

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Prof. Dr. med. G. Wulf)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zum  
Serin- und Glycin-Metabolismus  
und der Phosphoserin-Aminotransferase 1  
in der Modellzelllinie P493-6**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Wilken Harms**

aus

Hoya/Weser

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. R. Dressel

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Ko-Referent: Prof. Dr. med. R. Dressel

Drittreferent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 11.01.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zum Serin- und Glycin-Metabolismus und der Phosphoserin-Aminotransferase 1 in der Modellzelllinie P493-6“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 16.12.23

.....

Wilken Harms

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Lymphome .....	1
1.1.1 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom .....	1
1.2 Signalwege in B-Lymphozyten.....	2
1.2.1 JAK-STAT-Signalweg.....	3
1.2.2 NF- $\kappa$ B-Signalweg .....	3
1.3 Protoonkogen <i>MYC</i> und die Modellzelllinie P493-6 .....	5
1.4 Tumormetabolismus.....	6
1.4.1 Serin- und Glycin-Stoffwechsel.....	7
1.4.2 Glutaminolyse .....	9
1.5 Ziele und Fragestellungen.....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Materialien, Substanzen und Geräte.....	12
2.1.1 Zelllinien .....	12
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien .....	14
2.1.4 Geräte und Apparaturen .....	16
2.1.5 Stimulanzen, Inhibitoren und siRNA .....	17
2.1.6 Antikörper.....	18
2.1.7 Oligonukleotide.....	18
2.1.8 Gebrauchsfertige Kits .....	18
2.1.9 Software .....	18
2.2 Zellkultur .....	19
2.2.1 Kultivierung humaner B-Zellen.....	19
2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität.....	20
2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation unter Nährstoffentzug.....	20
2.2.4 Kultivierung von <i>Drosophila</i> Zellen zur Spike-In Vorbereitung.....	21
2.2.5 Stimulation und Inhibition .....	21
2.2.6 Transfektion von siRNA.....	21
2.2.7 Zellernte mit „Drosophila-Spike-In“ für Genexpressionsanalysen.....	22
2.3 Molekularbiologie .....	22

2.3.1	RNA-Isolation.....	22
2.3.2	Reverse Transkription .....	23
2.3.3	qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR).....	23
2.4	Proteinbiochemie .....	24
2.4.1	Proteinlysate nach siRNA-Transfektion .....	24
2.4.2	SDS-PAGE.....	25
2.4.3	Western Blot.....	25
2.5	Statistische Analysen .....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	Analyse des Einflusses von Serin und Glycin auf die Proliferation der B-Zelllinie P493-6 und verschiedener DLBCL-Zelllinien .....	27
3.1.1	Die Proliferation von IL10+CpG stimulierten P493-6 MYC <sup>low</sup> -Zellen wird durch den Entzug von Serin und Glycin reduziert, besonders unter Bedingungen einer erhöhten Glutaminverfügbarkeit.....	27
3.1.2	Die Proliferation von Karpas 422- und U-2932-R1-Zellen wird durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose reduziert.....	30
3.2	Reduzierte Expression von PSAT1 vermindert die IL10- und CpG-vermittelte Zellproliferation von P493-6 MYC <sup>low</sup> -Zellen vergleichbar zu GOT2, ist aber weder additiv noch synergistisch.....	32
3.3	Reduzierte Expression von PSAT1 und GOT2 hat keinen Einfluss auf die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese.....	34
3.4	Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese in IL10+CpG stimulierten MYC <sup>low</sup> -Zellen maßgeblich abhängig von NF-κB.....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>45</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der IL10-Rezeptor-vermittelte JAK1-STAT3-Signalweg und der TLR9-vermittelte NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	4
Abbildung 2: Die Biosynthese von Serin und Glycin und die Glutaminolyse.....	8
Abbildung 3: Der Entzug von Serin und Glycin hemmt die Proliferation von IL10- und CpG-stimulierten P493-6 MYC <sup>low</sup> -Zellen bei erhöhter Glutaminverfügbarkeit.....	29
Abbildung 4: Die Proliferation von Karpas 422 und U-2932-R1 wird durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose gehemmt.....	31
Abbildung 5: Die IL10- und CpG-vermittelte Proliferation von P493-6 MYC <sup>low</sup> -Zellen ist abhängig von PSAT1 und GOT2.....	33
Abbildung 6: Der Knockdown von GOT2 und PSAT1 hat keinen Effekt auf die Genexpression der weiteren Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese.....	35
Abbildung 7: Die IL10- und CpG-induzierte Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese ist abhängig vom NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	37

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien .....	12
Tabelle 2: Chemikalien .....	12
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	13
Tabelle 4: Fertiglösungen und Puffer .....	14
Tabelle 5: Puffer-Ansätze .....	14
Tabelle 6: Medien .....	15
Tabelle 7: Geräte und Apparaturen.....	16
Tabelle 8: Stimulanzen.....	17
Tabelle 9: Inhibitoren .....	17
Tabelle 10: <i>small interfering</i> RNA (siRNA).....	17
Tabelle 11: Antikörper .....	18
Tabelle 12: Oligonukleotide für qRT-PCR .....	18
Tabelle 13: Kits .....	18
Tabelle 14: Nährstoffkombinationen .....	20
Tabelle 15: cDNA Mastermix .....	23
Tabelle 16: cDNA Thermocycler Programm .....	23
Tabelle 17: qRT PCR Mastermix.....	24

## Abkürzungsverzeichnis

4-IPBA	4-Iodphenylborsäure
ACHP	2-Amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(4-piperidinyl)-3-pyridincarbonitril
Act42A	<i>actin 42A</i> , Genname für Aktin-42A
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF3/4	<i>activating transcription factor 3/4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Ct	<i>cycle threshold</i> , Zyklus-Schwellenwert
DEPC	Diethylcarbonat
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
GLS	Glutaminase
GLUD	Glutamat-Dehydrogenase
GOT2	Aspartat-Aminotransferase (auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase)
GPT	Alanin-Aminotransferase (auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B</i> , NF-kappa-B Inhibitor
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> , I $\kappa$ B-Kinase
IL10	Interleukin-10
IL10R	Interleukin-10-Rezeptor
JAK	Januskinase
MAX	<i>myc-associated factor X</i> , Myc-assoziiertes Faktor X
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>



---

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PHGDH	Phosphoglycerat-Dehydrogenase
PSAT1	Phosphoserin-Aminotransferase 1
PSPH	Phosphoserin-Phosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i> , Radio-Immunpräzipitationsassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SHMT1/2	Serin-Hydroxymethyltransferase 1 (zytosolisch)/2 (mitochondrial)
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYK2	Tyrosinkinase 2

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome stellen eine heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen des lymphatischen Systems dar. Histopathologisch werden dabei Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterschieden. Die NHL wiederum werden abhängig von der zugrundeliegenden lymphozytären Ursprungszelle (*cell of origin*) in B-Zell- sowie T/NK-Zell-Lymphome unterteilt (Jaffe et al. 2017). Im Jahr 2020 lag die Inzidenz der NHL in Westeuropa bei 10,2 pro 100.000 Personen mit einer Mortalität von 2,8 pro 100.000 Personen (Sung et al. 2021). Der Hauptteil von rund 90% entfällt dabei auf die B-Zell-NHL, die ihrerseits diverse Erkrankungen mit unterschiedlicher Malignität umfassen (Armitage et al. 2017). In dieser Arbeit wurde ein Subtyp der aggressiven B-Zell-NHL, das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL), näher betrachtet.

### 1.1.1 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Das DLBCL stellt mit 25 – 45% der Fälle den größten Anteil der NHL dar und ist weltweit das am häufigsten auftretende aggressive Lymphom im Erwachsenenalter (Berndt 2020). Neben einer morphologischen Unterteilung des DLBCL ist insbesondere die molekulare Subklassifikation anhand des Genexpressionsprofils der Ursprungszelle bedeutsam. So werden Subtypen von neoplastische Zellen unterschieden, die reifen B-Zellen des Keimzentrums ähneln (*germinal center B cell like*, GCB) oder vergleichbar mit aktivierten B-Zellen sind (*activated B cell like*, ABC) (Alizadeh et al. 2000). Das GCB-DLBCL ist gegenüber dem ABC-DLBCL mit einer signifikant besseren Prognose verbunden (Scott et al. 2015). Als Erstlinientherapie ist unabhängig vom molekularen Subtyp eine kombinierte Immunchemotherapie nach dem R-CHOP-Protokoll (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) langjährig etabliert (Pfreundschuh et al. 2011; Tilly et al. 2015). Die Hinzunahme des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab hat die Therapie maßgeblich verbessert, dennoch zeigen sich bis zu 40% der Patienten therapierefraktär oder erleben ein Rezidiv (Coiffier et al. 2010; Maurer et al. 2014).

Wie die meisten reifen B-Zell-Lymphome geht das DLBCL aus B-Zellen des Keimzentrums hervor. Hier erfolgt physiologischerseits die Selektion, Differenzierung und Proliferation von B-Lymphozyten im Rahmen der humoralen Immunantwort. Dieser Prozess exponiert B-Zellen gegenüber aberranten Transformationen der fein abgestimmten Genexpression, was schließlich zur Lymphomgenese führen kann (Basso und Dalla-Favera 2015). So lassen sich beim DLBCL häufig Mutationen bzw. Überexpressionen der regulatorischen Gene BCL2 und BCL6 (*B-cell lymphoma 2/6*) sowie insbesondere auch des Transkriptionsfaktors MYC

nachweisen (Sehn und Salles 2021). Eine MYC-Überexpression kann dabei die aggressive und ungehemmte Zellproliferation induzieren (Ott et al. 2013) (siehe Abschnitt 1.3). Doch intrazelluläre genetische Alterationen sind nicht der alleinige Treiber der Lymphomgenese. So spielt auch der Einfluss der Mikroumgebung (*microenvironment*) eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen (Scott und Gascoyne 2014). Die Zellen der Mikroumgebung, bestehend u. a. aus Stroma-, Immun- und Endothelzellen, formen ein komplexes Netzwerk, welches über eine vielschichtige Signalgebung zur Steuerung der B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum beiträgt (De Silva und Klein 2015). Zu den in den B-Zellen aktivierten Signalkaskaden zählen dabei unter anderem der JAK-STAT- sowie der NF- $\kappa$ B-Signalweg, die bei aberranter Aktivierung eine maligne Proliferation fördern (siehe Abschnitt 1.2). Beide Signalwege nehmen etwa durch eine konstitutive Aktivierung im ABC-DLBCL eine zentrale Rolle ein (Davis et al. 2001; Ding et al. 2008; Lam et al. 2008; Scuto et al. 2011). Über eine kooperative JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalgebung konnten auch umfassende Veränderungen des Metabolismus von B-Zellen festgestellt werden (Feist et al. 2018). Der Prozess einer metabolischen Reprogrammierung stellt eines der wesentlichen Merkmale von Tumorzellen dar (Hanahan und Weinberg 2011) (siehe Abschnitt 1.4). Tiefere Kenntnisse zu den JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-vermittelten Veränderungen des Metabolismus von B-Zellen sind daher für ein besseres Verständnis der Genese von B-Zell-Lymphomen wichtig. Dies könnte auch zu neuen Ansatzpunkten in der Entwicklung spezifischer Tumorthérapien des DLBCL und weiterer Lymphomentitäten beitragen.

## 1.2 Signalwege in B-Lymphozyten

Extrazelluläre Stimuli werden von B-Zellen in einem komplexen Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden übersetzt. Die Signalwege nehmen direkten Einfluss auf die Genexpression der Zelle und sind so an der Regulation grundlegender Prozesse wie Proliferation, Apoptose und der Anpassung des Metabolismus beteiligt (Kurosaki et al. 2010; Franchina et al. 2018). Während die Signalgebung unter physiologischen Bedingungen einer strengen Regulation unterliegt, ist ihre Deregulation eines der fundamentalen Merkmale von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2011). Anhand der B-Zelllinie P493-6, welche auch für diese Arbeit verwendet wurde, konnten mit Interleukin-10 (IL10) und CpG zwei Faktoren des Keimzentrums bzw. der Lymphom-Mikroumgebung identifiziert werden, die synergistisch zu einer Aktivierung der Zellproliferation sowie zu Veränderungen im Zellmetabolismus führen. Die Induktion der Zellproliferation durch IL10 und CpG ist dabei vergleichbar zum Effekt einer aberranten Überexpression des Transkriptionsfaktors MYC. Die Faktoren vermitteln ihre Wirkung maßgeblich über die gemeinsame Aktivierung des JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Feist et al. 2017).

### 1.2.1 JAK-STAT-Signalweg

Die Januskinasen (JAK) bilden gemeinsam mit den STAT-Proteinen (*signal transducers and activators of transcription*) einen der zentralen Knotenpunkte der intrazellulären Signalgebung. Die mit den Tyrosinkinassen der JAK-Familie (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2)) assoziierten Rezeptoren können über eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert werden. Dazu zählen diverse Interleukine, wie auch das im Folgenden betrachtete Interleukin-10 (IL10) (Hu et al. 2021).

IL10 wird von verschiedenen Leukozyten auto- oder parakrin sezerniert (Wolk et al. 2002; Sabat et al. 2010). Die Bindung an den IL10-Rezeptor (IL10R) führt über eine Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten zur Aktivierung der JAK1 und TYK2. Nachfolgend kommt es zu einer JAK-vermittelten Phosphorylierung von STAT-Proteinen, welche ihrerseits nach Dimerisierung in den Nukleus gelangen (Pestka et al. 2004; O'Shea et al. 2015) (siehe Abbildung 1). IL10 vermittelt vorrangig die Aktivierung von STAT3, daneben aber auch von STAT1 und STAT5 (Wehinger et al. 1996). Die STAT-Proteine induzieren als Transkriptionsfaktoren die Expression diverser Zielgene und wirken so auf die Regulation zellulärer Vorgänge wie Proliferation und Differenzierung ein (Awasthi et al. 2021). Darüber hinaus sind sie maßgeblich an immunregulativen Prozessen beteiligt (Villarino et al. 2017).

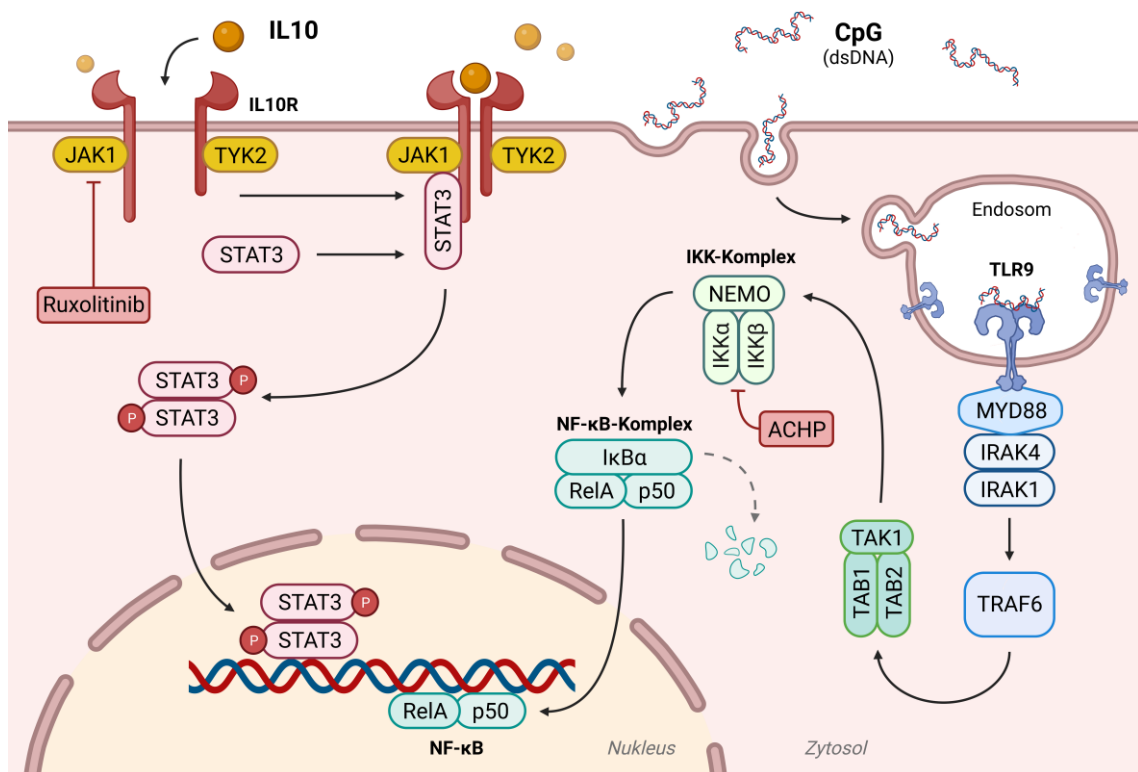
Aberrationen des JAK-STAT-Signalwegs können zur Pathogenese verschiedener Lymphom-entitäten beitragen (Scott und Gandhi 2015). Für das DLBCL konnte beschrieben werden, dass sowohl IL10 als auch der IL10-Rezeptor mitunter signifikant überexprimiert werden und durch eine Autostimulation des JAK1-STAT3-Signalwegs wesentlich zum Überleben und der Proliferation der Lymphomzellen beitragen (Béguelin et al. 2015; Lu et al. 2018). Ein erhöhtes IL10-Level bzw. eine erhöhte STAT3-Expression geht dabei mit einer Verschlechterung der Prognose einher (Lech-Maranda et al. 2006; Wu et al. 2011). Ursächlich kann hier u. a. das Zusammenspiel mit einem ebenfalls aberranten NF- $\kappa$ B-Signalweg sein, der eine Hochregulierung von IL10 induziert (Lam et al. 2008; Ngo et al. 2011).

### 1.2.2 NF- $\kappa$ B-Signalweg

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression hunderter Zielgene und verfügt über die Fähigkeit diverse zelluläre Prozesse zu modifizieren (Zhang et al. 2017). Neben Zellproliferation und Apoptose ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg insbesondere an der Regulation des Immunsystems beteiligt (Hayden und Ghosh 2012). So spielt er auch eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten (Sasaki und Iwai 2015).

NF- $\kappa$ B umfasst eine Familie von insgesamt fünf unterschiedlichen Proteinen. Dazu gehören RelA (p65), RelB, c-Rel sowie NF- $\kappa$ B1 (p50) und NF- $\kappa$ B2 (p52). Diesen gemeinsam ist eine

N-terminale Rel-Homologie-Domäne, welche die Sequenz-spezifische DNA-Bindung vermittelt. Jeweils zwei der Untereinheiten bilden als Homo- oder Heterodimer den funktionalen NF- $\kappa$ B-Komplex. Die Dimere unterliegen einer strengen Regulation und werden durch I $\kappa$ B-Proteine (u. a. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ) oder die Vorläuferproteine von NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 (p105 bzw. p100) inhibiert. In dieser inaktiven Form verbleiben sie im Zytoplasma unstimulierter Zellen (Siebenlist et al. 1994; Hayden und Ghosh 2012). Die Aktivierung des Signalwegs wird über verschiedene Rezeptoren vermittelt, u. a. über B-Zell- und Zytokin-Rezeptoren sowie Toll-like-Rezeptoren (Vallabhapurapu und Karin 2009).



**Abbildung 1: Der IL10-Rezeptor-vermittelte JAK1-STAT3-Signalweg und der TLR9-vermittelte NF- $\kappa$ B-Signalweg.** Die Bindung von IL10 an den **IL10-Rezeptor** (IL10R) führt zu einer Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten IL10R1 und IL10R2, welche mit der Januskinase 1 (JAK1) bzw. Tyrosinkinase 2 (TYK2) assoziiert sind. Hierdurch erfolgt eine Aktivierung und anschließende Transphosphorylierung der JAK1 und TYK2. Über eine nachfolgende Phosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptordomäne wird eine Bindungsstelle für STAT3 geschaffen, welches ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert wird. Die aktivierten STAT3-Proteine bilden Dimere und gelangen so als Transkriptionsfaktor in den Nucleus. Der **endosomale TLR9** wird über repetitive CpG-Motive bakterieller DNA aktiviert, die via Phagozytose in die Zelle aufgenommen wird. Das Adapterprotein MYD88 induziert die Signalkaskade durch Interaktion mit der Proteinkinase IRAK4. Die folgende Phosphorylierung der IRAK1 führt nach Aktivierung von TRAF6 zur Rekrutierung des TAK/TAB-Komplexes. Die TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex, welcher aus den katalytischen Komponenten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO besteht. Der IKK-Komplex führt schließlich zur Degradation der I $\kappa$ B-Inhibitorproteine. In der Folge wird NF- $\kappa$ B (RelA/p50) frei, gelangt in den Nucleus und bindet als Transkriptionsfaktor an diverse Zielgene. Abgebildet sind zudem die in dieser Arbeit eingesetzten **JAK- bzw. IKK-Inhibitoren** (siehe Abschnitt 2.2.5 und 3.4). Ruxolitinib hemmt selektiv JAK1 und JAK2, während ACHP insbesondere IKK $\beta$  sowie auch IKK $\alpha$  inhibiert. IRAK1/4 = interleukin-1 receptor associated kinase 1/4, TRAF6 = tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TAK1 = transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1, TAB2/3 = TAK1 binding protein 2/3, IKK = I $\kappa$ B kinase, NEMO = NF- $\kappa$ B essential modulator.

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind als eine Subklasse der Pattern-Recognition-Rezeptoren zentral an der Pathogenerkennung und Aktivierung der Immunantwort beteiligt. Humane B-Zellen exprimieren eine Reihe von TLR, wobei im Folgenden die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch den TLR9 näher betrachtet wird (Chiron et al. 2008) (siehe Abbildung 1).

Der endosomal lokalisierte TLR9 wird verstärkt in B-Zellen des Keimzentrums exprimiert und durch unmethylierte doppelsträngige DNA mit repetitiven CpG-Motiven aktiviert (Hemmi et al. 2000; Latz et al. 2004; Månsson et al. 2006). Die CpG-Bindung induziert die klassische (kanonische) NF- $\kappa$ B-Signalkaskade über das Adapterprotein MYD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*). Verschiedene Zwischenschritte kumulieren dabei in der Degradation des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$ , sodass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (RelA/p50) frei wird, in den Nukleus gelangt und hier spezifisch an Zielgene binden kann (Ntoufa et al. 2016).

Dysregulationen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs tragen vielfach zur Genese von B-Zell-Lymphomen bei. Zugrunde liegen können dabei verschiedenste Mutationen der Signalkaskade selbst oder auch TLR-vermittelte pro-inflammatorische Einflüsse der Mikroumgebung (Zhang et al. 2017; Isaza-Correa et al. 2014; Sato et al. 2009). Eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist beispielsweise charakteristisch für das ABC-DLBCL (Davis et al. 2001). Unter anderem resultieren Gain-of-Function-Mutationen des *MYD88*-Gens in einer unkontrollierten Signalgebung, die essenziell zum Überleben der Lymphomzellen beiträgt (Ngo et al. 2011). NF- $\kappa$ B nimmt also nicht nur in der normalen Zellphysiologie, sondern auch in malignen Zellen eine zentrale Funktion ein.

### 1.3 Protoonkogen *MYC* und die Modellzelllinie P493-6

Der Transkriptionsfaktor MYC ist über die Expression tausender Zielgene an der Regulation wesentlicher zellulärer Prozesse beteiligt – vom Zellzyklus über die Differenzierung bis zum Metabolismus. Das zugrundeliegende *MYC*-Gen stellt damit eines der potentesten humanen Protoonkogene dar (Eilers und Eisenman 2008; Lourenco et al. 2021). Die Aktivierung von MYC erfolgt durch eine Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein MAX, vermittelt über ein basisches Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Motiv. Der MYC/MAX-Komplex initiiert die Transkription durch Bindung an regulatorische E-box-Sequenzen (Enhancer box) innerhalb der Zielgene (Meyer und Penn 2008; Blackwood und Eisenman 1991; Amati et al. 1993).

Die physiologische MYC-Expression unterliegt dem Einfluss diverser wachstumsregulierender Signalwege sowie komplexen Kontrollmechanismen auf transkriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene (Stine et al. 2015). Eine Dysregulation dieses Netzwerks, etwa durch Translokationen, Genmutationen und -amplifikationen oder eine chronische Aktivierung vorgeschalteter Signalwege, bewirkt eine onkogene Überexpression von

*MYC* (Boxer und Dang 2001; Meyer und Penn 2008). Diese wiederum triggert alle klassischen Kennzeichen einer Tumorzelle, insbesondere eine ungehemmte Zellproliferation und das Zellwachstum. Damit einher geht eine globale Reprogrammierung des zellulären Metabolismus sowie eine gesteigerte Proteinbiosynthese. (Hanahan und Weinberg 2011; Gabay et al. 2014). Zu den metabolischen Anpassungen zählen neben einer erhöhten Nährstoffaufnahme auch die Expressionssteigerung nahezu aller an der aeroben Glykolyse beteiligten Gene sowie die Hochregulation der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese und eine Steigerung der Glutaminolyse (Kim et al. 2004; Wise et al. 2008; Gao et al. 2009; Sun et al. 2015).

Die *MYC*-Dysregulation stellt in vielen Tumorerkrankungen ein wesentliches molekulares Merkmal dar (Gabay et al. 2014). Unter den B-NHL ist eine primär *MYC*-induzierte Genese insbesondere für das Burkitt-Lymphom beschrieben, bedingt durch eine chromosomale Translokation von *MYC* unter die Kontrolle eines Immunglobulin-Locus (Klapproth und Wirth 2010; Boxer und Dang 2001). Daneben wurden auch für das DLBCL verschiedene *MYC*-Alterationen beschrieben (Ott et al. 2013). Eine Überexpression ist dabei mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf assoziiert (Kluk et al. 2012; Schrader et al. 2012; Horn et al. 2013). Der Einfluss einer *MYC*-Dysregulation in B-Lymphozyten wurde vielfach mit der auch in dieser Arbeit eingesetzten humanen B-Zelllinie P493-6 untersucht (Schlosser et al. 2005; Klapproth und Wirth 2010).

Die Modellzelllinie P493-6 verfügt über ein *MYC*-exprimierendes Plasmid, welches über Tetrazyklin reguliert werden kann. In Gegenwart von Tetrazyklin wird die ektopische *MYC*-Expression drastisch reduziert ( $MYC^{low}$ ) und die Zelle arretiert in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus. Unbehandelte P493-6-Zellen zeigen eine *MYC*-Überexpression ( $MYC^{high}$ ) ähnlich wie aggressive Lymphomzellen. Die Zelllinie dient somit als ein Modell für ruhende B-Zellen ( $MYC^{low}$ ) sowie proliferierende *MYC*-transformierte B-Zellen ( $MYC^{high}$ ) mit dem jeweils gleichen genetischen Profil (Schuhmacher et al. 1999; Pajic et al. 2000).

#### 1.4 Tumormetabolismus

Tumorzellen sind durch eine unkontrollierte Proliferation und ungehindertes Wachstum gekennzeichnet. Dieser Fähigkeit liegt neben einer dysregulierten Signalgebung auch eine Reprogrammierung des Zellmetabolismus zugrunde (Hanahan und Weinberg 2011). Zu den zentralen Kennzeichen eines veränderten Metabolismus zählen u. a. eine gesteigerte Aufnahme von Glucose und Aminosäuren, die Adaption kataboler und anaboler Stoffwechselwege sowie die wechselseitige Formung der Tumormikroumgebung, welche das Tumorstadium unterstützt (Pavlova und Thompson 2016). Maligne Zellen begegnen so dem erhöhten Energiebedarf und speisen die Biosynthese diverser Makromoleküle für Zell-

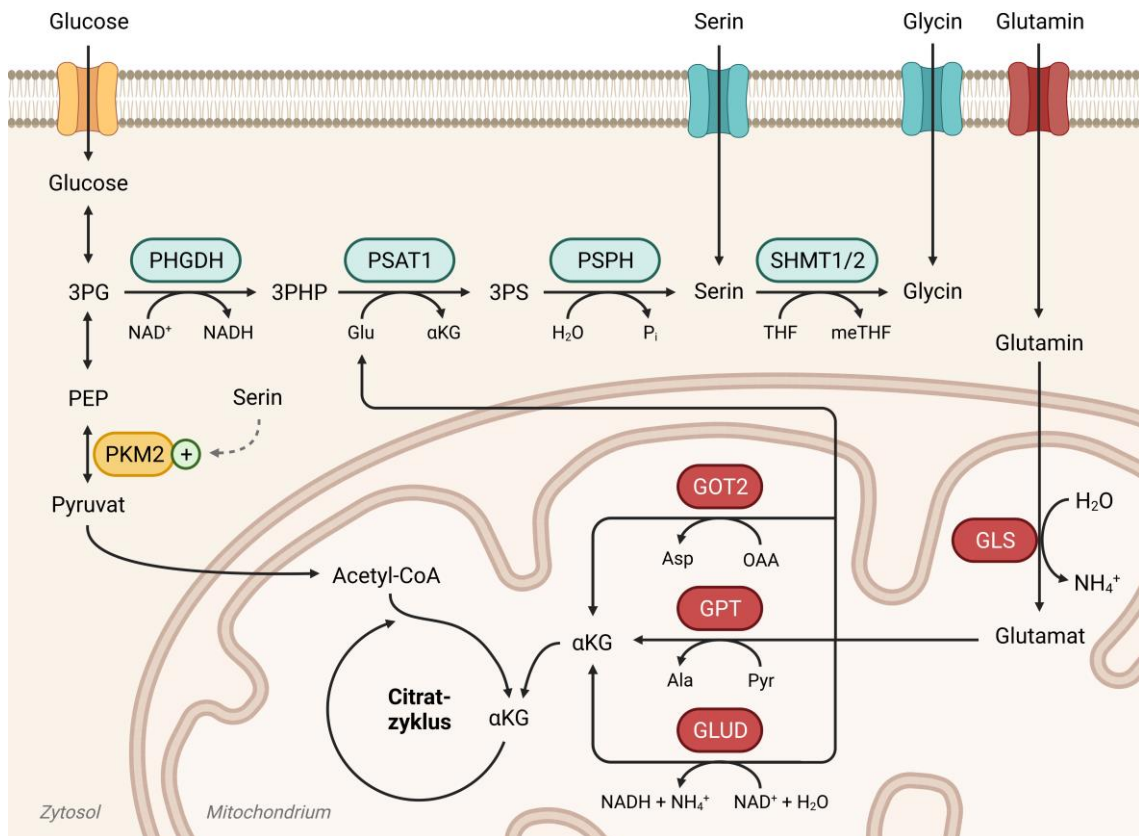
wachstum, Proliferation und die Aufrechterhaltung des Redoxstatus (DeBerardinis und Chandel 2016). Lange bekannt ist das von Otto Warburg beschriebene Phänomen der aeroben Glykolyse, wonach Tumorzellen auch in Gegenwart einer ausreichenden Oxygenierung Glukose bevorzugt zu Laktat umsetzen (Warburg 1956). Angenommen wird, dass dadurch vermehrt Zwischenprodukte der Glykolyse zu Gunsten anaboler Reaktionen umgeleitet werden können, welche wiederum zur raschen Zellproliferation beitragen (Lunt und Van-der Heiden 2011). Neben Glucose ist Glutamin ein wichtiger Metabolit, dessen Stoffwechsel im Tumormetabolismus erheblichen Veränderungen unterliegt (Yang et al. 2017). Dies gilt insbesondere auch für Lymphomzellen, für deren Proliferation sich Glutamin als essenziell erwiesen hat (Altman und Dang 2012; Franchina et al. 2018; Feist et al. 2018). Die Bedeutung zweier weiterer Aminosäuren, Serin und Glycin, für das komplexe metabolische Zusammenspiel ist in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus gerückt und soll im Folgenden ausführlicher betrachtet werden (Mattaini et al. 2016; Geeraerts et al. 2021).

#### 1.4.1 Serin- und Glycin-Stoffwechsel

Die nicht essenziellen Aminosäuren Serin und Glycin sind wichtige Bausteine zahlreicher metabolischer Prozesse (Kalhan und Hanson 2012). In Tumorzellen zeigt sich oftmals eine Steigerung der Serin- und Glycin-Biosynthese als Ausdruck der Adaptation des Zellmetabolismus an die erhöhten Bedürfnisse für Proliferation und Wachstum (Mattaini et al. 2016). Serin kann sowohl von extrazellulär über verschiedene Transporter in die Zelle aufgenommen werden als auch *de-novo* aus Glucose synthetisiert werden. Die Synthese erfolgt dabei ausgehend von 3-Phosphoglycerat (3PG), einem Zwischenprodukt der Glykolyse bzw. Gluconeogenese. 3PG wird über die Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PHGDH) zu 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) oxidiert. Die Phosphoserin-Aminotransferase 1 (PSAT1) katalysiert die Transaminierung von 3PHP in einer Glutamat-abhängigen Reaktion zu 3-Phosphoserin (3PS). Im dritten und letzten Schritt wird 3PS über die Phosphoserin-Phosphatase (PSPH) zu Serin umgesetzt (Ichihara und Greenberg 1955; Snell 1984; Amelio et al. 2014) (siehe Abbildung 2). Als proteinogene Aminosäure ist Serin von wesentlicher Bedeutung für die Proteinsynthese und dient darüber hinaus als wichtiger Baustein für Sphingo- und Phospholipide sowie als Vorstufe für die Aminosäuren Glycin und Cystein. Glycin und Cystein wiederum gehen in die Synthese von Glutathion ein, das als Antioxidans an der Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts mitwirkt (Locasale 2013).

Die Umwandlung von Serin in Glycin erfolgt über die Serin-Hydroxymethyltransferase im Cytosol (SHMT1) oder in den Mitochondrien (SHMT2). Die dabei frei werdende Kohlenstoffeinheit geht gebunden an Tetrahydrofolat (THF) in den 1C-Stoffwechsel (*one carbon metabolism*) ein, welcher sowohl den Folat- als auch den Methioninzyklus umfasst. Serin





**Abbildung 2: Die Biosynthese von Serin und Glycin und die Glutaminolyse.** Serin und Glycin können über verschiedene Transporter aus der Zellumgebung aufgenommen oder *de-novo* aus Glucose synthetisiert werden. Ausgehend von 3-Phosphoglycerat (3PG), einem Zwischenprodukt der Glykolyse, erfolgt die Umwandlung zu 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) durch die PHGDH. Nachfolgend katalysiert die PSAT1 die Glutamat- und Pyridoxal-5-Phosphat-abhängige Reaktion zu 3-Phosphoserin (3PS) und  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG). 3PS wird schließlich über die PSPH zu Serin umgesetzt. Die Synthese von Glycin erfolgt ausgehend von Serin über die SHMT1/2 (cytosolisch/mitochondrial). Die in Tumorzellen verstärkt exprimierte Pyruvatkinase M2 (PKM2) wird über Serin allosterisch aktiviert. Ein Mangel an Serin mindert die Enzymaktivität und glykolytische Zwischenprodukte werden zu Gunsten der Serin-Biosynthese umgeleitet. Glutamin wird im Rahmen der Glutaminolyse über zwei Reaktionsschritte zu  $\alpha$ KG umgesetzt. Zunächst erfolgt über die mitochondriale Glutaminase (GLS) eine Desaminierung zu Glutamat (Glu). Die folgende Umwandlung von Glutamat zu  $\alpha$ KG wird entweder über die Glutamat-Dehydrogenase (GLUD) katalysiert oder über eine der drei folgenden Aminotransferasen: Alanin-Aminotransferase (GPT), Aspartat-Aminotransferase (GOT2) oder die PSAT1. Ala = Alanin, Asp = Aspartat, meTHF = 5,10-Methylen-tetrahydrofolat, NAD<sup>+</sup>/NADH = Nicotinamadenindinukleotid (oxidiert/reduziert), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Ammonium, OAA = Oxalacetat, P<sub>i</sub> = anorganisches Phosphat (*inorganic phosphate*), PEP = Phosphoenolpyruvat, Pyr = Pyruvat, THF = Tetrahydrofolat.

stellt auf diese Weise einen der zentralen Kohlenstofflieferanten für den 1C-Stoffwechsel dar (Davis et al. 2004; Locasale 2013). Der nachgeschaltete Folatstoffwechsel ist essenziell für die *De-novo*-Synthese von Purinen und Thymidin und somit für die Nukleotidsynthese. Daneben dient er zur Regeneration der Cosubstrate NADH, NADPH und ATP (Tedeschi et al. 2013) und trägt an der Schnittstelle zum Methioninzyklus zur Bildung von S-Adenosylmethionin (SAM) bei. SAM stellt nicht nur für Proteine und Lipide einen wichtigen Methylgruppendonor dar, sondern auch für die DNA- und Histon-Methylierung und somit für die

epigenetische Genregulation (Tedeschi et al. 2013; Maddocks et al. 2016). Die klinische Signifikanz des 1C-Stoffwechsels sowie des nachgeschalteten Folatzyklus wird mit Blick auf die seit Jahrzehnten als Chemotherapeutika eingesetzten Folatantagonisten deutlich (Farber et al. 1948; Locasale 2013).

Bei einem erhöhten Serinbedarf der Zelle kann die *De-Novo*-Synthese mitunter durch eine Feedback-Regulation der in hochproliferativen Tumorzellen vermehrt exprimierten glykolytischen Pyruvatkinase M2 (PKM2) gesteigert werden (Chaneton et al. 2012; Ye et al. 2012) (siehe Abbildung 2). Die Expression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese wiederum unterliegt der Regulation durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter bei zellulärem Stress ATF4 (*activating transcription factor 4*) sowie insbesondere auch MYC (Ye et al. 2012; Sun et al. 2015) (siehe Abschnitt 1.3). Mittels der Modellzelllinie P493-6 war in B-Zellen eine Expressionssteigerung der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese durch MYC nachweisbar. In B-Zellen mit verminderter MYC-Expression konnte wiederum eine Expressionssteigerung durch eine Stimulation mit den Faktoren IL10 und CpG beobachtet werden (Feist 2016).

In der Tumorforschung sind Aberrationen des Serin- und Glycin-Stoffwechsels bzw. dessen Regulierung von anhaltendem Interesse (Li und Ye 2020). So konnten bereits in verschiedenen Tumorentitäten Überexpressionen von PHGDH und PSAT1 beschrieben werden, unter anderem auch für das Burkitt-Lymphom (Possemato et al. 2011; Locasale et al. 2011; Jia et al. 2016; Białopiotrowicz et al. 2020). Insgesamt ist die Bedeutung des Serin- und Glycin-Metabolismus speziell für B-Zellen bzw. B-Zell-Lymphome bisher jedoch kaum charakterisiert, sodass detaillierte Untersuchungen für ein besseres Verständnis notwendig sind.

#### 1.4.2 Glutaminolyse

Die hohe Proliferationsaktivität von Tumorzellen geht mit einem erhöhten Glutaminbedarf einher. Viele Tumorzellen weisen daher eine regelrechte Abhängigkeit von Glutamin auf, so auch die B-Zelllinie P493-6 (Wise und Thompson 2010; Feist et al. 2018). Glutamin dient dabei als wichtiges Energiesubstrat (Reitzer et al. 1979; Fan et al. 2013) sowie als Stickstoff- und Kohlenstoffdonor für die Biosynthese diverser Makromoleküle wie Aminosäuren, Nucleotiden, Fettsäuren und Antioxidantien (Hosios et al. 2016; Yang et al. 2017). Im Rahmen der Glutaminolyse wird das Glutamin zunächst über die mitochondriale Glutaminase (GLS) zu Glutamat umgesetzt. Die anschließende Umwandlung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat wird über zwei unterschiedliche Wege katalysiert: entweder über die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase (GLUD) oder über eine Gruppe verschiedener Aminotransferasen. Hierzu zählen neben der Alanin-Aminotransferase (GPT) auch die mitochondriale Aspartat-Aminotransferase (GOT2) sowie die Phosphoserin-Aminotransferase 1 (PSAT1). Die durch diese Enzyme vermittelte Transaminierung ermöglicht die Synthese von nicht essenziellen

Aminosäuren, darunter primär Alanin, Aspartat und Phosphoserin (Moreadith und Lehninger 1984; Altman et al. 2016). Das dabei anfallende  $\alpha$ -Ketoglutarat kann als anaplerotisches Substrat auch in den Citratzyklus eingespeist werden (Le et al. 2012; Altman et al. 2016). Feist et al. konnten aufzeigen, dass die Glutaminolyse essenziell für die Proliferation der B-Zelllinie P493-6 sowie verschiedener Subtypen von B-Zell-Lymphomen ist. Hier nimmt insbesondere die GOT2 eine wesentliche Funktion ein. B-Zellen mit verminderter MYC-Expression (P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen) zeigen nach Stimulation mit den Faktoren IL10 und CpG eine durch STAT3 und NF- $\kappa$ B regulierte Reprogrammierung der Glutaminolyse mit einem Anstieg der GOT2-Expression. Eine aberrante Überexpression von GOT2 stellt zudem ein prognostisch relevantes Merkmal für das DLBCL dar. Die Aminotransferase GPT zeigt sich gegenüber der GOT2 als deutlich weniger relevant für die Proliferation von MYC-deprivierten B-Zellen, während die Rolle der PSAT1 in diesem Kontext noch unbekannt ist (Feist et al. 2018). Die PSAT1 besetzt mit der Glutamat-abhängig katalysierten Bildung von Phosphoserin einen Schnittpunkt der Glutaminolyse mit dem Serin-Stoffwechsel (siehe Abbildung 2). Eine weiterführende Analyse der Bedeutung der PSAT1 für die B-Zell-Proliferation erscheint daher von besonderem Interesse.

## 1.5 Ziele und Fragestellungen

Metabolische Reprogrammierungen wie die Anpassung des Serin- und Glycin-Stoffwechsels stellen ein wesentliches Merkmal von Tumorzellen dar (Mattaini et al. 2016). Die spezifischen Veränderungen des Serin- und Glycin-Metabolismus in B-Zellen respektive B-Zell-Lymphomen sowie die zugrundeliegenden onkogenen Signalwege sind bisher kaum charakterisiert und sollten im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Die dafür eingesetzte B-Zelllinie P493-6 dient mittels einer kontrollierbaren MYC-Expression als Modell für ruhende B-Zellen (MYC<sup>low</sup>) oder proliferierende MYC-transformierte B-Zellen (MYC<sup>high</sup>) (Pajic et al. 2000) (siehe Abschnitt 1.3).

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit gehen aus den im Folgenden zusammengefassten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hervor: Mit IL10 und CpG sind zwei Faktoren der Mikroumgebung von B-Zellen identifiziert worden, die STAT3- und NF- $\kappa$ B-vermittelt zu einer synergistischen Aktivierung der Proliferation von MYC-deprivierten B-Zellen (P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen) führen. Die Zellproliferation ist dabei vergleichbar zu Zellen mit einer aberranten MYC-Überexpression (P493-6 MYC<sup>high</sup>-Zellen) (Feist et al. 2017). Einhergehend zeigt sich in IL10- und CpG-stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen eine globale Steigerung der Expression von Metabolismus-assoziierten Genen. Dies umfasst neben der Glutaminolyse und Glykolyse auch die Enzyme des Serin- und Glycin-Stoffwechsels (Feist 2016). Hinsichtlich der vorbekannten Glutaminabhängigkeit der Proliferation der P493-6-Zellen nimmt insbesondere

die Aspartat-Aminotransferase (*GOT2*) eine zentrale Rolle ein. Die durch einen Entzug von Glutamin zu beobachtende Reduktion der Zellproliferation kann jedoch durch einen Knockdown der *GOT2* nicht gänzlich abgebildet werden. Daher ist anzunehmen, dass weitere Glutamat-verbrauchende Aminotransferasen für die B-Zell-Proliferation eine Rolle spielen könnten. Die *PSAT1* zeigt als eine solche Aminotransferase, ähnlich wie die *GOT2*, eine deutliche Expressionssteigerung sowohl durch eine Stimulation mit IL10 und CpG als auch durch eine *MYC*-Überexpression (Feist 2016).

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war daher, dass die *PSAT1* und somit der Serin- und Glycin-Metabolismus wichtig für die Proliferation der B-Zelllinie P493-6 ist. Entsprechend war es das Ziel der Arbeit zu klären, welchen Einfluss Serin und Glycin auf die IL10- und CpG-induzierte sowie die *MYC*-vermittelte Proliferation von P493-6-Zellen haben und welche Rolle die *PSAT1* dabei erfüllt. Zudem sollte untersucht werden, ob die Genexpression der *PSAT1* und weiterer Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese über den JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert wird. Spezifisch wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Sind Serin und Glycin wichtig für die IL10- und CpG-induzierte Proliferation von P493-6 *MYC*<sup>low</sup>-Zellen bzw. die Proliferation von *MYC*<sup>high</sup>-Zellen? Wie wirkt sich ein Mangel von Serin und Glycin auf P493-6-Zellen und auf ausgewählte DLBCL-Zelllinien aus?
2. Ist die Aminotransferase *PSAT1* für die IL10- und CpG-induzierte Proliferation von P493-6 *MYC*<sup>low</sup>-Zellen wichtig? Verstärkt ein *PSAT1*-Knockdown die Wirkung eines *GOT2*-Knockdowns auf die Zellproliferation?
3. Kommt es bei einer verminderten Expression der *GOT2* oder *PSAT1* zu einer kompensatorischen Expressionssteigerung weiterer Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese?
4. Wird die IL10- und CpG-induzierte Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese über den JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden IL10- und CpG-stimulierte P493-6 *MYC*<sup>low</sup>-Zellen (aktivierte, proliferierende B-Zellen) und *MYC*<sup>high</sup>-Zellen (proliferierende *MYC*-transformierte B-Zellen) unter Entzug von Serin und Glycin kultiviert. Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen zur Zellproliferation und Genexpression nach Knockdown von *PSAT1* und *GOT2*. Der Einfluss des JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die Enzymexpression der Serin- und Glycin-Biosynthese wurde durch eine entsprechende Inhibition dieser Signalwege weiterführend analysiert.

## 2 Material und Methoden

Die für diese Arbeit verwendeten Materialien, Substanzen und Geräte sowie die eingesetzte Software werden im folgenden Materialteil (2.1) aufgelistet. Im Methodenteil (2.2-2.5) werden sowohl die zell- und molekularbiologischen sowie proteinanalytischen Verfahren als auch die statistischen Methoden zur Datenanalyse beschrieben.

### 2.1 Materialien, Substanzen und Geräte

#### 2.1.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 1 genannten Zelllinien eingesetzt.

**Tabelle 1: Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Distributor	Referenz
P493-6	<i>Homo sapiens</i> B-lymphoblastoide Zelllinie mit Tetrazyklin-reguliertem <i>MYC</i> -Gen	Bornkamm, München DE	(Schuhmacher et al. 1999)
Karpas 422	<i>Homo sapiens</i> Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom	DSMZ, Braun- schweig DE	(Dyer et al. 1990)
U-2932-R1	<i>Homo sapiens</i> Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom	DSMZ, Braun- schweig DE	(Amini et al. 2002)
Schneider (S)-2	<i>Drosophila melanogaster</i> späte Embryonalzelle	DSMZ, Braun- schweig DE	(Schneider 1972)

#### 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind jeweils in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 2: Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
4-Iodphenylborsäure (4-IPBA)	Sigma-Aldrich, München DE
Acrylamid/Bisacrylamid 40%	BioRad, München DE
Agarose	Sigma-Aldrich, München DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad, München DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg DE
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München DE
DEPC-Wasser, DNase-/RNase-frei	Roth, Karlsruhe DE
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	PrimeTech ALC, Minsk BY

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München DE
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, München DE
Ethanol (100%)	J.T. Baker, Deventer NL
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze DE
Fetales Kälberserum (FBS)	Merck, Darmstadt DE
Full Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare, München DE
Glucose	Sigma-Aldrich, München DE
Glycin	Lonza, Basel CH
Hot FIREpol DNA-Polymerase	Solis BioDyne, Tartu EE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München DE
L-Glutamin	Biochrom/Merck, Berlin DE
L-Serin	Lonza, Basel CH
Luminol	Sigma-Aldrich, München DE
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Solis BioDyne, Tartu EE
Methanol	J.T. Baker, Deventer NL
Milchpulver	Roth, Karlsruhe DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt DE
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt DE
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München DE
NP-40 (Nonidet P-40)	Sigma-Aldrich, München DE
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Basel CH
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München DE
RPMI-1640	Lonza, Basel CH
RPMI-1640 w/o Glucose, Glycin, Serin	Teknova, Hollister, CA, USA
Salzsäure (HCL) 37%	Merck, Darmstadt DE
SYBR Green I Gelfarbstoff	Merck, Darmstadt DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München DE
Trehalose Dihydrat	Roth, Karlsruhe DE
Trisbase	Sigma-Aldrich, München DE
Triton X-100	Roth, Karlsruhe DE
Trypanblau 0,4% in PBS	Life Technologies, Eggenstein DE
Tween-20	Merck, Darmstadt DE
Wasser HPLC-Qualität	Merck, Darmstadt DE
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München DE

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
384-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Combitips advanced 0,1 ml	Eppendorf, Hamburg DE
Cryobox	Nunc, Wiesbaden DE

Cryotubes	Nunc, Wiesbaden DE
Deckgläser	Menzel, Braunschweig DE
Elektroporationsküvette	BioRad, München DE
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht DE
Filter Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht DE
Glaspipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim DE
Immobilon PVDF Membran	Merck, Darmstadt DE
Micro-Touch Nitrile Handschuhe	Ansell, München DE
Optical Adhesive Cover (Folie)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht DE
Pipettenspitzen (mit/ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht DE
Reaktionsgefäß (0.5, 1.0, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht DE
Whatman-Filterpapier (Diethylaminoethyl-cellulose)	GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA
Zellkultur Multiwell Platten Cellstar (6-, 12-, 24-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster AT
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht DE
Zellkulturplatten 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht DE

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Gebrauchsfertige Puffer und Lösungen, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 4 genannt. Weitere Puffer-Ansätze sowie die eingesetzten Zellkulturmedien werden in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 4: Fertiglösungen und Puffer**

Lösung	Hersteller
HEPES Puffer	Millipore, Schwalbach am Taunus DE
PBS pH 7,4 (für Zellkultur)	Lonza, Verviers BE
Reblot Plus Mild Antibody Stripping Solution (10x)	Millipore, Schwalbach am Taunus DE
Roti-Load (4x Ladepuffer)	Roth, Karlsruhe DE

**Tabelle 5: Puffer-Ansätze**

Puffer	Ansatz
RIPA Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,4 0,1% SDS 1% NP-40 0,25% Natriumdesoxycholat
Laufpuffer (1x):	25 mM Tris 192 mM Glycin 34,67 mM SDS

Transferpuffer (1x):	25 mM Tris 192 mM Glycin 15% Methanol
Trenngel 10%	250 mM Tris pH 8,8 25% Acrylamid/Bis-Lösung (40%) 50% H <sub>2</sub> O 0,0004% APS 0,00125% TEMED
Sammelgel 5%	250 mM Tris pH 6,8 12,5% Acrylamid/Bis-Lösung (40%) 62,6% H <sub>2</sub> O 0,0004% APS 0,00125% TEMED
TBS (1x)	20 mM Tris 137 mM Natriumchlorid eingestellt auf pH 7,6
TBS-T	1x TBS 0,1% Tween-20
Chemilumineszenz-Lösung (ECL) I	100 mM Tris/HCl pH 8.8 2,5 mM Luminol 4 mM 4-IPBA
Chemilumineszenz-Lösung (ECL) II	100 mM Tris/HCl pH 8.8 5,3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PCR Puffer (10x)	750 mM Tris pH 8,8 200 mM Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% Tween-20 in DEPC-Wasser
SYBR-Green-Mix	1x PCR Puffer 3 mM MgCl <sub>2</sub> 1:80.000 SyberGreen jeweils 0,2 mM dNTP 20 U/ml Hot FIREpol DNA-Polymerase 0,25% Triton X-100 0,5 mM Trehalose in DEPC-Wasser
Blockpuffer I	5% BSA in TBS-T 0,1%
Blockpuffer II	5% Milchsäure in TBS-T 0,1%

**Tabelle 6: Medien**

Medium	Ansatz/Hersteller
<i>Drosophila</i> Medium	Schneiders <i>Drosophila</i> Medium (Gibco) 10% FBS (Gibco) 200 U/ml Penicillin & 200 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium (Humanzellen)	90% FBS (Gibco) 10% DMSO



Einfriermedium ( <i>Drosophila</i> )	45% FBS (Gibco) 45% konditioniertes <i>Drosophila</i> Medium 10% DMSO
Zellkulturmedium I	RPMI-1640 (Lonza) 10% FBS (Gibco) 200 U/ml Penicillin & 200 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium II (ohne Glucose, Glycin, Serin)	RPMI-1640 ohne Glucose, Glycin, Serin (Teknova) 10% FBS (Gibco) 200 U/ml Penicillin & 200 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium III (Transfektionsmedium)	RPMI-1640 (Lonza) 1 mM Pyruvat 10 mM HEPES

#### 2.1.4 Geräte und Apparaturen

Die eingesetzten Geräte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Geräte und Apparaturen**

Gerät	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Accu-Jet Pipettierhilfe	Brand, Hamburg DE
Biofuge Pico Mikroliterzentrifuge	Heraeus, Hanau DE
Biofuge Primo R Zentrifuge	Heraeus, Hanau DE
Bioruptor Standard Sonication Device	Diagenode Inc., Denville, NJ, USA
CAT RM 5 Rollenmischer	CAT M Zipperer GmbH, Staufen DE
Centrifuge 5451D	Eppendorf, Hamburg DE
Consort E734 Netzgerät	Schütt Labortechnik, Göttingen DE
Elektrophoresekammer und Tankblot-System	Bio-Rad GmbH, München DE
Heraeus Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HeraFreeze -80°C Gefrierschrank	Heraeus, Hanau DE
IKA KS 260 Orbitalschüttler	IKA-Werke GmbH, Staufen DE
IKAMAG RCT Magnetrührer	IKA-Werke GmbH, Staufen DE
Incudrive Inkubator	Schütt Labortechnik, Göttingen DE
Inkubator Cytoperm	Heraeus, Hanau DE
Inverses Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Jena DE
LAS-4000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm, Düsseldorf DE
Microcool Centrifuge 1-15k	Sigma, München DE
Microflow Laminar Downflow Werkbank	Bioquell, GB
Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau DE

Multipette plus	Eppendorf, Hamburg DE
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer Improved	Lo-Laboroptik, Friedrichsdorf DE
Nucleofector II	Lonza, Basel CH
Power Pac 300 Netzgerät	Bio-Rad, München DE
Thermocycler 60	Biomed, Theres DE
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg DE
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen DE
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg DE
Vortex Genie 2	Schütt Labortechnik, Göttingen DE
Waage L2200 S	Sartorius AG, Göttingen DE
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Hänigsen DE

### 2.1.5 Stimulanzen, Inhibitoren und siRNA

Die Zellen wurden gemäß den Versuchsbeschreibungen unter Zugabe von IL10 und CpG stimuliert (Tabelle 8) bzw. mit dem in Tabelle 9 genannten IKK- oder JAK-Inhibitor behandelt. Die verwendeten *small interfering* RNAs (siRNA) sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 8: Stimulanzen**

Stimulanz	Konzentration	Hersteller
rekombinantes humanes IL10	5 ng/ml	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Klasse B CpG-Oligonukleotid (ODN2006)	0,1 µM	InvivoGen, San Diego, CA, USA

**Tabelle 9: Inhibitoren**

Inhibitor	Konzentration	Hersteller
IKK2 Inhibitor VIII (ACHP)	7 µM	Calbiochem/Merck, Darmstadt DE
Ruxolitinib	1 µM	Selleckchem, München DE

**Tabelle 10: *small interfering* RNA (siRNA)**

siRNA	Konzentration	Hersteller
<i>Scrambled</i> siRNA (Ambion Silencer Select Negative Control No. 1)	0,5 µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>PSAT1</i> (Ambion Silencer Select)	0,5 µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>GOT2</i> (SMARTpool: ON-TARGETplus)	0,5 µg/µl	Dharmacon, Lafayette, CO, USA

### 2.1.6 Antikörper

Die beim Western Blot eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Antikörper**

Antikörper	Konzentration	Hersteller
anti-Tubulin, mouse	1:5.000 in 5% BSA	Millipore, Schwalbach DE
anti-PSAT1, rabbit	1:1.000 in 5% BSA	Proteintech, Chicago, IL, USA
anti-GOT2, rabbit	1:5.000 in 5% Milch	Proteintech, Chicago, IL, USA
anti-rabbit IgG-HRP, goat	1:2.000 in 5% BSA	Santa Cruz, Heidelberg DE
anti-mouse IgG-HRP, goat	1:2.000 in 5% BSA	Santa Cruz, Heidelberg DE

### 2.1.7 Oligonukleotide

In Tabelle 12 sind die für die qRT-PCR eingesetzten Primer aufgelistet.

**Tabelle 12: Oligonukleotide für qRT-PCR**

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')
<i>Act42A</i>	CTAAGCAGTAGTCGGGCTGG	GTCTGCAATGGGTGTGTTCG
<i>GOT2</i>	GATGCTGGCATGCAGCTACAA	TCCACAGCGCCTGTGAAGTC
<i>PHGDH</i>	CAGGATTGGGAGAGAGGTAGCTACC	GCAGCTGCTGAACACCAAAGG
<i>PSAT1</i>	TCCAAGCCAGTGGATGTTTCC	AGCAGAGCCAACATTCTTCTGG
<i>PSPH</i>	GCAGGTGCAGAGACTCATAGCAG	GCTCCTGTAGGCGACTTACCAG
<i>SHMT1</i>	GATACTGGCTACATCAACTATGACCAGC	CTCATCTGCAATCTTCCGTAGCC
<i>SHMT2</i>	CTAGAGCTTGTATCCATCACTGCCA	AGTCATCCTCACGGAAGTGTCCG
<b>Konzentration:</b> 0,1 nmol/µl		<b>Hersteller:</b> IBA Lifesciences GmbH, Göttingen DE

### 2.1.8 Gebrauchsfertige Kits

Die für die Versuchsdurchführung eingesetzten gebrauchsfertigen Reagenz-Kits sind in Tabelle 13 genannt.

**Tabelle 13: Kits**

Kit	Hersteller
Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza, Basel CH
NucleoSpin RNA II Isolation Kit	Machery-Nagel, Düren DE
Superscript II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe DE

### 2.1.9 Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2016 geschrieben. Zur Literaturverwaltung wurde Citavi (Version 6.6.0.0) verwendet. Die initiale Datenverwaltung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2016. Die statistische Datenanalyse sowie Erstellung von Grafiken wurde mit GraphPad Prism 7.04 durchgeführt. Zur quantitativen Auswertung von

Western Blots wurde ImageJ (Version 1.53k) genutzt. Die zugehörigen Abbildungen wurden mittels Microsoft Office PowerPoint 2016 angefertigt. Zur Auswertung der real-time PCR wurde das Sequence Detection System (SDS 2.4) sowie der RQ Manager 1.2.1 von Applied Biosystems verwendet. Die Schaubilder wurden mit den online verfügbaren Grafikelementen von BioRender erstellt ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Kultivierung humaner B-Zellen

Die für diese Studie verwendeten humanen B-Zelllinien P493-6, Karpas 422 und U-2932-R1 wurden in RPMI-1640 Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem Medium wurden jeweils 10% FBS sowie Penicillin/Streptomycin zugesetzt (Zellkulturmedium I, Tabelle 6). Die Zellkultur wurde dreimal wöchentlich gesplittet, um die Zelldichte zwischen 0,5·10<sup>6</sup> bis 1,5·10<sup>6</sup> Zellen/ml zu halten. Hierfür wurden die Zellen gezählt, die gewünschte Zahl entnommen und zentrifugiert (100 g, 5 min bei RT). Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine frische Zellkulturflasche überführt.

Einen Tag vor Durchführung der Experimente wurden die Zellreihen jeweils in frischem Medium auf eine Konzentration von 1·10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Um in den P493-6-Zellen eine verminderte *MYC*-Expression (*MYC*<sup>low</sup>) zu erreichen, wurden diese 24 Stunden vor Versuchsdurchführung sowie zu Versuchsbeginn mit Doxycyclin (1 ng/ml) behandelt. Bei Kultivierung ohne Zugabe von Doxycyclin erfolgte entsprechend eine *MYC*-Überexpression (*MYC*<sup>high</sup>).

Für eine Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (250 g, 5 min bei RT) und in Gefriermedium in einer Konzentration von 5·10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von je 1 ml pro Cryotube in einer Gefrierbox mit Isopropanol langsam auf -80°C heruntergekühlt und ab dem Folgetag bei -150°C gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut. Ein Auswaschen des Gefriermediums erfolgte durch Zugabe von 5 ml erwärmtem Medium und anschließender Zentrifugation der Zellen. Das Zellpellet wurde zur Aussaat in frischem Medium resuspendiert (1·10<sup>6</sup> Zellen/ml) und im Inkubator bei 37°C gelagert. Vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen mindestens drei Tage in Kultur gehalten.

### 2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Die Bestimmung der Zellzahlen sowie der Viabilität erfolgte mittels eines Hämocytometers (*Neubauer* Zählkammer) unter Färbung mit Trypanblau. Dafür wurde eine Probe der Zellsuspension von 10-20  $\mu\text{l}$  entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau durchdringt nur die Zellmembran toter bzw. geschädigter Zellen, färbt diese entsprechend blau an und erlaubt so eine mikroskopische Bestimmung der Anzahl abgestorbener Zellen. Die Zellviabilität ergibt sich aus dem Verhältnis von lebenden zu toten Zellen. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden bei allen Versuchsreihen jeweils zwei Proben ausgezählt und der entsprechende Mittelwert bestimmt.

### 2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation unter Nährstoffentzug

Für eine Analyse der Proliferation bei unterschiedlichem Nährstoffangebot wurden die Zellreihen P493-6, Karpas 422 und U-2932-R1 für 24 bis 48 Stunden in unterschiedlich konstituierten Medien kultiviert. Die Zellen wurden dafür zu Versuchsbeginn in das Zellkulturmedium II (Tabelle 6) überführt, welches weder Glucose noch Serin oder Glycin enthielt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellen wurden in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Dem Medium wurden anschließend Glucose, Serin und Glycin in unterschiedlichen Kombinationen hinzugefügt. Die dabei eingesetzten Konzentrationen wurden entsprechend der gebräuchlichen Formulierung von RPMI-1640-Medium gewählt (Moore et al. 1967). Zusätzlich zu dem im Medium II bereits enthaltenen Glutamin (0,3 g/L) wurde einem Teil der Proben additiv Glutamin zugesetzt (insgesamt 0,6 g/L). Die unterschiedlichen Nährstoffkombinationen sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Die Stimulation von P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen mit IL10 und CpG erfolgte zu Versuchsbeginn sowie ggf. erneut nach 24 Stunden (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Zellzahl wurde je nach Versuchsansatz nach 24 oder 48 Stunden mittels eines Hämocytometers bestimmt.

**Tabelle 14: Nährstoffkombinationen**

Metabolit	Konzentration		Medium II (ohne Glc, Ser, Gly) mit:							
			+	-	+	-	+	-	+	-
Serin	285 $\mu\text{M}$	0,03 g/L	+	-	+	-	+	-	+	-
Glycin	133 $\mu\text{M}$	0,01 g/L	+	-	+	-	+	-	+	-
Glucose	11 mM	2g/L	+	+	-	-	+	+	-	-
Glutamin	2/4 mM	0,3/0,6 g/L	+	+	+	+	++	++	++	++

#### 2.2.4 Kultivierung von *Drosophila* Zellen zur Spike-In Vorbereitung

Vor Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR erfolgte ein Spike-In von Schneider-2 (S2) Zellen, einer Zelllinie der *Drosophila melanogaster* (siehe Abschnitt 2.2.7). Die Zellen wurden in *Drosophila* Medium (Tabelle 6) in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml ausgesät und bei Raumtemperatur in Kultur gehalten. Ein- bis zweimal wöchentlich erfolgte ein Splitting, um die Kultur beständig unter einer Zellzahl von  $20 \cdot 10^6$  Zellen/ml zu halten.

Zur Zellernte in Vorbereitung des Spike-In wurde die Zellzahl mittels eines Hämocytometers unter Färbung mit Trypanblau bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2). Nach einer Zentrifugation (300 g, 7 min bei RT) wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in *Drosophila* Gefriermedium resuspendiert und schließlich jeweils 1 ml in Cryotubes aliquotiert und bei  $-150^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.5 Stimulation und Inhibition

Vor der Behandlung mit Stimulanzien bzw. Inhibitoren (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9) wurden P493-6-Zellen auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in frisches Medium überführt. Zur Stimulation wurden die Zellen mit rekombinantem humanem IL10 oder dem Oligonukleotid CpG (ODN 2006) oder der Kombination beider Faktoren zugleich behandelt. IL10 wurde in einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt und CpG mit  $0,5 \mu\text{M}$ . Im Rahmen der Experimente erfolgte eine Stimulation für 24 bis 48 Stunden. Transfizierte Zellen wurden erstmals 24 Stunden nach der Transfektion behandelt.

Für eine Inhibition der durch IL10 bzw. CpG aktivierten Signalkaskaden erfolgte der Einsatz von Ruxolitinib (JAK-Inhibitor,  $1 \mu\text{M}$ ) bzw. ACHP (IKK-2-Inhibitor,  $7 \mu\text{M}$ ). Die nachfolgende Stimulation mit IL10 und CpG wurde drei Stunden nach der Inhibitor-Behandlung vorgenommen. Die Zellernte für die anschließende Genexpressionsanalyse erfolgte nach 24 Stunden (siehe Abschnitt 2.2.7).

#### 2.2.6 Transfektion von siRNA

Die Funktionsuntersuchung spezifischer Gene erfolgte über das Einbringen von *small interfering* RNA (siRNA). Durch komplementäre Bindung der siRNA an einzelsträngige RNA-Abschnitte wird dabei die Expression des Zielgens unterdrückt (Gen-Knockdown). Die Transfektion der siRNA wurde per Elektroporation mit dem Amaxa Nucleofector System (Lonza) durchgeführt (analog zum Protokoll für Ramos-Zellen). Dabei wurde das Nucleofector Kit V gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers verwendet.

Unbehandelte P493-6-Zellen im MYC<sup>high</sup>-Zustand wurden 24 Stunden vor Versuchsdurchführung auf eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Am Versuchstag wurden jeweils  $4 \cdot 10^6$  Zellen pro Transfektion eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert (10 min, 650 rpm bei RT) und in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Nucleofectorlösung resuspendiert. Pro Probe wurden

jeweils 4  $\mu\text{g}$  siRNA (Tabelle 10) hinzugegeben. Die Transfektion erfolgte anschließend mit dem Elektroporationssystem Nucleofector II (Lonza) unter der Programmeinstellung C-009. Die transfizierten Zellen wurden nachfolgend in jeweils 2 ml des vorbereiteten Zellkulturmediums III (Transfektionsmediums; Tabelle 6) überführt und bei 37°C inkubiert. Nach drei Stunden wurden erneut jeweils 2 ml Medium hinzugegeben. Zudem erfolgte nun die Behandlung mit Doxycyclin (4  $\mu\text{l}$ ) zum Erreichen des MYC<sup>low</sup>-Zustandes. Alle nachfolgenden Versuche wurden 24 Stunden nach dem Gen-Knockdown durchgeführt.

### 2.2.7 Zellernte mit „Drosophila-Spike-In“ für Genexpressionsanalysen

Im Rahmen der Zellernte für die weiterführenden Genexpressionsanalysen erfolgte ein Spike-In von zuvor vorbereiteten *Drosophila* S2-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.4). Der Spike-In erlaubt eine Berücksichtigung von MYC-assoziierten Variationen der Genexpression (Taruttis et al. 2017). Die Bestimmung der Expression des Haushaltsgens *Act42A* der *Drosophila*-Zellen dient dabei als endogene Kontrolle zur Normierung der analysierten RNA-Proben. P493-6-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in einer Konzentration von 0,5 bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml auf einer 24-Well-Platte in Medium I ausgesät. Es folgte die Stimulation mit IL10 und CpG und anschließend eine 24-stündige Inkubation bei 37°C. Nach erneuter Zellzählung wurden jeweils 0,5 bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen geerntet. Die kryokonservierten S2-Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und rasch resuspendiert. Anschließend wurden pro  $1 \cdot 10^6$  geernteter Zellen jeweils  $1 \cdot 10^5$  S2-Zellen direkt zu den humanen P493-6-Zellen gegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (900 g, 5 min bei 4°C), mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und als Trockenpellet bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert.

## 2.3 Molekularbiologie

### 2.3.1 RNA-Isolation

Die Extraktion von RNA erfolgte aus Zellen, welche 48 Stunden zuvor transfiziert worden waren. Dafür wurden jeweils 0,5- $1 \cdot 10^6$  Zellen geerntet (siehe Abschnitt 2.2.7). Die Aufbereitung der Proben erfolgte mit dem Isolations-Kit NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel) gemäß dem Herstellerprotokoll. Die nach Zelllyse und Filtration an eine Silikatmembran gebundene RNA wurde dabei durch den Zusatz von DNase von der ebenfalls isolierten DNA getrennt. Hierauf folgten mehrere Waschschrte zur Überführung der RNA in einen hochreinen Zustand. Anschließend wurde die isolierte RNA in 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung sowie eine Prüfung der Reinheit der RNA erfolgte abschließend mittels eines Spektralphotometers (NanoDrop 1000).

### 2.3.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der extrahierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde mit dem gebrauchsfertigen Kit SuperScript II (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt und zu 2 µl eines Random-Hexamer-Primers hinzugegeben. Es folgte die Denaturierung im Thermocycler bei 70°C für zehn Minuten. Anschließend wurden 8 µl Mastermix (Tabelle 15) einschließlich der reversen Transkriptase hinzugegeben und die Probe zur Bindung der Primer auf Eis abgekühlt. Die Transkription wurde schließlich im Thermocycler nach dem in Tabelle 16 angegebenen Programm durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

**Tabelle 15: cDNA Mastermix**

Substanz	Menge
5x First-strand buffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
SuperScript II RT	1 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl

**Tabelle 16: cDNA Thermocycler Programm**

Zykluslänge	Temperatur
10 min	25°C
60 min	42°C
10 min	65°C
Pause	4°C

### 2.3.3 qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR)

Die quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels Real-Time PCR. Dieses Verfahren erlaubt es, die Polymerase-Kettenreaktion über Anreicherung eines Fluoreszenzsignals während des Thermocyclings in Echtzeit zu verfolgen. Der hier eingesetzte Cyanin-Farbstoff SYBR-Green interkaliert mit den amplifizierten doppelsträngigen DNA-Abschnitten. Die Zunahme des detektierten Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts und ermöglicht somit eine relative Quantifizierung der vervielfältigten DNA.

Alle Proben wurden jeweils in Triplets auf eine 384-Well-Platte aufgetragen. In ein Well wurden 10 µl des Reaktionsgemisches gegeben, bestehend aus 10 ng (2 µl) der zuvor synthetisierten cDNA sowie dem Mastermix mit SYBR-Green und dem entsprechenden Primerpaar (siehe Tabelle 17). Die für die PCR essenzielle hitzestabile Taq-Polymerase sowie die dNTP waren im SYBR-Green-Mix enthalten (siehe Tabelle 5). Als Negativkontrolle wurden Proben mit sterilem Wasser anstatt cDNA aufgetragen. Die qRT-PCR wurde schließlich mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Da die Quantifizierung über SYBR-Green nur eine geringe Spezifität aufweist, wurde nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Spezifität der Amplifikate durchgeführt.

Die Datenanalyse erfolgte über die Software SDS 2.4 und RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde dabei mittels der



vergleichenden Ct-Methode ermittelt. Der Ct-Wert (cycle threshold) gibt die minimale Zyklenzahl an, bei der die Fluoreszenzintensität einen zuvor festgelegten Schwellenwert überschreitet und die Amplifikation erstmals detektiert wird. Als endogene Kontrolle diente die Expression von *Act42A*, einem Aktin-Gen der *Drosophila melanogaster*. Dieser Vergleich war möglich, da bei der Zellernte für die RNA-Isolation ein Spike-In mit *Drosophila* S2-Zellen erfolgt war (siehe Abschnitt 2.2.7).

Um technische Abweichungen zwischen den Proben auszugleichen, erfolgte zunächst die Normalisierung auf das (Spike-In) Haushaltsgen *Act42A* durch Subtraktion der Ct-Werte ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}}$ ). Anschließend wurde der Expressionsunterschied zwischen den behandelten Proben und der unbehandelten Kontrolle ermittelt ( $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Behandlung}} - Ct_{\text{Kontrolle}}$ ). Die relative Quantifizierung (RQ) wurde schließlich anhand der Formel  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  berechnet und als Mittelwert dargestellt. Sie gibt die Veränderung der Genexpression im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle wieder.

**Tabelle 17: qRT PCR Mastermix**

<b>Substanz</b>	<b>Menge pro Well</b>
SYBR Green Mix	5,6 $\mu\text{l}$
Primer forward (10 $\mu\text{M}$ )	0,3 $\mu\text{l}$ (3 pmol)
Primer reverse (10 $\mu\text{M}$ )	0,3 $\mu\text{l}$ (3 pmol)
DEPC H <sub>2</sub> O	1,8 $\mu\text{l}$

## 2.4 Proteinbiochemie

### 2.4.1 Proteinlysate nach siRNA-Transfektion

Zur Kontrolle der Wirksamkeit des Gen-Knockdowns nach Transfektion von siRNA erfolgte ein quantitativer Proteinnachweis mittels Western Blot (siehe Abschnitt 2.4.3). Zur Vorbereitung der hier eingesetzten Proteinlysate wurden 24 Stunden nach Transfektion jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen geerntet. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert (900 g, 5 min, 4°C), einmalig mit 1 ml PBS gewaschen und als Trockenpellet bei -20°C gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurde das Pellet in einem Gemisch aus dem Lysepuffer RIPA (15 $\mu\text{l}$ ) und dem SDS-Ladepuffer Roti-Load (5 $\mu\text{l}$ ) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Zur besseren Proteinextraktion erfolgte abschließend eine Ultraschallbehandlung der Proben über sechs Zyklen von jeweils zehn Sekunden (Bioruptor Standard Sonication Device). Das Lysat wurde danach direkt für die SDS-PAGE aufgetragen oder zur späteren Verwendung erneut bei -20°C gelagert.

### 2.4.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Die Herstellung des hier verwendeten Trenngels (10%) und Sammelgels (5%) wurde nach den in Tabelle 5 genannten Ansätzen durchgeführt. Die Geltaschen wurden mit jeweils 15 µl Proteinlysate beladen. Zusätzlich wurde ein Full Range Rainbow Marker zur einfacheren Identifizierung der Proteine anhand der Molekülmasse (kDa) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in 1x Tris-Glycin-Laufpuffer (Laemmli-Puffer) für zunächst 30 Minuten bei 20 mA. Sobald alle Proben das Trenngel erreichten, wurde die Elektrophorese konstant mit 40 mA für etwa eine Stunde fortgeführt.

### 2.4.3 Western Blot

Der Western Blot (Immunoblot) ermöglicht einen gezielten Nachweis und eine Quantifizierung von Proteinen nach dem Transfer auf eine Membran. Die Detektion der Proteine erfolgt durch den Einsatz spezifischer Antikörper.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte nach dem Tank-Blot-Verfahren (Towbin et al. 1979). Die hier verwendete hydrophobe PVDF-Membran wurde vor Gebrauch in 100% Methanol aktiviert (15 sek), in H<sub>2</sub>O gewaschen (2 min) und in Transferpuffer vorbehandelt (5 min, Tabelle 5). Die Membran und das Polyacrylamid-Gel wurden zwischen Whatman Filterpapier in die Blot-Kammer eingebracht. Darauf folgend wurde der Elektrotransfer für eine Stunde bei 100 V und 4°C durchgeführt.

Der Proteinübertrag auf die Membran wurde im Anschluss durch eine reversible Proteinfärbung mittels Ponceau S überprüft. Nach Markierung der gewünschten Proteinbanden wurde die Membran in TBS-T wieder entfärbt. Es folgte eine Inkubation (1 h, RT) zur Blockierung unspezifischer freier Bindungsstellen in 5% BSA oder Milchpulver, abhängig vom eingesetzten Primärantikörper. Die Behandlung mit dem zum jeweiligen Zielprotein spezifischen Primärantikörper (Tabelle 11) erfolgte anschließend über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran dreimalig mit TBS-T gewaschen (je 10 min) bevor ein Sekundärantikörper gegen die entsprechende Spezies des Primärantikörpers hinzugegeben wurde (1 h, RT). Hieran schloss sich erneut ein dreimaliges Waschen der Membran in TBS-T an (je 10 min).

Die Visualisierung der an die Proteinbanden gebundenen Antikörper erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Verfahrens. Hierfür wurde die Membran für eine Minute mit einer Luminol-Peroxid-Lösung behandelt, welche sich zu gleichen Teilen aus den in Tabelle 5 genannten ECL-Lösungen zusammensetzte (Haan und Behrmann 2007). Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals, entstehend durch die Oxidation des Luminols über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase, erfolgte über einen LAS-4000 Image Reader.

Für einen Reblot zum Nachweis weiterer Proteine auf denselben Membranabschnitten wurde die Membran für 15 Minuten in einer Stripping-Lösung (Tabelle 4) inkubiert, um die bisherigen Antikörper abzulösen. Anschließend erfolgte eine erneute Blockierung mit BSA oder Milchpulver sowie die Zugabe der neuen Antikörper nach oben genanntem Verfahren. Die Auswertung des siRNA-vermittelten Knockdowns wurde mit dem Programm ImageJ vorgenommen. Die Bandendichte des untersuchten Proteins wurde dabei zunächst zu einer Ladekontrolle mit dem Housekeeping-Gen Tubulin normalisiert, welches konstitutiv in menschlichen Zellen exprimiert wird. Die relative Quantifizierung des Zielproteins und somit des Gen-Knockdowns erfolgte schließlich durch Berechnung des Verhältnisses vom Zielprotein zu einer Kontrollprobe, welche mit unspezifischer siRNA (*scrambled* siRNA) transfiziert wurde.

## 2.5 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Zellzählungen sowie der qRT-Daten wurde mit GraphPad Prism 7.04 durchgeführt. Für die Berechnung wurde jeweils eine Normalverteilung angenommen. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der durchgeführten Versuchsreihen. Zur Vergleichsanalyse der Mittelwerte mehrerer Gruppen erfolgte eine einfaktorische ANOVA (*one-way analysis of variance*). Daran anschließend wurde zur Korrektur des Signifikanzniveaus ein post-hoc Bonferroni-Test durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als signifikant gewertet (\* p  $< 0,05$ , \*\* p  $< 0,01$ , \*\*\* p  $< 0,001$ , \*\*\*\* p  $< 0,0001$ ).

### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte anhand der Modellzelllinie P493-6 der Einfluss des Serin- und Glycin-Stoffwechsels sowohl auf die IL10- und CpG-vermittelte als auch die *MYC*-induzierte Proliferation von B-Zellen untersucht werden (siehe Abschnitt 1.5). Dafür wurden einerseits Analysen unter Entzug der Aminosäuren Serin und Glycin im Zellkulturmedium durchgeführt. Andererseits wurde untersucht wie sich ein Knockdown der *PSAT1*, einer Glutamat-verbrauchenden Transaminase des Serin-Biosynthesewegs, im Vergleich zu *GOT2* auf die Zellproliferation sowie auf die Expression weiterer Enzyme des Serin- und Glycin-Stoffwechsels auswirkt. Parallel wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Expression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese abhängig vom JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalweg ist.

#### 3.1 Analyse des Einflusses von Serin und Glycin auf die Proliferation der B-Zelllinie P493-6 und verschiedener DLBCL-Zelllinien

##### 3.1.1 Die Proliferation von IL10+CpG stimulierten P493-6 *MYC*<sup>low</sup>-Zellen wird durch den Entzug von Serin und Glycin reduziert, besonders unter Bedingungen einer erhöhten Glutaminverfügbarkeit

Es war vorbekannt, dass in der B-Zelllinie P493-6 sowohl durch die Stimulation mit IL10 und CpG als auch durch eine *MYC*-Überexpression globale Veränderungen der Expression Metabolismus-assoziiierter Gene erfolgen und einhergehend vielfältige Anpassungen des zellulären Stoffwechsels stattfinden (siehe Abschnitt 1.5). Diese Veränderung der Genexpression umfasst auch die Enzyme des Serin- und Glycin-Stoffwechsels. Zunächst sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob Serin und Glycin wichtig für die Proliferation der P493-6-Zellen sind und wie sich ein exogener Mangel dieser Nährstoffe auswirkt.

P493-6-Zellen wurden dafür in RPMI-1640 Medium ohne Zusatz von Serin und Glycin kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.3). Unter diesen Bedingungen sollte geklärt werden, ob sich die *MYC*- oder IL10+CpG-vermittelte Zellproliferation in Abwesenheit von Serin und Glycin verändert und wie ausgeprägt sich diese Veränderung ggf. darstellt. Vergleichend zum Entzug von Serin und Glycin wurden die Zellen auch in Medium ohne Glucose sowie mit unterschiedlichem Glutaminangebot kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei unter folgenden Bedingungen: *MYC*<sup>low</sup> (ruhende B-Zellen), *MYC*<sup>low</sup> IL10 stimuliert, *MYC*<sup>low</sup> CpG stimuliert, *MYC*<sup>low</sup> IL10+CpG stimuliert (aktivierte, proliferierende B-Zellen) und zum Vergleich *MYC*<sup>high</sup> (proliferierende, *MYC*-transformierte B-Zellen).

Das hier verwendete Zellkulturmedium war frei von Serin, Glycin und Glucose. Diese Nährstoffe wurden dann in unterschiedlichen Kombinationen supplementiert, sodass die Veränderung der Zellproliferation in Abhängigkeit von einem ausgewählten Angebot an Serin, Glycin und Glucose bestimmen werden konnte (siehe Abbildung 3). Der experimentelle

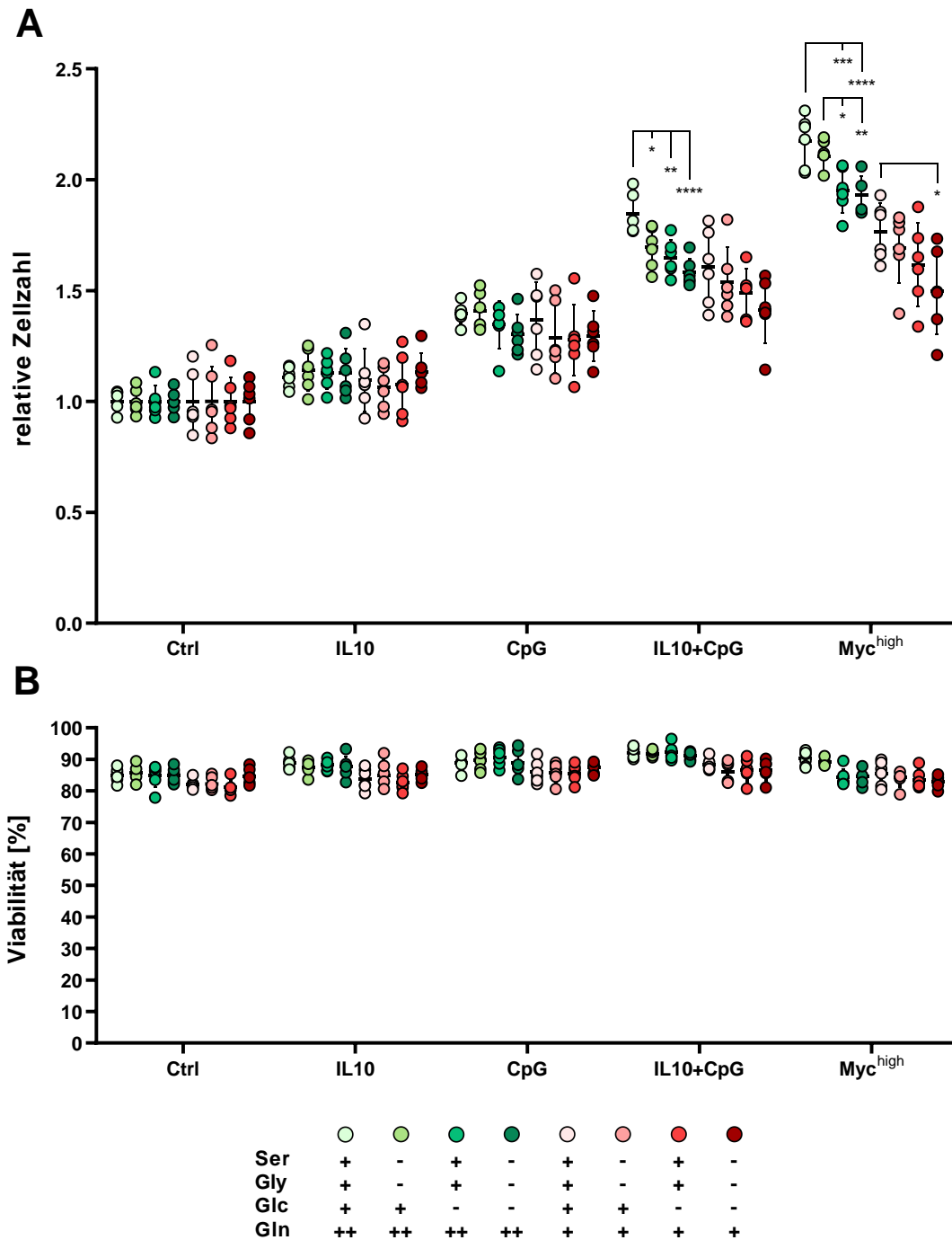
Ansatz wurde außerdem um eine Vergleichsgruppe mit zusätzlich hinzugefügtem Glutamin ergänzt, um einen übergeordneten, proliferationslimitierenden Mangel an Glutamin auszuschließen. Während das Medium in seiner Grundzusammensetzung eine Glutaminkonzentration von 0,3 g/L enthielt (Gln+), wurde das Glutamin in der Vergleichsgruppe auf eine Konzentration von 0,6 g/L verdoppelt (Gln++). Dieses Komplettmedium wurde unter Ergänzung aller weiteren Nährstoffe als Bezugspunkt für eine optimale Proliferation von IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>- sowie MYC<sup>high</sup>-Zellen betrachtet (in Abbildung 3 bezeichnet als Ser+ Gly+ Glc+ Gln++). Die Zellproliferation und -viabilität wurde nach 48-stündiger Kultur unter den verschiedenen Nährstoffkombinationen mittels Trypanblau-Zellzählung bestimmt.

Durch die Stimulation mit IL10 und CpG war im Komplettmedium (Ser+ Gly+ Glc+ Gln++) die bereits vorbekannte Induktion der P493-6-Proliferation (siehe Abschnitt 1.5) zu beobachten. Die Proliferation der IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen sowie der MYC<sup>high</sup>-Zellen zeigte dabei signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der jeweiligen Nährstoffverfügbarkeit (siehe Abbildung 3 A). Die Zellviabilität war unabhängig von diesen Proliferationsunterschieden konstant (siehe Abbildung 3 B).

Die Analyse der Versuchsgruppe mit erhöhter Glutaminverfügbarkeit (0,6 g/L; Gln++) zeigte, dass der alleinige Entzug von Serin und Glycin in den IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion der Proliferation führte. Demgegenüber bewirkte ein Mangel an Glucose einen stärker signifikanten Proliferationsrückgang sowohl der IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen als auch der MYC<sup>high</sup>-Zellen. Durch einen zusätzlichen Entzug von Serin und Glycin wurde die Proliferation jeweils weiter abgeschwächt. Innerhalb der Versuchsgruppe mit einfacher Glutaminverfügbarkeit (0,3 g/L; Gln+) war durch den Entzug von Serin und Glycin weder für die IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen noch für die MYC<sup>high</sup>-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellproliferation zu beobachten. Erst ein zusätzlicher Mangel von Glucose führte zu einer deutlich geringeren Proliferation, die im Fall der MYC<sup>high</sup>-Zellen auch signifikant war.

Mit Blick auf die Proben, die in Medium mit einer erhöhten Glutaminmenge kultiviert wurden, fällt für die IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen sowie für die MYC<sup>high</sup>-Zellen insgesamt eine stärkere Proliferation im Vergleich zu den Proben mit einfacher Glutaminverfügbarkeit auf. Auch in Gegenwart von Glucose, Serin und Glycin war durch zusätzliches Glutamin eine weitere Steigerung der Proliferation nachweisbar.

Zusammenfassend zeigte sich durch den Entzug von Serin und Glycin unter den gewählten experimentellen Bedingungen in Gegenwart von Glucose und einem erhöhten Glutaminangebot ein signifikant hemmender Effekt auf die Proliferation von MYC<sup>low</sup>-Zellen. Ein Mangel an Glucose wirkte sich demgegenüber jedoch deutlicher auf die Zellproliferation aus. Eine erhöhte Glutaminverfügbarkeit steigerte die Proliferation der P493-6-Zellen.



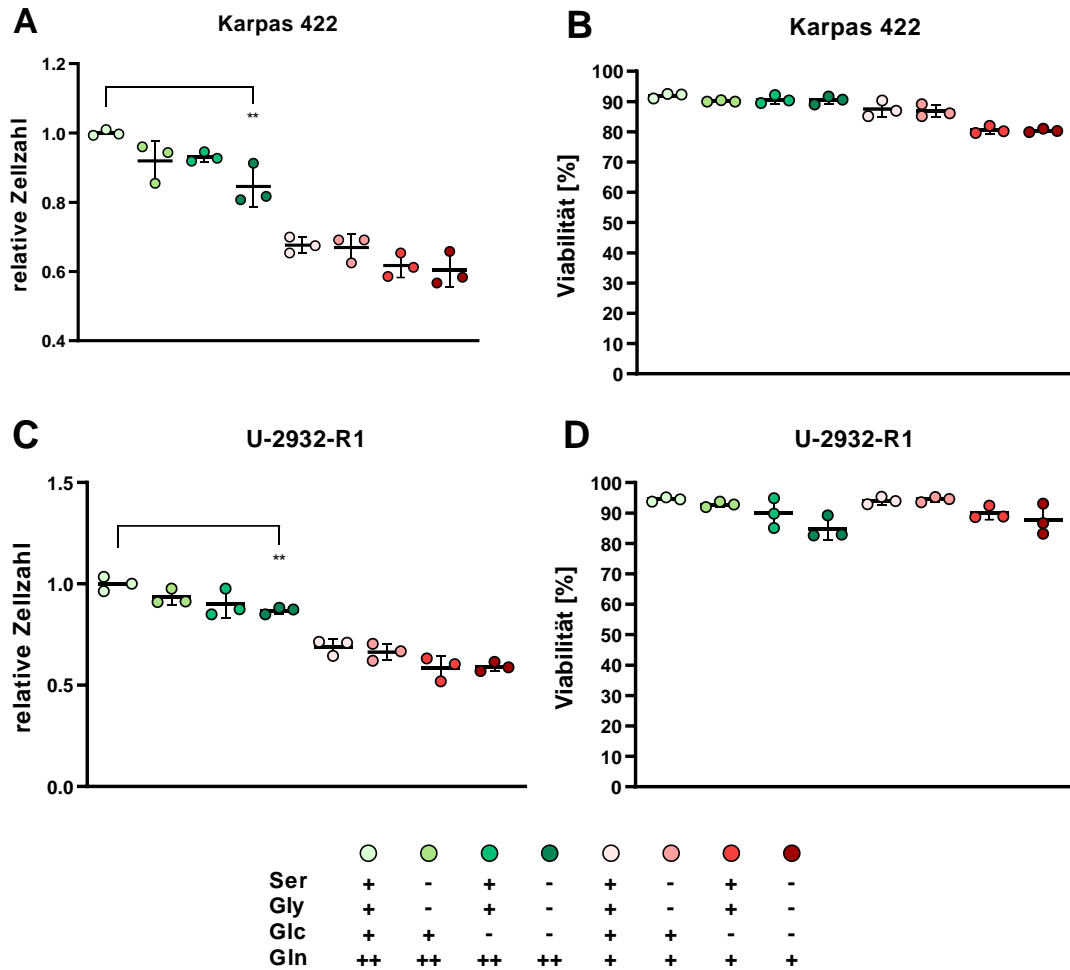
**Abbildung 3: Der Entzug von Serin und Glycin hemmt die Proliferation von IL10- und CpG-stimulierten P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen bei erhöhter Glutaminverfügbarkeit.** P493-6-Zellen wurden in Zellkulturmedium II ausgesät, welches kein Serin (Ser), Glycin (Gly) und keine Glucose (Glc) enthielt. Diese Nährstoffe wurden dem Medium entsprechend den oben genannten Kombinationen zugesetzt. Der Hälfte der Proben wurde zusätzliches Glutamin hinzugefügt (Gln++). Durch eine Behandlung mit Doxycyclin wurde die MYC-Expression reprimiert. Die MYC<sup>low</sup>-Zellen wurden zu Versuchsbeginn sowie erneut nach 24h mit IL10, CpG oder IL10+CpG stimuliert. Eingesetzte Nährstoffkonzentrationen: Ser (+): 0,03 g/L, Gly (+): 0,01 g/L, Glc (+): 2 g/L, Gln (+): 0,3 g/L, Gln (++) : 0,6 g/L. **(A)** Relative Zellzahl 48h nach Stimulation mit Normierung auf die jeweils unstimulierte MYC<sup>low</sup>-Kontrollprobe. **(B)** Die Zellviabilität zeigt sich nach 48h konstant. Dargestellt ist der MW±SD von n=6 mit den Ergebnissen der One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. Die Proben mit erhöhtem Glutamingehalt (Gln++) und regulärem Glutamingehalt (Gln+) wurden separat verglichen. Innerhalb der jeweiligen Gruppe (Ctrl, IL10, CpG, IL10+CpG, MYC<sup>high</sup>) erfolgte ein Vergleich der Proben untereinander. Signifikanzniveau \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

### **3.1.2 Die Proliferation von Karpas 422- und U-2932-R1-Zellen wird durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose reduziert**

In den vorhergehenden Analysen konnte gezeigt werden, dass der Entzug von Serin und Glycin nur unter Bedingungen einer erhöhten Glutaminverfügbarkeit zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation in IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-P493-6-Zellen führte, während der gleichzeitige Entzug von Glucose auch in MYC<sup>high</sup>-Zellen eine deutlichere Reduktion der Proliferation bewirkte. Im Folgenden sollte nun geprüft werden, wie sich der Entzug von Serin, Glycin und Glucose auf zwei weitere humane DLBCL-Zelllinien, Karpas 422 und U-2932-R1, auswirkt. Beide Zelllinien wurden äquivalent zu den Vorversuchen unter Entzug von Serin, Glycin und Glucose in Kultur gehalten. Die Nährstoffe wurden dabei gemäß den in Abbildung 4 genannten Kombinationen supplementiert. Die Hälfte der Proben wurde auch hier in Kompletmedium mit erhöhtem Glutamingehalt (0,6 g/L, Gln++) kultiviert, die Vergleichsgruppe hingegen unter einfacher Glutaminverfügbarkeit (0,3 g/L, Gln+). Die Zellproliferation und -viabilität wurden jeweils nach 48 Stunden bestimmt.

Innerhalb der Proben, die unter erhöhtem Glutamingehalt (Gln++) kultiviert wurden, war sowohl für Karpas 422- als auch U-2932-R1-Zellen eine signifikante Reduktion der Proliferation durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose zu beobachten. Der alleinige Entzug von Serin und Glycin oder von Glucose wirkte sich jedoch nicht signifikant auf die Proliferation aus. In den Proben mit einfacher Glutaminverfügbarkeit (Gln+) fiel der durch den Nährstoffentzug bedingte Rückgang der Proliferation jeweils geringfügiger aus. Hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben zu erheben. Sowohl die Karpas 422- als auch die U-2932-R1-Zellen zeigten in der Versuchsgruppe mit zusätzlichem Glutamin eine deutliche Steigerung der Zellproliferation gegenüber den Vergleichsproben mit einfacher Glutaminverfügbarkeit, ähnlich wie dies zuvor auch für die P493-6-Zellen beobachtet werden konnte.

In Zusammenschau zeigte sich bei allen in dieser Arbeit untersuchten B-Zelllinien, P493-6, Karpas 422 und U-2932-R1, unter Bedingungen einer erhöhten Glutaminverfügbarkeit eine Reduktion der Proliferation durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose. Durch den alleinigen Entzug von Serin und Glycin war nur in den IL10+CpG stimulierten P493-6-Zellen ein signifikanter Effekt zu beobachten, nicht jedoch in den hier untersuchten Lymphomzelllinien. Auffällig zeigte sich bei allen untersuchten B-Zelllinien eine Proliferationssteigerung in Gegenwart eines erhöhten Glutamingehalts.



**Abbildung 4: Die Proliferation von Karpas 422 und U-2932-R1 wird durch den gemeinsamen Entzug von Serin, Glycin und Glucose gehemmt.** Karpas 422- und U-2932-R1-Zellen wurden in Zellkulturmedium II ohne Serin (Ser), Glycin (Gly) und Glucose (Glc) kultiviert. Es erfolgte ein Zusatz dieser Nährstoffe entsprechend den oben genannten Kombinationen. Die Hälfte der Proben wurde unter einem erhöhten Glutamingehalt (Gln++) kultiviert. Eingesetzte Nährstoffkonzentrationen: Ser (+): 0,03 g/L, Gly (+): 0,01 g/L, Glc (+): 2 g/L, Gln (+): 0,3 g/L, Gln (++) : 0,6 g/L. **(A+C)** Die Proliferation wurde nach 48h bestimmt. Es erfolgte eine Normierung auf die Kontrollprobe des Komplettmediums mit Serin, Glycin, Glucose und erhöhtem Glutamingehalt. **(B+D)** Die Zellviabilität zeigte sich konstant. Abgebildet sind der  $MW \pm SD$  von  $n=3$  mit den Ergebnissen der One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. Signifikante Veränderungen wurden für die Proben mit erhöhtem Glutamingehalt (Gln++) und regulärem Glutamingehalt (Gln+) jeweils relativ zur jeweiligen Kontrollprobe ohne Nährstoffentzug berechnet. Signifikanzniveau \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

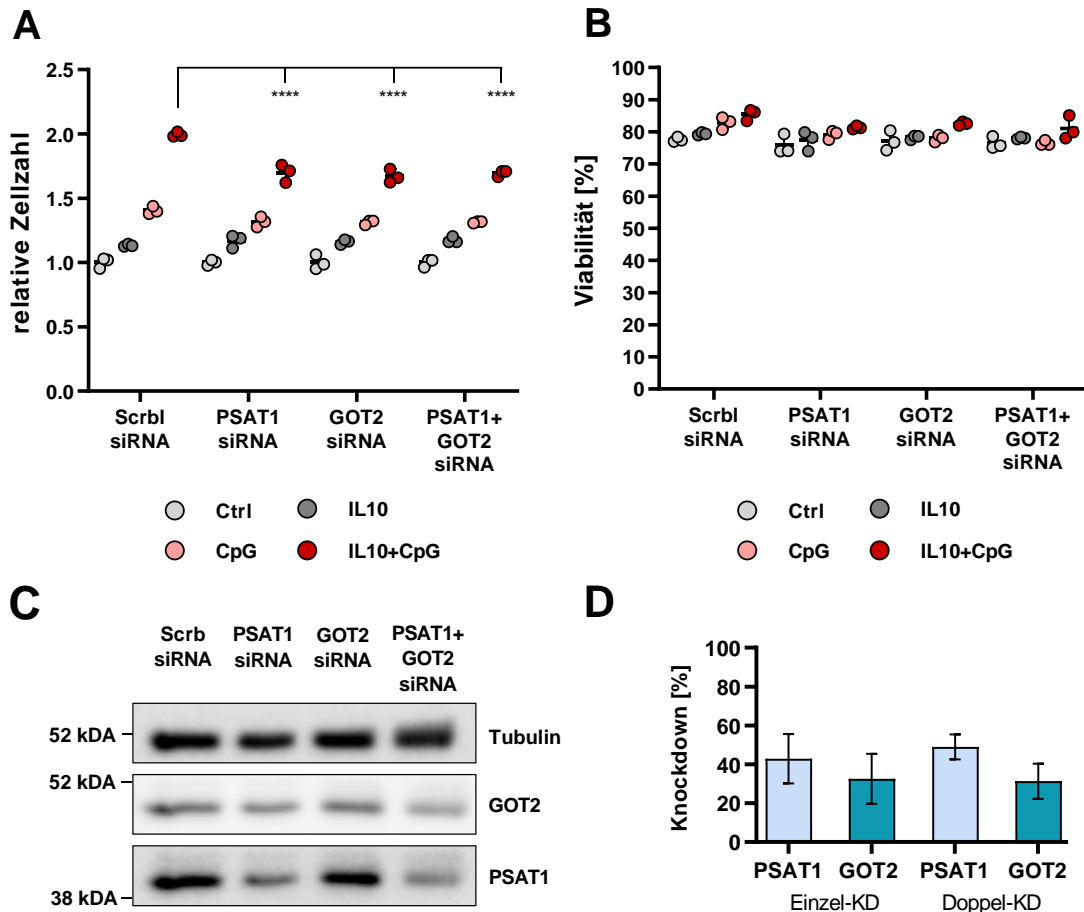


### 3.2 Reduzierte Expression von PSAT1 vermindert die IL10- und CpG-vermittelte Zellproliferation von P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen vergleichbar zu GOT2, ist aber weder additiv noch synergistisch

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben im Rahmen einer RNA-Sequenzierung gezeigt, dass die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese sowohl in P493-6 MYC<sup>high</sup>-Zellen als auch in IL10- und CpG-stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen deutlich gesteigert ist. Darüber hinaus konnte in weiteren Analysen eine Abhängigkeit der Proliferation von der Aminotransferase GOT2 beschrieben werden und es war anzunehmen, dass auch weitere Glutamat-verbrauchende Aminotransferasen von Bedeutung für die Proliferation der P493-6-Zellen sein könnten (siehe Abschnitt 1.5). Hier sollte nun der Einfluss der PSAT1, einem zentralen Enzym der Serin-Biosynthese, auf die Zellproliferation im Vergleich zur GOT2 analysiert werden. Dazu wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown sowohl von *PSAT1* als auch *GOT2* durchgeführt. P493-6 MYC<sup>high</sup>-Zellen wurden mit spezifischer PSAT1- oder GOT2-siRNA bzw. einer Kombination aus beiden siRNAs transfiziert, um einen entsprechenden Knockdown zu erreichen. Die Transfektion der Kontrollproben erfolgte mit unspezifischer siRNA (*scrambled* siRNA). Drei Stunden nach Transfektion erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Doxycyclin zur Suppression der MYC-Expression (MYC<sup>low</sup>). Um den spezifischen Knockdown zu quantifizieren, wurden Zellen 24 Stunden nach Transfektion für einen Immunoblot geerntet. Die Reduktion der Proteinmenge durch den *PSAT1*-Knockdown war dabei ähnlich effizient wie der *GOT2*-Knockdown (siehe Abbildung 5 C+D). Die verbliebenen Zellen wurden mit IL10, CpG oder IL10+CpG stimuliert oder unbehandelt weiter kultiviert. Die Zellproliferation und -viabilität wurden 48 Stunden nach der ersten Stimulation mit IL10 und CpG bestimmt (d.h. 72 Stunden nach Transfektion; siehe Abbildung 5 A+B).

In der mit *scrambled* siRNA transfizierten Kontrollgruppe lag die Proliferation nach einfacher Stimulation mit IL10 oder CpG sowie nach Doppelstimulation mit IL10+CpG im Bereich der vorhergehenden Analysen. Nach Einzelknockdown von *PSAT1* und *GOT2* war für die mit IL10 und CpG stimulierten Zellen ein nahezu äquivalenter Rückgang der Proliferation zu beobachten (siehe Abbildung 5 A). Der gemeinsame Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* zeigte eine Reduktion der Zellproliferation vergleichbar zum jeweiligen Einzelknockdown. Ein additiver oder synergistischer Effekt war nicht zu erheben, trotz einer ähnlichen Knockdown-Effizienz im Vergleich zum Einzelknockdown in der Western Blot-Kontrolle (siehe Abbildung 5 C+D). Die Proliferation der mit IL10 oder CpG einzeln stimulierten Zellen, zeigte sich nach *PSAT1*- oder *GOT2*-Knockdown im Vergleich zur *Scrambled*-Kontrolle nicht signifikant verändert. Die Zellviabilität blieb jeweils konstant, sodass hierdurch bedingte Proliferationsunterschiede ausgeschlossen werden konnten (siehe Abbildung 5 B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die IL10- und CpG-vermittelte Proliferation zum Teil sowohl von *PSAT1* als auch von *GOT2* abhängig ist. Die Reduktion der Zellproliferation durch den Knockdown von *PSAT1* bestätigt, dass der Serin- und Glycin-Stoffwechsel, wie bereits in Abschnitt 3.1.1 durch den Nährstoffentzug gezeigt, wichtig für die Proliferation der IL10- und CpG-stimulierten P493-6-Zellen ist. Der gemeinsame Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* hatte jedoch keine stärkere Auswirkung auf die Proliferation der P493-6-Zellen als der jeweilige Einzelknockdown.

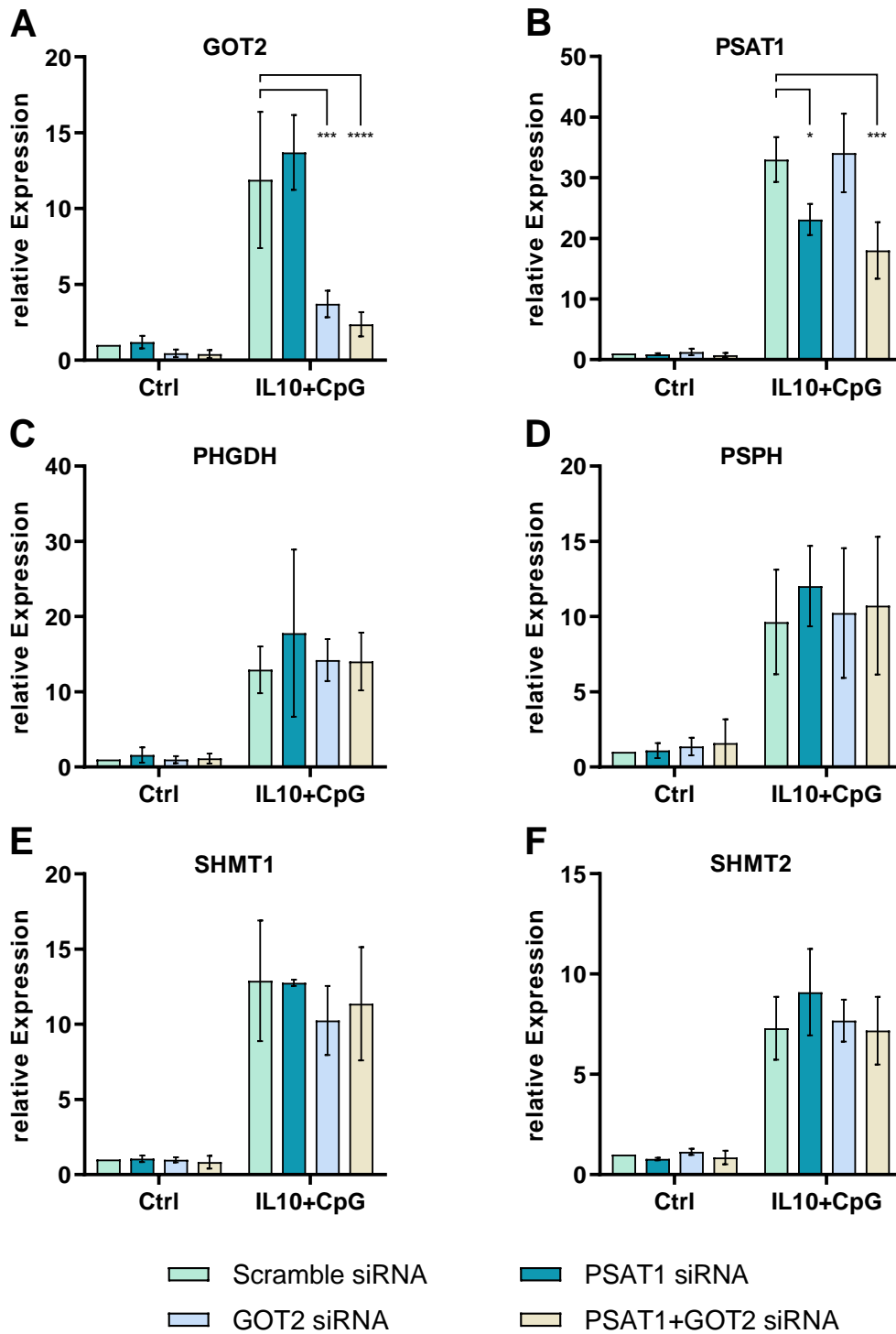


**Abbildung 5: Die IL10- und CpG-vermittelte Proliferation von P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen ist abhängig von PSAT1 und GOT2.** P493-6-Zellen wurden mit je 2 µg *PSAT1*- oder *GOT2*-siRNA allein oder in Kombination transfiziert. Einzeltransfektionen wurden unter Zusatz von 2 µg unspezifischer *scrambled* siRNA durchgeführt. Für die Kontrolle wurden 4 µg *scrambled* siRNA eingesetzt. Zur Suppression der *MYC*-Expression erfolgte eine Behandlung mit Doxycyclin. Die Zellen wurden zu Versuchsbeginn und nach 24h mit IL10, CpG oder IL10+CpG stimuliert. **(A)** Die Zellproliferation wurde 48h nach erstmaliger Stimulation bestimmt. Dargestellt ist die relative Zellzahl nach Normierung auf die jeweils unstimulierte Kontrollprobe. Die Proliferationssteigerung durch die Stimulation mit IL10 und CpG zeigt sich durch den Gen-Knockdown von *PSAT1* oder *GOT2* reduziert, jedoch ohne additiven Effekt durch den Doppelknockdown. **(B)** Die Zellviabilität blieb trotz der Proliferationsunterschiede konstant. **(C)** Ein Western Blot zum Nachweis eines erfolgreichen Knockdowns erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot mit Tubulin als Ladekontrolle. **(D)** Die Quantifizierung des Einzel- und Doppelknockdowns wurde relativ zur Ladekontrolle mit Tubulin sowie der *Scrambled*-Kontrollprobe berechnet. Die Auswertung erfolgte mittels Image J. 100% entsprechen einem vollständigen Knockdown. Dargestellt ist der MW±SD von n=3. Die transfizierten Proben (Ctrl, IL10, CpG und IL10+CpG) wurden mit der jeweiligen *Scrambled*-Kontrollprobe in einer One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Signifikanzniveau \*\*\*\*p < 0,0001.

### 3.3 Reduzierte Expression von *PSAT1* und *GOT2* hat keinen Einfluss auf die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese

Im Rahmen der vorhergehenden Untersuchungen war durch den Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* ein Rückgang der Proliferation der P493-6-Zellen zu beobachten. Gleichzeitig blieb jedoch trotz des Knockdowns zweier zentraler Enzyme der Serin-Biosynthese bzw. der Glutaminolyse ein wesentlicher Anteil der IL10- und CpG-induzierten Zellproliferation erhalten. Im Hinblick hierauf ergab sich die Frage, ob ggf. durch den Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* eine kompensatorische Expressionssteigerung der weiteren Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese (*PHGDH*, *PSPH*, *SHMT1*, *SHMT2*) erfolgt. Es wurde entsprechend eine qRT-PCR zur Analyse der Genexpression von unstimulierten sowie IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit *PSAT1*- oder *GOT2*-siRNA oder einer Kombination aus beiden siRNAs transfiziert worden waren (siehe Abbildung 6).

Durch die Kostimulation mit IL10 und CpG war eine deutliche Induktion der Expression aller untersuchten Gene zu beobachten, wie auch aus den bereits vorbekannten RNA-Seq-Analysen zu erwarten war (siehe Abschnitt 1.5). Der Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* zeigte eine Reduktion der Transkriptmengen beider Transaminasen (siehe Abbildung 6 A+B) ähnlich der zuvor erhobenen Reduktion der jeweiligen Proteinmengen (siehe Abbildung 5). Für die Enzyme *PHGDH*, *PSPH*, *SHMT1* und *SHMT2* konnten keine Veränderungen der Genexpression gefunden werden (siehe Abbildung 6 C-F). Weder durch die Reduktion von *PSAT1* noch von *GOT2* kam es hier zu einer kompensatorischen Steigerung der Genexpression. Somit ist davon auszugehen, dass die durch den *PSAT1*-Knockdown beobachtete Reduktion der Zellproliferation (siehe Abschnitt 3.2) einen spezifischen Effekt durch eben-diese Expressionsminderung der *PSAT1* darstellt. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass kein vollständiger *PSAT1*-Knockdown vorlag, sondern eine zwar reduzierte aber weiterhin deutliche Expression zu verzeichnen war. Der *GOT2*-Knockdown erbrachte demgegenüber eine stärkere Reduktion der *GOT2*-Transkriptmenge.



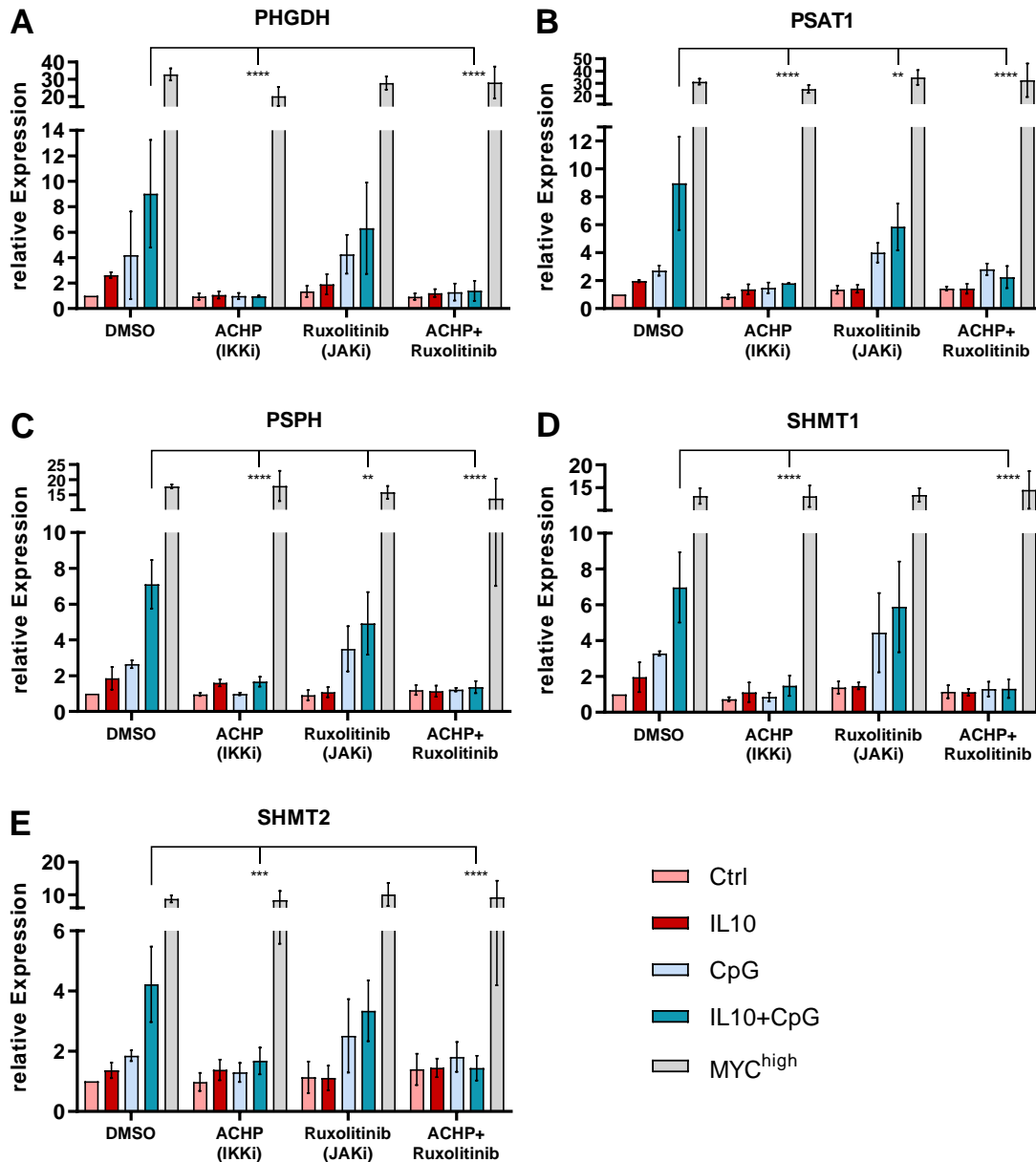
**Abbildung 6: Der Knockdown von GOT2 und PSAT1 hat keinen Effekt auf die Genexpression der weiteren Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese.** Relative Genexpression von **(A) GOT2**, **(B) PSAT1**, **(C) PHGDH**, **(D) PSPH**, **(E) SHMT1** und **(F) SHMT2** in unstimulierten und IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen nach Knockdown von PSAT1- und/oder GOT2. P493-6-Zellen wurden mit je 2 µg PSAT1- oder GOT2-siRNA allein oder in Kombination transfiziert. Zur Einzeltransfektion wurden zusätzlich je 2 µg unspezifische *scrambled* siRNA hinzugefügt. Für die Positivkontrolle wurden 4 µg *scrambled* siRNA eingesetzt. Die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR wurde 48h nach Transfektion und 24h nach Stimulation mit IL10 und CpG durchgeführt. Es erfolgte eine Normalisierung auf *Act42A*. Dargestellt ist der MW±SD von jeweils drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die unstimulierten Proben und die IL10+CpG stimulierten Proben wurden mit der jeweiligen *Scrambled*-Kontrolle in einer One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Signifikanzniveau \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

### 3.4 Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese in IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen maßgeblich abhängig von NF-κB

Für die Zelllinie P493-6 war aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt, dass es durch die Stimulation mit IL10 und CpG zu einer kooperativen Aktivierung des JAK-STAT- und NF-κB-Signalwegs kommt, die maßgeblich an der Reprogrammierung der Glutaminolyse und der Regulation der Expression von *GOT2* beteiligt ist (siehe Abschnitt 1.2 und 1.4.2). Dieser experimentelle Ansatz wurde hier auf den Serin- und Glycin-Stoffwechsel übertragen, für dessen Enzyme ebenfalls ein Anstieg der Genexpression durch die Stimulation mit IL10 und CpG zu erheben war (siehe Abschnitt 3.3). Entsprechend lautete die Fragestellung, ob die IL10- und CpG-vermittelte Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese (*PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1* und *SHMT2*) ebenfalls abhängig vom NF-κB- und JAK-STAT-Signalweg ist. Dafür wurden P493-6-Zellen mit dem IKK-Inhibitor AHP sowie dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib behandelt. Ruxolitinib hemmt selektiv die Januskinasen JAK1 und JAK2, während AHP als Inhibitor der IκB-Kinasen IKKα und IKKβ des NF-κB-Signalwegs fungiert (siehe Abbildung 1). Im Anschluss an die Inhibitor-Behandlung erfolgte mittels qRT-PCR eine Genexpressionsanalyse von unstimulierten, IL10 oder CpG stimulierten sowie IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen und von MYC<sup>high</sup>-Zellen (siehe Abbildung 7).

In der DMSO-Kontrollgruppe war eine sehr deutliche Hochregulierung der Genexpression aller Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese in MYC<sup>high</sup>-Zellen zu beobachten. Daneben zeigte sich in den MYC<sup>low</sup>-Zellen eine synergistische Steigerung der Genexpression durch die Doppelstimulation mit IL10 und CpG im Vergleich zu den jeweiligen Einzelstimulationen. Durch die Behandlung mit dem IKK-Inhibitor AHP wurde diese Steigerung der Genexpression in stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen fast vollständig blockiert. Nach JAK-Inhibition durch Ruxolitinib zeigte sich in den mit IL10 und CpG doppelt stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen ein signifikanter Rückgang der Expression von *PSAT1* und *PSPH*. Die Expressionsminderung war hier aber deutlich weniger ausgeprägt als durch die IKK-Inhibition. Für die weiteren Enzyme war innerhalb der Ruxolitinib-Versuchsgruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zwar eine Verminderung des synergistischen Wirkeffektes durch die Doppelstimulation zu beobachten, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant. Somit zeigte sich hinsichtlich der JAK-Inhibition ein differenziertes Bild. Das Expressionslevel in den MYC<sup>high</sup>-Zellen wurde weder durch AHP noch durch Ruxolitinib wesentlich beeinträchtigt. Eine Auswirkung auf die MYC-vermittelte Genexpression war dementsprechend nicht zu erheben.

Insgesamt zeigte sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen, dass die durch IL10- und CpG-Stimulation vermittelte Steigerung der Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese maßgeblich vom NF-κB-Signalweg abhängig ist. Eine Abhängigkeit vom JAK-STAT-Signalweg war hingegen nur für die *PSAT1* und *PSPH* nachzuweisen.



**Abbildung 7: Die IL10- und CpG-induzierte Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese ist abhängig vom NF- $\kappa$ B-Signalweg.** Relative Genexpression von (A) *PHGDH*, (B) *PSAT1*, (C) *PSPH*, (D) *SHMT1* und (E) *SHMT2* in stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen und unstimulierten MYC<sup>high</sup>-Zellen nach IKK- oder JAK-Inhibition. Die Zellen wurden mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib (1  $\mu$ M) und/oder dem IKK-Inhibitor ACHP (7  $\mu$ M) behandelt und nach 3h mit IL10 und/oder CpG stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte 24h nach Inhibitor-Behandlung mittels qRT-PCR und wurde auf *Act42A* normalisiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, mit DMSO behandelte MYC<sup>low</sup>-Zellen. Dargestellt ist der MW $\pm$ SD von jeweils drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Inhibitor-behandelten MYC<sup>low</sup>-Proben und die MYC<sup>high</sup>-Proben wurden separat voneinander mit der jeweiligen DMSO-Kontrollprobe (Ctrl, IL10, CpG, IL10+CpG) in einer One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Signifikanzniveau \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen ersten Einblick in den Einfluss des Serin- und Glycin-Stoffwechsels auf die IL10- und CpG-induzierte sowie die MYC-vermittelte Proliferation der B-Zelllinie P493-6 zu gewinnen. Da die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe neben der essenziell wichtigen Transaminase GOT2 auch einen Beitrag weiterer Glutamat-verbrauchender Aminotransferasen für die B-Zell-Proliferation vermuten ließen (Feist et al. 2018), wurde im Speziellen die Bedeutung der PSAT1 näher betrachtet. Zudem wurde der Frage nachgegangen, ob die IL10- und CpG-vermittelte Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese abhängig vom JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalweg ist.

Die für diese Arbeit durchgeführten Nährstoffversuche zeigten auf, dass exogenes Serin und Glycin signifikant zur Proliferation von IL10 und CpG stimulierten P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen beitragen können (siehe Abbildung 3). Dies muss jedoch unter der gewählten Versuchsanordnung *in vitro* differenziert betrachtet werden, da dieser Effekt nur unter Bedingungen einer erhöhten Glutaminverfügbarkeit zu beobachten war. In MYC<sup>high</sup>-Zellen war durch den alleinigen Mangel an Serin und Glycin kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation feststellbar. Eine deutlichere Abhängigkeit von IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen als auch MYC<sup>high</sup>-Zellen war hingegen für Glucose zu erheben, was in ähnlichem Umfang bereits in den Vorarbeiten beschrieben werden konnte (Feist et al. 2018). Ein zusätzlicher Entzug von Serin und Glycin konnte hier den Proliferationsrückgang nochmals verstärken. Gleiches war auch für die weiterführend untersuchten DLBCL-Zelllinien U-2932-R1 und Karpas 422 nachzuweisen (siehe Abbildung 4). Während also exogenes Serin und Glycin kontextabhängig einen substanziellen Beitrag zur Proliferation der P493-6-Zellen leisten können, unterstreichen die Ergebnisse insbesondere die Bedeutung von Glucose für die Zellproliferation. Dies gilt darüber hinaus indirekt auch für Glutamin, da durch eine erhöhte Glutaminverfügbarkeit eine allgemeine Proliferationssteigerung zu erheben war.

Mit Blick auf die vorbekannt hohe Relevanz von Glutamin für die Proliferation der P493-6-Zellen war die Durchführung der Nährstoffversuche jeweils unter Kultivierung einer Vergleichsgruppe mit erhöhtem Glutamingehalt erfolgt. Dabei war es das Ziel einen übergeordneten, möglicherweise proliferationslimitierenden Mangel an Glutamin sicher auszuschließen. Überraschenderweise zeigte sich unter erhöhter Glutaminverfügbarkeit eine deutliche Proliferationssteigerung vergleichend zur Zellkultur mit der für RPMI-1640 Medien gebräuchlichen Konzentration von Glutamin (siehe Abbildung 3). Dies galt sowohl für die P493-6-Zellen als auch die DLBCL-Zelllinien Karpas 422 und U-2932-R1. Das Glutaminangebot scheint somit eine maßgebliche Limitierung für die Proliferation der hier untersuchten B-Zelllinien darzustellen. Gleichzeitig kann diese Beobachtung aber auch als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Zelllinie P493-6 sowie die untersuchten DLBCL-Zelllinien

in klassischem RPMI-1640 Medium nicht optimal versorgt sind, um bestmöglich zu proliferieren.

Glucose und Glutamin sind die beiden wesentlichen Substrate für metabolische Prozesse in Tumorzellen und können als solche auch die *de-novo*-Synthese von Serin und Glycin speisen (Locasale 2013; Sun et al. 2015; Pavlova und Thompson 2016). Wie von Sun et al. gezeigt, führt der Entzug von Glutamin, Glucose oder Serin und Glycin in P493-6 MYC<sup>high</sup>-Zellen zu einer deutlichen Aktivierung der Serin- und Glycin-Biosynthese durch eine MYC-vermittelte Expressionssteigerung der Enzyme dieses Stoffwechselwegs (Sun et al. 2015). Ein Mangel an Serin bewirkt des Weiteren die Induktion des Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor 4*), einem Hauptregulator der Serin-Biosynthese. Über ATF4 erfolgt im Zusammenspiel mit ATF3 eine Steigerung der *de-novo*-Synthese durch eine direkte Aktivierung der Genexpression (Ye et al. 2012; DeNicola et al. 2015; Li et al. 2021). Neben der Hochregulierung der Serin-Biosynthese selbst, kann überdies die Bereitstellung der Synthesevorstufe 3-Phosphoglycerat (3PG) sowohl über die Glykolyse als auch über die Gluconeogenese erfolgen und bedarfsweise gesteigert werden. Die Gluconeogenese wiederum kann zudem über die Glutaminolyse unterhalten werden, indem das hier anfallende  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratzyklus eingespeist und schließlich zu Pyruvat umgesetzt wird (Sun et al. 2015). Bei Ratten konnte unter Bedingungen einer Proteinrestriktion gezeigt werden, dass bis zu 70% des in der Serin-Biosynthese umgesetzten Kohlenstoffs über die Gluconeogenese zugeführt werden (Kalhan et al. 2011). Serin fungiert außerdem als ein allosterischer Aktivator der Pyruvatkinase M2 (PKM2), einem Enzym der Glykolyse bzw. Gluconeogenese. Ein Serinmangel führt entsprechend zu einem Rückgang der Enzymaktivität, sodass das Zwischenprodukt 3-Phosphoglycerat vermehrt zu Gunsten der Serin-Biosynthese umgeleitet wird (Chaneton et al. 2012; Ye et al. 2012) (siehe Abbildung 2). Der Serin- und Glycin-Stoffwechsel unterliegt also einer komplexen Regulierung, die eine Anpassung unter metabolischem Stress erlaubt und somit zur Aufrechterhaltung des schnellen Wachstums von Tumorzellen beiträgt (Yang und Vousden 2016). Mit Blick auf die durchgeführten Nährstoffversuche kann daher angenommen werden, dass über eine Steigerung der *de-novo*-Synthese unter Verfügbarkeit von ausreichend Glucose und Glutamin das Fehlen von exogenem Serin und Glycin weitgehend ausgeglichen wird. Dies steht jedoch im Kontrast zu der Beobachtung, dass ein Mangel von Serin und Glycin unter Bedingungen erhöhter Glutaminverfügbarkeit zu einer Proliferationsreduktion der P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen führt. Eine Hypothese zur Erklärung wäre, dass unter erhöhter Glutaminverfügbarkeit die Zellproliferation insgesamt deutlich gesteigert ist und der folglich erhöhte Nährstoffbedarf nun möglicherweise nicht mehr ausreichend durch die *de-novo*-Synthese von Serin und Glycin gedeckt



werden kann. Die Verfügbarkeit von exogenem Serin und Glycin wäre demnach insbesondere bei einer hohen B-Zell-Proliferationsrate bedeutsam.

Zur weiterführenden Analyse der metabolischen Anpassungen wäre die Durchführung einer Isotopenmarkierung mit einem  $^{13}\text{C}$ -Labeling von Glucose und einem  $^{13}\text{C}$ - sowie  $^{15}\text{N}$ -Labeling von Glutamin denkbar. Hierüber wäre ein Einblick in den Glucose- und Glutamin-Katabolismus unter Bedingungen eines Mangels an exogenem Serin und Glycin möglich. Gleichzeitig könnten so auch etwaige Unterschiede zwischen IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>- sowie MYC<sup>high</sup>-Zellen erfasst werden. Von Feist et al. wurden bereits Analysen mit einem  $^{13}\text{C}$ - sowie  $^{15}\text{N}$ -Labeling von Glutamin unter regulären Nährstoffbedingungen durchgeführt. Dabei konnte zwar sowohl in IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen als auch in MYC<sup>high</sup>-Zellen eine deutliche Anreicherung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Intermediaten im Citratzyklus sowie eine Inkorporation des aus Glutamin stammendem Kohlenstoffs in verschiedenen Aminosäuren festgestellt werden, nicht jedoch eine Aufnahme in Serin und Glycin. Auch die Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  fiel für Serin und Glycin vergleichsweise gering aus (Feist et al. 2018). Dennoch bleibt hier die Frage offen, in welchem Maße unter einem Mangel an exogenem Serin und Glycin eine Anpassung des Glutamin-Katabolismus zu Gunsten der *de-novo*-Synthese dieser beiden Aminosäuren erfolgt.

In P493-6-Zellen war sowohl durch eine Stimulation mit IL10 und CpG als auch durch eine MYC-Überexpression eine deutliche Expressionssteigerung der Aminotransferase PSAT1 beobachtet worden (Feist 2016). Die PSAT1 setzt in einem zentralen Schritt der Serin-Biosynthese 3-Phosphohydroxypyruvat in einer Glutamat-abhängigen Reaktion zu 3-Phosphoserin um. Im Rahmen des hier durchgeführte Gen-Knockdowns konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass die Proliferation der IL10+CpG stimulierten P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen abhängig von der PSAT1 ist (siehe Abbildung 5). Ein vergleichbar hemmender Effekt auf die Zellproliferation war auch durch den Knockdown der GOT2 zu erheben, wie bereits aus den Vorarbeiten bekannt war (Feist et al. 2018). Der Knockdown von *PSAT1* unterbindet die Serin-Biosynthese, sodass glykolytische Zwischenprodukte nicht weiter umgesetzt werden können. Indirekt zeigte sich somit eine Abhängigkeit der Zellproliferation von der *de-novo*-Serinsynthese. Die beobachtete Reduktion der Proliferation der P493-6-Zellen bestätigte zudem die Voruntersuchungen, wonach der gemeinsame Entzug von Glucose, Serin und Glycin die Proliferationsleistung signifikant einschränkt.

Durch den gemeinsamen Knockdown von *PSAT1* und *GOT2* war überraschenderweise keine stärkere Reduktion der Zellproliferation zu beobachten als durch den jeweiligen Einzelknockdown von *PSAT1* oder *GOT2*. Ein additiver oder gar synergistischer Effekt war nicht zu beobachten, was jedoch bei einer gleichzeitigen Beeinträchtigung sowohl der Serin- und Glycin-Biosynthese als auch der Glutaminolyse zu vermuten gewesen wäre. Hier ist mit

Blick auf die Versuchsdurchführung auch eine mögliche technische Limitierung durch den nur unvollständigen Knockdown der *PSAT1* in Betracht zu ziehen. Um die *PSAT1* mit höherer Effizienz auszuschalten, wäre eine Versuchsdurchführung unter Anwendung der CRISPR/Cas9-Methode zur präzisen Genom-Editierung denkbar.

Zur differenzierten Analyse der Abhängigkeit der Zellproliferation von der *PSAT1* könnte weiterführend ein *Rescue*-Experiment mit einer Substitution von  $\alpha$ -Ketoglutarat nach *PSAT1*-Knockdown erfolgen. Hier wäre der Frage nachzugehen, in welchem Maße das bei der anaplerotischen Reaktion anfallende  $\alpha$ -Ketoglutarat und in welchem Maße das synthetisierte Serin und Glycin selbst zur Proliferation beiträgt und ob sich etwaige Unterschiede zwischen IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen und MYC<sup>high</sup>-Zellen erheben lassen. Eine Analyse verschiedener Brustkrebszelllinien konnte beispielsweise aufzeigen, dass die *PSAT1*-vermittelte Reaktion im Rahmen der Serin-Biosynthese für bis zu 50% des Umsatzes von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat verantwortlich ist und somit für einen signifikanten Anteil des anaplerotischen Zuflusses in den Citratzyklus sorgt (Possemato et al. 2011).

Der Knockdown von *PSAT1* und/oder *GOT2* bewirkte keine wesentliche Veränderung in der Genexpression der weiteren Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese (siehe Abbildung 6). Entsprechend ist davon auszugehen, dass die beobachtete Reduktion der Zellproliferation durch den *PSAT1*-Knockdown spezifisch durch eben diese Expressionsminderung hervorgerufen wird. Eine Verfälschung dieses Effektes, etwa durch eine kompensatorische Expressionssteigerung der vorgeschalteten *PHGDH* war nicht zu beobachten. Die Reduktion der *PSAT1* scheint somit geeignet, die Serin- und Glycin-Biosynthese insgesamt zu beeinträchtigen.

Die *PSAT1* ist Gegenstand der aktuellen Forschung für diverse Tumorentitäten (Feng et al. 2022). So konnte aufgezeigt werden, dass eine Überexpression der *PSAT1* beispielsweise beim Mammakarzinom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und dem kolorektalen Karzinom mit Mechanismen der Tumorprogression und einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist (Chan et al. 2020; Metcalf et al. 2020; Wang et al. 2020; Luo et al. 2022). Neben der B-Zelllinie P493-6 konnte auch in Zellen des Burkitt-Lymphoms eine MYC-vermittelte Hochregulation der *PSAT1* beschrieben werden. Hier war nach *PSAT1*- und *PHGDH*-Depletion ein Rückgang der Zellproliferation *in vitro*, nicht jedoch *in vivo*, zu beobachten (Białopiotrowicz et al. 2020). Insgesamt ist die Rolle der *PSAT1* in B-Zell-Lymphomen jedoch bisher kaum bekannt. Somit sind weitere Untersuchungen nötig, um die Bedeutung der *PSAT1* in malignen B-Zellen näher zu charakterisieren und zu prüfen, ob die *PSAT1*-Expression möglicherweise als prognostischer Marker oder sogar therapeutisches Target von Interesse sein könnte. Bisherige Bemühungen um die gezielte pharmakologische Adressierung eines erhöhten Serin- und Glycin-Metabolismus in Tumorzellen

mündeten in der Entwicklung verschiedener *small molecule* Inhibitoren für PHGDH, deren klinische Erprobung jedoch aussteht (Mullarky et al. 2016; Pacold et al. 2016; Rohde et al. 2018). DLBCL-Zellen haben sich zudem vulnerabel gegenüber SHMT1/2-Inhibitoren gezeigt (Ducker et al. 2017). Nach ähnlichem Ansatz wäre möglicherweise auch eine selektive Inhibition der PSAT1 bei entsprechend erhöhtem Expressionslevel denkbar (Buqué et al. 2021). Für verschiedene Tumorentitäten wie dem Mamma- und Kolonkarzinom wird darüber hinaus ein kombinierter Therapieansatz mit dem gleichzeitigen Entzug von exogenem Serin und der Inhibition der endogenen *de-novo*-Serinsynthese diskutiert (Buqué et al. 2021; Montrose et al. 2021; Tajan et al. 2021; Choi et al. 2022). Durch die Kombination eines *PSAT1*-Knockdowns und einer Serin-freien Diät konnte zudem eine verzögerte Progression von MYC-induzierten Lebertumoren in Mäusen erreicht werden (Méndez-Lucas et al. 2020). Ein Knockdown der *PSAT1* kann jedoch nicht nur zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber einem Serinmangel beitragen, sondern auch gegenüber einem Mangel an Glutamin, wie an NSCLC-Zellen gezeigt werden konnte (Jin et al. 2019). Die genannten Beispiele geben einen Ausblick zur Rolle der PSAT1 in Tumorzellen, der bezogen auf B-Zell-Lymphome weitere grundlegende Untersuchungen erfordert. Die gezeigte Abhängigkeit der P493-6-Proliferation von der PSAT1 kann dabei einen Ausgangspunkt für weiterführende Analysen darstellen. Anknüpfen könnte sich in einem nächsten Schritt die Kombination eines *PSAT1*-Knockdown mit dem Entzug von exogenem Serin und Glycin oder auch ein gemeinsamer Knockdown von *PHGDH* und *PSAT1*.

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese in IL10 und CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen über den NF-κB- und JAK-STAT-Signalweg induziert wird. Die Genexpressionsanalysen nach Behandlung mit dem IKK-Inhibitor ACP, und somit einer selektiven Hemmung der IκB-Kinasen IKKβ und IKKα, ergaben eine deutliche Abhängigkeit der Expression aller Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese (*PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1* und *SHMT2*) vom NF-κB-Signalweg. Unter der Inhibition mit Ruxolitinib war darüber hinaus für die Expression der *PSAT1* und der *PSPH* eine Abhängigkeit vom JAK-STAT-Signalweg zu beobachten, nicht jedoch für die weiteren Enzyme des Serin- und Glycin-Stoffwechsels (siehe Abbildung 7). Diesbezüglich scheint jedoch eine weitere Prüfung sinnvoll, da hier mit Blick auf den Effekt der IL10-Stimulation auf die Genexpression der weiteren Enzyme ebenfalls eine Induktion durch den JAK-STAT-Signalweg als wahrscheinlich angesehen werden kann. Hier bietet sich ggf. der Einsatz eines alternativen JAK-Inhibitors an, da Ruxolitinib als selektiver Inhibitor der JAK1 und JAK2 fungiert, der IL10-Rezeptor jedoch neben der JAK1 auch die TYK2 aktiviert und somit möglicherweise nur unzureichend gehemmt wird. Dementsprechend wäre außerdem auch ein Knockdown der JAK1 und TYK2 denkbar. Zur detaillierteren

Aufklärung der Signalgebung wäre möglicherweise auch eine Analyse unter Knockdown von RelA (p65) und STAT3 aufschlussreich. Beide Transkriptionsfaktoren haben sich als essenziell für die IL10- und CpG-vermittelte Proliferation sowie für die Expression der GOT2 in IL10+CpG stimulierten MYC<sup>low</sup>-Zellen erwiesen (Feist et al. 2018).

Eine weitere Aufschlüsselung der Wirkweise des NF- $\kappa$ B- und JAK-STAT-Signalwegs auf den Tumormetabolismus maligner B-Zellen im Allgemeinen und den Serin- und Glycin-Stoffwechsel im Speziellen kann zum erweiterten Verständnis der B-Zell-Lymphomgenese beitragen. Dies ist insofern von besonderem Interesse, als dass sowohl DLBCL-Subtypen als auch weitere Lymphomentitäten häufig Aberrationen dieser Signalkaskaden aufweisen (Béguelin et al. 2015; Lu et al. 2018; Pasqualucci und Zhang 2016). Zunehmende Kenntnisse um die molekulare Heterogenität des DLBCL sind bereits heute ein Ausgangspunkt für unterschiedliche pharmakologische Ansätze zur Unterdrückung der NF- $\kappa$ B- und IL10-Signalgebung in DLBCL-Subtypen (Carr et al. 2020; Schmitt et al. 2021). Künftige Studien müssen zeigen, ob eine Inhibition des NF- $\kappa$ B- und des JAK-STAT-Signalwegs eine mögliche Therapiestrategie für B-Zell-Lymphome darstellen kann. Grundlegende Herausforderungen stellen dabei die Heterogenität und Plastizität des Metabolismus maligner Zellen sowie das komplexe Wechselspiel der zellulären Signalgebung mit der Tumormikroumgebung dar (Martinez-Outschoorn et al. 2017).

Zusammenfassend gibt die vorliegende Arbeit einen Einblick in den Serin- und Glycin-Metabolismus der B-Zelllinie P493-6 und dessen Bedeutung für die IL10- und CpG-vermittelte Zellproliferation. Exogenes Serin und Glycin trug kontextabhängig unter Bedingungen eines erhöhten Glutaminangebots signifikant zur Proliferation von IL10 und CpG stimulierten P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen bei. Demgegenüber war der Beitrag von Glucose jedoch bedeutender. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Biosynthese maßgeblich über den NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie im Falle der *PSAT1* und *PSPH* auch über den JAK-STAT-Signalweg vermittelt wird. Darüber hinaus war erstmalig nachzuweisen, dass die *PSAT1* als ein zentrales Enzym der *de-novo*-Serinsynthese wichtig für die Proliferation der P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen ist. Weiterführende Untersuchungen zum Serin- und Glycin-Stoffwechsel und speziell zur *PSAT1* sowie der zugrundeliegenden JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalgebung sind zum besseren Verständnis des B-Zell-Metabolismus notwendig. Dies könnte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien bei B-Zell-Lymphomen beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Ein wesentliches Merkmal von Tumorzellen stellt die Reprogrammierung des Zellmetabolismus dar. Auch die komplexe Genese aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome wie dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) geht mit einem Umbau des zellulären Stoffwechsels einher. Dem besseren Verständnis metabolischer Veränderungen in B-Zellen und der zugrundeliegenden Signalgebung kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

In vorhergehenden Analysen zeigte sich die Proliferation aktivierter B-Zellen, die durch die beiden Faktoren der Mikroumgebung IL10 und CpG stimuliert wurden, abhängig von Glutamin. Zentral ist dabei die Aspartat-Aminotransferase (GOT2), deren Expression durch eine kooperative JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalgebung induziert wird. Die Glutaminabhängigkeit ist jedoch nicht ausschließlich auf die GOT2 zurückzuführen, sodass ein Beitrag weiterer Glutamat-verbrauchender Transaminasen angenommen wird. Hieraus leitet sich die Hypothese dieser Arbeit ab, wonach die Phosphoserin-Aminotransferase 1 (PSAT1) und der damit verbundene Serin- und Glycin-Metabolismus wichtig für die B-Zell-Proliferation ist. Das Ziel war es daher zu analysieren, welche Auswirkung ein Mangel von Serin und Glycin sowie ein Knockdown der *PSAT1* allein oder in Kombination mit der *GOT2* auf die B-Zell-Proliferation hat. Weiterführend sollte der Einfluss des JAK-STAT- und NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die Expression der Enzyme der Serin- und Glycin-Synthese untersucht werden. Die Analyse erfolgte anhand der B-Zelllinie P493-6, die über ein kontrollierbares MYC-Plasmid verfügt und hier als ein Modell für ruhende oder mittels IL10 und CpG aktivierte B-Zellen sowie proliferierende MYC-transformierte B-Zellen diente.

Es konnte gezeigt werden, dass Serin und Glycin signifikant zur Proliferation von IL10- und CpG-stimulierten P493-6 MYC<sup>low</sup>-Zellen beitragen. Dies war abhängig von der vorhandenen Glutaminkonzentration. Erstmals war eine Abhängigkeit der IL10- und CpG-induzierten B-Zell-Proliferation von der PSAT1 und somit indirekt von der *de-novo*-Serinsynthese nachzuweisen. Die PSAT1 zeigte sich vergleichbar relevant für die Zellproliferation wie die GOT2. Der Knockdown beider Transaminasen führte jedoch weder zu einer weiteren Reduktion der Zellproliferation noch zu einer kompensatorischen Expressionssteigerung weiterer Enzyme der Serin- und Glycin-Synthese. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der Enzyme der Serin- und Glycin-Synthese maßgeblich über den NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie im Falle der *PSAT1* auch über den JAK-STAT-Signalweg vermittelt wird.

Die anhand der Modellzelllinie P493-6 gewonnenen Ergebnisse geben einen Einblick in den Serin- und Glycin-Metabolismus aktivierter und MYC-transformierter B-Zellen. Weiterführende Analysen sind notwendig, um das Wissen zum Serin- und Glycin-Stoffwechsel und der PSAT1 in B-Zell-Lymphomen zu vertiefen. Dies kann dazu beitragen prognostisch relevante Merkmale aufzuzeigen und zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X et al. (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511
- Altman BJ, Dang CV (2012): Normal and cancer cell metabolism: lymphocytes and lymphoma. *FEBS J* 279, 2598–2609
- Altman BJ, Stine ZE, Dang CV (2016): From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16, 619–634
- Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1993): Oncogenic Activity of the c-Myc Protein Requires Dimerization with Max. *Cell* 72, 233–245
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G (2014): Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci* 39, 191–198
- Amini RM, Berglund M, Rosenquist R, Heideman A von, Lagercrantz S, Thunberg U, Bergh J, Sundström C, Glimelius B, Enblad G (2002): A Novel B-cell line (U-2932) Established from a Patient with Diffuse Large B-cell Lymphoma Following Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 43, 2179–2189
- Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F (2017): Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 390, 298–310
- Awasthi N, Liongue C, Ward AC (2021): STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *J Hematol Oncol* 14, 198
- Basso K, Dalla-Favera R (2015): Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* 15, 172–184
- Béguelin W, Sawh S, Chambwe N, Chan FC, Jiang Y, Choo JW, Scott DW, Chalmers A, Geng H, Tsikitas L et al. (2015): IL10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia* 29, 1684–1694
- Berndt SI: Non-Hodgkin lymphoma - Complex etiology, including the role of immune function. In: Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW (Hrsg.): *World Cancer Report - Cancer research for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2020, 468–476
- Białopiotrowicz E, Noyszewska-Kania M, Kachamakova-Trojanowska N, Łoboda A, Cybulska M, Grochowska A, Kopczyński M, Mikula M, Prochorec-Sobieszek M, Firczuk M et al. (2020): Serine Biosynthesis Pathway Supports MYC-miR-494-EZH2 Feed-Forward Circuit Necessary to Maintain Metabolic and Epigenetic Reprogramming of Burkitt Lymphoma Cells. *Cancers* 12, 580
- Blackwood EM, Eisenman RN (1991): Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science* 251, 1211–1217

- Boxer LM, Dang CV (2001): Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595–5610
- Buqué A, Galluzzi L, Montrose DC (2021): Targeting Serine in Cancer: Is Two Better Than One? *Trends Cancer* 7, 668–670
- Carr M, Mamand S, Chapman KL, Perrior T, Wagner SD (2020): IKK $\epsilon$  and TBK1 in diffuse large B-cell lymphoma: A possible mechanism of action of an IKK $\epsilon$ /TBK1 inhibitor to repress NF- $\kappa$ B and IL-10 signalling. *J Cell Mol Med* 24, 11573–11582
- Chan YC, Chang YC, Chuang HH, Yang YC, Lin YF, Huang MS, Hsiao M, Yang CJ, Hua KT (2020): Overexpression of PSAT1 promotes metastasis of lung adenocarcinoma by suppressing the IRF1-IFN $\gamma$  axis. *Oncogene* 39, 2509–2522
- Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH et al. (2012): Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* 491, 458–462
- Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Jegou G (2008): Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 112, 2205–2213
- Choi BH, Rawat V, Högström J, Burns PA, Conger KO, Ozgurses ME, Patel JM, Mehta TS, Warren A, Selfors LM et al. (2022): Lineage-specific silencing of PSAT1 induces serine auxotrophy and sensitivity to dietary serine starvation in luminal breast tumors. *Cell Rep* 38, 110278
- Coiffier B, Thieblemont C, van den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C et al. (2010): Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 116, 2040–2045
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001): Constitutive Nuclear Factor  $\kappa$ B Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *J Exp Med* 194, 1861–1874
- Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick LS, Quinlivan EP, Coats BS, Shane B, Bailey LB, Gregory JF (2004): Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E272-279
- De Silva NS, Klein U (2015): Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15, 137–148
- DeBerardinis RJ, Chandel NS (2016): Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2, e1600200
- DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D, Tang H, Xie Y, Asara JM, Huffman KE et al. (2015): NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet* 47, 1475–1481

- Ding BB, Yu JJ, Yu RYL, Mendez LM, Shaknovich R, Zhang Y, Cattoretti G, Ye BH (2008): Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 111, 1515–1523
- Ducker GS, Ghergurovich JM, Mainolfi N, Suri V, Jeong SK, Hsin-Jung Li S, Friedman A, Manfredi MG, Gitai Z, Kim H et al. (2017): Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 11404–11409
- Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A (1990): A New Human B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Cell Line (Karpas 422) Exhibiting Both t (14;18) and t(4;11) Chromosomal Translocations. *Blood* 75, 709–714
- Eilers M, Eisenman RN (2008): Myc's broad reach. *Genes Dev* 22, 2755–2766
- Fan J, Kamphorst JJ, Mathew R, Chung MK, White E, Shlomi T, Rabinowitz JD (2013): Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol Syst Biol* 9, 712
- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester Jr RF, Wolff JA (1948): Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med* 238, 787–793
- Feist M: Synergism of IL10R and TLR9 signaling affects gene expression, proliferation and metabolism in B cells: A comparative study of STAT3/NF- $\kappa$ B and c-Myc mediated effects. *Naturwiss. Diss. Göttingen* 2016
- Feist M, Kemper J, Taruttis F, Rehberg T, Engelmann JC, Gronwald W, Hummel M, Spang R, Kube D (2017): Synergy of interleukin 10 and toll-like receptor 9 signalling in B cell proliferation: Implications for lymphoma pathogenesis. *Int J Cancer* 140, 1147–1158
- Feist M, Schwarzfischer P, Heinrich P, Sun X, Kemper J, von Bonin F, Perez-Rubio P, Taruttis F, Rehberg T, Dettmer K et al. (2018): Cooperative STAT/NF- $\kappa$ B signaling regulates lymphoma metabolic reprogramming and aberrant GOT2 expression. *Nat Commun* 9, 1514
- Feng M, Cui H, Tu W, Li L, Gao Y, Chen L, Li D, Chen X, Xu F, Zhou C et al. (2022): An integrated pan-cancer analysis of PSAT1: A potential biomarker for survival and immunotherapy. *Front Genet* 13, 975381
- Franchina DG, Grusdat M, Brenner D (2018): B-Cell Metabolic Remodeling and Cancer. *Trends Cancer* 4, 138–150
- Gabay M, Li Y, Felsher DW (2014): MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a014241
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, van Eyk JE, Mendell JT et al. (2009): c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765



- Geeraerts SL, Heylen E, De Keersmaecker K, Kampen KR (2021): The ins and outs of serine and glycine metabolism in cancer. *Nat Metab* 3, 131–141
- Haan C, Behrmann I (2007): A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318, 11–19
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674
- Hayden MS, Ghosh S (2012): NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26, 203–234
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745
- Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML et al. (2013): MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 121, 2253–2263
- Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, Manalis SR, Vander Heiden MG (2016): Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell* 36, 540–549
- Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W (2021): The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther* 6, 402
- Ichihara A, Greenberg DM (1955): Pathway of Serine Formation from Carbohydrate in Rat Liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 605–609
- Isaza-Correa JM, Liang Z, van den Berg A, Diepstra A, Visser L (2014): Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J Hematol Oncol* 7, 57
- Jaffe ES, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH: Introduction and overview of the classification of lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Hrsg.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Auflage; International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017, 189–198
- Jia XQ, Zhang S, Zhu HJ, Wang W, Zhu JH, Wang XD, Qiang JF (2016): Increased Expression of PHGDH and Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Transl Oncol* 9, 191–196
- Jin HO, Hong SE, Kim JY, Jang SK, Kim YS, Sim JH, Oh AC, Kim H, Hong YJ, Lee JK et al. (2019): Knock-down of PSAT1 Enhances Sensitivity of NSCLC Cells to Glutamine-limiting Conditions. *Anticancer Res* 39, 6723–6730
- Kalhan SC, Hanson RW (2012): Resurgence of Serine: An Often Neglected but Indispensable Amino Acid. *J Biol Chem* 287, 19786–19791
- Kalhan SC, Uppal SO, Moorman JL, Bennett C, Gruca LL, Parimi PS, Dasarathy S, Serre D, Hanson RW (2011): Metabolic and Genomic Response to Dietary Isocaloric Protein Restriction in the Rat. *J Biol Chem* 286, 5266–5277

- Kim JW, Zeller KI, Wang Y, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV (2004): Evaluation of Myc E-Box Phylogenetic Footprints in Glycolytic Genes by Chromatin Immunoprecipitation Assays. *Mol Cell Biol* 24, 5923–5936
- Klapproth K, Wirth T (2010): Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol* 149, 484–497
- Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, Monti S, Pinkus GS, Shipp MA, Rodig SJ (2012): Immunohistochemical Detection of MYC-driven Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *PLoS ONE* 7, e33813
- Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y (2010): B Cell Signaling and Fate Decision. *Annu Rev Immunol* 28, 21–55
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, Chan JW, Rosenwald A, Gascoyne RD, Staudt LM (2008): Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- $\kappa$ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 3701–3713
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190–198
- Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Zhang H et al. (2012): Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells. *Cell Metab* 15, 110–121
- Lech-Maranda E, Bienvenu J, Michallet AS, Houot R, Robak T, Coiffier B, Salles G (2006): Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur Cytokine Netw* 17, 60–66
- Li AM, Ye J (2020): The PHGDH enigma: Do cancer cells only need serine or also a redox modulator? *Cancer Lett* 476, 97–105
- Li X, Gracilla D, Cai L, Zhang M, Yu X, Chen X, Zhang J, Long X, Ding HF, Yan C (2021): ATF3 promotes the serine synthesis pathway and tumor growth under dietary serine restriction. *Cell Rep* 36, 109706
- Locasale JW (2013): Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer* 13, 572–583
- Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H et al. (2011): Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* 43, 869–874
- Lourenco C, Resetca D, Redel C, Lin P, MacDonald AS, Ciaccio R, Kenney TMG, Wei Y, Andrews DW, Sunnerhagen M et al. (2021): MYC protein interactors in gene transcription and cancer. *Nat Rev Cancer* 21, 579–591

- Lu L, Zhu F, Zhang M, Li Y, Drennan AC, Kimpara S, Rumball I, Selzer C, Cameron H, Kellicut A et al. (2018): Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E498-E505
- Lunt SY, Vander Heiden MG (2011): Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 441-464
- Luo MY, Zhou Y, Gu WM, Wang C, Shen NX, Dong JK, Lei HM, Tang YB, Liang Q, Zou JH et al. (2022): Metabolic and Nonmetabolic Functions of PSAT1 Coordinate Signaling Cascades to Confer EGFR Inhibitor Resistance and Drive Progression in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 82, 3516-3531
- Maddocks ODK, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH (2016): Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. *Mol Cell* 61, 210-221
- Månsson A, Adner M, Höckerfelt U, Cardell LO (2006): A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* 118, 539-548
- Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagès M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP (2017): Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 11-31
- Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG (2016): The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol* 214, 249-257
- Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, Delarue R, Micallef IN, Peyrade F, Macon WR et al. (2014): Event-Free Survival at 24 Months Is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol* 32, 1066-1073
- Méndez-Lucas A, Lin W, Driscoll PC, Legrave N, Novellasdemunt L, Xie C, Charles M, Wilson Z, Jones NP, Rayport S et al. (2020): Identifying strategies to target the metabolic flexibility of tumours. *Nat Metab* 2, 335-350
- Metcalfe S, Dougherty S, Kruer T, Hasan N, Biyik-Sit R, Reynolds L, Clem BF (2020): Selective loss of phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) suppresses migration, invasion, and experimental metastasis in triple negative breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 37, 187-197
- Meyer N, Penn LZ (2008): Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8, 976-990
- Montrose DC, Saha S, Foronda M, McNally EM, Chen J, Zhou XK, Ha T, Krumsiek J, Buyukozkan M, Verma A et al. (2021): Exogenous and Endogenous Sources of Serine Contribute to Colon Cancer Metabolism, Growth, and Resistance to 5-Fluorouracil. *Cancer Res* 81, 2275-2288
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967): Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA* 199, 519-524

- Moreadith RW, Lehninger AL (1984): The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria. Role of Mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-Dependent Malic Enzyme. *J Biol Chem* 259, 6215–6221
- Mullarky E, Lucki NC, Beheshti Zavareh R, Anglin JL, Gomes AP, Nicolay BN, Wong JCY, Christen S, Takahashi H, Singh PK et al. (2016): Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1778–1783
- Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H et al. (2011): Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470, 115–119
- Ntoufa S, Vilia MG, Stamatopoulos K, Ghia P, Muzio M (2016): Toll-like receptors signaling: A complex network for NF- $\kappa$ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Semin Cancer Biol* 39, 15–25
- O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A (2015): The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med* 66, 311–328
- Ott G, Rosenwald A, Campo E (2013): Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood* 122, 3884–3891
- Pacold ME, Brimacombe KR, Chan SH, Rohde JM, Lewis CA, Swier LJYM, Possemato R, Chen WW, Sullivan LB, Fiske BP et al. (2016): A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat Chem Biol* 12, 452–458
- Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, Kempkes B, Schuhmacher M, Staeger MS, Brielmeier M, Ellwart J, Kohlhuber F, Bornkamm GW et al. (2000): Cell cycle activation by c-myc in a Burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87, 787–793
- Pasqualucci L, Zhang B (2016): Genetic drivers of NF- $\kappa$ B deregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 39, 26–31
- Pavlova NN, Thompson CB (2016): The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 23, 27–47
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB (2004): Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22, 929–979
- Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Österborg A, Trneny M, Shepherd L, Gill DS, Walewski J, Pettengell R, Jaeger U et al. (2011): CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 12, 1013–1022
- Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK et al. (2011): Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350

- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979): Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells. *J Biol Chem* 254, 2669–2676
- Rohde JM, Brimacombe KR, Liu L, Pacold ME, Yasgar A, Cheff DM, Lee TD, Rai G, Baljinnyam B, Li Z et al. (2018): Discovery and optimization of piperazine-1-thiourea-based human phosphoglycerate dehydrogenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 26, 1727–1739
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010): Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 331–344
- Sasaki Y, Iwai K (2015): Roles of the NF- $\kappa$ B Pathway in B-Lymphocyte Biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 393, 177–209
- Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DSB (2009): Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2, 205–214
- Schlosser I, Hölzel M, Hoffmann R, Burtscher H, Kohlhuber F, Schuhmacher M, Chapman R, Weidle UH, Eick D (2005): Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520–524
- Schmitt A, Xu W, Bucher P, Grimm M, Konantz M, Horn H, Zapukhlyak M, Berning P, Brändle M, Jarbouli MA et al. (2021): Dimethyl fumarate induces ferroptosis and impairs NF- $\kappa$ B/STAT3 signaling in DLBCL. *Blood* 138, 871–884
- Schneider I (1972): Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27, 353–365
- Schrader A, Bentink S, Spang R, Lenze D, Hummel M, Kuo M, Arrand JR, Murray PG, Trümper L, Kube D et al. (2012): High Myc activity is an independent negative prognostic factor for diffuse large B cell lymphomas. *Int J Cancer* 131, E348-361
- Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F (1999): Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255–1258
- Scott DW, Gascoyne RD (2014): The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* 14, 517–534
- Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, Kridel R, Barry GS, Hother C, Abrisqueta P et al. (2015): Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol* 33, 2848–2856
- Scott LM, Gandhi MK (2015): Deregulated JAK/STAT signalling in lymphomagenesis, and its implications for the development of new targeted therapies. *Blood Rev* 29, 405–415
- Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, Krymskaya L, Wang L, Weiss LM, Digiusto D, Yu H, Forman S, Jove R (2011): STAT3 Inhibition Is a Therapeutic Strategy for ABC-like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer Res* 71, 3182–3188
- Sehn LH, Salles G (2021): Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 384, 842–858

- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994): Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405–455
- Snell K (1984): Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul* 22, 325–400
- Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV (2015): MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov* 5, 1024–1039
- Sun L, Song L, Wan Q, Wu G, Li X, Wang Y, Wang J, Liu Z, Zhong X, He X et al. (2015): cMyc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions. *Cell Res* 25, 429–444
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249
- Tajan M, Hennequart M, Cheung EC, Zani F, Hock AK, Legrave N, Maddocks ODK, Ridgway RA, Athineos D, Suárez-Bonnet A et al. (2021): Serine synthesis pathway inhibition cooperates with dietary serine and glycine limitation for cancer therapy. *Nat Commun* 12, 366
- Taruttis F, Feist M, Schwarzfischer P, Gronwald W, Kube D, Spang R, Engelmann JC (2017): External calibration with *Drosophila* whole-cell spike-ins delivers absolute mRNA fold changes from human RNA-Seq and qPCR data. *Biotechniques* 62, 53–61
- Tedeschi PM, Markert EK, Gounder M, Lin H, Dvorzhinski D, Dolfi SC, Chan LLY, Qiu J, DiPaola RS, Hirshfield KM et al. (2013): Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. *Cell Death Dis* 4, e877
- Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, Walewski J, André M, Johnson PW, Pfreundschuh M et al. (2015): Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26, v116-125
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354
- Vallabhapurapu S, Karin M (2009): Regulation and Function of NF- $\kappa$ B Transcription Factors in the Immune System. *Annu Rev Immunol* 27, 693–733
- Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ (2017): Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* 18, 374–384
- Wang H, Cui L, Li D, Fan M, Liu Z, Liu C, Pan S, Zhang L, Zhang H, Zhao Y (2020): Overexpression of PSAT1 regulated by G9A sustains cell proliferation in colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther* 5, 47
- Warburg O (1956): On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314

- Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM (1996): IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 394, 365–370
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB et al. (2008): Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18782–18787
- Wise DR, Thompson CB (2010): Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* 35, 427–433
- Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R (2002): Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *J Immunol* 168, 5397–5402
- Wu ZL, Song YQ, Shi YF, Zhu J (2011): High nuclear expression of STAT3 is associated with unfavorable prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 4, 31
- Yang L, Venneti S, Nagrath D (2017): Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng* 19, 163–194
- Yang M, Vousden KH (2016): Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 650–662
- Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, Thompson CB (2012): Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6904–6909
- Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D (2017): 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* 168, 37–57