

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Christian Mawrin)

Rolle der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Julian Kahr
Altenburg (Thüringen)
2023

I. Bibliografische Beschreibung

Kahr, Julian:

Rolle der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen – 2023. -61 Bl., 21 Abb., 7 Tab.

Kurzreferat

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen genauer zu charakterisieren. Es wurde angenommen, dass eine veränderte Expression von RagC und Map4K3 direkten Einfluss auf die mTORC1-Aktivität nimmt und dadurch relevant zelluläre Mechanismen in Gliomzellen moduliert.

Humane Gliome wurden hinsichtlich der Expression von RagC und Map4K3 analysiert. Mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode wurden in Gliomzellen die Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 ausgeschaltet. Die Analyse von Morphologie und Motilität in Gliomzellen erfolgte mittels Konfokal- und optischer Mikroskopie. Es wurden Vitalitäts-Assays (CCK-8, ATP, BrdU, Trypan Blau) genutzt, um das Zellwachstum zu beschreiben. Zusätzlich wurden Veränderungen im mTOR-Signalweg sowie Autophagie und Seneszenz für RagC- und Map4K3-KO-Zellen charakterisiert.

Es zeigte sich mit steigendem Malignitätsgrad der Gliome eine signifikant verminderte Expression für RagC und Map4K3. Das Ausschalten von RagC und Map4K3 in U87-Gliomzellen beeinflusste sowohl Morphologie als auch Motilität. Weiterhin führte der Verlust von RagC und Map4K3 zu einer signifikanten Proliferationssteigerung in Gliomzellen (U87/U138). Es zeigten sich zudem in diesen Zellen Veränderungen im mTOR-Signalweg. Ein induzierter Aminosäuremangel (Leucinentzug) führte zu signifikanter Zellwachstumsreduzierung in U87 Map4K3-KO, nicht aber in U87 RagC-KO. Darüber hinaus zeigte sich eine induzierte Autophagie und ein verändertes Seneszenz-Verhalten.

Diese Daten belegen, dass ein verminderter Gehalt von Aminosäuresensoren mit steigendem Malignitätsgrad der Gliome zu einer gesteigerten Zellproliferation sowie Veränderungen im mTOR-Signalweg führt.

Schlüsselwörter

Gliom, Map4K3, RagC, Proliferation, Autophagie

II. Inhaltsverzeichnis

I. Bibliografische Beschreibung	1
II. Inhaltsverzeichnis.....	2
III. Abbildungsverzeichnis.....	4
IV. Tabellenverzeichnis	5
V. Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Das Glioblastom – aktueller Stand.....	8
1.2. mTOR als zentrale Schalteinheit der Zelle.....	10
1.2.1. mTORC1 und mTORC2 Aktivierung durch Akt-Signalweg.....	12
1.2.2. Leucin und mTOR.....	12
1.2.3. Rolle von RagC im mTOR-Signalweg.....	14
1.2.4. Rolle von Map4K3 im mTOR-Signalweg.....	14
1.3. Autophagie.....	15
1.4. Zielstellung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Technische Geräte und Chemikalien	18
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Genutzte Zelllinien und Zellkultivierung	21
2.2.2. Lentivirale Transfektion der Zelllinien und Knockout-Generierung.....	21
2.2.3. Herstellung der Zelllysate und Proteinbestimmung.....	23
2.2.4. SDS-Page und Western Blot	25
2.2.5. Vitalitäts-Assays	27
2.2.5.1. Trypan Blau-Assay.....	27
2.2.5.2. ATP-Assay	27
2.2.5.3. BrdU-Assay.....	27

2.2.5.4. CCK-8-Assay	28
2.2.6. Spaltschlussversuch	28
2.2.7. Seneszenz-Assay	29
2.2.8. Phalloidinfärbung	29
2.2.9. Live-Cell-Imaging	30
2.2.10. PCR-Analyse der humanen Gliom-Proben	30
2.2.11. Statistische Analyse	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Expression von RagC und Map4K3 in humanen Gliomen	33
3.2. Untersuchung der Morphologie nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout....	35
3.3. Migration und Motilität nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout.....	37
3.4. Proliferationsverhalten nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout	39
3.5. Western Blots des mTOR-Signalwegs.....	41
3.6. U87 RagC- und Map4K3-Knockout unter Leucin-freien Bedingungen.....	45
3.7. Autophagie und Seneszenz in U87 RagC- und Map4K3- Knockout	48
4. Diskussion	53
4.1. Die Rolle von RagC und Map4K3 in der Zellbiologie von Gliomen	53
4.2. Der molekulare Mechanismus von RagC und Map4K3	55
4.3. Ausblick	60
5. Zusammenfassung	61
VI. Quellenverzeichnis.....	62
VII. Danksagung.....	71
VIII. Ehrenerklärung	72
IX. Darstellung des Bildungsweges	73

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von mTORC1 und mTORC2	11
Abbildung 2: mTORC1 und mTORC2 Signalweg.....	13
Abbildung 3: Beziehung zwischen mTORC1 und Autophagie.....	16
Abbildung 4: Rel. Expression von RagC und Map4K3 in humanen Gliom-Proben ..	33
Abbildung 5: Proteinexpression von RagC und Map4K3 in humanen Gliom-Proben	34
Abbildung 6: Ausgangsexpression RagC und Map4K3	34
Abbildung 7: Knockout-Generierung von RagC und Map4K3	35
Abbildung 8: Morphologie nach Aminosäuresensor-KO	36
Abbildung 9: Zellkontakt- und Kolonieverhalten nach Aminosäuresensor-KO.....	37
Abbildung 10: Migrations-Assay nach Aminosäuresensor-KO	38
Abbildung 11: Live-Cell-Imaging nach Aminosäuresensor-KO	39
Abbildung 12: Proliferations-Assays für U87 Aminosäuresensor-KO	40
Abbildung 13: CCK-8-Assay U138 und MCF-7 Aminosäuresensor-KO	41
Abbildung 14: Proteinexpression der U87 Aminosäuresensor-KO in DMEM	44
Abbildung 15: CCK-8-Assay der U87 Aminosäuresensor-KO unter Leucinmangel..	45
Abbildung 16: Western Blot von U87 Aminosäuresensor-KO unter Leucinmangel ..	48
Abbildung 17: Autophagie-Induktion nach Aminosäuresensor-KO	48
Abbildung 18: Autophagiefluss in U87 Aminosäuresensor-KO.....	49
Abbildung 19: Western Blots von TFEB für U87 Aminosäuresensor-KO.....	51
Abbildung 20: Seneszenz nach U87 Aminosäuresensor-KO	52
Abbildung 21: Schematische Darstellung der TFEB-Phosphorylierung in U87 Aminosäuresensor-KO	59

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Geräte und Hilfsmittel.....	18
Tabelle 2: Chemikalien	18
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 4: Zellkulturmaterialien und Assays.....	20
Tabelle 5: Crispr/Cas9 Vektoren.....	22
Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper.....	26
Tabelle 7: cDNA-Primer.....	32

V. Abkürzungsverzeichnis

ΔC_t	Cycle threshold normiert gegen $\beta 2$ -Mikroglobulin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ADP/ATP	Adenosindi-/tri-phosphat
Akt	RAC(Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Atg	AuTophagy related 1
4E-BP1	4E-bindendes Protein 1
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor
CDKN2A/B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
GBM	Glioblastom multiforme
h	Stunden
H_2O	Wasser
HEK293T	Human Embryonic Kidney Zellen
IDH	Isocitratdehydrogenase
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAT-1	L-type amino acid transporter 1
LC3, MAPLC3A	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A
LRS	Leucyl-tRNA synthase
mA	Miliamper
Map4K3	Mitogen activated protein kinase kinase Kinase 3
MGMT	O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase
Min	Minuten

ml	Milliliter
mLST8	mammalian lethal with sec-13 protein 8
mM	Millimolar
mSIN1	mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1
mTORC 1/2	mammalian Target of Rapamycin complexe 1/2
n	Anzahl
nm	Nanometer
p70S6K, s6K	p70s6 Kinase
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	phosphoinositidabhängige Kinase 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PRAS40	proline-rich AKT substrate 40 kDa
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RagA/B/C/D	Ras-related GTP binding protein A/B/C/D
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
g	Erdbeschleunigung
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunden
SCR	scrambled (Kontrollzellen)
SD	Standardabweichung
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
TTF	Tumor-Treating-Field
ULK1/2	Unc-51-like autophagy-activating kinases 1/2
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Das Glioblastom – aktueller Stand

Das Glioblastom, früher auch als Glioblastoma multiforme (GBM) bezeichnet, ist mit 15,1 % der häufigste Hirneigene Tumor [1]. Es handelt sich um eine aggressive Tumorentität, die aus den Gliazellen Astrozyten, den stützenden Zellen des Gehirns, entsteht. Auffällig wird das Glioblastom erst durch unterschiedliche neurologische Beschwerden. Dabei spielt die Lokalisation des Tumors die entscheidendste Rolle bei der Symptomausprägung. Häufig entstehen aus völliger Gesundheit heraus Symptome wie epileptische Anfälle oder Kopfschmerzen. Aber auch Lähmungen, Seh-, Sprach- oder Gedächtnisstörungen sowie Veränderungen der Persönlichkeit sind nur einige der vielfältigen Symptome. Was daraufhin folgt, sind klinisch-neurologische Untersuchungen sowie der Einsatz bildgebender Verfahren. Aber auch die neuropathologische Analyse nach Biopsie-Gewinnung des Tumors spielt eine wichtige Rolle bei der Beurteilung des ZNS-WHO-Grades und gegebenenfalls Therapieentscheidung [1].

ZNS-WHO-Grade und Mutationen

Konventionell-histologisch erfolgte die Einteilung der Astrozytome unter neuropathologischen Gesichtspunkten wie Angiogenese, Zelldichte und Mitosen, Kernpleomorphismus und Infiltration. Dabei teilte man die Tumoren in vier Grade ein, wobei die am stärksten entdifferenzierte Variante - Glioblastom Grad 4 - genannt wurde. Heute sind zusätzliche molekulare Merkmale entscheidend für die genauere Einordnung. Die wichtigste genetische Veränderungen bei Gliomen ist die Mutation des *IDH*-Gens [2]. Entsprechend der ZNS-WHO-Klassifikation von 2021 erfolgt die Bezeichnung der Grad 4 Astrozytome nicht mehr generell als Glioblastom, sondern als Astrozytom Grad 4, wenn eine *IDH*-Mutation vorliegt [3]. Glioblastome hingegen sind durch einen *IDH*-Wildtyp gekennzeichnet. Ein anderer prognostischer und prädiktiver Marker ist die Methylierung des *MGMT*-Promoters. Dieser kann in methylierter und nicht-methylierter Version vorliegen. Ein methylierter *MGMT*-Promoter-Status bedeutet eine Inaktivierung des DNA-Reparationsmechanismus und verbessert den Therapieerfolg von Temozolomid [4]. Ein nicht-methylierter *MGMT*-Promoter hingegen verringert deutlich die Wirksamkeit von Temozolomid. Zusammen bilden sie einen entscheidenden Anker bei der Therapieentscheidung [5]. Darüber

hinaus seien die Beispiele homozygote Deletion von *CDKN2A/B*, *TERT*-Promotor-Mutation, *EGFR*-Amplifikation und +7/-10-Kopienzahlvarianten erwähnt. Diese Mutationen können zur genaueren Klassifikation genutzt werden [3]. Das Wissen über die Mutationen und korrespondierenden ZNS-WHO-Grade spiegeln den Wert molekularer Marker in Bezug auf die Therapieentscheidung deutlich wider.

Therapie

Derzeitiger Standard für die Behandlung des Glioblastoms ist die operative Entfernung unter strengster Berücksichtigung umliegender funktionell-relevanter Strukturen. Sollte dann noch der *MGMT*-Promotor methyliert und damit inaktiviert sein, kann eine Behandlung mit Temozolomid angestrebt werden [6]. Hinzu kommt meist noch eine Bestrahlung (Stupp-Schema) oder die alleinige Bestrahlung bei fehlender Methylierung des *MGMT*-Promotors [7, 8]. Aktuell steht eine Kombinationsbehandlung aus Temozolomid und Lomustin unter Diskussion (Herrlinger-Schema) [9]. Möglicherweise kann bei neu diagnostiziertem *MGMT*-Promotor-methyliertem Glioblastom dieses Therapieschema zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führen [9]. Ein weiterer potentieller Wirkstoff ist Vorasidenib. Dies ist ein neuer, oral zu verabreichender Hemmstoff für mutierte *IDH1*- und *IDH2*-Enzyme, der in *IDH*-mutierten Grad 2 Gliomen ein reduziertes Wachstum herbeiführt [10].

Seit einigen Jahren gewinnt die Behandlung mit Tumor-Treating-Fields (TTF) an Bedeutung als einzige weiter zugelassene Therapie zur Behandlung von Glioblastomen [11]. Es konnte gezeigt werden, dass das Überleben von Patienten mit TTF- und Temozolomid-Behandlung im Median auf 20,9 Monate, im Vergleich zu 16 Monate mit Temozolomid-Monotherapie, gestiegen ist [12]. Hintergrund der TTF-Behandlung ist die Störung der Mitose durch die lokale Erzeugung eines alternierenden elektrischen Feldes, welches im besten Fall zum programmierten Zelltod oder mitotischen Arrest führt [13, 14]. Auch wenn der mediane Zugewinn von Lebenszeit mit ca. 5 Monaten keinen Meilenstein in der Behandlung des Glioblastoms darstellt, so zeigt sich dessen Bedeutung als mögliche vierte Säule neben chirurgischer-, radiologischer und chemotherapeutischer Behandlung.

Weitere mögliche Ansätze sollen hier kurz Erwähnung finden, wie zum Beispiel die Immuntherapie mittels Immunrekonstruktion. Um eine Immunrekonstruktion des Gehirns zu erreichen, werden adenovirale Vektoren in die Resektionshöhle oder den

verbleibenden Tumor injiziert [15]. Erfolgsversprechende Ergebnisse lassen auch hier leider auf sich warten, da das Glioblastom mit eigenen Strategien und eigener Mikroumgebung ein Immunsuppressives Milieu bildet [16]. Daneben gibt es Ansätze, positive Effekte mittels Zell-Therapien, genauer CAR (Chimärer Antigen-Rezeptor) T-Zellen, CAR Natürlich Killerzellen, Makrophagen und Andere, zu erzielen. Dabei basieren alle auf einer Individualtherapie. Diese CAR-Konstrukte dienen zur Erkennung ausgewählter Tumorantigene bzw. tumorverwandter Antigene, die bei Glioblastomen überexprimiert sind und im gesunden Hirngewebe oder anderswo im Körper wenig bis gar nicht exprimiert werden [17]. Auch hier sind die Ergebnisse sehr überschaubar, wenngleich sie eine erfolgversprechende Möglichkeit zur Behandlung des Glioblastoms darstellt [18].

Die bereits erwähnte Individualtherapie ist das Schlagwort moderner Medizin, die dabei den individuellen Fingerabdruck des Tumors nutzt, um gezielte therapeutische Behandlungen zu ermöglichen. Das Verständnis über die molekularen Eigenschaften des Glioblastoms, seinen veränderten Expressionen und Mechanismen auf allen Ebenen zu entschlüsseln stellt eine Mammutaufgabe dar.

1.2. mTOR als zentrale Schalteinheit der Zelle

Die mTOR-Kinase (mammalian target of rapamycin) ist ein zentraler Regulator des Zellwachstums, der Proliferation und des Stoffwechsels [19]. Diese Serin/Threonin-Kinase spielt eine zentrale Rolle bei der Integration verschiedener intra- und extrazellulärer Signale zur Koordinierung der zellulären Reaktionen. Der mTOR-Signalweg ist in zwei unterschiedliche Komplexe unterteilt, mTORC1 und mTORC2, die jeweils einzigartige Funktionen und Regulierungsmechanismen haben. Beide Komplexe bestehen dabei aus mTOR (mammalian Target of Rapamycin), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) und mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) [20-22]. Hingegen unterscheiden sie sich hauptsächlich durch das zum mTORC1 gehörige Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) und proline-rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40), und das zum mTORC2 gehörige Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) sowie mSIN1 (mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1) [21, 23-25]. Raptor ist dabei ein wichtiges Gerüstprotein, das dabei hilft, Substrate und regulatorische Komponenten an

mTORC1 zu rekrutieren. Rictor ist ebenfalls ein wichtiges Gerüstprotein, das die Zusammensetzung von mTORC2 bestimmt. Es ist für den Aufbau und die Stabilität von mTORC2 erforderlich. mTORC1 reguliert in erster Linie die Proteinsynthese über die Phosphorylierung von 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) und p70S6K (p70s6 Kinase 1). Dabei unterbricht die mTORC1-vermittelte 4E-BP1-Phosphorylierung den 4E-BP1-eIF4E-Komplex und ermöglicht eine 5'-Cap-abhängige mRNA-Translation [26, 27]. In ähnlicher Weise agiert die phosphorylierte p70S6K, indem sie die Initiierung der mRNA-Übertragung fördert [28]. Zusätzlich reguliert mTORC1 die Autophagie als Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und den Energiestatus [29-31]. Im Gegensatz dazu spielt mTORC2 eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen, die Organisation des Zytoskeletts und die Regulierung des Stoffwechsels [32]. Eine Fehlregulierung des mTOR-Signalwegs wird mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, Stoffwechselsyndrome und immunbedingte Erkrankungen [19, 33-35]. Das Verständnis des komplizierten Signalnetzwerks von mTOR hat zur Entwicklung zielgerichteter Therapien, wie Rapamycin-Analoga, für die Behandlung verschiedener Krankheiten geführt.

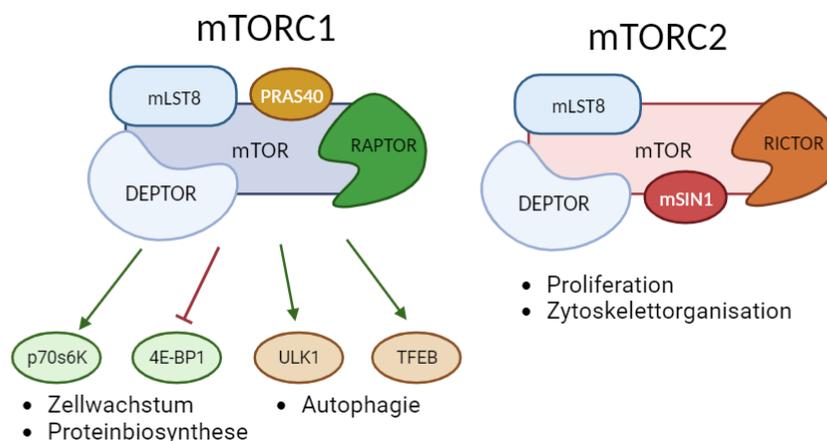


Abbildung 1: Aufbau von mTORC1 und mTORC2. Schematische Darstellung von mTORC1 und mTORC2 mit deren einzelnen Bestandteilen sowie ihrer Beziehung zu Downstream-Proteinen. Genaue Bezeichnung der Komponenten im Text (1.2 und 1.3) Abbildung wurde modifiziert mit Biorender.com [31].

1.2.1. mTORC1 und mTORC2 Aktivierung durch Akt-Signalweg

Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin) binden sich an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und aktivieren PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) [36]. PI3K wandelt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) um, was von PTEN inhibiert wird [37]. Für die Aktivierung von mTORC2 bindet PIP3 an dessen mSIN1. Hingegen wird für die Aktivierung von mTORC1 eine Kaskade über Akt benötigt. Hierzu rekrutiert PIP3 die Phosphoinositidabhängige Kinase 1 (PKD1), um Akt zu aktivieren. Zusätzlich wird Akt über die mTORC2 abhängige Phosphorylierung an S473 aktiviert [38, 39]. Im weiteren Verlauf hemmt Akt wiederum den TSC-Komplex (tuberous sclerosis complex) [40]. Über einen zusätzlichen Signalweg wird der TSC-Komplex durch AMPK (AMP-activated protein kinase) gegenreguliert [41]. So phosphoryliert AMPK den TSC-Komplex bei Energiemangelzuständen [42]. Der TSC-Komplex selbst wirkt hemmend auf die GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) [43]. Anders ausgedrückt, führt die doppelte Inhibierung dazu, dass GTP-gebundenes Rheb als zentraler Aktivator von mTORC1 in Bezug auf seine Downstream-Produkte 4E-BP1 und p70S6K agiert [44]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts, die mTORC2-Aktivität negativ durch erhöhte Phosphorylierung von p70S6K reguliert ist [39].

1.2.2. Leucin und mTOR

Die Zellen überwachen ständig ihre Nährstoffumgebung, einschließlich der Verfügbarkeit von Aminosäuren. Unter den verschiedenen Aminosäuren ist Leucin einer der potentesten Aktivatoren von mTORC1 [45]. Ein ausreichender Aminosäurespiegel, insbesondere von Leucin, signalisiert der Zelle, dass genügend Bausteine für die Proteinsynthese und andere anabole Prozesse vorhanden sind. Die vollständige Aktivierung von mTORC1 erfordert eine durch Aminosäuren induzierte Signalisierung. Der speziell für Leucin sensible Transporter LAT1 (L-type amino acid transporter 1, auch SLC7A5 genannt) als auch andere membranständige Transporter importieren Aminosäuren in die Zelle [46, 47]. Einmal im Zytoplasma angekommen, wird unter anderem Leucin direkt von LRS (Leucyl-tRNA synthase) wahrgenommen [48]. Dies führt direkt zur Aktivierung von RAS-verwandten GTP-bindenden Proteinen (Rag's oder Rag-GTPasen), welche die lysosomale Translokation von mTORC1

vermitteln (siehe 1.2.3) [48]. Zusätzlich bindet Leucin bei ausreichender Präsenz an Sestrin2 [49]. Dies wiederum wirkt inhibitorisch auf GATOR2 [50, 51]. GATOR2 ist für die mTORC1-Aktivierung erforderlich und bindet dabei unter inhibitorischer Wirkung an GATOR1 [52, 53]. GATOR1 bindet und inaktiviert RagA/B [54, 55]. Die Kaskade der supprimierenden Wirkungen von GATOR2 auf die Inhibition durch GATOR 1 führt schlussendlich dazu, dass die Rag-GTPasen die Verlagerung von mTORC1 an die lysosomale Oberfläche, den Ort der mTORC1-Aktivierung, fördern [56, 57]. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass mTORC1 unter Aminosäure-freien Bedingungen frei im Zytoplasma befindlich ist. Wenn ausreichend Aminosäuren die Translokation einmal an der lysosomalen Oberfläche über die genannte Kaskade initiiert haben, dann interagiert mTORC1 mit Rheb [58]. Zusätzlich erfolgt die Verankerung über eine v-ATPase, so dass die konstitutive Ausrichtung von mTORC1 auf die lysosomale Oberfläche ausreicht, um mTORC1 aminosäureunempfindlich und unabhängig von der Funktion von Rag, aber nicht von Rheb, zu machen [59, 60].

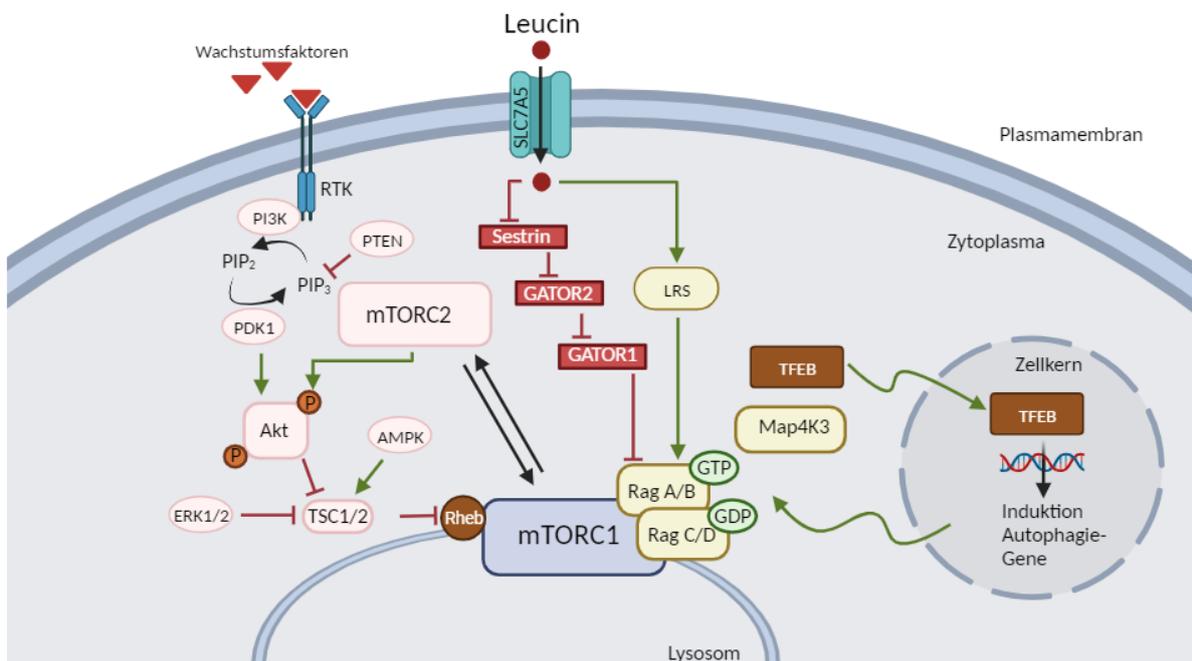


Abbildung 2: mTORC1 und mTORC2 Signalweg. Vereinfachte Darstellung der Proteine im Upstream des mTOR-Signalweges, mit Fokus auf Leucin abhängige Aktivierung von mTORC1 durch Rag GTPasen. Darstellung des Map4K3 abhängigen TFEB-Mechanismus. Zusätzliche Illustration des PI3K/Akt Signalwegs unter Einbeziehung von mTORC2. Abbildung wurde mit Biorender.com modifiziert [31, 61-63].

1.2.3. Rolle von RagC im mTOR-Signalweg

Die bereits erwähnten Rag-GTPasen, die sich aus RagA/RagB und RagC/RagD zusammensetzen, bilden zusammen ein Heterodimer [64]. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Lokalisierung und Aktivierung des mTORC1-Komplexes als Reaktion auf Veränderungen der Aminosäureverfügbarkeit [58, 65]. Die Rag-GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechseln [66]. In Studien mit *Drosophila* S2 Zellen konnte gezeigt werden, dass RagC eine der Rag-GTPasen ist, die als kritische Aminosäuresensoren innerhalb des mTOR-Wegs fungieren [67]. In GTP-gebundener Form fungiert RagC als Gerüstplattform, die die Rag-Heterodimere an der lysosomalen Oberfläche verankert, wo durch Bindung an der mTORC1-Untereinheit Raptor die Aktivierung ausgelöst wird [58, 59]. Wie bereits erwähnt beeinflussen die Aminosäuren zwar die mTORC1-Aktivierung durch Rag-GTPasen, scheinen dabei aber nicht alleine die GTP-Aufladung von Rag verändern zu können [68]. Damit ist die Bindung von Raptor an Rag zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die mTORC1-Aktivierung an sich [68]. Zusätzliche aminosäureabhängige Schritte koppeln Rag-mTORC1 an Rheb und bilden so einen großen Komplex für die volle mTORC1-Aktivierung [69].

1.2.4. Rolle von Map4K3 im mTOR-Signalweg

Map4K3 ist ein Mitglied der Ste20-Familie und gehört zur Gruppe der Mitogen-activated protein kinase Kinasen (MAP4K) [70]. MAP4K3 wurde als ein Protein identifiziert, das gezielt auf Aminosäureverfügbarkeit, insbesondere Leucin, reagiert und nachgeschaltet über mTORC1 p70S6K bzw. 4E-BP1 moduliert [70, 71]. Genauer gesagt, benötigt Map4K3 für die Interaktion mit mTORC1 und dessen Aktivierung eine eigene Phosphorylierung [72]. Die Phosphorylierung an Serine170 ist dabei abhängig von zwei Untereinheiten, welche nur in Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration aktiv werden [72]. Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass Map4K3 für die mTORC1-Aktivität unbedingt erforderlich ist [73]. Eine Verminderung oder Hemmung von MAP4K3 führt zu einer verringerten mTORC1-Aktivität und zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Zellproliferation [74, 75]. Die Aktivierung von MAP4K3 durch Aminosäuren erfolgt vor der S6K-Phosphorylierung und wird

durch Rapamycin nicht gehemmt, was darauf hindeutet, dass MAP4K3 im Upstream von mTORC1 angeordnet werden kann [70, 72]. Darüber hinaus könnte Map4K3 durch die Phosphorylierung und Aktivierung der Rag-GTPasen zur Regulierung der mTORC1-Aktivierung als Reaktion auf die Verfügbarkeit von Aminosäuren beitragen [76]. Zusätzlich phosphoryliert MAP4K3 direkt den Transkriptionsfaktor TFEB, was zu einer Hemmung der durch Aminosäuremangel vermittelten TFEB-Kerntranslokation führt (siehe 1.3) [77].

1.3. Autophagie

Die Autophagie ist ein koordinierter homöostatischer Prozess zur Beseitigung unerwünschter Proteine und beschädigter Organellen [78, 79]. Mehrere Signalwege erkennen verschiedene Arten von Zellstress (Glukosedepletion, Aminosäuremangel, etc.), um Autophagie in mehreren Phasen des Prozesses zu regulieren. Die Autophagie beginnt mit der Bildung von Phagophoren, ein Schritt, der durch einen Proteinkomplex eingeleitet wird, und der aus ULK1/2 (Unc-51-like autophagy-activating kinases 1/2) sowie Atg-Proteinen (autophagy-related genes) besteht [80, 81]. ULK1/2 phosphoryliert dann Komponenten des Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Komplexes, dessen Bildung durch Beclin 1 vorangetrieben wird [82, 83]. Der Phagophor dehnt sich aus und isoliert seine Ladung in einer geschlossenen Struktur, die als Autophagosom bezeichnet wird [79]. Während der Autophagie verschlingen die Autophagosomen zytoplasmatische Komponenten, einschließlich zytosolischer Proteine und Organellen. Gleichzeitig wird eine zytosolische Form von LC3 (LC3-I) an Phosphatidylethanolamin konjugiert, um LC3-Phosphatidylethanolamin-Konjugat (LC3-II) zu bilden, das an die autophagosomalen Membranen rekrutiert wird [84]. Die Verschmelzung des Lysosoms mit dem Autophagosom als Autophagolysosom ermöglicht den Abbau seines Inhalts [79]. Neben ULK1/2 wird ein weiterer Signalweg über Akt beschrieben, der für die Phosphorylierung von TFEB (Transkriptionsfaktor EB) verantwortlich ist, und so dessen Aktivität moduliert [82, 85]. Im unphosphorylierten Zustand kann TFEB in den Zellkern gelangen und dort die Induktion von Autophagie-Genen aktivieren, die zur Einleitung der Autophagie essentiell sind [86-89]. Demzufolge ist die Autophagie durch phosphoryliertes TFEB verhindert. Es wird beschrieben, dass Map4K3 ebenfalls als

Phosphorylierungs-Regulator an TFEB wirkt und somit als wichtiger Modulator der Autophagie in Bezug auf Aminosäuremangel agiert [77]. Genauer gesagt, MAP4K3 interagiert physisch mit TFEB, phosphoryliert dieses und sorgt für eine Hemmung der nukleären Lokalisierung von TFEB [77]. Darüber hinaus ist die Phosphorylierung von TFEB für die Interaktion mit dem Komplex aus mTORC1 und Rag GTPasen erforderlich [77]. Es wurde gezeigt, dass die Rag-GTPasen TFEB in Abhängigkeit der Aminosäuremenge an Lysosomen rekrutieren, und dass diese Umverteilung für die mTORC1-vermittelte Phosphorylierung von TFEB erforderlich ist [63]. Eine Studie zeigte an neugeborenen Mäusen mit einer Punktmutation in RagA, und dadurch übermäßigen Aktivität von mTORC1, unabhängig vom Nährstoffgehalt, dass diese nicht in der Lage einer Autophagie-Induktion waren [90].

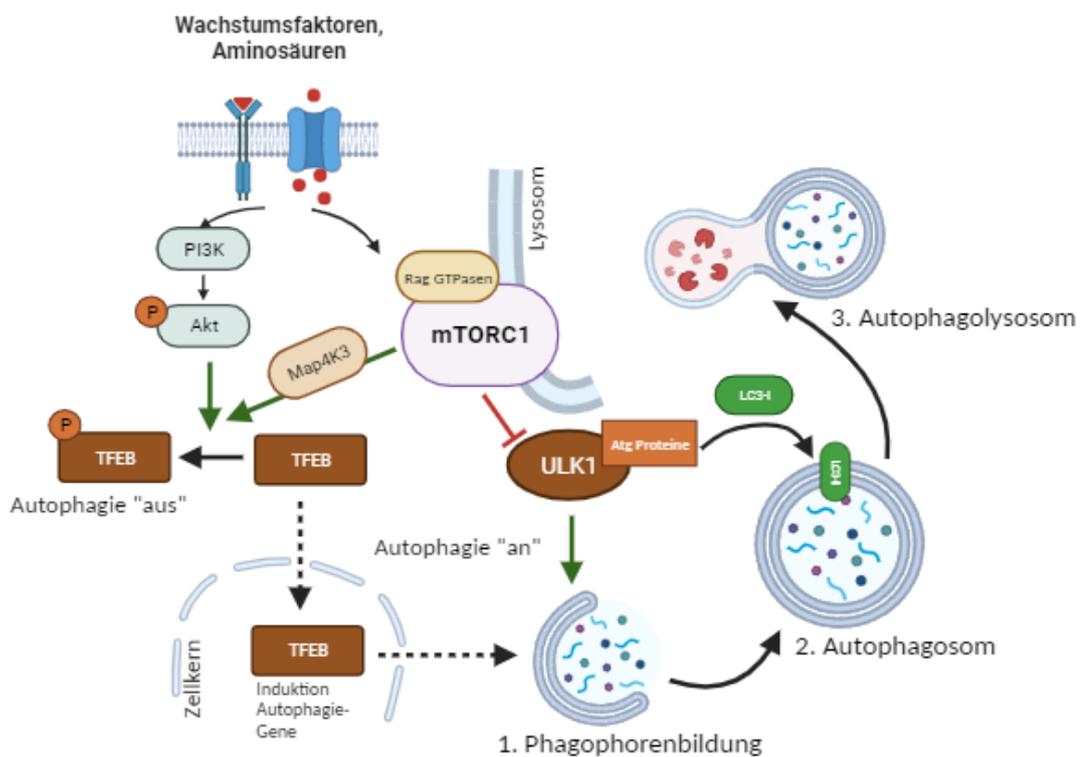


Abbildung 3: Beziehung zwischen mTORC1 und Autophagie. Vereinfachte Darstellung der an der Autophagie beteiligten Proteine in Abhängigkeit des mTOR-Signalweges. Abbildung wurde mit Biorender.com modifiziert [62, 77, 85, 91-93]

1.4. Zielstellung der Arbeit

Glioblastome zeichnen sich durch ihre schnelle Wachstumsrate, ihre Infiltration in umliegendes Gewebe und ihre Neigung zur Bildung neuer Blutgefäße aus, was zu einer gesteigerten Versorgung mit Nährstoffen führt.

Sowohl RagC als auch Map4K3 sind bekannt dafür, als bedeutende Komponenten im mTOR-Signalweg zu agieren. Dabei spielen beide Proteine eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Aminosäuren, insbesondere der essentiellen Aminosäure Leucin.

Daher stellten sich die Fragen:

1. Wie verhält sich die Expression von RagC und Map4K3 in humanen Gliomen in Abhängigkeit vom WHO-Grad?
2. Beeinflusst der Verlust der Aminosäuresensoren RagC oder Map4K3 signifikant zelluläre Mechanismen (Proliferation etc.) in Gliomzellen?
3. Führt das Ausschalten der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 zu Veränderungen im mTOR-Signalweg?
4. Sorgt ein Nährstoffmangelzustand (Leucin) in RagC- oder Map4K3- defizienten Gliomzellen zu einem eingeschränkten Metabolismus?

2. Material und Methoden

2.1. Technische Geräte und Chemikalien

Tabelle 1: Technische Geräte und Hilfsmittel

Technisches Gerät	Hersteller
Elektrophorese Ausrüstung	Bio-Rad
Entwickler Fusion Fx7	peQLab Biotechnologie GmbH
Heizblock	Rotilabo Block Heater H 250
Hand-Homogenisierer	IKA T10 basic
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies
Konfokal Mikroskop, Live-Cell-Imaging	BZ-8000K fluorescence microscope, Keyence
Live-Cell-Imaging Kammer-system	Tokai Hit INU-KI3-F1
Luminometer	Turner designs TD 20/20
Messwaage	Ohaus Pioneer
Multimodales Messgerät	TECAN Infinte m200 Nanoquant
pH-Meter	Sartorius
Schüttler	VWR Rocking Platform
Tischinkubator	Heraeus, Kendro Laboratory Products
Tisch-Vortexer	Heidolph Reax top
Tischzentrifuge	Micro Centrifuge, Roth
Ultraschall-Prozessor	Dr. Hielscher, UP 100H
Vertikalschüttler	Edmund Bühler, KL1
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen Mikro 220 R
Zentrifuge	Thermo Scientific Heraeus Multifuge X1R

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth
Alexa Fluor 546 Phalloidin-Stammlösung	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

Ammonium Persulfat (APS)	Serva
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth
Chemilumineszenz für Western Blot	Immobilon Western, Millipore, Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Glycin	Carl Roth
Kristallviolettlösung	Serva
L-Leucin	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
MycoZap	Biozym
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham Protran
Paraformaldehyd	Carl Roth
Protease Inhibitor Cocktail	EMD millipore
Puromycin Dihydrochlorid	BioChemica, PanReac AppliChem
Rinderserumalbumin (BSA)	Biowest
Salzsäure, 25%	Carl Roth
SDS Proben Puffer, Laemmli 2x Konzentrat	Sigma
Tetramethyl-ethylenediamine (TMED)	Serva
Tris/Base, Tris/HCl	Carl Roth
Triton X-100	Molecular Sigma Biology
Tween 20	Carl Roth

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Lyse Puffer	1 ml RIPA (Thermo Fisher Scientific), 10 µl Natriumvanadat (100 mM), 10 µl

	Protease Inhibitor Cocktail, und 1 µl DTT (1 mM)
Polyacrylamidgel 12,5 %	Trenngel: 1,8 ml dH ₂ O, 4,2 ml Acrylamid 30%, 2 ml 1,88 M TRIS-HCl, 2 ml SDS 0,5 %, 8,3 µl TEMED, 50 µl APS Sammelgel: 2,6 ml dH ₂ O, 1 ml Acrylamide 30%, 1,2 ml 0,625 M TRIS-HCl, 1,2 ml SDS 0,5%, 6 µl TEMED, 30 µl APS
TBS 10x	9 g Tris-Base, 68,5 g Tris-HCl, 87,8 g NaCl, 1L dH ₂ O
Waschpuffer	200 ml TBS, 1,8 l dH ₂ O, 2 ml Tween 20
Western Blot, Block Lösung für Membran, 5 %	50 ml Waschpuffer and 2,5 g BSA/ Milchpulver
Western Blot, Laufpuffer	15,1 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS, 5 l dH ₂ O; pH = 8,3
Western Blot, Transferpuffer	7,57 g Tris-Base, 28,15 g Glycin, 2 l dH ₂ O, 500 ml Methanol; pH = 8,3

Tabelle 4: Zellkulturmaterialien und Assays

Material/ Medium	Hersteller
5-Bromo-2-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	Roche
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay	Promega
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), high glucose	PanBiotech
DNA/RNA Isolationskit, NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PanBiotech
Proteinbestimmungs-Kit, DC Protein-Assay	Bio-Rad
Senescence Cells Histochemical Staining Kit	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PanBiotech
Virusmedium, Gibco	Thermo Fisher Scientific
Zell-Counting Kit CCK-8	MCE, MedChemExpress
Zellkultur-Einsätze (Spalthalter)	IBIDI

2.2. Methoden

2.2.1. Genutzte Zelllinien und Zellkultivierung

U87 MG, U138 MG und MCF-7 (ATCC, American Type Culture Collection), wurden in 250 ml Zellkulturflaschen (Cellstar, Greiner bio-one) mit 10 ml DMEM kultiviert. Zur Verwendung in Experimenten oder für Zellpassagen wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und anschließend in 2 ml Trypsin inkubiert. Danach erfolgte die Suspension mit zusätzlichen 8 ml PBS und eine Überführung in 50 ml Falcon-Röhrchen, welche dann bei 1000 rpm für 12 min zentrifugiert wurden. Eine entsprechende Anzahl an Zellen wurde für Experimente genutzt oder zurück in die Zellkulturflasche gesät. Hier wurden die Zellen in 10 ml DMEM bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für *Experimente mit Leucinentszugs* wurden die Zellen in DMEM ohne Leucin und zugefügten dialysierten fötalen Rinderserum kultiviert. Für Proteinanalysen mittels Western Blot wurden 4 h Leucinmangelzustand erzeugt. Für Proliferation-Assays wurden die Zellen 24 bzw. 48 h behandelt. Entsprechende Re-Stimulations-Experimente erfolgten mit dem gleichen Leucin-freien Medium, welches aber zusätzliches Leucin, äquivalent zu vollwertigem DMEM, enthielt. Hierzu wurde Leucin in Wasser gelöst und eine Konzentration im Medium von 1 mM hergestellt. Entsprechende Re-Stimulations-Experimente wurden für Proteinanalysen im Sinne des Western Blots für 1 h und für Proliferations-Experimente für 48 h durchgeführt.

Für die genauere Betrachtung der Autophagie wurde eine *Ammoniumchlorid-Behandlung* der Zellen durchgeführt. Dafür wurde eine Ammoniumchlorid Konzentration von 20 mM im Medium hergestellt. Es erfolgte eine Behandlungsdauer von 4 h.

2.2.2. Lentivirale Transfektion der Zelllinien und Knockout-Generierung

Drei in Bakterien hergestellte Plasmide wurden von VektorBuilder erworben. Ein humanes CRISPR/Cas9-Kontrollkonstrukt (verschlüsselte lediglich 2 kleine RNAs, die 2 spezifische gRNAs ersetzen) und ein humanes CRISPR/Cas9-Konstrukt, gekoppelt mit zwei MAP4K3 gRNAs. Des Weiteren ein humanes CRISPR/Cas9 Konstrukt in Verbindung mit zwei RRAGC-gRNAs. Jedes Konstrukt wurde begleitet von einem Puromycin (Puro)-Resistenz-Gen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Crispr/Cas9 Vektoren

Vektor	Beschreibung
MAP4K3, Vektor ID: VB200507-1074bqr	pLV[2CRISPR]-hCas9:T2A:Puro-U6>hMAP4K3[gRNA#9205]-U6>hMAP4K3[gRNA#9128] E.coli stock
RagC, Vektor ID: VB200507-1071hsw	pLV[2CRISPR]-hCas9:T2A:Puro-U6>hRRAGC[gRNA#461]-U6>hRRAGC[gRNA#113] E.coli stock

Diese beiden Plasmide und das Kontroll-Plasmid (scrambled) waren Sequenz-identisch, mit Ausnahme der Target-spezifischen gRNAs, die im Kontroll-Plasmid durch scrambled RNAs ersetzt waren.

Lentivirale Transfektion

Für die lentivirale Transfektion wurden HEK293T Zellen genutzt. Dabei wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in Zellkulturflaschen mit 10 ml Virusmedium für 24 h ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden zwei Mixturen hergestellt. Erstere enthielt 6 µg pC-Pack2 Packaging Mix (Collecta®, Konzentration = 0,5 µg/µl, enthält Hilfsplasmide pMD2.G mit dem VSV-G envelope Gen) und psPAX2 mit den Genen für Virusprotein und reverse Transkriptase sowie das jeweilige, HIV1-abgeleitete lentivirale Plasmid (siehe Tabelle 5). Das zweite enthielt 1,8 ml OptiMEM und 27 µl FuGene®. Beide Mixturen wurden bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und anschließend vereint. Hiernach erfolgten weiter 15 min Inkubation während das Virusmedium gewechselt und auf 4 ml reduziert wurde. Dann erfolgte die Zugabe des Mixes und eine weitere Inkubation für 24 h bei 37°C (Lentivirus-Produktion durch die HEK-Zellen). Am darauffolgenden Tag wurde das Virusmedium gewechselt und durch 9 ml frisches Virusmedium ersetzt. Nach 16 h wurde der erste Virusüberstand abgenommen, mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert und bei -80°C gelagert. Zusätzlich wurden 6 ml frisches Virusmedium zu den HEK293T Zellen gegeben und für weitere 8 h inkubiert. Danach wurde der zweite Virusüberstand abgenommen, ebenfalls mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert und mit dem zuvor gewonnenen Virusüberstand zusammengeführt.

Für die Transfektion der Zielzellen (U87 MG, U138 MG, MCF-7) wurden 5×10^5 Zellen mit 1,5 ml Virusüberstand (entsprechend der gewünschten gRNAs für: Map4K3, RagC, scrambled) in einer 6-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) für 24 h inkubiert. Dabei wurde der Virusüberstand innerhalb von 48 h zweimal gewechselt. Abschließend wurde das Virusmedium durch reguläres Kulturmedium (DMEM) ersetzt und die Zielzellen wurden in Zellkulturflaschen überführt.

Selektion der Zielzellen

Die Selektion der transfizierten Zielzellen erfolgte mit Puromycin in einer Konzentration von 3 µg/ml. Dafür wurden jeweils 1×10^6 Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Puromycin behandelt. Anschließend wurden aus den Zellkulturflaschen 5×10^5 Zellen entnommen und mit 10 ml DMEM in eine 10 cm Petrischale ausgesät und so lange inkubiert, bis sich kleine Kolonien ausgebildet hatten. In eine mit jeweils 1 ml DMEM vorbereitete 12-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) wurden einzelne Kolonien überführt. Hierzu wurde die Petrischale mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin für 2 min inkubiert. Das Trypsin wurde entfernt und die Kolonien mit einer 100 µl Pipette vorsichtig abgetragen und in die 12-Well-Multiwellplatte überführt. Nachdem die Aussaat eine ausreichende Dichte erreichte, wurden die Zellkulturen in zwei Teile getrennt. Ein Teil wurde zur weiteren Absicherung kultiviert und bei positivem Knockout-Ergebnis eingefroren. Der andere Teil wurde in 50 ml Zellkulturflaschen angezüchtet und für Zelllysate weiterverwendet, um hier einen erfolgreichen Knockout per Western Blot nachzuweisen.

2.2.3. Herstellung der Zelllysate und Proteinbestimmung

Zelllysate aus humanen Proben

Hierfür wurden aus eingefrorenen Proben 30 mg Tumormaterial entfernt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Anschließend wurden 300 µl Lysepuffer hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Das Tumor-Lyse-Gemisch wurde dann mit einem Stabmixer homogenisiert und für 10 min bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt.

Zellysate aus Zellkulturen

Die zuvor in 50 ml Zellkulturflaschen angewachsenen Zellen wurden mit 5 ml PBS zweimalig gewaschen und anschließend wurden 200 µl Lysispuffer hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen mit Lysispuffer wurden bei 4°C für 20 min inkubiert. Darauffolgend wurde das Lysepuffer-Zell-Gemisch mit einem Zellschaber abgetragen und in ein Eppendorf-Tube überführt. Das Gemisch wurde dann mit einem Ultraschallgerät homogenisiert und für 10 min bei 4°C mit 14 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt.

Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde das DC-Protein-Assay genutzt. In einer 96-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) wurde eine Standardreihe unterschiedlicher BSA-Konzentration (0 µg/ml – 3 µg/ml) und die Lysatproben mit jeweils 5 µl doppelt aufgetragen. Dazu wurden jeweils 25 µl Reagenz A/S-Gemisch und 200 µl Reagenz B pro Well hinzugegeben. Dies wurde für 20 min auf einem Vertikal-Schüttler inkubiert und anschließend in einem multimodalen Plattenmessgerät der Firma Tecan analysiert. Die finale Proteinkonzentration wurde anhand der ermittelten Standardkurve errechnet. Für die nachfolgende SDS-Page Beladung wurden je Probe 20 µg Protein, welche mit Lysepuffer auf 10 µl eingestellt wurde, und 10 µl SDS-Probenpuffer verwendet. Diese Ladeproben wurden auf 95°C für 5 min erhitzt, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und für die Beladung der SDS-Page verwendet.

2.2.3.1. Zellysate für Kern-Plasma-Separation

Hierzu wurden die in 250 ml Zellkulturflaschen gewachsenen Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin für 2 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml DMEM aufgenommen und für 4 min bei 4°C mit 500 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und durch 4°C kaltes PBS ersetzt und wiederholt für 4 min bei 4°C mit 500 g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet wurde mit 500 µl destilliertem Wasser resuspendiert und für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde so Triton X-100 hinzugegeben, dass eine Konzentration von 0,1 % erreicht wurde. Nach 3 min Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 1000 g für 5 min. Dies führt zu zwei Fraktionen: Erstere enthält den Überstand, welcher in ein neues Eppendorf-Tube

überführt und wiederholt bei 4°C und 1500 g für 3 min zentrifugiert wurde. Der neue Überstand wurde wieder in ein neues Eppendorf-Tube überführt und enthält die Zytoplasma-Bestandteile. Die zweite, aus dem Pellet bestehende Fraktion, wurde in PBS mit 0,2 % Triton X-100 resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 1000 g für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und durch 200 µl Lysispuffer ersetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe des Ultraschallgeräts homogenisiert. Schlussendlich erfolgte für 10 min bei 4°C mit 14.000 rpm die letzte Zentrifugation, bei dem der Überstand die Zellkern Bestandteile enthält.

2.2.4. SDS-Page und Western Blot

Die Ladungsproben wurden in Taschen eines 12,5 % Polyacrylamid-Gels gefüllt, welches in einer Kammer mit Laufpuffer gebaut wurde. Anschließend wurde eine elektrische Spannung (120 V) angelegt, so dass die Proteine im Gel elektrophoretisch der Größe nach wandern konnten und sich auftrennten bis die Bromphenol Blau Bande des Ladepuffers das Gelende erreichte.

Daran anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel in eine Sandwichkammer, bestehend aus je einem Vlies und Whatmans Filterpapier pro Seite, zusammen mit einer Nitrozellulosemembran eingebaut. Dieses Kammersystem befand sich in Transferpuffer umrandet mit Eis. Unter einem elektrischen Strom von 400 mA wandern die negativ geladenen Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran. Nach 100 min wurde die Membran dann in 5% Milch- oder BSA-Lösung geblockt (in Abhängigkeit von den Herstellerangaben zu den jeweiligen primären Antikörpern, die in Tabelle 7 aufgelistet sind). Dies dient dem Vermeiden von unspezifischen Bindungen während der Inkubation mit dem primären Antikörper. Nach 1 h wurde die Block-Lösung entfernt, durch korrespondierend gelösten primären Antikörper ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen und die Membran dreimalig für 10 min mit Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (entsprechend dem primären Antikörper) für 1 h. Danach erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschrift für je 10 min. Schlussendlich wurde eine Wasserstoff-Peroxid-Lösung und ein Luminol-Reagenz auf die Membran gegeben. Hierbei reagiert der sekundäre Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, mit dem

Wasserstoff-Peroxid und Luminol. Das dabei emittierte Licht wurde in einer Fotokammer eingefangen und ist als Bande des Western Blots sichtbar. Abschließend wurde die Densitometrie für jede Bande der Zielproteine und β -Aktin (Referenzbande) mit NIH ImageJ gemessen, an β -Aktin normalisiert und mit Graphpad Prism als Diagramme dargestellt.

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β -Aktin	1/5000	Sigma Aldrich
Akt (#2938)	1/1000	Cell Signaling
p-Akt S473 (#4060)	1/2000	Cell Signaling
p-Akt T308 (#9275)	1/1000	Cell Signaling
AMPK (#2532)	1/1000	Cell Signaling
p-AMPK (#2535)	1/1000	Cell Signaling
4E-BP1 (#9452)	1/1000	Cell Signaling
p-4E-BP1 (#9459)	1/1000	Cell Signaling
Caspase-3 (#9662)	1/1000	Cell Signaling
LC3 (#4599)	1/1000	Cell Signaling
Map4K3 (#92427)	1/1000	Cell Signaling
p44/42 MAPK (#9102)	1/1000	Cell Signaling
mTOR (#2972)	1/1000	Cell Signaling
p-mTOR (#2971)	1/1000	Cell Signaling
RagA (#4357)	1/1000	Cell Signaling
RagC (#3360)	1/1000	Cell Signaling
RagD (#4470)	1/1000	Cell Signaling
p70S6K (#9202)	1/1000	Cell Signaling
p-p70S6K (#9206)	1/1000	Cell Signaling
TFEB (#37785)	1/1000	Cell Signaling
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ab mouse	1/10000	Cell Signaling
Ab rabbit	1/10000	Cell Signaling

2.2.5. Vitalitäts-Assays

2.2.5.1. Trypan Blau-Assay

Die Färbung mit Trypan Blau eignet sich gerade für die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Denn Letztere nehmen den Farbstoff nicht auf und lassen sich gut von lebenden unterscheiden. Hierfür wurden jeweils 32.000 Zellen U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO in einer 48-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) für 48 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und in 10 ml DMEM resuspendiert. Davon wurden 500 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. In einer 96-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) wurden 20 µl dieser Zellsuspension mit 20 µl Trypan Blau vermischt. Das Gemisch wurde dann auf eine gedeckelte Neubauer-Kammer aufgetragen, bis diese vollständig bedeckt war. Unter dem Mikroskop konnten nun die lebenden Zellen, optisch aufgeteilt in 4 Quadranten, gezählt werden. Die Gesamtsumme wurde entsprechend auf einen Milliliter zurückgerechnet.

2.2.5.2. ATP-Assay

Das CellTiter-Glo® Lumineszenz-Assay gibt Auskunft über die metabolisch aktiven Zellen im Untersuchungsbereich. Hier nutzt das Assay die ATP-Konzentration, um die Reaktion von Luciferin und Luciferase unter Lichtemission zu ermöglichen. Hierfür wurden jeweils 2.000 Zellen U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO in einer 96-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) für 48 h in 100 µl DMEM inkubiert. Danach wurden 100 µl CellTiter-Glo® 2.0 Reagenz je Well hinzugegeben und für 2 min auf dem Vertikalschüttler zur Induktion der Zellyse belassen. Anschließend erfolgte eine 10 min Inkubation zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals. Das emittierte Licht wurde in einem Luminometer gemessen.

2.2.5.3. BrdU-Assay

Hierbei wird 5-Bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und spiegelt somit die Proliferation wider. Dies lässt sich mit einem monoklonalen Antikörper nachweisen, welcher mit einem Enzym- oder Fluorochromkonjugierten Sekundärantikörper gemessen werden kann. 5.000 Zellen U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO wurden in einer 96-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) für 48 h in 100 µl DMEM inkubiert. Im Anschluss wurde für

jedes Well 10 µl BrdU-Lösung hinzugegeben und für weitere 4 h (Einbauzeit) inkubiert. Das Medium, einschließlich der BrdU-Lösung wurde verworfen und die Wells mit 250 µl 10 % FCS/PBS Lösung zweimalig gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit Zugabe von 200 µl gekühlter Fixierlösung (Ethanol) pro Well und einer Inkubationszeit von 30 min. Danach wurde die Lösung abgenommen und jedes Well wurde dreimalig mit 250 µl 10 % FCS/PBS Lösung gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl Endonuklease-Lösung pro Well und eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Im Anschluss wurde die Endonuklease-Lösung abgenommen und wiederholt dreimalig mit 250 µl 10 % FCS/PBS Lösung gewaschen. Danach wurde pro Well 100 µl Anti-BrdU-POD-Lösung hinzugegeben und ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen und ebenfalls mit 250 µl 10 % FCS/PBS Lösung dreimalig gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 100 µl Peroxidase-Lösung, welche sich nach 30 min grün verfärbte und mit dem multimodalen Plattenmessgerät Tecan wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

2.2.5.4. CCK-8-Assay

Ein weiteres Assay zur Bestimmung der Zellproliferation war das kolorimetrische CCK-8-Assay, bei dem eine Tetrazoliumverbindung (WST-8) durch Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert wird. Dafür wurden 4.000 Zellen U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO (4000 Zellen U138 und 2.000 Zellen MCF-7) in einer 96-Well-Multiwellplatte (Cellstar, Greiner bio-one) je nach Versuchsziel für 48 h in 100 µl DMEM, Leucin-freien Medium oder Medium zur Restimulation inkubiert. Nach 48 h Inkubation wurden 10 µl der Tetrazoliumverbindung zu den entsprechenden Wells gegeben und für weitere 3 h inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm in den 96-Well-Platten mit dem multimodalen Plattenmessgerät Tecan ermittelt.

2.2.6. Spaltschlussversuch

Der Spaltschlussversuch (Gap-Assay) dient vorrangig der Analyse von Migration und Chemotaxis. Dazu wurden in 6-Well-Platten ein Spalthalter-Einsatz mit je einer Tasche auf jeder Seite der Mittellinie eingebracht. In diese Taschen wurden jeweils 70µl mit 50.000 U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO Zellen eingesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Einsätze entfernt, wodurch sich scharf begrenzte Spalten in dem gebildeten Zellrasen ergeben, und 2 ml DMEM

hinzugegeben. Bilder wurden mit einem Phasenkontrast-Mikroskop zu Zeitpunkt 0 h bis 10 h alle 2h aufgenommen. Für jeden Zeitpunkt wurde die Spaltbreite mit der am Mikroskop verbunden Software (Axiovision Rel. 4.8) gemessen. Dabei wurden 20 Spaltmaße vermessen und als Mittelwert verrechnet. Die Ausgangsspaltgröße betrug 500 μm , welche auf den Zahlenwert 1 normiert wurde. Somit wurden alle gemessene Werte auf die Ausgangsspaltgröße normiert, wobei ≥ 1 komplett offen und 0 komplett verschlossen bedeutet.

2.2.7. Seneszenz-Assay

Zum Nachweis seneszenten Zellen wurde ein histochemisches Färbe-Kit genutzt. Damit ist die β -Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Zellen leicht nachweisbar, aber nicht in ruhenden (quiescent), unsterblichen oder Tumorzellen [94]. Hierfür wurden jeweils 100.000 U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO Zellen in 2 ml in 6-Well-Platten über Nacht eingesät und anschließend entweder in Vollmedium (DMEM) oder in DMEM ohne Serum (-Serum) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und zweimalig mit PBS gewaschen. Danach wurde 1,5 ml Fixationspuffer (zum Kit gehörig) je Well zugegeben und für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Fixationspuffer wurde im Anschluss abgenommen und die Wells wurden dreimalig mit PBS gewaschen. Schlussendlich wurde 1 ml der Färbemixtur (zum Kit gehörig) hinzugegeben und über Nacht im Tischinkubator bei 37 °C und Raumluff-CO₂-Gehalt inkubiert. Zur Vermeidung von Austrocknung wurden die 6-Well-Platten mit Parafilm® versiegelt. Am nächsten Tag wurden mit dem Konfokal-Mikroskop von Keyence für U87 RagC- und Map4K3-KO sowie U87 SCR drei Bilder pro Well aufgenommen. Jede grün gefärbte oder grün tangierte (schwach oder in Teilen gründlich Erscheinend) Zelle wurde gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl gesetzt, so dass ein prozentualer Wert ermittelt werden konnte.

2.2.8. Phalloidinfärbung

Zur Visualisierung der Größe und Form der U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO Zellen wurden eine Färbung mit Phalloidin durchgeführt. Phalloidin bildet dabei einen Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle und kann Rückschlüsse auf die Morphologie geben. Hierzu wurden Deckgläschen in 6-Well-Platten gelegt, mit 5000 Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % FCS übersät und über 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS zweimalig gewaschen. Für 5 min erfolgte dann die

Fixation mit 250 μ l 4 % Paraformaldehyd je Deckglas. Dann wurde das Paraformaldehyd abgenommen und es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Für die Permeabilisierung wurde 200 μ l 1 % Triton X-100 je Deckglas dazugegeben und für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde mit 300 μ l je Deckglas einer 1 % BSA/PBS Lösung für 30 min geblockt. Nachdem die Blocklösung entfernt wurde, erfolgte die Inkubation mit 200 μ l Phalloidin-Lösung. Die Phalloidin-Stammlösung wurde dabei mit 1:40 in PBS gelöst. Nach 30 min Inkubation wurde die Phalloidin-Lösung abgenommen, mit PBS gewaschen und die Deckgläschen für 2 h ohne Lichteinfluss getrocknet. Die getrockneten Deckgläser wurden dann umgedreht auf einem Objektträger fixiert. Mit dem Konfokal-Mikroskop von Keyence wurden Bilder mit je 10 Zellen der U87 Aminosäuresensor-KO aufgenommen. Hierfür wurde ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung und zusätzlich 20-facher virtueller Vergrößerung genutzt. Für die Abmessung der Größe bzw. Form und des Flächeninhaltes wurde die zum Konfokal-Mikroskop gehörige Software BZ Analyser genutzt. Zur Berechnung der Form wurde die kürzeste gegenüber der längsten Ausdehnung normiert. Dabei entspricht 0 einer perfekt kreisförmigen und 1 einer maximal elongierten Zelle.

2.2.9. Live-Cell-Imaging

Für die nähere Betrachtung der Motilität der U87 Aminosäuresensor-KO wurde Live-Cell-Imaging genutzt. Hierfür wurden 50.000 Zellen U87 SCR, RagC-KO oder Map4K3-KO in einer 60 mm Petrischale (Corning®) in DMEM mit 10 % FCS ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die besäte Petrischale in ein zum Konfokal-Mikroskop (Keyence) gehörigen Kammersystem (Tokai Hit), welches unter konstantem Durchfluss eines Gemisches von 5 % CO₂ in Luft und 37°C Beheizung stand, gebracht. In einem geeigneten Blickfeld wurde über 4 h hinweg alle 5 min ein Bild erzeugt (48 Bilder total, je Aminosäuresensor-KO). Die Einzelbilder wurden im Anschluss mit Hilfe der Software NIH ImageJ zu einem Video zusammengefügt. NIH ImageJ wurde ebenfalls dafür genutzt, um 20 Zellen je U87 Aminosäuresensor-KO über 4 h hinweg zu verfolgen und entsprechende zurückgelegte Distanzen zu vermessen.

2.2.10. PCR-Analyse der humanen Gliom-Proben

Relative Expression von RagC und Map4K3 wurden in Gliomen des ZNS WHO-Grad 2 (n = 6), 3 (n = 7) und 4 (n = 23) aus humanen Proben analysiert. Hierzu wurde zuerst die RNA aus den tiefgefrorenen Proben isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben

und mittels qPCR quantifiziert. Die einzelnen Schritte sind übersichtshalber in Kürze zusammengefasst.

RNA-Präparation

Eine geringe Menge Tumorprobe wurde zusammen mit Homogenisatorkügelchen (Precellys 24) und 1 ml Trizol homogenisiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 300 µl Chloroform vermischt und händisch geschüttelt. Nach 10 min Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min. Die Obere der dadurch entstanden drei Phasen beinhaltete die gewünschte RNA. Diese wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimalig mit 500 µl 80 % eiskaltem Ethanol gewaschen, gevortext und 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das so aufgereinigte Pellet wurde vom Überstand entfernt und für 3 h getrocknet. Anschließend wurde, angepasst an die Pelletgröße, mit DEPC- (Diethylpyrocarbonat) Wasser (frei von RNAasen) resuspendiert und bei 64°C für 10 min im Heizblock inkubiert. Mit einem Mikrophotometer wurde die RNA-Konzentration gemessen.

cDNA-Präparation

Hierzu wurde 1 µg der RNA-Probe mit 4 µl Hexamerprimer mit DEPC-Wasser in einem Eppendorf-Tube auf 10 µl aufgefüllt und bei 70°C für 10 min erhitzt. Dies dient in erster Linie dem Auftrennen von Sekundärstrukturen und Bindungsmöglichkeit der reversen Transkriptase. Der RNA-Probe wurden dann 4 µl 5-fach Puffer, 0,4 µl Nucleotidmix, 0,125 µl reverse Transkriptase und 5,475 µl DEPC-Wasser zugegeben. Die Probe wurde anschließend 55 min bei 40°C und weitere 15 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert.

Quantitative Real-Time-PCR

Für den qPCR-Ansatz wurden 1 µl der cDNA-Probe mit je 1 µl entsprechenden Forward- und Reverse-Primer (siehe Tabelle 8), 8,26 µl SYBR®-Hi-Rox und 5,3 µl Wasser genutzt. Der PCR-Ansatz wurde dann als Doppelbestimmung in eine PCR-Platte pipettiert und mit dem ABI Prism 7000 SDS® inklusive entsprechender Software

amplifiziert. Dabei wurden die Ansätze 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C erhitzt, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 30 s („Melting“), 55°C für 30 s („Primer annealing“) und 72°C für 45 s („Elongation“). Schlussendlich liefert die PCR ein quantitatives Ergebnis über die Expression der entsprechend zugrundeliegenden mRNA der einzelnen Proben. Gemessen an der Differenz zum Referenzgen (β 2-Mikroglobulin) ergibt sich daraus ein ΔC_t -Wert. C_t ist hierbei abgekürzt für engl. „threshold cycle“ und stellt eine theoretische Größe dar, die den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve (hier der Verdoppelung der DNA) beschreibt. Ein hoher ΔC_t -Wert entspricht demzufolge einer niedrigen Expression des Zielgens und vice versa. Die relative Expression wurde anschließend mit der Formel: $2^{-\Delta C_t}$ berechnet.

Tabelle 7: cDNA-Primer

Name	Ziel-Gen	T _{annealing}	Sequenz	Hersteller
hRagC-163-F	RagC	55°C	CATTTCCAATAGCTCCTTTG	Biomers.net
hRagC-R	RagC		GCTTTAGAAACAGTAATGTGAAG	
hMap4K3-152-F	Map4K3		CACATTTAGAAGATGATGAAGG	
hMap4K3-R	Map4K3		CTTGATTGTTTCCTTGATTTTC	
β 2Mg-quant F	β 2-Mikroglobulin		CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	
β 2Mg-quant R	β 2-Mikroglobulin		GATGCTGCTTACATGTCTCG	

2.2.11. Statistische Analyse

Die Analyse der Densitometrie erfolgte mit NIH ImageJ 1.53f51 und wurden als Diagrammen mit Graphpad Prism 8.0.1 erstellt. Für die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme von den in den Abbildungen präsentierten Experimenten wurde ebenfalls Graphpad Prism 8.0.1 genutzt. Die dabei dargestellten Balken mit Fehlerbalken präsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung. Die p-Werte sind als * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$ angegeben. Für die Auswertung von zwei zu einander zu vergleichenden Werte wurde ein t-Test mit Welch-Korrektur berechnet. Für statistische Signifikanz bei einer Gesamtzahl von > 2 zu vergleichenden Gruppen wurde der zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Posttest durchgeführt. Zur statistischen Auswertung von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal -Wallis-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von RagC und Map4K3 in humanen Gliomen

Um eine Einordnung über die Expression der beiden Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen höheren Grades zu erhalten, wurden humane Gliom-Proben der ZNS-WHO-Grade 2 bis 4 mittels PCR auf die relative Expression von RagC und Map4K3 hin untersucht (Abb. 4 A und B). Hierbei wurde festgestellt, dass die Genexpression für RagC erst mit ZNS-WHO-Grad 4 signifikant abnimmt, wohingegen für Map4K3 bereits mit ZNS-WHO-Grad 3 im Vergleich zu Grad 2 eine signifikante Mindereexpression erkennbar wird. Um ein zusätzliches Ergebnis zu erhalten, wurde die Proteinexpression für jeweils drei humane Proben pro ZNS-WHO-Grad 2 bis 4 mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde eine signifikant verringerte Proteinexpression für RagC in Grad 4 gegenüber Grad 3 festgestellt (Abb. 5). In der Proteinexpression von Map4K3 zeigte sich keine signifikante Minderung in Grad 4.

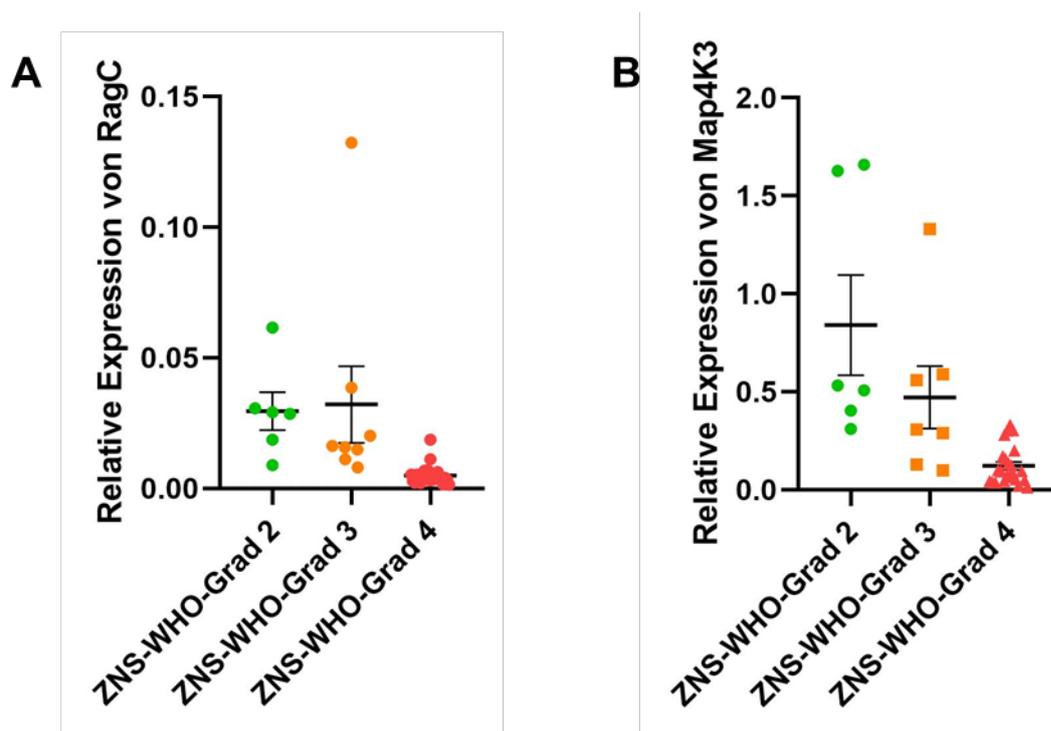


Abbildung 4: Rel. Expression von RagC und Map4K3 in humanen Gliom-Proben. Relative Expression ist dargestellt als $2^{-\Delta C_t}$, wobei ΔC_t die Differenz zwischen RagC (A) bzw. Map4K3 (B) und $\beta 2$ -Mikroglobulin repräsentiert. (ZNS-WHO Grad 2: n = 6; ZNS-WHO Grad 3: n = 7; ZNS-WHO Grad 4: n = 23; $p_{RagC, Map4K3} < 0,001$)

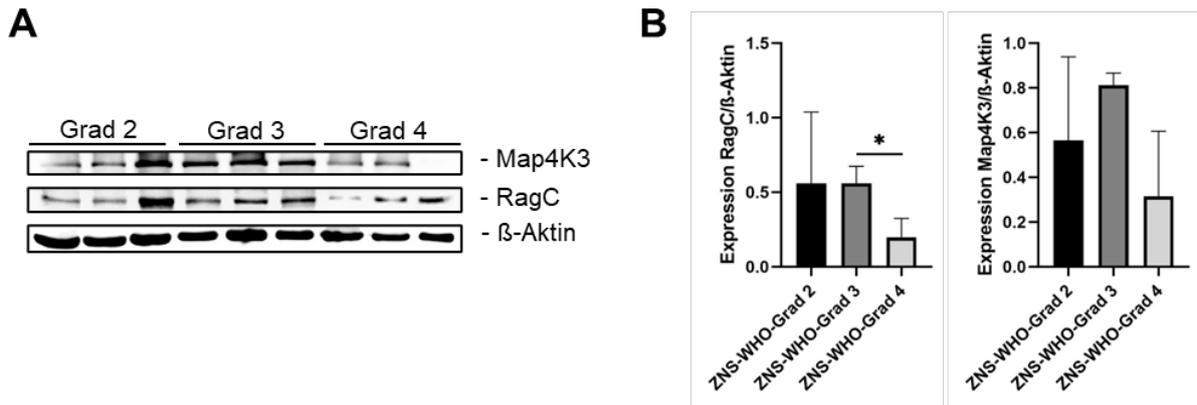


Abbildung 5: Proteinexpression von RagC und Map4K3 in humanen Gliom-Proben. Western Blots sind dargestellt für RagC bzw. Map4K3 (A) mit jeweils 3 humanen Proben je ZNS-WHO-Grad 2 bis 4 (Übersichtlichkeitshalber als Grad 2, Grad 3 und Grad 4 bezeichnet). Die korrespondierende Densitometrie für RagC und Map4K3 ist in (B) dargestellt. * $p < 0,05$.

Zur Kontrolle einer vergleichbaren Expression von RagC und Map4K3 in U87 MG, U138 MG und MCF-7, wurden entsprechende Western Blots angefertigt (Abb. 6). Dabei zeigt sich für U138 MG eine erhöhte RagC-Expression und eine verringerte Map4K3-Expression im Vergleich zu U87 MG. MCF-7 zeigt hingegen eine erhöhte Expression von RagC und Map4K3 im Vergleich zu U87 MG und U138 MG.

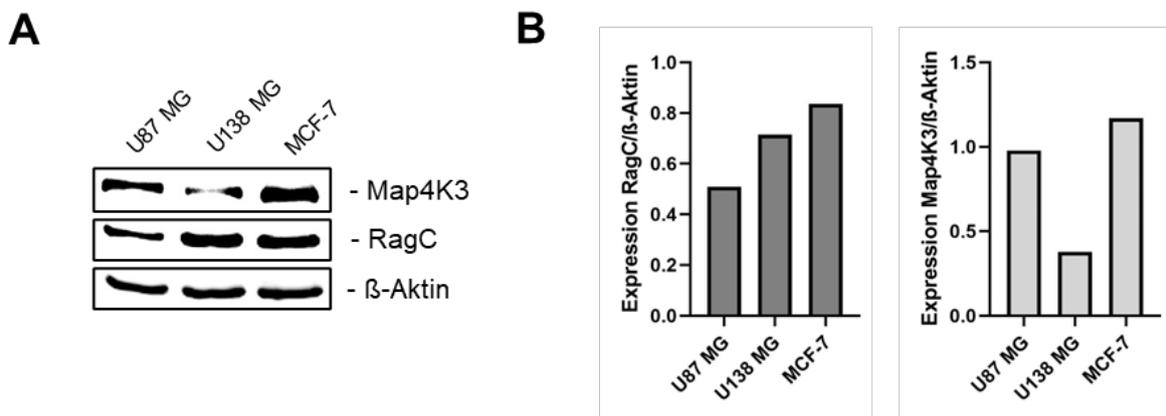


Abbildung 6: Ausgangsexpression RagC und Map4K3. In den Zelllinien U87 MG, U138 MG und MCF-7 wurde die Ausgangsexpression für RagC und Map4K3 untersucht (A). Die korrespondierende Densitometrie für RagC und Map4K3 ist als Balkendiagramm dargestellt (B).

3.2. Untersuchung der Morphologie nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout

Um die Ergebnisse der menschlichen Gliomproben bestmöglich zu replizieren, wurde CRISPR/Cas verwendet, um einen Knockout für RagC und Map4K3 in U87MG Zellen zu erzeugen (Abb. 7A). Die in Abbildung 7A dargestellte Densitometrie zeigt einerseits den vorhandenen Knockout, andererseits zeigt sich kein kompensatorischer Anstieg für Map4K3 in RagC-KO und kein Anstieg der Expression von RagC in Map4K3-KO. Für weitere vergleichende Untersuchung wurde ein RagC- und Map4K3-Knockout für U138MG und MCF-7 Zellen erzeugt (Abb. 7B und C).

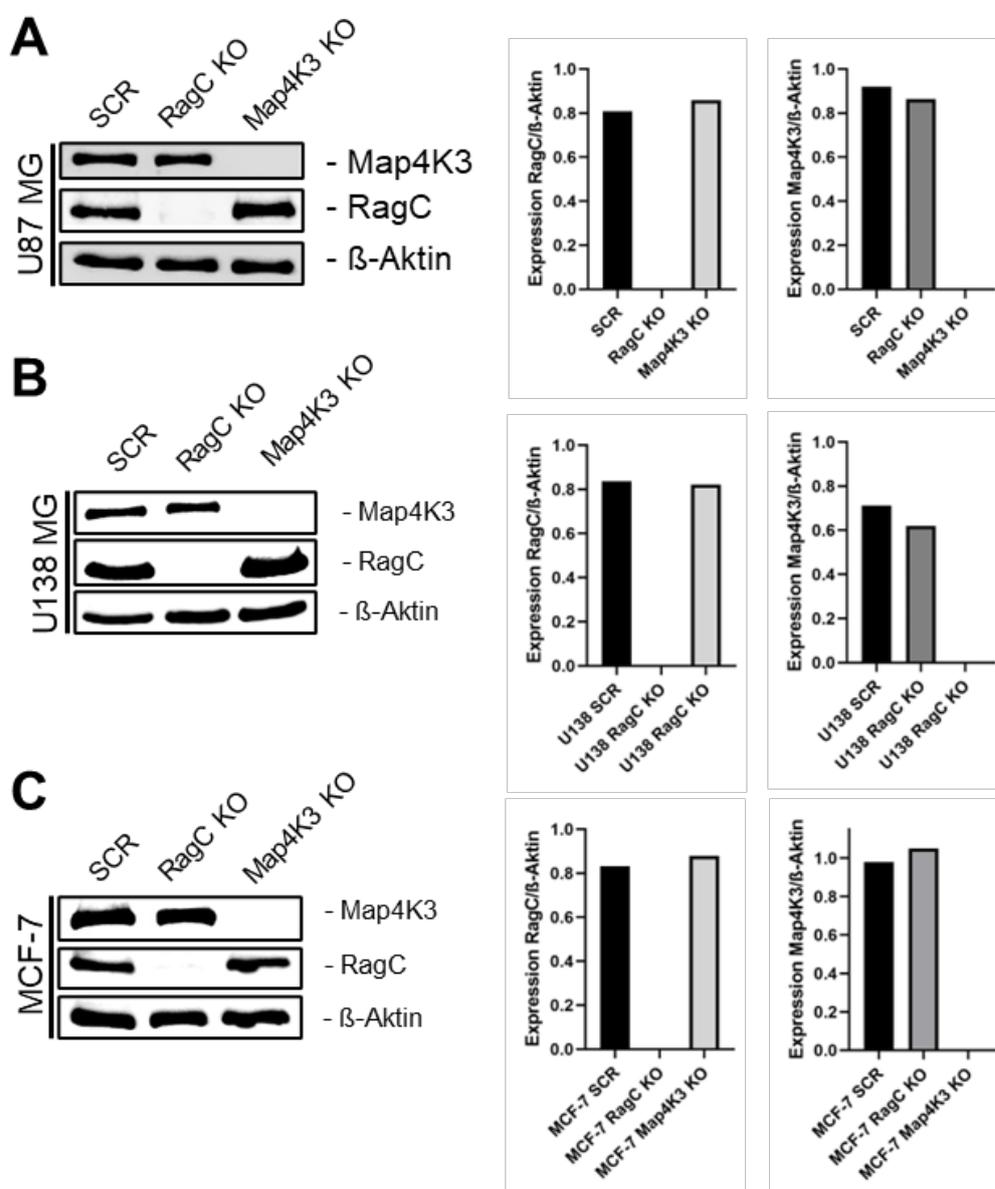


Abbildung 7: Knockout-Generierung von RagC und Map4K3. Western Blots der in U87 MG (A), U138 MG (B) und MCF-7 (C) Zellen mittels Crispr/Cas generierten RagC- und Map4K3-KO. Die jeweils korrespondierende Densitometrie für RagC und Map4K3 ist als Balkendiagramm dargestellt.

Nach der Bestätigung des Map4K3- und RagC-Knockouts in den U87 Zellen wurden die Unterschiede in der Zellmorphologie mittels Phalloidin-Färbung untersucht (Abb. 8). Die Veränderungen der Zellfläche und das Erscheinungsbild wurden bei 20 Zellen pro Aminosäuresensor-KO bewertet. U87 RagC-KO wies eine signifikant kleinere Zellfläche und U87 Map4K3-KO eine signifikante vergrößerte Fläche im Vergleich zu U87 SCR auf (Abb. 8A). Gleichzeitig zeigt U87 RagC-KO eine signifikante Elongierung gegenüber U87 SCR und U87 Map4K3-KO eine signifikante Streckung (Abb. 8B).

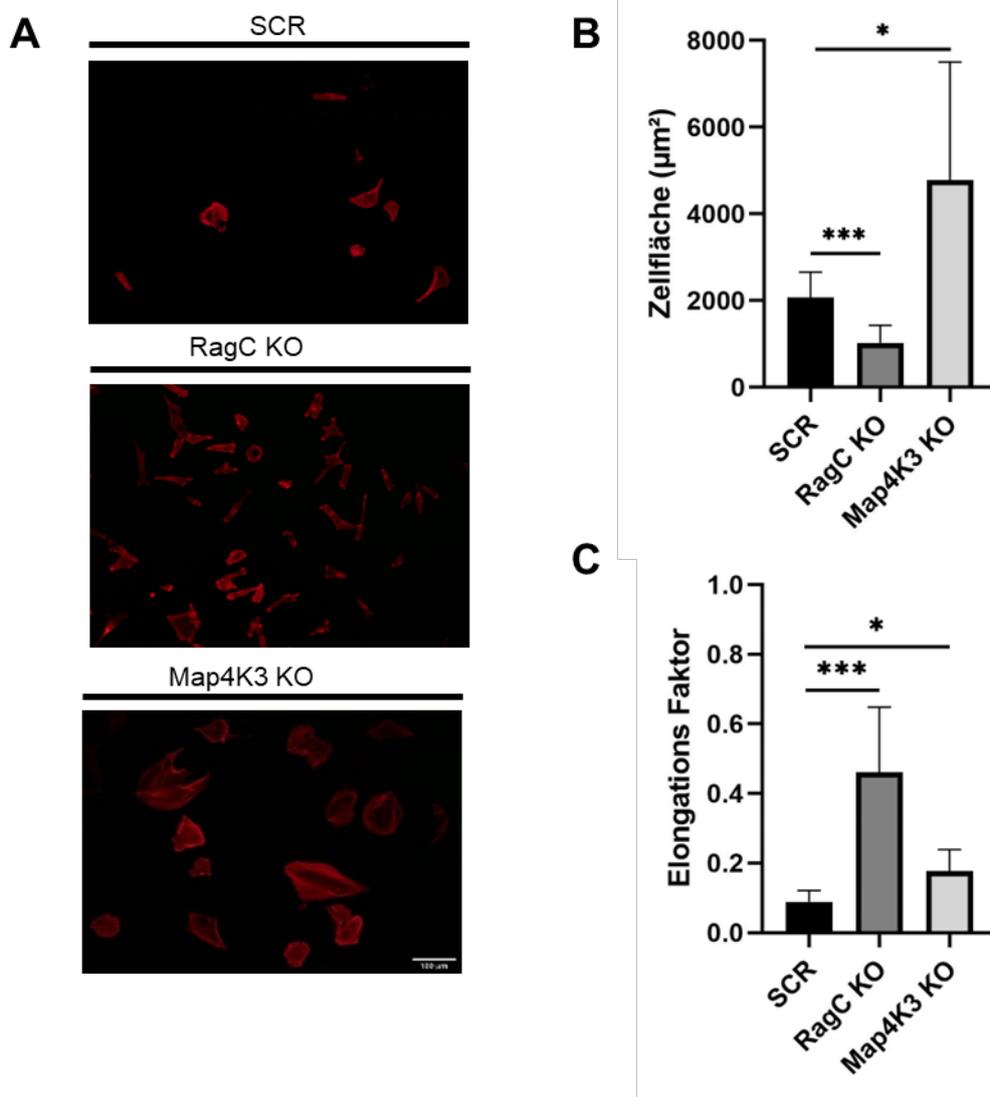


Abbildung 8: Morphologie nach Aminosäuresensor-KO (A) zeigt die Phalloidin-Färbung von U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO. Die Zellfläche (B) und die Elongation (C) wurden mit 20 Zellen pro Aminosäuresensor-KO bewertet. Die Elongation wurde auf einer Skala von 0 bis 1 normiert, wobei 0 für eine Zelle steht, die einem perfekten Kreis ähnelt, und 1 für eine deutlich gestreckte Zelle. Maßstabsbalken für Abb. A: 100 µm. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Neben der Morphologie konnten nach 10 Tagen Wachstum auch deutliche Unterschiede im Zellkontaktverhalten bzw. in der Bildung von Zellkolonien zwischen den U87 Aminosäuresensor-KO festgestellt werden (Abb. 9). Dabei bilden U87 Map4K3-KO ein deutlich dichteres Netzwerk, während U87 RagC-KO Zellen frühzeitig einzelne separate Kolonien bilden und eher sphäroidisch wachsen. U87 SCR zeigt eine Mischung des Zellkontaktverhaltens aus U87 RagC- und Map4K3-KO.

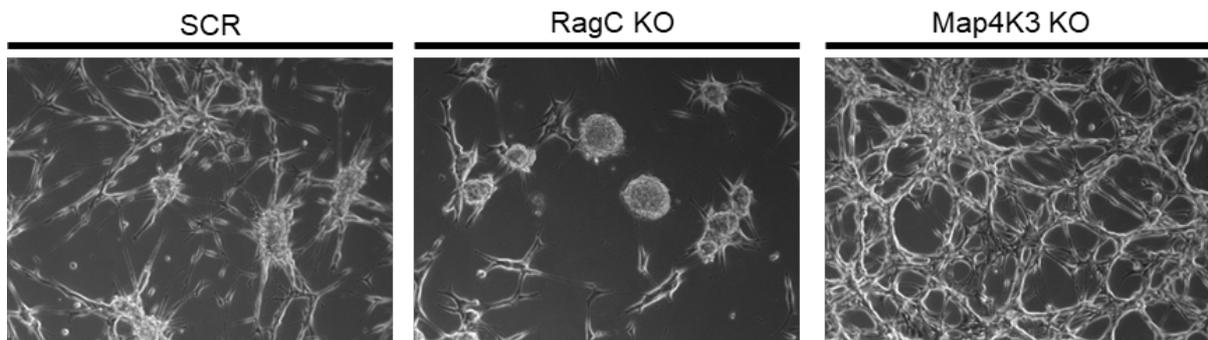


Abbildung 9: Zellkontakt- und Kolonieverhalten nach Aminosäuresensor-KO. U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO wurden nach 10 Tagen Wachstum in einer 250 ml Zellkulturflasche fotografiert. Hierbei handelt es sich um eine rein bildliche Darstellung ohne statistische Auswertung. Hierfür wurde ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung verwendet.

3.3. Migration und Motilität nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout

Für eine weitere Charakterisierung der U87 RagC-KO und Map4K3-KO wurde der Spaltversuch durchgeführt (Abb. 10). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Map4K3-KO und SCR-Kontrollen, bei dem ein deutlich geringerer Spaltschluss innerhalb von 6 h bei Map4K3-KO (Ausgangsspaltbreite zu 1 gesetzt) beobachtet wurde. Zwischen RagC-KO und SCR-Kontrollen wurde nahezu die gleiche Geschwindigkeit beim Schließen der Spalte festgestellt.

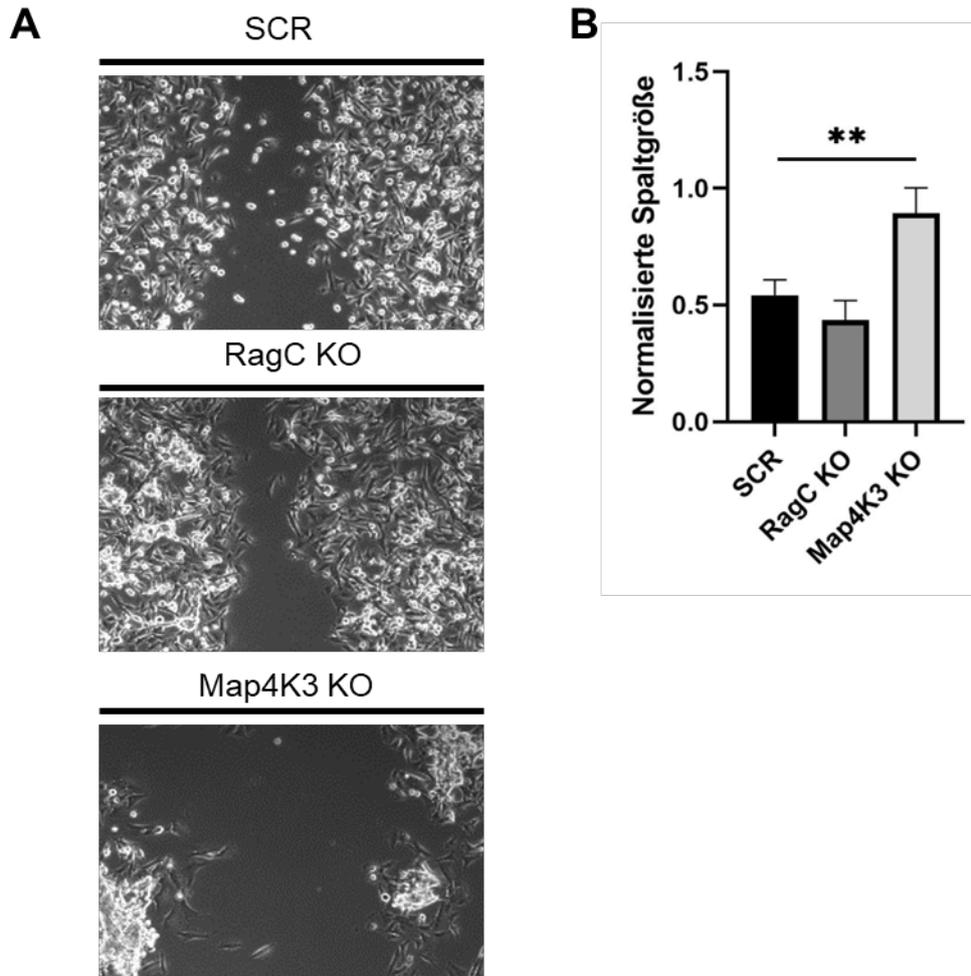


Abbildung 10: Migrations-Assay nach Aminosäuresensor-KO. (A) Fotografische Darstellung der Spaltbreite nach 6 h für U73 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO. Das unter (B) dargestellte Diagramm zeigt die auf die Ausgangsspaltbreite normierte Spaltbreite nach 6 h. Hierfür wurde ebenfalls ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung verwendet. ** $p < 0,01$.

In dem beobachteten Spalt wurden wiederholt einzelne Zellen mit abweichender Lokalisation festgestellt. Daher wurde eine gezielte Beobachtung mittels Live-Cell-Imaging der einzelnen U73 Aminosäuresensor-KO Zellen durchgeführt (Abb. 11). Dabei konnte sowohl für U73 Map4K3-KO als auch für U73 RagC-KO gegenüber U73 SCR eine signifikante Reduktion der Motilität festgestellt werden.

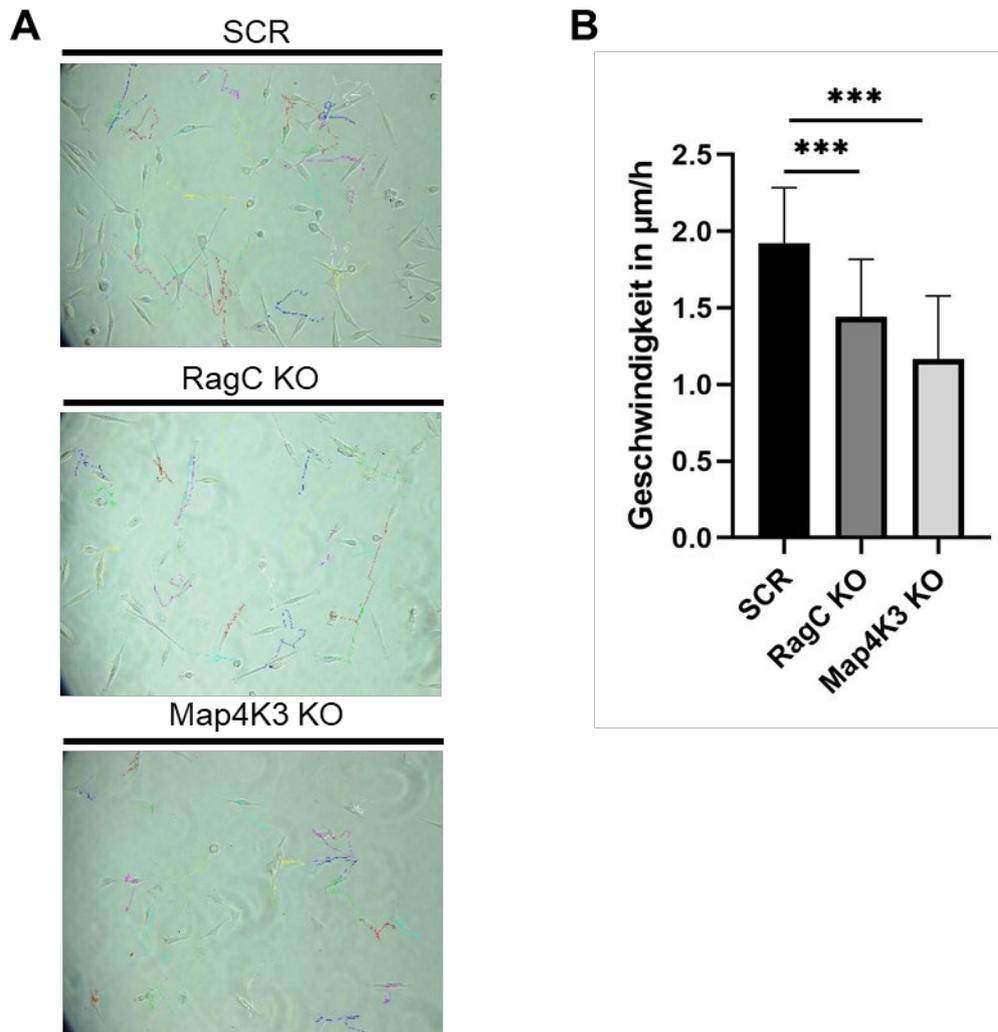


Abbildung 11: Live-Cell-Imaging nach Aminosäuresensor-KO. Die in (A) dargestellten Fotoabbildungen stellen das letzte aufgenommene Bild des gesamten Beobachtungszeitraums für U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO dar. Hier sind zudem die nachverfolgten und entsprechend zurückgelegten Distanzen mit eingezeichnet. Das in (B) dargestellte Diagramm zeigt die Mittelwerte von 20 Zellen je U87 Aminosäuresensor-KO, welche über 4 h hinweg beobachtet wurden. *** $p < 0,001$.

3.4. Proliferationsverhalten nach U87 RagC- und Map4K3- Knockout

Da Glioblastome bekanntermaßen sehr proliferativ sind, wurden die proliferativen Eigenschaften der Knockout veränderten U87 Zellen untereinander mithilfe direkter und indirekter Methoden untersucht. Der CCK-8 – Assay (misst Dehydrogenase-Aktivität) ergab, dass innerhalb von 48 h etwa doppelt so viele lebensfähige U87 RagC-KO vorhanden waren, verglichen mit U87 SCR. Für U87 Map4K3-KO wurden etwa dreimal so viele wie U87 SCR festgestellt (Abb. 12A). Der ebenfalls metabolische ATP - Assay ergab eine signifikant erhöhte ATP-Konzentration für U87 RagC-KO und

eine geringere, aber dennoch signifikant erhöhte ATP-Konzentration für U87 Map4K3-KO im Vergleich zu U87 SCR (Abb. 12B). Weitere Unterstützung durch die direkte Messung der Proliferation ergab sich aus dem BrdU - Assay (Abb. 12C). Hierbei zeigt sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferation für U87 RagC-KO und U87 Map4K3-KO gegenüber U87 SCR. Um den Zustand des metabolischen Stresses zu vermeiden, wurden die Zellen direkt durch die Trypanblau-Färbung aus den Zellkulturflaschen heraus gezählt (Abb. 12D). Dabei wurde ebenso ein signifikanter Anstieg der Zellzahl von U87 RagC-KO und U87 Map4K3- KO gegenüber U87 SCR festgestellt.

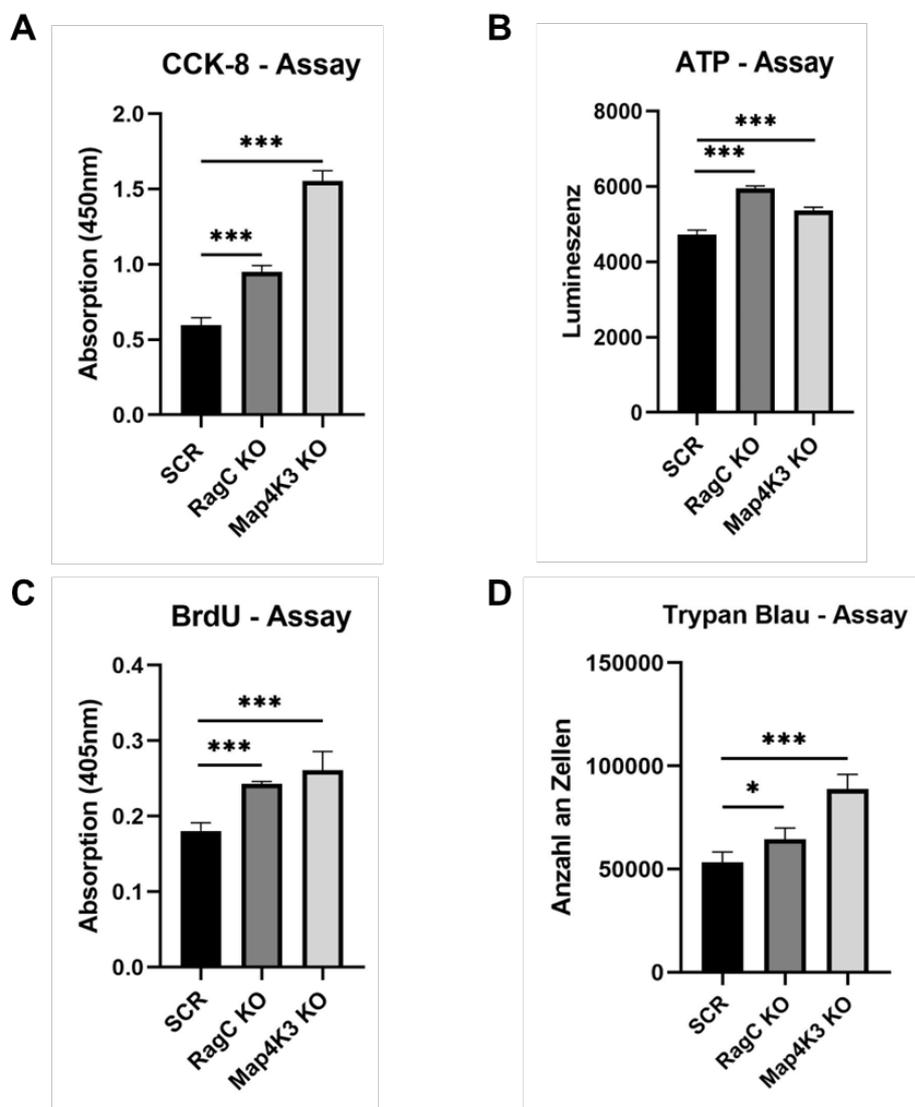


Abbildung 12: Proliferations-Assays für U87 Aminosäuresensor-KO. Darstellung der indirekten Untersuchung der Proliferation durch CCK-8 - Assay (A) und ATP - Assay (B). Die Substratumsetzungszeit lag bei 3 h für CCK-8 -Assay. Das in (C) dargestellte Diagramm zeigt die direkte Messung der Proliferation durch den messbaren Nukleosideinbau. Hierbei lag die Einbauzeit bei 4 h. Direkte Zellzahlzählung ist in (D) dargestellt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Zur Bestätigung der proliferativen Wirkung wurden Untersuchungen in U138-, als auch in MCF-7 RagC-KO und Map4K3-KO mittels CCK-8-Assay durchgeführt (Abb. 13). Hier zeigt sich ebenfalls für U138 RagC-KO und Map4K3-KO eine signifikante Proliferationssteigerung im Vergleich zu U138 SCR. Für MCF-7 zeigt sich ebenfalls eine signifikante Proliferationssteigerung durch den RagC-KO, wohingegen durch den Map4K3-KO keine signifikante Steigerung der Proliferation festgestellt wurde.

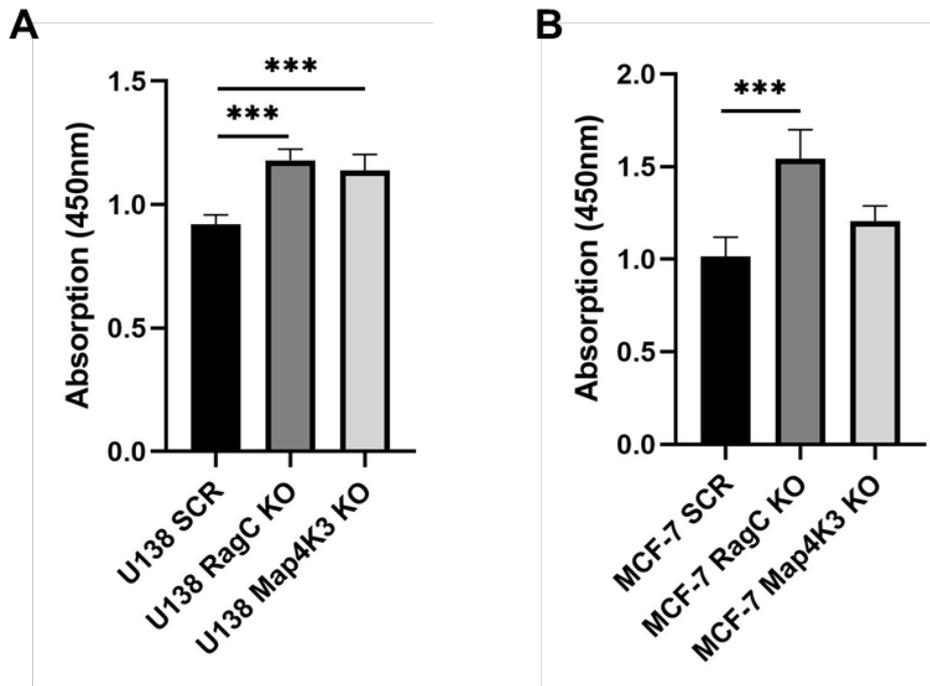
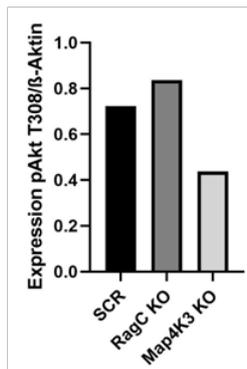
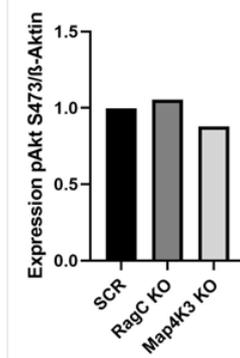
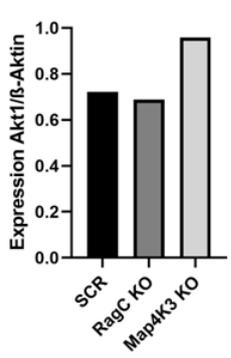
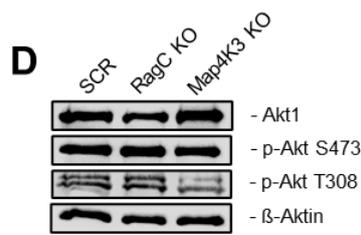
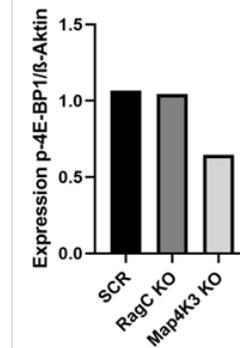
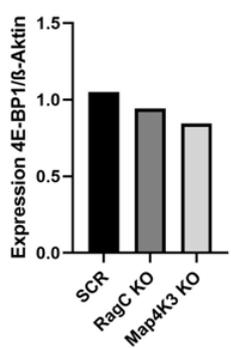
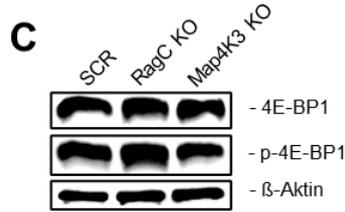
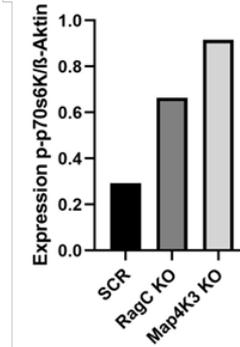
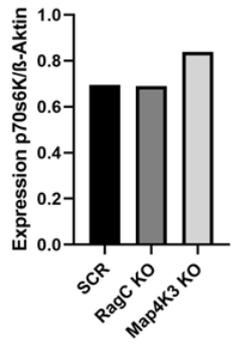
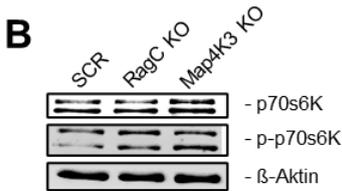
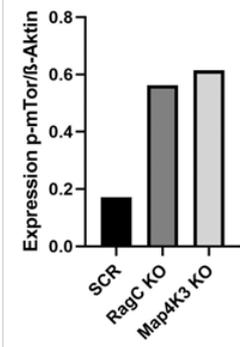
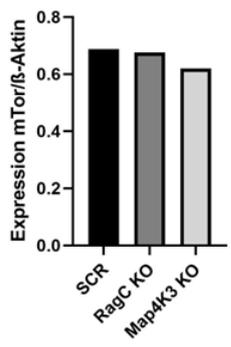
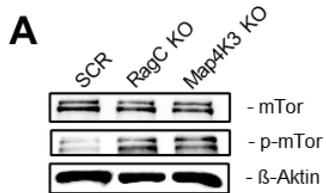


Abbildung 13: CCK-8-Assay U138 und MCF-7 Aminosäuresensor-KO. Darstellung der Proliferation durch das CCK-8-Assay. *** $p < 0,001$.

3.5. Western Blots des mTOR-Signalwegs

Auf der Suche nach einer Erklärung für die erhöhte Proliferation wurden für die Knockout-Varianten Western-Blot-Analysen durchgeführt. Da sowohl RagC, als auch Map4K3 wichtige Komponenten des mTOR-Signalwegs sind, wurde zunächst mTOR (Abb. 14A) und die nachgeschaltete p70s6-Kinase sowie deren Phosphorylierung (Abb. 14B) genauer untersucht. Der U87 RagC-KO zeigt eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von mTOR mit einer entsprechenden Phosphorylierung von p70S6K im Vergleich zu U87 SCR. Der U87 Map4K3-KO zeigt eine ähnliche gesteigerte Aktivierung von mTORC1 wie der RagC-KO. Tatsächlich ist aber die Phosphorylierung von p70S6K deutlicher für Map4K3-KO ausgeprägt. Ein weiteres

nachgeschaltetes Molekül von mTORC1, 4E-BP1, zeigt keine deutliche Veränderung in der 4E-BP1-Expression zwischen U87 SCR und U87 RagC- bzw. Map4K3-KO (Abb. 14C). Hingegen zeigt die Phosphorylierung von 4E-BP1 eine Verminderung für U87 Map4K3-KO im Vergleich zu U87 SCR. In Abbildung 14D wurde die im Upstream gelegene, Stoffwechsel fördernde Kinase, Akt und dessen Phosphorylierung an Serin 473 und Threonin 308 untersucht. Verglichen mit U87 SCR ergab sich für U87 Map4K3-KO eine erhöhte Expression von Akt und eine geringe Verminderung von p-Akt S473 sowie deutliche reduzierte Phosphorylierung an Threonin 308. Für U87 RagC-KO zeigt sich nahezu keine Veränderung der Expression von Akt gegenüber U87 SCR. Es finden sich in U87 RagC-KO nur gering erhöhte Expressionen von p-Akt S473 und p-Akt T308. Abbildung 14E zeigt die zum Rag-GTPasen-Komplex gehörenden Proteine RagA und RagD, die sowohl in U87 RagC-KO als auch in U87 Map4K3-KO stärker exprimiert sind. Hier wurde eine starke Zunahme von RagD in U87 RagC-KO und nur eine geringe Zunahme in U87 Map4K3-KO im Vergleich zu U87 SCR gefunden. Darüber hinaus ist die Expression von RagA sowohl bei U87 RagC-KO als auch bei U87 Map4K3-KO deutlich erhöht, wenngleich sie bei Map4K3-KO noch stärker ausfällt, verglichen mit U87 SCR. Für eine genauere Unterscheidung zwischen mTORC2 und mTORC1 wurden Rictor bzw. Raptor untersucht (Abb. 14F). Hierbei zeigt sich für Rictor eine deutliche Minderexpression für U87 RagC- und Map4K3-KO im Vergleich zu U87 SCR. Raptor hingegen zeigt eine, wenn auch marginale Steigerung in U87 Map4K3-KO gegenüber U87 SCR. Darüber hinaus wurde der Zellstressindikator AMPK untersucht, wobei die Phosphorylierung für U87 Map4K3-KO eine geringe Verminderung gegenüber U87 SCR zeigt und eine geringere Reduktion für U87 RagC-KO (Abb. 14G). Abbildung 14H zeigt zusätzlich Caspase 3. Hier konnte lediglich eine leicht erhöhte Expression in U87 RagC-KO im Vergleich zu U87 SCR beobachtet werden. Für die U87 Aminosäuresensor-KO konnte kein abgespaltenes Caspase 3-Produkt (Cleaved Caspase 3) gefunden werden. Im Rahmen der Sensitivität dieser Western Blots fanden sich somit keine Hinweise auf Apoptose in diesen Zellen.



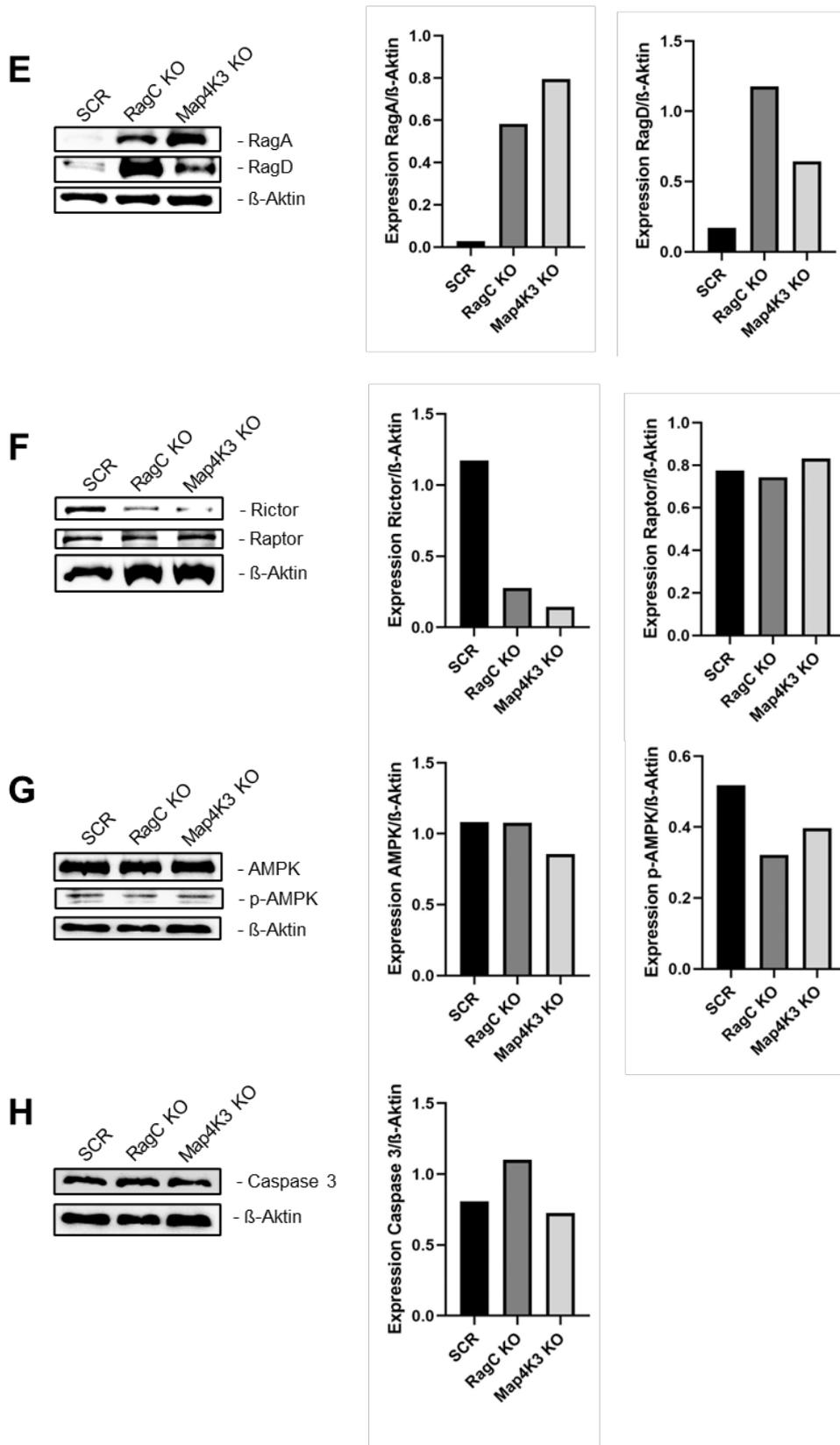


Abbildung 14: Proteinexpression der U87 Aminosäuresensor-KO in DMEM. Western Blots von U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO für die Antikörper mTOR (A), p70S6K (B), 4E-BP1 (C), Akt (D), RagA/D (E), Rictor/Raptor (F), AMPK (G) und Caspase 3 (H). Bei dargestellten Doppelbanden, entspricht die jeweils untere Bande dem gesuchten Protein. Die korrespondierende Densitometrie für die entsprechend dargestellten Antikörper ist jeweils gegen β -Aktin normiert.

3.6. U87 RagC- und Map4K3-Knockout unter Leucin-freien Bedingungen

Da sowohl RagC als auch Map4K3 als Aminosäuresensoren beschrieben sind, wurde das Verhalten nach Ausschalten ebendieser unter Bedingungen des Mangels an der essentiellen Aminosäure Leucin untersucht. Zu diesem Zweck wurde zuerst, für die Beschreibung der Proliferation, der CCK-8 - Assay benutzt (Abb. 15). Unter Leucin-Entzug (-Leu) zeigt U87 SCR einen nicht signifikanten Rückgang der Proliferation und auch U87 RagC-KO zeigt eine nicht signifikant verringerte Proliferation. U87 Map4K3-KO zeigt hingegen einen signifikanten Rückgang der Proliferation unter Leucinmangel. Unter den Bedingungen des Leucin-freien Mediums, das zusätzliches Leucin entsprechend DMEM enthält (Stim), zeigen U87 SCR und U87 RagC-KO eine nicht signifikante Proliferation über dem Ausgangswert hinaus, während U87 Map4K3-KO nahezu den Ausgangswert erreicht.

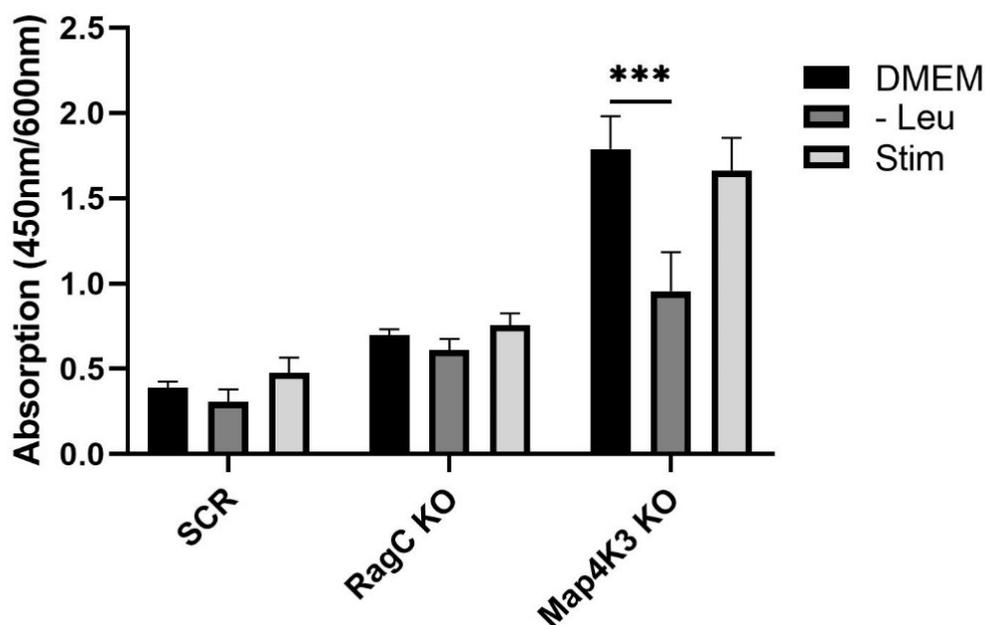
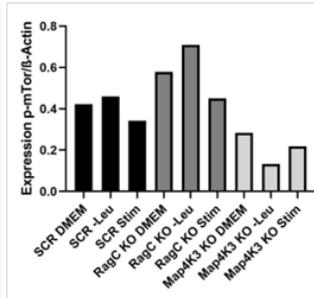
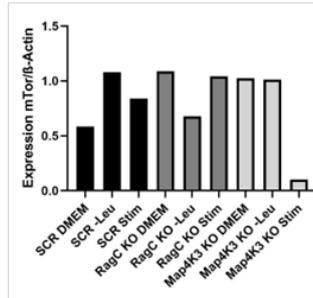
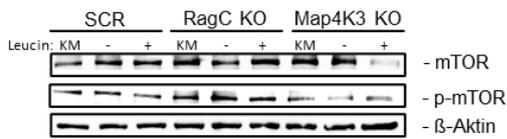
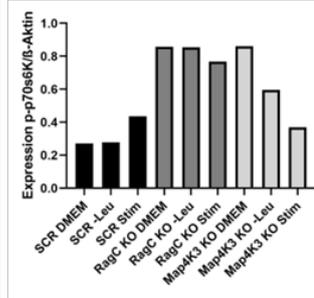
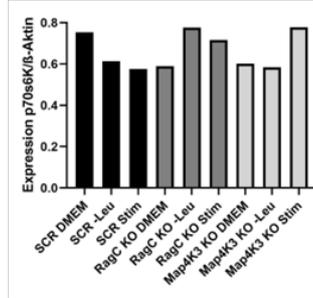
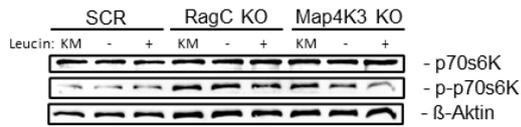
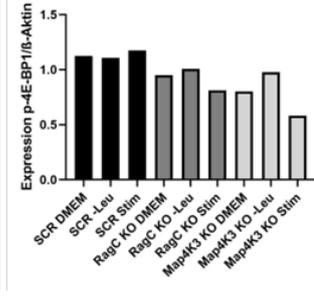
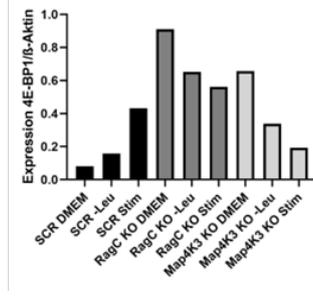
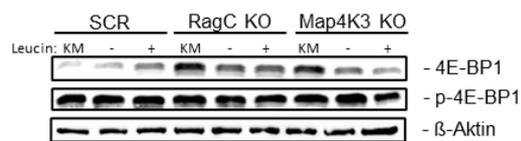
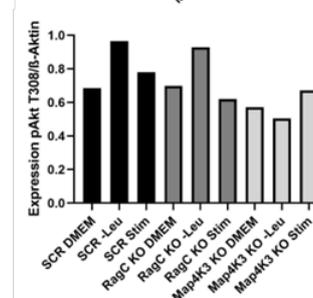
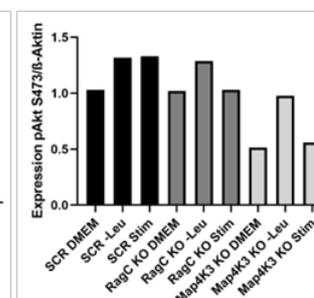
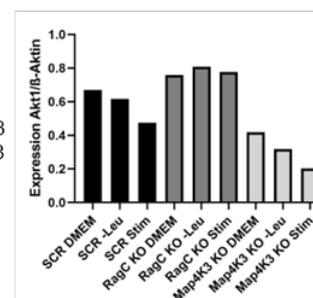
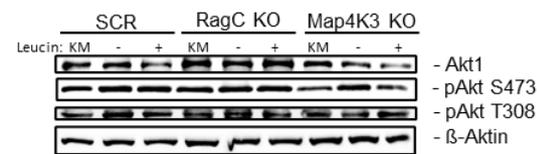


Abbildung 15: CCK-8-Assay der U87 Aminosäuresensor-KO unter Leucinmangel. Darstellung der indirekten Untersuchung der Proliferation durch CCK-8 – Assay. Beobachtungszeit über 48 h für DMEM als auch Leucinmangelzustand bzw. Stimulation mit 1mM Leucin angereichertem Leucin-freien Medium. *** $p < 0,001$.

Um den Leucinentzug in den U87 Knockout-Zellen genauer zu beschreiben, wurden Western Blots durchgeführt. Abbildung 16A zeigt mTOR und seine Phosphorylierung, mit einem leichten Anstieg der Phosphorylierung bei U87 RagC-KO und einem

leichten Rückgang bei Map4K3-KO unter Mangel an Leucin. Bei einer erneuten Stimulation, mit Leucin freiem Medium und zugesetztem Leucin gemäß DMEM, ist ein Rückgang auf ein ähnliches Niveau wie im Kontrollmedium (DMEM) zu beobachten. Da die Aktivierung des mTORC1-Komplexes bekanntermaßen in der Aktivierung von p70S6K bzw. Inhibierung von 4E-BP1 zum Ausdruck kommt, wurde diese Aktivierung in Form der Phosphorylierung gemessen. Dabei zeigt sich, dass die Phosphorylierung von p70S6K in U87 Map4K3-KO unter Leucin-Entzugsbedingungen reduziert ist. Die U87 RagC-KO und U87 SCR weisen hingegen eine ähnliche Expression für phospho-p70S6K, im Vergleich zum Kontrollmedium auf (Abb. 16B). Unter Stimulationsbedingungen steigt die Expression von phosphoryliertem p70S6K in U87 SCR über das Ausgangsniveau, wohingegen in U87 RagC-KO ein dezenter Abfall und in U87 Map4K3-KO ein deutlicher Abfall zu verzeichnen ist. Das im Downstream von mTORC1 befindliche 4E-BP1 zeigt eine nahezu unveränderte Phosphorylierung für U87 SCR sowie RagC-KO, und eine gering gesteigerte Phosphorylierung für U87 Map4K3-KO unter Leucin-freien Bedingungen. Unter Stimulation wurde in U87 SCR eine leichte Steigerung festgestellt, wohingegen in U87 RagC-KO und Map4K3-KO eine geringe Minderung in der Phosphorylierung von 4E-BP1 zeigen (Abb. 16C). Die für den zellulären Stoffwechsel wichtige Akt-Kinase und seine Phosphorylierung S473 bzw. T308 sind in Abbildung 16D dargestellt. Sowohl pAkt-S473 als auch pAkt-T308 zeigen einen leichten Anstieg unter Leucin-freien Bedingungen für U87 RagC-KO und U87 SCR. U87 Map4K3-KO zeigt einen Anstieg nur für p-Akt S473, nicht aber für p-Akt T308. Unter Stimulation wird eine nahezu gleiche Expression wie in DMEM beobachtet. Sowohl U87 Map4K3-KO als auch U87 RagC-KO zeigen im Vergleich zu U87 SCR unter Kontrollmedium eine durchgängig erhöhte Expression, der zum Rag-GTPasen-Komplex gehörenden, RagA und RagD (Abb. 16E bzw. 14E). Unter Leucin-freien Bedingungen kommt es bei U87 RagC-KO zu einer deutlichen Reduktion von RagA ohne Erholung auf das Ausgangsniveau zurück. U87 Map4K3-KO und U87 SCR zeigen dagegen einen geringen Anstieg unter Leucinmangelzustand, mit einem durch die Stimulation erfolgten Rückgang auf das Ausgangsniveau. Für RagD zeigt sich in U87 SCR, als auch der beiden Knockout-Varianten ein geringer Anstieg unter Leucinmangel, welcher durch Stimulation wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte.

A**B****C****D**

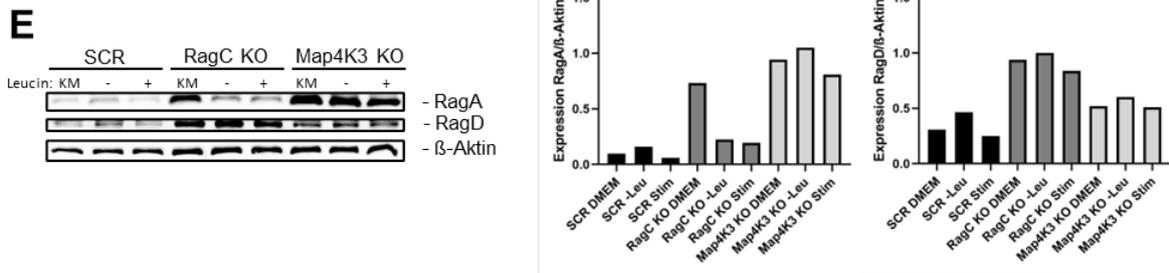


Abbildung 16: Western Blot von U87 Aminosäuresensor-KO unter Leucinmangel. Western Blots von U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO unter Bedingungen des Leucinmangels für die Antikörper mTOR (A), p70S6K (B), 4E-BP1 (C), Akt (D) und RagA/D (E). Die korrespondierende Densitometrie für die entsprechend dargestellten Antikörper sind gegen β -Aktin normiert. Leucin: KM = Kontrollmedium (DMEM), - = Leucinmangel (4 h), + = Restimulation mit Leucin-freien Medium plus 1 mM Leucin (1 h).

3.7. Autophagie und Seneszenz in U87 RagC- und Map4K3- Knockout

Da die beobachtete Proliferationssteigerung mit der Autophagie in Zusammenhang gebracht werden könnte, wurden die Auswirkungen in den U87 Aminosäuresensor-KO Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Western-Blot-Analyse von LC3 für U87 RagC-KO und Map4K3-KO im Vergleich zu U87 SCR durchgeführt (Abb. 17). Einerseits zeigt sich eine erhöhte Menge an freiem LC3 im Zytosol (entspricht LC3-I), aber auch eine erhöhte Menge an vorrangig autophagosomal gebundenem LC3 (entspricht LC3-II).

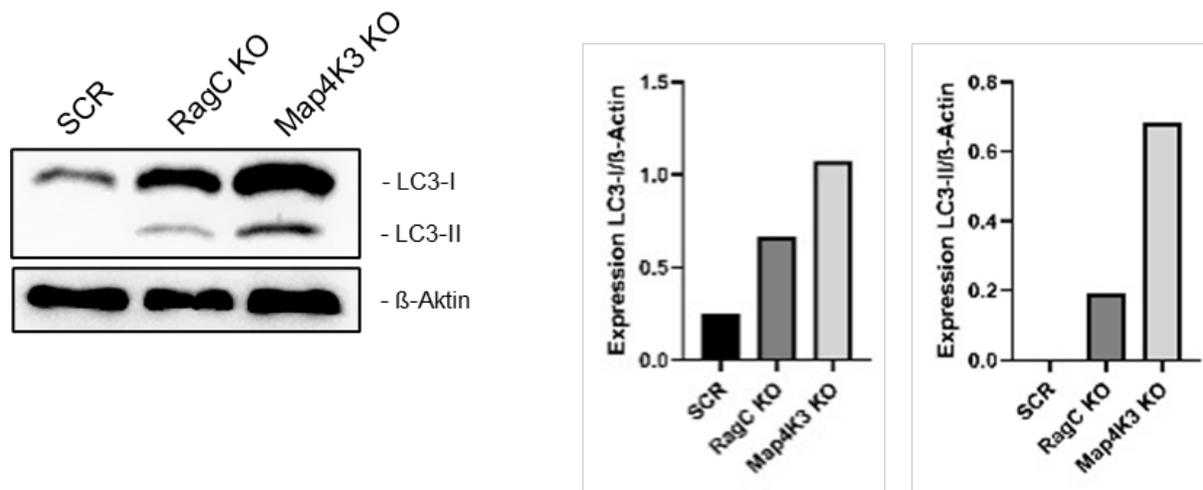


Abbildung 17: Autophagie-Induktion nach Aminosäuresensor-KO. LC3 Western Blots von U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO unter DMEM. Die korrespondierende Densitometrie für LC3 ist gegen β -Aktin normiert und als Balkendiagramm dargestellt.

Für eine detailliertere Bewertung des Autophagieflusses wurde die Menge an LC3 nach Behandlung mit Ammoniumchlorid, das den lysosomalen Abbau von Autophagosomen blockiert (Abb. 18), analysiert. Dabei stellte sich ein weiterer Anstieg der LC3-II-Menge fest, was auf eine Induktion der Autophagie und eine ordnungsgemäße Autophagosomen-Lysosomen-Fusion hindeutet. Zusätzlich wurde der Autophagiefluss unter Bedingungen des Leucinmangels untersucht. Dieser resultiert in einem noch deutlicheren Autophagiefluss, entsprechend einer verstärkten Autophagie.

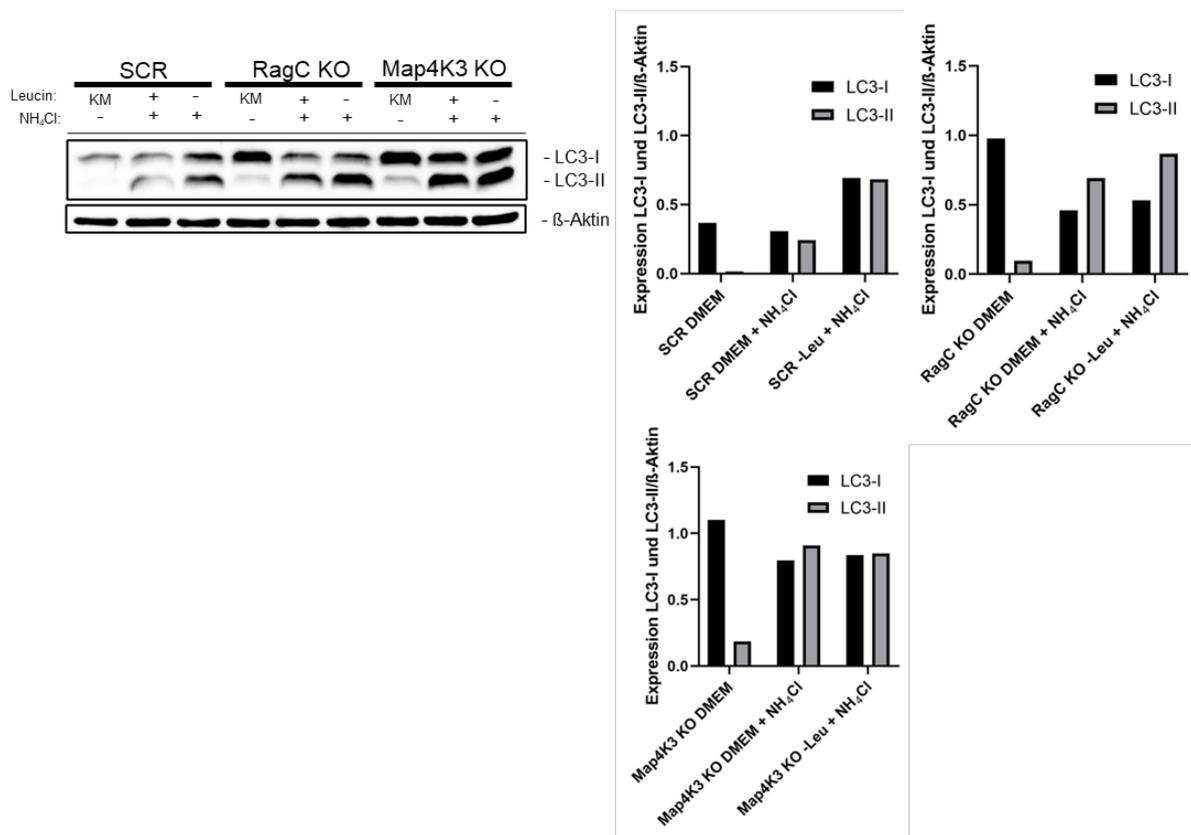


Abbildung 18: Autophagiefluss in U87 Aminosäuresensor-KO. Untersuchung des Autophagieflusses durch Ammoniumchlorid-Behandlung und zusätzlichem Leucinmangel für LC3. Die korrespondierende Densitometrie für LC3 gegen β -Aktin normiert und als Balkendiagramm dargestellt. Leucin: KM = Kontrollmedium (DMEM), - = Leucinmangel (4 h), + = Restimulation mit Leucin-freiem Medium plus 1 mM Leucin (1 h); NH₄Cl: - = keine Behandlung, + = Behandlung für 4 h.

Des Weiteren wurde untersucht, ob TFEB, das hauptsächlich durch Map4K3 und indirekt durch RagC gesteuert wird, eine Rolle bei der beobachteten, erhöhten Autophagie-Induktion spielt. Daher wurden Western Blots für Gesamt-TFEB (phosphoryliert und unphosphoryliert) durchgeführt. Hierbei wurden deutlich erhöhte Expressionen in U87 RagC-KO und U87 Map4K3-KO im Vergleich zur U87 SCR

festgestellt (Abb. 19A). Es ist bekannt, dass TFEB als Transkriptionsfaktor für die Autophagie im Zellkern fungiert. Daher wurden TFEB-Western Blots nach Separation von Zytoplasma und Zellkern für U87 Aminosäuresensor-KO durchgeführt (Abb. 19B). TFEB zeigt eine deutlich erhöhte Expression für U87 RagC-KO im Zytoplasma, bei gleichzeitig deutlicher Präsenz im Zellkern verglichen mit U87 SCR. U87 Map4K3-KO hingegen zeigt im Zytoplasma einen sehr deutlichen Anstieg an TFEB, wohingegen im Zellkern eine deutliche Verringerung im Vergleich zu U87 SCR festgestellt wurde. Zusätzlich wurde unter den Bedingungen des Leucinmangels die LC3- und Gesamt-TFEB-Konzentrationen untersucht (Abb. 19C). Im Hinblick auf LC3-II zeigen U87 RagC-KO und U87 SCR eine verstärkte Induktion der Autophagie unter 4 Stunden Leucinmangel, während bei U87 Map4K3-KO eine leicht reduzierte LC3-II Expression beobachtet wurde. Eine anschließende 1-stündige Stimulation mit Leucin freiem Medium und zusätzlichem Leucin gemäß DMEM zeigt eine Induktion der Autophagie über den Ausgangswert hinaus bei U87 SCR und U87 RagC-KO. U87 Map4K3 kehrt dabei auf das hohe Ausgangsniveau zurück. Ebenfalls zeigt sich für LC3-I unter Zustand des Leucinmangels eine erhöhte Expression für U87 SCR und U87 RagC, wohingegen bei U87 Map4K3-KO eine verminderte Expression festgestellt wurde. Unter Leucin-freien Bedingungen ist die Expression von Gesamt-TFEB in U87 SCR erhöht, während U87 RagC-KO und U87 Map4K3-KO eine verringerte Expression aufweisen. Dieser Rückgang setzt sich auch bei erneuter Stimulation fort. Für U87 SCR wurde eine nicht auf das Ausgangsniveau zurückkehrende Expression festgestellt.

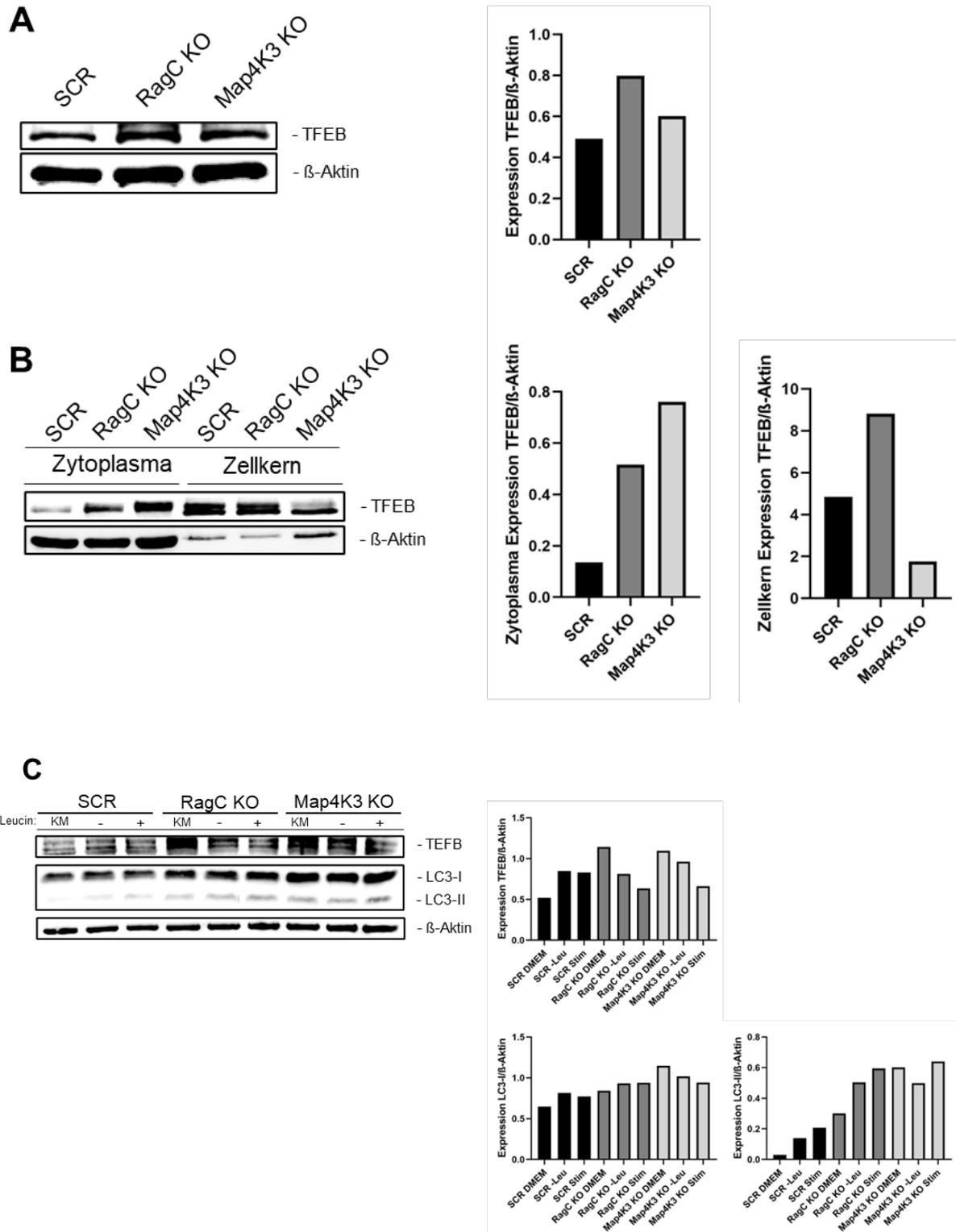


Abbildung 19: Western Blots von TFEB für U87 Aminosäuresensor-KO. Western Blots für TFEB als totale Menge (A) und als Separation von Zytoplasma gegenüber ist in (B) dargestellt. Der in (C) dargestellte Western Blot zeigt das Gesamt-TFEB (Doppelbande) und LC3 Expression unter Leucinmangelzustand. Die korrespondierende Densitometrie für die entsprechenden Antikörper ist gegen β -Aktin normiert und als Balkendiagramm dargestellt. Leucin: KM = Kontrollmedium (DMEM), - = Leucinmangel (4 h), + = Restimulation mit Leucin-freiem Medium plus 1 mM Leucin (1 h).

Da die Autophagie die Seneszenz fördern kann, wurde eine β -Gal-Färbung für U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO durchgeführt (Abb. 20A, B). In Vollmedium (DMEM) zeigen sich für U87 SCR ca. 20 %, U87 RagC-KO ca. 43 % und U87 Map4K3-KO ca. 4 % seneszente Zellen. Als Kontrolle wurde der komplette Verzicht von Serum (-Serum) gewählt, um den Zellen einen maximalen Stressreiz zu setzen. Hier zeigen sich für U87 SCR ca. 32 %, U87 RagC-KO ca. 73 % und U87 Map4K3-KO ca. 6 % seneszente Zellen.

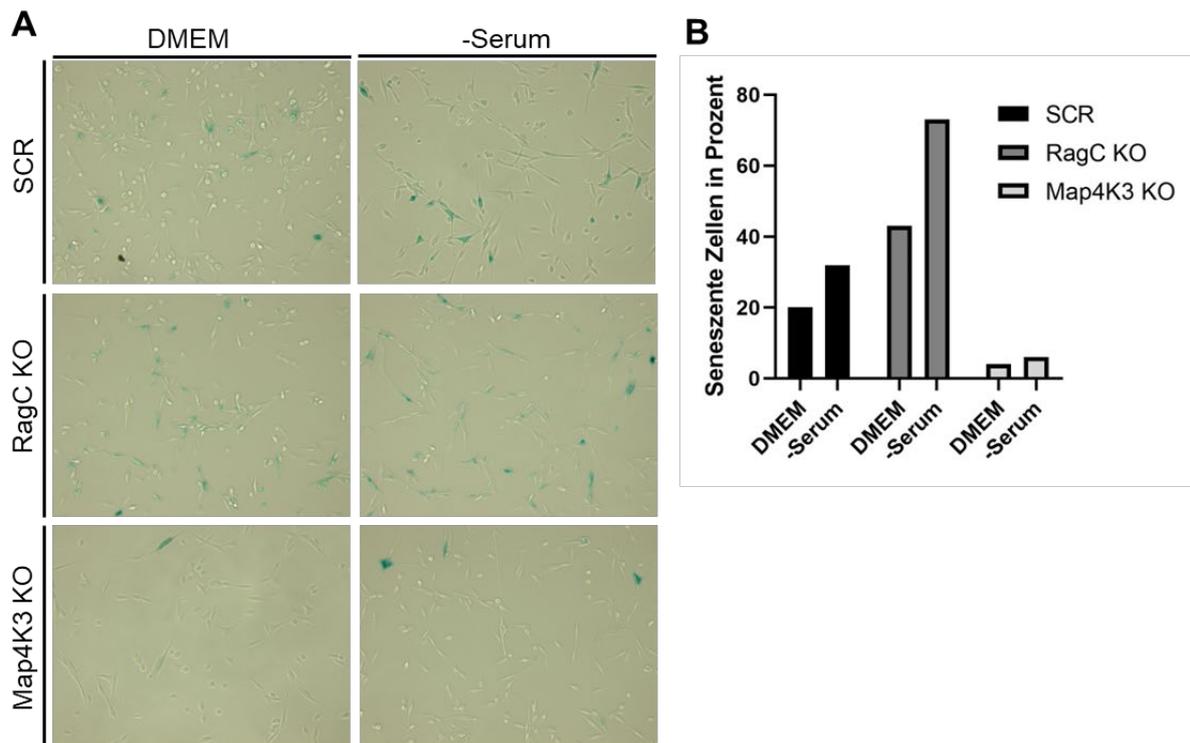


Abbildung 20: Seneszenz nach U87 Aminosäuresensor-KO. Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Zellen bei Behandlung mit DMEM (Vollmedium) und -Serum (DMEM ohne Serum) für 24 h. **(A)** zeigt Bilder der mikroskopischen Ausschnitte von U87 SCR, RagC-KO und Map4K3-KO in den entsprechenden Medien. **(B)** zeigt die mikroskopisch gezählten positiven Zellen gegenüber der Gesamtzahl an Zellen in Prozent.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit wollte die Frage klären, ob die für die Funktion des mTORC1-Signalweges relevanten Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 für die gesteigerte Proliferation in malignen Gliomen mit verantwortlich sind. Die Tatsache einer signifikant verminderten Expression der Aminosäuresensoren mit steigendem Malignitätsgrad in Gliomen, wurde durch das Ergebnis einer paradoxen Proliferationssteigerung in RagC- und Map4K3- ausgeschalteten Gliomzellen bestätigt.

4.1. Die Rolle von RagC und Map4K3 in der Zellbiologie von Gliomen

Auswertungen der mRNA sowie der Proteinexpression von RagC und Map4K3 in humanen Gliom-Proben zeigen überraschenderweise eine Verminderung für ZNS-WHO-Grad 4 gegenüber Grad 2/3. Sowohl für die mRNA- als auch für die Proteinisolierung ergeben sich eine Vielzahl von Einflussfaktoren. So ist aufgrund des diffus infiltrativen Charakters von Gliomen nicht sicher auszuschließen, dass die genutzten Proben neben Tumorgewebe auch Anteile normalen Hirnparenchyms enthalten. Zudem tragen auch im Tumorgewebe selbst Gefäßendothelien und Lymphozyten stets zum mRNA- bzw. Proteinpool bei. Somit kann davon ausgegangen werden, dass hierdurch mRNA und Proteine von Nicht-Tumorgewebe im Ergebnis enthalten sind. Dies würde die geringe Heterogenität innerhalb der mRNA-Analyse erklären. Zudem wurden in der Proteinexpressionsuntersuchung lediglich drei Proben je ZNS-WHO-Grad genutzt, was eine mögliche Heterogenität innerhalb der Stichproben erklären würde. Dennoch lässt sich eine Tendenz für ZNS-WHO-Grad 4 Gliome erkennen, die bei schwacher Datenlage und überwiegend für andere Tumorentitäten beschrieben, nur begrenzt einzuordnen ist [95, 96]. So gibt es einige wenige Beschreibungen von RagC in follikulären Lymphomen und bei Kardiomyopathien, welche somatische Mutationen tragen und zu einer gestörten mTORC1-Aktivität führen [97-99]. Für Map4K3 sind Überexpressionen in Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen beschrieben, die mit Metastasenbildung und schlechter Prognose einhergehen [100, 101]. Daher war es von Interesse, vergleichend zur Versuchszelllinie U87 MG, weitere Zelllinien, wie U138 MG (ebenfalls

Gliom-Zelllinie) und die von einem Mamma-Karzinom abgeleitete Linie MCF-7 als „gliomfremde“ Zelllinie, zu nutzen, und eine Ausgangsexpression für beide Aminosäuresensoren zu erhalten. Die dabei gefundene Heterogenität zwischen den verwandten und nicht verwandten Tumorentitäten lassen einen Tumor-spezifischen Effekt nicht sicher ausschließen. Da es zwischen den drei Zelllinien auf Protein-Ebene keine Expressions-Unterschiede gab, sondern nur moderate Differenzen, ist es jedoch naheliegend, dass beide betrachteten Aminosäuresensoren von allgemeiner Bedeutung sind. Auch die gemachte Einschränkung der Knockout-Experimente auf wenige Zelllinien charakterisiert damit zumindest keinen außergewöhnlichen Sonderfall. Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse wurden, mittels Crispr/Cas, Knockout-Varianten von U87 MG mit RagC-Knockout (KO) und Map4K3-KO erzeugt. Die fehlende kompensatorische Mehrexpression des jeweils nicht ausgeschalteten Aminosäuresensors lässt vermuten, dass beide Proteine nicht in einander direkt komplementärer Funktion in derselben Teilstrecke der mTORC-Regulation eingebunden sind [59, 70, 71]. Überraschenderweise wurde aber für beide Knockout-Varianten eine veränderte Morphologie gefunden. In Studien an Kardiomyozyten und Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Mutationen in RagC mit konsekutiv erhöhter mTORC1 Aktivität eine Änderung in der Morphologie verursachen [97, 102]. Eine Überexpression von RagC führte demzufolge zu einer vergrößerten Zellfläche. Im Umkehrschluss könnte man davon ausgehen, dass durch das Ausschalten von RagC eine verkleinerte Zellgröße, aufgrund der eingeschränkten mTORC1-Aktivität resultiert [67]. Die in U87 RagC-KO festgestellte, verkleinerte Zellfläche könnte womöglich zu einer ursächlich gesteigerten Motilität sowie Migration innerhalb der Glioblastome führen [103]. Anders als in U87 RagC-KO, zeigt sich in U87 Map4K3-KO überraschenderweise eine vergrößerte Zellfläche. Dies erscheint unter der Map4K3-mTORC1-Abhängigkeit bemerkenswert, da in Studien mit *Drosophila* gezeigt wurde, dass bei Verringerung von Map4K3 eine verminderte Zellgröße hervorgeht [74, 75]. Das lässt vermuten, dass die Zellgröße keinen direkten Einfluss auf die Motilitäts- oder Migrationseigenschaften nimmt, sondern vielmehr ein Produkt des Mikromilieus zu sein scheint [103, 104]. Morphologie und Motilität setzen ein einwandfrei funktionierendes Zytoskelett voraus. Hierbei ist mTORC2 maßgeblich an der Dynamik des Zytoskeletts beteiligt [25, 32, 105]. In dieser Arbeit wurde die mTORC2-Aktivität einerseits über Rictor, andererseits über dessen Phosphorylierung an Akt (S473, T308) beurteilt. Hier lässt sich, sowohl für den RagC-KO als auch den Map4K3-KO,

eine verminderte Expression von Rictor und auch eine verminderte Phosphorylierung an Akt feststellen. Insbesondere scheint die Phosphorylierung von Akt an Stelle T308 eine Abhängigkeit von Map4K3 zu besitzen (Abb. 14 D). Dies lässt vermuten, dass Map4K3 und RagC, als Bestandteil des Rag-GTPasen-mTORC1-Signalweges, eine entscheidende Rolle für die Interaktion zwischen mTORC1 und mTORC2 spielen [106]. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Rag-GTPasen-Komplex, neben direkter Bindung von Raptor, auch eine Bindungsstelle für Rictor darstellt und über Map4K3 gestützt wird [58]. Eine andere Studie zeigte, dass durch die erhöhte mTORC1-Aktivität mit konsekutiver Mehrexpression von p70S6K, ein negatives Feedback auf Rictor und den PI3K/Akt-Signalweg entsteht [39].

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine paradoxe Proliferationssteigerung durch die Abschaltung der Aminosäuresensoren beobachtet. Der paradoxe Charakter entsteht durch den, in anderen Entitäten beschriebenen, positiven Einfluss von RagC und Map4K3 auf die mTOR-Aktivität und dessen Zellwachstum [67, 74]. Ein Verlust der beiden Aminosäuresensoren ist, insbesondere für Gliome, bisher nur bedingt beschrieben. Lediglich in einer Arbeit konnte eine Proliferationssteigerung in Osteosarkomzellen nach partieller Repression der Expression von Map4K3, nachgewiesen werden [107]. Zum Ausschluss eines paradox singulären Ergebnisses für U87 MG wurde RagC und Map4K3 ebenfalls in U138 MG und MCF-7 ausgeschaltet. Die in beiden Zelllinien beobachtete Proliferationssteigerung, bei verminderter Expression von RagC, untermauert die direkte Modulation von mTORC1 (siehe 4.2). Die fehlende Proliferationssteigerung bei MCF-7 Map4K3-KO lässt vermuten, dass Map4K3 als selektiver Aminosäuresensor eine eher untergeordnete Rolle in der mTORC1-Modulation von Gliomzellen spielt [108].

4.2. Der molekulare Mechanismus von RagC und Map4K3

Für den U87 RagC-KO zeigt sich eine erhöhte Phosphorylierung von p70S6K, was eine erhöhte Kinase-Aktivität von mTORC1 vermuten lässt. Da RagC als wichtige Komponente des Rag-GTPasen-Komplexes beschrieben ist und direkt die mTORC1-Aktivität moduliert, ist es erstaunlich, dass mit dem Ausschalten von RagC eine Proliferationssteigerung zu verzeichnen ist [109]. Eine mögliche Erklärung findet sich

in dieser Arbeit gefundenen, deutlich erhöhten Expression von RagD (Abb. 14E). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von RagD direkten Einfluss auf die lysosomale Rekrutierung von mTORC1 nimmt [110]. Es ist beschrieben, dass dadurch der RagGTPasen-mTORC1-Komplex direkt mit TFEB interagieren kann und für dessen Phosphorylierung verantwortlich ist [110-112]. Dies würde bedeuten, dass eine erhöhte mTORC1-Aktivität vermehrt TFEB phosphoryliert und somit die Autophagie inhibiert. Es ist bekannt, dass nur unphosphoryliertes TFEB im Zellkern die Autophagie-Gene induzieren kann. Damit stellte sich die Frage, wie der RagC-KO auf die Expression von TFEB wirkt. Ausgehend davon, wurde in dieser Arbeit die Expression von Gesamt-TFEB (phosphoryliert und unphosphoryliert) in der gesamten Zelle, dem Zytoplasma und Zellkern untersucht. Durch die beobachtete, erhöhte Gesamt-TFEB-Expression ist anzunehmen, dass TFEB selbst in einem dynamischen Zustand zwischen Zytoplasma und Zellkern agiert [113]. Die dabei beobachtete geringe Induktion der Autophagie lässt vermuten, dass zwar in Summe mehr TFEB exprimiert wird, RagC aber nicht maßgeblich für die Phosphorylierung zuständig ist [91]. Es scheint also durch den Mangel an RagC dennoch zu einer ausreichenden Phosphorylierung von TFEB zu kommen, welche durch die erhöhte Expression von RagD und konsekutiver mTORC1-Aktivität erklärbar wäre [63]. Es wurde zudem festgestellt, dass es unter normalem Aminosäureangebot zu einer gesteigerten RagA Expression kommt. Damit ist anzunehmen, dass RagA ein Bindungspartner für RagC ist, welcher ebenfalls kompensatorisch gesteigert agiert [64]. Die unter Leucin-freiem Medium beobachtete deutlich reduzierte Expression von RagA mit gleichzeitig unverändert hoher Expression von RagD lässt eine Leucin-Sensitivität für RagA vermuten [114]. Zusätzlich wurde unter Leucinmangel eine reduzierte Expression von TFEB, bei gleichzeitiger Induktion der Autophagie, beobachtet. Eine Studie zeigte, dass die Interaktion von mTORC1 mit TFEB in RagA/B-verminderten Zellen signifikant beeinträchtigt war, ohne dabei die mTORC1-p70S6K-Interaktion selbst zu beeinträchtigen [92]. Das würde bedeuten, dass für die RagGTPasen-mTORC1-Interaktion mit TFEB RagA eine untergeordnete Rolle spielt. Ebenso lässt sich vermuten, dass die Proliferationssteigerung durch die Überexpression von RagD mit konsekutiver mTORC1-Aktivierung einhergeht und durch den Leucinmangel nahezu nicht eingeschränkt wird. Dies würde die Hypothese der RagD-ausgelösten fehlregulierten Proliferationssteigerung untermauern. Zusätzlich könnte die erhöhte TFEB-Expression über einen noch unklaren Weg die Proliferation ebenso steigern

[91]. Aufgrund mangelnder Induktion der Autophagie bei erhöhter Expression von TFEB war die Überlegung ob alternative Mechanismen parallel aktiviert werden, oder die Autophagie innerhalb des Leucinentzugs ein Resultat unzureichender Kompensation darstellt. Studien zeigten, dass die Seneszenz als ein neuer Effektormechanismus bei unzureichender Autophagie wirkt, bzw. aus einer überreizten Stresssituation heraus entstehen kann [115, 116]. Möglicherweise könnte der deutliche Abfall der RagA-Expression ein Indiz dafür sein, dass die Autophagie nicht mehr adäquat aufrechterhalten werden kann und in die Seneszenz übergegangen wird. Grund hierfür könnte womöglich die verringerte Zellgröße und die damit eingeschränkte Verfügbarkeit von Zellbestandteilen in U87 RagC-KO sein [117].

Die in U87 Map4K3-KO beobachtete, deutliche Expression von phosphoryliertem p70S6K und reduziert phosphoryliertem 4E-BP1, spricht einerseits für eine erhöhte mTORC1-Aktivität, andererseits spiegelt es die Rolle als Aminosäuresensor im Upstream von mTORC1 wider [70, 72, 77]. Es wurde unter anderem gezeigt, dass Map4K3 mit Rag-GTPasen in direkten Kontakt treten kann, insbesondere mit RagA und RagC [74]. Die gefundene Überexpression von RagA in Abwesenheit von Map4K3, lässt einen kompensatorischen Charakter erahnen. Bedenkt man zusätzlich den geringen Anstieg von RagA unter Leucinentzug lässt sich vermuten, dass RagA als direkt nachgeschaltetes Protein von Map4K3 agiert und womöglich mit diesem interagiert [70, 72]. Vermutlich entsteht durch den Verlust von Map4K3 und der damit einhergehenden verringerten Aminosäure-Sensorik, eine gesteigerte Expression von RagA mit entkoppeltem Feedback [114, 118, 119]. Es zeigt sich, ebenso wie in U87 RagC-KO, eine Überexpression von RagD, wenngleich diese unter dem Map4K3-KO geringer auszufallen scheint. Dies würde aber die kompensatorische Überexpression von RagD durch den RagC-KO und dessen möglichen Einfluss auf die Proliferationssteigerung stützen. Zusätzlich lässt sich vermuten, dass Map4K3 oberhalb des Signalweges von mTORC1 agiert und eine mögliche Interaktion mit dem Rag-GTPasen-Komplex eingeht [70, 72]. Wie bereits zuvor beschrieben, kommt es höchstwahrscheinlich zu einer unkontrollierten Rag-GTPasen-Aktivität mit gesteigerter Verankerung von mTORC1 an die Lysosomenmembran [110]. Der in Studien mit HEK293-Zellen beschriebene Effekt einer deutlichen Autophagie-Induktion durch den Verlust von Map4K3 konnte durch die vorliegende Arbeit ebenfalls für Gliomzellen nachgewiesen werden [77, 120]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass

Map4K3 für die Phosphorylierung von TFEB eine entscheidende Rolle spielt [77]. Nimmt man an, dass Map4K3 zusammen mit den Rag-GTPasen einen Komplex bildet, um so für eine ausreichende Phosphorylierung und damit eine Inhibierung der Autophagie zu sorgen, würde der Verlust an Map4K3 eine Autophagie induzieren [77, 120]. Genau dieser Sachverhalt konnte in U87 Map4K3-KO festgestellt werden. Überraschenderweise zeigte sich eine Erhöhung der TFEB-Expression im Zytoplasma und eine deutliche TFEB-Reduktion im Zellkern. Vermutlich kommt es durch den Verlust von Map4K3 zu einer verminderten Phosphorylierung von TFEB im Zytoplasma, und damit zu einer Translokation in den Zellkern [113]. Dies führt zur Induktion der Autophagie-Gene und schlussendlich zur Autophagie selbst [112]. Die TFEB-Minderung ist dabei höchstwahrscheinlich als dessen Umsatz im Zellkern anzusehen, da die TFEB-Expression im Zytoplasma deutlich erhöht ist. Wie bereits erwähnt, scheint die TFEB-Expression maßgeblich die Proliferation zu beeinflussen [91]. Die beobachtete erhöhte TFEB-Menge im Zellkern von U87 SCR und RagC-KO, bei gleichzeitiger, fehlender bzw. nur geringer Autophagie-Induktion, wäre am ehesten als Akkumulation oder als Steady State zu erklären [121]. Zusätzlich wäre dies ein mögliches Indiz für die benötigte zytoplasmatische Lokalisation von TFEB, um direkten Einfluss auf die Proliferation zu nehmen. Ergänzend zeigte sich für U87 Map4K3-KO nahezu keine Seneszenz. Möglicherweise scheint die vergrößerte Zellfläche genügend Autophagie-Kapazität zu besitzen, so dass selbst durch den Entzug von Serum über 24 h hinweg nahezu keine Seneszenz induziert wurde.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Proliferationssteigerung für U87 RagC-KO und Map4K3-KO mit einer Überexpression von RagA und RagD in Verbindung gebracht werden kann. RagD verursacht dabei eine übersteigerte Verankerung von mTORC1 an der Lysosomenmembran. RagA hingegen scheint einen wichtigen Einfluss auf die Autophagie-Induktion zu nehmen. Ob RagA dabei Einfluss auf das im Downstream von mTORC1 befindliche ULK1/2 nimmt, bleibt eine offene Frage. Nichtsdestotrotz scheint die Überexpression beider Rag-GTPasen für eine gesteigerte Aktivität von mTORC1, mit konsekutiv erhöhter Phosphorylierung von proliferativen Proteinen im Signalweg unterhalb der Kinase, zu sorgen. Zeitgleich kommt es durch das Ausschalten von RagC und Map4K3 zu einer Überexpression von TFEB, welches unter normalen Aminosäurebedingungen nur unzureichend von mTORC1 phosphoryliert werden kann (Abb. 21) [63, 77].

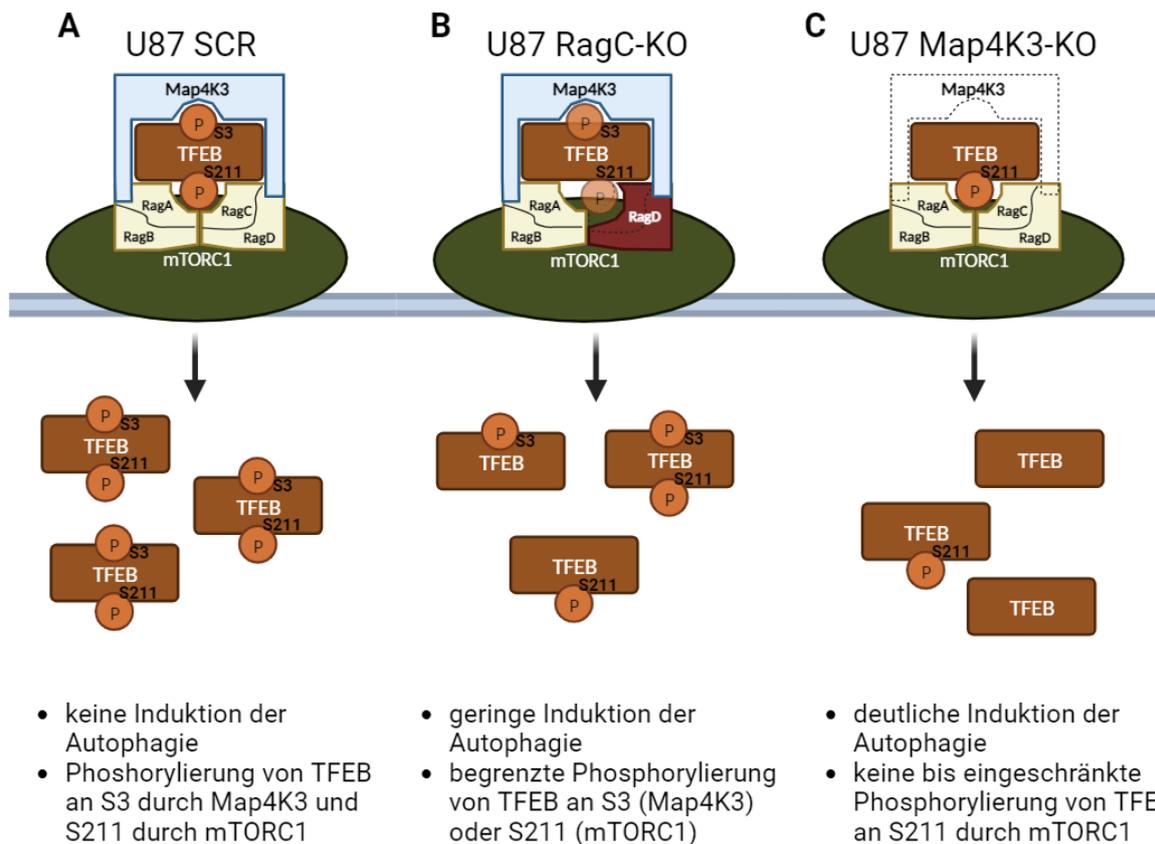


Abbildung 21: Schematische Darstellung der TFEB-Phosphorylierung in U87 Aminosäuresensor-KO. Die unter (A) abgebildete Darstellung zeigt die Kontrolle U87 SCR mit ordnungsgemäßer Phosphorylierung durch mTORC an Stelle S211 und durch MAP4K3 an Stelle S3 [63, 77]. (B) zeigt die eingeschränkte Phosphorylierung durch fehlendes RagC. Map4K3 kann dabei die Phosphorylierung an Stelle S3 gewährleisten und als Komplex womöglich die Phosphorylierung an Stelle S211 unterstützen. (C) zeigt die eingeschränkte Phosphorylierung an Stelle S3 durch fehlendes Map4K3. Außerdem ist die Komplexbildung eingeschränkt, so dass es zu unzureichender Phosphorylierung an Stelle S211 kommt. Die Abbildung wurde modifiziert mit Biorender.com [63, 77, 93].

Die durch den RagC-KO verursachte morphologische Veränderung benachteiligt vermutlich dabei die Autophagie und führt schneller und frühzeitiger in die Seneszenz. Somit trägt die induzierte Autophagie nur bedingt und kurzfristig zur Proliferationssteigerung bei. Es ist anzunehmen, dass durch das Fehlen von Map4K3 es zu einer morphologischen Veränderung kommt, welche die entkoppelte Autophagie begünstigt, und zusätzlich zur gestiegenen Proliferation beiträgt. Dabei scheinen die strukturellen Zellbestandteile genügend Kapazität zu besitzen, so dass selbst in 24 h serumfreiem Medium keine Seneszenz in U87 Map4K3-KO induziert wird.

4.3. Ausblick

Die mTORC1-Signalübertragung, im Sinne der Proliferation, und die Autophagie stellen parallele, aber in der Regel gegensätzliche Signalwege dar [122, 123]. Um die Homöostase und die Wachstumskontrolle aufrechtzuerhalten, müssen beide in koordinierter Weise zusammenarbeiten. Der Verlust dieser Kontrolle, wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt, liegt wahrscheinlich der Pathogenese vieler menschlicher Krebsarten zugrunde [124]. Die genauen Mechanismen, durch die die Autophagie bei der Kontrolle des Zellwachstums und der Tumorunterdrückung wirkt, müssen jedoch noch eingehender erforscht werden. Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das rapide Wachstum der Gliomzellen durch den Verlust von RagC und Map4K3 erklärbar ist. Einerseits konnten zelluläre Mechanismen aufgedeckt werden, andererseits sind viele neue Fragen für zukünftige Forschungstätigkeiten aufgekommen. Könnte die gesteigerte mTORC1-Aktivität eine veränderte Sensibilität für mTORC1-Inhibitoren mit sich bringen [57]? Die aus dem Takt geratene Autophagie scheint unter gewissen Bedingungen in Seneszenz überzugehen, was ein großes, noch weitestgehend unzureichend verstandenes Feld in der Onkogenese darstellt. Es stellt sich außerdem die Frage, inwieweit die filigrane Regulierung zwischen Autophagie, Seneszenz und Apoptose gelingt [115]. In dieser Arbeit wurde bereits ein vorsichtiger Blick in die Seneszenz geworfen, und auch die Apoptose wurde geringfügig, mittels Caspase 3, untersucht. Es entsteht die Frage, ob hier ein abwechselndes Spiel zwischen Seneszenz und Apoptose dahinterliegen könnte [125]. Womöglich könnte die gesteigerte Seneszenz in U87 RagC-KO, durch Veränderungen des Zellmilieus, einen negativen Beitrag zum Gesamtüberleben leisten [126-128]. Es stellt sich zudem die Frage, ob diese Ergebnisse auf andere Tumorentitäten übertragbar wären. Die in MCF-7 beobachteten Ergebnisse, insbesondere für den Verlust von Map4K3, könnten Hinweise auf einen tumorspezifische Regulationsmechanismen der mTOR-Signalwege geben [129]. Eventuell lassen sich aus den hier gefundenen Ergebnissen künftige Kombinationsmöglichkeiten in der Therapiestrategie bei höhergradigen Gliomen ableiten.

5. Zusammenfassung

Der häufigste maligne Tumor im ZNS ist das Glioblastom. Es zeichnet sich durch seinen aggressiven Charakter mit infiltrativem Zellwachstum sowie hoher Teilungsaktivität aus, was in einer nach wie vor schlechten Prognose resultiert. Es ist bekannt, dass die Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 maßgeblich an der Modulation des mTOR-Signalweges beteiligt sind und somit die Proliferation beeinflussen können. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein Ausschalten der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen zu einer Modulierung des mTOR-Signalwegs führt und zudem eine Proliferationssteigerung verursacht.

Untersuchungen der mRNA an humanen Gliomproben zeigten eine signifikante Mindereexpression von RagC und Map4K3 mit steigendem Malignitätsgrad ($p < 0,001$). Entsprechende Protein-Analysen der humanen Gliome zeigten, bei geringer Probenanzahl, eine signifikante verminderte Expression von RagC nicht aber für Map4K3. Mit diesem Ergebnis wurden in Gliom-Zelllinien (U87, U138) und der Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF-7 als nicht-glialer Vergleich mittels Crispr/Cas gezielt RagC und Map4K3 ausgeschaltet (knockout, KO). Sowohl U87 RagC-KO als auch U87 Map4K3-KO zeigte eine veränderte Morphologie und Motilität. Der Verlust der Aminosäuresensoren RagC oder Map4K3 führte weiterhin zu einer signifikant gesteigerten Proliferation ($p_{\text{RagC, Map4K3}} < 0,001$) in verschiedenen Vitalitäts-Assays (CCK-8, ATP, BrdU, Trypan Blau). Zusätzliche Untersuchungen an U138 und MCF-7-Zellen bestätigten die gesteigerte Proliferation nach Ausschalten von RagC oder Map4K3 (U138: $p_{\text{RagC, Map4K3}} < 0,001$; MCF-7: $p_{\text{RagC}} < 0,001$). Ein induzierter Aminosäuremangel (Leucinentzug) führte nur in U87 Map4K3-KO zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation ($p_{\text{Map4K3}} < 0,001$). Analysen des mTOR-Signalweges in U87 RagC-KO und Map4K3-KO-Zellen zeigten eine gesteigerte Phosphorylierung von p70S6K sowie eine Überexpression von RagD und TFEB, die als möglicher Mechanismus der Proliferationssteigerung wirken könnten. In diesem Zusammenhang kommt es in U87 Map4K3-KO zu einer entkoppelten, übersteigerten Autophagie. Der U87 RagC-KO zeigt hingegen nur eine geringe Autophagie-Induktion, dafür aber ein gesteigertes Seneszenz-Verhalten. Diese Daten zeigen, dass eine verminderte Expression von RagC und Map4K3 direkt den mTOR-Signalweg beeinflusst und relevant zelluläre Mechanismen in Gliomzellen moduliert.

VI. Quellenverzeichnis

1. Wick, W., et al., *Gliome, S2k-Leitlinie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2021.
2. Nobusawa, S., et al., *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6002-7.
3. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Neuro Oncol, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.
4. Stupp R, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p.987-996.
5. Molenaar, R.J., et al., *The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone*. Neuro Oncol, 2014. **16**(9): p. 1263-73.
6. Hart, M.G., et al., *Temozolomide for high grade glioma*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **2013**(4): p. CD007415.
7. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
8. Yang, L.-J., C.-F.U. Zhou, and Z.-X. Lin, *Temozolomide and Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Systematic Review*. Cancer Investigation, 2014. **32**(2): p. 31-36.
9. Herrlinger, U., et al., *Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2019. **393**(10172): p. 678-688.
10. Mellinghoff, I.K., et al., *Vorasidenib in IDH1- or IDH2-Mutant Low-Grade Glioma*. N Engl J Med, 2023. **389**(7): p. 589-601.
11. Gemeinsamer Bundesausschuss. *Behandlung von Glioblastomen mit Tumortherapiefeldern wird verordnungsfähig*. 2020 02 September 2023]; Available from: <https://www.g-ba.de/presse/pressemitteilungen-meldungen/851/>.
12. Stupp, R., et al., *Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2017. **318**(23): p. 2306-2316.
13. Mun, E.J., et al., *Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(2): p. 266-275.

14. Giladi, M., et al., *Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18046.
15. Lowenstein, P.R. and M.G. Castro, *Evolutionary basis of a new gene- and immune-therapeutic approach for the treatment of malignant brain tumors: from mice to clinical trials for glioma patients*. Clinical Immunology, 2018. **189**: p. 43-51.
16. Rolle, C.E., S. Sengupta, and M.S. Lesniak, *Mechanisms of immune evasion by gliomas*. Adv Exp Med Biol, 2012. **746**: p. 53-76.
17. Wang, G. and W. Wang, *Advanced Cell Therapies for Glioblastoma*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 904133.
18. Maggs, L., et al., *CAR T Cell-Based Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 662064.
19. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
20. Kim, D.H., et al., *mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery*. Cell, 2002. **110**(2): p. 163-75.
21. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217-23.
22. Peterson, T.R., et al., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. Cell, 2009. **137**(5): p. 873-86.
23. Hara, K., et al., *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action*. Cell, 2002. **110**(2): p. 177-89.
24. Wang, L., et al., *PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 20036-44.
25. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. 1296-302.
26. Brunn, G.J., et al., *Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin*. Science, 1997. **277**(5322): p. 99-101.
27. Gingras, A.C., et al., *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1422-37.
28. Holz, M.K., et al., *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell, 2005. **123**(4): p. 569-80.

29. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
30. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**(Suppl 2): p. 1542-52.
31. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
32. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
33. Shafei, M.A., M. Harris, and M.E. Conway, *Divergent Metabolic Regulation of Autophagy and mTORC1-Early Events in Alzheimer's Disease?* Front Aging Neurosci, 2017. **9**: p. 173.
34. Grabiner, B.C., et al., *A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity*. Cancer Discov, 2014. **4**(5): p. 554-63.
35. Sato, T., et al., *Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer*. Oncogene, 2010. **29**(18): p. 2746-52.
36. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
37. Arico, S., et al., *The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35243-6.
38. Tato, I., et al., *Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6128-42.
39. Julien, L.A., et al., *mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(4): p. 908-21.
40. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.
41. Corradetti, M.N., et al., *Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome*. Genes Dev, 2004. **18**(13): p. 1533-8.
42. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
43. Garami, A., et al., *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1457-66.

44. Tee, A.R., et al., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. *Curr Biol*, 2003. **13**(15): p. 1259-68.
45. Duan, Y., et al., *The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism*. *Amino Acids*, 2016. **48**(1): p. 41-51.
46. Yanagida, O., et al., *Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1514**(2): p. 291-302.
47. Zhang, Y., et al., *The SLC transporter in nutrient and metabolic sensing, regulation, and drug development*. *J Mol Cell Biol*, 2019. **11**(1): p. 1-13.
48. Han, J.M., et al., *Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway*. *Cell*, 2012. **149**(2): p. 410-24.
49. Budanov, A.V. and M. Karin, *p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling*. *Cell*, 2008. **134**(3): p. 451-60.
50. Parmigiani, A., et al., *Sestrins inhibit mTORC1 kinase activation through the GATOR complex*. *Cell Rep*, 2014. **9**(4): p. 1281-91.
51. Kim, J.S., et al., *Sestrin2 inhibits mTORC1 through modulation of GATOR complexes*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 9502.
52. Valenstein, M.L., et al., *Structure of the nutrient-sensing hub GATOR2*. *Nature*, 2022. **607**(7919): p. 610-616.
53. Jiang, C., et al., *Ring domains are essential for GATOR2-dependent mTORC1 activation*. *Mol Cell*, 2023. **83**(1): p. 74-89.e9.
54. Shen, K., et al., *Architecture of the human GATOR1 and GATOR1-Rag GTPases complexes*. *Nature*, 2018. **556**(7699): p. 64-69.
55. Wolfson, R.L., et al., *KICSTOR recruits GATOR1 to the lysosome and is necessary for nutrients to regulate mTORC1*. *Nature*, 2017. **543**(7645): p. 438-442.
56. Zoncu, R., et al., *mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase*. *Science*, 2011. **334**(6056): p. 678-83.
57. Bar-Peled, L., et al., *A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1*. *Science*, 2013. **340**(6136): p. 1100-6.
58. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. *Science*, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.

59. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
60. Jewell, J.L., R.C. Russell, and K.L. Guan, *Amino acid signalling upstream of mTOR*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(3): p. 133-9.
61. Mossmann, D., S. Park, and M.N. Hall, *mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(12): p. 744-757.
62. Deleyto-Seldas, N. and A. Efeyan, *The mTOR-Autophagy Axis and the Control of Metabolism*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 655731.
63. Martina, J.A. and R. Puertollano, *Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 475-91.
64. Sekiguchi, T., et al., *Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7246-57.
65. Jewell, J.L., et al., *Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine*. Science, 2015. **347**(6218): p. 194-8.
66. Shen, K., A. Choe, and D.M. Sabatini, *Intersubunit Crosstalk in the Rag GTPase Heterodimer Enables mTORC1 to Respond Rapidly to Amino Acid Availability*. Mol Cell, 2017. **68**(3): p. 552-565.e8.
67. Kim, E., et al., *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 935-45.
68. Oshiro, N., J. Rapley, and J. Avruch, *Amino acids activate mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 without changing Rag GTPase guanyl nucleotide charging*. J Biol Chem, 2014. **289**(5): p. 2658-74.
69. Kim, J. and E. Kim, *Rag GTPase in amino acid signaling*. Amino Acids, 2016. **48**(4): p. 915-928.
70. Findlay, G.M., et al., *A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling*. Biochem J, 2007. **403**(1): p. 13-20.
71. Schriever, S.C., et al., *Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(5): p. 824-31.
72. Yan, L., et al., *PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 633-42.
73. Duan, Y., et al., *Key mediators of intracellular amino acids signaling to mTORC1 activation*. Amino Acids, 2015. **47**(5): p. 857-67.

74. Bryk, B., et al., *MAP4K3 regulates body size and metabolism in Drosophila*. *Dev Biol*, 2010. **344**(1): p. 150-7.
75. Resnik-Docampo, M. and J.F. de Celis, *MAP4K3 is a component of the TORC1 signalling complex that modulates cell growth and viability in Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e14528.
76. Kim, J. and K.L. Guan, *Amino acid signaling in TOR activation*. *Annu Rev Biochem*, 2011. **80**: p. 1001-32.
77. Hsu, C.L., et al., *MAP4K3 mediates amino acid-dependent regulation of autophagy via phosphorylation of TFEB*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 942.
78. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 27-42.
79. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. *Nature*, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
80. Ganley, I.G., et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(18): p. 12297-305.
81. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(7): p. 1981-91.
82. Hou, B., et al., *HGF protected against diabetic nephropathy via autophagy-lysosome pathway in podocyte by modulating PI3K/Akt-GSK3 β -TFEB axis*. *Cell Signal*, 2020. **75**: p. 109744.
83. Criollo, A., et al., *Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(5): p. 1029-39.
84. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 and Autophagy*. *Methods Mol Biol*, 2008. **445**: p. 77-88.
85. Palmieri, M., R. Pal, and M. Sardiello, *AKT modulates the autophagy-lysosome pathway via TFEB*. *Cell Cycle*, 2017. **16**(13): p. 1237-1238.
86. Sha, Y., et al., *STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway*. *Embo j*, 2017. **36**(17): p. 2544-2552.
87. Martina, J.A., et al., *MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB*. *Autophagy*, 2012. **8**(6): p. 903-14.
88. Rocznik-Ferguson, A., et al., *The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis*. *Sci Signal*, 2012. **5**(228): p. ra42.

89. Settembre, C., et al., *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB*. *Embo j*, 2012. **31**(5): p. 1095-108.
90. Efeyan, A., et al., *Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival*. *Nature*, 2013. **493**(7434): p. 679-83.
91. Alesi, N., et al., *TSC2 regulates lysosome biogenesis via a non-canonical RAGC and TFEB-dependent mechanism*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 4245.
92. Napolitano, G., et al., *A substrate-specific mTORC1 pathway underlies Birt-Hogg-Dubé syndrome*. *Nature*, 2020. **585**(7826): p. 597-602.
93. Ballabio, A. and J.S. Bonifacino, *Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. **21**(2): p. 101-118.
94. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
95. Chuang, H.C. and T.H. Tan, *MAP4K3/GLK in autoimmune disease, cancer and aging*. *J Biomed Sci*, 2019. **26**(1): p. 82.
96. Okosun, J., et al., *Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma*. *Nat Genet*, 2016. **48**(2): p. 183-8.
97. Reijnders, M.R.F., et al., *De novo missense variants in RRAGC lead to a fatal mTORopathy of early childhood*. *Genet Med*, 2023. **25**(7): p. 100838.
98. Long, P.A., et al., *De novo RRAGC mutation activates mTORC1 signaling in syndromic fetal dilated cardiomyopathy*. *Hum Genet*, 2016. **135**(8): p. 909-917.
99. Ortega-Molina, A., et al., *Oncogenic Rag GTPase signaling enhances B cell activation and drives follicular lymphoma sensitive to pharmacological inhibition of mTOR*. *Nat Metab*, 2019. **1**(8): p. 775-789.
100. Hsu, C.P., et al., *GLK/MAP4K3 overexpression associates with recurrence risk for non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(27): p. 41748-41757.
101. Chuang, H.C., et al., *MAP4K3/GLK Promotes Lung Cancer Metastasis by Phosphorylating and Activating IQGAP1*. *Cancer Res*, 2019. **79**(19): p. 4978-4993.
102. Kim, M., et al., *TFEB Overexpression, Not mTOR Inhibition, Ameliorates RagC(S75Y) Cardiomyopathy*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
103. Mair, D.B., H.M. Ames, and R. Li, *Mechanisms of invasion and motility of high-grade gliomas in the brain*. *Mol Biol Cell*, 2018. **29**(21): p. 2509-2515.
104. Diao, W., et al., *Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 85.

105. Thomanetz, V., et al., *Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology*. J Cell Biol, 2013. **201**(2): p. 293-308.
106. Xie, J. and C.G. Proud, *Crosstalk between mTOR complexes*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(11): p. 1263-5.
107. Lam, D., et al., *MAP4K3 modulates cell death via the post-transcriptional regulation of BH3-only proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11978-83.
108. Chiang, J. and J.A. Martinez-Agosto, *Effects of mTOR Inhibitors on Components of the Salvador-Warts-Hippo Pathway*. Cells, 2012. **1**(4): p. 886-904.
109. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Nutrient sensing: TOR's Ragtime*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 881-3.
110. Di Malta, C., et al., *Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth*. Science, 2017. **356**(6343): p. 1188-1192.
111. Settembre, C., et al., *TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1429-33.
112. Martina, J.A., et al., *The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris*. Sci Signal, 2014. **7**(309): p. ra9.
113. Napolitano, G., et al., *mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3312.
114. Gollwitzer, P., et al., *A Rag GTPase dimer code defines the regulation of mTORC1 by amino acids*. Nat Cell Biol, 2022. **24**(9): p. 1394-1406.
115. Young, A.R., et al., *Autophagy mediates the mitotic senescence transition*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 798-803.
116. Wang, R.C. and B. Levine, *Autophagy in cellular growth control*. FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1417-26.
117. Lanz, M.C., et al., *Increasing cell size remodels the proteome and promotes senescence*. Mol Cell, 2022. **82**(17): p. 3255-3269.e8.
118. Demetriades, C., N. Doumpas, and A.A. Teleman, *Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2*. Cell, 2014. **156**(4): p. 786-99.
119. Figlia, G., et al., *Brain-enriched RagB isoforms regulate the dynamics of mTORC1 activity through GATOR1 inhibition*. Nat Cell Biol, 2022. **24**(9): p. 1407-1421.

120. Dubinsky, A.N., et al., *Let-7 coordinately suppresses components of the amino acid sensing pathway to repress mTORC1 and induce autophagy*. Cell Metab, 2014. **20**(4): p. 626-38.
121. Puertollano, R., et al., *The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization*. Embo j, 2018. **37**(11).
122. Mathiassen, S.G., D. De Zio, and F. Cecconi, *Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 51.
123. Watson, A.S., et al., *Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia*. Cell Death Discov, 2015. **1**: p. 15008-.
124. Levy, J.M.M., C.G. Towers, and A. Thorburn, *Targeting autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(9): p. 528-542.
125. Childs, B.G., et al., *Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?* EMBO Rep, 2014. **15**(11): p. 1139-53.
126. Schmitt, C.A., B. Wang, and M. Demaria, *Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities*. Nat Rev Clin Oncol, 2022. **19**(10): p. 619-636.
127. Zhang, X., et al., *Reprogramming tumour-associated macrophages to outcompete cancer cells*. Nature, 2023. **619**(7970): p. 616-623.
128. Coppé, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
129. Strickland, M. and E.A. Stoll, *Metabolic Reprogramming in Glioma*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 43.

VII. Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Rolle der Aminosäuresensoren RagC und Map4K3 in Gliomen

im Institut für Neuropathologie

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil. C. Mawrin

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 06.12.2023

Julian Kahr

VIII. Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.