effekte noch Tendenzen beobachtet.

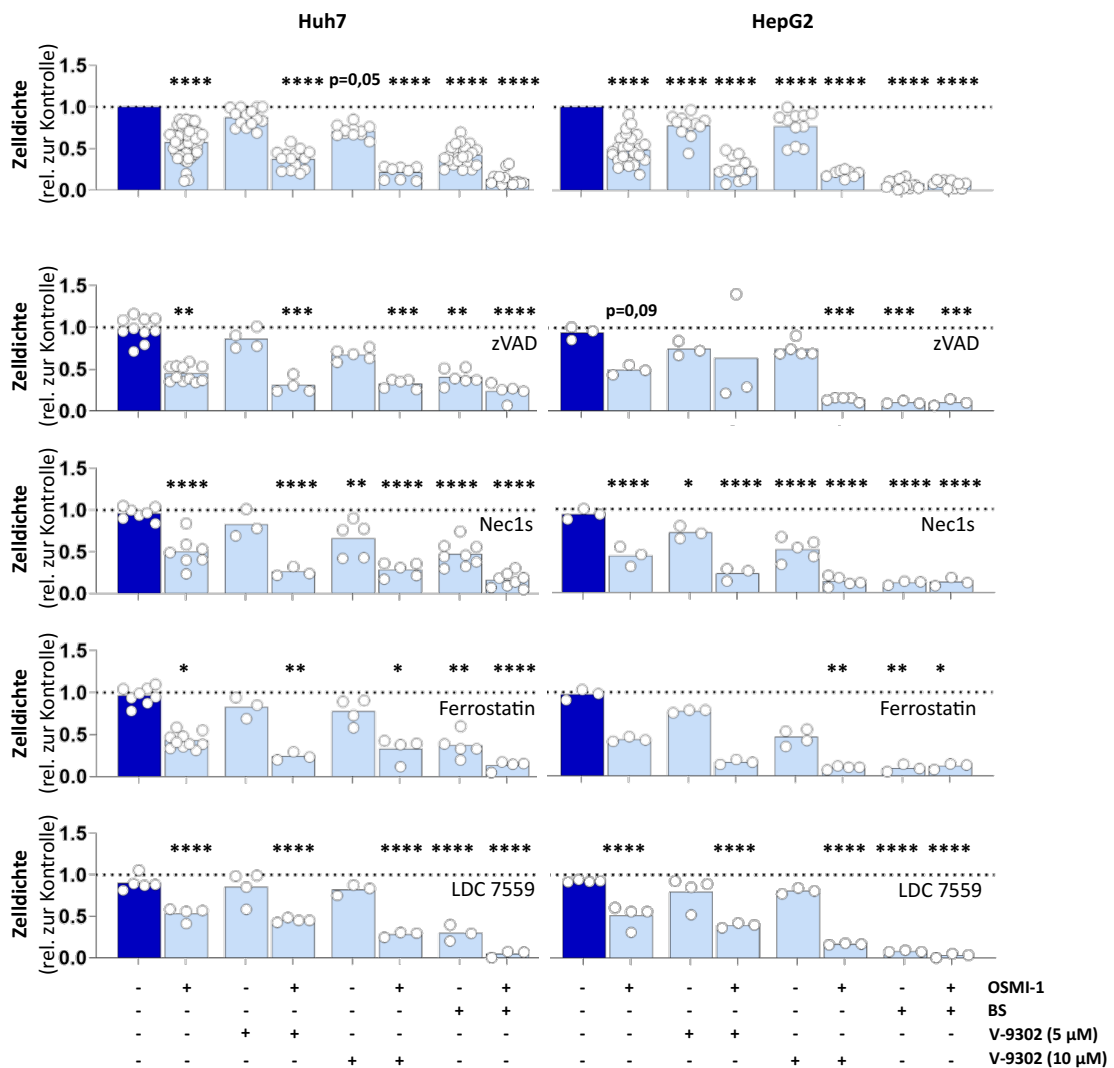


Abbildung 20: Charakterisierung des durch Aminosäuretransport- und Protein-O-GlcNAcylierungshemmung induzierten Zelltod in Huh7- und HepG2-Zellen.

Hepatomazellen wurden in An- oder Abwesenheit der jeweils angegebenen Substanzen über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert und die Zelldichte durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert. Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-11$.

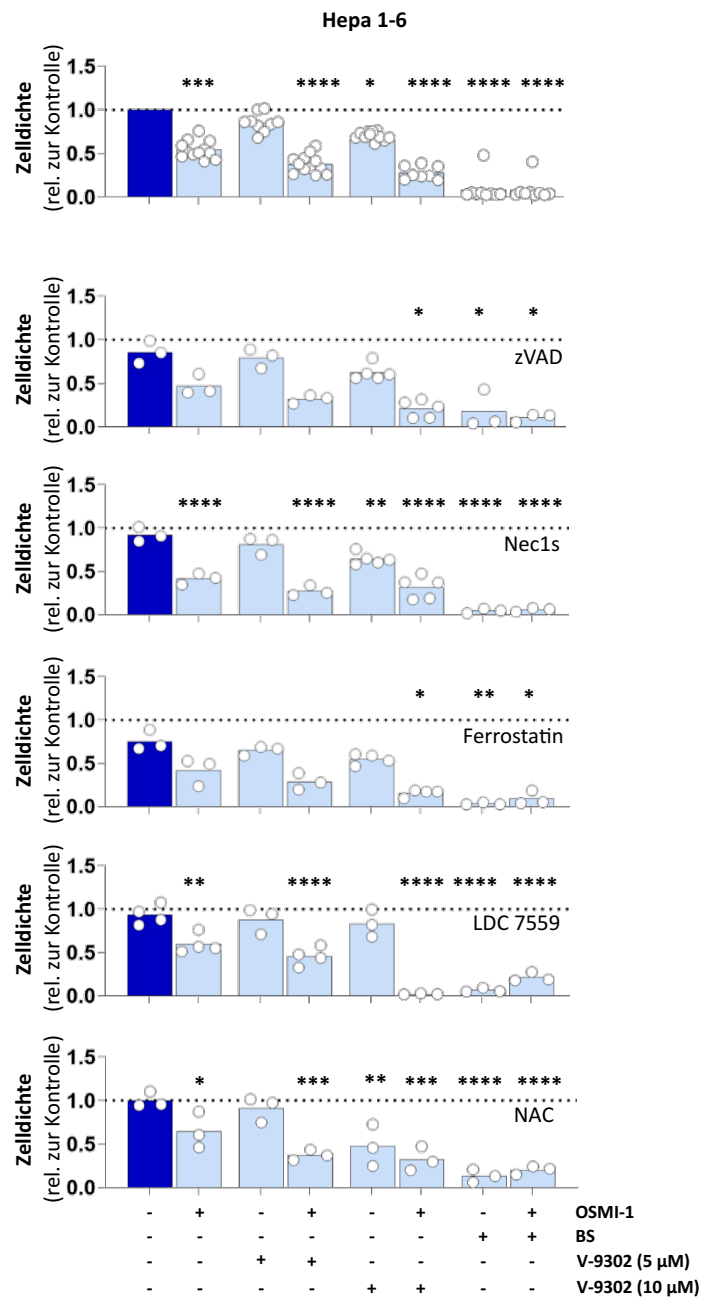


Abbildung 21: Charakterisierung des durch Aminosäuretransport- und Protein-O-GlcNAcylierungshemmung induzierten Zelltod in Hepa1-6-Zellen.

Hepatomazellen wurden in An- oder Abwesenheit der jeweils angegebenen Substanzen über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert und die Zelldichte durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert. Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-5$.

Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Beteiligung der klassischen Zelltodformen Apoptose, Nekroptose, Ferroptose oder Pyroptose als Ursache für den durch die Aminosäuretransporter- und Protein-O-GlcNAcylierungshemmung hervorgerufenen Zelltod.

3.2 Wirkungen der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Expression, Lokalisation und Proteinspiegel von ASCT2 in Huh7- und HepG2-Zellen

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass der Aminosäuretransporter ASCT2 essenziell für die Viabilität von Huh7- und HepG2-Zellen ist (Abb. 13, 14). Aus Literaturbefunden ist bekannt, dass der ASCT2 in der Plasmamembran und in Mitochondrien lokalisiert sein kann (22).

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit in Huh7- und HepG2-Zellen mittels Immunfluoreszenz Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 22, 23). Superresolution-Mikroskopie-Aufnahmen zeigen eine klare Kolokalisation von anti-ASCT2-immunoreaktiven Punkten mit dem Plasmamembranmarker Na^+/K^+ -ATPase (Abb. 22, Box 1). Eine punktuelle anti-ASCT2-Immunoreaktivität ist auch im Zytosol erkennbar (Abb. 22, Box 2).

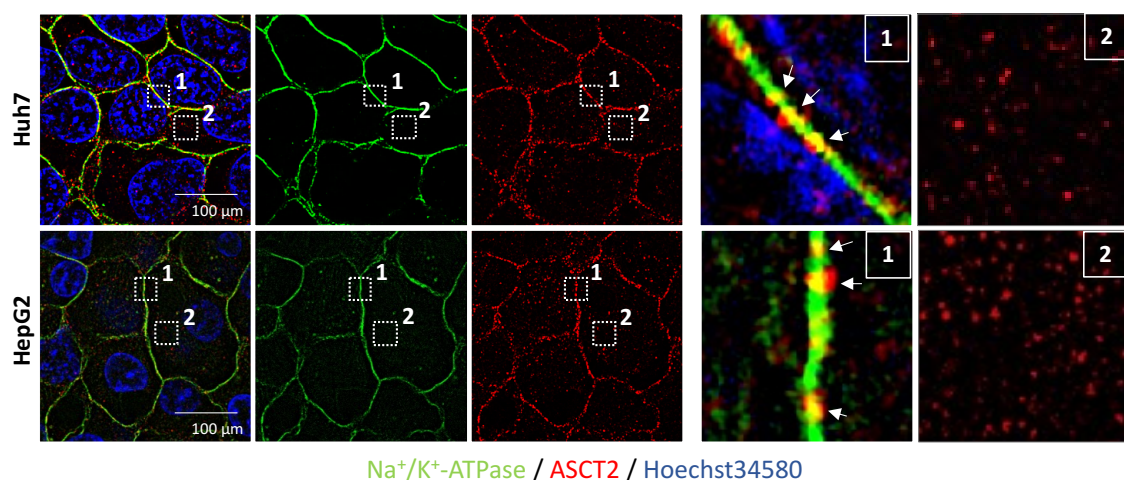


Abbildung 22: Superresolution Mikroskopie Aufnahmen von Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden fixiert und ASCT2, Na^+/K^+ -ATPase wurde mittels Immunfluoreszenz und Superresolution Mikroskopie analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 markiert. In den Übersichtsbildern markierte und nummerierte Bildbereiche (gestrichelte Linien) sind daneben vergrößert dargestellt (n=3).

Zur weiteren Abklärung, ob diese punktuelle, zytosolische ASCT2-Färbung auf mitochondrial-lokalisierten ASCT2 hinweist, wurden mit MitoTracker gefärbte Huh7- und HepG2-Zellen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. In Übereinstimmung mit den SR-SIM-Aufnahmen zeigte auch diese Untersuchungstechnik in beiden Zelltypen ASCT2 in der Zellmembran (Abb. 23A, 1 und 3). Ungefähr 25 % der gesamten Anti-ASCT2-Immunoreaktivität kolokalisierte mit dem Plasmamembranmarker Na^+/K^+ -

ATPase. Die punktuelle im Zytosol erkennbare ASCT2-Immunoreaktivität überlappte nur gelegentlich und inkonsistent mit der MitoTracker-Fluoreszenz (Abb. 23A, 2 und 4). Insgesamt kolokalisierten weniger als 0,005 % der anti-ASCT2-Immunoreaktivität mit MitoTracker (Abb. 23B).

Zur weiteren Abklärung, in welcher Quantität in Huh7- und HepG2-Zellen die glykosylierte, membranständige und die mitochondriale Variante des ASCT2 vorhanden ist, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden auch MiaPaCa2-Zellen untersucht, in denen die mitochondriale ASCT2-Variante mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa erstbeschrieben wurde (22).

In allen drei Zelllinien wurden anti-ASCT2-reaktive Banden mit Molekulargewichten zwischen ca. 65-100 kDa, die nach PNGase F-Verdau nicht mehr sichtbar waren, gefunden (Abb. 23C, Bande 1). In den deglykosylierten Proben traten stattdessen Banden im Bereich zwischen 37-50 kDa auf (Abb. 23C, Bande 3).

In den MiaPaCa2-Zellen und schwächer auch in Huh7- und HepG2-Zellen wurden außerdem anti-ASCT2-immunoreaktive Banden im Bereich von 30 kDa beobachtet (Abb. 23C, Bande 5). Die Stärke des anti-ASCT2-immunoreaktiven Signals bei 30 kDa war dabei deutlich niedriger, verglichen mit dem im Bereich von 40-50 kDa nach Deglykosylierung sichtbaren Signal (Abb. 23C, Banden 3 und 5).

Neben diesen anti-ASCT2-immunoreaktiven Banden wurden weitere Banden im Western-Blot im Bereich oberhalb von 37 kDa und ca. bei 50 kDa detektiert (Abb. 23C, Banden 2 und 4). Insbesondere in HepG2-Zellen ist die 50 kDa-Variante sehr prominent.

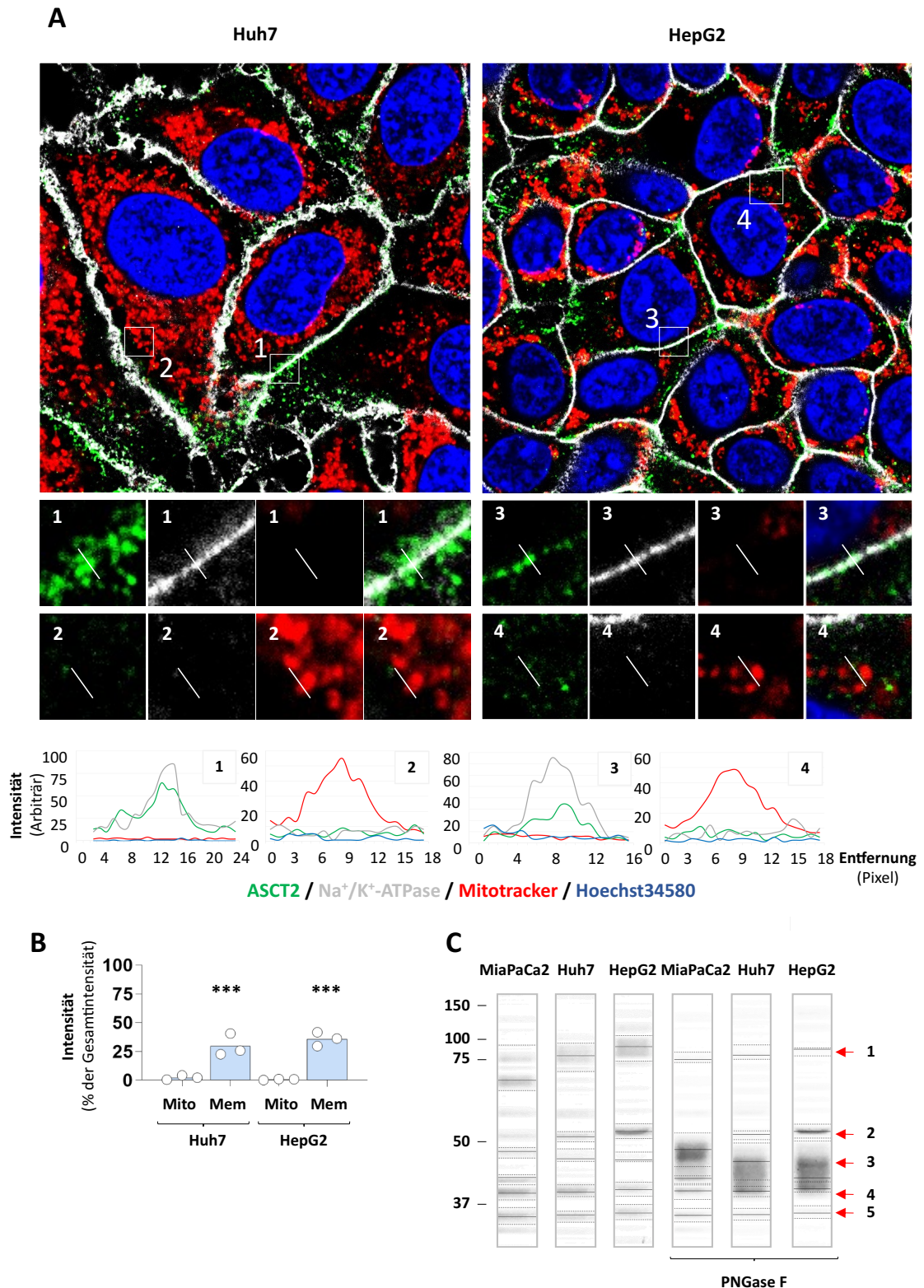


Abbildung 23: Lokalisation des ASCT2-Transporters in Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden fixiert und ASCT2, Na⁺/K⁺-ATPase wurde mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning Mikroskopie analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 und Mitochondrien mit MitoTracker markiert. In den Übersichtsbildern markierte und nummerierte Bildbereiche sind darunter vergrößert dargestellt. In selektierten Bereichen im Bild (gestrichelte Linie) wurden die Intensitätsprofile der Fluoreszenzkanäle gemessen und in einem Graphen dargestellt (A). Machine learning (Intelligence)-assistierte Quantifizierung kolokalisierender Bereiche (ASCT2 mit Na⁺/K⁺-ATPase oder MitoTracker). Prozentualer Anteil kolokalisierender Fluoreszenz in Relation zur Gesamtintensität von ASCT2. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: ***: p<0.001 (einseitiger t-Test nach

Student), n =3 **(B)**. ASCT2 Western-Blot-Analyse. ASCT2-Proteinspiegel in MiaPaCa2-, Huh7- und HepG2-Zellen wurden mittels Western-Blot analysiert. Individuelle anti-ASCT2-immunoreaktive Banden sind mit Pfeilen markiert und nummeriert. Wo angegeben, wurden die Proteinlysate vor Western-Blot-Analyse mit PNGase F vor der Gelelektrophorese deglycosyliert **(C)**.

In nachfolgenden Experimenten wurde mittels Western-Blot untersucht, ob eine Hemmung der Protein-*O*-GlcNAcylierung durch OSMI-1 die Proteinspiegel der membranständigen, glykosylierten Form (ca. 75 kDa) nach 72 und 144 Stunden in Huh7- und HepG2-Zellen beeinflusst. In Kontrollexperimenten wurden die Proben zusätzlich mit PNGase F verdaut, um den ASCT2 zu deglykosylieren. Wie in Abbildung 24A gezeigt, waren die Proteinspiegel des 75 kDa ASCT2 in den mit OSMI-1 inkubierten Proben gegenüber der Kontrolle signifikant verringert. Die Behandlung der Proben mit PNGase F reduzierte sowohl in den Kontrollen als auch in den mit OSMI-1 behandelten Hepatomazellen das Molekulargewicht der anti-ASCT2-immunoreaktiven Bande auf zwischen 40-50 kDa (Abb. 24B). Auch nach Deglykosylierung waren die ASCT2-Proteinspiegel in den mit OSMI-1 inkubierten Zellen geringer als in den Kontrollen (Abb. 24B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Huh7- und HepG2-Zellen der ASCT2 überwiegend glykosyliert ist und damit in der Plasmamembran lokalisiert ist.

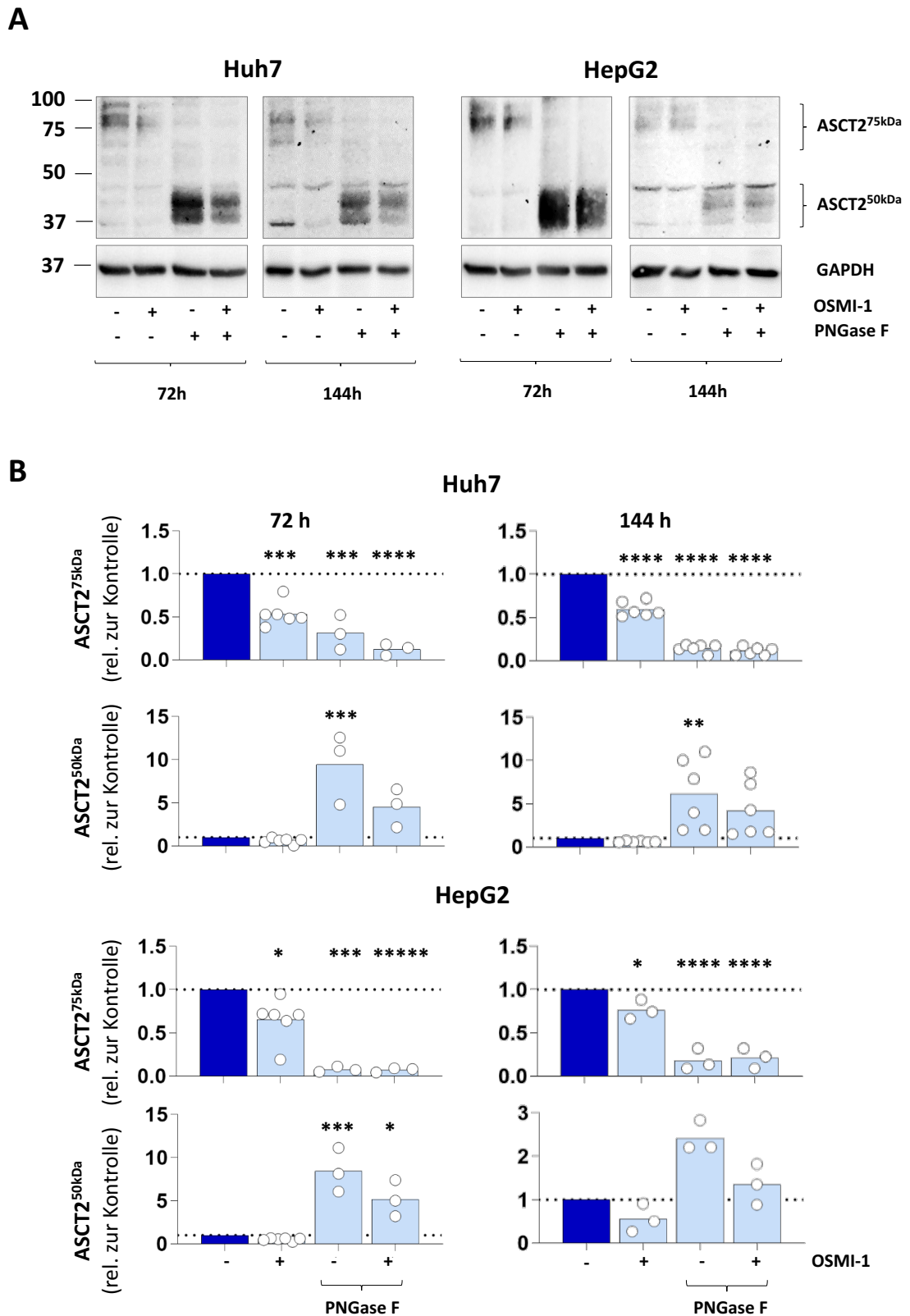


Abbildung 24: ASCT2-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 für 72 oder 144 Stunden inkubiert und ASCT2-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot analysiert. Wo angegeben, wurden die Proteinlysate vor Western-Blot-Analyse mit PNGase F wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben deglycosyliert (A). Densitometrische Analyse der anti-ASCT2-Immunoreaktivität. Die Intensität in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Intensitäten in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. Die Proteinspiegel von ASCT2 wurden auf die der GAPDH-normiert (B). Unabhängige Messwerte sind durch

Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-6$.

Die durch OSMI-1 reduzierte *O*-GlcNAcylierung des ASCT2 spiegelt sich auch in einer veränderten Lokalisation des ASCT2 wider. Während in Huh7-Zellen die anti-ASCT2-Immunoaktivität an der Plasmamembran reduziert war, wurden in HepG2-Zellen submembranär ASCT2-immunoreaktive vesikuläre Strukturen sichtbar. Parallel zur ASCT2-Immunoaktivität nahm auch die des Plasmamembranmarkers Na^+/K^+ -ATPase durch die Inkubation mit OSMI-1 ab (Abb. 25).

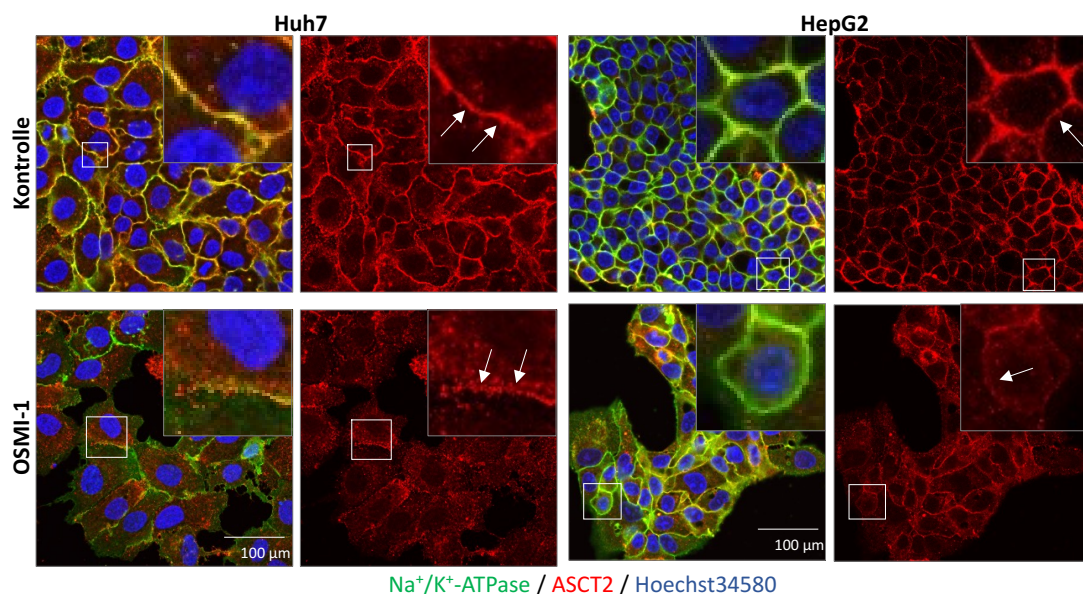


Abbildung 25: Effekte einer Protein-*O*-GlcNAcylierungshemmung auf die Lokalisation von ASCT2 in Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert und mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie ASCT2, Na^+/K^+ -ATPase analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 markiert. In den Übersichtsbildern markierte Bildbereiche (gestrichelte Linien) sind daneben vergrößert dargestellt, die Zellmembran mit Pfeilen kenntlich gemacht ($n=3$).

Im weiteren Verlauf wurden die Proteinspiegel von ASCT2 und der *O*-GlcNAcylierung in Huh7- und HepG2-Zellen in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 analysiert (Abb. 26). In Huh7-Zellen waren die Proteinspiegel des glykosylierten ASCT2 nach Inkubation mit OSMI-1 oder OSMI-1+V-9302 signifikant verringert. Dies ging einher mit tendenziell und signifikant reduzierten Spiegeln *O*-GlcNAcylierter Proteine. In den mit V-9302 inkubierten Huh7-Zellen waren hingegen keine Änderungen erkennbar (Abb. 26B). Tendenziell ähnlich waren die in den HepG2-Zellen beobachteten Effekte der Hemmstoffe auf die ASCT2- und *O*-GlcNAc-Spiegel, allerdings waren hier aufgrund der starken

Streuung und geringen n-Zahl nur signifikante Änderungen in den mit OSMI-1 inkubierten HepG2-Zellen auf Ebene der ASCT2-Proteinspiegel zu beobachten.

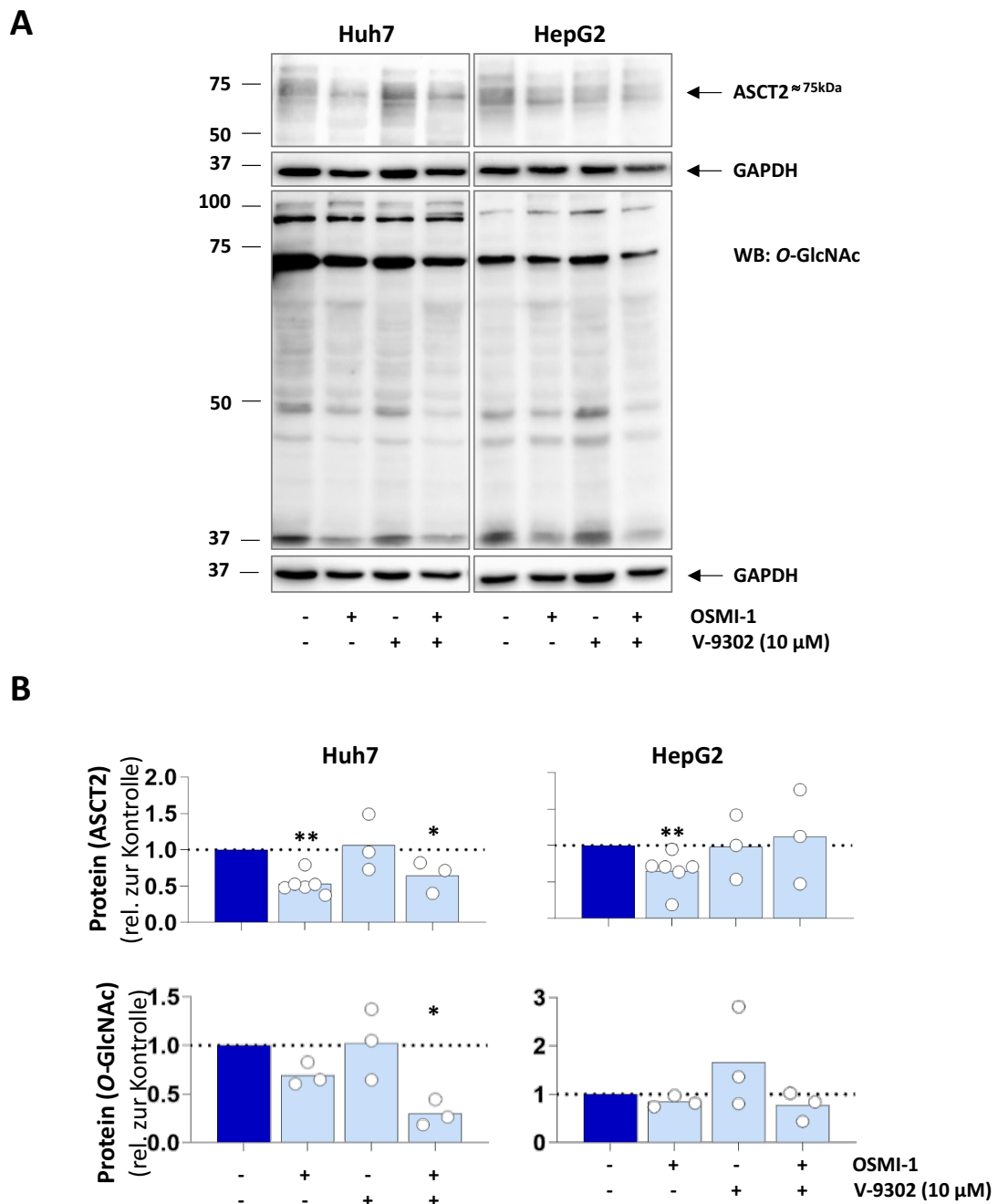


Abbildung 26: Spiegel von ASCT2 und O-GlcNAcylierten Proteinen in Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und ASCT2- sowie O-GlcNAc-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot analysiert (A). Densitometrische Analyse der anti-ASCT2- bzw. anti-O-GlcNAc-Immunoaktivität. Die Intensität in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Intensitäten in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. Die Proteinspiegel von ASCT2 sowie O-GlcNAc wurden auf die der GAPDH-normiert (B). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunnett's multipler Vergleichstest), $n = 3-6$.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von ASCT2 in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen bestimmt. Die Analyse erfolgte nach Behandlung mit OSMI-1 und/oder V-9302. Ein signifikanter Rückgang der ASCT2-mRNA-Spiegel wurde ausschließlich in HepG2-Zellen nach Inkubation mit OSMI-1 beobachtet. Unter allen anderen Versuchsbedingungen zeigten sich keine signifikant veränderten ASCT2-mRNA-Spiegel (Abb. 27).

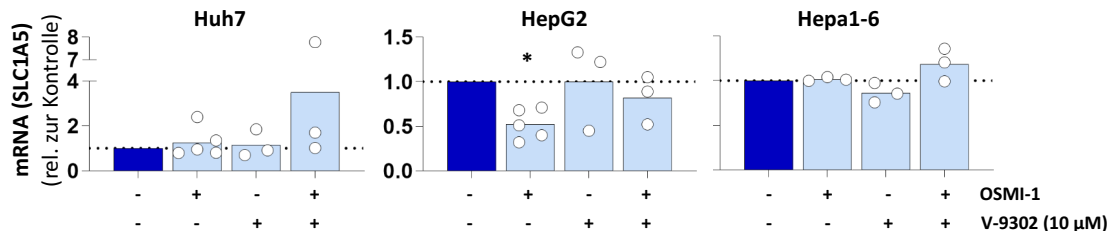


Abbildung 27: ASCT2-mRNA in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und die ASCT2-mRNA-Level wurden mittels qPCR analysiert. mRNA-Level in den unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die C_t -Werte in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. mRNA-Level von ASCT2 wurden auf die von HPRT normiert. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-5$.

3.3 Wirkungen der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und/oder von LAT1/SNAT2 auf die mRNA- und Proteinspiegel von LAT1 in Huh7- und HepG2-Zellen

Im Folgenden wurden Wirkungen einer Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die LAT1-mRNA und -Protein untersucht. Wie in Abbildung 28A gezeigt, waren die Proteinspiegel des LAT1 in den Huh7- und HepG2-Zellen in den mit OSMI-1 inkubierten Proben um ca. 50 % gegenüber der Kontrolle verringert (Abb. 28B). In beiden Zelllinien waren die LAT1-Proteinspiegel nach Koinkubation mit OSMI-1 und V-9302 signifikant reduziert gegenüber der Kontrolle. V-9302 hatte keinen Einfluss auf das LAT1-Proteinniveau (Abb. 28).

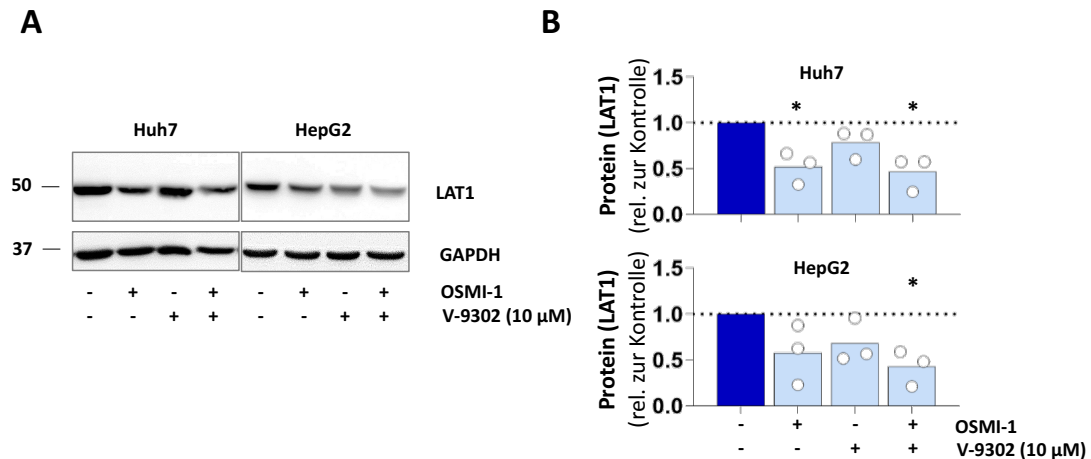


Abbildung 28: LAT1-Proteinspiegel in mit OSMI-1 und/oder V-9302 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und LAT1-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot analysiert (A). Densitometrische Analyse der anti-LAT1-Immunoaktivität. Die Intensität in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Intensitäten in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. Die Proteinspiegel von LAT1 wurden auf die der GAPDH-normiert (B). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3$.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von LAT1 in Huh7- und HepG2-Zellen bestimmt. Die Analyse erfolgte nach Inkubation mit OSMI-1 und/oder V-9302. Die mRNA-Spiegel des LAT1 nahm in Huh7- und HepG2-Zellen unter Koinkubation zu. Die Inkubation mit OSMI-1 oder V-9302 allein bewirkte weder in Huh7- noch in HepG2-Zellen eine signifikante Veränderung (Abb. 29).

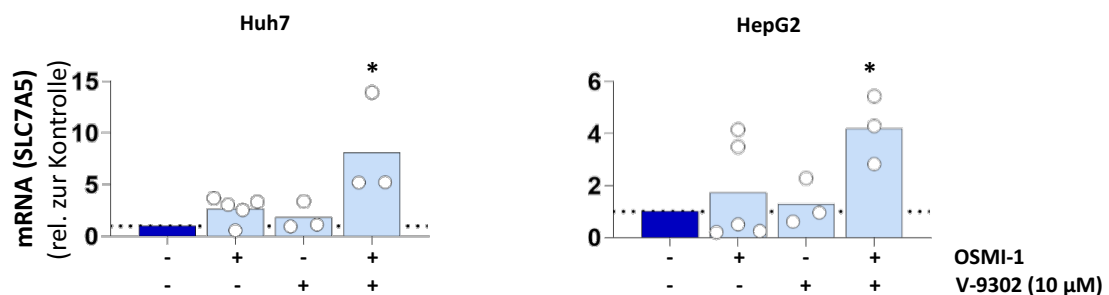


Abbildung 29: LAT1-mRNA in mit OSMI-1 und/oder V-9302 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und die LAT1-mRNA-Level wurden mittels qPCR analysiert. mRNA-Level in den unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die C_t -Werte in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. mRNA-Level von LAT1 wurden auf die von HPRT normiert. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-5$.

3.4 Weitere Aminosäuretransporter

Im Folgenden wurde die mRNA-Expression des SNAT1 und SNAT2 in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 in Huh7- und HepG2-Zellen überprüft.

Ein signifikanter Rückgang der mRNA-Expression von SNAT1 und SNAT2 nach Inkubation mit OSMI-1 konnte in den HepG2-Zellen beobachtet werden. Die Koinkubation von OSMI-1 und V-9302 führte in HepG2-Zellen beim SNAT2 ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion. Die Inkubation mit OSMI-1 und/oder V-9302 änderte in Huh7-Zellen die SNAT1- und SNAT2-mRNA-Level nicht. Bei den HepG2-Zellen konnte bis auf den Rückgang des SNAT1 und des SNAT2 mit OSMI-1 Inkubation und einem zusätzlichen Rückgang des SNAT2 unter Koinkubation ebenfalls kein Effekt auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Abb. 30).

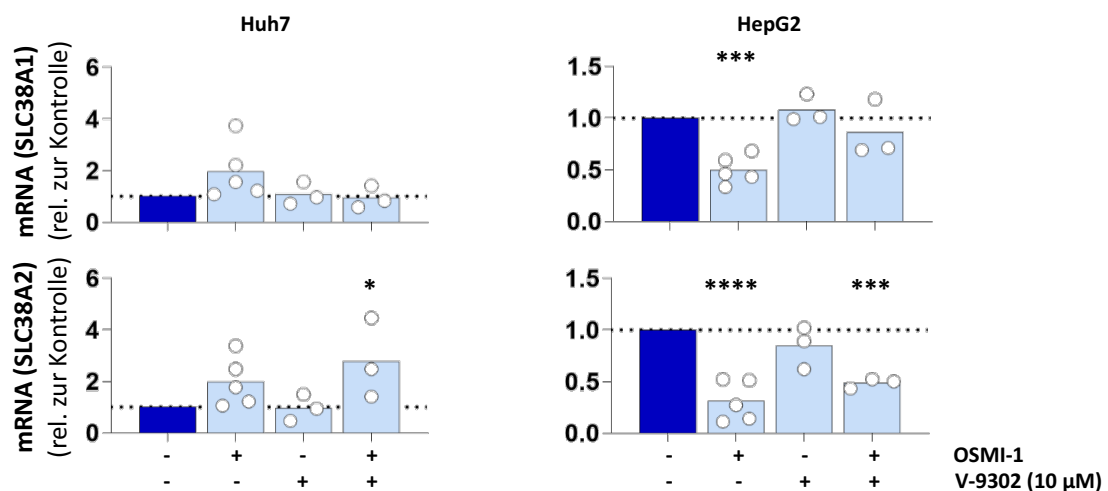


Abbildung 30: SNAT1- und SNAT2-mRNA in Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und die SNAT1- und SNAT2-mRNA-Level wurden mittels qPCR analysiert. mRNA-Level in den unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die C_t -Werte in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. mRNA-Level von SNAT1 bzw. SNAT2 wurden auf die von HPRT normiert. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: **** $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n = 3-5$.

3.5 Glutamin- und Kynurenin-Uptake

Im Folgenden wurden die intrazellulären Glutamin- und Glutamatkonzentrationen sowie die Aufnahme von Glutamin und dem daraus gebildeten Glutamat in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen mittels ^{13}C -markierten Glutamins massenspektrometrisch analysiert (Abb. 31). In Huh7-Zellen waren die Glutamin- und Glutamat-Spiegel (^{12}C -Glutamat) 72 Stunden nach Inkubation mit OSMI-1 nicht verändert. Demgegenüber waren beide in HepG2- und Hepa1-6-Zellen deutlich erhöht (signifikant oder stark tendenziell, Abb. 31).

Die Aufnahme von Glutamin und dessen Umwandlung im Metabolismus zu Glutamat (gemessen an ^{13}C -Glutamin bzw. -Glutamat) war tendenziell und signifikant verringert in Huh7-Zellen und signifikant erhöht in HepG2- und Hepa1-6-Zellen (Abb. 31).

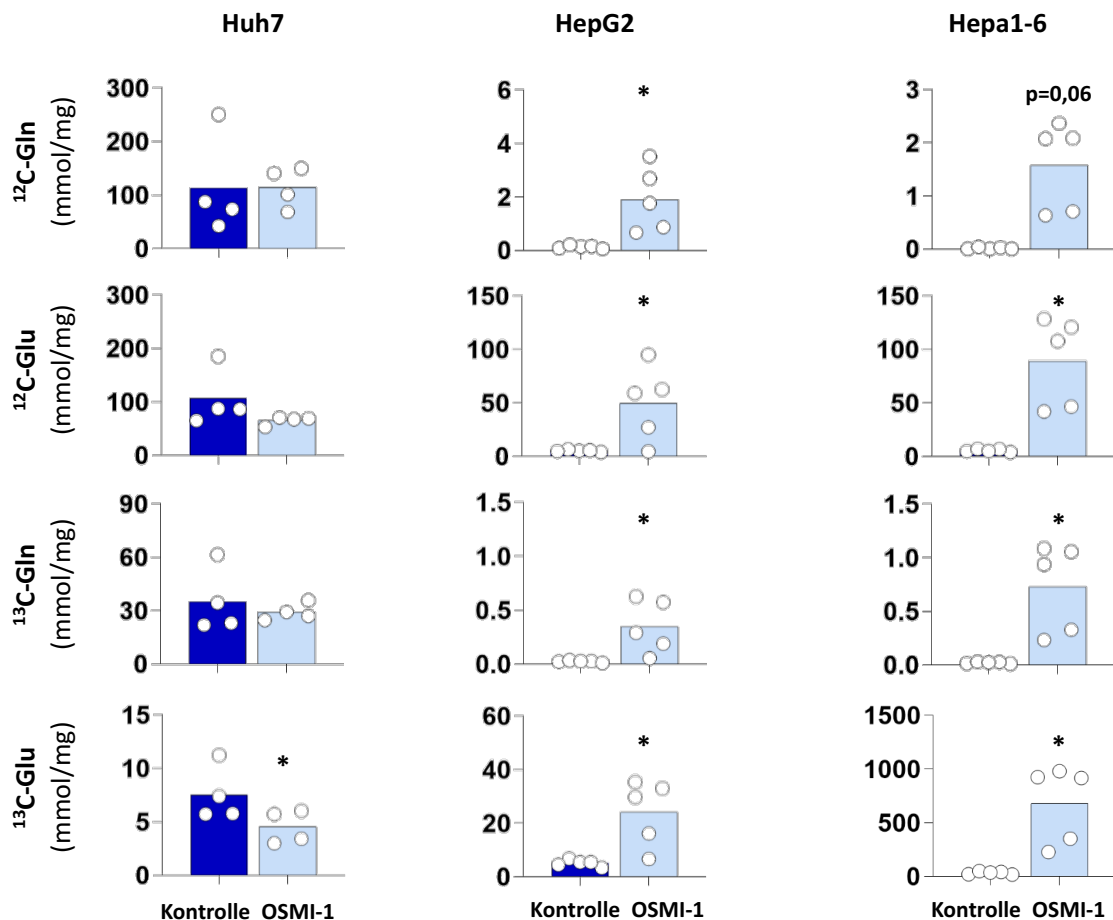


Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse der Aufnahme von ^{13}C -markiertem Glutamin sowie der intrazellulären ^{13}C -Glutamat-Spiegel und basalen ^{12}C -Glutamin-/ ^{12}C -Glutamat-Level in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 für 72 Stunden inkubiert. Nachdem sie für eine halbe Stunde mit Medium inkubiert wurden, welches ^{13}C -markiertes-Glutamin enthielt, wurden die Protein-Lysate massenspektrometrisch gemessen und der Gehalt an ^{13}C -Glutamin und -Glutamat sowie an ^{12}C -Glutamin und -Glutamat analysiert. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$ (einseitiger t-Test nach Student), $n=4-5$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass OSMI-1 die intrazellulären Glutamin- und Glutamat-Spiegel sowie die Aufnahme von Glutamin in Huh7 bzw. HepG2 und Hepa1-6 entgegengesetzt beeinflusst.

Im Folgenden wurde der Uptake von Kynurenin fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei dem Substrat Kynurenin handelt es sich um eine Aminosäure, die exklusiv über den LAT1 in die Zellen aufgenommen wird (95). In An- und Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 wurden Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen mit Kynurenin behandelt

und die Aufnahme fluoreszenzmikroskopisch mit dem Cell-Observer detektiert. Zur Kontrolle, ob es sich um ein spezifisches Signal durch die Aufnahme handelt, wurde jeweils eine Probe mit BCH vorinkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Hemmstoff für den LAT1. Bei entsprechend behandelten Zellen konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 32). Die Inkubationen mit OSMI-1 und/oder V-9302 führten zu einer Reduktion des Fluoreszenzsignals (Abb. 32).

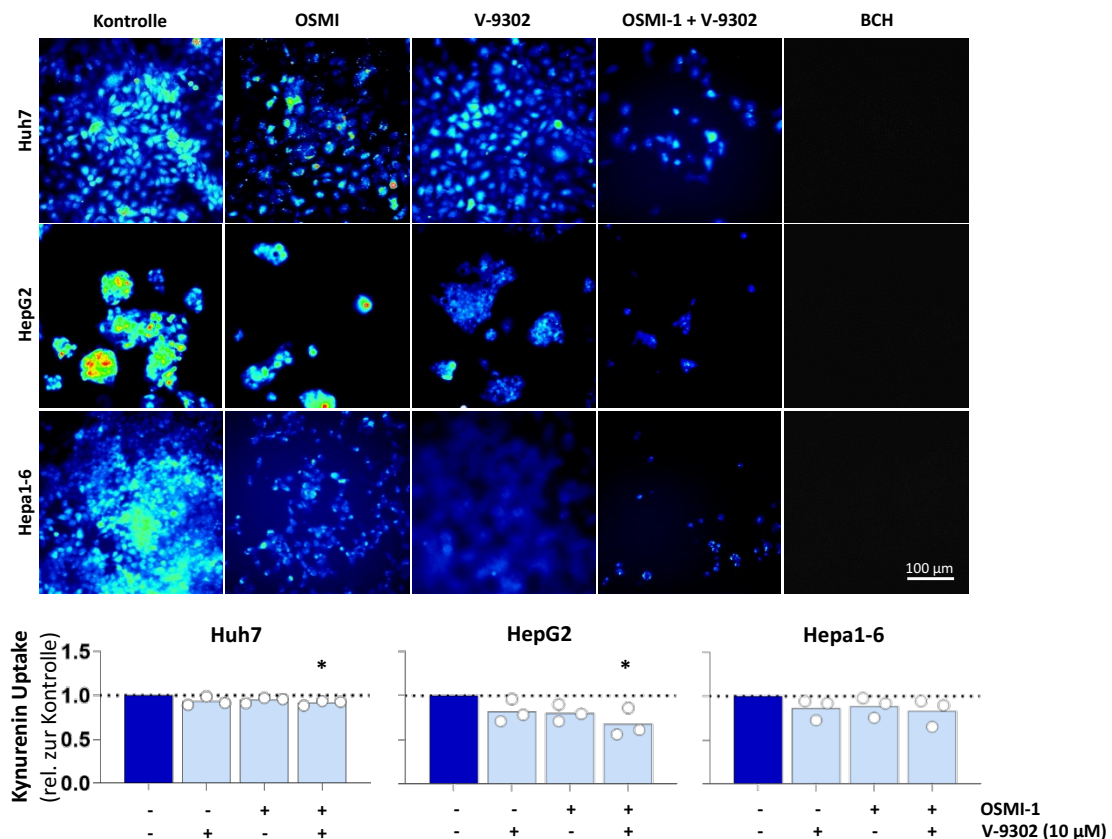


Abbildung 32: Kynurenin-Uptake in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen nach Inkubation mit OSMI-1 und/oder V-9302.

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert, anschließend für 4 Minuten mit Kynurenin inkubiert und nach Fixierung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur experimentellen Kontrolle wurde jeweils eine Probe vor der Inkubation mit Kynurenin mit BCH (Hemmstoff LAT1) vorinkubiert. Die in den behandelten Gruppen gemessenen Zelldichten wurden relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3$.

3.6 Effekt der Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Glutaminsynthetase und die Glutaminolyse in Huh7- und HepG2-Zellen

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob eine Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung potenziell die endogene Synthese von Glutamin und die Glutaminolyse zur Bereitstellung von Glutamat für den TCA-Zyklus beeinflussen kann.

Hierfür wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt und die Proteinspiegel der Glutaminsynthetase und Kidney-type-Glutaminase quantifiziert.

Während die Inkubation mit OSMI-1 die GS-Proteinspiegel in Huh7-Zellen signifikant auf ca. 60 % des Kontrollniveaus verringerte, verdoppelte sich die GS-Proteinmenge in HepG2-Zellen (Abb. 33A). Demgegenüber verringerte sich die KGA-Proteinmenge in beiden mit OSMI-1 inkubierten Hepatomazelllinien gleichermaßen auf unter 50 % des Kontrollniveaus (Abb. 33B).

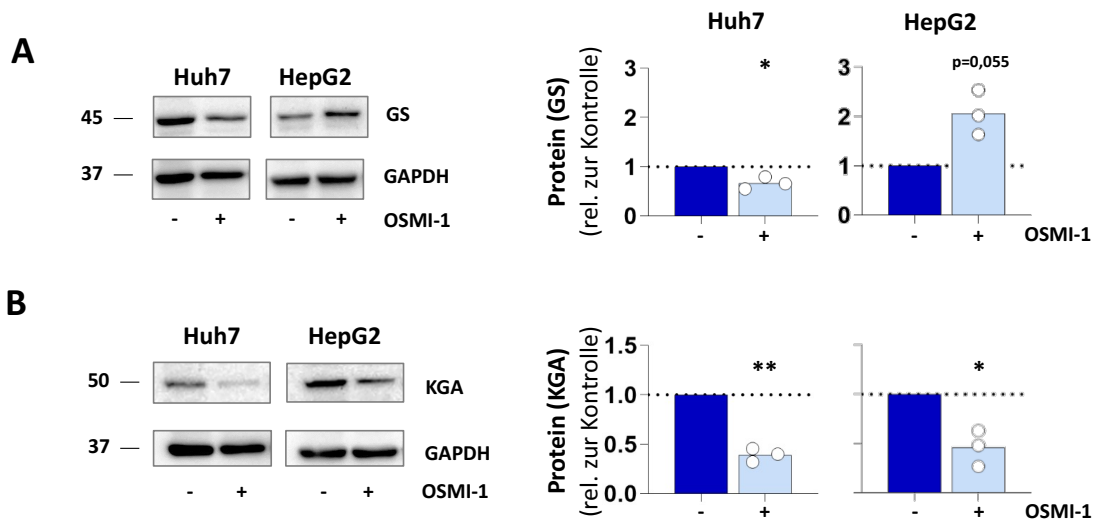


Abbildung 33: GS- und KGA-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 für 72 Stunden inkubiert und GS- und KGA-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot analysiert (**A**). Densitometrische Analyse der anti-GS- und anti-KGA-Immunoreaktivität. Die Intensität in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Intensitäten in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. Die Proteinspiegel von GS bzw. KGA wurden auf die der GAPDH-normiert (**B**). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (einseitiger t-Test nach Student), $n=3$.

Diese Daten sprechen dafür, dass die Hemmung der Protein-*O*-GlcNAcylierung durch OSMI-1 die endogene Synthese von Glutamin und die Glutaminolyse in Huh7- und HepG2-Zellen beeinflusst.

3.7 Effekte einer Hemmung von GLUT1 in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Viabilität von Huh7- und HepG2-Zellen

Mithilfe von Koloniebildungsassays wurde die Wirkung des GLUT1-Hemmstoffes STF-31 auf das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 34A erkennbar ist, hemmte die Inkubation der Zellen mit STF-31 die Koloniebildung in beiden Zelllinien nahezu vollständig und signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

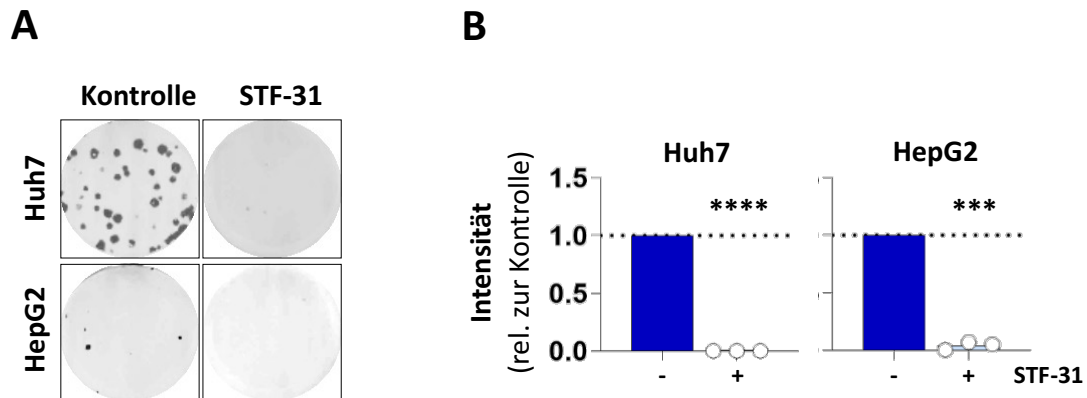


Abbildung 34: Bedeutung von Glukose für die Langzeitproliferation von Huh7- und HepG2-Hepatoma-zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von STF-31 über einen Zeitraum von 15 ± 5 Tagen kultiviert und die Proliferation mithilfe des Koloniebildungsassays untersucht (A). Quantifizierung angefärbter Kolonien mittels ImageJ-Software (B). Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$ (einseitiger t-Test nach Student), $n=3$.

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von STF-31 in An- oder Abwesenheit von V-9302 und OSMI-1 auf das Wachstum semikonfluent (70 %) ausgesäter Huh7- und HepG2-Zellen über einen kürzeren Beobachtungszeitraum (72 Stunden) mittels Fluorimetrie (s. 2.2.4) quantifiziert (Abb. 35).

Wie in Abbildung 35 erkennbar ist, hemmten SFT-31, OSMI-1 oder V-9302 das Wachstum der Huh7- und HepG2-Zellen signifikant. Die Koinkubation von STF-31 mit V-9302 oder OSMI-1 verstärkte die wachstumshemmende Wirkung verglichen mit der Inkubation der Einzelsubstanzen. Wurden die Zellen mit allen drei Substanzen inkubiert, wurde dieser Effekt noch einmal gesteigert (Abb. 35). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen abhängig ist von der Glukoseaufnahme durch den GLUT1, dem Aminosäuretransporter durch LAT1/SNAT2 und der Protein-O-GlcNAcylierung.

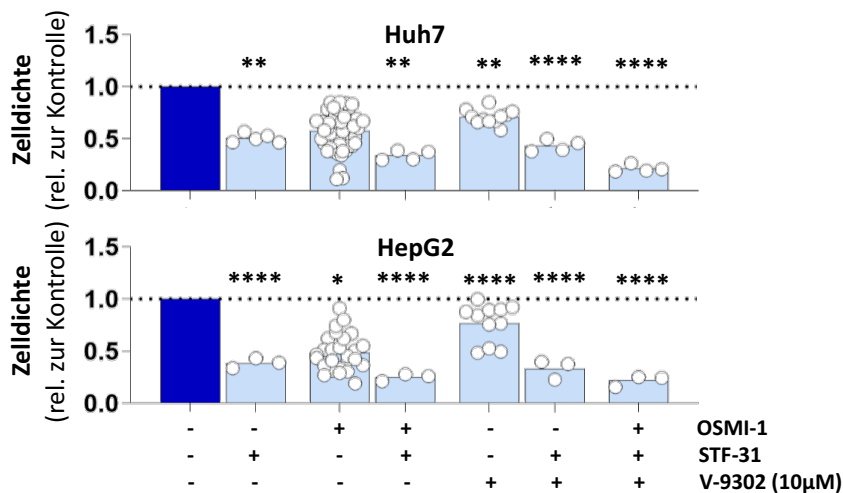


Abbildung 35: Effekte der Hemmung von GLUT1, LAT1/SNAT2, und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf das Wachstum humaner Hepatomazellen.

Huh7- und HepG2-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit der angegebenen Substanzen 3 Tage kultiviert und die Populationsgröße durch fluorimetrische Messung Hoechst34580-gefärbter Zellkerne quantifiziert. Die in den behandelten Gruppen gefundene Zelldichte ist relativ zu der in den unbehandelten Kontrollen angegeben. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus gegenüber der Kontrolle: ****: $p < 0.0001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n = 3-54$.

In nachfolgenden Experimenten wurde mittels Western-Blot die Wirkungen einer Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Proteinspiegel des GLUT1 in Huh7- und HepG2-Zellen untersucht. Im Western-Blot wurde eine anti-GLUT1-Immunoreaktivität im Molekulargewichtsbereich zwischen 37-250 kDa beobachtet, die auf multiple post-translationale Modifikationen des GLUT1 (Molekulargewicht ca. 50 kDa) zurückzuführen ist (O-GlcNAcylierung, N-Glykosylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung etc.) (96). Wie in Abbildung 36 gezeigt, steigerte OSMI-1 die anti-GLUT1-Immunoreaktivität im Molekulargewichtsbereich zwischen 37-250 kDa in Huh7-Zellen und verringerte sie in HepG2-Zellen (Abb. 36B). In Huh7-Zellen verringerte sich die Proteinmenge des unmodifizierten GLUT1 nach Inkubation mit OSMI-1 nicht, wohingegen es in HepG2-Zellen abnahm (Abb. 36C).

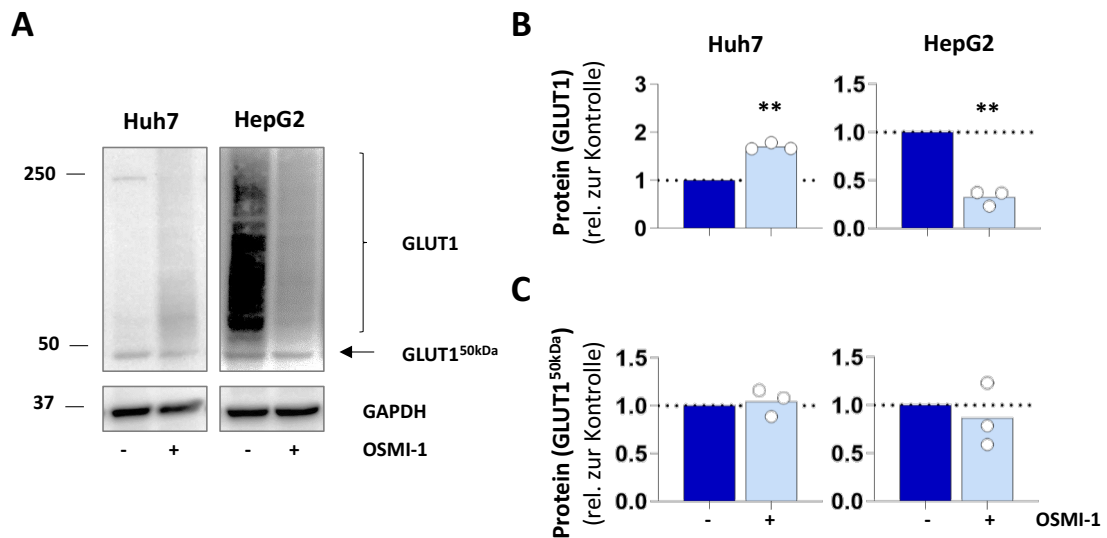


Abbildung 36: GLUT1-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 für 72 Stunden inkubiert und GLUT1-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot analysiert (A). Densitometrische Analyse der anti-GLUT1-Immunoaktivität. Die Intensität in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Intensitäten in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. Die Proteinspiegel von GLUT1 wurden auf die der GAPDH-normiert (B). Die Proteinspiegel von GLUT1^{50kDa} wurden auf die der GAPDH-normiert (C). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: **: p<0.01 (einseitiger t-Test nach Student), n=3.

Quantitative PCR-Analysen zeigten, dass die Slc1a2-mRNA nach Inkubation mit OSMI-1 und Koinkubation mit V-9302 in HepG2, aber nicht in Huh7-Zellen verringert war. Die Inkubation mit V-9302 in Abwesenheit von OSMI-1 veränderte die Slc1a2-mRNA-Spiegel hingegen nicht (Abb. 37).

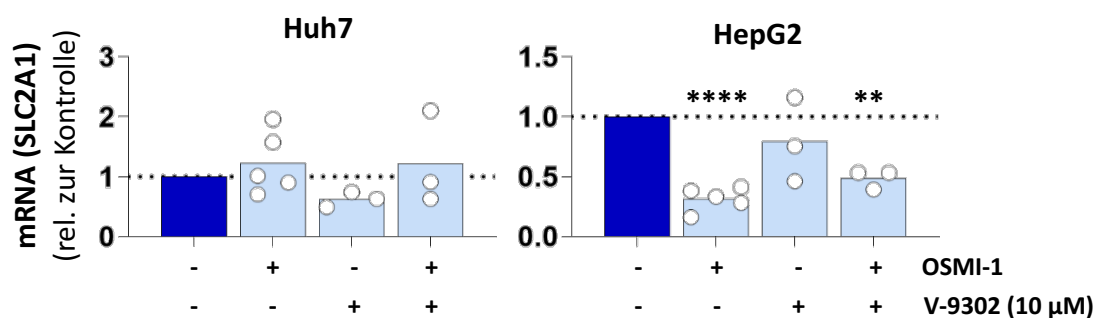


Abbildung 37: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die GLUT1-mRNA-Spiegel in Huh7- und HepG2-Zellen.

Huh7- und HepG2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit OSMI-1 und/oder V-9302 für 72 Stunden inkubiert und die GLUT1-mRNA-Level wurden mittels qPCR analysiert. mRNA-Level in den unbehandelten Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die C_t-Werte in den anderen Proben sind relativ dazu angegeben. mRNA-Level von GLUT1 wurden auf die von HPRT normiert. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: ****: p<0.0001, **: p<0.01 (Ordinary one-way, Dunn's multipler Vergleichstest), n=3-5.

Mithilfe von Immunfluoreszenz-Analysen und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde untersucht, ob die zelluläre Lokalisation von GLUT1 durch OSMI-1 und/oder V-

9302 in Huh7- und HepG2-Zellen beeinflusst wird. In allen untersuchten Zelltypen blieb die plasmamembranäre Lokalisation von GLUT1 unter allen Inkubationsbedingungen erhalten (Abb. 38). In den mit OSMI-1 inkubierten HepG2- und gelegentlich auch in den Huh7-Zellen waren verstärkt anti-GLUT1-immunoreaktive Vesikel beobachtbar. Diese Strukturen waren in den Hepa1-6-Zellen im Vergleich zu den Huh7- und HepG2-Zellen bereits unter Kontrollbedingungen sichtbar.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die zelluläre Lokalisation von GLUT1 unter diesen experimentellen Bedingungen nicht durch OSMI-1 und/oder V-9302 verändert ist.

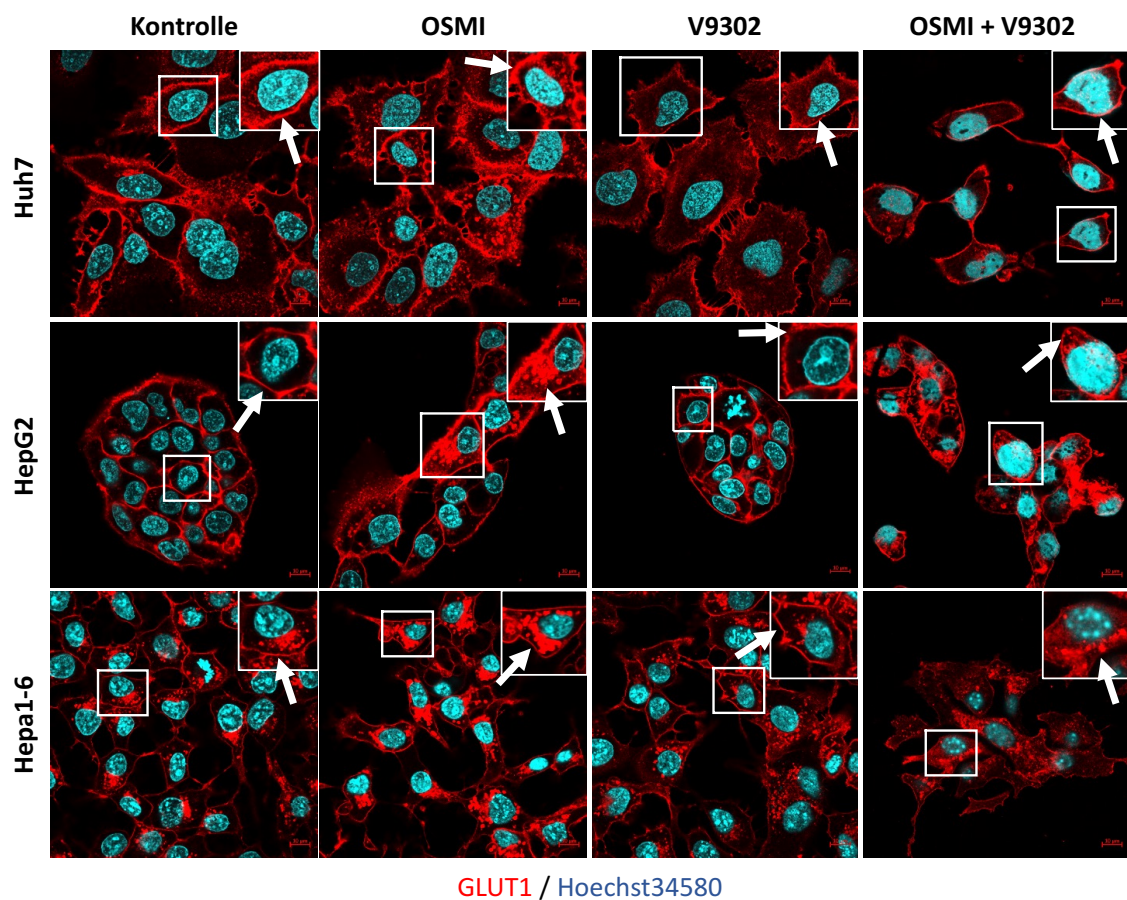


Abbildung 38: Effekte einer Hemmung des LAT1/SNAT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Lokalisation von GLUT1 in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.

Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von OSMI-1 und/oder V-9302 über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert und mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie GLUT1 analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 markiert. In den Übersichtsbildern markierte Bildbereiche (gestrichelte Linien) sind daneben vergrößert dargestellt (n=3).

3.8 Wirksamkeit von OSMI-1 und V-9302 auf das Wachstum von Hepatomazellen *in vivo*

3.8.1 Effekte von OSMI-1 und V-9302 auf das Tumorwachstum im Allograft-Modell

Die *in vitro* beobachtete anti-Tumor Wirksamkeit von OSMI-1 und/oder V-9302 wurde im Allograft-Modell *in vivo* untersucht (Abb. 39A). Alle Tiere wurden 8 Tage nach Versuchsstart (Injektion der Zellen) fotografiert. Die makroskopischen Bilder zeigen zu diesem Zeitpunkt gut sichtbare Tumore im Injektionsbereich. Die Tumorgöße in den mit OSMI-1+V-9302-behandelten Mäusen war kleiner als in den Tieren, die mit Vehikel oder nur mit V-9302 oder OSMI-1 behandelt wurden (Abb. 39B).

Die Tumorumfänge wurden zusätzlich *ex vivo* durch Bestimmung ihres Verdrängungsvolumens quantifiziert. Die volumetrische Analyse zeigte dabei eine signifikant geringere Flüssigkeitsverdrängung durch die Tumore derjenigen Tiere, die mit beiden Substanzen behandelt wurden, verglichen mit solchen, die jeweils nur das Vehikel bzw. eine der beiden Substanzen erhielten (Abb. 39C).

Dabei war das verringerte Tumorwachstum mit einer längeren Zeitspanne bis zum Erreichen des Versuchsabbruchkriteriums (Tumordurchmesser > 1,5 cm) verbunden und dadurch definiert mit einer höheren Überlebenszeit. In den mit Vehikel behandelten Gruppen erreichten alle Tiere das definierte Abbruchkriterium vor Ablauf der geplanten dreiwöchigen Behandlungs- und Beobachtungsdauer. In der Monobehandlung mit V-9302 oder OSMI-1 hatte lediglich ein Tier nach Ablauf der Behandlungsdauer einen Tumordurchmesser kleiner als 1,5 cm. In der mit V-9302+OSMI-1 behandelten Gruppe mussten hingegen nur zwei Tiere vorzeitig aus dem Versuch genommen werden, während die übrigen Tiere den Behandlungszeitraum vollständig durchliefen (Abb. 39D).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die kombinierte Behandlung der Mäuse im Allograft-Tumormodell mit OSMI-1+V-9302 das Wachstum der Hepa1-6-Zellen *in vivo* hemmt.

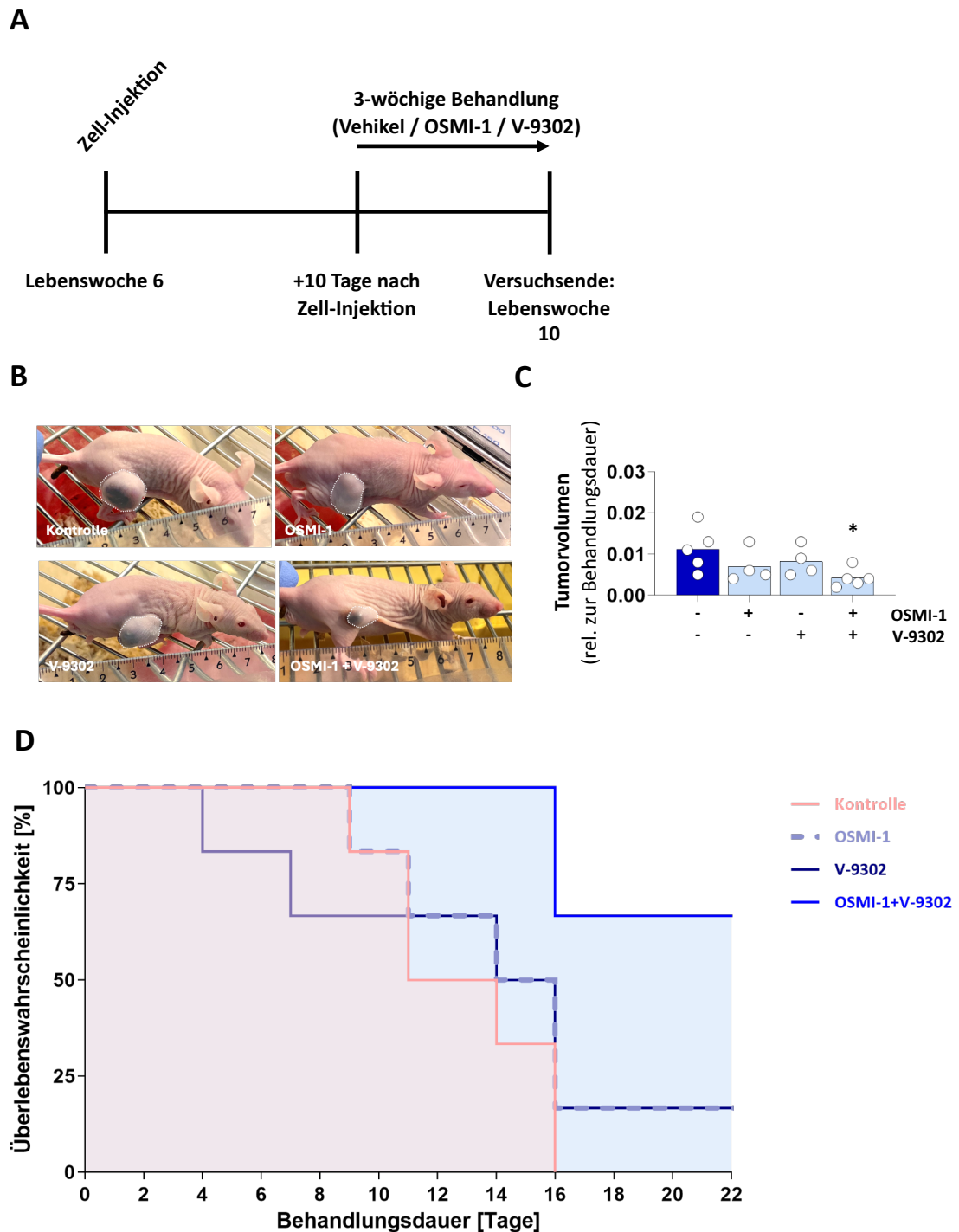


Abbildung 39: Effekte der Verabreichung von OSMI-1, V-9302 oder beiden Substanzen auf das Wachstum von Hepa1-6 Hepatomazellen *in vivo*.

Männlichen BALB/c-nu Mäusen wurden Hepa1-6-Zellen subcutan injiziert. Nach 10 Tagen wurde den Tieren bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums entweder das Vehikel, OSMI-1 und/oder V-9302 i.p. verabreicht (A). Repräsentative Fotos von Tumoren der Behandlungsgruppen 8 Tage nach Behandlungsstart (B). Tumorvolumen am Ende des Versuchszeitraums bestimmt mittels Volumetrie. Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=4-5$ (C). Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere angeben als Kaplan-Meier-Kurve (D).

3.8.2 Untersuchungen zur Lebertoxizität von OSMI-1 und V-9302 in der Maus

Zur Analyse potenzieller toxischer Wirkungen der verwendeten Verbindungen wurden für eine Leberschädigung charakteristische Biomarker und als Funktionsparameter für die Leberfunktion Bilirubin im Serum gemessen (Abb. 40). In keiner der Untersuchungsgruppen lagen die ALP, AST oder Bilirubin oberhalb des Normbereichs. Weder OSMI-1 noch V-9302 allein noch deren kombinierte Verabreichung steigerte diese Parameter. Die Bilirubin-Werte waren in den mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten Gruppe signifikant oder tendenziell reduziert gegenüber der Kontrolle. Die ALT- und GLDH-Serumwerte lagen in der Vehikel-Gruppe oberhalb des Normbereichs und wurden durch die einzelnen oder kombinierten Behandlungen ebenfalls tendenziell oder signifikant verringert (Abb. 40).

Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass die Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 in diesem Tiermodell keine Leberschädigung induziert.

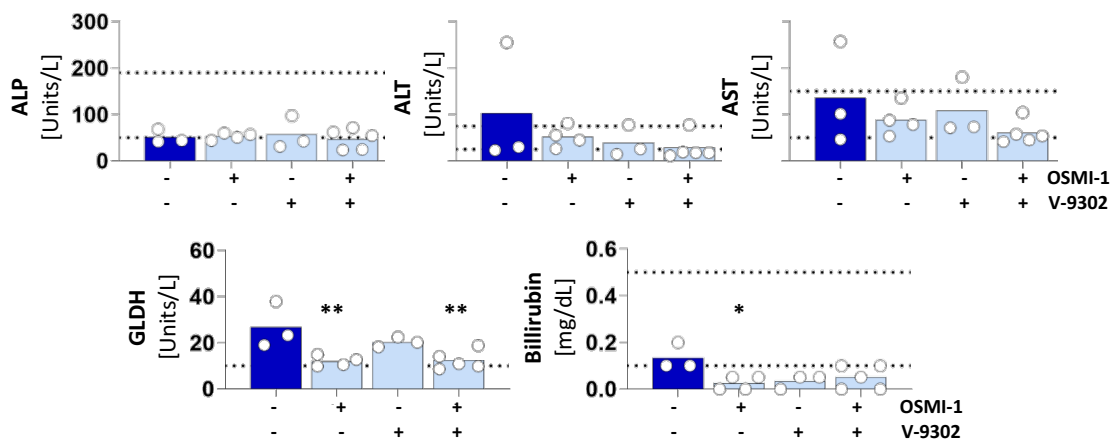


Abbildung 40: Surrogatmarker für Zellschädigung und Leberfunktion im Serum von mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten Mäusen.

Serum-Level von ALP, AST, ALT, GLDH und Bilirubin der mit OSMI-1 (5 mg/kg Körpergewicht) und/oder V-9302 (30 mg/kg Körpergewicht) behandelten Tiere verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-5$.

3.8.3 Effekte von OSMI-1 und V-9302 auf das Wachstum von Lebertumoren im HDI-Modell

Die Effekte von OSMI-1 und/oder V-9302 auf das Tumorstadium wurden im HDI-Lebertumor-Modell untersucht. Hierfür wurden die Mäuse wie in Abbildung 41A

schematisch beschrieben behandelt. Abbildung 41B zeigt repräsentative Lebern aus den unterschiedlich behandelten Tieren. In allen HDI-behandelten Tieren sind Tumore in der Leber erkennbar. Verglichen mit den mit dem Vehikel behandelten Gruppen, sind weniger Tumore an den Lebern der mit OSMI-1+V-9302 behandelten Tiere erkennbar (Abb. 41B).

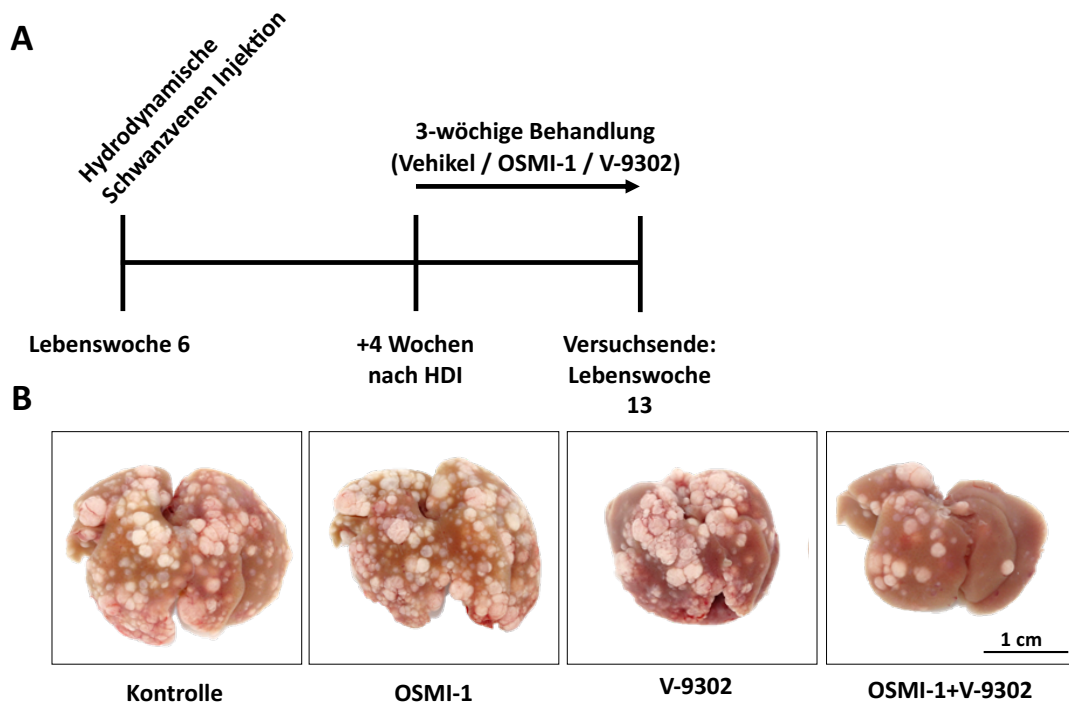


Abbildung 41: Versuchsablauf und Effekte der Verabreichung von OSMI-1, V-9302 oder beiden Substanzen auf das HCC-Wachstum im HDI-Lebertumormodell.

Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Männlichen C57BL/6J Mäusen wurden mittels HDI die onkogenen Plasmide *c-myc Nras^{G12V}* und Transposase SB13 injiziert. Nach 4 Wochen wurde mit einer dreiwöchigen Verabreichung von Vehikel, V-9302, OSMI-1 oder V-9302+OSMI-1 begonnen (A). Repräsentative Fotoaufnahmen der Lebern am Versuchsende (B).

Zur Erfassung der Lebertumore wurde Kollagen IV in den in Paraffin eingebetteten Leberschnitten angefärbt und das Gewebe mittels Hämatoxylin gegengefärbt (Abb. 42). Die Anzahl und Fläche der tumorpositiven Bereiche wurde mithilfe des Programms QuPath (Abb. 42B) und arivis Cloud (Abb. 42C) ermittelt. Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Analyse-Techniken sind weitestgehend kongruent zueinander. Beide zeigten, dass die Tumoranzahl durch keine der Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle in den unterschiedlich behandelten Lebern verändert wurde. Demgegenüber war die relative Tumorphäche signifikant in den mit OSMI-1+V-9302-behandelten Mäusen gegenüber den mit dem Vehikel behandelten Tieren reduziert. Dies ging einher mit einer

signifikanten (QuPath) bzw. tendenziellen (arivis Cloud) Verringerung der Tumorgröße in den mit OSMI-1+V-9302-behandelten Tieren (Abb. 42B, C).

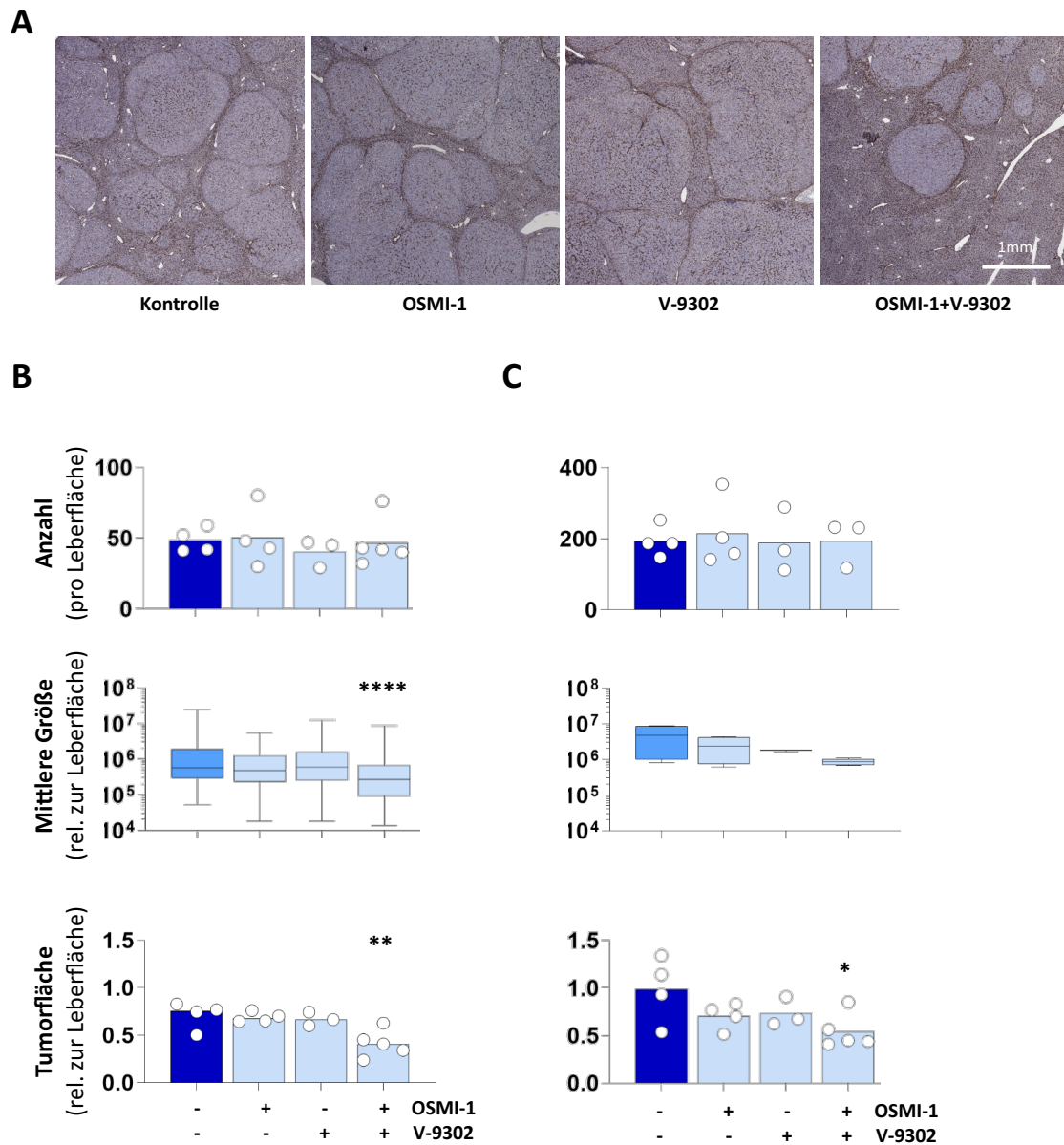


Abbildung 42: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf das HCC-Wachstum im HDI-Lebertumormodell.

Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen IV in Leberschnitten. Das Lebergewebe wurde mittels Hämatoxilin gegengefärbt (A). Quantifizierung des Tumorgewebes (Anzahl, Größe und Fläche der Tumore) mit QuPath (B) bzw. arivis Cloud (C). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$ (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multiplexer Vergleichstest), $n=3-5$.

3.8.4 Untersuchungen zur Lebertoxizität von OSMI-1 und V-9302 in der Maus

Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich das Körper- und Lebergewicht der Mäuse in den unterschiedlichen Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 43A). Auch die im Serum gemessenen Spiegel der Leberenzyme ALT, AST und ALP sowie GLDH und Bilirubin waren in keiner der Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 43B). In der Gruppe der mit OSMI-1+V-9302 behandelten Mäuse stiegen die GLDH-Spiegel tendenziell, aber nicht signifikant an (Abb. 43B).

Diese Befunde sprechen dafür, dass die Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 im HDI-Lebertumor-Modell nicht leberschädigend wirkt.

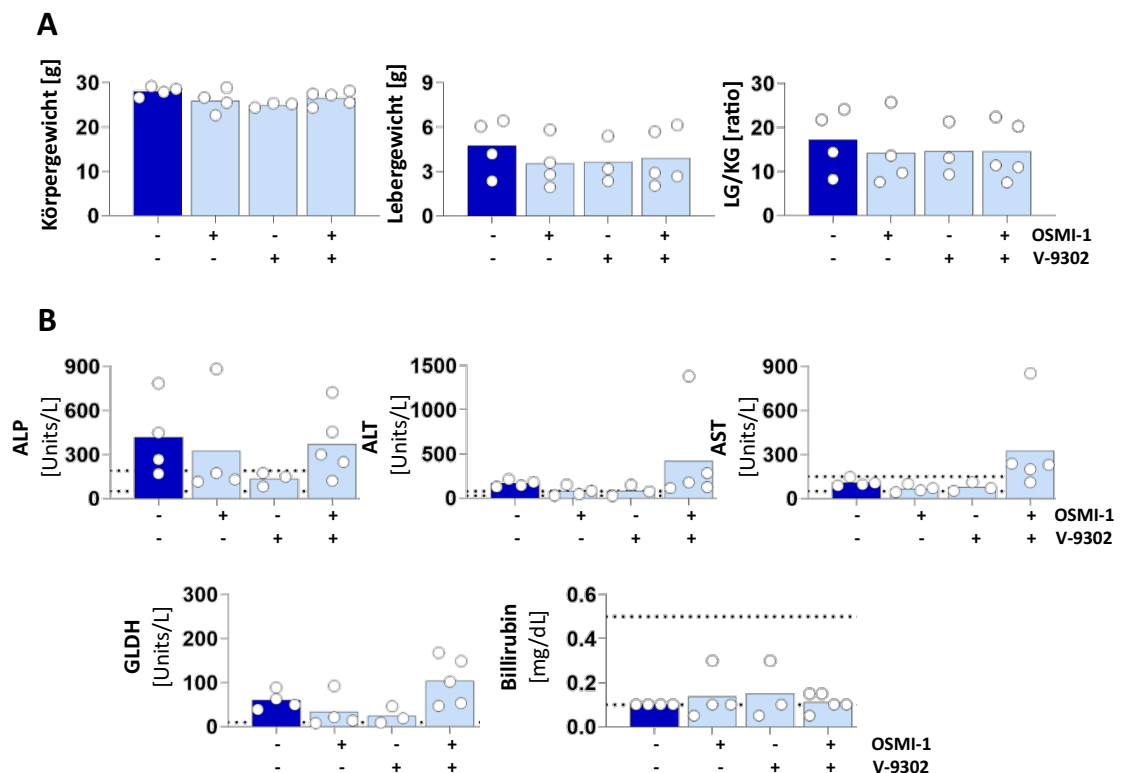


Abbildung 43: Biometrie und Surrogatmarker für Zellschädigung und Leberfunktion im Serum von mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten Mäusen.

Körper-, Lebergewicht und dessen Verhältnis (A) und Serum-Level von ALP, AST, ALT, GLDH und Bilirubin (B) in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen. Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), n=3-5.

3.8.5 Nachweis von T- und B-Zellen und Makrophagen in der Leber mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten HDI-Mäusen

Mittels immunhistochemischen Färbungen wurde die Quantität und Verteilung von B-Zellen (B220), Makrophagen (F4/80) und T-Zellen (CD3) in den Leberschnitten

untersucht. Weder in den mit OSMI-1 oder V-9302 einzelbehandelten Mäusen noch in den mit beiden Substanzen behandelten Mäusen war ein signifikanter Unterschied in der Quantifizierung der drei einzelnen Färbungen erkennbar (Abb. 44B). Tendenziell war die Anzahl der T- und B-Zellen in den mit OSMI-1 oder V-9302 behandelten Tieren und die Anzahl der Makrophagen in den mit V-9302 und mit OSMI-1+V-9302 behandelten Tieren in der Leber erhöht (Abb. 44).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlungen die Zellzahlen der untersuchten Immunzellen in der Leber nicht signifikant veränderten.

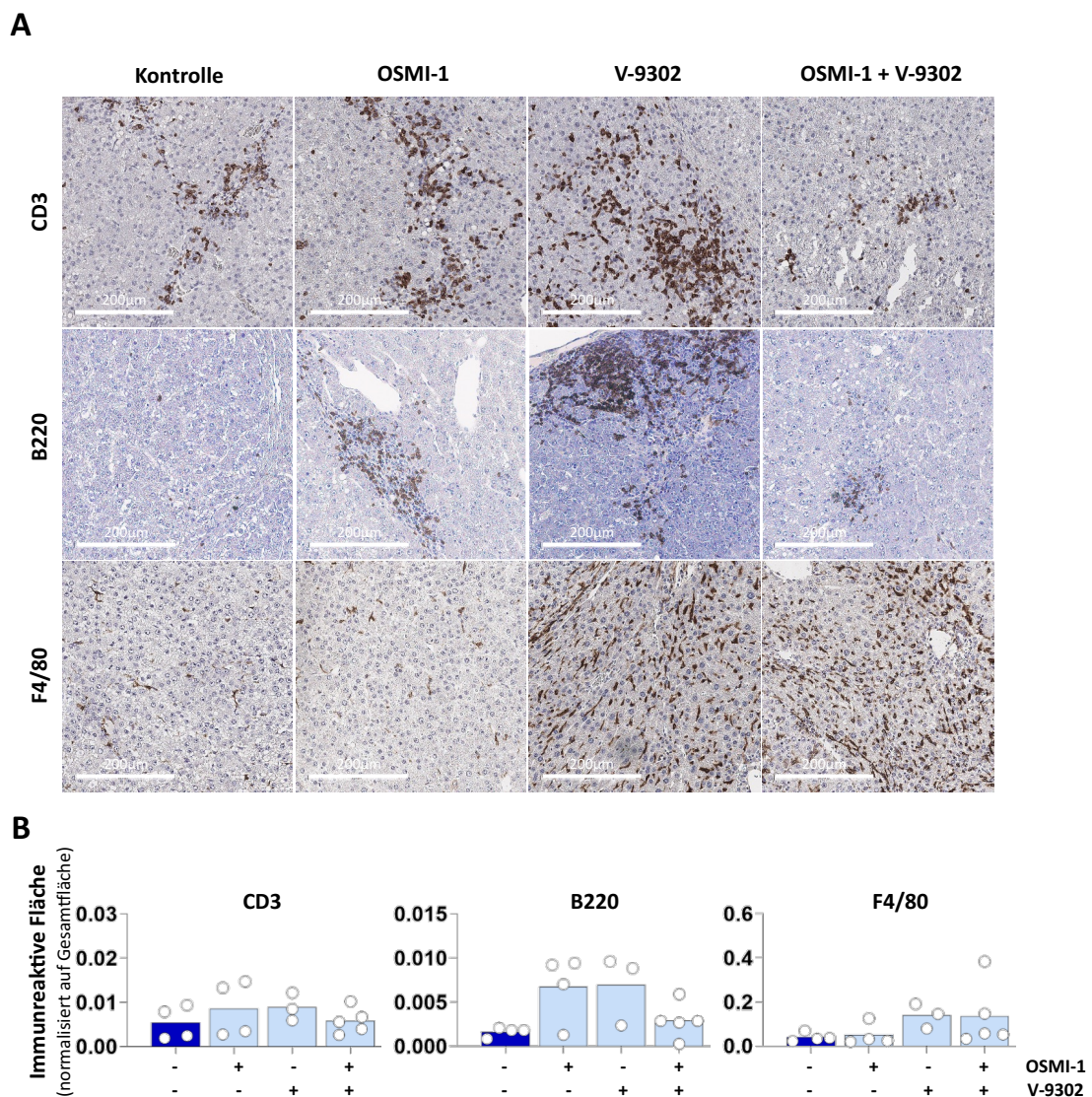


Abbildung 44: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Quantität von T- und B-Zellen und Makrophagen in der Leber im HDI-Modell.

Leberschnitte wurden immunohistochemisch mit Antikörpern gegen CD3, B220 und F4/80 angefärbt. Das Lebergewebe wurde mittels Hämatoxylin gegengefärbt (A). Intellesis-basierte Quantifizierung der CD3-, B220 und F4/80-positiven Zellen (B). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. (Ordinary one-way ANOVA/Kruskal-Wallis, Dunn's multipler Vergleichstest), n=3-5.

3.8.6 Metabolische Zonierung in der Leber mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelte HDI-Mäuse

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde die Quantität und Verteilung der Glutaminsynthetase, die ein Surrogatmarker für die metabolische Zonierung der Leber ist, in Leberschnitten untersucht. Bei relativer Betrachtung zur Gesamtfläche des Leberabschnitts, stieg die Fläche GS-positiver Zellen in den mit OSMI-1 oder V-9302 behandelten Mäusen gegenüber der Kontrolle nicht signifikant an (Abb. 45B). Demgegenüber war die Fläche GS-positiver Zellen in den mit OSMI-1+V-9302 behandelten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 45B).

Die HDI-vermittelte Tumorinduktion veränderte die Zonierung der GS im Lebergewebe deutlich: Häufig befanden sich die GS-positiven Zellen unmittelbar am Grenzbereich von gesundem zu Tumorgewebe. Mit der Reduktion der Tumormasse durch kombinierte Behandlung mit OSMI-1 und V-9302 (Abb. 42) normalisierte sich die Zonierung der GS teilweise wieder (Abb. 45A).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Induktion von Lebertumoren im HDI-Tumormodell die Zonierung der GS in der Leber verändert, aber dass in den Tumoren selbst keine GS vorhanden ist.

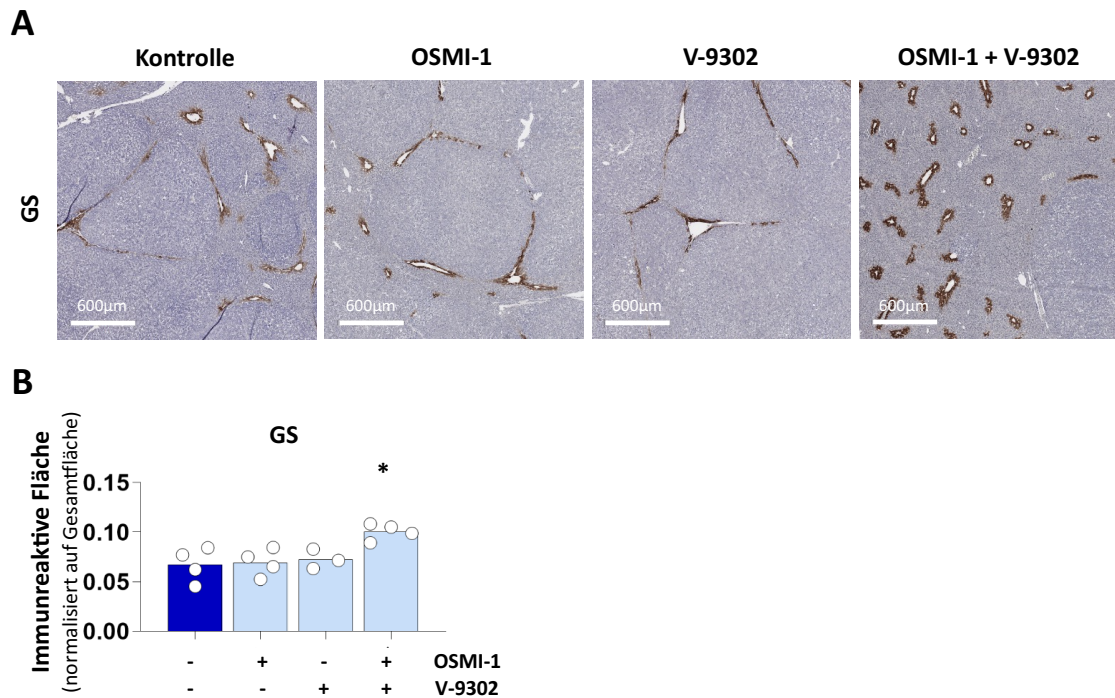


Abbildung 45: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Lokalisation und Quantität der GS in der Leber im HDI-Modell.

Leberschnitte Vehikel-, OSMI-1- und/oder V-9302-behandelter Mäuse wurden immunohistochemisch mit Antikörpern gegen GS angefärbt. Das Lebergewebe wurde mittels Hämatoxylin gegengefärbt (A). Quantifiziert wurden die GS-positiven Flächen mithilfe des Programms Intellesis von ZEISS (B). Unabhängige Messwerte sind durch Punkte dargestellt. Signifikanzniveaus: *: $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA, Dunn's multipler Vergleichstest), $n=3-5$.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig, dass eine Beeinträchtigung des Glutamin-/Aminosäurestoffwechsels durch gleichzeitige Hemmung der Aminosäuretransporter LAT1/SNAT2 und der Protein-O-GlcNAcylierung das Wachstum von Hepatomazellen *in vitro* und *in vivo* hemmt.

4.1 Rolle von Glutamin für die durch Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und/oder des Aminosäuretransports vermittelte Wachstums- und Viabilitätsreduktion

Bedeutung der Synthese, der Aufnahme und des Metabolismus von Glutamin für das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen

Der Aminosäure Glutamin, die durch den ASCT2 und LAT1/SNAT2 aufgenommen werden kann, wird eine große Bedeutung für das Tumorzellwachstum zugeschrieben (17). Einige Arbeiten vermuten jedoch, dass das Wachstum von Hepatomazellen abhängig ist von der endogenen Synthese: So zeigen z.B. Untersuchungen von Elmetewalli *et al.* 2023 eine Abnahme der Viabilität kultivierter HepG2-Zellen durch den Glutaminsynthetase-Hemmstoff MSO mittels MTT-Assay (97). Die vorliegende Arbeit zeigt hingegen keine Reduktion des Wachstums von HepG2- oder von Huh7-Zellen (Abb. 13, 14). Eine mögliche Erklärung dafür könnten unterschiedliche Glutaminmengen im jeweils verwendeten Kulturmedium sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen in DMEM/F-12 kultiviert, welches stabilisiertes Glutamin (Glutamax=L-Alanyl-L-Glutamin) enthält und somit eine kontinuierliche Bereitstellung gewährleistet, ohne dass die Zellen auf eine endogene Synthese angewiesen sind. Die Aufnahme von Glutamax erfolgt Aminosäuretransporter-unabhängig und die Freisetzung von L-Glutamin wird durch Dipeptidasen im Zytosol bewerkstelligt (98). Es ist denkbar, dass das in der Studie von Elmetewalli *et al.* 2023 eingesetzte DMEM einen niedrigeren Glutamingehalt aufwies, sodass die Zellen zur Bedarfsdeckung vermehrt selbst Glutamin synthetisieren mussten. Abschließend verifizieren lässt sich diese Vermutung jedoch nicht, da in der Arbeit von Elmetewalli *et al.* 2023 die Zusammensetzung des Kulturmediums und die Zugabe von Supplementen

nicht beschrieben wurde. Für Huh7-Zellen wurde hingegen in Proliferations-untersuchungen von Nowosu *et al.* 2018 gezeigt, dass die Hemmung der Glutaminsynthese durch MSO, wie in der vorliegenden Arbeit, keinen Effekt auf die Proliferation hat (99).

Im Gegensatz zur Hemmung der endogenen Glutaminsynthese verminderte eine Hemmung der Glutaminolyse mittels BPTES in der vorliegenden Arbeit die Viabilität und das Wachstum von HepG2- und Huh7-Zellen signifikant (Abb. 13, 14). Dieser Befund ist im Einklang mit Daten von Lee *et al.* 2014, die mittels Koloniebildungsassays an HepG2-Zellen eine dosisabhängige wachstumshemmende Wirkung von BPTES ab einer Konzentration von 2 μM zeigten (100). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit fanden Jin *et al.* 2020 eine Wachstumshemmung von Huh7-Zellen durch BPTES im Koloniebildungsassay ab einer Konzentration von 8 μM (91). Darüber hinaus wurde das Wachstum von HepG2-Zellen durch den Glutaminase-Hemmstoff CB-839 vermindert (91).

Die Hemmung des Transports von Glutamin (sowie weiterer Aminosäuren) über LAT1 und SNAT2 mittels V-9302 führte in Huh7- und HepG2-Zellen zu einer je nach Zelltyp variablen, konzentrationsabhängigen Reduktion von Viabilität und Wachstum (Abb. 13, 14). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Jin *et al.* 2020 an HepG2-Zellen gemachten Beobachtungen (91) die zeigen, dass während 5 μM V-9302 das Wachstum von den Zelllinien SNU398 und MHCC97H hemmte, das Wachstum von HepG2-Zellen erst ab einer Konzentration von 10 μM gehemmt wurde (91). Bei der Interpretation ihrer Ergebnisse nahmen diese Autoren aufgrund von Vorarbeiten von Schulte *et al.* 2018 (69) an, mit V-9302 spezifisch den ASCT2-Transporter zu hemmen. Die Arbeiten von Bröer *et al.* 2018 widersprechen dieser Behauptung jedoch und zeigen, dass V-9302 tatsächlich nicht den ASCT2, sondern die Aminosäuretransporter LAT1 und SNAT2 hemmt (20). In Übereinstimmung damit zeigte eine Studie von Bothwell *et al.* 2018, dass das Wachstum von Huh7- und SK-Hep1-Zellen durch Knockdown von LAT1 vermindert wird (101). Auch die Hemmung von LAT1 mittels JPH203 verminderte das Wachstum von HepG2-Zellen (102). Diese Arbeiten sprechen für eine wichtige Rolle von LAT1 für das Wachstum von Hepatomazellen *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin die Bedeutung des ASCT2 für das Wachstum der Hepatomazellen mittels BS überprüft werden. Dieser Hemmstoff wird häufig als ASCT2-Hemmstoff und darüber hinaus auch als spezifisch für die

mitochondriale Variante des ASCT2 beschrieben (22). Da einige Arbeiten vermuten lassen, dass BS zusätzlich LAT1, LAT2, SNAT1 und SNAT2 hemmt (20, 64, 103) und BS in sehr hoher Konzentration eingesetzt wird, müssen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vorsichtig interpretiert werden. Für zusätzliche, nicht ASCT2-spezifische Wirkungen, sprechen außerdem die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, dass BS auffallend starke Zelltod-induzierende Wirkungen entfaltet (Abb. 13, 14). Es ist plausibel, dass eine kombinierte Hemmung unterschiedlicher Aminosäuretransportsysteme über die Induktion einer Aminosäuredysbalance, die nicht mehr durch redundante Systeme kompensiert werden kann, dafür verantwortlich ist. Diese Annahme stimmt mit der von Bröer *et al.* 2018 aufgestellten Hypothese überein, dass die Hemmung eines Transportsystems allein in Tumorzellen nicht ausreichend ist, um das Wachstum der Zellen effektiv zu vermindern (20). Diese Annahme ist ebenfalls kongruent zu den Beobachtungen von Bothwell *et al.* 2018, die das Wachstum von Huh7- und SK-Hep1-Zellen nicht allein durch ASCT2-Knockdown vermindern konnten (101). Auch Autoren wie Ye *et al.* 2018 und Wahi *et al.* 2024 bestätigen, dass in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien (104) oder in Magenkrebszelllinien (105) die alleinige Hemmung des ASCT2 keinen Effekt auf das Wachstum der Zelllinien hat. In der Literatur findet sich jedoch auch eine Untersuchung, in der das Wachstum von SK-Hep1-Zellen durch Knockdown von ASCT2 gehemmt und Apoptose induziert werden konnte (106). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle von ASCT2 für das Wachstum von Huh7- und SK-Hep1-Zellen abschließend beurteilen zu können.

Neben dem plasmamembranständigen ASCT2 beschrieben Yoo *et al.* 2020 erstmalig eine mitochondrial lokalisierte, am N-Terminus-trunkierte ASCT2-Variante (22). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit in Huh7- und HepG2-Zellen unter Verwendung eines am C-Terminus-bindenden Antikörpers nicht oder möglicherweise nur in sehr geringem Umfang detektiert (Abb. 23B). Da der Antikörper im Western-Blot allerdings die ASCT2-Variante in einer als Positivkontrolle fungierenden Probe (Yoo *et al.* 2020) ebenfalls nur schwach detektierte, sind weitere Untersuchungstechniken erforderlich, um abschließend klären zu können, ob die mitochondriale Variante in Huh7- und HepG2-Zellen vorkommt.

Molekulare Mechanismen des durch Protein-O-GlcNAcylierungshemmung verminderten Wachstums von Huh7- und HepG2-Zellen

Die Inkubation mit dem Glutaminase- und GFAT-Hemmstoff DON hemmte in der vorliegenden Arbeit – wie auch in der Literatur beschrieben (107, 108) die Viabilität und das Wachstum der Huh7- und HepG2-Zellen (Abb. 13, 14). Dabei blieb unklar, ob und inwieweit die Wachstumshemmung jeweils auf die Hemmung der Glutaminolyse oder auf die der Protein-O-GlcNAcylierung zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen in der Tat, dass eine Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung durch OSMI-1 das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen vermindert (Abb. 13, 14). Die Wirksamkeit der durch OSMI-1-vermittelten OGT-Hemmung, wurde dabei durch eine Reduktion der Protein-O-GlcNAcylierung bestätigt (Abb. 26). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, die ebenfalls eine Wachstumshemmung von HepG2-Zellen durch OSMI-1 zeigen (81). Ähnliche Effekte wurden auch an anderen Zelltypen, wie z.B. Glioblastoma-Zelllinien beschrieben (Leonel *et al.* 2023). Die in der zuletzt genannten Untersuchung beobachtete Wirkung konnte auch durch Knockdown der OGT mithilfe von shRNA erzielt werden (109). Der wachstumshemmende Effekt von OSMI-1 wurde daher als Folge einer spezifischen Hemmung der OGT interpretiert (109).

Zusätzlich zum wachstumsverringern Effekt einer Protein-O-GlcNAcylierungshemmung wurden in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zelltypspezifische und gegensätzliche Effekte von OSMI-1 auf die Proteinspiegel der GS gefunden (Abb. 33). Tatsächlich könnten sowohl die Verringerung als auch die Erhöhung der GS-Proteinspiegel durch Veränderungen in der Protein-O-GlcNAcylierung erklärt werden. Beide Wirkungen sind bereits in der Literatur für individuelle Proteinspezies beschrieben worden: so kann die Protein-O-GlcNAcylierung den Abbau des Transkriptionsfaktors SIX1 durch Blockierung einer Phosphorylierungsstelle hemmen, die essenziell für die Bindung der Ubiquitin-Ligase ist (110). Konträr zu diesem Protein-stabilisierenden Effekt kann die Protein-O-GlcNAcylierung die Ubiquitin-vermittelte Degradation von HGS durch Störung der Bindung von stabilisierenden Bindungspartnern steigern (110). Derzeit ist unklar, ob die GS selbst in Huh7- und HepG2-Zellen O-GlcNAcyliert ist und ob dadurch eine Stabilisierung bewirkt wird. Dies könnte jedoch die gegensätzlichen Proteinspiegel in den beiden Zelltypen nicht erklären. Es ist aber denkbar, dass entweder

unterschiedliche Proteinspezies an der Ubiquitinierung der GS beteiligt sind oder diese differentiell durch Protein-*O*-GlcNAcylierung modifiziert werden. Ebenso plausibel ist, dass die gegensätzlichen Wirkungen von OSMI-1 auf die GS-Proteinspiegel in Huh7- und HepG2-Zellen sekundäre Effekte von OSMI-1 sind, die in beiden Zelltypen differentielle Veränderungen herbeiführen. Die funktionale Relevanz der durch OSMI-1 induzierten gegensätzlichen Veränderungen der GS-Proteinspiegel für das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen ist derzeit unklar, insbesondere da die alleinige Hemmung der endogenen Glutaminbildung keinen Effekt auf das Wachstum dieser Zelllinien hatte (Abb. 13, 14). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Zuge vieler durch OSMI-1 in Huh7- und HepG2-Zellen herbeigeführten Änderungen die Verringerung oder Erhöhung der endogenen Bildung von Glutamin zur Wachstumsreduktion der Zellen beiträgt.

Plausibel erscheint hingegen, dass der wachstumshemmende Effekt von OSMI-1 in Huh7- und HepG2-Zellen partiell auf einer Reduktion des KGA-Proteins und damit der Glutaminolyse beruht (Abb. 33). Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass auch der KGA-Hemmstoff BPTES das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen in ähnlichem Ausmaß hemmt (Abb. 13, 14). Fang *et al.* 2025 zeigten, dass reduzierte KGA-Proteinspiegel in den Hepatoblastomazellen HUH6 die Tumorprogression und -resistenz verringern und dies mit einer verstärkten Lipidperoxidation, verringerten GSH-Spiegeln und der Induktion von Ferroptose einhergeht (111). Die Autoren fanden außerdem heraus, dass durch *O*-GlcNAcylierung die Stabilität der KGA und in der Folge die Glutaminolyse gesteigert wird (111). In der Tat erklärt dies den Rückgang der KGA in den mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen, der in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Dies hat jedoch im Gegensatz zur Arbeit von Fang *et al.* 2025 keinen Zelltod induziert (Abb. 17, 19, 20). Dies könnte bedeuten, dass in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Huh7- und HepG2-Zellen, im Gegensatz zu den HUH6-Zellen, weitere, durch OSMI-1 vermittelte Veränderungen induziert werden, die einer Zelltodinduktion entgegenwirken. Diese heterogene Wirkung auf unterschiedliche Hepatomazelllinien lässt vermuten, dass OSMI-1 allein als Therapeutikum für die Behandlung des HCC ineffizient ist.

Eine weitere potenziell wachstumshemmende Konsequenz von OSMI-1 könnte eine Verringerung der Aminosäuretransporter ASCT2 und LAT1 in Huh7- und HepG2-Zellen sein (Abb. 24, 25, 28). Die Verringerung der ASCT2- und LAT1-Proteinspiegel ist

dabei nicht Folge einer Hemmung der Transkription, sondern durch posttranslationale Prozesse reguliert (Abb. 24, 26, 27, 28, 29). In dem Zusammenhang zeigten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass die Hemmung der Protein-*O*-GlcNAcylierung mit einer Reduktion der Proteinspiegel und der Membranständigkeit des ASCT2 einhergeht (Abb. 24, 25). Aus der Literatur ist bekannt, dass im HCC die Protein-*O*-GlcNAcylierung als Folge einer gesteigerten Synthese von UDP-GlcNAc erhöht ist (112). Der Transporter ASCT2 ist essenziell für die Substratversorgung des HBS im HCC. Er trägt wesentlich zur metabolischen Reprogrammierung sowie zur Protein-*O*-GlcNAcylierung und somit zur Aktivierung von onkogenen Signalwegen bei (113). In Übereinstimmung damit, dass die Protein-*O*-GlcNAcylierung für die Membranständigkeit des ASCT2 essenziell ist (114), verringerte OSMI-1 in der vorliegenden Arbeit auch in Huh7- und HepG2-Zellen das ASCT2-Protein an der Membran (Abb. 25). Zusammengefasst deuten diese Befunde daraufhin, dass die Protein-*O*-GlcNAcylierung die Verfügbarkeit der im HBS benötigten Substrate durch Hochregulation von Glutamin-Transportern sicherstellt und damit die metabolische Reprogrammierung onkogener Zellen ermöglicht. Ähnlich wie der ASCT2 ist es denkbar, dass der LAT1 selbst *O*-GlcNAcyliert wird und dies – wie beim ASCT2 – sowohl die Membranständigkeit als auch, wie bereits zuvor für andere Proteine beschrieben, seine Stabilität erhöht. Im Gegensatz zu ASCT2, beeinflusste OSMI-1 die Membranständigkeit von GLUT1 in Huh7- und HepG2-Zellen nicht (Abb. 38). Dies lässt vermuten, dass die Membranständigkeit von GLUT1 Protein-*O*-GlyNAcylierungsunabhängig ist.

Vor dem Hintergrund, dass die Glutamintransporter LAT1 und ASCT2 in beiden Zelllinien durch OSMI-1 herunterreguliert werden, ist zunächst verwunderlich, dass die Glutaminaufnahme in Huh7-Zellen nicht und in HepG2-Zellen sogar deutlich gesteigert ist (Abb. 31). Dies könnte Folge einer kompensatorischen Hochregulation anderer Aminosäuretransporter sein, wie z.B. dem induzierbaren SNAT2 oder dem konstitutiv-exprimiertem SNAT1 (24, 115). Interessanterweise sind LAT1 und ASCT2 unter physiologischen Bedingungen essenziell für die Aufrechterhaltung der Aminosäurehomeostase, indem der LAT1 Glutamin für den Import von essenziellen Aminosäuren über den ASCT2 exportiert (116). Daher können die unter OSMI-1-Behandlung beobachteten erhöhten intrazellulären Glutaminspiegel auch einen verminderten Glutaminexport als Folge der Herunterregulation von LAT1 und ASCT2 reflektieren. Die letztere Annahme steht

jedoch in direktem Gegensatz zur allgemeinen Auffassung, dass LAT1 und ASCT2 Glutamin in Krebszellen im- aber nicht exportieren.

Die hier an Hepatomazellen beschriebenen Effekte könnten zelltypspezifisch sein. In diesem Zusammenhang fanden Minh *et al.* 2023 in Kolonkrebszellen, dass die Protein-O-GlcNAcylierung den Transport in die Zellen beeinflusst und eine Hochregulation zu einem gesteigerten Transport führt (117). Interessanterweise spiegeln sich die durch OSMI-1-induzierten Effekte auf die Glutaminaufnahme in beiden Zelllinien gegenüber den unbehandelten Zellen auf der Ebene der endogenen Glutaminspiegel wider. Dies deutet daraufhin, dass der metabolische Flux von Glutamin in den Zellen quantitativ unverändert ist. Hierfür spricht auch, dass sich sowohl die basalen wie auch die nach Glutaminaufnahme gefundenen Glutamatspiegel kongruent zur jeweiligen durch OSMI-1 vermittelten Änderung der Glutaminaufnahme verhielten (Abb. 31). Diese Beobachtung ist verwunderlich vor dem Hintergrund, dass z.B. die Glutaminolyse durch OSMI-1 vermindert wird. Es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, dass andere metabolische Prozesse wie z.B. eine verstärkte Transaminierung (z.B. AST, ALT) die intrazelluläre Glutamatkonzentration in Folge der erhöhten Glutaminkonzentration steigern.

Effekte einer gleichzeitigen Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und von LAT1/SNAT2 auf Viabilität und Wachstum von Hepatomazellen in vitro

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen gegenüber den jeweiligen Einzelbehandlungen einen überproportionalen viabilitäts- und wachstumshemmenden Effekt, wenn die Protein-O-GlcNAcylierung und die Aminosäuretransporter LAT1/SNAT2 gleichzeitig gehemmt wurden (Abb. 16, 39, 41). Bereits bei der alleinigen Inkubation mit V-9302 wurde ein geringfügiger Effekt beobachtet, der durch Verwendung einer höheren Konzentration erheblich gesteigert wurde (Abb. 13, 15).

Von einer Wirkungssteigerung bei der gleichzeitigen Hemmung von zwei Signalwegen berichten ebenfalls Jin *et al.* 2020, wenn die Zellen mit V-9302 und CB-839 gleichzeitig inkubiert wurden. In Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit zeigen deren Ergebnisse, dass die Einzelbehandlung mit V-9302 in vergleichbaren Konzentrationen lediglich einen geringen Effekt auf das Wachstum der Zellen hat. In der Kombination mit CB-839 wurde dieser Effekt jedoch deutlich verstärkt (91). Auch durch gleichzeitige Inkubation mit OSMI-1+Doxorubicin konnte in der Arbeit von Lee *et al.*

20214 gezeigt werden, dass das Wachstum von HepG2-Zellen gegenüber der Behandlung mit den Einzelsubstanzen verstärkt gehemmt wurde (81). Interessanterweise wurde durch Doxorubicin Apoptose induziert, die durch OSMI-1 weiter gesteigert werden konnte (81). In Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit konnte durch OSMI-1 selbst kein Zelltod ausgelöst werden (Abb. 17, 19). Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Bröer *et al.* 2018, dass V-9302 ein LAT1/SNAT2-Hemmstoff ist (20), kann die überproportional höhere Wachstumshemmung von OSMI-1+V-9302 gegenüber den Einzelsubstanzen durch eine effektive Hemmung der verbliebenen LAT1- und der SNAT2-Transportaktivität erklärt werden. Man kann daher spekulieren, dass gemeinschaftliche Beeinträchtigung dieser drei Transportsysteme nicht mehr durch SNAT1 kompensiert werden kann und eine schwerwiegende Aminosäuredysbalance entsteht.

Weder die einzel- noch die gemeinsame Behandlung kultivierter Maushepatozyten mit OSMI-1 und/oder V-9302 verminderte unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen die Zellzahl. Dies deutet auf eine tumorspezifische wachstumshemmende Wirkung hin (Abb. 14B). Dies ist kongruent zu der Annahme, dass gesunde und maligne Zellen einen unterschiedlichen Bedarf an Energiesubstraten wie Glutamin und Glukose aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten haben.

Charakterisierung des durch Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung und von LAT1/SNAT2-induzierten Zelltod in Hepatomazellen

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmstoffe konzentrationsabhängig Zelltod in den Hepatomazelllinien induzieren (Abb. 17-19), welcher mit charakteristischen morphologischen Veränderungen einher geht (Abb. 18). Die genaue Zelltodform bleibt dabei derzeit unklar (Abb. 20, 21).

Auf Grundlage der beobachteten morphologischen Veränderungen wird der durch OSMI-1+V-9302 induzierte Zelltod durch eine strukturelle Schwächung der Integrität der Zellmembran vermittelt (Abb. 18). Dieser Integritätsverlust könnte eine Folge einer durch Verarmung an essenziellen Aminosäuren vermittelten gesteigerten Autophagie sein (118).

4.2 Beeinflussung des Glukosetransports durch Protein-*O*-GlcNAcylierungshemmung

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Glykolyse für das Tumorzellwachstum wurden in der vorliegenden Arbeit auch potenzielle Folgen einer Protein-*O*-GlcNAcylierungshemmung auf das Wachstum von Huh7- und HepG2-Zellen untersucht. Die alleinige Hemmung von GLUT1, dem Hauptglukosetransporter in Hepatomazellen, bewirkte in Übereinstimmung mit der Literatur bereits eine Reduktion der Viabilität der Hepatomazellen (Abb. 34). Auch die wachstumshemmende Wirkung von OSMI-1 konnte ähnlich wie bei V-9302 durch gleichzeitige Inkubation mit STF-31 überproportional gesteigert werden. Diese Befunde stimmen überein mit Untersuchungen von Ferrer *et al.* 2014, die zeigten, dass die Hemmung der Protein-*O*-GlcNAcylierung die Expression von GLUT1 *in vitro* wie auch *in vivo* hemmt und so das Tumorzellwachstum inhibiert (77). Diese Steigerung des wachstumshemmenden Effekts gilt in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die kombinierte Inkubation von V-9302 mit STF-31 (Abb. 34). Diese Ergebnisse passen wiederum zu denen von Gauthier-Coles *et al.* 2022, die in ihrer Arbeit von *in-vitro*-Versuchen berichten, die das Zellwachstum von verschiedenen Krebszelllinien durch Hemmung des GLUT1 (BAY-876) und SNAT2 (neu identifizierter Hemmstoff) synergistisch reduzieren (119). Wurden die Zellen der vorliegenden Arbeit schließlich mit V-9302+OSMI-1+STF-31 inkubiert, konnte der Hemmeffekt nur noch geringfügig gesteigert werden (Abb. 35). Die beschriebenen Effekte einer Hemmung mehrerer Komponenten des Energiemetabolismus passen zu denen von Polet *et al.* 2016, die eine stärkere Hemmung des Tumorwachstums in Leukämiezelllinien durch Hemmung der Glykolyse und dadurch vermittelte Entglykolisierung des ASCT2 herbeiführte. Dennoch war die Glutaminaufnahme unter diesen Bedingungen unverändert, aufgrund einer kompensatorischen Hochregulation des LAT1. Wurde dieser zusätzlich durch 2-Deoxyglukose gehemmt, wurde das Krebszellwachstum verstärkt gesenkt (120).

Frühere Untersuchungen ließen vermuten, dass eine Protein-*O*-GlcNAcylierungshemmung GLUT1 hochreguliert. Dies wurde als Adaptionmechanismus an die Störung des Tumorzellmetabolismus interpretiert (77). Interessanterweise zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass der glykosylierte Transporter in Huh7- herunter- und in HepG2-Zellen heraufreguliert wird durch Hemmung der Protein-*O*-GlcNAcylierung (Abb. 36). Diese gegensätzlichen Veränderungen zeigen, dass es sich hier um keinen

universellen, sondern zelltypspezifischen Mechanismus handelt. Inwieweit dadurch die intrazelluläre Glukosehomöostase betroffen ist, bleibt derzeit unklar.

Trotz eines wachstumshemmenden Effekts auf die Hepatomazellen konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine Veränderung in der Membranständigkeit detektiert werden (Abb. 38). Anders als beim ASCT2 (Abb. 25) weisen diese Befunde nicht darauf hin, dass die Membranständigkeit des GLUT1 Protein-O-GlyNAcylierungsabhängig ist (121, 122).

4.3 Potenzielle Behandlungsresistenz-vermittelnde metabolische Veränderungen in mit OSMI-1 und V-9302 behandelter Hepatomazellen

Während im Langzeitversuch nach Inkubation mit OSMI-1 oder V-9302 (Abb. 13) oder STF-31 (Abb. 34) nahezu keine Zellen in der Kultur expandierten, überlebten in bereits etablierten Kulturen (70 % konfluent) einzelne Zellen die Inkubation mit OSMI-1 und V-9302 (Abb. 14) bzw. OSMI-1+STF-31 (Abb. 35). Dies deutet darauf hin, dass die mit dem Zellwachstum der Krebszellen bei der Expansion auftretenden genetischen Veränderungen Klone hervorbringen könnten, bei denen metabolische Veränderungen eine Resistenz gegenüber den Hemmstoffen vermitteln. Dieses Phänomen ist in der Literatur weitläufig beschrieben und oft ursächlich für das Versagen des jeweiligen therapeutischen Ansatzes (123-125).

4.4 Wirkungen von OSMI-1 und V-9302 auf experimentell in Mäusen induzierte Leberzelltumore

Reduziertes Tumorzellen und verbessertes Überleben im murinen Allograft-Modell durch Behandlung mit OSMI-1+V-9302

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die gemeinsame Verabreichung von OSMI-1 und V-9302 das Wachstum von Hepatomazellen im Allograft-Modell in der Maus vermindert (Abb. 39). Bei den Einzelsubstanzen war hingegen kein Effekt bzw. nur ein geringer Trend gegenüber einer Wachstumshemmung erkennbar (Abb. 39). Auch Lee *et al.* 2020 fanden, dass OSMI-1 alleine keine signifikante Reduktion eines HepG2-Xenograft in Mäusen bewirkte (81). Demgegenüber verstärkte OSMI-1 unter Verwendung der

gleichen Konzentration wie in der vorliegenden Arbeit die wachstumshemmende Wirkung von Doxorubicin. Zusammen mit den Befunden der vorliegenden Arbeit unterstützen die Beobachtungen der zuletzt genannten Studie die zuvor in dieser Arbeit gemachte Annahme, dass die Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung die Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber weiteren Hemmstoffen erhöht. In der zuletzt beschriebenen Arbeit bleibt jedoch die durch Hemmung der Protein-O-GlcNAcylierung herbeigeführte molekulare Veränderung unklar, durch welche die Zellen gegenüber den wachstumshemmenden Wirkungen von Doxorubicin empfindlicher werden.

Auch durch V-9302 konnte eine gesteigerte wachstumshemmende Wirkung im Xenograft-Modell unter Verwendung des Glutaminase-Inhibitors CB-839 erzielt werden (91). Diese Wirkung wurde durch Verwendung der gleichen Injektionsmenge an V-9302 wie in der vorliegenden Arbeit erzielt.

Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Surrogatmarker für Zellschädigung dafürsprechen, dass die verabreichten Substanzen selbst keine Leberschädigung im Tiermodell induzieren (Abb. 40). In den vorher genannten Studien, in denen OSMI-1 bereits im Mausmodell verwendet wurde (81), werden keine Daten zur Toxizität des Inhibitors präsentiert (126). Toxische Wirkungen von V-9302 im Mausexperiment wurden bislang in der Literatur nicht beschrieben. In HCT-116- und HT29-Xenograft-Mäusen veränderte eine 21-tägige Behandlung mit V-9302 das Gewicht der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht und auch die Leber zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten (69). In der vorliegenden Arbeit wurde V-9302 in einer Dosierung von 30 mg/kg/KG eingesetzt. Die gleiche Dosis (91) sowie eine höhere Dosis (75 mg/kg/KG), wurde bereits in früheren Studien verwendet (81, 127). In diesen Studien fehlen teilweise genaue Angaben, wie die Substanz gelöst/verabreicht wurde oder V-9302 wurde in PBS mit 2 % DMSO gelöst. Eigene Versuche, die erforderliche Substanzmenge für die Applikation von 30 mg/kg/KG in dem nach GV-SOLAS Vorgaben maximal-verabreichbaren Volumen in PBS mit 2 % DMSO zu lösen, schlugen fehl als Folge einer Überschreitung des Löslichkeitsprodukts von V-9302. Das Lösen von V-9302 im vom Hersteller empfohlenen Lösungsmittelgemisch gelang hingegen problemlos. Es bleibt daher unklar, ob in den zuvor beschriebenen Studien V-9302 vollständig gelöst verabreicht wurde und dies ggf. die Bioverfügbarkeit beeinflusst hat. Vor dem Hintergrund, dass diese Studien keinen entsprechenden Serumparameter

untersucht haben, bleibt deren Eignung zur Bewertung potenziell toxischer Wirkungen von V-9302 fraglich.

In den gemeinsam mit OSMI-1+V-9302 behandelten Tieren waren die Serumspiegel des mitochondrialen Schädigungsmarkers GLDH gegenüber den mit Vehikel behandelten Tieren reduziert. Dies könnte entweder Folge eines Abbaus des Tumorgewebes oder toxische Wirkungen auf mitochondrienreiches Gewebe der Maus reflektieren (128). In ersterem Fall würde der verringerte GLDH-Spiegel auf eine reduzierte Tumormast hindeuten (129).

Weitere Untersuchungen an unbehandelten Mäusen mit OSMI-1 und V-9302 sind erforderlich, um die Toxizität der Substanzen genauer zu charakterisieren.

Reduktion der TumorgroÙe im HDI-Modell nach kombinierter Behandlung

In der vorliegenden Arbeit war die Tumorentwicklung nach der vierwöchigen Behandlungszeit in allen Gruppen deutlich fortgeschritten. Tiere, die entweder das Vehikel oder nur eine Substanz erhalten hatten, wiesen eine ausgeprägte Tumormast auf. Bei den Tieren, welche mit OSMI-1+V-9302 behandelt wurden, war das Tumormast im Vergleich zu der Kontroll- und den Einzelbehandlungen geringer (Abb. 41). In der Literatur wird beschrieben, dass bereits ab der fünften Woche nach Beginn der HDI mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmiden invasive Tumore in der Leber vorhanden sind (130, 131). Da sich die Tumore (132) bereits zu einem früheren Zeitpunkt bilden, weisen die geringeren Tumormast/-volumina bei unveränderter Tumormast unter gleichzeitiger Behandlung mit OSMI-1+V-9302 entweder auf die Induktion von Zelltod oder auf eine Wachstumshemmung hin (Abb. 41, 42).

Für ersteres könnte der damit verbundene tendenzielle Anstieg der GLDH-Werte im Serum sprechen (Abb. 43), welcher Folge eines verstärkten Untergangs von Tumorgewebe in der Leber sein könnte (133). Hierfür sprechen auch die tendenziell erhöhten AST- und ALT-Werte im Serum der mit OSMI-1+V-9302 behandelten Tiere. Weitere Experimente sind notwendig zur statistischen Abklärung dieser Vermutung.

Die Reduktion der Tumormast in den mit OSMI-1+V-9302-behandelten HDI-Mäusen ging einher mit einer Steigerung der GS-Proteinspiegel (Abb. 45). Interessanterweise waren die durch HDI-induzierten Tumore GS-negativ. Viele Tumore wurden durch Zentralvenen begrenzt und in der Folge war die GS im peritumoralen Bereich lokalisiert.

Diese Beobachtungen sind ähnlich zu denen von Ye *et al.* 2023, die fanden, dass in c-Myc/h-Ras-induzierten Maustumoren die GS ausschließlich in tumorfreien Geweben, nicht aber in den Tumoren selber zu finden war (134).

Eine Beteiligung des Immunsystems konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig belegt werden (Abb. 44). Lediglich die Anzahl der Makrophagen war tendenziell in der Leber mit V-9302 und OSMI-1+V-9302 - behandelter Mäuse erhöht. Ein unveränderter Status der Infiltration dieser drei Immunzelltypen nach Tumorbehandlung, wie in der vorliegenden Arbeit erkannt wurde, deutet also darauf hin, dass die Tumor-reduzierende Wirkung nicht primär Folge einer gesteigerten Immunantwort ist (Abb. 44). Weitere Untersuchungen sind notwendig zur Abklärung, ob die gemeinsame Behandlung mit OSMI-1 und V-9302 die Immunantwort in der Leber der HDI-Mäuse beeinflusst.

4.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden an Zellkulturen tumorwachstumshemmende und Zelltod-induzierende Effekte von OSMI-1 und V-9302 identifiziert. Die durch OSMI-1 vermittelte Verringerung des ASCT2- und LAT1-Proteins sowie der Plasmamembranständigkeit von ASCT2 wurde begleitet von einer erhöhten bzw. unveränderten Aufnahme von extrazellulärem Glutamin in HepG2 und Huh7-Zellen. Diese Befunde lassen vermuten, dass durch OSMI-1 in Kombination mit dem LAT1/SNAT2-Hemmstoff V-9302 eine nicht-kompensierbare Aminosäuredyshomeostase erzeugt wird. Diese wird von einer Herunterregulation der Glutaminase und zelltypspezifischen Änderungen in der Proteinkonzentration des Glukosetransporters GLUT1 begleitet, was für den Energiestoffwechsel der Tumorzellen bedeutsam ist.

Die Wirksamkeit der kombinierten Behandlung mit OSMI-1 und V-9302 wurde in zwei Leberzelltumormodellen *in vivo* bestätigt. Dies lässt vermuten, dass die kombinierte Verabreichung beider Substanzen therapeutisch wirksam in der HCC-Behandlung sein könnte.

4.6 Ausblick

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte abschließend die durch OSMI-1+V-9302-induzierte Zelltodform nicht identifiziert werden. Spezifische morphologische

Veränderungen an Zellen lassen vermuten, dass durch die beiden Hemmstoffe die Integrität der Zellmembran beeinträchtigt wird. Zukünftige Untersuchungen könnten dies durch Anfärbung oder Expression Fluoreszenz-getaggtter zytoskeletaler Proteine und mit Hilfe von Farbstoffen, welche die Lipidzusammensetzung der Zellmembran anzeigen, wie z.B. Laurdan, untersuchen.

Weitere Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen werden klären, ob die Aufrechterhaltung oder Steigerung der Glutaminaufnahme in OSMI-1 behandelten Huh7- bzw. HepG2-Zellen trotz verminderter ASCT2- und LAT1-Proteinspiegel durch kompensatorische Hochregulation von SNAT2 vermittelt wird.

Massenspektrometrische Untersuchungen sollen mithilfe die Hypothese zu überprüfen, ob die zusätzliche Hemmung von LAT1 und SNAT2 mit V-9302 in OSMI-1 behandelten Hepatomazellen eine Aminosäuredyshomeostase induziert und ob diese Ursache für die Zelltodinduktion ist.

In zusätzlichen Untersuchungen an Mäusen sollen die bereits gefundenen Tendenzen insbesondere im Hinblick auf die Immunzellzahlen in der Leber und Serumwerte von Surrogatmarkern für Leberschädigung durch weitere unabhängige Experimente validiert werden.

An unbehandelten Mäusen, in denen kein Tumor induziert wurde, wird die Toxizität der Substanzen untersucht, um sie mit den bereits in den Tumormodellen erhobenen Serumparametern zu vergleichen.

Künftige Experimente könnten außerdem darauf abzielen, die Spezifität der Inhibitoren durch Verwendung neu hergestellter Derivate oder neuer Verbindungen zu optimieren. Auch eine organspezifische Applikation der Hemmstoffe, beispielsweise durch den Einsatz hepatozytenspezifischer Nanopartikel, könnte dabei einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Diese gezielte Wirkstoffverabreichung würde voraussichtlich nicht nur das Risiko systemischer Nebenwirkungen reduzieren, sondern auch die Effizienz der Therapie durch eine verbesserte Wirkstoffanreicherung im Zielgewebe und eine effektivere Ausnutzung der verabreichten Dosis steigern.

5. Referenzen

1. Koop I. Gastroenterologie compact alles für Klinik und Praxis ; 27 Tabellen. 2., komplett überarb., aktualisierte und erw. Aufl. ed. Koop I, editor. Stuttgart u.a.: Thieme; 2010.
2. Vaupel P, Mutschler, Ernst, Schaible, Hans-Georg. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed2007.
3. Tilg H. Basics Gastroenterologie. 2. Auflage ed. München: Elsevier; 2021.
4. Fried M. Magen-Darm-Trakt mit 34 Tabellen. Lüscher TF, editor. Berlin u.a.: Springer Medizin; 2013.
5. Manns MP. Praxis der Hepatologie mit 30 Tabellen. Manns MP, editor. Berlin u.a.: Springer; 2016.
6. Li T, Chiang JY. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res.* 2009;2009:501739.
7. Leistner E. Pharmazeutische Biologie kompakt Grundlagen, Systematik, Humanbiologie ; 38 Tabellen. 8., überarb. und erw. Aufl. ed. Leistner E, Breckle S-W, Drews G, editors. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 2014.
8. Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1481-96.
9. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol.* 2013;3(2):785-97.
10. Cunningham RP, Porat-Shliom N. Liver Zonation - Revisiting Old Questions With New Technologies. *Front Physiol.* 2021;12:732929.
11. Paris J, Henderson NC. Liver zonation, revisited. *Hepatology.* 2022;76(4):1219-30.
12. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):118-27.
13. Wei Y, Wang YG, Jia Y, Li L, Yoon J, Zhang S, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes. *Science.* 2021;371(6532).
14. Kang YBA, Eo J, Mert S, Yarmush ML, Usta OB. Metabolic Patterning on a Chip: Towards in vitro Liver Zonation of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):8951.
15. Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev Mol Med.* 2012;14:e4.
16. Comar JF, Suzuki-Kemmelmeier F, Constantin J, Bracht A. Hepatic zonation of carbon and nitrogen fluxes derived from glutamine and ammonia transformations. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):1.
17. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med.* 2020;52(9):1496-516.
18. Paulusma CC, Lamers WH, Broer S, van de Graaf SFJ. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. *Biochem Pharmacol.* 2022;201:115074.
19. Jakobsen S, Nielsen CU. Exploring Amino Acid Transporters as Therapeutic Targets for Cancer: An Examination of Inhibitor Structures, Selectivity Issues, and Discovery Approaches. *Pharmaceutics.* 2024;16(2).
20. Bröer A, Fairweather S, Bröer S. Disruption of Amino Acid Homeostasis by Novel ASCT2 Inhibitors Involves Multiple Targets. *Front Pharmacol.* 2018;9:785.

21. Bröer S, Fairweather SJ. Amino Acid Transport Across the Mammalian Intestine. *Compr Physiol*. 2018;9(1):343-73.
22. Yoo HC, Park SJ, Nam M, Kang J, Kim K, Yeo JH, et al. A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metab*. 2020;31(2):267-83.e12.
23. Liu Y, Cao L, Song Y, Kang Z, Liu T, Ding J, et al. Mitochondrial glutamine transporter SLC1A5_var, a potential target to suppress astrocyte reactivity in Parkinson's Disease. *Cell Death Dis*. 2022;13(11):946.
24. Böhme-Schäfer I, Lörentz S, Bosserhoff AK. Role of Amino Acid Transporter SNAT1/SLC38A1 in Human Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(9).
25. Mackenzie B, Schäfer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23720-30.
26. Yan R, Li Y, Müller J, Zhang Y, Singer S, Xia L, et al. Mechanism of substrate transport and inhibition of the human LAT1-4F2hc amino acid transporter. *Cell Discov*. 2021;7(1):16.
27. Huttunen J, Peltokangas S, Gynther M, Natunen T, Hiltunen M, Auriola S, et al. L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1/Lat1)-Utilizing Prodrugs Can Improve the Delivery of Drugs into Neurons, Astrocytes and Microglia. *Sci Rep*. 2019;9(1):12860.
28. Häussinger D, Stehle T. Hepatocyte heterogeneity in response to icosanoids. The perivenous scavenger cell hypothesis. *Eur J Biochem*. 1988;175(2):395-403.
29. Berg JM. *Stryer Biochemie*. 7. Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
30. Lemberg A, Fernández MA. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol*. 2009;8(2):95-102.
31. Häussinger D, Schliess F. Cell volume and hepatocellular function. *J Hepatol*. 1995;22(1):94-100.
32. Frieg B, Görg B, Gohlke H, Häussinger D. Glutamine synthetase as a central element in hepatic glutamine and ammonia metabolism: novel aspects. *Biol Chem*. 2021;402(9):1063-72.
33. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:133-59.
34. Häussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J*. 1990;267(2):281-90.
35. Brosnan JT. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J Nutr*. 2000;130(4S Suppl):988s-90s.
36. Häussinger D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul*. 1986;25:159-80.
37. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e218.
38. Mookerjee SA, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *J Biol Chem*. 2017;292(17):7189-207.
39. König M, Bulik S, Holzhütter HG. Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: a detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(6):e1002577.

40. Pragallapati S, Manyam R. Glucose transporter 1 in health and disease. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(3):443-9.
41. Chan DA, Sutphin PD, Nguyen P, Turcotte S, Lai EW, Banh A, et al. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med.* 2011;3(94):94ra70.
42. Zhang X, Yang S, Chen J, Su Z. Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:802.
43. Sun HW, Yu XJ, Wu WC, Chen J, Shi M, Zheng L, Xu J. GLUT1 and ASCT2 as Predictors for Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168907.
44. Paneque A, Fortus H, Zheng J, Werlen G, Jacinto E. The Hexosamine Biosynthesis Pathway: Regulation and Function. *Genes (Basel).* 2023;14(4).
45. Kim DY, Park J, Han IO. Hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAc cycling of glucose metabolism in brain function and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;325(4):C981-c98.
46. Vásquez Martínez IP, Pérez-Campos E, Pérez-Campos Mayoral L, Cruz Luis HI, Pina Canseco MDS, Zenteno E, et al. O-GlcNAcylation: Crosstalk between Hemostasis, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024;25(18).
47. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(11):2430-7.
48. Yuasa H, Morino N, Wagatsuma T, Mune Kane M, Ueda S, Matsunaga M, et al. ZNT5-6 and ZNT7 play an integral role in protein N-glycosylation by supplying Zn(2+) to Golgi α -mannosidase II. *J Biol Chem.* 2024;300(6):107378.
49. Martínez-Maza R, Poyatos I, López-Corcuera B, E Nú, Giménez C, Zafra F, Aragón C. The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem.* 2001;276(3):2168-73.
50. Gonzalez-Rellan MJ, Fondevila MF, Dieguez C, Nogueiras R. O-GlcNAcylation: A Sweet Hub in the Regulation of Glucose Metabolism in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:873513.
51. Issad T, Al-Mukh H, Bouaboud A, Pagesy P. Protein O-GlcNAcylation and the regulation of energy homeostasis: lessons from knock-out mouse models. *J Biomed Sci.* 2022;29(1):64.
52. Woo JR, Bae SH, Wales TE, Engen JR, Lee J, Jang H, Park S. The serine phosphorylations in the IRS-1 PIR domain abrogate IRS-1 and IR interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(17):e2401716121.
53. Hançer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2014;289(18):12467-84.
54. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(7):452-65.
55. Bechstein WO. Expertise Allgemein- und Viszeralchirurgie Leber und Gallenwege. Bechstein WO, Schnitzbauer AA, editors. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag; 2018.
56. Rosien U. Facharztwissen Gastroenterologie und Hepatologie. 2. Auflage ed. Rosien U, Berg T, Layer P, editors. München: Elsevier; 2021.
57. Nong S, Han X, Xiang Y, Qian Y, Wei Y, Zhang T, et al. Metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and therapeutics. *MedComm (2020).* 2023;4(2):e218.

-
58. Ye F, Jia D, Lu M, Levine H, Deem MW. Modularity of the metabolic gene network as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(19):15015-26.
59. Chu F, Tong K, Gu X, Bao M, Chen Y, Wang B, et al. Glutamine transporters as effective targets in digestive system malignant tumor treatment. *Oncol Res*. 2024;32(10):1661-71.
60. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(8):427-33.
61. Conger KO, Chidley C, Ozgurses ME, Zhao H, Kim Y, Semina SE, et al. ASCT2 is the primary serine transporter in cancer cells. *bioRxiv*. 2023.
62. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, Marshall AD, Thoeng A, Gao D, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(24):3201-8.
63. Fuchs BC, Perez JC, Suetterlin JE, Chaudhry SB, Bode BP. Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(3):G467-78.
64. van Geldermalsen M, Quek LE, Turner N, Freidman N, Pang A, Guan YF, et al. Benzylserine inhibits breast cancer cell growth by disrupting intracellular amino acid homeostasis and triggering amino acid response pathways. *BMC Cancer*. 2018;18(1):689.
65. Wang Q, Hardie RA, Hoy AJ, van Geldermalsen M, Gao D, Fazli L, et al. Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol*. 2015;236(3):278-89.
66. Tambay V, Raymond VA, Voisin L, Meloche S, Bilodeau M. Reprogramming of Glutamine Amino Acid Transporters Expression and Prognostic Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2024;25(14).
67. Garib Singh RA, Ndaru E, Garaeva AA, Shi Y, Zielewicz L, Zakrepine P, et al. Rational design of ASCT2 inhibitors using an integrated experimental-computational approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(37).
68. Corti A, Dominici S, Piaggi S, Belcastro E, Chiu M, Taurino G, et al. γ -Glutamyltransferase enzyme activity of cancer cells modulates L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GPNA) cytotoxicity. *Sci Rep*. 2019;9(1):891.
69. Schulte ML, Fu A, Zhao P, Li J, Geng L, Smith ST, et al. Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models. *Nat Med*. 2018;24(2):194-202.
70. LIVER CANCER - Interactive survival scatter plot & Survival analysis [Internet]. 22.06.2024 10:57 Uhr. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105281-SLC1A5/pathology/liver+cancer>.
71. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-8.
72. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
73. Smith B, Schafer XL, Ambeskovic A, Spencer CM, Land H, Munger J. Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells. *Cell Rep*. 2016;17(3):821-36.

74. LIVER CANCER - Interactive survival scatter plot & Survival analysis [Internet]. 22.06.2024 11:00 Uhr. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000117394-SLC2A1/pathology/liver+cancer>.
75. Ye L, Ding W, Xiao D, Jia Y, Zhao Z, Ao X, Wang J. O-GlcNAcylation: cellular physiology and therapeutic target for human diseases. *MedComm* (2020). 2023;4(6):e456.
76. Yang YR, Kim DH, Seo YK, Park D, Jang HJ, Choi SY, et al. Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF- κ B signaling. *Oncotarget*. 2015;6(14):12529-42.
77. Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, et al. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell*. 2014;54(5):820-31.
78. Zhu Q, Wang H, Chai S, Xu L, Lin B, Yi W, Wu L. O-GlcNAcylation promotes tumor immune evasion by inhibiting PD-L1 lysosomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(13):e2216796120.
79. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zacharyus JL, Guinez C, Mir AM, et al. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *Faseb j*. 2014;28(8):3325-38.
80. Wu D, Jin J, Qiu Z, Liu D, Luo H. Functional Analysis of O-GlcNAcylation in Cancer Metastasis. *Front Oncol*. 2020;10:585288.
81. Lee SJ, Kwon OS. O-GlcNAc Transferase Inhibitor Synergistically Enhances Doxorubicin-Induced Apoptosis in HepG2 Cells. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
82. Lee SJ, Lee DE, Choi SY, Kwon OS. OSMI-1 Enhances TRAIL-Induced Apoptosis through ER Stress and NF- κ B Signaling in Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20).
83. Lee DE, Lee GY, Lee HM, Choi SY, Lee SJ, Kwon OS. Synergistic apoptosis by combination of metformin and an O-GlcNAcylation inhibitor in colon cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2023;23(1):108.
84. Yang YR, Jang HJ, Yoon S, Lee YH, Nam D, Kim IS, et al. OGA heterozygosity suppresses intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Oncogenesis*. 2014;3(7):e109.
85. Charni-Natan M, Goldstein I. Protocol for Primary Mouse Hepatocyte Isolation. *STAR Protocols*. 2020;1(2):100086.
86. Zählkammer N. <https://de.vwr.com/store/product/2991828/zahlkammer-neubauer-improved> 01.06.2024 15 Uhr [
87. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.
88. Combs CA. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr Protoc Neurosci*. 2010;Chapter 2:Unit2.1.
89. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020;92(1):e68.
90. Görg B, Karababa A, Schütz E, Paluschinski M, Schrimpf A, Shafiqullina A, et al. O-GlcNAcylation-dependent upregulation of HO1 triggers ammonia-induced oxidative stress and senescence in hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2019;71(5):930-41.
91. Jin H, Wang S, Zaal EA, Wang C, Wu H, Bosma A, et al. A powerful drug combination strategy targeting glutamine addiction for the treatment of human liver cancer. *Elife*. 2020;9.
92. Litwin JA. Histochemistry and cytochemistry of 3,3'-diaminobenzidine. A review. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*. 1979;17(1):3-28.

93. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021;2021(12).
94. Luo Z, Xu J, Sun J, Huang H, Zhang Z, Ma W, et al. Co-delivery of 2-Deoxyglucose and a glutamine metabolism inhibitor V9302 via a prodrug micellar formulation for synergistic targeting of metabolism in cancer. *Acta Biomater.* 2020;105:239-52.
95. Sinclair LV, Neyens D, Ramsay G, Taylor PM, Cantrell DA. Single cell analysis of kynurenine and System L amino acid transport in T cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):1981.
96. Qualls-Histed SJ, Nielsen CP, MacGurn JA. Lysosomal trafficking of the glucose transporter GLUT1 requires sequential regulation by TXNIP and ubiquitin. *iScience.* 2023;26(3):106150.
97. Elmetwalli A, Nageh A, Youssef AI, Youssef M, Ahmed MAE, Noreldin AE, El-Sewedy T. Ammonia scavenger and glutamine synthetase inhibitors cocktail in targeting mTOR/ β -catenin and MMP-14 for nitrogen homeostasis and liver cancer. *Med Oncol.* 2023;41(1):38.
98. Stehle P, Zander J, Mertes N, Albers S, Puchstein C, Lawin P, Fürst P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet.* 1989;1(8632):231-3.
99. Nwosu ZC, Battello N, Rothley M, Piorońska W, Sitek B, Ebert MP, et al. Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):211.
100. Lee YZ, Yang CW, Chang HY, Hsu HY, Chen IS, Chang HS, et al. Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget.* 2014;5(15):6087-101.
101. Bothwell PJ, Kron CD, Wittke EF, Czerniak BN, Bode BP. Targeted Suppression and Knockout of ASCT2 or LAT1 in Epithelial and Mesenchymal Human Liver Cancer Cells Fail to Inhibit Growth. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
102. Katoh M, Fujii T, Tabuchi Y, Shimizu T, Sakai H. Negative regulation of thyroid adenoma-associated protein (THADA) in the cardiac glycoside-induced anti-cancer effect. *J Physiol Sci.* 2024;74(1):23.
103. Fan Y, Xue H, Li Z, Huo M, Gao H, Guan X. Exploiting the Achilles' heel of cancer: disrupting glutamine metabolism for effective cancer treatment. *Front Pharmacol.* 2024;15:1345522.
104. Wahi K, Freidman N, Wang Q, Devadason M, Quek LE, Pang A, et al. Macropinocytosis mediates resistance to loss of glutamine transport in triple-negative breast cancer. *Embo j.* 2024;43(23):5857-82.
105. Ye J, Huang Q, Xu J, Huang J, Wang J, Zhong W, et al. Targeting of glutamine transporter ASCT2 and glutamine synthetase suppresses gastric cancer cell growth. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144(5):821-33.
106. Fuchs BC, Finger RE, Onan MC, Bode BP. ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(1):C55-63.
107. Tenora L, Alt J, Dash RP, Gadiano AJ, Novotná K, Veeravalli V, et al. Tumor-Targeted Delivery of 6-Diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) Using Substituted Acetylated Lysine Prodrugs. *J Med Chem.* 2019;62(7):3524-38.
108. Ishikita A, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Nishimura R, Tadokoro T, et al. GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-O-GlcNAcylation-Akt pathway. *iScience.* 2021;24(12):103517.

109. Leonel AV, Alisson-Silva F, Santos RCM, Silva-Aguiar RP, Gomes JC, Longo GMC, et al. Inhibition of O-GlcNAcylation Reduces Cell Viability and Autophagy and Increases Sensitivity to Chemotherapeutic Temozolomide in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2023;15(19).
110. Zhou X, Hang S, Wang Q, Xu L, Wang P. Decoding the Role of O-GlcNAcylation in Hepatocellular Carcinoma. *Biomolecules*. 2024;14(8).
111. Fang S, Zhu G, Xie Y, Ding M, Zhen N, Zhu J, et al. O-GlcNAcylation of glutaminase isoform KGA inhibits ferroptosis through activation of glutaminolysis in hepatoblastoma. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):160.
112. Zhang J, Xun M, Li C, Chen Y. The O-GlcNAcylation and its promotion to hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2022;1877(6):188806.
113. Bhat SA, Farooq Z, Ismail H, Corona-Avila I, Khan MW. Unraveling the Sweet Secrets of HCC: Glucometabolic Rewiring in Hepatocellular Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2023;22:15330338231219434.
114. Wang F, Chen L, Zhang B, Li Z, Shen M, Tang L, et al. O-GlcNAcylation Coordinates Glutaminolysis by Regulating the Stability and Membrane Trafficking of ASCT2 in Hepatic Stellate Cells. *J Clin Transl Hepatol*. 2022;10(6):1107-16.
115. Grewal S, Defamie N, Zhang X, De Gois S, Shawki A, Mackenzie B, et al. SNAT2 amino acid transporter is regulated by amino acids of the SLC6 gamma-aminobutyric acid transporter subfamily in neocortical neurons and may play no role in delivering glutamine for glutamatergic transmission. *J Biol Chem*. 2009;284(17):11224-36.
116. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521-34.
117. Le Minh G, Esquea EM, Young RG, Huang J, Reginato MJ. On a sugar high: Role of O-GlcNAcylation in cancer. *J Biol Chem*. 2023;299(11):105344.
118. Fabris G, Dumortier O, Pisani DF, Gautier N, Van Obberghen E. Amino acid-induced regulation of hepatocyte growth: possible role of Drosha. *Cell Death Dis*. 2019;10(8):566.
119. Gauthier-Coles G, Bröer A, McLeod MD, George AJ, Hannan RD, Bröer S. Identification and characterization of a novel SNAT2 (SLC38A2) inhibitor reveals synergy with glucose transport inhibition in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2022;13:963066.
120. Polet F, Martherus R, Corbet C, Pinto A, Feron O. Inhibition of glucose metabolism prevents glycosylation of the glutamine transporter ASCT2 and promotes compensatory LAT1 upregulation in leukemia cells. *Oncotarget*. 2016;7(29):46371-83.
121. Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, et al. The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*. 1991;266(36):24632-6.
122. Console L, Scalise M, Tarmakova Z, Coe IR, Indiveri C. N-linked glycosylation of human SLC1A5 (ASCT2) transporter is critical for trafficking to membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(7):1636-45.
123. Tang Y, Zhang Z, Chen Y, Qin S, Zhou L, Gao W, Shen Z. Metabolic Adaptation-Mediated Cancer Survival and Progression in Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7).
124. Munir R, Lisek J, Swinnen JV, Zaidi N. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *Br J Cancer*. 2019;120(12):1090-8.

-
125. Smith LK, Parmenter T, Kleinschmidt M, Kusnadi EP, Kang J, Martin CA, et al. Adaptive translational reprogramming of metabolism limits the response to targeted therapy in BRAF(V600) melanoma. *Nat Commun.* 2022;13(1):1100.
126. Feinberg D, Ramakrishnan P, Wong DP, Asthana A, Parameswaran R. Inhibition of O-GlcNAcylation Decreases the Cytotoxic Function of Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 2022;13:841299.
127. Zhang Z, Liu R, Shuai Y, Huang Y, Jin R, Wang X, Luo J. ASCT2 (SLC1A5)-dependent glutamine uptake is involved in the progression of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2020;122(1):82-93.
128. Thakur S, Kumar V, Das R, Sharma V, Mehta DK. Biomarkers of Hepatic Toxicity: An Overview. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2024;100:100737.
129. Wang L, Fang Z, Gao P, Zheng J. GLUD1 suppresses renal tumorigenesis and development via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Front Oncol.* 2022;12:975517.
130. Hochnadel I, Hoenicke L, Petriv N, Suo H, Groebe L, Olijnik C, et al. In vivo RNAi screen and validation reveals Ngp, Hba-a1, and S100a8 as novel inhibitory targets on T lymphocytes in liver cancer. *Front Immunol.* 2025;16:1549229.
131. Petriv N, Suo H, Hochnadel I, Timrott K, Bondarenko N, Neubert L, et al. Essential roles of B cell subsets in the progression of MASLD and HCC. *JHEP Rep.* 2024;6(12):101189.
132. Ho C, Wang C, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Delogu S, et al. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology.* 2012;55(3):833-45.
133. Schomaker S, Potter D, Warner R, Larkindale J, King N, Porter AC, et al. Serum glutamate dehydrogenase activity enables early detection of liver injury in subjects with underlying muscle impairments. *PLoS One.* 2020;15(5):e0229753.
134. Ye Y, Yu B, Wang H, Yi F. Glutamine metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma. *Front Mol Biosci.* 2023;10:1242059.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Leber (Erstellt mit BioRender.com).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der metabolischen Zonierung der Leber (Erstellt mit BioRender.com).	4
Abbildung 3: Aminosäuretransporter (20) (Erstellt mit BioRender.com).....	6
Abbildung 4: Reaktionsgleichungen zur Glutaminsynthese, Glutaminolyse und der Harnstoffsynthese.	7
Abbildung 5: Schematische Übersicht des Glutamin-Stoffwechsels in der Leber (Erstellt mit BioRender.com).	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Hexosamin Biosynthese Signalwegs (44) (Erstellt mit BioRender.com).	10
Abbildung 7: HCC-Stadien und Therapien (erstellt mit BioRender.com).....	12
Abbildung 8: Klinische Relevanz des SLC2A5(70).	14
Abbildung 9: Klinische Relevanz des SLC2A1 (74).	16
Abbildung 10: Darstellung der Neubauer Zählkammer(86).....	27
Abbildung 11: Versuchsablauf des Allograft- und HDI-Versuchs.....	35
Abbildung 12: Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Analyse des ¹³ C-Glutamin-Uptakes (erstellt mit BioRender.com).....	42
Abbildung 13: Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für die Langzeitproliferation von Huh7- und HepG2-Hepatomazellen.	49
Abbildung 14: Bedeutung von Glutamin und der Protein-O-GlcNAcylierung für das Wachstum von Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Hepatomazellen und kultivierter Maushepatozyten.....	50
Abbildung 15: Konzentrationsabhängigkeit der Hepatomazell-wachstumshemmenden Wirkungen von OSMI-1 und V-9302.....	51
Abbildung 16: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, ASCT2 und/ oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf das Wachstum humaner und muriner Hepatomazellen und kultivierter Maushepatozyten.	53
Abbildung 17: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, ASCT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf Proliferation und Induktion von Zelltod.....	55
Abbildung 18: Veränderung der Zellmorphologie sterbender Huh7-Zellen.....	56

Abbildung 19: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2, und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Induktion von Zelltod.	57
Abbildung 20: Charakterisierung des durch Aminosäuretransport- und Protein-O-GlcNAcylierungshemmung induzierten Zelltod in Huh7- und HepG2-Zellen.	59
Abbildung 21: Charakterisierung des durch Aminosäuretransport- und Protein-O-GlcNAcylierungshemmung induzierten Zelltod in Hepa1-6-Zellen.....	60
Abbildung 22: Superresolution Mikroskopie Aufnahmen von Huh7- und HepG2-Zellen.	61
Abbildung 23: Lokalisation des ASCT2-Transporters in Huh7- und HepG2-Zellen.	63
Abbildung 24: ASCT2-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.	65
Abbildung 25: Effekte einer Protein-O-GlcNAcylierungshemmung auf die Lokalisation von ASCT2 in Huh7- und HepG2-Zellen.	66
Abbildung 26: Spiegel von ASCT2 und O-GlcNAcylierten Proteinen in Huh7- und HepG2-Zellen.	67
Abbildung 27: ASCT2-mRNA in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.....	68
Abbildung 28: LAT1-Proteinspiegel in mit OSMI-1 und/oder V-9302 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.....	69
Abbildung 29: LAT1-mRNA in mit OSMI-1 und/oder V-9302 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.....	69
Abbildung 30: SNAT1- und SNAT2-mRNA in Huh7- und HepG2-Zellen.	70
Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse der Aufnahme von ¹³ C-markiertem Glutamin sowie der intrazellulären ¹³ C-Glutamat-Spiegel und basalen ¹² C-Glutamin-/ ¹² C-Glutamat-Level in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.....	71
Abbildung 32: Kynurenin-Uptake in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen nach Inkubation mit OSMI-1 und/oder V-9302.....	72
Abbildung 33: GS- und KGA-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.	73
Abbildung 34: Bedeutung von Glukose für die Langzeitproliferation von Huh7- und HepG2-Hepatomazellen.	74
Abbildung 35: Effekte der Hemmung von GLUT1, LAT1/SNAT2, und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf das Wachstum humaner Hepatomazellen.....	75

Abbildung 36: GLUT1-Proteinspiegel in mit OSMI-1 inkubierten Huh7- und HepG2-Zellen.....	76
Abbildung 37: Effekte der Hemmung von LAT1/SNAT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die GLUT1-mRNA-Spiegel in Huh7- und HepG2-Zellen.....	76
Abbildung 38: Effekte einer Hemmung des LAT1/SNAT2 und/oder der Protein-O-GlcNAcylierung auf die Lokalisation von GLUT1 in Huh7-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen.....	77
Abbildung 39: Effekte der Verabreichung von OSMI-1, V-9302 oder beiden Substanzen auf das Wachstum von Hepa1-6 Hepatomazellen <i>in vivo</i>	79
Abbildung 40: Surrogatmarker für Zellschädigung und Leberfunktion im Serum von mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten Mäuse.....	80
Abbildung 41: Versuchsablauf und Effekte der Verabreichung von OSMI-1, V-9302 oder beiden Substanzen auf das HCC-Wachstum im HDI-Lebertumormodell.	81
Abbildung 42: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf das HCC-Wachstum im HDI-Lebertumormodell.	82
Abbildung 43: Biometrie und Surrogatmarker für Zellschädigung und Leberfunktion im Serum von mit OSMI-1 und/oder V-9302 behandelten Mäuse.	83
Abbildung 44: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Quantität von T- und B-Zellen und Makrophagen in der Leber im HDI-Modell.....	84
Abbildung 45: Effekte der Verabreichung von OSMI-1 und/oder V-9302 auf die Lokalisation und Quantität der GS in der Leber im HDI-Modell.....	86

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen.	20
Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits.....	20
Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Materialien.....	21
Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	23
Tabelle 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer der Firma Eurofins.	23
Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme.	23
Tabelle 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.....	24
Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper.	24
Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.....	24
Tabelle 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen und dazugehörige Kultivierungsmedien.....	25
Tabelle 11: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien für die Hepatozyten Isolation.	26
Tabelle 12: Gemessene Serumparameter und entsprechende, vom Analysegerät, verwendete Abkürzungen und Einheiten.....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung des Proteinlyse-Puffers (RL-Puffer).....	38
Tabelle 14: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die Western-Blot-Analyse.	40
Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese.	44
Tabelle 16: Zusammensetzung je Well bei der qPCR.	44
Tabelle 17: Ablauf der qPCR.	45
Tabelle 18: PCR-Programm der Mykoplasmen PCR.....	46
Tabelle 19: Verwendete Software-Programme.....	48

8. Eidesstaatliche Erklärung

Ich, Frau Anna-Lena Dwillies, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der ‚Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf‘ erstellt worden ist.

Düsseldorf, der 02.02.2026

Unterschrift

9. Danksagung

Zunächst gilt mein herzlichster Dank Prof. Dr. Tom Lüdde, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchzuführen. Ich danke ihm sehr für die ausgezeichnete Zusammenarbeit sowie für seine wertvolle Unterstützung und fachliche Begleitung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat die Rolle des Zweitgutachters zu übernehmen. Ich schätze sein Engagement und seine Zeit sehr.

Ganz besonders möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Boris Görg für die hervorragende Zusammenarbeit und den ständigen, außerordentlich hilfreichen fachlichen Austausch danken. Vielen Dank auch für seine Zeit und Mühe, die er zum Gegenlesen und Korrigieren meiner Doktorarbeit aufgebracht hat.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank der technischen Assistentin Michaela Fastrich für die außerordentlich gute Einarbeitung sowie für ihre stetige fachliche und menschliche Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Vielen herzlichen Dank!!

Ebenfalls möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Herrn Dr. Timo Dellmann bedanken, stellvertretend für das gesamte Team der Core Facility Advanced Light Mikroskopy der Heinrich-Heine-Universität. Vielen Dank für die hervorragende Unterstützung und die Möglichkeit, die Mikroskope und Analyseprogramme für meine Arbeit nutzen zu dürfen.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. Diran Herebian von der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, der meine Proben massenspektrometrisch analysiert und mich bei der Auswertung sowie der Beschreibung der Methodik unterstützt hat. Durch seinen Beitrag hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nun möchte ich mich ausdrücklich bei den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Lüdde und Bode bedanken. Vielen Dank an jeden Einzelnen von euch für die großartige Zusammenarbeit und die vielfältige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitdotorandinnen und -dotoranden – Leonie Keysberg, Michael Singer und Julian Gilljam, Aylin Yücel, Lauredana dos Santos Ferreira Grani und Mika Froning vielen Dank für die schöne und unvergessliche Zeit mit euch! Ebenfalls gilt mein ausdrückliches Dankeschön Frau Dr. Carolin Angendoehr, die sowohl bei fachlichen Fragen als auch bei persönlichen Anliegen stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Matthias Dille für seine allzeit kompetente Unterstützung – sowohl bei den Tierversuchen als auch bei allen weiteren Fragen im Laboralltag.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Mirco Castoldi und Herrn Dr. Evangelos Kondylis, die mich bei Experimenten im Labor unterstützt und mir jederzeit bei Fragen weitergeholfen haben.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Anne Theres Schneider und Herrn Dr. Mihael Vucur für die stets hilfreichen und fachlich wertvollen Ideen in Bezug auf meine Arbeit.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen Nicole Eichhorst, Vanessa Herbertz, Thorsten Janssen, Stefanie Lindner, Claudia Rupprecht, Nathalie Walter und Marijana Suzanj für eure wertvolle Unterstützung im Labor und für euer stets offenes Ohr.

Weiter möchte ich mich von Herzen bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mir während der gesamten Promotionszeit zur Seite standen, mich unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Vielen Dank für eure unermüdliche Rückendeckung!

Mein besonderer Dank gilt zuletzt meinem Partner Henrik Dwillies. Danke, dass du immer an meiner Seite bist, mich in jeder Situation motivierst und mir hilfst stets mein Bestes zu geben. Ohne dich hätte ich es niemals so weit geschafft.

DANKE!