Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

&

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik IV Klinikum der Universität Ludwig-Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Immunstimulatorische *short-interfering*-RNA als Therapieansatz der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Marcus Zeitlhöfler aus Deggendorf 2022 Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Rothenfußer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Walz
	Priv. Doz. Dr. med. Philipp A. Greif

Mitbetreuung durch

die promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Lichtenegger

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:10.02.2022

III

Meiner Familie in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	<u>1</u>
11	ÜBERBLICK ÜBER DAS KRANKHEITSBILD DER AKUTEN MYFLOISCHEN LEUKÄMIE	1
111	KLINIK UND EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2	KRANKHEITSENTSTEHUNG	
1.1.3	KLASSIFIKATIONEN UND DIAGNOSTIK	
1.1.4	PROGNOSTISCHE FAKTOREN UND PROGNOSEGRUPPEN	
1.1.5	THERAPIE UND PROGNOSE	
1.1.6	AKTUELLE ANSTRENGUNGEN IN DER THERAPIEFORSCHUNG DER AML	
1.2	EINFÜHRUNG IN DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM	
1.2.1	RNA ALS PATHOGEN-ASSOZIIERTES MOLEKULARES MUSTER (PAMP)	9
1.2.3	ZELLTODINDUKTION DURCH AKTIVIERUNG VON RIG-I-LIKE-REZEPTOREN (RLR)	10
1.2.4	ROLLE DER EINZELNEN INTERFERON-SUBTYPEN IN DER IMMUNABWEHR.	
1.3	KONZEPT DER RNA-INTERFERENZ UND SHORT-INTERFERING-RNA	
1.4	IMMUNSTIMULATORISCHE SHORT-INTERFERING-RNA IN DER KREBSTHERAPIE	15
1.5	FRAGESTELLUNG	17
2	MATERIALIEN UND METHODEN	
-		
2.1	Mampaa	10
2.1		18
2.1.1	GERATE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
2.1.2	REAGENZIEN UND REAGENZIENSA I ZE	20
2.1.3	PUFFER UND MEDIEN	
2.1.4	PRIMER UND KINA-SEQUENZEN Üdeosiciut ded vedwendeten Zelli inien	
2.1.5	OBERSICH I DER VERWENDETEN ZELLLINIEN	
2.2		
2.2.1	ΖΕLLΚΟΓΙΟΚ Η ερετεί μίνε νον Τρισμοςρίατ ΡΝΑ συρεί <i>ην μπρο</i> Τρανευριστίον	
2.2.2	TIERSTELLUNG VON TRIPHOSPHAT-KINA DURCH IN-VITRO-TRANSKRIPTION	
2.2.3 2.2.1	$\ddot{\Pi}$ I RANSPERTIONS- OND STIMULATIONSEXFERIMENTE	
2.2.4	MESSINC DES ZEI LÜREDI ERENS	
2.2.5	MESSONG DES ZEELOBEREEDENS	34
2.2.0	Intersuching DER GENERPERSSION DURCH OUANTITATIVE-REVERSE-TRANSCRIPTION	
POLY	MERASE-KETTENREAKTION (ORT-PCR)	34
2.2.8	STATISTISCHE ANALYSEN	36
2.2.9	SOFTWARE	
<u> </u>		
2	ED CEDNICCE	25
<u>3</u>	ERGEBNISSE	
3.1	TRANSFEKTION VON AML-ZELLLINIEN	37
3.1.1	ETABLIERUNG EINES PROTOKOLLS ZUR TRANSFEKTION VON AML-ZELLLINIEN	37
3.1.2	ALLE NEUN GETESTETEN LEUKÄMIE-ZELLLINIEN LASSEN SICH TRANSFIZIEREN	
3.1.3	RNA wird nach Transfektion in das Zellinnere aufgenommen	40

Inhaltsverzeichnis

3.2	UNTERSUCHUNG DER IMMUNSTIMULATION DURCH AKTIVIERUNG VON RIG-I-LIKE-REZEPTOREN	N IN
2 2 1	-ZELLEN	.42
J.Z.1	TEDT WEDDEN	42
222	21εκτ werden	. 74 GN
VIARI	L^{-} DIE STIMOLATION MIT FOLT (I.C.) UND TRIFIOSFITAT-RIVA RESOLTIERT IN EINER VERMINDERTI	
22	ΠΙΑΤ VON ΑΜΙ-ΔΕΕΕΕΝ	. 77
3.3 INTEI	DAS AML-SPEZIFISCHE MUTATIONSPROTEIN AMLT-ETO LASST SICH SELEKTIV DURCH SHORT-	16
2Λ	IDENTIEIZIEDUNG GEEIGNETED ZIEI STDUZTUDEN EÜD EINEN SUODT INTEDEEDING DNA DASIEDTE	. 40
J.T TUED	IDENTIFIZIERUNG GEEIGNETER ZIELSTRUKTUREN FUR EINEN <i>STURT-INTERFERIN</i> G-KINA DASIERTE DADIEANGATZ IN AMI	17 17
	APIEANSATZ IN AML.	.4/
3.4.1 7151 C	NUCLEUPHUSMIN-1, DRUMUDUMAIN-CUNTAINING-PRUTEIN-4 UND PULU-LIRE-NINASE1 ALS	47
LIELS	SIRUKIUKEN FUR EINE SHURI-INIERFERING-RINA-BASIERIEN I HERAPIE-DER AMIL	.4/
3.4.Z	IN OUT-AML3-ZELLEN LASST SICH DER DURCH SHORT-INTERFERING-KINA VERMITTELTE	F 2
KNUL	<i>K-DOWN</i> -EFFEKT DER ZUVOR IDEN HFIZIERTEN ZIELSTRUKTUREN GUT REPRODUZIEREN	. 52
3.5	DIE ZYTOPATHISCHEN EFFEKTE AUF OCI-AML3-ZELLEN DURCH SHORT-INTERFERING-KNA-	F 4
INDU	ZIERTEM KNOCK-DOWN UND IMMUNSTIMULATION SIND ADDITIV	. 54
3.6	OCI-AML3-ZELLEN REAGIEREN EMPFINDLICHER AUF DAS CHEMOTHERAPEUTIKUM CYTARABIN	=0
NACH	I VORAUSGEGANGENEM KNOCK-DOWN VON NUCLEOPHOSMIN-1 DURCH SHORT-INTERFERING-RNA	. 58
<u>4.</u>	DISKUSSION	.60
41	711SAMMENEASSUNG DER EIGENEN FRGERNISSE	60
1.1	VEDCI EICU DED EDCEDNISSE MIT DED I ITEDATIID	.00
т. <u>с</u> 12	VERGLEICH DER ERGEDNISSE MIT DER EITERATUR.	60
4.5	LIMITATIONEN UND HERAUSFORDERUNGEN	.09
<u>5.</u>	ZUSAMMENFASSUNG	72
6.	LITERATURVERZEICHNIS	.74
-		=0
<u>7.</u>	ABKURZUNGSVERZEICHNIS	79
<u>8.</u>	DANKSAGUNG	.83
9	VFRÖFFFNTLICHUNGFN	84
<u></u>		.07
<u>10.</u>	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	<u>.85</u>

1.1 Überblick über das Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie

1.1.1 Klinik und Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der myeloischen Progenitor- oder Stammzellen des Knochenmarks ^{1–3}. Leukämiezellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Mutationen einen Proliferationsvorteil zum einen und einen Differenzierungsblock zum anderen erworben haben ¹. In der Folge kommt es durch das unkontrollierte Wachstum der Leukämiezellen zu einer Störung der normalen Blutbildung. Das klinische Bild zeichnet sich durch den Mangel an kompetenten normalen Blutzellen aus, was sich durch Blutungen, Infektanfälligkeit und Müdigkeit äußert ¹.

Die AML stellt die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter dar mit einer Inzidenz in der westlichen Welt von etwa 3,8 Fällen pro 100000 Einwohner. Hauptsächlich betroffen sind Menschen über 60 Jahre, mit 15 Fällen pro Jahr pro 100000 Einwohner ¹. Pädiatrische AML-Fälle sind selten, haben jedoch die beste therapeutische Prognose mit einem 5-Jahresüberleben von über 60 % ¹.

1.1.2 Krankheitsentstehung

Die Analyse von 200 AML-Proben durch Gen- oder Exom-Sequenzierungen identifizierte pro AML-Genom nur etwa zehn bis 20 Mutationen. Davon fanden sich nur sehr wenige in Genen, die häufig wiederkehrend in AML mutiert sind ^{1,4}. Aus diesen funktionale, für die Krankheitsentstehung wichtige Ergebnissen wurden Mutationskategorien formuliert: Transkriptionsfaktor-Fusionen, Mutationen im Nucleophosmin-1-Gen, mutierte Tumorsuppressionsgene, Mutationen in DNA-Methylierungs-Genen, Signalwegs-Mutationen, Mutationen in Chromatinmodifizierenden Genen, Mutationen in myeloischen Transkriptionsfaktor-Genen,

mutierte Cohesin-Komplex-Gene, sowie veränderte *Spliceosome-Complex*-Gene. ^{1–4} Abbildung 1-1 stellt AML-relevante Mutationskategorien dar.

Das klassische Modell zur Pathogenese der AML besagt, dass zwei Mutationen stattfinden müssen: eine, die der Zelle einen Proliferationsvorteil verschafft, und eine, die einen Differenzierungsblock verursacht ¹. Nach dem heutigen Konzept, das eine Erweiterung dieses Modells ist, geht man von einer initialen Mutation in einer hämatopoetischen Stammzelle aus, welche so einen Proliferationsvorteil erlangt und klonal expandiert ¹.

In der Folge wird durch das Eintreten einer oder mehrerer kooperierender Mutationen die Transformation zur AML komplettiert. Aus diesem malignen Gründungsklon können weitere Subklone entstehen, so dass Zeitpunkt zum der Krankheitsmanifestation ein oligoklonales Geschehen vorliegt ¹. Das Erscheinungsbild der Erkrankung wird maßgeblich durch die Art der initialen und kooperierenden Gründungsklons beeinflusst ¹. Während Mutationen des des weiteren Krankheitsverlaufs kann sich das Mutationsprofil durch weitere Mutationen ändern ¹. Darüber hinaus kann durch Chemotherapie ein dominanter Subklon selektioniert werden, welcher weniger empfindlich für die Therapieform ist ¹.

Mutationen des *FMS-like-tyrosine-kinase-3*-Rezeptors (FLT3) gehören zu den häufigsten Mutationen in der AML. In etwa 20 % aller AML-Fälle ist FLT3 durch das Einfügen von *internal-tandem*-Duplikationen (ITD) gekennzeichnet ². Das so mutierte FLT3 (FLT3-ITD) ist durch eine ligandenunabhängige Aktivierung des FLT3-Signalwegs mit Inhibierung von Apoptose und unkontrollierter Zellproliferation gekennzeichnet ¹. FLT3-ITD sind vermutlich eher kooperative Mutationen als Initialmutationen. So treten sie häufig zusammen mit Mutationen von *Nucleophosmin-1* (NPM1) auf ¹.

NPM1 ist ein Phosphoprotein, welches als Transportprotein zwischen Nucleus und Zytoplasma dient ⁵. NPM1 hat vielschichtige Funktionen, unter anderem in der Ribosomen-Biogenese, der Kontrolle der Zentrosomenverdopplung sowie der

2

Beeinflussung der zellulären Apoptose durch Interaktion mit Tumorsuppressoren wie TP53, wobei hierbei die Rolle im Signalweg noch nicht ganz verstanden wird ⁶. In etwa 30 % aller adulten AML-Fälle ist NPM1 mutiert ². Mutiertes NPM1 hat seine Funktion als *Shuttle*-Protein verloren und akkumuliert im Zytoplasma ⁵. Die exakte Rolle von NPM1 Mutationen in der malignen Transformation ist noch unbekannt. Falls NPM1 mutiert vorliegt, dann fast immer in allen Subklonen, was entweder auf eine initiale Mutation oder eine sehr früh in der Leukämieentstehung einsetzende Mutation hinweist ¹.

AML1–ETO ist ein Fusionsprotein, welches aus der häufigsten chromosomalen Translokation der AML, t(8; 21) (q22; q22), resultiert und in etwa 10 % aller AML-Fälle von Erwachsenen nachzuweisen ist ⁷. Das Fusionsprotein AML1-ETO führt zu einer Verminderung der Transkriptionsaktivität von AML1 (auch: *Runt related transcription factor 1, RUNX1*) durch die Interaktion von ETO (auch: *RUNX1 translocation partner 1*, RUNX1T1) mit transkriptionellen Co-Repressoren und resultiert so in einer gestörten hämatopoetischen Zellausreifung sowie einer erhöhten Selbsterneuerungsrate von Progenitorzellen ⁷.



Abbildung 1-1 Schematische Übersicht AML-relevanter Mutationskategorien.

Mutationen in Signalwegs-Genen wie FLT3 führen über Aktivierung von proliferationsfördernden Signalwegen zu einem Wachstumsvorteil. Mutationen in myeloischen Transkripitonsfaktoren wie AML1 oder Transkriptionsfaktor-Gen-Fusionen, wie AML1-ETO, resultieren in einer transkriptionellen Deregulation und gestörten hämatologischen Zellausreifung. Mutationen im Nucleophosmin-1-Gen, das für ein multifunktionales nukleo-zytoplasmatisches Shuttle-Protein kodiert, führen zu einer unphysiologischen zytoplasmatischen Lokalisation von NPM1. Mutationen in Genen des Spliceosom-Komplexes sind in der Deregulierung der RNA-Prozessierung involviert. Cohesin-Komplex-Mutationen, STAG2, können die wie Chromosomenteilung und Transkriptionsregulation stören. Mutationen in Genen der epigenetischen Regulation, wie ASXL1. können in einer Deregulierung der Chromatinmodifizierung münden. DNMT3A-Mutationen können zu einer gestörten DNA-Methylierung führen. In Tumorsuppressor-Genen, wie TP53, können Mutationen zu transkriptioneller Deregulation führen.

FLT3: *FMS-like-tyrosine-kinase-3*-Rezeptor; ITD: *internal tandem duplication*; DNMT3A: *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A;* NPM1: *Nucleophosmin-1;* STAG2: *Stromal antigen 2;* ASXL1: *Additional sex combs like 1, transcriptional regulator;* TP53: *Tumor protein p53* X: Mutation (Vereinfachte Darstellung nach Döhner et al. ²)

1.1.3 Klassifikationen und Diagnostik

Diagnostiziert wird die AML durch den Nachweis von mehr als 20 % myeloischer Blasten im Knochenmark oder im Blut ³.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlichte 2001 eine AML Klassifikation, welche 2008 und zuletzt 2016 überarbeitet wurde, um die Fortschritte der Diagnostik und Behandlung zu berücksichtigen. Nach dieser Klassifikation wird die AML in sieben Hauptkategorien unterteilt: AML mit rekurrenten genetischen Abnormalitäten, AML mit myelodysplastischen Veränderungen, Therapiebedingte myeloische Neoplasien, nicht anderweitig spezifizierte AML, Myeloisches Sarkom, Myeloische Proliferation in Verbindung mit Down-Syndrom sowie familiäre myeloische Neoplasien ³.

Klinisch relevanter ist allerdings die Einteilung in Prognosegruppen unter Berücksichtigung von Zytogenetik und molekularen Mutationen welche im Folgenden dargestellt wird.

1.1.4 Prognostische Faktoren und Prognosegruppen

Anhand von prognostischen Faktoren lassen sich Patienten in Risikogruppen hinsichtlich der Therapieresistenz oder therapiebedingter Sterblichkeit (TBS) einteilen. Die TBS stellt zusammen mit Faktoren wie Alter und Komorbidität, eine Entscheidungsgrundlage dar, ob eine intensivierte Therapie möglich ist ^{2,3}.

Im Gegensatz dazu gibt das leukämiegenetische Mutationsprofil Hinweise auf die Therapieresistenz ^{2,3}. Darauf aufbauend erfolgt die Stratifikation anhand der Molekulargenetik und Zytogenetik nach dem *European LeukemiaNet* (ELN) in drei prognostische Gruppen mit günstigem, intermediärem und ungünstigem Risikoprofil wie in Tabelle 1-1 zu sehen ist ³.

Prognostisch günstiger sind unter anderem AML-Formen mit Expression des AML1-ETO Fusionsgens (auch RUNX1-RUNX1T1 Fusionsgen), oder Formen mit mutiertem NPM1 ohne oder nur im geringen Maße gleichzeitigem Auftreten einer FLT3-ITD ^{2,3}. Zu den intermediären Formen zählen unter anderem AML Formen bei denen NPM1 mutiert vorliegt und FLT3 durch ein höheres Maß an ITD mutiert ist ³. Außerdem

weisen intermediäre Formen meist keine chromosomalen Veränderungen auf, oder nur solche, welche weder günstig noch als ungünstig klassifizieren. Prognostisch ungünstig sind unter anderen Formen welche unbalancierte, chromosomale Rearrangements oder den Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen aufweisen. Dies wird als komplexer Karyotyp bezeichnet ^{1–3}.

Prognosegruppe	Genetische Veränderungen
günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 Fusionsgen;
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Fusionsgen
	Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT-ITD ^{niedrig} *
	CEBPA mit mutierten Allelen
intermediär	Mutiertes NPM1 und FLT3-ITD ^{hoch *}
	Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{niedrig} *(ohne ungünstige
	genetische Veränderungen)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Fusionsgen &
	Zytogenetische Veränderungen die nicht als günstig oder ungünstig
	eingestuft sind
ungünstig	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 Fusionsgen
	t(v;11q23.3); KMT2A rearrangiert
	t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 Fusionsgen
	inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1)
	- 5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Komplexer Karyotyp ^{#,} monosomaler Karyotyp [%]
	Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD ^{hoch} *
	RUNX1 Mutationen **
	ASXL1 Mutationen **
	TP53 Mutationen

Tabelle 1-1 AML-Einteilung in Prognosegruppen gemäß European LeukemiaNet (ELN)

* niedrig, niedriger Allelquotient (<0.5); hoch, hoher Allelquotient (>0.5);

[&] t(9;11)(p21.3;q23,3) bewirkt die Einstufung in die intermediäre Risikogruppe, auch bei gleichzeitiger Anwesenheit als ungünstig klassifizierter genetischer Veränderungen.

[#] Drei oder mehr unabhängige Chromosomenaberrationen in Abwesenheit einer von der WHO klassifizierten wiederkehrenden Translokation oder Inversion (d.h. t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) oder t(3;3); AML mit BCR-ABL1)

[%] Eine Monosomie (mit Ausnahme eines Verlusts von einem X- oder Y-Chromosom) in Verbindung mit mindestens einer zusätzlichen Monosomie oder strukturellen Chromosomenanomalie (mit Ausnahme von *Core-Binding-Factor-AML*)

** Nur als ungünstig einzustufen, wenn gleichzeitig keine als günstig klassifizierten Marker vorliegen

CBFB: Core-Binding Factor Subunit Beta; CEBPA: CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha; MYH11: myosin heavy chain 11; MLLT3: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to 3; KMT2A: Lysine (K)-specific methyltransferase 2A; NUP214: Nucleoporin 214kDa; BCR: Breakpoint cluster region; ABL1: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1; GATA2: GATA binding protein 2); MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1 (modifiziert übenommen von Latuske 2018⁸ nach Döhner et al 2017³)

1.1.5 Therapie und Prognose

Zunächst unterscheidet man zwischen intensiver und nicht-intensiver Therapie. Dies richtet sich nach der TBS wie oben beschrieben. Die intensive Therapie wird wiederum in Induktionstherapie und Postremissionstherapie eingeteilt ³.

Die Induktionstherapie hat eine komplette Remission der Krankheit zum Ziel und basiert überwiegend auf Cytarabin, einem Nukleosidanalogon, in Kombination mit einem Anthrazyklin, wie Daunorubicin. Dieses Regime führt in bis zu 80 % der unter 60-jährigen und in bis zu 60 % der über 60-jährigen Erkrankten zu einer kompletten Remission ^{1,2}. Aber selbst nach Erreichen einer kompletten Remission kommt es bei fast allen Fällen ohne weitere Therapie zu einem Rezidiv ¹.

Daher folgt einer erfolgreichen Remission eine Postremissionstherapie: entsprechend dem genetischen Risikoprofil der zugrundeliegenden AML-Form entweder durch Monotherapie mit hochdosiertem Cytarabin über mehrere Zyklen, oder durch eine allogene Stammzelltransplantation ^{2,3}. Allerdings beträgt die Rezidivrate auch unter Postremissionstherapie mit Chemotherapie etwa 50 % und nach Stammzelltransplantation etwa 30 %, so dass insgesamt die 5-Jahres-Überlebensrate 30-40% beträgt ³.

Patienten die nicht für eine intensivierte Therapie geeignet sind, werden üblicherweise mit niedrig dosierten Chemotherapien auf Cytarabin-Basis behandelt oder werden in klinische Studien mit neuen Medikamenten eingeschlossen ³. Das mediane Überleben in dieser Patientengruppe beträgt lediglich 5-6 Monate ³.

So liegt insgesamt das 5-Jahresüberleben aufgeschlüsselt nach Altersgruppen bei 60% der pädiatrischen Fälle, 10-50% bei den jungen Erwachsenen und nur etwa 10% bei den über 75-jährigen Erkrankten ¹. Ausschlaggebend für die schlechte Prognose im höheren Alter sind ungünstigere leukämische Mutationsmuster sowie limitierte Therapieoptionen aufgrund eines reduzierten Allgemeinzustands oder Vorerkrankungen ².

1.1.6 Aktuelle Anstrengungen in der Therapieforschung der AML

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Therapieerfolg der AML vor allem bei älteren Patienten immer noch sehr schlecht ist und dringender Bedarf an neuen Behandlungsmethoden besteht. Zum einen liefern die Ergebnisse aus großen molekulargenetischen Studien immer weitere Einblicke in die Pathogenese der AML und identifizieren AML-relevante Gene, welche als Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien genutzt werden können, zumal der evolutionäre Charakter im Krankheitsverlauf eine flexible, multimodale Therapie erfordern könnte. Zum anderen liefert die Erforschung des Immunsystems weitere therapeutische Ansatzstellen. Die allogene Stammzelltransplantation mit ihrem *Graft-vs*-Leukämie Effekt, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die köperfremden transplantierten Immunzellen die Leukämiezellen bekämpfen, stellt die effektivste Therapieform dar ². Neuere AML-Therapie-Strategien versuchen daher, sich eine Aktivierung des Immunsystems zunutze zu machen ⁹.

1.2 Einführung in das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem von Wirbeltieren und Menschen besteht aus zwei sich ergänzenden Teilen, um mikrobielle Pathogene und auch entartete Körper-eigene Zellen zu erkennen und zu bekämpfen ^{10,11}. Das angeborene Immunsystem stellt hierbei die erste Abwehrlinie dar und beruht auf dem Prinzip der Erkennung von Pathogen-assozierten molekularen Strukturen (*pathogen-associated*

molecular patterns, PAMP) durch eine limitierte Anzahl von in der Keimbahn angelegten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR)¹⁰. PAMP sind meist für den Lebenszyklus von pathogenen Mikroorganismen wichtige Strukturen ¹⁰. Neben Körper-fremden Strukturen, wie Lipopolysacharide oder Flagellin, stellen auch Nukleinsäuren PAMP dar ¹⁰. Die Unterscheidung zwischen Körper-fremder und -eigener RNA und DNA ist essentiell, um eine limitierte, adäquate Immunantwort auszulösen und eine überschießende durch Erkennung von Selbst-RNA und -DNA zu vermeiden ¹⁰.

1.2.1 RNA als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP)

Die RNA-Struktur in Verbindung mit ihrer Lokalisation stellt eine sehr wichtige Unterscheidungsgrundlage zwischen eigener und nicht-eigener RNA dar. RNA-Sekundärstrukturen, welche als fremd eingestuft werden, stellen unter anderem lange dsRNA im Zytosol dar. Diese sind kennzeichnend für DNA und RNA-Virusreplikation und sind abwesend in nicht infizierten Zellen ¹². Eine RNA mit einer 5'-Triphosphat-Gruppe im Zytosol gilt als Zeichen extranukleären Ursprungs und ist somit kennzeichnend für eine virale Infektion ¹². Enzymatische RNA-Biosynthese lässt immer eine freie Triphosphatgruppe am 5'-Ende ¹². Endogene RNA wird im Zellkern synthetisiert und verliert entweder seine Triphosphatgruppe oder verändert deren Zugänglichkeit durch weitere Prozessierung wie das Anfügen einer CAP-Modifikation, bevor sie ins Zytosol transloziert ¹². Somit kann 5'-Triphosphat-RNA im Zytosol als ein Kennzeichen viraler Infektion erkannt werden ¹².

Die Erkennung von zytosolischer RNA erfolgt wesentlich durch die DExD/H-box RNA-Helikasen Retinoic acid inducible gene I (RIG-I), Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) und Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) ^{10,12}. RIG-I und MDA5 besitzen zudem Caspase recruitment domains (CARD), über die sie bei RNA-Erkennung das mitochondriale anti-virale Signalprotein (MAVS, auch Cardif, IPS1 und VISA genannt) aktivieren können ¹². Der aktivierte MAVS-Signalweg führt über *Interferon* regulatory factor 3 (IRF3) und IRF7 zur Induktion von Typ I-IFN und Apoptose sowie Aktivierung des nuclear factor-кВ (NF-ĸB) durch zur Induktion von Entzündungszytokinen wie IL-6, TNF und pro-IL-1 und über das NOD-, LRR- und Pyrindomain-containing-3 (NLRP3) Inflammasoms zur Produktion von aktivem Interleukin-1 β (IL-1 β) ¹². Darüber hinaus werden auch einige Interferon-regulierte Gene (IRG) direkt induziert, welche zu einer Verstärkung der anti-viralen Immunantwort führen, wie beispielsweise eine Induktion von PRR ¹³. Daneben hat RIG-I noch eine direkte antivirale Funktion durch Bindung von viraler genomischer RNA und Interferenz mit viraler Polymerase ¹². Von LGP2 wird angenommen, dass es eine modulierende Funktion auf die Immunantwort von RIG-I und MDA5 hat ¹². MDA5 erkennt lange dsRNA, welche länger als 300 Basenpaare (bp) sind, wie Polyinosin-Polycytidin-Säure

(poly(I:C)), eine synthetische dsRNA ¹². RIG-I wird durch dsRNA von mindestens 18 bis 19 bp Länge mit blanden Enden mit einer 5'-Triphosphat-Gruppe ohne Überhänge aktiviert ¹². Außerdem wird von RIG-I auch 5'-Diphosphat-RNA erkannt, jedoch mit geringerer Affinität ¹². Poly(I:C) kann neben MDA5 auch von RIG-I erkannt werden, was daran liegen könnte, dass durch enzymatische poly(I:C)-Synthese freie Überhänge mit 5'-Diphosphat-Enden entstehen können ¹². Endosomale RNA wird durch Mitglieder der Familie der *Toll like Receptors* (TLR) erkannt. dsRNA wird von TLR3 und TLR7 erkannt, und ssRNA von TLR7 und TLR8. Der Signalweg durch *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ* (TRIF) und *myeloid differentiation primary response protein 88* (MYD88) führt zur Induktion von IRF3 und IRF7 und zur Produktion von Typ I Interferonen, sowie über NF-kB zur Induktion von pro-IL1 und von NLRP3 ¹².

1.2.3 Zelltodinduktion durch Aktivierung von *RIG-I-like*-Rezeptoren (RLR)

Man unterscheidet verschiedene Formen von Zelltod, darunter die programmiert und nicht immunogen ablaufende Apoptose, die programmierten immunogenen Formen Pyroptose und Nekroptose sowie die Nekrose, welche unter Verlust der Membranintegrität einer Zelle abläuft und immunogen ist ¹⁴. Unter immunogenem Zelltod versteht man Zelltodformen, die zu einer Immunantwort mit Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems und somit der Entwicklung eines immunologischen Langzeitgedächtnis einhergehen ¹⁵. Dem zugrunde liegt ein Zusammenspiel von Antigenität sowie Adjuvanzien ¹⁵.

Die Funktion der Adjuvanzien nehmen hierbei die *damage-associated molecular patterns* (DAMP) ein, welche freigesetzt werden und die durch PRR, ähnlich wie die oben genannten PAMP, erkannt werden ¹⁴. DAMP sind körpereigene Stoffe, oft intrazelluläre Moleküle, welche im Normalfall nicht für die Detektion im extrazellulärem Raum durch PRR zugänglich sind ¹⁴. Kommt es jedoch zu einer Schädigung der Zellmembran, werden DAMP freigesetzt ¹⁴. Die Freisetzung von DAMP alleine reicht jedoch nicht, um eine adaptive Immunantwort zu generieren. Dazu müssen von den sterbenden Zellen auch Antigene präsentiert werden, die vormals noch

keine zentrale oder periphere Toleranz ausgelöst haben. Solche neo-Epitope werden durch Gene kodiert welche in der Tumorentstehung oder –progression mutiert wurden ¹⁵. Wichtige Voraussetzung für einen nicht-immunogenen Zelltod ist deshalb die Integrität der Zellmembran während des Sterbevorgangs, wie es bei der Apoptose gegeben ist ¹⁴.

In der Steuerung der Apoptose spielen spezielle Cystein-abhängige-Aspartatspezifische-Proteasen (Caspasen) eine wichtige Rolle ¹⁶. Es werden zwei Wege in der Apoptoseinduktion unterschieden: der intrinsische, mitochondriale Weg sowie der extrinsische, rezeptorgesteuerte Weg ¹⁶. Caspase 9 und Proteine der BCL-2-Gen-Familie stellen dabei wichtige Regulatoren der intrinsischen dar, Caspase 8 sowie Todes-Rezeptoren (*death receptor*; DR), wie DR4 und DR5, und deren Liganden, wie *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), sind Regulatoren der extrinsischen Apoptoseinduktion ^{16,17}.

Induktion von Apoptose durch MAVS-Aktivierung wird unter anderem durch Rekrutierung und Aktivierung von Caspase 9 und 8 eingeleitet oder durch eine IRF3/IRF7-abhängige Hochregulation der pro-apoptotisch wirkenden Proteine TRAIL, *P53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) und NOXA (auch *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1,* PMAIP1) sowie durch Herabregulation der anti-apoptotisch wirkenden Gene BCL2, *Baculoviral IAP repeat containing 3* (BIRC3) und *Protein kinase C epsilon* (PRKCE) ^{12,17–20}. Daneben wurde eine direkte Aktivierung von pro-apoptotisch wirksamem BCL-2-assoziierten X-Protein (Bax) durch IRF3 beschrieben ^{12,21}.

Eine Übersicht über die RNA-Erkennung durch RIG-I oder MDA5 und konsekutive MAVS-Aktivierung und Induktion von Apoptose und Pyroptose ist in Abbildung 1-2 dargestellt.





Abbildung 1-2 Apoptoseinduktion durch RNA-Erkennung durch RIG-I-*like***-Rezeptoren.** 3p-RNA oder poly(I:C) wird von RIG-I oder MDA5 im Zytosol erkannt. Diese translozieren an MAVS und aktivieren es. Es folgt die Rekrutierung von IRF3 und IRF7, welche dann in den Nucleus translozieren und dort die Transkription von IRGs und Interferonen induzieren. Außerdem fördern sie die Transkription von pro-apoptotischen Genen wie PUMA und Noxa. Der aktivierte MAVS-Signalweg bewirkt zudem die Induktion der Apoptose-auslösenden Caspase 8 und 9, BAX sowie die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Induktion von Pyroptose. IL-1 β : Interleukin-1 β ; NLRP3: *NOD-, LRR- and pyrin-domain containing 3;* IRG: Interferon-regulierte Gene; RIG-I: *Retinoic acid inducible gene-I*; MDA5: *Melanoma differentiation-associated gene 5;* IRF: *Interferon regulatory factor;* MAVS: *Mitochondrial antiviral signaling*; BAX: *BCL2 associated X, apoptosis regulator;*

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis; Bcl-2: B cell leukemia/lymphoma 2; BIRC3: baculoviral IAP repeat containing ;

PRKCE: protein kinase C epsilon; IFN: Interferon; IFNaR: Typ I-IFN-Rezeptor;

3p-RNA: 5'-Triphosphat-RNA; poly(I:C): Polyinosin-Polycytidin-Säure

(Vereinfachte Darstellung nach Schlee et al. ¹²)

1.2.4 Rolle der einzelnen Interferon-Subtypen in der Immunabwehr

Wie oben bereits beschrieben, ist die Produktion von Typ I-Interferon eine der Folgen der Erkennung von Nukleinsäuren durch PRR des angeborenen Immunsystems. Typ I-Interferon wurde als Inhibitor der viralen Replikation 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben ^{12,13,22,23}.

Insgesamt kennt man heute neben Typ I- auch noch Typ II- und Typ III-Interferone. Zu den Typ I-IFN zählen IFN α , wobei 13 Untertypen unterschieden werden, IFN β , IFN ϵ , IFN κ und IFN ω ¹³. Typ I-IFN können von beinahe jeder Zelle produziert werden, jedoch wird der Großteil während einer Infektion von plasmazytoiden dendritischen Zellen sezerniert ¹³. Die Untertypen der Typ I-IFN zeichnen sich durch unterschiedliche Gewebsspezifität und Affinitätsunterschiede zu ihrem Wirkungsrezeptor, dem IFN α -Rezeptor (IFN α R), aus ¹³.

IFN γ stellt den einzigen Vertreter der Typ II-Interferone dar und wirkt über den INF- γ -Rezeptor ¹³. Es wird fast ausschließlich von Immunzellen produziert, jedoch wird sein Rezeptor von fast allen Zelltypen exprimiert ¹³. Es spielt eine vielseitige Rolle in der Etablierung von zellulärer Immunität und stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar ¹³. IFN γ -induziertes Protein 10 (IP-10) hat hierbei als Chemokin eine wichtige Funktion in der Rekrutierung von T-Lymphozyten, natürlichen Killer (NK)-Zellen und Monozyten ^{24–26}.

Typ III-Interferone wurden 2003 erstbeschrieben und umfassen vier Vertreter ¹³. Sie sind mit den Zytokinen der IL-10-Familie strukturell verwandt ¹³. Sie sind in ihrer Wirkung den Typ I-IFN sehr ähnlich und induzieren viele der gleichen ISG ¹³. Hervorzuheben ist die gewebsrestringierte Expression des IFN- λ Rezeptors 1 (INFLR1) welcher nur in Epithelzellen exprimiert wird ¹³.

1.3 Konzept der RNA-Interferenz und short-interfering-RNA

RNA-Interferenz beschreibt zellulären (RNAi) einen Mechanismus zum sequenzspezifischen Abbau von mRNA durch kurze RNA-Moleküle und dadurch die Hemmung der Translation von Proteinen²⁷. Die Erstbeschreibung erfolgte von Fire und Mello in dem Fadenwurm Caenorhabditis elegans ²⁸. RNAi ist ein alter eukaryotischer Abwehrmechanismus, der in vielen Nicht-Vertebraten wie Insekten und Pflanzen eine zentrale Rolle in der Virusbekämpfung einnimmt ^{12,27}. In Säugetieren spielt dieser Mechanismus in der viralen Abwehr soweit man bisher weiß keine Rolle, da diese vom Interferon-System und dem adaptiven Immunsystem übernommen wurde ²⁷. Jedoch ist auch in Säugetieren und dem Menschen der Apparat zur RNAi erhalten geblieben, dient dort aber vornehmlich dem microRNA-Weg zur endogenen Genregulation²⁷.

Der klassische Mechanismus, so wie er von Fire und Mello beschrieben wurde, lässt sich in mehrere Abschnitte gliedern. In einem ersten Schritt wird exogen zugeführte, lange dsRNA von DICER, einer RNase Typ III, in kleine, 21 bis 23 bp lange, dsRNA Fragmente gespaltet, welche als siRNA bezeichnet werden ^{27,29}. In einem zweiten Schritt bindet nun dieses kurze RNA-Stück an den RNA-induzierten-*silencing-complex (*RISC), einen Proteinkomplex. Die siRNA bestehen aus zwei Basensträngen, von denen einer identisch und der andere komplementär zur Sequenz der Ziel-mRNA ist ^{27,29}. Der identische Strang wird abgebaut und der komplementäre 5'-Strang dient als Leitstruktur zur Anlagerung des RISC an die mRNA. Der komplementäre mRNA-Strang wird durch RISC gespalten und die Translation dadurch unterbunden ^{27,29}.

In Menschen funktioniert RNAi mit langer dsRNA nicht, was unter anderem daran liegt, dass humanes DICER lange dsRNA nicht so gut schneiden kann ²⁷. Werden hingegen von exogen kurze siRNA appliziert, so können diese auch in humanen Zellen an RISC binden, und die Ziel-*messenger*-RNA (mRNA) kann gespalten werden ³⁰. Im Gegensatz zu einer Deletion eines Gens im Genom, die als Knock-out bezeichnet wird, spricht man hier von einem so genannten Knock-down, was impliziert, dass es sich um keine vollständige und nicht dauerhafte, Herabregulation handelt.

1.4 Immunstimulatorische *short-interfering*-RNA in der Krebstherapie

Tumorentstehung und –wachstum zeichnen sich zum einen dadurch aus, dass Zellen genetische und epigenetische Veränderungen erfahren, welche Einfluss auf die normale Zellproliferation und das Zellüberleben haben und somit einen Proliferationsvorteil und Überlebensvorteil gegenüber gesunden Zellen aufweisen ^{11,31}. Zum anderen wird die Tumorpathogenese von einem Prozess begleitet, den man als Immuneditierung bezeichnet. Viele Tumore sind initial immunogen und werden vom Immunsystem bekämpft. Im Verlauf gelingt es jedoch dem Tumor, durch Mutationen sich dem Immunsystem zu entziehen ^{11,31}.

Aufgrund dieser Plastizität und Dynamik erscheinen Therapieansätze, welche auf der einen Seite das Immunsysteme stimulieren und auf der anderen Seite an Strukturen ansetzen, welche für einen Proliferations- oder Überlebensvorteil von Krebszellen verantwortlich sind, besonders sinnvoll ^{11,31}. Einen solchen Ansatz stellt die Verwendung von bifunktionalen siRNA-Molekülen dar, welche neben dem RNAi-Effekt durch Hinzufügen einer 5'-Triphosphatgruppe (3p-siRNA) über eine RIG-I-Aktivierung immunogen wirken ³¹. Abbildung 1-3 stellt schematisch das Funktionsprinzip dieses Ansatzes dar.

Poeck et al. verwendeten als erste Arbeitsgruppe eine 3p-siRNA gegen das antiapoptotische Bcl-2. Es konnte eine RIG-I-abhängige Immunreaktion in Melanomzellen mit Produktion von Typ I-IFN, Aktivierung von dendritischen Zellen Induktion von Apoptose gezeigt werden. Die sowie Kombination aus Immunstimulation und Bcl-2-Knock-Down war dabei synergistisch und führte zu einer ausgeprägten Apoptoseinduktion in Lungenmetastasen in vivo im Melanom-Mausmodell. Der therapeutische Effekt hierbei war abhängig von Typ I-IFN, NK-Zellen sowie der Herabregulation von Bcl-2 und ging mit einer systemischen Induktion von Typ 1-T-Helferzell-Zytokinen wie INF-γ und IL-12p40 einher. ³¹

Einleitung



Abbildung 1-3 Schematische Darstellung der Funktionsweise von bifunktionaler RNA.

3p-siRNA wird in die Zelle transfiziert. Im Zytosol bindet sie zum einen über die Triphosphatgruppe an RIG-I, was durch Aktivierung des MAVS-Signalwegs zu einer inflammatorischen Immunreaktion mit Zytokinproduktion (IL-1, IFN α/β) führt und Apoptose induziert. Zum anderen führt die Aktivierung des RISC zum Abbau des homologen siRNA-Strangs. Der komplementäre Strang dient als Leitstruktur zur Bindung an die entsprechende mRNA und führt durch Spaltung dieser zu einer Inhibierung der Translation des Zielproteins.

RISC: RNA induced silencing complex; MAVS: Mitochondrial antiviral signaling; RIG-I: Retinoic acid inducible gene-I; CARD: Caspase activating and recruiting domain; 3P: Triphosphatgruppe; OH: Hydroxylgruppe (Darstellung nach Petrocca et al.³²)

1.5 Fragestellung

Die Fragestellung der nachfolgenden Arbeit war, ob das Konzept der bifunktionalen 3psiRNA auch für die akute myeloische Leukämie anwendbar ist. Das gezielte Ausschalten der individuell der Krebskrankheit zugrunde liegenden Mutationen durch siRNA ist aus mehreren Gründen dabei ein attraktives Konzept. Dadurch verspricht man sich zum einen, einen größeren Behandlungserfolg zu erzielen bei geringeren Nebenwirkungen, und zum anderen durch die Kombination von siRNA, die Möglichkeit an mehreren tumorrelevanten Signalwegen gleichzeitig ansetzen zu können ^{33,34}. Die Anpassung der Zielsequenz sowie die Herstellung von siRNA an sich ist einfach und günstig und lässt sich zügig bewerkstelligen ^{33,34}. Somit wäre es möglich, sehr individualisierte Therapieoptionen anzubieten.

Die Kombination des siRNA-Ansatzes mit der gezielten Aktivierung von RIG-I lässt sich durch das Einführen einer 5'-Triphosphat-Modifizierung der siRNA theoretisch einfach bewerkstelligen. Die Kombination von siRNA-mediierter Onkogen-Inhibition und RIG-I-vermittelter Immunaktivierung hat das Potential neben des direkt zytopathischen Effekts auf AML-Zellen synergistisch über das Auslösen eines immunogenen Zelltodes der Leukämiezellen eine gegen den Tumor-gerichtete Aktivierung des adaptiven Immunsystems auszulösen.

In dieser Arbeit sollten daher Grundlagen für dieses Therapiekonzept der bifunktionalen siRNA im Modell der AML getestet werden.

Dazu wurden die folgenden Teilfragestellungen untersucht:

Können AML-Zellen (Zell-Linien, Primärmaterial) mit 3p-siRNA transfiziert werden? Verfügen sie über funktionsfähige RIG-I-like-Rezeptoren, welche nach 3p-Stimulierung eine Immunantwort auslösen?

Ist der Mechanismus der RNAi in AML-Zellen erhalten und zweckmäßig zur Ausschaltung von AML-spezifischen Onkogenen?

Gibt es synergistisches Potenzial der beiden Einzelansätze und sind sie gegebenenfalls auch mit üblicherweise eingesetzten Zytostatika kombinierbar?

2 Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Geräte

Gerät und Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubationsschrank, BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham, USA
CELLview-Glasboden-4-Kompartiment-	Greiner bio-one, Frickenhausen,
Platte	Deutschland
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD Biosciences, San Jose, USA
Elektronische Pipette, Pipett Boy Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt,
	Deutschland
Gefrierschränke -80 °C, HERA freeze	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrier- und Kühlschränke -20 °C/ 4 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe,
	Deutschland
Konfokalmikroskop, TCS SP5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Fischknecht, Balgach,
	Deutschland
PCR-Gerät, Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer, Mithras LB 940®	Berthold Technologies, Bad Wildbad,
	Deutschland
qPCR-Gerät, <i>LightCycler 480 II</i>	Roch Diagnostics, Mannheim,
	Deutschland
Spektrophotometer, NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Zellkultur, Laminar Air-Flow	Heraeus, Hanau, Deutschland
HB 2472 S	
Tischzentrifuge, Centrifuge 5425	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Gerät, Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellkulturmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Zentrifuge, <i>Mulitfuge</i> 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.1.1 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturmaterialien	
Ciprofloxacin	Stada, Bad Homburg, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco`s PBS (1x)	PAA, Linz, Österreich

Fetales-Kälber-Serum (FCS)	GibcoBRL, Paisley, Großbritannien
HEPES-Puffer	PAA, Linz, Österreich
Hoechst-33342 Farbstoff	Pierce Bioscience, Bonn, Deutschland
Isopropanol (70 % vol.)	Apotheke Innenstadt, LMU München
L-Glutamin (200mM)	PAA, Linz, Österreich
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-Well-Rundboden-Zellkulturplatten	Falcon/Corning, Corning, USA
RPMI-1640-Medium	PAA, Linz, Österreich
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zellkulturflaschen	Corning, Corning, USA
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen,
	Deutschland
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen,
	Deutschland

Für Zellkulturexperimente wurden Verbrauchsplastikmaterialien von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Falcon/Corning (Corning, USA), Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) verwendet.

In-vitro-Transkription

Ethanol absolut	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Quick Spin Oligo Columns	Roche, Mannheim, Deutschland
Phenol – Chloroform,	Roth, Karslruhe, Deutschland

Transfektion

Cytarabin	Apotheke Innenstadt, LMU München,
	Deutschland
Humanes IFNα	Sigma, Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipofectamine RNAiMAX reagent	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific,
	Waltham, USA
OptiMEM-Medium	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific,
-	Waltham, USA
Poly(I:C) (Polyinosin-Polycytidin-Säure)	Invivogen, San Diego, USA

Durchflusszytometrie

FACS Flow, FACS Safe	BD Biosciences, San Jose, USA
5 ml-Rundboden-Röhrchen (FACS-	BD Biosciences, San Jose, USA
Röhrchen)	

Apoptose-Färbung	
Annexin-binding-Puffer 10x	BD Biosciences, San Jose, USA
Annexin V-FITC-FLuos	BD Biosciences, San Jose, USA
Propidiumiodid (PI) (c=250 μg/ml)	Immunochemistry Technologies,
	Bloomington, USA

IP-10-ELISA	
Schwefelsäure (H2SO4, 2N)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
cDNA-Umschrieb, qPCR	
Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen,
	Deutschland
dNTP (10 μM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
(Desoxyribonukleosidtriphosphate)	
Oligo-dT-Primer (10 μM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
PCR-Behältnisse,	Biozym Scientific GmbH, Hessisch
"PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml"	Oldendorf, Deutschland
Primer links (10 μM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Primer rechts (10 μM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
qPCR MasterMix, "KAPA Probe FAST	Peqlab/VWR, Radnor, USA
Universal 2x"	
Reverse Transkriptase,	Thermo Scientific, Waltham, USA
"Revert Aid H Minus RT"	
RNase-Inhibitor,	Thermo Scientific, Waltham, USA
_"Riblock RNase Inhibitor"	
RT-Puffer 5x	Thermo Scientific, Waltham, USA
96-Well-PCR-Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch
	Oldendorf, Deutschland

2.1.2 Reagenzien und Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Blue cell viability reagent	Promega, Madison, USA
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, San Jose, USA
Human IP-10-ELISA Set	BD Biosciences, San Jose, USA
IVT-Kit, MegaShortscript T7 Kit	Ambion, Darmstadt, Deutschland
	Roche Diagnostics, Mannheim,
LightCycler 480 Probes Master	Deutschland
qPCR Sonden,	Roche Diagnostics, Mannheim,
	Deutschland
Universal Probe Library Set, human	
RNA-Isolationskit ,	peqlab/VWR, Radnor, USA
"peqGOLD Total RNA Kit"	

2.1.3 Puffer und Medien

2.1.3.1 Zellkultur

Kulturmedium	Kulturmedium ohne Antibiotikum (Abx)	Transfektionsmedium Opti-MEM Medium
RPMI 1640-Medium mit		
- 10 % vol. FCS - 1 % vol. L-Glutamin - 25 mM HEPES-Puffer - 2,5 mg/ml Ciprofloxacin	RPMI 1640-Medium mit - 10 % vol. FCS - 1 % vol. L-Glutamin - 25 mM HEPES-Puffer	Einfrier-Lösung 10 % vol. DMSO in FCS

2.1.3.1 Annexin/PI Färbung

1-fach-Annexin V Bindepuffer

50 µl 10-fach Annexin V-Bindungspuffer in 450 µl ddH20

2.1.4 Primer und RNA-Sequenzen

2.1.4.1 Primer

Alle Primer und die DNA-Templates für die Triphosphat-RNA-Herstellung wurden von der Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) hergestellt. Zur Festlegung der Primersequenzen für die quantitative rtPCR wurde das *Assay*-Design-Programm von Roche (www.lifescience.roche.com) verwendet, welches zugleich passende Fluoreszenz-markierte Sonden der verwendeten Sondenbibliothek (Roche, universal-probe-library) auswählt. Die Sonden-Nummern der nachfolgenden Tabelle beziehen sich auf eben diese Sondenbibliothek.

Gen	forward Primer-Sequenz (5' \rightarrow 3')	Sonde
	reverse Primer-Sequenz (5' \rightarrow 3')	
AML1	ACA AAC CCA CCG CAA GTC	Probe
	CAT CTA GTT TCT GCC GAT GTC TT	#21
AML1-ETO	ACA AAC CCA CCG CAA GTC	Probe
	TGG AGT GCT TCT CAG TAC GAT T	#21
β- Aktin	CCA ACC GCG AGA AGA TGA	Probe
	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG	#64

Materialien und Methoden

BRD4	AGT CGG AGA GCT CCA GTG AG	Probe
	TGT CCA ATG ATT AGG CAG GAC	#17
ETO	AGG ACG CAC TGG CAG TTA TC	Probe
	CAC AAT TCC AGC AAC TCT CG	#18
FLT3	CTC AAA TGG GAG TTT CCA AGA G	Probe
	CCC CAG GTT CAC AAT A	#33
HPRT	TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC	Probe
	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	# 73
MDA5	AGG CAC CAT GGG AAG TGA T	Probe
	GGT AAG GCC TGA GCT GGA G	#36
NPM1	GCG CCA GTG AAG AAA TCT AT	Probe
	CTT CCT CCA CTG CCA GAG AT	#19
PLK1	CAC AGTGTCAATGCCTCCAA	Probe
	TTGCTGACCCAGAAGATGG	#30
RIG-I	TGG ACC CTA CCT ACA TCC TGA	Probe
	GGC CCT TGT TGT TTT TCT CA	#69
// O N		

= Sonden-Nummer der Roche, universal-probe-library

2.1.4.2 DNA-Template für die Herstellung von Triphosphat-RNA durch *invitro*-Transkription

Bezeichnung	Sequenz (5'→3´)
2.2as-Template	GCATGCGACCTCTGTTTGACTATAGTGAGTCGTA

2.1.4.3 RNA

Bezeichnung	<i>Stock</i> - Bezeichnung	Sequenz (5'→3´)
5'-Triphosphat-RNA (3p-RNA)	5'-3p -2.2as RNA	G UCA AAC AGA GGU CGC AUG C
AF488-RNA	2.2as-RNA mit 5'- AlexaFluor488	UCA AAC AGA GGU CGC AUG C

2.1.4.3 siRNA

Die siRNA sowie die 2.2as-AF488-RNA wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Notierung der Sequenzen erfolgte in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung. Die siRNA-Sequenzen korrespondieren mit der jeweiligen kodierenden Sequenz der Ziel-mRNA. Ein Überhang von dTdT wurde jeder Sequenz am 3'-Ende angefügt.

Bezeichnung siRNA	<i>Stock</i> -Bezeichnung siRNA	Sequenz der siRNA (5'→3')
siAML1ETO_1	siAML1ETO_14+5	CCG AGA ACC UCG AAA UCG U(dTdT)
siAML1ETO-2	siAML1ET0_7+12	CCU CGA AAU CGU ACU GAG A(dTdT)
siBRD4	siBRD4_1818	GGA AAG AGG AAG UGG AAG A(dTdT)
siCO4 (CO4-RNA)	siCO4	GCG CUA UCC AGC UUA CGU A(dTdT)
siFLT3	siFLT3_1313	CCA GCC AGG AGA AUA UAU A(dTdT)
siNPM1_1	siNPM1_602	GGA GGA AGA UGC AGA GUC A(dTdT)
siNPM1_2	siNPM1_1375	GGU GGU CAG ACA UGG AAA U(dTdT)
siPLK1_1	siPLK1_1424	AGA UCA CCC UCC UUA AAU A(dTdT)
siPLK1_2	siPLK1_1550	GCG CGA AGG UGA UGA GCU C(dTdT)

2.1.5 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Anbieter/ Quelle	Herkunft	Zytogenetik	AML-typische Mutationen
HL60	ATCC CCL- 240	AML M2, (f), PB	pseudodiploid	
K-562	ATCC CCL- 243	CML, Blasten Krise, Pleuraerguss	triploid	
Kasumi-1	ATCC CRL- 2724	AML M2 (m, juvenil), PB	t(8;21)(q22,q22)	AML1-ETO
MOLM-13	DSMZ ACC 554	AML M5a (m), Rezidiv, sekundäre AML nach MDS, PB	Komplexer Karyotyp	
MV4-11	ATCC CRL- 9591	Biphenotypische B-ALL (m, juvenil), PB	48, xy, t(4;11) (q21;q23), +8, +19	
NB4	AG Prof. Subklewe 3.Medizinisch e Klinik Universität München	AML M3(f), Rezidiv, KM	t(15;17), 12p Rearrangement, 19 Rearrangement	
OCI-AML3	DSMZ ACC 99	AML M4 (m), Primärmaifestation , PB	Komplexer Karyotyp	NPM1 mut A
PL21	DSMZ ACC 536	AML M3 (m)	N0 t(15;17); Komplexer Karyotyp	
THP1	ATCC TIB-202	AML M5b (m), PB		
(f)= weiblich (m)= männlich		PB= peripheres Blut KM= Knochenmark	CML=Chronisch My AML= Akut Myelois	eloische Leukämie che Leukämie

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultur von AML-Zellen

Die Zellkultur sowie alle Experimente wurden unter einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, um steriles Arbeiten gewährleisten zu können.

Die Kultivierung der verwendeten humanen Zelllinien erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit (rH). Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, und die Zellen wurden auf ihre Vitalität hin im Mikroskop überprüft und gesplittet.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Zellen in der Zellkultur vor dem Ausplattieren für Experimente wurden die Zellen mittels Trypan-Blau gefärbt und dann mit einer Neubauer-Zählkammer unter Auflichtmikroskopie gezählt. Bei diesem Prinzip macht man sich die Tatsache zunutze, dass tote Zellen keine intakte Zellwand mehr besitzen, der Farbstoff somit in das Zellinnere gelangt und diese dann unter dem Mikroskop blau erscheinen.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zu 3 ml Einfrier-Lösung in einem 50 ml-Zentrifungenröhrchen wurden 2x10⁶ Zellen ganz langsam hinzugegeben. Nach Schwenken der Zellsuspension wurde diese mit der Pipette aufgenommen und in zwei bis drei 2 ml-Kryo-*tubes* umgefüllt. Dann erfolgte der sofortige Transfer der Kryo-*tubes* in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierblock, welcher sogleich bei -80 °C eingelagert wurde. Nach 24 Stunden wurden die Kryo-*tubes* aus dem Einfrierblock genommen und entweder weiter bei -80 °C für kurzfristige Verwendung, oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Zellen wurden aus dem Stickstofftank oder aus einem -80 °C Gefrierschrank zügig im Wasserbad (37 C°) aufgetaut, mit einer Pipette aufgenommen und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, welches mit 5 ml Kulturmedium ohne Antibiotika gefüllt war. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen mit den suspendierten Zellen auf ein Gesamtvolumen von 30 ml mit Kulturmedium ohne Antibiotika aufgefüllt und 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert und der Überstand verschüttet. Das Zellpellet wurde sodann mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.5 Ausplattieren von AML-Zellen für Experimente

Für alle Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatten $1-6x10^4$ Zellen in einem Volumen von 30 µl Kulturmedium ohne Antibiotikum zu Beginn eines Transfektions-Protokolls ausplattiert und im Verlauf auf ein Volumen zwischen 100 und 200 µl aufgefüllt.

2.2.2 Herstellung von Triphosphat-RNA durch in-vitro-Transkription

Unter *in-vitro*-Transkription (IVT) versteht man ein molekularbiologisches Verfahren, welches erlaubt, RNA enzymatisch in zellfreier Umgebung herzustellen.

Dabei wird ein DNA-Strang (Template) mit Hilfe einer Polymerase, meist der T7-Polymerase, in einen dem Template komplementären RNA-Strang transkribiert.

Für dieses Projekt besonders relevant ist die Tatsache, dass bei der Synthese des RNA-Strangs mittels IVT am 5'-Ende die Triphosphatgruppe des ersten NTPs in der synthetisierten RNA erhalten bleibt und diese daher für die Erkennung durch RIG-I verfügbar ist ³⁵.

Die Enzyme werden dann im Anschluss an die Transkription mit Ammoniumacetat denaturiert, DNasen werden hinzugegeben, um das Template zu degradieren, und die RNA wird mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Das Prinzip beruht darauf, dass Proteine und Nucleinsäuren in dieser zweiphasigen Emulsion unterschiedlich löslich sind. Während sich die denaturierten Proteine in der organischen, unteren Phase sammeln, reichert sich oben die RNA in der wässrigen Phase an.

Die Fällung der RNA erfolgt anschließend in Ethanol bei -20 °C. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen und die RNA in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Hierbei wurde wie in Hamm 2012 ³⁶ beschrieben vorgegangen. Zunächst wurden 1 µl DNA-Hybridisierungspuffer, 2 µl T7 Promoter Primer (100 pmol/ml) und 2 µl DNA-Template (100 pmol/ml). in ein PCR-*tube* gegeben und für 5 Minuten im Thermocycler auf 70 °C erhitzt. Die anschließende Abkühlung auf Raumtemperatur ermöglichte die Bindung der Primer an das Template. In einem zweiten Schritt wurde 5 µl RNase freies Wasser, 2 µl Klenow-Fill-in-Puffer, 2 µl Desoxiribonukleotid-Triphosphat-Mix (2,5 mM) und 1 µl ExoKlenow-DNA-Polymerase hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als nächstes wurde das PCR-*tube* erneut im Thermocycler für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt, um die DNA-Polymerase zu deaktivieren. Das darin enthaltene DNA-Template konnte anschließend für die Transkription verwendet werden.

Das Ansezten der Transkription unter Verwendung des Mega Shortscript T7-Kits (Ambion) erfolgte in einem weiteren PCR-tube gemäß Herstellerangaben. Hierzu wurden 6 µl RNase freies Wasser, 2 µl 10x T7-Rxn-Puffer, je 2 µl ATP, GTP, CTP und UTP (je 75 mM), 2 µl **DNA-Template** und 2 µl **T7-RNA-Polymerase** zusammengegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Verdauung des DNA-Templates erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 µl Turbo-DNase und Inkubation bei 37 °C über 30 Minuten. Danach wurden durch Hinzufügen von 15 µl Ammoniumacetat die DNase inaktiviert, der gesamte Inhalt in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 115 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA erfolgte in einem ersten Schritt durch Zugabe von 150 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und nach kurzem Schütteln durch Zentrifugation bei 12000 g über 5 Minuten. Die obere Phenol-Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und durch Gabe von 150 µl Chloroform und Zentrifugation in einem weiteren Schritt aufgereinigt. Die Fällung der RNA geschah durch Zugabe von 300 µl Ethanol absolut zum Phenol-RNA-Gemisch und anschließender Lagerung bei -20 °C über mindestens 2 Stunden. Danach wurde mit 14000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Durch die Verwendung von Mini Quick Spin Columns (Roche) nach Herstellerangaben wurden die überschüssigen Nukleotide sowie RNA mit einer Länge von weniger als acht Nukleotiden entfernt. Die RNA-Konzentration wurde im Nanodrop durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.2.3 Transfektions- und Stimulationsexperimente

2.2.3.1 Grundlagen zur Transfektion

Mit dem Begriff Transfektion wird das nicht-virale Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen bezeichnet. Man unterscheidet mehrere Verfahren. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren ist die Lipofektion. Das Prinzip beruht darauf, dass Liposomen ebenfalls, so wie die Zellmembran, aus einer Phospholipid-Doppelschicht bestehen und somit mit der Zellmembran verschmelzen können und die umschlossenen Nucleinsäuren in das Zytosol freigeben. Die Aggregation der Liposomen um die Nucleinsäuren beruht darauf, dass die Phospholipide überwiegend positiv und die Nucleinsäuren hingegen negativ geladen sind. RNAiMAX ist ein Lipofektionsreagenz, welches für die Aufnahme von siRNA optimiert wurde.

2.2.3.2 Allgemeine Durchführung der Transfektion von AML-Zellen

Zunächst wurde die entsprechende RNA in ein mit Opti-MEM gefülltes 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit RNAiMAX versetzt und durch Vortexen gut durchmischt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 30 μ l dieses Tranfektionsmixes in jedes Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte mit zuvor in 30 μ l Kulturmedium ohne Antibiotikum ausplattierten Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine mindestens vierstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rH. Erfolgte im Anschluss nicht gleich die Auswertung, so

wurde mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l pro Well ergänzt und die Zellkulturplatte bis zum Auswertungszeitpunkt zurück in den Inkubator gestellt. Bei zweizeitiger Transfektion erfolgte die Mediumgabe nach Ablauf der Inkubationszeit der zweiten Transfektion.

2.2.3.2.1 Transfektionsexperimente mit 2.2as-AlexaFluor488-RNA zur Transfektionskontrolle

Ansatz pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte:			
Transfektionsmix:	Endkonzentration in 60 µl:		
1) 60 ng o.120 ng	c _{RNA:} 1 μg/ml oder 2 μg/ml		
AF488-RNA à	с _{глаімах} : 0,7/1/1,3 % vol.		
0,4/0,6/0,8 μl RNAiMAX	c _{Zellen} : 1,7-10x10 ⁵ Zellen/ml		
in 30 µl Opti-MEM			
2) 60 ng o.120			
ng AF488-RNA ohne			
RNAiMAX in			
30 µl Opti-MEM			
Inkubation: 4-9 Stunden			
	undboden-Zellkulturplatte: Transfektionsmix: 1) 60 ng o.120 ng AF488-RNA à 0,4/0,6/0,8 μl RNAiMAX in 30 μl Opti-MEM 2) 60 ng o.120 ng AF488-RNA ohne RNAiMAX in 30 μl Opti-MEM Inkubation: 4-9 Stunden		

2.2.3.2.2 Transfektion mit siRNA in posttrankriptionellen Gen-Knock-down-Experimenten

Ansatz pro Well einer 96-Well-F	Rundboden-Zellkulturplatte:	
Zellsuspension:	Transfektionsmix:	Endkonzentration in 60 μl
1 – 6 x 104 Zellen in	1.Transfektion:	1.Transfektion:
30 μl Kulturmedium ohne Abx	60 ng siRNA à	c _{RNA:} 1 μg/ml
	0,6 μl RNAiMAX in	CRNAIMAX: 1 % vol.
	30 μl Opti-MEM	c _{Zellen:} 1,7-10x10 ⁵ Zellen/ml
	nach 15-25 Stunden:	
	2.Transfektion:	Endkonzentration in 90 µl
	60 ng siRNA à	2.Transfektion:
	0,6 μl RNAiMAX in	$c_{RNA:}$ 0,7 μ g/ml
	30 μl Opti-MEM	CRNAIMAX: 0,7 % vol.
	Inkubation: 4-10 Stunden	
	Medium: 110 μl	

Bei zweimaliger Transfektion von siRNA erfolgte nach 15- bis 25-stündiger Inkubationszeit die erneute Gabe der gleichen Menge eines frisch angesetzten Tranfektionsmixes.

Sofern der siRNA-Behandlung eine Gabe von Cytarabin folgte, wurde in den unbehandelten Bedingungen zu den Transfektionszeitpunkten nur 30μ l Opti-MEM

ohne siRNA oder Transfektionsreagenz gegeben. 5 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden alle Bedingungen mit Kulturmedium auf ein Volumen von 180 µl pro Well gebracht. Nach weiteren 19 Stunden erfolgte die Gabe von Cytarabin in entsprechenden Verdünnungsstufen in 20 µl Kulturmedium zu den Zellen. Nach 48-stündiger Inkubationszeit erfolgte eine Apoptosefärbung mit Annexin V/PI und im Anschluss daran die durchflusszytometrische Auswertung.

2.2.3.2.3 Transfektion mit poly(I:C), Triphosphat-RNA sowie Stimulation mit Interferon- α in Immunstimulationsexperimenten

Ansatz pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte:			
Zellsuspension:	Transfektionsmix:	Endkonzentration in 60 µl	
1 – 6 x 104 Zellen in	60 ng RNA(poly(I:C) oder 3p-RNA	$c_{\rm RNA:} 1 \mu g/ml$	
30 μl Kulturmedium ohne Abx	+ CO4) à 0,6 μl RNAiMAX in	Crnaimax: 1 % vol.	
	30 μl Opti-MEM	c _{Zellen:} 1,7-10x10 ⁵ Zellen/ml	
	Inkubation: 4-7 Stunden		
	Medium: 140 μl		

Die Gesamtkonzentration an RNA und RNAiMAX betrug jeweils 60 ng RNA und $0,6 \mu$ l RNAiMAX/Well (1 μ g/ml RNA und 1 % vol. RNAiMAX).

Bei kleineren Konzentrationen an poly(I:C) oder Triphosphat-RNA wurde mit einer Kontroll-RNA ergänzt. Als Kontrolle diente eine vorbeschriebene doppelsträngige Kontroll-RNA (CO4-RNA) ohne triphosphat-Modifikation und ohne humanes oder murines Zielgen (Referenz ^{17,31,37}). Sofern mit Interferon- α (INF- α) stimuliert wurde, wurde zu den ausplattierten Zellen INF- α in Kulturmedium entsprechend verdünnt gegeben, so dass die Endkonzentration 1000 IU/ml (Internationale Einheiten/ml) betrug. Nach vierstündiger Stimulation im Inkubator erfolgte die Auswertung.

Ansatz pro Well einer 96-Well-	Rundboden-Zellkulturplatte:	
Zellsuspension:	Transfektionsmix:	Endkonzentration in 60 µl
1 x10 ⁴ Zellen in	3p-RNA/siRNA = 2/1	3p-RNA/siRNA = 2/1
30 μl Kulturmedium ohne Abx	90 ng RNA(60 ng 3p-RNA +	c _{RNA:} 1,5 μg/ml oder 1 μg/ml
	30 ng siRNA) à 0,6 μl RNAiMAX	c _{RNAiMAX} : 1 % vol. oder
	in 30 μl oder 60 μl Opti-MEM	0,7 % vol.
		c _{Zellen:} 1,7x10 ⁵ Zellen/ml oder
	3p-RNA/siRNA = 1/1	1,1x10 ⁵ Zellen/ml
	60 ng RNA(30 ng 3p-RNA +	
	30 ng siRNA) à 0,6 μl RNAiMAX	3p-RNA/siRNA = 1/1
	in 30 μl Opti-MEM	c _{RNA:} 1 μg/ml
		crnaimax: 1 % vol.
	Inkubation: 5-24 Stunden	c _{Zellen:} 1,7x10 ⁵ Zellen/ml
	Medium: 140 μl	
	in 30 μl oder 60 μl Opti-MEM 3p-RNA/siRNA = 1/1 60 ng RNA(30 ng 3p-RNA + 30 ng siRNA) à 0,6 μl RNAiMAX in 30 μl Opti-MEM Inkubation: 5-24 Stunden Medium: 140 μl	$C_{RNAIMAX}$. 1 % vol. odel 0,7 % vol. $C_{Zellen:}$ 1,7x10 ⁵ Zellen/ml oder 1,1x10 ⁵ Zellen/ml 3p-RNA/siRNA = 1/1 $C_{RNA:}$ 1 µg/ml $C_{RNAIMAX}$: 1 % vol. $C_{Zellen:}$ 1,7x10 ⁵ Zellen/ml

2.2.3.2.4 Ko-Transfektion mit siRNA und Triphosphat-RNA in kombinierten Knock-down- und Immunstimulationsexperimenten

Die entsprechenden Mengen an Triphosphat-RNA (oder CO4 als Negativkontrolle), wurden gemeinsam mit der entsprechenden siRNA Menge in Opti-MEM vorgelegt, dann mit RNAiMAX versetzt und nach zehnminütiger Inkubationszeit jeweils die entsprechende Tranfektionsmixmenge zu den Zellen gegeben.

2.2.4 Überprüfung der Transfizierbarkeit von AML-Zellen

2.2.4.1 Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie

Vier Stunden nach der Transfektion mit AF488-RNA wurden die Zellen aus der Zellkulturplatte aufgenommen und in ein mit 2 ml PBS gefülltes FACS Röhrchen transferiert und durch Zentrifugation mit 400 g für 5 Minuten bei 4 °C gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet durch Vortexen gelöst und in 100 μ l PBS resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im FL-1-Kanal des FACS Calibur; die Auswertung mit der Software FlowJo.

2.2.4.2 Konfokalmikroskopie

Die Zellen wurden mit AF488-RNA transfiziert wie oben beschrieben. Nach sechseinhalbstündiger Inkubationszeit wurden 140 µl Kulturmedium pro Well
hinzugegeben und die Zellen über Nacht im Inkubator gestellt. 22 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aus der 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte aufgenommen, in mit 2 ml PBS gefüllte FACS-Röhrchen gegeben und durch Zentrifugation (400 g, 5 Minuten, 4 °C) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 150 μ l PBS resuspendiert und mit 0,5 μ l Hoechst-33342-Farbstoff zum Anfärben der Zellkerne versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen in eine *CELLview*-Glasboden-Platte transferiert und dann mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet.

2.2.5 Messung des Zellüberlebens

2.2.5.1 Überlebensbestimmung anhand von Zellmorphologie mittels Durchflusszytometrie

Funktionsprinzip

Bei dieser Art der Auswertung macht man sich zu Nutze, dass tote Zellen ein anderes Lichtbeugungs- und –brechungsmuster aufweisen als vitale Zellen. Diese Veränderung kann man durch Messung der Lichtstreuung im Längs- und Querfeld der Durchflusszytometrie ermitteln und anhand dessen lebende und tote Zellen in verschiedene Subpopulationen einteilen.

Durchführung der Auswertung

Zum gewünschten Auswertungszeitpunkt wurden die Zellen der einzelnen Bedingungen in ihren Wells durch Pipettieren gut durchmischt, aus der Zellkulturplatte aufgenommen und in ein mit 2 ml PBS gefülltes FACS-Röhrchen transferiert und durch Zentrifugation mit 400 g für 5 Minuten bei 4 °C gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet durch Vortexen gelöst und in 100 µl PBS resuspendiert. Gemessen wurde die Lichtbeugung und -brechung an der Zelle im *forward-* und *side-scatter.* Die Datenauswertung erfolgte mittels der Software FlowJo.

2.2.5.2 Überlebensbestimmung durch Annexin V-FITC/Propidiumiodid Färbung und Detektion in der Durchflusszytometrie

Allgemeines Prinzip der Apoptose-Färbung

Zur genaueren Untersuchung, ob Zellen apoptotisch oder nekrotisch sind, können mit Fluorochrom gekoppelte Annexine zur verwendet werden. Das Prinzip hierbei fußt darauf, dass im Anfangsstadium der Apoptose selektiv Phosphatidylserine nach außen an die Zelloberfläche "flippen" und dadurch die Bindung von Annexin V an das nun zugängliche Phosphatidylserin ermöglicht wird. Ist an das Annexin V-Molekül ein Fluorochrom gekoppelt, so kann nach entsprechenden Waschschritten das ungebundene Annexin V entfernt und das gebundene mittels Fluoreszenzmessung in der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Nekrotische Zellen lassen sich durch gleichzeitige Färbung mit Propidiumiod (PI) nachweisen. Grundlage hierfür ist, dass PI an Nukleinsäuren bindet und dadurch in seiner Fluoreszenz verstärkt wird. Normalerweise kann PI nicht die Zellmembran penetrieren. Ist diese jedoch bei nekrotischen Zellen beschädigt, kann es in das Zellinnere eindringen und die Nukleinsäuren interkalieren. Nach dem Entfernen von ungebundenem PI durch Waschschritte kann die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Durchführung

Zum gewünschten Auswertungszeitpunkt wurden die Zellen der einzelnen Versuchsbedingungen in ihren Wells durch Pipettieren gut durchmischt, aus der Zellkulturplatte aufgenommen und in ein mit 500 μ l 1-fach Annexin V-Bindungspuffer gefülltes FACS-Röhrchen transferiert und durch Zentrifugation mit 400 g für 5 Minuten bei 4 °C gewaschen. Dann wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet durch Vortexen gelöst und anschließend in 70 μ l 1-fach Annexin V-Bindungspuffer und 5 μ l Annexin V-FITC resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis und in Dunkelheit erfolgte die Zugabe von 1 μ l PI (c_{stock}=250 μ g/ml) und die Auswertung

durch Messung der Fluoreszenz im FL-1-Kanal (Annexin V-FITC) und FL-2-Kanal (PI) des FACS-Calibur.

2.2.5.3 Überlebensschätzung durch CellTiter-Blue (CTB)-Assay

Allgemeine Grundlagen

Beim CellTiter-Blue (CTB)-Assay macht man sich die Veränderung des Stoffwechsels in sterbenden Zellen zunutze. Dabei wird ein Farbstoff, Resazurin, welcher wenig Eigenfluoreszenz besitzt und daher tiefblau erscheint, in lebenden Zellen zu Resorufin reduziert, das rosa-pink flouresziert. Diesen Farbumschlag kann man dann mit einem Photometer auswerten. Tote oder geschädigte Zellen haben eine veränderte Stoffwechselaktivität. Sie setzen daher im Vergleich zu gesunden Zellen weniger Farbstoff um. Dies kann photometrisch bestimmt werden.

Prozedur der Auswertung mittels CTB-Assay

Die Proliferation wurde mit Hilfe des Promega *CellTiter-Blue*-Reagenzes untersucht. Die Experimente wurden so angesetzt, dass pro Bedingung Versuchstriplikate bestanden. Zum gewünschten Auswertungszeitpunkt nach 72 Stunden wurde 100 μ l zellfreier Überstand pro Well verworfen und zu den verbleibenden 100 μ l Zellsuspension 20 μ l des auf Raumtemperatur gebrachten Reagenzes gegeben und durch vorsichtiges Rütteln der Zellkulturplatte gleichmäßig verteilt. Danach wurden die Zellen wieder in den Inkubator gestellt und zwei bis neun Stunden dort belassen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Photometer durch Anregung bei 530 nm und Messung der Emission bei 585 nm über eine Sekunde lang. Nach Subtraktion der Eigenfluoreszenz des Reagenzes in 100 μ l zellfreiem Kulturmedium wurde pro Bedingung der Mittelwert der Versuchstriplikate ermittelt und zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

2.2.6 Messung der Aktivierung des Interferon (INF) Signalwegs durch IP-10-ELISA

Die Messung von IP-10 im zellfreien Zellüberstand erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hierzu wurde zum Zeitpunkt der Auswertung 50 µl zellfreier Überstand aus den Versuchsbedingungen abgenommen. Der Assay wurde mit dem "Human IP-10 ELISA Set" bis auf eine Halbierung des vorgeschlagenen Ansatzes nach dem Protokoll des Herstellers BD Biosciences durchgeführt und durch Absorptionsmessung bei 450 nm photometrisch ausgewertet.

2.2.7 Untersuchung der Genexpression durch *quantitative-reversetranscription* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

2.2.7.1 Allgemeines Prinzip

Die qRT-PCR (*quantitative-reverse-transcription*-Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode die zum quantitativen Nachweis von mRNA verwendet werden kann. Dabei wird zunächst die mRNA enzymatisch durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche dann durch das Enzym Polymerase in der Gegenwart spezifischer Primer in einer Kettenreaktion amplifiziert wird.

Die Bestimmung funktioniert nur im linearen Bereich, wenn pro Zyklus der PCR die DNA verdoppelt wird. Information über die Quantität ergibt sich daraus, dass nach jedem Zyklus die neu synthetisierte DNA-Menge gemessen wird.

Die Messung hierfür erfolgt durch Messung der Fluoreszenz von Sonden, welche aus einer zu der zu untersuchenden cDNA komplementären Sequenz bestehen und an diese binden. Sonden haben neben einer fluoreszierenden Rezeptordomäne einen *Quencher*, welcher die Emittierung des Lichts der Rezeptordomäne verhindert. Kommt es zur Amplifikation der cDNA durch die Polymerase, die zugleich eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, dann wird der *Quencher* vom Rezeptor getrennt, und die Lichtemission kann detektiert werden. Die Quantifizierung kann anhand eines Standards absolut oder relativ zur Bestimmung der mRNA eines *housekeeping*-Gens, welches durch Zellstimulation unverändert exprimiert wird, erfolgen.

2.2.7.2 Isolation von RNA

RNA wurde mit Hilfe des Isolationskits "peqGOLD Total RNA Kit" (peqlab) gemäß der Herstellerangaben isoliert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c.

2.2.7.3 Umschrieb von RNA in komplementäre DNA (cDNA)

Zu maximal 1 µg isolierter RNA in 11 µl Volumen RNase freien Wasser wurden 0,25 µl Reverse Transkriptase (Fermentas reverdaid HT-reverse transkriptase; c stock= 200 U/ µl) 0,5 µl RNase-Inhibitor (Ribolock; 40 U/ul), 0,25 µl ddH₂O, 2 µl 10 µM-iger Oligo-dT-Primer, 2 µl 10 µM-iger dNTP (c final = 1 uM) und 4 µl 5x RT-Puffer in 0,2 ml-PCR-Behältnisse gegeben und für 60 Minuten bei 42 °C, gefolgt von 10 Minuten bei 70 °C, im Thermocycler in cDNA umgeschrieben.

2.2.7.4 Durchführung der *quantitative-reverse-transcription*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zu 6 μ l cDNA wurden 14 μ l qPCR-Mix, bestehend aus 10 μ l qPCR-MasterMix, 3 μ l RNase-freies Wasser, 0,4 μ l von 10 μ M *forward*-Primer , 0,4 μ l von 10 μ M *reverse*-Primer rechts, sowie 0,2 μ l der entsprechenden Sonde in eine 96-Well-PCR-Platte gegeben und diese dann mit einer Folie überklebt. Die qPCR erfolgte in einem LightCycler480 II Gerät. Alle verwendeten Primer wurden von Metabion international AG bezogen.

2.2.8 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software *Prism 5 (GraphPad)* durchgeführt. Es wurde entweder ein gepaarter, zweiseitiger Student t-Test durchgeführt oder, wo angebracht, eine *one-way*-ANOVA-Analyse mit anschließendem *Tukey's Multiple Comparison Test.* Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem P-Wert < 0,05 angesehen.

2.2.9 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Creative Suite	Adobe Systems, San Jose, USA
FlowJo Tree Star	FlowJo, Ashland, USA
Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA

3.1 Transfektion von AML-Zelllinien

3.1.1 Etablierung eines Protokolls zur Transfektion von AML-Zelllinien

Um die Fragestellungen dieser Dissertation bearbeiten zu können, musste zunächst ein Protokoll optimiert werden, das erlaubt siRNA in AML-Zellen einzubringen. Dieser Vorgang wird, wie unter 2.2.3 beschrieben, als Transfektion bezeichnet.

Nach ausgiebigen Vorversuchen zur Volumenoptimierung sowie der Testung von verschiedenen Transfektionsarten und –reagenzien wurde die Methode der Lipofektion und speziell das Reagenz RNAiMAX (Invitrogen, USA) gewählt, welches speziell für RNA-Interferenz-Versuche entwickelt wurde.

Um schnell und einfach die Transfektionsrate überprüfen zu können, wurde 2.2as-RNA verwendet, welche mit AlexaFluor 488 gekoppelt war (AF488-RNA). Dieses Fluorochrom emittiert nach entsprechender Anregung grünes Licht (Emissions-Maximum bei 519 nm), was in der Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Die verwendete 2.2-as-RNA, deren Sequenz auch später als Triphosphat-RNA eingesetzt wurde, gleicht in ihrer Größe und doppelsträngigen Struktur siRNA, sodass anhand der Ergebnisse dieser Experimente auf die Transfizierbarkeit von siRNA geschlossen werden kann.

Zur Ermittlung der bestmöglichen Transfektionsrate wurden verschiedene Verhältnisse von Transfektionsreagenz und RNA-Konzentrationen in zwei AML-Zelllinien, Kasumi-1 und MV4-11, untersucht.

Mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Einschätzung der Toxizität anhand morphologischer Eigenschaften der Zellen im *forward- und side-scatter* und die Tranfektionsbestimmung durch Fluoreszenzmessung.

Es zeigte sich, dass die beiden untersuchten AML-Zelllinien unterschiedlich auf die einzelnen Transfektionsverhältnisse reagierten. Wie erwartet erfolgte keine Transfektion, wenn RNA ohne Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben wurde.

37

Da das Verhältnis 1 µg/ml RNA und 1 % vol. RNAiMAX bei beiden untersuchten Zelllinien gute Transfektionsraten bei akzeptabler Toxizität erzielt, wurde dieses Verhältnis für die weiteren Experimente gewählt.



Abbildung 3-1 AML-Zelllinien lassen sich gut transfizieren bei akzeptabler Toxizität. Dargestellt sind zwei repräsentative AML-Zelllinen, Kasumi-1 (A) und MV4-11 (B). Pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte wurden $6x10^4$ Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen AF488-RNA, 1 µg/ml und 2 µg/ml, sowie mit vier verschiedenen Mengen des Transfektionsreagenzes RNAiMAX (R) (0; 0,7; 1 und 1,3 % vol.) transfiziert. 4 h nach Transfektion erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytometrie im *forward-scatter/side-scatter* zur Abschätzung der Lebendpopulation sowie der Messung der Fluoreszenz zur Bestimmung der Transfektionsrate. Dargestellt ist jeweils der Anteil der lebenden Zellen nach der Behandlung (Überlleben), sowie der Anteil der davon transfizierten Zellen (Transfektion). Darstellung eines Experiments (n=1) ohne Versuchsmultiplikaten.

3.1.2 Alle neun getesteten Leukämie-Zelllinien lassen sich transfizieren

Nach der Etablierung eines optimierten Transfektionsprotokolls wurden acht AML-Zelllinien sowie eine chronisch-myeloische-Leukämie (CML)-Zelllinie, K-562, auf ihre Transfizierbarkeit hin untersucht.

Dazu wurden sie mit AF488-RNA und RNAiMAX transfiziert. Als Kontrolle diente die alleinige Behandlung mit RNA ohne Transfektionsreagenz. In der anschließenden Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie zeigte sich, dass sich alle Zelllinien transfizieren ließen, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz (Tabelle 3-1).

OCI-AML3 Zellen zeigten die beste Transfektionsrate. Diese war zudem auch über fünf unabhängige Experimente hin konstant, wie Abbildung 3-2 B zeigt.

Die Varianz der Inkubationszeit, welche jedoch mindestens vier Stunden betrug, sowie der Zellzahl hatten keinen wesentlichen Effekt auf die Transfektionsrate. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung, OCI-AML3-Zelllinie bevorzugt für die weiteren Experimente zu verwenden.

Zelllinie	HL60	Kasumi-1	K-562	Molm-	MV4-11	NB4	OCI-AML3	PL21	THP1
				13					
Transfektion	+	++++	++	++	+++	+	++++	+	++++

Tabelle 3-1 AML-Zelllinien lassen sich unterschiedlich gut transfizieren. Es wurden acht AML-Zelllinien sowie eine CML-Zelllinie, K-562, untersucht. Je 2-6x10⁴ Zellen pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte wurden für 4 bis 9 Stunden mit 1 µg/ml AF488-RNA und 1 % vol. RNAiMAX transfiziert. Die Auswertung erfolgte anschließend durch Durchflusszytometrie mittels Fluoreszenzbestimmung. "+": <25 %; "++": 25–50 %; "++": 50–75 %; "+++": >75 % Transfektionsrate. Daten von n=2 Experimenten pro Zellinie wurden für die Tabelle zusammengefasst.



Abbildung 3-2 OCI-AML3-Zellen weisen eine hohe und reproduzierbare Tranksfektionsrate auf. 1-6x10⁴ OCI-AML3-Zellen pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundbodenzellkulturplatte wurden mit 1 % vol. RNAiMAX und 1 µg/ml AF488-RNA transfiziert und nach 4 bis 6 Stunden Inkubationszeit das Zellüberleben und die Aufnahme der fluoreszenz-markierten RNA mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

A: Zellen ohne Transfektionsreagenz (graue Kurve) als Kontrolle sowie Zellpopulation mit RNAiMAX transfiziert (grüne Kurve). Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

B: Relativer Anteil der AF488 positiven Zellen nach Transfektion mit RNAiMAX und AF488-RNA. Dargestellt ist der Anteil an transfizierten Zellen bezogen auf die Lebendpopulation. Gezeigt sind der Mittelwert + SEM von fünf unabhängigen Experimenten (n=5).

3.1.3 RNA wird nach Transfektion in das Zellinnere aufgenommen

Die Tatsache, dass in den Kontroll-Bedingungen ohne Transfektionsreagenz kein Fluoreszenz-Signal abgeleitet werden kann, legt den Schluss nahe, dass in den experimentellen Bedingungen die RNA ins Zellinnere aufgenommen wird.

Dies ist Voraussetzung dafür, dass der geplante Ansatz funktioniert, da sowohl die siRNA-Maschinerie als auch die RLRs im Zytoplasma lokalisiert sind.

Um zu überprüfen, in welches Kompartiment die transfizierte RNA gelangt, wurden die Zelllinien Kasumi-1, MV4-11, OCI-AML3 und PL21 mit AF488-RNA und RNAiMAX transfiziert und nach Anfärben des Zellkerns mittels Konfokalmikroskopie untersucht.

In der Abbildung 3-3 ist zu sehen, dass die Zelllinien, welche sich in der Durchflusszytometrie als gut transfizierbar erwiesen hatten, auch in der Konfokalmikroskopie einen Gehalt an AF488-RNA zeigten. Wie zu erwarten war zeigte

die PL21 Zelllinie, welche eine schlechte Transfektionsrate aufgezeigt hatte, auch einen deutlich geringeren Gehalt an AF488-RNA. Aufgrund der Lokalisation der grünen RNA in unmittelbarer Nachbarschaft zu den blauen Zellkernen lässt sich schließen, dass die RNA tatsächlich in das Zellinnere aufgenommen wurde. Anhand der Aggregatbildung ist eine endosomale Anreicherung suggestiv. Ferner lässt sich eine diffuse Zytoplasmaanreicherung erkennen, welche jedoch durch die hohe Fluoreszenz der Aggregate überstrahlt wird.

Somit wurden durch eine zweite Auswertungsmethode die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung bestätigt und lieferten einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass die RNA tatsächlich in das Zellinnere aufgenommen wurde, einer Schlüsselvoraussetzung für das Konzept der Behandlung der AML mit immunstimulatorischer siRNA.



Abbildung 3-3 AF488-RNA wird in das Zellinnere aufgenommen. Darstellung von repräsentativen Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der Zellinien Kasumi-1 (A), MV4-11 (B), OCI-AML3 (C) und PL21 (D) in unterschiedlichen Auflösungen. $6x10^4$ Zellen pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte wurden mit 1 µg/ml AF488-RNA und 1 % vol. RNAiMAX über 6,5 Stunden inkubiert, nach 22 Stunden mit Hoechst-33342-Farbstoff gefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht. Zu sehen sind Zellkerne (blau) und die AF488-RNA (grün). Ein Experiment (n=1) ist gezeigt.

3.2 Untersuchung der Immunstimulation durch Aktivierung von *RIG-I-like*-Rezeptoren in AML-Zellen

3.2.1 AML-Zelllinien exprimieren *RIG-I-like*-Rezeptoren, die nach Immunstimulation induziert werden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RNA in das Zellinnere aufgenommen werden kann, erfolgte im nächsten Schritt die Überprüfung, ob AML-Zelllinien auch *RIG-I-like*-Rezeptoren exprimieren.

Dazu wurden Zellen der Zelllinien HL60, K-562, Kasumi-1, Molm-13, MV4-11, NB4, OCI-AML3, PL-21 sowie THP1 entweder unbehandelt belassen, mit dem prototypischen RLR-Liganden poly(I:C) transfiziert oder mit IFN-α stimuliert, einem etablierten RLR-Induktor. Anschließend wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um die Expression der RLR und deren Induktion durch diese beiden Stimuli zu untersuchen.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine Basis-Expression von MDA5 und RIG-I (Daten nicht gezeigt). Wie anhand der Tabelle 3-2 ersichtlich ist, lassen sich in allen untersuchten Zelllinien MDA5 und RIG-I durch diese beiden Stimuli hochregulieren, jedoch in sehr unterschiedlichem Ausmaß.

Aus Abbildung 3-4 geht hervor, dass sowohl poly(I:C) als auch IFN- α zu einer Induktion von RIG-I und MDA5 in OCI-AML3-Zellen führen. Zumindest für diese Zelllinie scheint es jedoch, dass die Aktivierung des endogenen RLR-Signalwegs zu einer stärkeren Immunantwort und Hochregulation von Immun-Genen führt als die Induktion über den IFN- α -Rezeptor. Ein quantitativer Vergleich der Hochregulation von Immun-Genen durch die verwendeten Stimuli lässt sich jedoch aufgrund von unterschiedlichen Stimulationszeiten nicht machen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass RLR in AML-Zellen exprimiert werden und sie durch Immunstimulation induzierbar sind, was darauf hindeutet, dass auch ein intakter Regelkreislauf erhalten geblieben ist.



Abbildung 3-4 OCI-AML3-Zellen exprimieren RIG-I-like-Rezeptoren, deren Expression durch Immunstimulation mit poly(I:C) und Interferon induziert wird. $6x10^4$ OCI-AML3-Zellen pro Bedingung und Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte wurden unbehandelt belassen, mit poly(I:C) (1 µg/ml; 1 % vol. RNAiMAX), oder mit Interferon- α (INF- α) 1000 IU/ml) stimuliert. Die poly(I:C) und unbehandelten Bedingungen wurden nach vierstündiger Inkubationszeit mit Kulturmedium aufgefüllt und bis zur gemeinsamen Auswertung in den Inkubator gestellt. Die Stimulation der entsprechenden IFN- α -Bedingungen erfolgte am nächsten Morgen, 18 Stunden nach der Transfektion mit poly(I:C). Nach vierstündiger Inkubationszeit erfolgte die Auswertung aller Bedingungen. Hierzu wurde eine qRT-PCR zur Untersuchung der Expression von RIG-I und MDA5 durchgeführt und diese normalisiert zur unbehandelten Bedingung entweder gegen das Referenzgen HPRT oder β - Aktin aufgetragen. Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

Zelllinie	HL60	Kasumi-1	K-562	Molm-13	MV4-11	NB4	OCI-AML3	PL21	THP1*
RIG-I	+++	+++	++++	++	++++	++	+++	++	++++
MDA5	+	+++	++++	++	++++	++	+++	+	++

Tabelle 3-2 Expression von RIG-I und MDA5 in den neun untersuchten Leukämie-Zelllinien.

Zellen genannten 6x10⁴ Zelllinien pro Bedinauna und Well einer der 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte wurden unbehandelt belassen, mit poly(I:C) (1 µg/ml; 1 % vol. RNAiMAX), oder mit Interferon-a (INFa; 1000 IU/ml) stimuliert. Die mit poly(I:C) und die unbehandelten Bedingungen wurden nach vierstündiger Inkubationszeit mit Kulturmedium aufgefüllt und bis zur gemeinsamen Auswertung in den Inkubator gestellt. Die Stimulation der entsprechenden IFN-α-Bedingungen erfolgte am nächsten Morgen, 18 Stunden nach der Transfektion mit poly(I:C). Nach erneuter, vierstündiger, Inkubationszeit erfolgte die Auswertung aller Bedingungen. Hierzu wurde eine gRT-PCR zur Untersuchung der Expression von RIG-I und MDA5 durchgeführt und diese normalisiert zur unbehandelten Bedingung gegen das Referenzgen β-Aktin aufgetragen. Anschließend wurden für jedes der beiden Zielgene (MDA5, RIG-I) die Induktionsraten durch IFNα- und poly(I:C)-Stimulation addiert, daraus der Mittelwert gebildet und dieser in der Tabelle angegeben.

Semiquantitative Darstellung der Induktion der Zielstruktur durch INF-α- und poly(I:C)-Stimulation. ,+,: < 15-fache Induktion, ,++":15–45x, ,+++":45–75x, ,++++":>75x

(* nur Stimulation mit IFN α und Zellzahl 1,5x10⁴ pro Bedingung und Well). Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

3.2.2 Die Stimulation mit poly(I:C) und Triphosphat-RNA resultiert in einer verminderten Viabiliät von AML-Zellen

Nachdem bereits demonstriert werden konnte, dass RNA in die Zellen transfiziert werden kann und dass AML-Zellen RLR exprimieren, die durch Immunstimulation hochreguliert werden, folgte nun die Untersuchung, ob eine Transfektion mit Triphosphat-RNA oder poly(I:C) auch einen messbaren immunstimulatorischen und zytopathischen Effekt auf die Zellen hat. Als Kontrolle diente eine vorbeschriebene doppelsträngige Kontroll-RNA (CO4-RNA) ohne Triphosphat-Modifikation und ohne humanes oder murines Zielgen (Referenz ^{17,31,37}). Diese Kontroll-RNA diente in den folgenden Experimenten sowohl als Negativkontrolle in Immunstimulationsexperimenten durch die nicht immunstimulatorische OH-Gruppe als auch als Kontrollbedingung in Knock-Down-Experimenten.

Dazu wurden OCI-AML3-Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen einer in Vorarbeiten charakterisierten Triphosphat-RNA mit guter RIG-Aktivierungsfähigkeit (3p-2.2as RNA; Referenz ^{17,31,37}), im Folgenden als 3p-RNA bezeichnet, und fünf verschiedenen Konzentrationen an poly(I:C) transfiziert. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion mit CO4-RNA. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gesamtmenge an RNA in allen Bedingungen konstant war, um für mögliche toxische und immunstimulatorische Nebeneffekte zu kontrollieren. Die Auswertung erfolgte am dritten Tag. Die Immunstimulation wurde durch die Bestimmung von IP-10 im Zellüberstand gemessen, das Überleben durch einen CTB-Assay.

Es zeigte sich, dass es sowohl durch Stimulation mit poly(I:C) als auch Triphosphat-RNA zu einer Immunantwort kam – nicht jedoch in den Bedingungen, welche nur mit CO4-RNA, der nicht immunstimulatorischen Kontroll-RNA, behandelt wurden (Abbildung 3-5). Weiterhin korrelierte zumindest im unteren Konzentrationsbereich die Menge an verwendeter RNA mit der IP-10-Produktion und über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von poly IC mit dem Zell- Überleben.

Somit konnte gezeigt werden, dass der RLR-Signalweg in AML-Zellen intakt ist und die RLR-Aktivierung durch poly(I:C) und Triphosphat-RNA sowohl einen messbaren immunstimulatorischen Effekt als auch einen zytopathischen Effekt auf AML-Zellen hat.



Abbildung 3-5 Aktivierung von RIG-I-like-Rezeptoren führt zu IP-10 Produktion und Induktion von Zelltod. OCI-AML3-Zellen wurden mit (A) 83 ng/ml und 1000 ng/ml 5' Triphosphat-modifizierter RNA (3p-RNA) bzw. (B) 1,6; 8; 40; 200 und 1000 ng/ml poly(I:C) oder mit 1000 ng/ml einer 5'-OH-siRNA (CO4) und RNAiMAX stimuliert. Dazu wurden pro Bedingung Versuchs-Triplikaten mit je 1x10⁴ Zellen ausplattiert. Die Gesamt-Menge an RNA und RNAiMAX betrug in allen Bedingungen 1 µg/ml und 1 % vol. RNAiMAX und wurde bei geringeren immunstimulatorischen RNA-Konzentrationen durch CO4 ergänzt. Nach sechsstündiger Inkubationszeit wurden die Bedingungen mit Kulturmedium aufgefüllt und bis zur Auswertung im Inkubator gelagert. Interferon- γ induziertes Protein 10 (IP-10) im Überstand wurde nach 66 (A) beziehungsweise 72 Stunden (B) nach Stimulation gemessen. Am dritten Tag nach Stimulation wurde zur Einschätzung der Lebendzellzahl ein CTB-Assay durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert mit SEM von Versuchs-Triplikaten. Für die IP-10 Messung wurden die Überstände der Versuchs-Triplikate *gepoolt*. Dargestellt ist ein Experiment. (n=1).

3.3 Das AML-spezifische Mutationsprotein AML1-ETO lässt sich selektiv durch *short-interfering-*RNA posttranskriptionell herabregulieren

Bisher konnte gezeigt werden, dass RNA in die Zellen aufgenommen werden kann und dass Triphosphat-RNA über Aktivierung von RLR einen immunstimulatorischen Effekt auf die behandelten Zellen hat. Nun galt es zu untersuchen, ob AML-Zellen auch über einen intakten RISC verfügen und in ihnen das Prinzip des posttranskriptionellen Gen-Knock-downs, also Genregulation auf mRNA Ebene, durch siRNA funktioniert.

Um die Spezifität des RNAi-Ansatzes zu demonstrieren wurde versucht, das AMLspezifische AML1-ETO, welches in Kasumi-1-Zellen exprimiert wird, spezifisch herunterzuregulieren.

Dazu wurden zwei siRNA gegen die mRNA des Fusionsproteins AML1-ETO (siAML1ETO_1/_2) entworfen, die auf den fusions-spezifischen Abschnitt der AML1-ETO mRNA abzielen, und synthetisiert. Als Kontrollen diente die CO4-RNA sowie zwei siRNA gegen ein anderes humanes Gen, NPM1 (siNPM1_1/_2).

48 Stunden nach Transfektion der siRNA erfolgte die Auswertung mittels qRT-PCR zur Quantifizierung des Knock-downs von AML1-ETO. Ebenfalls wurden qRT-PCR Assays konzipiert, welche spezifisch die einzelnen Gene AML1 und ETO amplifizieren. Die Gen-Expression wurde dabei in Relation gegenüber dem Referenzgen β -Aktin quantitativ bestimmt.

In Abbildung 3-6 wird ersichtlich, dass die Expression des Fusionsproteins AML1-ETO wie erwartet nicht durch die siRNA gegen NPM1 und CO4 beeinflusst wurde. Die Bedingungen, welche mit einer der beiden siRNA gegen AML1-ETO behandelt wurden, zeigten eine Herabregulation des Fusionsproteins, nicht jedoch der Einzelproteine AML1 und ETO, was die AML-Spezifität der verwendeten siRNA unterstreicht. Somit konnte die These belegt werden, dass in AML-Zellen mit der Verwendung von siRNA spezifische *Knock-Downs* möglich sind.



Abbildung 3-6 Die Expression des AMLspezifischen Fusionsproteins AML1-ETO lässt sich durch spezifische siRNA selektiv herabregulieren. 5x10⁵ Kasumi-1-Zellen pro Bedingung und Well einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden ausplattiert und mit verschiedenen siRNA transfiziert (1 µg/ml siRNA und 1 % vol. RNAiMAX). Dabei wurden zwei gegen die mRNA des Fusionsprotein AML-1ETO gerichtete spezifische siRNA (siAML1ETO_1, siAML1ETO 2), eine Kontroll-RNA (CO4) und zwei gegen eine andere mRNA gerichtete siRNA (siNMP 1 1/ 2) verwendet. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurde mit Kulturmedium aufgefüllt und die Zellen in den Inkubator gestellt. Nach 48 Stunden wurde mittels gRT-PCR die Expression von AML1, ETO, sowie des Fusionsproteins AML1-ETO untersucht und gegen das Referenzprotein β-Aktin aufgetragen. Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

3.4 Identifizierung geeigneter Zielstrukturen für einen *shortinterfering*-RNA basierten Therapieansatz in AML

3.4.1 *Nucleophosmin-1, Bromodomain-containing*-Protein-4 und *Polo-like*-Kinase1 als Zielstrukturen für eine *short-interfering*-RNA-basierten Therapie-der AML

Aufgrund ihrer Häufigkeit und wichtigen Rolle in der AML-Pathogenese, wie oben im Kapitel "1.1.2 Krankheitsentstehung" aufgeführt, fiel die Wahl auf die Gene *FMS-like-tyrosine-kinase-3*-Rezeptors (FLT3), Nucleophosmin-1 (NPM1) sowie das Fusionsgen AML1-ETO als mögliche Zielstrukturen für eine spezifische Anti-Tumor-Therapie mittels siRNA sowie auf *Bromodomain-containing protein 4* (BRD4) welches als potenzielles AML-Zielgen in einem RNAi-Screen durch Zuber et al. zuvor beschrieben worden war ³⁸. In der Folge wurden siRNA gegen diese designt und überprüft, inwiefern ein *Knock-down* der Zielgene einen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen hat.

Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) ist ein Mitglied der bromodomain-andextraterminal-containing (BET)-Proteine, einer Familie von epigenetischen

Regulatoren, welche wichtige Aufgaben in der Transkription und Zellwachstum haben ³⁹. BRD4 ist ein Chromatin-*Reader*, der an azetylierte Histone bindet und eine tragende Rolle in der Transkriptionsregulation sowie in der Regulation der RNA-Polymerase-II-Aktivität spielt ³⁹.

Es wurden Kasumi-1-, MV4-11-, THP1- und OCI-AML3-Zellen verwendet und zweimal, im Abstand von 18 Stunden mit siRNA gegen FLT3, BRD4, NPM1 (siNPM1_2) und CO4 als Kontrolle transfiziert. Kasumi-1-Zellen wurde zusätzlich noch mit siRNA gegen AML1-ETO (siAML1ETO_1) behandelt.

Die Auswertung erfolgte mittels CTB-Assays an Tag 0, 1, 2, 3, 4 und 7 bezogen auf den Zeitpunkt der ersten Transfektion und nach jeweils dreistündiger Inkubationszeit des CTB-Reagenzes. Am zweiten Tag nach der ersten Transfektion erfolgte eine qRT-PCR zur Bestimmung der Knock-down-Effizienz der Zielgene in Relation zum Referenzgen β -Aktin.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 3-7 B erkennbar, dass bei allen Zelllinien und verwendeten siRNA eine Herabregulation der jeweiligen Ziel-mRNA stattgefunden hat, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Die besten Knock-down-Daten zeigten OCI-AML3- und THP1-Zellen. Allein bei diesen beiden Zelllinien und unter Behandlung mit siRNA gegen BRD4 und NPM1 zeigte sich ein Effekt auf das Überleben der Zellen (Abb. 3-7 A). Damit konnten BRD4 und NPM1 als praktikable Zielstrukturen zumindest in einer Subgruppe von AML-Zelllinien identifiziert werden.





Abbildung 3-7 Der Knock-down von BRD4 und NPM1 führt zu Zelltod in AML-Zelllinien. Kasumi-1-, MV4-11-, THP1 und OCI-AML3-Zellen wurden pro Bedingung und Auswertezeitpunkt als Versuchs-Triplikate mit je 1x10⁴ Zellen pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte in 60 µl Medium ausgesät. Sie wurden zweimal innerhalb von 18 Stunden mit einer Kontroll-RNA (CO4) sowie siRNA gegen BRD4, FLT3, NPM1 und bei Kasumi-1 zusätzlich gegen AML1-ETO in einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml und 1 % vol. RNAiMAX transfiziert. Zehn Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die Bedingungen mit Kulturmedium aufgefüllt und in den Inkubator gestellt, über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet und an Tag 0, 1, 2, 3, 4 und 7 mit einem CTB-Assay die Lebendzellzahl eingeschätzt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SEM von Versuchs-Triplikaten (**A**). Die Untersuchung der Herabregulation der Zielstrukturen erfolgte 52 Stunden nach der ersten Transfektion durch eine qRT-PCR und wurde gegen das Referenzgen β -Aktin berechnet und als % der Expression in Anwesenheit von CO4 angegeben (**B**). Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

Nachdem sich im ersten Zielstruktur-*screen* nur zwei der vier ausgewählten Zielgene effektiv herunterregulieren ließen bzw. deren Herunterregulierung nur in zwei Zellinien zur Induktion von Zelltod geführt hatte, wurde nach *Polo-like*-Kinase1 (PLK1) als weitere mögliche siRNA-Zielstrukur untersucht, welche bereits zuvor als mögliche Zielstruktur in der AML-Therapie identifiziert worden war ⁴⁰.

Polo-like-Kinasen (PLK) sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, welche essenzielle Schritte des Zellzyklus während der Mitose regulieren. Zu den Aufgaben von PLK1 gehört unter anderem die Regulation des Übergangs von der Metaphase in die Anaphase sowie die Chromatid-Separation ⁴⁰. Außerdem ist sie durch Phosphorylierung von Bcl-XL, eines anti-apoptotischen Proteins, in die Regulation der Apopotose involviert ⁴⁰.

Hierzu wurden Kasumi-1-, MV4-11- oder THP1-Zellen im Abstand von 24 Stunden zweimal mit siRNA gegen PLK1 (siPLK1_1) oder CO4-RNA als Kontrolle transfiziert. 48 Stunden nach der ersten Transfektion erfolgte die *Knock-down*-Kontrolle durch eine qRT-PCR, nach weiteren 22 Stunden ein CTB-Assay zur Quantifizierung des Überlebens der Zellen.

Es zeigte sich, dass es in allen drei geprüften Zelllinien möglich war, die Expression der für PLK1 kodierenden mRNA durch siRNA zu verringern (Abbildung 3-8 B). THP1-Zellen, welche die besten *Knock-down*-Daten für PLK1 lieferten, zeigte auch den am stärksten ausgeprägten zytopathischen Effekt.

Somit wurde PLK1 als dritte Zielstruktur identifiziert, welche darüber hinaus bei allen getesteten Zelllinien, wenn auch teilweise nur schwach, zu messbaren zytopathischen Ergebnissen führte.



Abbildung 3-8 PLK1 zeigt sich als weitere praktikable siRNA-Zielstruktur. Pro Bedingung und Auslesezeitpunkt wurden Versuchs-Triplikate mit je 10⁴ (CTB-Auswertung) bzw 6x10⁴ (*Knock-down*-Auswertung) Kasumi-1-, MV4-11- oder THP1-Zellen pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte ausgesät und im Abstand von 24 Stunden zweimal mit 1 % vol. RNAiMAX und 1 µg/ml siRNA gegen PLK1 oder mit der Kontroll-RNA (CO4) transfiziert. Vier Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die Bedingungen mit Medium aufgefüllt und in den Inkubator bis zu Auslesezeitpunkt gestellt.

A): Dargestellt ist ein CTB-Assay zur Abschätzung der Lebendzellzahl 66 Stunden nach der ersten Transfektion. Gezeigt ist der Mittelwert mit SEM von Versuchs-Triplikaten. Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

B): Darstellung der Quantifizierung von PLK1 gegenüber dem Referenzgen β-Aktin 48 Stunden nach der ersten Transfektion durch eine qRT-PCR. Hierzu wurden die Versuchtriplikate zur Auswertung *gepoolt*. Die Werte sind auf die Kontrollbedingung CO4 normalisiert aufgetragen. Dargestellt ist ein Experiment (n=1).

3.4.2 In OCI-AML3-Zellen lässt sich der durch *short-interfering*-RNA vermittelte *Knock-down*-Effekt der zuvor identifizierten Zielstrukturen gut reproduzieren

Nachdem drei für siRNA praktikable Zielstrukturen gefunden worden waren, galt es den Effekt dieser zu validieren. Da OCI-AML3-Zellen die beste Transfizierbarkeit aufwiesen, sollte exemplarisch anhand dieser Zelllinie die Reproduzierbarkeit des Effekts überprüft werden.

Wie aus Abbildung 3-9 ersichtlich ist, führte die siRNA Behandlung gegen BRD4 und NPM1 zu einer signifikante Reduktion der Genexpression der Zielstrukturen und zu einem signifikant gegenüber der Kontrolle mit CO4-RNA reduziertem Überleben der AML-Zellen. Auch die präliminären Daten der Untersuchung von OCI-AML3-Zellen mit siRNA gegen PLK1 scheinen sich in diese Beobachtungen einzureihen.

Somit zeigte sich, dass der *Knock-down* der drei untersuchten Zielstrukturen BRD4, NPM1 und PLK1 in OCI-AML3-Zellen durch siRNA reproduzierbar ist und die Effekte dieser auf das Überleben valide zu sein scheinen.



Abbildung 3-9 Knock-down-Effekt von siRNA gegen BRD4, NPM1 und PLK1 sind in OCI-AML3 Zellen gut reproduzierbar. Pro Bedingung wurden 1- $50x10^4$ OCI-AML3-Zellen pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte ausplattiert und zweimal im Abstand von 15 bis 25 Stunden mit je 1 % vol. RNAiMAX und 1 µg/ml siRNA gegen BRD4 (**A**,**D**), NPM1(**B**,**E**), PLK1(**C**,**F**), oder mit einer Kontroll-RNA (CO4), transfiziert. Die Signifikanzberechnung erfolgte durch gepaartem, zweiseitigen, Student t-Test. *(P<0,05) **(P<0,01) ***(P<0,001)

A, **B**, **C**: Einschätzung der Lebendzellpopulation mittels CTB-Assay 63 bis 78 Stunden nach der ersten Transfektion. Aus Versuchstriplikaten in jedem Einzelexperiment wurde zuerst der Mittelwert gebildet und dann dieser durch den Mittelwert der Kontrollbedingung mit CO4 normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SEM der gemittelten und auf CO4 normalisierten unabhängigen Einzelexperimente (n=x). **A** (n=3; p=0,019) **B** (n=6; p=0,009) **C** (n=2).

D, **E**, **F**: Untersuchung des Gen-*knock-downs* mittels qRT-PCR 42 bis 52 Stunden nach der ersten Transfektion. Von jedem Einzelexperiment wurde die Expression von BRD4, NPM1 oder PLK1 auf die Kontrollbedingung mit CO4 normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SEM der normalisierten Einzelexperimente (n=x). D (n=3; p=0,006), E (n=3; p=0,0006), F (n=1).

3.5 Die zytopathischen Effekte auf OCI-AML3-Zellen durch *short-interfering*-RNA-induziertem *Knock-down* und Immunstimulation sind additiv

Nachdem geeignete Zielstrukturen für die siRNA Komponente gefunden worden waren, sollte untersucht werden, ob beide Ansätze – Immunstimulation und Gen-*knock-down* durch siRNA – gleichzeitig funktionieren und sich in ihrer zytotoxischen Wirkung auf AML-Zellen verstärken. Um dies zu überprüfen, wurde Triphosphat-RNA und siRNA gleichzeitig in OCI-AML3-Zellen transfiziert.

Dazu wurden OCI-AML3-Zellen mit siRNA gegen BRD4, NPM1 (siNPM1_2), PLK1 (siPLK1_1) und jeweils der etablierten Triphosphat-RNA 2.2.AS einmalig kotransfiziert. Als Kontrolle diente jeweils CO4-RNA. Im Falle von siRNA gegen BRD4 und NPM1, wurde mit zwei verschiedenen Mengenverhältnissen von Triphosphat-RNA und siRNA transfiziert. Bei den Bedingungen "1:1" wurden gleiche Mengen von Triphosphat-RNA und siRNA appliziert, bei den Bedingungen "2:1" doppelt soviel Triphosphat-RNA (bzw. der Kontrollbedingung) als siRNA. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde ein CTB-Assay zur Messung des Zell-Überlebens durchgeführt. Aus je einem Experiment einer Experimenten-Serie wurde vor der Überlebensmessung ein **IP-10-ELISA** zum Nachweis der Immunstimulation durchgeführt. Die Signifikanzberechnung erfolgte dann mittels one-way-ANOVA-Analyse und Tukey-Test.

Wie aus Abbildung 3-10 A hervorgeht, zeigte sich ein signifikanter, additiver Effekt der Ko-Stimulation mit Triphosphat-RNA auf die OCI-AML3-Zellpopulation. Die Betrachtung der entsprechenden IP-10-Daten zeigt eine Immunstimulation in allen mit Triphosphat-RNA stimulierten Zellen, jedoch nicht in den alleinig mit siRNA behandelten.

Beim Vergleich der Datensätze doppelter und einfacher Triphosphat-RNA Applikation im Verhältnis zur siRNA-Menge, zeichnet sich kein großer Unterschied ab (3-10 A, C). Die Daten aus ko-stimulatorischen Experimente mit siRNA gegen NPM1 (3-10 B, D;) und PLK1 (3-10 E) mit Triphosphat-RNA ließen ähnliche Beobachtungen wie für BRD4

machen, lassen aber aufgrund von präliminären Daten keine abschließende Beurteilung zu.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Kombination beider Ansätze möglich ist, sie nicht negativ miteinander interagieren und zumindest im Falle von BRD4 eine signifikante, additive Wirkung auf das Überleben der Zellpopulationen haben.





Abbildung 3-10 Die Effekte auf das Überleben von siRNA induziertem *Knock-down* von BRD4, NPM1 und PLK1 und die Effekte der Immunstimulation durch 5'-Triphosphat RNA sind teilweise additiv.

Pro Bedingung wurden Versuchs-Triplikate mit je 1x10⁴ OCI-AML3-Zellen pro Well einer 96-Well-Rundboden-Zellkulturplatte ausgesät und mit siRNA gegen BRD4, NPM1 und PLK1 und mit 5'-Triphosphat-RNA (3p-RNA) ko-transfiziert. Die nicht-immunstimulatorische siRNA gegen CO4 (CO4) diente jeweils als Kontrolle für die siRNA- sowie die 3p-RNA-Bedingung. Es wurde jeweils das Überleben sowie die IP-10 Produktion 72 Stunden nach Transfektion durch einen CTB-Assay bzw. einen IP-10-ELISA gemessen.

Die Darstellung der Überlebensdaten erfolge durch Mittelwertbildung der Versuchs-Triplikate in jedem Einzelexperiment welcher dann durch den Mittelwert der Kontrollbedingung mit CO4 normalisiert wurde. Die Daten zeigen Mittelwerte mit SEM dieser so gemittelten und normalisierten unabhängigen Einzelexperimente. Die Signifikanzberechnung erfolgte dann mittels *one-way*-ANOVA-Analyse und Tukey-Test.

A, B: Die Ko-Transfektion mit 3p-RNA und siBRD4 (**A**) bzw. siNPM1 (**B**) fand im Mengenverhältnis von 3p-RNA/siRNA = 2:1 statt, die Endkozentration (c_{RNAgesamt}) betrug zwischen 1 - 1,5 μg/ml.

Überlebensdaten wurden aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) generiert.

(ns= nicht signifikant; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; *one-way*-ANOVA Analyse und Tukey Test) Darstellung der IP-10-Produktion jeweils aus einem Experiment nachdem die Versuchs-Triplikate *gepoolt* wurden.

C, **D**: Die Ko-Transfektion mit 3p-RNA und siBRD4 (C) bzw. siNPM1 (D) fand im Mengenverhältnis von 3p-RNA/siRNA= 1/1 statt, die Endkonzentration (_{CRNAgesamt}) betrug 1 µg/ml.

Überlebensdaten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Darstellung der IP-10-Produktion jeweils aus einem Experiment nachdem die Versuchs-Triplikate gepoolt wurden.

E: Die Ko-Transfektion mit 3p-RNA und siPLK1 fand im Mengenverhältnis von 3p-RNA/siRNA = 1/1 statt, die Endkozentration (c_{RNAgesamt}) betrug 1 µg/ml.

Dargestellt sind das Überleben und IP-10-Produktion aus einem Experiment.

3.6 OCI-AML3-Zellen reagieren empfindlicher auf das Chemotherapeutikum Cytarabin nach vorausgegangenem *Knockdown* von *Nucleophosmin-1* durch *short-interfering*-RNA.

Zum Schluss dieser Arbeit sollte überprüft werden inwiefern der vorgestellte Therapieansatz oder Teile daraus auch in bereits gängige Therapieschemata integriert werden können. Balusu et al. konnten zeigen, dass das Ausschalten von NPM1 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cytarabin, einem Standardchemotherapeutikum in der AML-Therapie, führte ⁵. Im Folgenden sollte dies in unserem experimentellen Setting überprüft werden.

Hierzu wurden OCI-AML-3-Zellen mit siRNA gegen NPM1 innerhalb von 25 Stunden zweimal transfiziert. Um für sequenzspezifische off-target-Effekte zu kontrollieren wurden zwei unterschiedliche, gegen NPM1 gerichtete, siRNA verwendet. Als Kontrolle diente die CO4-RNA. Am nächsten Tag wurde dann in verschiedenen Verdünnungsstufen Cytarabin hinzugegeben. Nach weiteren zwei Tagen Inkubationszeit im Inkubator erfolgte eine Apoptosefärbung mit Annexin/PI und im Anschluss daran die durchflusszytometrische Auswertung.

Aus Abbildung 3-11 geht hervor, dass OCI-AML3-Zellen, die zuvor mit siRNA gegen NPM1 behandelt worden waren, eine erhöhte Sensibilität gegenüber dem Chemotherapeutikum entwickelt haben, was sich an einem höheren Anteil an toten oder sterbenden Zellen gemessen an der Vergleichsgruppe mit CO4-RNA oder unbehandelten Zellen darstellt.

Somit würde sich die Behandlung mit siRNA gegen NPM1 möglicherweise in der etablierten Standardtherapie der AML integrieren lassen. Vor allem im Stadium der Postremissionstherapie, wo neben der allogenen Stammzelltherapie Cytarabin der derzeitige Standard ist. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass womöglich auch unerwünschte Nebenwirkungen durch den propagierten Ansatz aus Cytarabin und NPM1-*knock-down* verstärkt werden könnten. Offen bleibt weiter zu untersuchen, ob

der hier beobachtete Effekt auch in der Kombination mit siRNA und Triphosphat-RNA ebenfalls so oder gar entsprechend stärker ausgeprägt sein könnte.



Abbildung 3-11 Die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cytarabin ist nach Knockdown von NPM1 durch siRNA gesteigert. Pro Bedingung wurden je 4×10^4 OCI-AML3-Zellen pro Well ausplattiert. Sie wurden entweder unbehandelt belassen, oder zweimal innerhalb von 25 Stunden mit einer Kontroll-RNA (CO4) oder mit einer von zwei siRNA gegen NPM1 (siNPM1_1/_2) transfiziert (c_{RNA} jeweils 1 µg/ml, 1 % vol. RNAiMAX). 48 Stunden nach der ersten Transfektion wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen von Cytarabin (0,1 – 5 µM) inkubiert und nach weiteren 48 Stunden wurde der Anteil von apoptotischen (Annexin+) oder nekrotischen Zellen (PI+) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Aufgetragen ist der Anteil an Annexin- oder Propidiumiodid-positiven Zellen der untersuchten Zellpopulation. Dargestellt sind die Ergebnisse von Versuchs-Unikaten von einem Experiment (n=1).

4.1 Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse

Bevor die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der bestehenden Literatur verglichen werden sollen, werden diese hier noch einmal kurz zusammengefasst dargestellt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass es bei allen untersuchten AML-Zelllinien möglich war, mit dem verwendeten, auf Lipofektion mit RNAiMax beruhenden, Protokoll RNA in Zellen zu transfizieren - allerdings mit sehr unterschiedlicher Effizienz zwischen den verwendeten Zelllinien, wie aus Tabelle 3-1 hervorgeht.

Der Unterschied ist jedoch nicht durch verschiedene Inkubationszeiten erklärbar, da die individuelle Transfektionsrate der einzelnen Zellinien über die untersuchte Inkubationszeitspanne relativ konstant war (Abbildung 3-2).

So muss von zellspezifischen Unterschieden im Bezug auf die Transfizierbarkeit ausgegangen werden. Durch Konfokalmikroskopie konnte die Transfektion mit AlexaFluor488 markierter RNA bestätigt und eine Lokalisation der RNA im Zellinneren suggeriert werden (Abbildung 3-3). Dass die RNA tatsächlich frei im Zytosol vorliegt lässt sich mit dieser Methode jedoch nicht mit letzter Sicherheit beweisen.

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien RIG-I und MDA5 exprimieren und dass deren Expression sowohl durch Stimulation mit poly(I:C) als auch durch exogenenes IFN- α induzierbar war (Abbildung 3-4, Tabelle 3-2).

Die teilweise sehr unterschiedlich ausgeprägte Induzierbarkeit der RLR zwischen den einzelnen Zelllinien kann teilweise durch unterschiedliche Transfektionsraten erklärt werden, da diese beiden Parameter innerhalb einer Zelllinie zu korrelieren scheinen (Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Dass aber die von der Transfektionsrate unabhängige Interferon-Stimulation auch Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigt, deutet auf zellspezifische Unterschiede in der molekularen Ausstattung der Signalwege hin. Die Daten geben ausreichend Anhalt, um annehmen zu können, dass RLR in allen getesteten AML-Zelllinien vorhanden sind und dass ihre Induktionsmechanismen durch Immunstimulation im Sinne einer positiven Verstärkung erhalten geblieben sind.

Für OCI-AML3-Zellen konnte demonstriert werden, dass sowohl mit poly(I:C) als auch mit Triphosphat-RNA eine Immunantwort ausgelöst werden konnte, welche zu einer Sekretion von IP-10 führte. Zugleich zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der RLR-Aktivierung auf das Proliferationsverhalten bzw. Überleben (Abbildung 3-5). Hierbei schien die Stärke der Immunantwort, gemessen an der IP-10 Produktion, mit der Induktion von Zelltod bzw. Hemmung von Proliferation zu korrelieren.

Somit scheint die gut beschriebene Erkennung von RNA durch RLR und die daraus resultierende Immunstimulation auch in AML-Zellen erhalten geblieben zu sein.

Es ließen sich drei Zielgene identifizieren, deren *Knock-down* durch siRNA vor allem in OCI-AML3- und THP1-Zellen zu einer Form von Zelltod führten: BRD4, NPM1 und PLK1 (Abbildung 3-7, Abbildung-3-8).

Bei gleichzeitiger Betrachtung der *Knock-down*- und Überlebensdaten für PLK1 scheinen beide miteinander zu korrelieren (Abbildung 3-8).

Aus dem Vergleich der *Knock-down*-Resultate von BRD4 und NPM1 innerhalb der Zelllinien geht hervor, dass dieser bei MV4-11 und Kasumi-1 geringer ausgeprägt war als bei OCI-AML3 und THP1 (Abbildung 3-7). Man könnte die Vermutung anstellen, dass bei ersteren der *Knock-down*-Effekt nicht ausgeprägt genug war, um einen Effekt auf das Proliferationsverhalten/den Zelltod der Zellen zu haben. So könnte dies daran liegen, dass sich MV4-11-Zellen im Vergleich zu OCI-AML3- und THP1-Zellen schlechter transfizieren lassen (Tabelle 3-1). Für Kasumi-1 Zellen stellt diese Hypothese jedoch keine befriedigende Erklärung dar, da sie sich durch eine gute Transfizierbarkeit auszeichnen. Jedoch könnte auch ein Unterschied zwischen den Zelllinien darin bestehen, in welches Kompartiment die siRNA aufgenommen werden – nur in Endosome oder in das Zytoplasma, dem relevanten Kompartiment für RLR-Aktivierung und siRNA Aktivität.

Für THP1-Zellen konnte beobachtet werden, dass nach vier Tagen der Wachstumsunterschied zwischen BRD4- und NPM1-*knock-down* gegenüber der Kontrollbedingung aufgehoben war (Abbildung 3-7). Möglicher Grund hierfür könnte ein Überwachsen der Kulturplatte durch initial nicht transfizierte Zellen sein.

Außerdem ist eine Nachsynthese der mRNA für BRD4 und NPM1 nach transienter siRNA-Wirkung und eine folgende Aufhebung des *Knock-down*-Effekts möglich. Weiter müssten beim Vergleich der einzelnen Zelllinien die unterschiedlichen zelltypischen Wachstumsraten berücksichtigt werden.

Die Herabregulation von AML1-ETO und FLT3 zeigten hingegen keine Wirkung auf das Proliferationsverhalten. Wider Erwarten hatte die erfolgreiche Suppression der FLT3mRNA keinen Effekt auf die Proliferation der untersuchten AML-Zelllinien (Abbildung 3-7).

Aus Abbildung 3-10 geht hervor, dass der Effekt simultan transfizierter Triphosphat-RNA und siRNA gegen BRD4 auf Überleben/Proliferieren von OCI-AML3- Zellen größer war als die Effekte der Einzelsubstanzen, also additiv. Ähnliches lässt sich auch für PLK1 und NPM1 vermuten. Ein aus dem Überstand durchgeführter IP-10-ELISA bestätigte die Produktion von IP-10 und somit einen funktionierenden RLR-Signalweg, welcher durch RNAi nicht beeinträchtigt zu werden scheint.

Auffällig war, dass in diesem Versuchsaufbau durch alleinige Transfektion von siRNA gegen NPM1 keine Wirkung erzielt werden konnte, obwohl dies für OCI-AML3-Zellen unter Verwendung der gleichen siRNA-Sequenz gut reproduzierbar gezeigt werden konnte. Eine Limitation hierbei ist, dass in dem Versuchsaufbau der simultanen Transfektion nur zu einem Zeitpunkt transfiziert wurde und nicht zweimal, wie in den alleinigen *Knock-down*-Experimenten.

Die Ko-Transfektion von siPLK1 und 3p-RNA zeigte weniger IP-10 an als die Kombinationen mit den beiden andere siRNA Zielen, BRD4 und NPM1. Dies muss nicht unbedingt Ausdruck einer schwächeren Immunstimulation sein. Möglich ist eine unterschiedliche Kinetik der *Knock-down*-Effekte der einzelnen Zielstrukturen. Sollte der antileukämische Effekt durch Herabregulation von PLK1 früher einsetzen oder stärker ausgeprägt sein als der von BRD4 oder NPM1, so könnte über den gleichen Zeitraum weniger IP-10 von insgesamt weniger lebenden Zellen produziert werden.

Somit konnte die Hauptfrage dieser Arbeit, ob beide Ansätze grundsätzlich in der AML-Therapie miteinander kombiniert werden können, bestätigt werden.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass OCI-AML3 Zellen, bei welchen zuvor NPM1 durch siRNA herabreguliert worden war, eine erhöhte dosisabhängige Sensibilität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cytarabin entwickelt haben (Abbildung 3-11). Die gemachte Beobachtung wird durch die Verwendung von zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen NPM1, welche in ihren Ergebnissen übereinstimmten, unterstrichen. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass womöglich auch unerwünschte Nebenwirkungen durch den propagierten Ansatz aus Cytarabin und NPM1-*knock-down* verstärkt werden könnten.

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Ansätze mit bifunktionaler 5'-Triphosphat-modifizierter-siRNA wurden bereits in diversen Krebsmodellen erforscht, darunter Melanom, Pankreaskarzinom und kleinzelliges Lungenkarzinom, nicht jedoch in AML ^{31,41-43}.

Neben der oben beschriebenen Arbeit von Poeck et al. konnte ebenfalls im Melanommodell durch Matheis et al. gezeigt werden, dass die Kombination von RIG-I-Aktivierung und Herabregulation des Onkogens urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) durch eine bifunktionale siRNA eine ausgeprägte Apoptose in Melanomzelllinien auslöste, wohingegen normale Fibroblasten und Melanozyten weniger sensitiv waren. Dieser Ansatz konnte sogar in Melanomzellen, welche zuvor Resistenzen *B-Raf proto-oncogene* (B-RAF)-Inhibition gegen und mitogen-activated protein kinase (MEK)/ extracellular signal-regulated kinase (ERK)-Inhibition erworben hatten, Apoptose induzieren. Im Mausmodell führte die systemische Applikation der Triphosphat-siRNA gegen uPAR zu einer Reduktion der Tumorgröße und löste eine systemische Immunantwort aus.⁴¹ Ellermeier al. et konnten dass

Ellermeier et al. konnten zeigen, dass RIG-I-Aktivierung in Pankreaskarzinom-Zelllinien zu Apoptose, *major histocompabiltiy complex 1* (MHC-1)-Expression und Produktion von Typ I-IFN und IP-10 führte. Bifunktionale Triphosphat-

63

siRNA gegen *transforming growth factor beta* (TGF- β) zeigte eine Herabregulation von TGF- β und eine RIG-I-Aktivierung *in vitro*. Die *in-vivo*-Applikation im Pankreasmausmodell von dieser bifunktionalen siRNA führte zu Apoptose sowie Rekrutierung und Aktivierung von CD8 T-Zellen im Tumorgewebe, welche für den therapeutischen Effekt notwendig waren, während NK-Zellen in diesem Model keine Rolle für den therapeutischen Effekt spielten. Der Effekt der Kombinationstherapie auf das Überleben war größer als die Einzeleffekte. ⁴²

In humanen Lungenkrebszellen war die Kombination aus Immunstimulation und Gen*knock-down* durch Verwendung einer Triphosphat-siRNA gegen Survivin, einem antiapoptotischen Protein, effektiver als konventionelle siRNA gegen Survivin in Bezug auf das Zell-Überleben ⁴³.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reihen sich somit in diese Beobachtungen ein. Ruzicka et al. konnten zudem *in vivo* im Mausmodell zeigen, dass RIG-I Stimulation durch Triphosphat-RNA eine niedrigere AML-Tumorlast, einen verzögerten Krankheitsausbruch und sogar eine komplette Remission in einigen Versuchstieren erreichen kann. Der Anti-Tumoreffekt war abhängig von einer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort und eines intakten MAVS-Signalwegs. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Triphosphat-Behandlung auch die Sensitivität von AML-Zellen gegenüber anti*programmed-death-lingand-1* (PD-L1)*-checkpoint-*Blockade *in vivo* gesteigert werden konnte ⁴⁴.

Tumorspezifität wird nicht nur durch die Wahl der siRNA-Zielstruktur erreicht, auch RLR-Stimulation durch poly(I:C) oder Triphosphat-RNA allein erwiesen sich als relativ spezifisch für maligne Zellen ¹⁷. Besch et al konnten bei der Untersuchung von malignen Melanomzellen zeigen, dass RLR-Stimulation in Melanomzellen zu ausgeprägter Apoptose führte, gesunde Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten jedoch weitestgehend verschont blieben ¹⁷.

Glas et al. konnten einen ähnlichen tumorspezifischen Apoptoseeffekt in Glioblastomzellen *in vitro* nachweisen ²⁰. Auch hier führte die Transfektion von poly(I:C) und Triphosphat-RNA zu einer RLR-Aktivierung mit Produktion von Typ I-Interferonen und IP-10 und zur Induktion von Apoptose ²⁰. Auf nicht-maligne humane neuronale Zellen hatte die Transfektion mit den beiden RLR-Liganden jedoch nur geringe Zytotoxizität ²⁰. Hervorzuheben ist auch, dass neben normalen Tumorzellen auch maligne Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften im gleichen Maße von dem RLR-induzierten Anti-Tumor-Effekt betroffen waren ²⁰. Dies ist deshalb so bemerkenswert, weil nach der Tumor-Stammzell-Theorie davon ausgegangen wird, dass Tumor-Stammzellen bis zu einem gewissen Grad vor einer konventionellen Chemotherapie geschützt sind und man davon ausgeht, dass sie im Falle eines Rezidivs das Reservoir darstellen, aus der wieder neue Tumorklone entstehen ^{1,11}.

Resümierend lässt sich feststellen, dass die durch RLR induzierbare Immunaktivierung in vielen Krebsentitäten erhalten geblieben zu sein scheint - darüber hinaus auch in malignen Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften. Auch der relativ tumorspezifische proapoptotische Effekt im Melanom- und Glioblastommodell lässt darauf hoffen, dass dieser Effekt auch in weiteren Entitäten, wie der AML, erhalten geblieben sein könnte.

In der bestehenden Literatur finden sich auch Daten zur Transfektion von AML-Zelllinien mit poly(I:C). In AML-Zellen löste die Transfektion von poly(I:C) mittels Elektroporation *in-vitro* Apoptose und Nekrose aus ⁴⁵. Es konnte zudem eine Immunantwort mit Typ I-IFN-Produktion einhergehend mit einer gesteigerten Empfindlichkeit der transfizierten AML-Zellen für durch NK-Zellen vermittelten Zelltod und Phagozytose durch dendritische Zellen gezeigt werden ⁴⁶. Die hier präsentierten Ergebnisse reihen sich somit in diese Beobachtungen ein und bestätigen die Funktionalität des RLR-Signalwegs in AML-Zellen.

Die RIG-I Expression in AML hat jedoch neben der Immunfunktion auch noch einen anderen Stellenwert. Zusätzlich zu seiner Aufgabe als wichtiger PRR spielt RIG-I möglicherweise auch eine wichtige regulatorische Rolle in der leukämischen

Zellproliferation und Differenzierung ^{47–49}. Zhang *et al.* beschrieben eine signifikante RIG-I-Induktion in einem RNA-unabhängigen Setting, nämlich in der Vitamin-Ainduzierten terminalen Ausreifung akuter promyelozytärer Leukämiezellen (APL) ⁴⁷. In dieser Form der AML beobachteten Jiang *et al.* eine Proliferationshemmung, welcher eine RIG-I-vermittelte, MAVS-unabhängige, *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) -Aktivierung zu Grunde lag ⁴⁸. Li *et al.* führten den antileukämischen Effekt durch RIG-I-Aktivierung auf die Induktion von Autophagie zurück ⁴⁹. Somit wäre neben den als apoptotisch und pyroptotisch beschriebenen Zelltodvorgängen durch RIG-I-Aktivierung noch ein weiterer anti-neoplastischer Mechanismus entdeckt.

In der vorliegenden Arbeit konnten BRD4, PLK1 und NPM1 als praktikable siRNA-Zielstrukturen in der AML bestätigt werden, wohingegen AML1-ETO- und FLT3-*knock-down* durch siRNA keinen Effekt zeigten.

Die hier präsentierten Daten decken sich mit Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen.

Zuber *et al.* konnten in einem RNAi-*screen* Brd4 als Zielstruktur in AML-Zellen identifizieren ³⁸. Brd4-Suppression führte zu einer Unterbrechung des Zellzyklus und Induktion von Apoptose in AML-Zellen, nicht jedoch in murinen embryozytären Fibroblasten (MEF). In *in-vivo*-Versuchen an Mäusen zeigte die Inhibierung von Brd4 durch den Einsatz des kleinmolekularen Brd4-Inhibitors JQ1 keine oder nur geringe Auswirkungen auf die normale Hämatopoese. Brd4 scheint darüber hinaus eine essenzielle Rolle im Erhalt der Leukämiestammzell-Population und der Einschränkung der terminalen Differenzierung in AML zu spielen, da Brd4-Inhibierung mit terminaler myeloischer Differenzierung und der Elimination von Leukämiestammzellen

Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass PLK1 in AML-Zelllinien und AML-Blasten häufig überexprimiert wurde und die Behandlung mit siRNA gegen PLK1 oder mit einem PLK1-Inhibitor zu einer verringerten Proliferationsrate von AML-Zellen
führte. Diese Inhibierung hatte weniger Effekt auf nicht-maligne Zellen und bestätigt daher PLK1 als relativ tumorspezifisches Ziel in AML-Zellen. ⁵⁰

Ein weiteres Forscherteam untersuchte NPM1 als Zielstruktur in der AML ⁵. *Knock-down* von unmutiertem NPM1 führte sowohl in AML-Zellen mit mutiertem NPM1 als auch in solchen mit nicht mutiertem NPM1 zu einer Einschränkung der Proliferation, wobei der Effekt auf NPM1-mutationstragende Zellen stärker ausgeprägt war ⁵.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein stärkerer anti-proliferativer Effekt auf die NPM1-mutationstragenden OCI-AML3-Zellen als auf THP1-Zellen, für welche keine Mutation im NPM1-Gen beschrieben ist, bei ähnlich guter Transfizierbarkeit beider Zelllinien. Der von Balusu *et al.* vorgeschlagene Mechanismus allerdings, dass der Effekt in den nicht-mutierten Zellen auf der Herabregulation von FLT3 beruht, deckt sich nicht mit den Beobachtung der vorliegenden Arbeit, da in den hier präsentierten FLT3-*knock-down*-Experimenten generell kein Effekt auf die Proliferationsrate nachgewiesen werden konnte. Hingegen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Herabregulation von NPM1 OCI-AML3-Zellen für Cytarabin sensibilisieren konnte. Die etwas höheren Apoptosewerte von bis zu 65 % wie von Balusu *et al.* beschrieben konnten in der hier vorliegenden Versuchsanordnung allerdings nicht erreicht werden. Dies könnte an der Art der Transfektion liegen, da die genannte Arbeitsgruppe die siRNA mittels Nukleofektion, einer Form der Elektroporation, und nicht wie in dieser Arbeit, mittels Lipofektion, tranfizierte. ⁵

FLT3 wurde in der Literatur als siRNA-Ziel in AML-Zelllinien beschrieben ^{51,52}. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit der dort beschriebene anti-leukämische Effekt nicht reproduziert werden ^{51,52}. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte Gao *et al* liefern. Diese Arbeitsgruppe konnte mit einer neuartigen Transfektionsmethode, der *nanochannel electroporation*, in Kombination mit Einzel-Zell-qPCR auf die Mengenverhältnisse von siRNA und mRNA rückschließen, welche für einen effektiven *Knock-down* nötig waren ⁵³. Dabei stellte sich heraus, dass zwischen den untersuchten Leukämie-Zellen unterschiedliche Mengen an mRNA der

untersuchten Zielstruktur *myeloid cell leukemia 1* (MCL1) vorhanden waren und unterschiedliche Mengen an siRNA notwendig waren, um einen effizienten antileukämischen Effekt zu erzielen ⁵³. In der Untersuchung der Transfektion im Zeitverlauf konnte die Arbeitsgruppe darstellen, dass bereits geringe Mengen siRNA erlaubten, schnell den Großteil der mRNA zu spalten, jedoch wirkten dem zelluläre Selbsterhaltungsmechanismen entgegen und führten zu einer Restauration der MCL1-mRNA ⁵³. Um eine ausreichend niedrige Menge an mRNA bis zur Apoptose-Induktion aufrecht zu erhalten, waren große Mengen oder multiple Dosen an siRNA in kurzen Intervallen notwendig ⁵³.

Dies könnte erklären, dass in der vorliegenden Arbeit zwar eine Reduktion der mRNA beobachtet werden konnte, dieser jedoch zelluläre Kompensationsmechanismen entgegenwirkten mit einer anschließenden Restauration der FLT3-mRNA. Somit könnte der FLT3-*knock-down* nicht lange genug aufrechterhalten worden sein, um den beschriebenen antileukämischen Effekt erzeugen zu können.

Für die Suppression von AML1-ETO mittels siRNA konnte eine Ausdifferenzierung sowie ein reduziertes klonales Wachstum in Kasumi-1-Zellen gezeigt werden ^{54,55}. In der hier vorliegenden Arbeit konnte dies, trotz erfolgreichen AML1-ETO-*knock-downs* auf mRNA-Ebene, jedoch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert Spirin *et al.*: Die Arbeitsgruppe beobachtete eine durch ALM1-ETO-Suppression erfolgte gleichzeitige Aktivierung von pro-apoptotischen sowie proliferations- und überlebensfördernden Signalwegen in Kasumi-1-Zellen, welche sich dadurch der Induktion von Apoptose entziehen konnten ⁵⁶.

4.3 Limitationen und Herausforderungen

Bei kritischer Betrachtung des experimentellen Aufbaus dieser Arbeit könnte bemängelt werden, dass alle Experimente nur mit AML-Zelllinien und keine Kontrollen mit primärem Material durchgeführt worden sind. Jedoch wurde in dieser Arbeit explizit darauf verzichtet, da sie in erster Linie die Grundlagen schaffen und eruieren sollte, ob der vorgeschlagene Ansatz in AML-Zellen überhaupt möglich ist. Daher wurde der Fokus auf diese Zellen gerichtet. Außerdem wurden nur Zielstrukturen bedient, welche bereits zuvor als relativ tumorspezifische AML-Zielstrukturen beschrieben worden waren. Aus selbigem Grund wurde auch auf *in-vivo*-Experimente zunächst verzichtet. Zudem könnte die Verwendung von siRNA in Mausmodellen zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen. Der murine *toll-like*-Rezeptor-3 (TLR3) scheint kürzere dsRNA-Fragmente als immunogen zu erkennen als seine humane Isoform ^{12,57,58}. Daher könnten in Mäusen, anderes als im Menschen, siRNA von diesen Rezeptoren erkannt werden und eine Immunantwort auslösen, selbst bei schlechter Transfektionsrate, da diese Rezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert sind und nicht wie die RLR im Zytosol ^{12,57,58}.

In den bestehenden Publikationen wurde eine bifunktionale RNA, welche Immunstimulation und posttranskriptionellen Gen-*knock-down* in einem Molekül vereint, untersucht. Der Vorteil liegt unter anderem in der Pharmadynamik, in der *Delivery*, da nur ein Molekül vorliegt, das in die Zelle aufgenommen werden muss. Die Verwendung je eines Moleküls für Immunstimulation und Gen-*knock-down*, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, hat jedoch den Vorteil, dass die Einzeleffekte unabhängig voneinander gesteuert und individuell angepasst werden können. Dies scheint vor dem Hintergrund der unterschiedlich stark ausgeprägten Induzierbarkeit der RLR, genauso wie vor der Varianz der mRNA-Mengen von potenziellen Zielstrukturen innerhalb von AML-Zelllinien, für eine möglichst effektive Therapie sinnvoll ⁵³.

Neben diesen, den Versuchsaufbau betreffenden Limitationen, gibt es jedoch auch solche, welche das Gesamtkonzept der Kombination von Immunstimulation und posttrankriptionellem Gen-*knock-down* angehen.

Seo et al. berichteten über eine reziproke Inhibierung zwischen intrazellulärer Viruserkennung durch RLR und des RNAi-Mechanismus in verschiedenen somatischen Zellen ⁵⁴. Virale Infektion oder Transfektion mit poly(I:C) führte zu einer Herabsetzung der RNAi-Aktivität ⁵⁹. Jedoch zeigen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten und der Vergleich mit der bestehenden Literatur zur Verwendung von 5'-Triphosphat-modifizierte-siRNA keine relevante negative Interaktion der beiden Ansätze.

Das Potenzial von RNAi in der Krebstherapie ist sehr groß, da es die Möglichkeit eröffnet, an weit mehr und anderen Zielstrukturen anzusetzen, als es mit anderen Methoden, wie Antikörpern, möglich ist ³³. Darüber hinaus können siRNA, unter alleiniger Voraussetzung der Kenntnis der mRNA-Sequenz der Zielstruktur, schnell und kostengünstig hergestellt werden ^{33,34}. Ein siRNA-Medikament in der Krebstherapie wurde noch nicht zugelassen, allerdings befinden sich mehrere Substanzen in klinischen Studien ^{34,60}. Die Resultate der bereits publizierten klinischen Daten mit siRNA in der Krebstherapie konnten bis jetzt maximal eine Einschränkung des Tumorwachstum zeigen, allerdings handelt es sich hierbei um frühe klinische Studien und dementsprechend vorsichtig müssen die Ergebnisse bewertet werden ³⁴. In den Studien wurden die siRNA bis auf wenige Ausnahmen gut toleriert und gingen mit wenigen Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Anstieg entzündungsfördernder Zytokine einher ³⁴.

Es konnten bis jetzt noch nicht gänzlich alle Gründe für die geringen Ansprechraten von siRNA identifiziert werden. Allerdings spielen die Verdauung von siRNA durch extraund intrazelluläre Nukleasen, geringe Aufnahme in die Ziel-Zellen und *off-target* Effekte, wie unerwünschte Degradierung eines anderen Gens als des Zielgens, eine wichtige Rolle ^{33,34}.

Daher wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie chemische Modifikationen der siRNA oder Transport-Vehikel. So verleiht beispielsweise eine 2'-Fluor-Modifikation der siRNA eine höhere Stabilität in Bezug auf Nukleasen ³³. Die Verwendung biologisch

zersetzbarer polymerischer Nanopartikel wie Polyethylenglykol (PEG) erlaubt eine bessere Stabilität im Serum, eine gesteigerte Aufnahme in Zellen und eine kontrolliertere Freisetzung ins Zytosol ³³. Vielversprechend klingt auch die Kopplung von siRNA mit auf Nukleinsäuren-basierenden Aptameren oder Antikörpern zur zielgerichteten Aufnahme ³³.

Die Hauptherausforderungen der Verwendung von siRNA in der Klinik stellen die Wahl der Zielstrukturen sowie die Optimierung des Transports und der Freisetzung von siRNA in den unterschiedlichen Tumoren dar ³³. Die Kombination von siRNA mit anderen Krebstherapieansätzen wie Chemotherapie, Immuntherapie, zielgerichteter Therapie, Strahlentherapie oder photodynamischer Therapie hat das Potential die Effizienz der Krebstherapie entscheidend zu verbessern ³³; zumal in der AML-Therapie durch Chemotherapeutika initial sehr oft eine komplette Remission erzielt werden kann und dann in der Remissionsphase eine multimodale Kombinationstherapie aus Chemotherapie, Immunstimulation und Herabregulation von Onkogenen die restlichen Tumorzellen und Tumor-Stammzellen eliminieren könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination aus Immunstimulation durch Triphosphat-RNA, einem Liganden von retinoid acid inducible gene I (RIG-I), und Ausschaltung von AML-relevanten Onkogenen durch Verwendung von shortinterfering-RNA (siRNA) als Therapieansatz in der akuten myeloischen Leukämie (AML) untersucht. Unter Verwendung von etablierten humanen AML-Zelllinien konnte in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass sich AML-Zellen gut mit kurzer doppelsträngiger RNA transfizieren lassen und sie funktionierende RIG-I-like-Rezeptoren (RLR) exprimieren. Darüber hinaus löste die Stimulation mit Polyinosin-Polycytidin-Säure (poly(I:C)) und Triphosphat-RNA eine Immunantwort mit Produktion entzündungsfördernder Chemokine sowie einer Reduktion der Zellproliferation aus. Auch der Mechanismus der RNA-Interferenz ist in den untersuchten AML-Zelllinien intakt, und es ließen sich mit Nucleophosmin-1 (NPM1), Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) und Polo-like-kinase 1 (PLK1) AMLrelevante Zielstrukturen identifizieren, deren mittels siRNA-vermittelter Knock-down zu einer Proliferationshemmung von AML-Zellen führte.

Die Kombination von Aktivierung von RIG-I und *Knock-down* eines Onkogens war für BRD4 additiv; für PLK1 und NPM1 war ebenfalls ein Trend zur additiven Verstärkung zu sehen. Die Ergebnisse von Immunstimulation mit poly(I:C) bzw. Triphosphat-RNA sowie der Ko-Transfektion von letzterer mit siRNA in AML-Zelllinien bestätigen Beobachtungen in der publizierten Literatur für andere Tumorentitäten. Eine beobachtete Steigerung der Sensitivität von AML-Zellen gegenüber Cytarabininduziertem Zelltod nach vorheriger Behandlung mit siRNA gegen NPM1 unterstreicht das Potenzial des siRNA-Ansatzes für Kombinationstherapien mit bestehenden etablierten AML-Therapien. Der Ausblick, dass auch AML-Stammzellen durch RLR-Aktivierung empfindlich für immunogenen Zelltod sein könnten, gibt Grund zur Hoffnung, da diese Zellen mit herkömmlicher Chemotherapie nur schwer therapierbar und häufig Ursache für Rezidive sind.

Zusammenfassung

Vor diesem Hintergrund stellt der vorgeschlagene Therapieansatz eine vielversprechende Erweiterung der bereits bestehenden Therapieoptionen dar und lässt auf synergistische antileukämische Effekte in der Kombination mit diesen hoffen.

6. Literaturverzeichnis

(1) Showel, M. M.; Levis, M. Advances in Treating Acute Myeloid Leukemia. *F1000Prime Rep* **2014**, *6* (96). https://doi.org/10.12703/P6-96.

(2) Döhner, H.; Weisdorf, D. J.; Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (12), 1136–1152. https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184.

(3) Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F. R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B. L.; Fenaux, P.; Larson, R. A.; Levine, R. L.; Lo-Coco, F.; Naoe, T.; Niederwieser, D.; Ossenkoppele, G. J.; Sanz, M.; Sierra, J.; Tallman, M. S.; Tien, H.-F.; Wei, A. H.; Löwenberg, B.; Bloomfield, C. D. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood* **2017**, *129* (4), 424–447. https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196.

(4) Network, T. C. G. A. R. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia

https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1301689?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov (accessed Nov 22, 2018). https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689.

(5) Balusu, R.; Fiskus, W.; Rao, R.; Chong, D. G.; Nalluri, S.; Mudunuru, U.; Ma, H.; Chen, L.; Venkannagari, S.; Ha, K.; Abhyankar, S.; Williams, C.; McGuirk, J.; Khoury, H. J.; Ustun, C.; Bhalla, K. N. Targeting Levels or Oligomerization of Nucleophosmin 1 Induces Differentiation and Loss of Survival of Human AML Cells with Mutant NPM1. *Blood* **2011**, *118* (11), 3096–3106. https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-309674.

(6) Falini, B.; Martelli, M. P. NPM1-Mutated AML: Targeting by Disassembling. *Blood* **2011**, *118* (11), 2936–2938. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366146.

(7) Jin, W.; Wu, K.; Li, Y.-Z.; Yang, W.-T.; Zou, B.; Zhang, F.; Zhang, J.; Wang, K.-K. AML1-ETO Targets and Suppresses Cathepsin G, a Serine Protease, Which Is Able to Degrade AML1-ETO in t(8;21) Acute Myeloid Leukemia. *Oncogene* **2013**, *32* (15), 1978–1987. https://doi.org/10.1038/onc.2012.204.

(8) Latuske, E.-M. Die kombinierte Inhibierung des Hedgehog- und FLT3-Signalwegs als therapeutische Zielstruktur zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie. Dissertation, Universität Hambur, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Hamburg, 2018.

(9) Short, N. J.; Ravandi, F. Acute Myeloid Leukemia: Past, Present, and Prospects for the Future. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2016**, *16*, S25–S29. https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.007.

(10) Wu, J.; Chen, Z. J. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32* (1), 461–488. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120156.

(11) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

(12) Schlee, M.; Hartmann, G. Discriminating Self from Non-Self in Nucleic Acid Sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 2016, *16* (9), 566–580. https://doi.org/10.1038/nri.2016.78.
(13) Schneider, W. M.; Chevillotte, M. D.; Rice, C. M. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 2014, *32* (1), 513–545. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

(14) Kono, H.; Kimura, Y.; Latz, E. Inflammasome Activation in Response to Dead

Cells and Their Metabolites. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *30*, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.09.001.

(15) Galluzzi, L.; Buqué, A.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunogenic Cell Death in Cancer and Infectious Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17* (2), 97–111. https://doi.org/10.1038/nri.2016.107.

(16) Ashkenazi, A.; Salvesen, G. Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30* (1), 337–356. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226.

(17) Besch, R.; Poeck, H.; Hohenauer, T.; Senft, D.; Häcker, G.; Berking, C.; Hornung, V.; Endres, S.; Ruzicka, T.; Rothenfusser, S.; Hartmann, G. Proapoptotic Signaling Induced by RIG-I and MDA-5 Results in Type I Interferon–Independent Apoptosis in Human Melanoma Cells. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (8), 2399–2411. https://doi.org/10.1172/JCI37155.

(18) Maadidi, S. E.; Faletti, L.; Berg, B.; Wenzl, C.; Wieland, K.; Chen, Z. J.; Maurer, U.; Borner, C. A Novel Mitochondrial MAVS/Caspase-8 Platform Links RNA Virus– Induced Innate Antiviral Signaling to Bax/Bak-Independent Apoptosis. *J. Immunol.* **2014**, *192* (3), 1171–1183. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300842.

(19) Kumar, S.; Ingle, H.; Mishra, S.; Mahla, R. S.; Kumar, A.; Kawai, T.; Akira, S.; Takaoka, A.; Raut, A. A.; Kumar, H. IPS-1 Differentially Induces *TRAIL*, *BCL2*, *BIRC3* and *PRKCE* in Type I Interferons-Dependent and -Independent Anticancer Activity. *Cell Death Dis.* **2015**, *6* (5), e1758. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.122.

(20) Glas, M.; Coch, C.; Trageser, D.; Daßler, J.; Simon, M.; Koch, P.; Mertens, J.;
Quandel, T.; Gorris, R.; Reinartz, R.; Wieland, A.; Lehe, M. V.; Pusch, A.; Roy, K.;
Schlee, M.; Neumann, H.; Fimmers, R.; Herrlinger, U.; Brüstle, O.; Hartmann, G.; Besch,
R.; Scheffler, B. Targeting the Cytosolic Innate Immune Receptors RIG-I and MDA5
Effectively Counteracts Cancer Cell Heterogeneity in Glioblastoma. *STEM CELLS* 2013, *31* (6), 1064–1074. https://doi.org/10.1002/stem.1350.

(21) Chattopadhyay, S.; Marques, J. T.; Yamashita, M.; Peters, K. L.; Smith, K.; Desai, A.; Williams, B. R. G.; Sen, G. C. Viral Apoptosis Is Induced by IRF - 3 - mediated Activation of Bax. *EMBO J.* **2010**, *29* (10), 1762–1773. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.50.

(22) Isaacs, A.; Lindenmann, J. Virus Interference. I. The Interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1957**, *147* (927), 258–267.

(23) Isaacs, A.; Lindenmann, J.; Valentine, R. C. Virus Interference. II. Some Properties of Interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1957**, *147* (927), 268–273.

(24) Baggiolini, M.; Dewald, B.; Moser, B. Human Chemokines: An Update. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15* (1), 675–705. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.675.

(25) Taub, D. D.; Lloyd, A. R.; Conlon, K.; Wang, J. M.; Ortaldo, J. R.; Harada, A.; Matsushima, K.; Kelvin, D. J.; Oppenheim, J. J. Recombinant Human Interferon-Inducible Protein 10 Is a Chemoattractant for Human Monocytes and T Lymphocytes and Promotes T Cell Adhesion to Endothelial Cells. *J. Exp. Med.* **1993**, *177* (6), 1809–1814. https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1809.

(26) Taub, D. D.; Sayers, T. J.; Carter, C. R.; Ortaldo, J. R. Alpha and Beta Chemokines Induce NK Cell Migration and Enhance NK-Mediated Cytolysis. *J. Immunol.* **1995**, *155* (8), 3877–3888.

(27) Svoboda, P. Renaissance of Mammalian Endogenous RNAi. *FEBS Lett.* **2014**, *588* (15), 2550–2556. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.030.

(28) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C.

Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811. https://doi.org/10.1038/35888.

(29) Pecot, C. V.; Calin, G. A.; Coleman, R. L.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A. K. RNA Interference in the Clinic: Challenges and Future Directions. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (1), 59–67. https://doi.org/10.1038/nrc2966.

(30) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494–498. https://doi.org/10.1038/35078107.

(31) Poeck, H.; Besch, R.; Maihoefer, C.; Renn, M.; Tormo, D.; Morskaya, S. S.; Kirschnek, S.; Gaffal, E.; Landsberg, J.; Hellmuth, J.; Schmidt, A.; Anz, D.; Bscheider, M.; Schwerd, T.; Berking, C.; Bourquin, C.; Kalinke, U.; Kremmer, E.; Kato, H.; Akira, S.; Meyers, R.; Häcker, G.; Neuenhahn, M.; Busch, D.; Ruland, J.; Rothenfusser, S.; Prinz, M.; Hornung, V.; Endres, S.; Tüting, T.; Hartmann, G. 5' -Triphosphate-SiRNA: Turning Gene Silencing and Rig-I Activation against Melanoma. *Nat. Med.* **2008**, *14* (11), 1256– 1263. https://doi.org/10.1038/nm.1887.

(32) Petrocca, F.; Lieberman, J. RIG-Ing an Antitumor Response. *Nat. Med.* **2008**, *14* (11), 1152–1153. https://doi.org/10.1038/nm1108-1152.

(33) Lee, S. J.; Kim, M. J.; Kwon, I. C.; Roberts, T. M. Delivery Strategies and Potential Targets for SiRNA in Major Cancer Types. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *104*, 2–15. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.010.

(34) Barata, P.; Sood, A. K.; Hong, D. S. RNA-Targeted Therapeutics in Cancer Clinical Trials: Current Status and Future Directions. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *50*, 35–47. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.08.004.

(35) Hornung, V.; Ellegast, J.; Kim, S.; Brzózka, K.; Jung, A.; Kato, H.; Poeck, H.; Akira, S.; Conzelmann, K.-K.; Schlee, M.; Endres, S.; Hartmann, G. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* **2006**, *314* (5801), 994–997. https://doi.org/10.1126/science.1132505.

(36) Hamm, W. Charakterisierung des Liganden des antiviralen Rezeptors Retinoic
Acid-Inducible Gene I. Text.PhDThesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2012.
(37) Schmidt, A.; Schwerd, T.; Hamm, W.; Hellmuth, J. C.; Cui, S.; Wenzel, M.;
Hoffmann, F. S.; Michallet, M.-C.; Besch, R.; Hopfner, K.-P.; Endres, S.; Rothenfusser, S.
5'-Triphosphate RNA Requires Base-Paired Structures to Activate Antiviral Signaling via
RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, *106* (29), 12067–12072.

https://doi.org/10.1073/pnas.0900971106.

(38) Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A. R.; Herrmann, H.; Sison, E. A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; Taylor, M. J.; Johns, C.; Chicas, A.; Mulloy, J. C.; Kogan, S. C.; Brown, P.; Valent, P.; Bradner, J. E.; Lowe, S. W.; Vakoc, C. R. RNAi Screen Identifies Brd4 as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukaemia. *Nature* **2011**, *478* (7370), 524–528. https://doi.org/10.1038/nature10334.

(39) Dawson, M. A.; Kouzarides, T.; Huntly, B. J. P. Targeting Epigenetic Readers in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, *367* (7), 647–657. https://doi.org/10.1056/NEJMra1112635.
(40) Brandwein, J. M. Targeting Polo-like Kinase 1 in Acute Myeloid Leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* 2015, *6* (2), 80–87. https://doi.org/10.1177/2040620715571077.

Matheis, F.; Heppt, M. V.; Graf, S. A.; Düwell, P.; Kammerbauer, C.; Aigner, A.;
Besch, R.; Berking, C. A Bifunctional Approach of Immunostimulation and UPAR Inhibition Shows Potent Antitumor Activity in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2016, *136* (12), 2475–2484. https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.026.

(42) Ellermeier, J.; Wei, J.; Duewell, P.; Hoves, S.; Stieg, M. R.; Adunka, T.;

Noerenberg, D.; Anders, H.-J.; Mayr, D.; Poeck, H.; Hartmann, G.; Endres, S.; Schnurr, M. Therapeutic Efficacy of Bifunctional SiRNA Combining TGF-B1 Silencing with RIG-I Activation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **2013**, *73* (6), 1709–1720. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3850.

(43) Wang, K.; Chen, X.; Yan, F.; Xing, Y.; Yang, X.; Tu, J.; Chen, Z. 5' -Triphosphate-SiRNA Against Survivin Gene Induces Interferon Production and Inhibits Proliferation of Lung Cancer Cells In Vitro. *J. Immunother.* **2013**, *36* (5), 294. https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318294183b.

(44) Ruzicka, M.; Koenig, L. M.; Formisano, S.; Boehmer, D. F. R.; Vick, B.; Heuer, E.-M.; Meinl, H.; Kocheise, L.; Zeitlhöfler, M.; Ahlfeld, J.; Kobold, S.; Endres, S.; Subklewe, M.; Duewell, P.; Schnurr, M.; Jeremias, I.; Lichtenegger, F. S.; Rothenfusser, S. RIG-I-Based Immunotherapy Enhances Survival in Preclinical AML Models and Sensitizes AML Cells to Checkpoint Blockade. *Leukemia* **2020**, *34* (4), 1017–1026. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0639-x.

(45) Mahmud, S. M.; Mek, K. J.; Idris, A. Intracellular Delivery of Synthetic DsRNA to Leukemic Cells Induces Apoptotic and Necrotic Cell Death. *Folia Biol. (Praha)* **2016**, *62* (2), 90–94.

(46) Lion, E.; Anguille, S.; Berneman, Z. N.; Smits, E. L. J. M.; Tendeloo, V. F. I. V. Poly(I:C) Enhances the Susceptibility of Leukemic Cells to NK Cell Cytotoxicity and Phagocytosis by DC. *PLOS ONE* **2011**, *6* (6), e20952.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020952.

(47) Zhang, N.-N.; Shen, S.-H.; Jiang, L.-J.; Zhang, W.; Zhang, H.-X.; Sun, Y.-P.; Li, X.-Y.; Huang, Q.-H.; Ge, B.-X.; Chen, S.-J.; Wang, Z.-G.; Chen, Z.; Zhu, J. RIG-I Plays a Critical Role in Negatively Regulating Granulocytic Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (30), 10553–10558. https://doi.org/10.1073/pnas.0804895105.

(48) Jiang, L.-J.; Zhang, N.-N.; Ding, F.; Li, X.-Y.; Chen, L.; Zhang, H.-X.; Zhang, W.;
(48) Chen, S.-J.; Wang, Z.-G.; Li, J.-M.; Chen, Z.; Zhu, J. RA-Inducible Gene-I Induction
Augments STAT1 Activation to Inhibit Leukemia Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (5), 1897–1902. https://doi.org/10.1073/pnas.1019059108.

(49) Li, X.-Y.; Jiang, L.-J.; Chen, L.; Ding, M.-L.; Guo, H.-Z.; Zhang, W.; Zhang, H.-X.; Ma, X.-D.; Liu, X.-Z.; Xi, X.-D.; Chen, S.-J.; Chen, Z.; Zhu, J. RIG-I Modulates Src-Mediated AKT Activation to Restrain Leukemic Stemness. *Mol. Cell* **2014**, *53* (3), 407–419. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.008.

(50) Renner, A. G.; Santos, C. D.; Recher, C.; Bailly, C.; Créancier, L.; Kruczynski, A.; Payrastre, B.; Manenti, S. Polo-like Kinase 1 Is Overexpressed in Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Preferentially Targets the Proliferation of Leukemic Cells. *Blood* **2009**, *114* (3), 659–662. https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195867.

(51) Wang, C.-M.; Sheng, G.-Y.; Lu, J.; Xie, L.; Bai, S.-T.; Xu, X.-J.; Liu, Y.-F. Effect of Small Interfering RNA Targeting Wild-Type FLT3 in Acute Myeloid Leukaemia Cells In Vitro and In Vivo. *J. Int. Med. Res.* **2011**, *39* (5), 1661–1674. https://doi.org/10.1177/147323001103900508.

(52) Lu, J.; Sheng, G.; Zou, X.; Xu, X.; Zhao, X.; Bai, S.; Xu, P. [Effects of FMS-like tyrosine kinase 3 targeted RNA interference on proliferation and apoptosis of acute monocytic leukemia cell line THP-1]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin. J. Pediatr.* **2007**, *45* (8), 615–619.

(53) Gao, K.; Huang, X.; Chiang, C.-L.; Wang, X.; Chang, L.; Boukany, P.; Marcucci, G.; Lee, R.; Lee, L. J. Induced Apoptosis Investigation in Wild-Type and FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia Cells by Nanochannel Electroporation and Single-Cell QRT-PCR. *Mol.*

Ther. 2016, 24 (5), 956–964. https://doi.org/10.1038/mt.2016.6.

(54) Heidenreich, O.; Krauter, J.; Riehle, H.; Hadwiger, P.; John, M.; Heil, G.;
Vornlocher, H.-P.; Nordheim, A. AML1/MTG8 Oncogene Suppression by Small Interfering RNAs Supports Myeloid Differentiation of t(8;21)-Positive Leukemic Cells. *Blood* 2003, *101* (8), 3157–3163. https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1589.
(55) Gessner, A.; Thomas, M.; Garrido Castro, P.; Büchler, L.; Scholz, A.;

(55) Gessner, A.; Thomas, M.; Garrido Castro, P.; Büchler, L.; Scholz, A.; Brümmendorf, T. H.; Martinez Soria, N.; Vormoor, J.; Greil, J.; Heidenreich, O. Leukemic Fusion Genes *MLL/AF4* and *AML1/MTG8* Support Leukemic Self-Renewal by Controlling Expression of the Telomerase Subunit TERT. *Leukemia* **2010**, *24* (10), 1751–1759. https://doi.org/10.1038/leu.2010.155.

(56) Spirin, P. V.; Lebedev, T. D.; Orlova, N. N.; Gornostaeva, A. S.; Prokofjeva, M. M.; Nikitenko, N. A.; Dmitriev, S. E.; Buzdin, A. A.; Borisov, N. M.; Aliper, A. M.; Garazha, A. V.; Rubtsov, P. M.; Stocking, C.; Prassolov, V. S. Silencing *AML1-ETO* Gene Expression Leads to Simultaneous Activation of Both pro-Apoptotic and Proliferation Signaling. *Leukemia* 2014, *28* (11), 2222–2228. https://doi.org/10.1038/leu.2014.130.
(57) Weber, C.; Müller, C.; Podszuweit, A.; Montino, C.; Vollmer, J.; Forsbach, A. Toll-like Receptor (TLR) 3 Immune Modulation by Unformulated Small Interfering RNA or DNA and the Role of CD14 (in TLR-Mediated Effects). *Immunology* 2012, *136* (1), 64–77. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03559.x.

(58) Kleinman, M. E.; Kaneko, H.; Cho, W. G.; Dridi, S.; Fowler, B. J.; Blandford, A. D.; Albuquerque, R. J.; Hirano, Y.; Terasaki, H.; Kondo, M.; Fujita, T.; Ambati, B. K.; Tarallo, V.; Gelfand, B. D.; Bogdanovich, S.; Baffi, J. Z.; Ambati, J. Short-Interfering RNAs Induce Retinal Degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol. Ther.* **2012**, *20* (1), 101–108. https://doi.org/10.1038/mt.2011.212.

(59) Seo, G. J.; Kincaid, R. P.; Phanaksri, T.; Burke, J. M.; Pare, J. M.; Cox, J. E.; Hsiang, T.-Y.; Krug, R. M.; Sullivan, C. S. Reciprocal Inhibition between Intracellular Antiviral Signaling and the RNAi Machinery in Mammalian Cells. *Cell Host Microbe* **2013**, *14* (4), 435–445. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.002.

(60) Sridharan, K.; Gogtay, N. J. Therapeutic Nucleic Acids: Current Clinical Status. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *82* (3), 659–672. https://doi.org/10.1111/bcp.12987.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene	
	homolog 1	
Abx	Antibiotikum	
AF488-RNA	AlexaFluor488-markierte-2.2as-RNA	
AML	Akute myeloische Leukämie	
AML1	Acute myeloid leukemia 1 protein, alias RUNX1	
AML1-ETO	Fusionsprotein aus AML1 und ETO	
ASXL1	Additional sex combs like 1, transcriptional	
	regulator	
APL	Akute promyelozytäre Leukämie	
BAX	BCL-2-assoziiertes X-Protein	
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	
BCR	Breakpoint cluster region	
BCR-ABL1	Fusionsgen aus BCR und ABL1	
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	
bp	Basenpaar (engl. base pare)	
B-RAF	B-Raf proto-oncogene	
BRD4	Bromodomain containing protein 4	
°C	° Celsius	
CARD	Caspase activating and recruiting domain	
Cardif	CARD adapter inducing interferon-β	
CBF	Core binding factor	
CBFB	Core-binding factor subunit beta	
CBFB-MYH11	Fusionsgen aus CBFB und MYH11	
cDNA	Komplementäre DNA	
CEBPA	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha	
CML	Chronisch myeloische Leukämie	
CO4	CO4-Gen (murin)	
СТВ	CellTiter-Blue	
DAMP	Damage-associated molecular pattern	
DEK-NUP214	Fusionsgen aus DEK und NUP214	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	
ds	Doppelstrang (engl. double-strand)	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	

Abkürzungsverzeichnis

ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ЕТО	Alias RUNX1T1, alias MTG8
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FCS	Fetal calf serum
FLT3	FMS-like-tyrosine-kinase-3-Rezeptor
GATA2	GATA binding protein 2
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma induced protein 10
IPS-1	Interferon- eta promoter stimulator protein 1
IRF	Interferon regulatory factor
IRG	Interferon-regulierte Gene
ITD	Internal tandem duplication
IVT	In vitro-Transkription
KMT2A	Lysine (K)-specific methyltransferase 2A
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling
MYD88	Myeloid differentiation primary response protein
	88
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia ;
	translocated to 3
MLLT3-KMT2A	Fusionsgen aus MLLT3 und KMT2A
MRD	Minimal residual disease
mRNA	Messenger RNA
MYHA11	Myosin heavy chain 11
NF-ĸB	Nuclear factor kappa B
NLR	<i>NOD-like</i> -Rezeptor
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin-domain containing 3
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NOXA	Alias PMAIP1
NPM1	Nucleophosmin-1
NUP214	Nucleoporin 214kDa
ОН	Hydroxylgruppe

Abkürzungsverzeichnis

PAMP	Pathogen-associated molecular pattern	
PBS	Phosphate-buffered saline	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
PD-L1	Programmed-death-lingand 1	
PEG	Polyethylenglykol	
PI	Propidiumiodid	
PKR	Proteinkinase R	
PLK1	Polo-like-Kinase-1	
PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced	
	protein 1	
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidin-Säure	
3p-RNA	5'-Triphosphat-RNA	
PRKCE	Protein kinase C epsilon	
PRR	Pattern recognition receptor	
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis	
qRT	Quantitative reverse transcription	
rH	Relative Luftfeuchtigkeit	
RIG-I	Retinoic acid inducible gene-I	
RISC	RNA-induzierter silencing complex	
RLR	<i>RIG-I like</i> -Rezeptoren	
RLH	<i>RIG-I like-</i> Helikasen	
RNA	Ribonukleinsäure	
RNAi	RNA-Interferenz	
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
RUNX1	Runt related transcription factor 1, alias AML1	
RUNX1T1	RUNX1 translocation partner 1, alias ETO	
SEM	Standard error of the mean	
siRNA	Short-interfering-RNA	
SS	Einzelstrang (engl. <i>single-strand</i>)	
STAG2	Stromal antigen 2	
STAT	Signal transducer and activator of transcription	
Таq	Thermus aquaticus	
TBS	Therapiebedingte Sterblichkeit	
TGFβ	Transforming gorwth factor beta	
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor	
TP53	Tumor protein p53	
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β	
uPAR	Urokinase typ plasminogen activator receptor	

Abkürzungsverzeichnis

VISA	Virus-induced signaling adapter
% vol.	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Stefan Endres bedanken für das Ermöglichen meiner Promotion im wissenschaftlich stimulierenden und menschlich sehr ansprechenden Umfeld der Abteilung für Klinische Pharmakologie sowie der Einbindung in das Graduierten Kolleg 1202 der DFG.

Herrn Prof. Simon Rothenfußer möchte ich besonders dafür danken, dass er mein Promotionsvorhaben in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mich während meiner Zeit im Labor sowie während der Niederschrift dieser Arbeit mit viel Geduld unterstützt hat.

Großen Dank möchte ich Herrn Dr. Felix Lichtenegger aussprechen, dem direkten Betreuer dieser Dissertation. Ihm möchte ich für die Konzeption des Forschungsprojekts, die gut strukturierte Einarbeitung, seine ständige Verfügbarkeit sowie seinen Rat bei der Planung der Experimente danken.

Allen Mitgliedern der einzelnen Arbeitsgruppen innerhalb der Abteilung für Klinische Pharmakologie möchte ich für die wissenschaftliche aber vor allem auch mentale Unterstützung danken. Dank dieser guten Atmosphäre war diese arbeitsreiche Zeit auch persönlich bereichernd für mich.

Meiner Familie möchte ich die mentale Unterstützung während dieser Arbeit danken. Andreas Linder möchte ich herzlich für seinen kritischen Geist und seine anregenden Korrekturen danken.

9. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

"RIG-I-Based Immunotherapy Enhances Survival in Preclinical AML Models and Sensitizes AML Cells to Checkpoint Blockade." 2020

Ruzicka, M.; Koenig, L. M.; Formisano, S.; Boehmer, D. F. R.; Vick, B.; Heuer, E.-M.; Meinl, H.; Kocheise, L.; **Zeitlhöfler, M**.; Ahlfeld, J.; Kobold, S.; Endres, S.; Subklewe, M.; Duewell, P.; Schnurr, M.; Jeremias, I.; Lichtenegger, F. S.; Rothenfusser, S.

Leukemia **2020**, *34* (4), 1017–1026. <u>https://doi.org/10.1038/s41375-019-0639-x</u>.

Poster

"Bifunctional siRNA as an approach to personalized AML therapy"

Lichtenegger, F.S.; **Zeitlhöfler, M**.; Meinl, H.; Endres, S.; Subklewe, M.; Rothenfusser, S.

International Symposium "ACUTE LEUKEMIAS XIV – Biology and Treatment Strategies" 24. – 27.02.2013, München, Deutschland

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Marcus Zeitlhöfler, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **"Immunstimulatorische short-interfering-RNA als Therapieansatz der akuten myeloischen Leukämie**" selbständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft einzeln nachgewiesen habe. Ferner versichere ich, dass ich die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

München, den 28.02.2022

Marcus Zeitlhöfler