

Aus der
Abteilung für Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres
in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**Charakterisierung unterschiedlicher in vivo und in vitro Modelle
akuter myeloischer Leukämie und Evaluation hinsichtlich
therapeutischer Anwendung von RIG-I aktivierender,
bifunktionaler siRNA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Eva-Maria Heuer
aus Rosenheim

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Simon Rothenfuß
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Philipp Greif Prof. Dr. Michael Albert
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. Felix Lichtenegger Dr. Lars König
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	6.6.2024



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Heuer, Eva-Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Charakterisierung unterschiedlicher in vivo und in vitro Modelle akuter myeloischer Leukämie
und Evaluation hinsichtlich therapeutischer Anwendung
von RIG-I aktivierender, bifunktionaler siRNA**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 22.01.2024

Ort, Datum

Heuer Eva-Maria

Unterschrift Eva-Maria Heuer

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 01.07.2024

1. Einleitung.....	8
1.1. Das Immunsystem	8
1.2. RIG-I- <i>like</i> Rezeptoren (RLR).....	9
1.3. Die Rolle von RLR-Liganden in der Tumorthherapie.....	12
1.4. Konzept der bifunktionellen siRNAs	13
1.5. Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie	14
1.6. Klinischer Verlauf und Therapieoptionen der AML	16
1.7. Bifunktionelle ppp-siRNAs bei AML – aktueller Forschungsstand, relevante Problemstellungen und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	18
1.8. Für die Untersuchung von bifunktioneller siRNA werden spezielle Modelle benötigt.....	19
1.9. Fragestellung	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Geräte und allgemeine Verbrauchsmittel	21
2.1.1. Technisches Equipment.	21
2.1.2. Verbrauchsmittel.....	21
2.1.3. Chemikalien.....	22
2.1.4. Reagenziensätze.....	24
2.1.5. Zellkultur	25
2.2. Projektspezifische Materialien	26
2.2.1. Stimuli	26
2.2.2. Viren	26
2.2.3. Zelllinien.....	26
2.2.4. Antikörper für Western Blot.....	27
2.2.5. FACS-Färbungen.....	27
2.2.6. q-PCR-Primer	27

2.2.7.	siRNAs.....	28
2.2.8.	DNA- <i>Templates</i> zur IVT und IVT Primer	28
2.3.	Zelluläre-immunologische Methoden.....	29
2.3.1.	Zellkultur	29
2.3.2.	Transfektion mit synthetischen Stimuli	31
2.3.3.	Elektroporation.....	32
2.3.4.	Virusinfektion	33
2.3.5.	Herstellung GFP-exprimierender Zelllinien.....	33
2.3.6.	ELISA.....	34
2.3.7.	Durchflusszytometrie	35
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	36
2.4.1.	Herstellung von Zelllysaten.....	36
2.4.2.	Messung der Proteinkonzentration	36
2.4.3.	Gelelektrophorese	37
2.5.	Molekularbiologische Methoden	38
2.5.1.	<i>In vitro</i> -Transkription	38
2.5.2.	Herstellung der bifunktionellen siRNA	39
2.5.3.	RNA Extraktion	40
2.5.4.	Reverse Transkription.....	40
2.5.6.	Färbungen für Durchflusszytometrie.....	41
2.6.	Tiermodell	42
2.6.1.	Mäuse	42
2.6.2.	Leukämieinduktion.....	42
2.6.3.	Herstellung von Organlysaten	43

2.6.4.	Auswertung von Organlysaten	43
2.7.	Statistik und Auswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Eignung der Zelllinie C1498 als <i>in vitro</i> -Modell für therapeutische Anwendung von bifunktionaler siRNA.....	44
3.2.	Charakterisierung des syngenem AML-Mausmodells C1498-GFP-Zellen in C57BL/6.....	49
3.3.	Vergleich zweier Xenograft-Mausmodelle mit FLT3-Mutation	52
3.4.	Anwendung und Effekt von Triphosphat-RNA in primären AML-Zellen.....	54
3.5.	Wirkung von bifunktionaler Triphosphat-modifizierter siRNA in primären AML-Zellen	59
4.	Diskussion	66
4.1.	Ergebnisüberblick	66
4.2.	Transfektion von Leukämiezellen ist problematisch	68
4.3.	Eignung von C1498-Zellen und primären AML-Blasten als <i>in vitro</i> -Modelle für Anwendung von bifunktionaler ppp-siRNA	71
4.4.	Effekt von bifunktionalen siRNAs in <i>ex vivo</i> kultivierten primären AML-Blasten	74
4.5.	Aussagekraft von Therapieversuchen in <i>ex vivo</i> -Kulturen von primären AML-Blasten.....	77
4.6.	Eignung unterschiedlicher Mausmodelle der AML als <i>in vivo</i> -Modelle für die Anwendung von bifunktionaler siRNA	79
4.7.	Zusammenfassung: Modelle für die Untersuchung bifunktionaler ppp-siRNAs in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie	83
5.	Literaturverzeichnis	85
6.	Abbildungsverzeichnis.....	98
7.	Abkürzungsverzeichnis	99
8.	Danksagung	101
9.	Veröffentlichungen	102
9.1.	Originalarbeiten.....	102
9.2.	Vorträge	102

9.3. Posterpräsentation.....102

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Aufbau und Funktion des Immunsystems beschäftigt Forscher schon seit über 200 Jahren. Auf welche Weise sich der menschliche Körper vor Bakterien, Viren und Parasiten schützt ist grundlegend entschlüsselt. Auf welche Weise das Immunsystem auch vor Tumorerkrankungen schützen kann, ist Gegenstand der immunologischen Forschung des aktuellen Jahrhunderts.

Grundlegend wird das angeborene und das erworbene Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem kann schnell auf konservierte mikrobielle Strukturen reagieren, welche in vielen pathogenen Organismen vorkommen. Der Aufbau des angeborenen Immunsystems ist über die Menschheitsgeschichte stark konserviert. Es ist bereits bei Geburt funktionsfähig. Die angeborene Abwehr beruht auf physikalischen, chemischen, zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen.

Im Gegensatz dazu basiert das erworbene Immunsystem auf antigenspezifischen Lymphozyten. Es ermöglicht dem Menschen eine Immunität gegen sowohl für das Individuum wie den Mensch als Spezies neue Krankheitserreger zu entwickeln und durch das sog. immunologische Gedächtnis eine langfristige Immunität zu erwerben. Durch den Vorgang der somatischen Rekombination entsteht ein Pool an Lymphozyten mit hochspezifischen Antigenrezeptoren auf der Oberfläche. Um diese Zellen zu aktivieren, ist die Präsentation der Antigene durch das angeborene Immunsystem notwendig. Die erworbene Immunreaktion ist somit der angeborenen Immunreaktion zeitlich nachgeschaltet (1).

Das angeborene Immunsystem beruht auf der Erkennung von sog. pathogen assoziierten Mustern (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR). PAMPs sind häufig essentielle Bestandteile des Pathogens. Beispiele sind Lipopolysaccharide (LPS), welche in der Zellwand gram-negativer Bakterien enthalten sind oder Flagellin, welches zur Fortbewegung einiger Bakterien notwendig ist. Erkannt werden PAMPs durch Zellen, welche PRR exprimieren.

Unter den PRR spielen insbesondere vier Proteinfamilien eine wichtige Rolle: *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und C-Typ Lektin Rezeptoren (CLRs), beide mit transmembranärer Lokalisation sowie *Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like* Rezeptoren (RLRs) und *NOD-like* Rezeptoren (NLRs) mit zytoplasmatischer Lokalisation (2).

Durch Detektion eines Pathogens wird eine komplexe Immunantwort ausgelöst. Durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wird die Eliminierung von Pathogenen und infizierten Zellen koordiniert. Proinflammatorischen Zytokine spielen hier eine bedeutende Rolle. Diese Proteine haben pleiotrope Effekte, sie regulieren den Zelltod von Entzündungsgeweben, modifizieren die vaskuläre Permeabilität, rekrutieren weitere Immunzellen in das entzündete Gewebe und induzieren die Produktion von Akutphasenproteinen (2). Beispiele relevanter Zytokingruppen sind Interleukine (z.B. IL2, IL6, TNF α), Chemokine (z.B. IP10) und Interferone.

1.2. RIG-I-like Rezeptoren (RLR)

Eine wichtige Gruppe der PRR ist die Familie der *RIG-I-like* Rezeptoren (RLR). Dazu gehören das *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), das *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Die Rezeptoren RIG-I und MDA5 erkennen RNA-Viren unterschiedlichen Aufbaus. Die Rolle von LGP2 ist weniger klar, es wird allgemein angenommen, dass es RIG-I und MDA5 reguliert. RLRs sind im Zytoplasma lokalisiert, ihre Expression kann als Reaktion auf Typ-I-IFN-Stimulation oder Virusinfektion stark erhöht werden. Im Gegensatz zu Antigenrezeptoren sind die RLRs in fast allen Körperzellen exprimiert. (2-4)

RIG-I erkennt stumpfe Enden von doppelsträngiger RNA, die ein 5'-Triphosphat oder ein 5'-Diphosphat enthalten (5-7). Diese Ergebnisse beruhen zu großen Teilen auf Untersuchungen mit künstlich hergestellten RIG-I Liganden. Als Prototyp wurde in experimentellen Studien häufig eine synthetisch oder enzymatisch hergestellte doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA mit einer Mindestlänge von 18-19 bp verwendet (8). Moleküle dieser Struktur werden im Folgenden als Triphosphat-RNAs bezeichnet.

MDA5 erkennt lange doppelsträngige RNAs (9, 10). Die genauen strukturellen Voraussetzungen sind noch nicht entschlüsselt, ein aktuelles Review lässt jedoch vermuten, dass die Länge und Sekundärstruktur der RNA wichtige Determinanten sind. Die Autoren spekulieren, dass ein noch zu identifizierendes Konsensus-RNA-PAMP, welches von MDA5 detektiert wird, existieren könnte (11).

Alle RLRs bestehen aus einer zentralen Helikasedomäne sowie einer so genannte carboxyterminalen Domäne, diese interagieren mit den RNAs. Zusätzlich besitzen RIG-I und MDA5 zwei aminoterminalen Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomänen (CARDs), diese ermöglichen die Interaktion mit dem Protein MAVS (4). MAVS befindet sich an der äußeren Mitochondrienmembran, nach

Aktivierung formt es „Prionen-ähnliche“ Aggregate (12). Diese vermitteln das Signal an die TANK-bindende Kinase 1 (TBK1) und die I κ B-Kinase- ϵ (IKK ϵ). Dadurch kommt es zur Aktivierung und nukleären Translokation von Interferon-Regulationsfaktor 3 (IRF3) und IRF7, sowie des Transkriptionsfaktors *nuclear factor*- κ B (NF- κ B). Diese induzieren die Expression von Typ I Interferonen und anderen Genprodukten (2, 4). (Abb. 1)

Die Aktivierung der RLR-Kaskade führt zur Transkription zahlreicher Zytokine und Chemokine (12-15). Diese Entzündungsmediatoren sind entscheidend für die Koordination der zellulären Immunantwort (1). Auf Grund der Relevanz für diese Arbeit, soll hier insbesondere auf Interferone und IP10 gesondert eingegangen werden: Das interferon- γ -inducible protein 10 (IP10) auch bekannt als Chemokine C-X-C ligand 10 (CXCL10) gehört zur Gruppe der Chemokine und wurde in Vorarbeiten zur Quantifizierung der RIG-I Kaskade eingesetzt (16, 17). IP10 wird, wie der Name suggeriert, u.a. abhängig von Interferon γ freigesetzt.

Die Funktionen von Interferonen umfassen direkte antivirale Aktivität sowie die Aktivierung und Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort (18). Interferone aktivieren über den JAK-STAT-Signalweg die Expression von *interferon stimulated genes* (ISGs). Bei den ISGs handelt es sich um eine große Gruppe an Genen, welche interferonabhängig exprimiert werden und insbesondere antivirale Effekte haben. Zur Gruppe der ISGs gehören auch RIG-I selber und Teile des JAK-STAT-Signalweges. Somit kommt es zu einem selbstverstärkenden Effekt der RIG-I Signalkaskade (19-21). Die RLR stehen somit an zentraler Stelle in der Regulation von antiviralen Immunantworten.

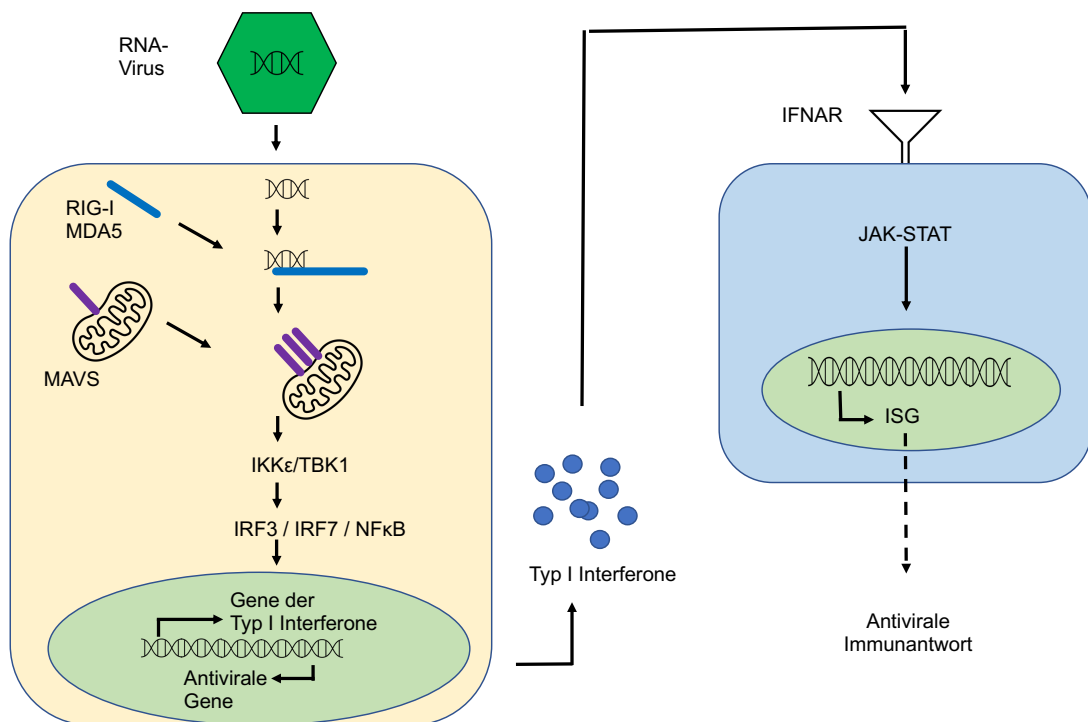


Abbildung 1. Die RIG-I Signalkaskade (Adaptiert nach (4, 12))

Neben dem Einfluss auf die systemischen Immunreaktion, spielt RIG-I auch eine Rolle in der direkten Eliminierung von infizierten Zellen. Zelltod kann in verschiedenen Unterformen auftreten. Es werden hierbei unter anderem Nekrose, Apoptose und Pyroptose unterschieden. Nekrose ist eine Zelltodform auf Grund von schädlichen externen Einflüssen z.B. physikalische Einflüsse oder Nährstoffmangel. Apoptose hingegen ist ein programmierter Vorgang, welcher durch interne oder externe Signale ausgelöst wird, der sog. extrinsische und intrinsische Apoptoseweg. Die Pyroptose beschreibt eine hochimmunogene Form des Zelltodes bei dem zahlreiche Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden (1).

RIG-I-Aktivierung führt zu Zelltod durch Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Weges (22-24), des extrinsischen Apoptoseweg (25) sowie durch Pyroptose (25, 26). Böhmer et al. konnten zeigen, dass die intrinsische Apoptose nach RIG-I-Aktivierung über die Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1) und RNase L vermittelt wird (27).

In vivo Arbeiten von DUEWELL et al. zeigten, dass es in Folge von RLR-abhängiger Apoptose von Tumorzellen zur spezifischen Aktivierung von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen spezifisch gegen diese Tumorzellen kommt (24). RLRs stellen

somit nicht nur über Entzündungsmediatoren, sondern auch im Rahmen der Apoptose eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem her.

1.3. Die Rolle von RLR-Liganden in der Tumorthherapie

Wu et al. beschreibt in seinem Review die Verbindung zwischen Virologie und Tumorummunologie folgendermaßen: „Krebszellen und virusinfizierte Zellen sind potentiell gefährliche Wirtszellen, und sie haben bestimmte gemeinsame Eigenschaften: Beide exprimieren spezifische Antigene, die sich vom Wirt unterscheiden, und beide müssen sich den Kontrollmechanismen des Immunsystems des Wirts und anderer Systeme entziehen, um zu überleben“ (aus dem Englischen übersetzt) (28).

Die Mechanismen, durch welche sich Tumorzellen dem Immunsystems entziehen, sind vielfältig. Tumorzellen haben nur eine geringe Immunogenität. Dies ist unter anderem durch die fehlende Präsentation von tumorspezifischen Antigenen bedingt. Zudem hemmt die Expression von negativ costimulierenden Liganden (z.B PD-L1) die T-Zellfunktion. Häufig fehlt ein costimulatorisches Molekül bei der Expression von Tumorantigenen durch Antigen präsentierende Zellen (APCs), somit können T-Zellen nicht aktiviert werden. Durch die Sekretion immunsuppressiver Mediatoren (z.B.IDO, (Indolamin-2,3-Dioxygenase)) können Immunzellen lokal in ihrer Funktion geschwächt werden. Zudem werden regulatorische Immunzellen angelockt, welche die Immunantwort unterdrücken (1, 29).

Eine Triphosphat-RNA stellt, in der Theorie, den passgenauen Gegenspieler zur tumorinduzierten Immunsuppression dar. Elion et al. (30) führt aus, welche Chance künstliche RIG-Liganden (wie z.B. Triphosphat-RNA) bei Tumorerkrankungen haben könnten: „Die RIG-I-Aktivierung könnte einen dreigleisigen Angriff darstellen: 1. direkte Aktivierung des Tumorzelltods; 2. Zytokin-vermittelte Aktivierung von angeborenen Immuneffektoren [...] und 3. erhöhte Rekrutierung und Cross-Priming von adaptiven Immuneffektoren [...] (aus dem Englischen übersetzt).

Zahlreiche Autoren stützen die zitierte Aussage von Elion et al. im Rahmen von präklinischen Untersuchungen. Triphosphat-RNA zeigte Wirkung u.a. für Melanome (22, 31), Pankreaskarziome (24) und Brustkrebs (25). Bisher gibt es keine Belege zur Wirksamkeit von Triphosphat-RNA im Menschen. Bisher wurden zwei Studien mit RIG-I Liganden bei metastasierten soliden Tumoren durchgeführt (NCT03065023, NCT03739138) davon letztere unter Hinzunahme von Pembrolizumab. Hier zeigte sich eine akzeptable Therapiesicherheit mit geringer Antitumoraktivität bei Nachweis von

RIG-I Aktivierung. In den getesteten Dosierungen brachte der RIG-I Ligand jedoch keinen klinischen Nutzen (32).

1.4. Konzept der bifunktionellen siRNAs

Eine bifunktionelle ppp-siRNA beschreibt ein kurzes doppelsträngiges RNA-Molekül mit einer Triphosphatmodifikation am 5'-Ende, dessen Sequenz komplementär zu einer Ziel-mRNA ist. Es vereint also die strukturellen Eigenschaften einer siRNA mit den Eigenschaften eines RIG-I Liganden.

siRNAs haben das Potential durch den Mechanismus der RNA-Interferenz die Expression eines komplementären mRNA-Stranges zu unterbinden. RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus in Eukaryoten zur Genregulation sowie zur Abwehr von Viren. Die Helikase Dicer erkennt eine doppelsträngige (virale) RNA und teilt diese in kurze RNA-Stücke, die sog. *small interfering RNAs* (siRNAs). Nach Separation in Einzelstränge werden diese auf einen Proteinkomplex geladen, der als RNA-induzierter *silencing*-Komplex (RISC) bekannt ist. Der so beladene RISC-Komplex durchsucht das Transkriptom nach der komplementären Ziel-mRNA und spaltet diese. So wird eine Expression verhindert (33).

Das mögliche Potential siRNA-basierter Therapien ist, gezielt mutierte oder in Tumorzellen überexprimierte Gene stillzulegen. Dies hat eine hohe Relevanz für genetische Erkrankungen. Die Entdecker der RNA-Interferenz, Fire und Mello erhielten 2006 für ihre Leistung den Nobelpreis (34). Bisher wurden zwei siRNA-basierte Medikamente zur Therapie seltener Stoffwechselerkrankungen zugelassen. Auch bei Tumorerkrankungen spielen genetische Mutationen eine wichtige Rolle, sie ermöglichen das unkontrollierte Zellwachstum und Vermehrung. Im Bereich der Tumorthherapie gibt es zahlreiche präklinische und klinische Studien zur Anwendung von siRNAs, bisher erfolgte jedoch noch keine Zulassung (35).

Bifunktionelle ppp-siRNA haben in der Theorie breite Anwendungsmöglichkeiten in der Tumorthherapie, da diese zwei grundlegende Mechanismen der Tumorentstehung außer Kraft setzen: genetische Mutation und Immunsuppression. Die Funktionsweise der bifunktionellen ppp-siRNA wird in Abb.2 dargestellt. Bisher gibt es vielversprechende Daten aus präklinischen Studien für das murine Pankreaskarzinom (16), Lungenkarzinome (36, 37), AML (23) und weiteren Tumorzelllinien (38).

In der vorliegenden Arbeit wird zur Unterscheidung der Komponenten der bifunktionellen ppp-siRNA die folgende Nomenklatur verwendet:

- siRNA: nicht stimulierende siRNA mit ausschließlicher *knock-down*-Funktion eines Gens z.B. entspricht siPLK1 einer siRNA gegen die mRNA von PLK1
- Triphosphat-RNA: stimulierende RNA mit Triphosphatmodifikation ohne *knock-down*-Funktion
- Bifunktionelle ppp-siRNA: Kombination aus stimulierender und *knock-down*-Komponente

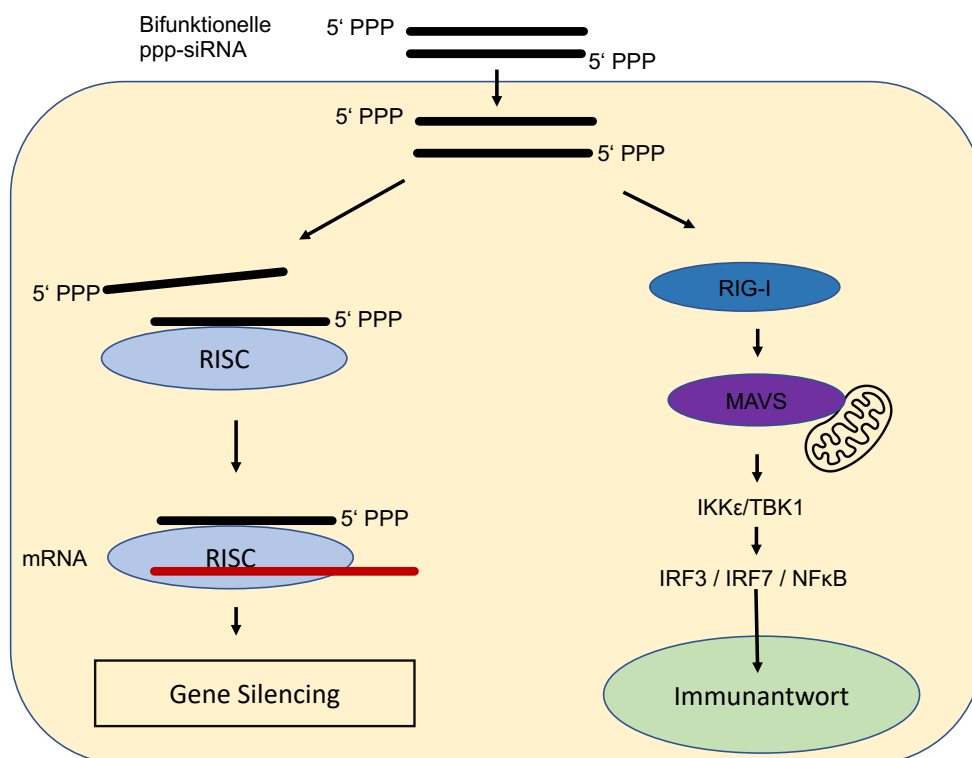


Abbildung 2. Funktionsweise der bifunktionellen ppp-siRNA
Adaptiert nach (39)

1.5. Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems. Auf Grund von Mutationen erlangt eine myeloische Vorläuferzelle die Fähigkeit zur unkontrollierten Vermehrung im Knochenmark. Andere Zellen des blutbildenden Systems werden durch diese sog. leukämischen Blasten verdrängt. Dadurch entstehen Krankheitssymptome wie Anämie, Thrombopenie und Infekthäufung.

Die genaue Krankheitsentstehung der AML ist bis heute nicht abschließend geklärt. Zwei Voraussetzungen müssen zur Entstehung einer AML gegeben sein:

1. Genetische Veränderungen einer hämatopoetischen Vorläuferzelle, welche die unkontrollierte Vermehrung ohne Ausreifung ermöglichen
2. Eine Situation, in der Tumorzellen nicht mehr durch das Immunsystem kontrolliert werden

Die Pathogenese der AML ist ein mehrstufiger Prozess. Ein stark vereinfachtes, jedoch weiterhin aktuelles Modell der AML-Entstehung stellt die *two-hit-Hypothese* dar. Diese wurde in den 90er Jahren entwickelt und besagt, dass zur Entstehung einer AML mindestens zwei Mutationen in einer Vorläuferzelle vorhanden sein müssen. Eine Mutation, welche zu einem Wachstumsvorteil führt, sowie eine Mutation, welche die Differenzierung der Vorläuferzelle aufhebt (40, 41). Diese genetischen Veränderungen werden auch als *driver*-Mutationen bezeichnet. Sie können in neun Klassen eingeteilt werden (42):

1. aktivierende Mutationen der Signaltransduktion (FLT3, KIT, KRAS, NRAS u.a.)
2. Mutationen von myeloischen Transkriptionsfaktoren (RUNX1, CEBPA u.a.)
3. Fusionen von Transkriptionsfaktor-Genen (PML-RARA, MYH11-CBFB u.a.)
4. Mutationen von Chromatin-Modifikatoren (MLL-PTD, ASXL1 u.a.)
5. Mutationen im Kohesin-Komplex (SMC1S u.a.)
6. Spliceosomen-Mutationen
7. Mutationen in Tumorsuppressorgenen (TP53, WT1 u.a.)
8. NPM1-Mutationen
9. Mutationen in Genen der DNA-Methylierung (TET1, TET2, IDH1, IDH2, DNMT3B, DNMT1, DNMT3A)

Martignoles et al. (43) zeigt, dass die Entstehung einer AML ein genetisch hochkomplexer Vorgang ist, er spricht von einer „genetischen Hierarchie“. In der Veröffentlichung wird gezeigt, dass Subtypen der AML die Mutationen in einer für den Subtypen spezifischen Reihenfolge erwerben. Aktuelle Recherchen zeigen, dass bei ca. 10% der formell gesunden Menschen älter als 65 Jahre Mutationen nachweisbar

sind, welche auch in akuten Leukämien zu finden sind. Man spricht von einer sogenannten klonalen Hämatopoese von unbestimmtem Potenzial (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) (44). Das Risiko bei bestehenden Mutationen im Verlauf eine Leukämie zu entwickeln war in dieser Patientengruppe signifikant erhöht (45). Uckelmann et al. (46) zeigten im Mausmodell, dass die Entstehung einer Leukämie durch ein sog. *small molecule* gegen eine entsprechende *driver*-Mutation verhindert werden konnte. Vor diesem Hintergrund sind Therapien auf genetischer Ebene sehr vielversprechend.

Die Rolle des Immunsystems in der Entstehung von Tumorerkrankungen wurde in Abschnitt 1.3 geschildert. Spezifika der Interaktion zwischen AML-Zellen und dem Immunsystem diskutieren Barrett et al. und Andersen et al. (47, 48) .

1.6. Klinischer Verlauf und Therapieoptionen der AML

Die Prognose der Erkrankung ist abhängig vom Subtyp der AML, Vorerkrankungen, Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Eine Heilung ist möglich, wenn sich der Patient für die Durchführung einer Knochenmarkstransplantation oder intensive Chemotherapie eignet. Bei palliativer Chemotherapie ist, auch unter Therapie, von einer insgesamt schlechten Prognose auszugehen.

Die AML ist eine seltene Erkrankung mit einer altersabhängigen Inzidenz. In den USA betrug die Inzidenz in den Jahren 2013-2017 4,3 Fälle pro 100 000 Einwohner, das Lebenszeitrisiko für eine AML betrug 0,5%. Die Überlebensdauer korreliert mit dem Alter. In der Altersgruppe der 50-64-jährigen betrug die 1-Jahres-Überlebensrate 53,2%, die 3-Jahres-Überlebensrate 34,1%. Bei Patienten älter als 65 Jahre betrug die 1-Jahres-Überlebensrate 22,8%, die 3-Jahres-Überlebensrate 9,0%. Bei den Patienten über 75 Jahren betrug die 1-Jahres-Überlebensrate 14%, die 3-Jahres-Überlebensrate nur 4%. Fast 60% der AML-Fälle traten in der Altersgruppe über 65-Jahren auf, das mediane Erkrankungsalter betrug 68 Jahre (49).

Diese Zahlen zeigen, dass insbesondere in der Altersgruppe >65 Jahre ein hoher Bedarf nach verbesserten Therapieoptionen besteht.

Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer AML haben alle Patienten, welche Kontakt mit mutagenen Substanzen haben. Erhöhtes Auftreten von AML wurde nach Kontakt mit radioaktiver Strahlung, Benzolen, Tabak, Mineralölproduktion, Farben, Äthylenoxyden, Herbiziden und Pestiziden beobachtet. Entwickelt ein Patient nach chemotherapeutischer Behandlung einer anderen Tumorentität eine AML, spricht man

von einer sekundären AML. Es wird davon ausgegangen, dass die AML als Folge der Chemotherapie entstanden ist.

AML ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung. Deshalb unterscheidet sich die Therapie je nach genetischem Risikoprofil sowie Allgemeinzustand des Patienten. Eine Sonderrolle spielt die akute Promyelozytäre Leukämie, hier gelten eigene Therapieempfehlungen.

Allgemein gliedert sich die Therapie der AML beim sog. „fitten“ Patienten in zwei Phasen, die Induktionstherapie und die Postremissionstherapie. Das Therapieziel ist kurativ. Durch die Induktionstherapie soll eine komplette Remission (CR) (<5% Blasten im Knochenmark, Abwesenheit von Auerstäbchen, Neutrophilenzahl > $1 \times 10^9/L$, Thrombozytenzahl > $100 \times 10^9/L$) erreicht werden. Durch die Postremissionstherapie soll der Zustand der CR langfristig erhalten werden. Bei Niedrigrisikokonstellationen kann dies allein durch Chemotherapie ggf. in Kombination mit Antikörperkonjugaten gegen CD33 (Gemtuzumab-Ozogamicin) erreicht werden, bei Hochrisikokonstellationen ist eine Stammzelltransplantation notwendig. Den sog. „unfiten“ Patienten wird eine palliative Therapie angeboten. Die genaue Therapiestruktur kann u.a. den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) entnommen werden (42).

Die Relevanz von Immuntherapien bei AML zeigt sich in den aktuellen Therapieschemata. Die allogene Stammzelltransplantation stellt die älteste und wirksamste Immuntherapie der AML dar. Man geht davon aus, dass das transplantierte Immunsystem des Spenders durch den *graft-versus-leukemia* Effekt verbleibende AML-Zellen bekämpft (50). Hypomethylierende Therapien (z.B. mit Azacitidin oder Decitabin) haben neben der zytotoxischen Wirkung auch einen aktivierenden Effekt auf das Immunsystem. Sie führen zur verstärkten Expression von Tumorantigenen und zur Aktivierung von antiviralen Immunantworten (51, 52). Inwiefern dieser Aspekt bei AML eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht abschließend erforscht (53). Der monoklonale Antikörper Gemtuzumab-Ozogamicin, ein Konjugat aus einem CD33-Antikörper und einem Toxin, wurde 2018 in der Kombination mit Standard-Chemotherapie zugelassen (42). Lichtenegger et al. beschreibt in einem Review über Immuntherapie bei AML vielversprechende Ansätze, jedoch insgesamt deutliche Defizite in der klinischen Entwicklung im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen. Ursache sei vor allem die komplizierte Therapieentwicklung, da im Vergleich zu anderen Tumorarten u.a. tumorspezifische Zielstrukturen fehlen und die Mutationslast geringer ist (54).

1.7. Bifunktionelle ppp-siRNAs bei AML – aktueller Forschungsstand, relevante Problemstellungen und Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Bifunktionelle ppp-siRNAs sind ein neuartiger Ansatz in der Immuntherapie der AML. Das bifunktionelle Molekül besitzt zwei funktionelle Komponenten, die siRNA und die Triphosphatmodifikation. Durch den siRNA-Bestandteil können gezielt zentrale Mutationen der AML stillgelegt werden. Dadurch kann beispielsweise das Zellwachstum stark gehemmt werden. Die Triphosphatmodifikation kommt auch in RNA-Viren vor und wird durch den Rezeptor RIG-I erkannt (4). Durch die Aktivierung von RIG-I werden eine antivirale Immunreaktion sowie proapoptotische Signalwege ausgelöst. Bifunktionelle ppp-siRNAs haben somit die Kapazität, in die oben beschriebenen Pathomechanismen der AML – genetische Mutation und fehlende Kontrolle durch das Immunsystem – einzugreifen.

Bifunktionelle ppp-siRNAs können nur wirken, wenn sie in ausreichender Menge in das Zytosol der Zelle eingebracht werden. Dieser Vorgang wird als Transfektion bezeichnet. Es gibt zahlreiche Methoden, siRNA in Zellen zu transfizieren, diese sind jedoch in der Regel für adhärenente Zellen optimiert. Nicht adhärenente Zellen gelten als schlecht zu transfizieren, trotzdem gibt es keine systematischen Untersuchungen zu den biochemischen Voraussetzungen zur Transfektion von DNA und RNA in Leukämiezellen (55-57). Uludag et al. (58) sehen das Haupthindernis für die Einführung von siRNA-basierten Leukämietherapien in der fehlenden Verfügbarkeit von funktionierenden Transportsystemen ins Zytosol. Bourquin et al. stellt den generellen Bedarf nach geeigneten Transportsystemen für RLR-Agonisten dar (59).

In AML-Zellen wurden bifunktionelle ppp-siRNA bisher kaum untersucht. Dengzhe et al. beobachteten eine Zunahme der Apoptose in AML-Zelllinien, insbesondere in Kombination mit Chemotherapie (23). Hanna Lausmann beschreibt in ihrer Promotion eine effiziente Wirkung von bifunktionellen ppp-siRNA bei AML *in vitro*. In fünf Zelllinien zeigte sie, dass die Expression von RLRs durch die Therapie gesteigert wird. Eine antivirale Immunantwort mit folgender Apoptoseinduktion und Reduktion der Zellviabilität konnte nachgewiesen werden. Sie testete zudem den Transport von bifunktionellen siRNA durch Nanopartikel, diese zeigten in der verfügbaren Struktur keine geeigneten Transporteigenschaften (60). Hanna Lausmann führte ihre Promotion in der gleichen Arbeitsgruppe wie die Autorin durch. Sie legte die Grundlagen für die vorliegende Arbeit.

1.8. Für die Untersuchung von bifunktioneller siRNA werden spezielle Modelle benötigt

Therapieversuche von AML mit bifunktioneller ppp-siRNA wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit ausschließlich *in vitro* in AML-Zelllinien durchgeführt. Um das Konzept der bifunktionellen ppp-siRNA weiter zu entwickeln, werden Studien in höherwertigen, translationalen Modellen benötigt. Hier sind, trotz zahlreicher Weiterentwicklungen, weiterhin Tierexperimente ein Standard in der Therapieforschung.

Kohnken et al. (61) stellt, in einer Übersichtsarbeit zu Mausmodellen in Leukämie- und Lymphomforschung, die Problematik der Wahl eines hochwertigen Mausmodells abhängig von der Fragestellung dar. Es wird insbesondere die Komplexität im Design von Leukämie-Modellen aufgezeigt. Auf Grund ihrer liquiden Natur, der genetischen Heterogenität und dem komplexen *microenvironment* ist es schwierig, Leukämien adäquat in einem Modell abzubilden. Es werden Mausmodelle mit spontaner Krankheitsentstehung, Xenograftmodelle und genetisch veränderte Modelle unterschieden. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit gab es keine Vorarbeiten in Hinblick auf geeignete Mausmodelle zur Untersuchung von bifunktioneller ppp-siRNA bei AML.

Kohnken et al. hebt auch hervor, dass die Maus nicht in jedem Falle das aussagekräftigste Modell ist. Neben relevanten Aspekten des Tierschutzes, stellt die schlechte Übertragbarkeit präklinischer Forschungsergebnisse in die klinische Arbeit einen sehr häufigen Kritikpunkt an Tierexperimenten dar. Die Übertragung von präklinischen Ansätzen in die tägliche Arbeit ist nur bei einem Bruchteil der untersuchten Modelle möglich (62, 63). Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Modelle sind in erster Linie dazu geeignet nachzuweisen, ob ein spezifischer Therapieansatz in einem klar definierten, artifizialen Modell funktioniert.

Zunehmend werden Modelle entwickelt, welche eine verbesserte Aussagekraft über die Wirksamkeit im menschlichen Organismus haben. Ein Schritt in diese Richtung ist die Arbeit mit primären Tumorzellen, z.B. aus Biopsien. Man spricht in diesem Fall auch von sog. „primären“ Zellen. Primäre Leukämiezellen sind ein sehr hochwertiges Testmodell. Sie werden kurz nach der Isolation aus dem Patienten verwendet und haben somit noch keine zusätzlichen Mutationen akquirieren können, die z.B. zu besserem Wachstum unter Zellkulturbedingungen führen. Durch die Arbeit mit Proben mehrerer Patienten kann auch die genetische Heterogenität einer Tumorerkrankung besser abgedeckt werden.

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Modelle ist, dass die Tumorumgebung, das sog. *tumor-microenvironment*, imitiert wird. Im Falle der AML handelt es sich um das Knochenmark, welchem eine hohe Relevanz für Krankheitsentstehung und Therapieresistenz beigemessen wird (64).

1.9. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, bifunktionelle ppp-siRNA als Therapieoption der AML in höherwertigen Modellen, verglichen zu Zellkulturmodellen mit etablierten AML-Zelllinien, zu untersuchen. Entsprechende Modelle waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend verfügbar bzw. nicht ausreichend evaluiert. Deshalb sollten zunächst grundlegende Vorarbeiten zur Etablierung und Evaluierung unterschiedlicher Mausmodelle durchgeführt werden. Um das *Tumor-Microenvironment* Knochenmark abzubilden, sollte die Anwendung von bifunktionaler siRNA an *ex vivo* kultivierten primären AML-Zellen mit *Feeder*-Zellen etabliert und evaluiert werden. Die genannten Modelle wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet und hinsichtlich ihrer Aussagekraft bewertet.

Folgende spezifische Fragestellungen wurden dafür bearbeitet:

- Erfüllt die murine Zelllinie C1498 die Voraussetzungen zur Durchführung von Untersuchungen mit bifunktionaler siRNA *in vitro*?
- Ist die Zelllinie C1498 transplantiert in C57BL/6 Mäuse ein geeignetes Modell der AML?
- Inwiefern bilden die Xenograftmodelle Molm 13 und MV4-11 in Nod-Scid-Mäusen den klinischen Verlauf einer AML ab?
- Sind *ex vivo* kultivierte primäre AML-Zellen auf murinen Feeder-Zellen ein aussagekräftiges Modell zur Untersuchung von bifunktionaler siRNA?
- Welchen Effekt haben bifunktionelle ppp-siRNA auf *ex vivo* kultivierte primäre AML-Blasten?

Inhaltlich baut diese Arbeit auf der Promotion von Hanna Lausmann auf (60). Die Veröffentlichung von Ruzicka et al. (65) fußt auf den vorliegenden Ergebnissen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und allgemeine Verbrauchsmittel

2.1.1. Technisches Equipment.

Brutschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
FACSCalibur	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
FACSCanto	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
FACSAria III (Cell-Sort)	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Fluoreszenzmikroskop ZEISS Axio Vert.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Germany)
<i>LAS4000 mini luminescent image analyzer</i>	Fujifilm (Tokyo, Japan)
<i>LightCycler 480 II</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>Mini Trans-Blot cell</i> (Wanne für Blotting)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser	Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
NanoDrop 2000 C	Thermo Fisher Scientific (Wilmington, USA)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht (Balgach, Deutschland)
<i>Nucleofector 96-well shuttle system</i>	Lonza, (Basel, Schweiz)
PowerPac 200 (Stromversorgungseinheit für Elektrophorese)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
<i>Thermocycler T3</i>	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.1.2. Verbrauchsmittel

<i>Falcons</i>	Corning Incorporated Life Sciences (Tewksbury, USA)
<i>Feather disposable scapel</i>	Andwin Scientific (Woodland Hills, USA)
Kanülen	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Spritzen	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Stripetten	Corning Incorporated Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)

Material und Methoden

Zellkulturflaschen

Corning Incorporated Life Sciences
(Amsterdam, Niederlande)

Zellsiebe 100, 70, 40µm

Corning Incorporated Life Sciences
(Amsterdam, Niederlande)

2.1.3. Chemikalien

Elisa

Natriumcarbonat (Na₂CO₃)

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt,
Deutschland)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt,
Deutschland)

Natriumhydroxid (NaOH)

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Phosphorsäure (H₃PO₄)

Apotheke Innenstadt Uni München
(Deutschland)

Tween 20

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Proteinextraktion

EDTA

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Natrium-Deoxycholat

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl)

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Protease und Phosphatase Inhibitor
Cocktail

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Natrium orthovanadate (Na₃VO₄)

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

TRIS Hydrochlorid

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Triton X-100

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

SDS-Page

2-Mercaptoethanol

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Acrylamidlösung 30%

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Ammonium persulfat (APS)

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Bromphenol Blau

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Glycerol

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland)

Material und Methoden

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<i>PageRuler prestained protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<u>Western Blot</u>	
Membranen 0,45 µm	Schleicher & Schuell (Dassel, DE)
Methanol	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
<u>In vitro-Transkription</u>	
5x siRNA Buffer	Eurofins Scientific (Dublin, Irland)
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ethanol 100%	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Exo-Minus Klenow DNA Polymerase (20 U/µl)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>Klenow fill-in Puffer</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>Mini Quick Spin Oligo Columns</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
Phenol-Chloroform-Alkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
T7-Promotor-Primer	Metabion (Planegg, Deutschland)
<u>Reverse Transkription</u>	
<i>5x Reverse Transcriptase Reaction Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
dNTP	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Oligo(dT)18 Primer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>RevertAid H Minus reverse Transkriptase</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

q-PCR

<i>KAPA PROBE FAST qPCR mastermix (2X)</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>LightCycler 480 Multiwell Platte 96, weiß</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
<i>Universal Probe Library Sonden</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Tiermodell

BD Pharm Lyse	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Collagenase D	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Heparin	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)

Transfektion

DreamFect Gold	OZ Biosciences SAS (Marseille, Frankreich)
HiPerFect	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
Interferin	Polyplus-transfection SA (Illkirch, Frankreich)
Lipofectamin 2000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lullaby	OZ Biosciences SAS (Marseille, Frankreich)
Oligofectamine	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNAiMax	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TransIT	Mirus Bio LLC (Madison, USA)
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics Deutschland GmbH R (Mannheim, Deutschland)

2.1.4. Reagenziensätze

DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Human IP-10 Elisa	BD Biosciences (San Diego, USA)
MEGashortscript™ T7 <i>transcription kit</i>	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 Duo Set</i>	R&D System, Inc. (Minneapolis, USA)

Elisa

peqGOLD <i>total RNA kit</i>	Peqlab, VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemolumineszenz-Substrat	Thermo Scientific by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TMB(3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin)- Substrat-Reagentien-Set	BD Biosciences (San Diego, USA)

2.1.5. Zellkultur

2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Alpha MEM (minimal essential medium)</i> <i>Eagle</i>	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DEMEM)	Lonza (Basel, Schweiz)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Fetal calf serum (FCS)</i>	Gibco Life Technologies by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
L-Glutamin	Lonza, Basel, Switzerland
<i>Opti-MEM (minimal essential medium)</i> <i>reduced-serum medium</i>	Life technologies (Carlsbad, CA, USA)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Lonza (Basel, Schweiz)
Penicillin/Streptomycin	Lonza (Basel, Schweiz)
Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
<i>RPMI (Roswell Park Memorial Institute)</i> <i>Medium</i>	Lonza (Basel, Schweiz)
Trypan blau 0,4%	Lonza (Basel, Schweiz)
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)

2.2. Projektspezifische Materialien

2.2.1. Stimuli

Interferon- α murin	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Interferon- β murin	Biologend (London, UK)
Poly I:C, <i>high molecular weight</i>	Invivogen (San Diego, USA)
Poly(dA:dT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
Staurosporin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)

2.2.2. Viren

<i>Vesicular Stomatitis Virus Indiana Strain</i> (VSV Wildtyp)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Anne Krug (LMU München)
VSV-M51R	Zur Verfügung gestellt von Dr. Wehlan (Harvard Medical School, Cambridge, USA)
Sendai Virus (Cantell Strain)	Charles River Laboratories (Wilmington, USA)

2.2.3. Zelllinien

1205LU	Zur Verfügung gestellt von R. Besch, LMU München, Deutschland
C1498	ATCC (Manassas, USA)
Hek 293 T	Zur Verfügung gestellt von AG Endres, LMU München, Deutschland
HeLa	ATCC (Manassas, Virginia, USA)
Hela GFP	Hergestellt von Hanna Meinl durch retrovirale Transduktion eines GFP-Plasmides
Molm 13	Zur Verfügung gestellt von M. Subklewe, LMU München, Deutschland
Molm 13 GFP	Hergestellt durch retrovirale Transduktion eines GFP-Plasmides
MS-5	Zur Verfügung gestellt von M. Subklewe,
MV411	Zur Verfügung gestellt von M. Subklewe
MV411 GFP	Hergestellt von Hanna Meinl durch retrovirale Transduktion eines GFP-Plasmides

Plat E
Primäre AML Blasten

Zur Verfügung gestellt von AG Endres
AML Zellen gewonnen bei Leukapharese,
Zur Verfügung gestellt von M. Subklewe

2.2.4. Antikörper für Western Blot

Anti-β-Aktin (murin)	Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, USA)
Anti-RIG-I (human, murin)	Adipogen AG (Liestal, Schweiz)
Anti-MDA5 (murin, human)	Enzo Life Sciences Inc. (New York, USA)

2.2.5. FACS-Färbungen

Annexin V FITC	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-CD33 PE (human)	Ebioscience, Thermo Fisher Scientific (San Diego, USA)
anti-human CD4 PerCP	BioLegend (San Diego, USA)
APC anti-mouse/rat CD29 Antikörper	BioLegend (San Diego, USA)
Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Propidiumiodid (PI)	Bender Med Systems (Wien, Österreich)
TO-PRO®-3 stain	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.2.6. q-PCR-Primer

Hersteller: Metabion (Planegg, Deutschland)

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')
RIG-I	<i>forward</i>	tggaccctacctacatcctga
	<i>reverse</i>	ggcccttggtgttttctca
MDA5	<i>forward</i>	aggcaccatgggaagtgat
	<i>reverse</i>	ggtaaggcctgagctggag
Interferon β	<i>forward</i>	cgacactgttcgtgtgtca
	<i>reverse</i>	gaggcacaacaggagagcaa
ISG 15	<i>forward</i>	gcgaactcatcttgccagt
	<i>reverse</i>	ttcagctctgacaccgacat

2.2.7. siRNAs

Ziel-mRNA	Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller
-	siCO4	GCGCUAUCCAGCUUACGUA*	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
GFP	siGFP_443	GCCACAACGUCUAUAUCAU	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
GFP	siGFP_698	GCAUGGACGAGCUGUACAA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
BRD4	siBRD4_2442	CCAGCAAGCUAUAGCUUAA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
BRD4	siBRD4 <i>antisense</i>	UUAAGCUAUAGCUUGCUGG	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FLT3	siFLT3_1313	CCAGCCAGGAGAAUAUAUA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
FLT3	siFLT3 <i>antisense</i>	UAUAUAUUCUCCUGGCUGG	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
PLK1	siPLK1_1424	AGAUCACCCUCCUAAAUA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
-	Alexa-488-RNA	UCAAACAGAGGUCGCAUGC ** Einzelstrang, 5' Alexa488- Modifikation	Kaneka Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien)

* Sequenz entspricht der Kontroll-siRNA aus Besch et al. (22)

** Sequenz entspricht der 2.2as-RNA aus Schmidt et al. (66)

2.2.8. DNA-*Templates* zur IVT und IVT Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller
T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATA	Metabion (Planegg, Deutschland)
<i>Template</i> 3pCO4 (<i>hairpin</i>)	GCG CTA TCC AGC TTA CGT A GAGCTC T ACG TAA GCT GGA TAG CGC TATAGT GAGTCGTATTA	Metabion (Planegg, Deutschland)
<i>Template</i> ppp-siFLT3 <i>sense</i>	TAT ATA TTC TCC TGG CTG GTA TAG TGA GTC G	Eurofins Genomics (Ebersberg,

<i>Template 3p-siFLT3 antisense</i>	CCA GCC AGG AGA ATA TAT ATA TAG TGA GTC G	Deutschland) Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<i>Template 3p-siBRD4 sense</i>	TTA AGC TAT AGC TTG CTG GTA TAG TGA GTC G	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<i>Template 3p-siBRD4 antisense</i>	CCA GCA AGC TAT AGC TTA ATA TAG TGA GTC G	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
<i>Template 3p-PLK 1424 (hairpin)</i>	AGA TCA CCC TCC TTA AAT A CTC GAG T ATT TAA GGA GGG TGA TCT TAT AGT GAG TCG TA	Metabion (Planegg, Deutschland)

2.3. Zelluläre-immunologische Methoden

2.3.1. Zellkultur

2.3.1.1. Allgemeines

Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer *Laminar-Air-Flow* durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ gelagert. Humane Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium kultiviert, zugesetzt war 10% FCS, 1,5 mM L-Glutamine, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100µg/ml). C1498, Hela und 1205lu wurden in DMEM kultiviert, die Zusätze waren identisch. MS5 Zellen wurden in Alpha MEM Eagle kultiviert, zugesetzt war 10% FCS, 10% Pferdeserum, 1,5 mM L-Glutamine, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100µg/ml).

Alle Zellreihen wurden monatlich auf Mycoplasmenbefall getestet.

2.3.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und Vitalität der Kulturen wurde mikroskopisch bestimmt. Ein Aliquot der Kultur wurde mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Trypanblau wird von abgestorbenen Zellen aufgenommen, die stark blau gefärbten Zellen können so von der Zählung ausgeschlossen werden.

2.3.1.3. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in vorgewärmtem Medium resuspendiert, gewaschen, zur gewünschten Konzentration verdünnt und kultiviert.

Zum Einfrieren wurde darauf geachtet, eine möglichst kurze Passagezeit der Zellen zu erreichen. Sobald die Kultur ein exponentielles Wachstum und einen minimalen Anteil nekrotischer Zellen zeigte wurden Aliquots eingefroren. Für jedes Kryoröhrchen wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert, das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 1,5 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend 24h in einer Einfrierbox bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff umgelagert.

2.3.1.4. Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Adhärenz Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei ausreichender Zelldichte wurde die Kultur geteilt. Zunächst wurde das Medium abgenommen, die Kultur mit *Phosphat Buffered Saline* PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen und anschließend mit Trypsinlösung aus der Flasche gelöst. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und in entsprechender Konzentration in Medium resuspendiert.

2.3.1.5. Kultivierung von Zelllinien in Suspension

Die Dichte der Suspensionszellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch und mittels Zählkammer bestimmt. Je nach Geschwindigkeit des Zellwachstums wurden die Zellen alle 1-3 Tage passagiert.

2.3.1.6. Blastenkultur

Die Langzeitkultur primärer AML-Zellen wurde durchgeführt wie bei Krupka et. al für *ex vivo cytotoxicity assays* beschrieben. (67). Es wurden Blasten von zwei Patienten eingesetzt, welche mittels Leukapharese nach schriftlicher Einwilligung durch die Patienten durch die AG Subklewe gewonnen wurden (Genehmigung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Nummern 068-08 und 222-10).

Die Probe von Patient 1 enthielt >95% Blasten und hatte folgende molekulargenetische Veränderungen: AML1/Eto: negativ; NPM1-Mutation: negativ; FLT3-ITD: positiv; FLT3-

TKD: negativ; MLL- PTD: negativ; CEBPA: negativ. Die Probe von Patient 2 enthielt ca. 91% Blasten und war NPM1-mutiert.

2.3.2. Transfektion mit synthetischen Stimuli

2.3.2.1. Lipofektion

Bei der Lipofektion werden die zu transportierenden siRNAs in Liposomen eingeschlossen und so in die Zelle transferiert. Je nach Transfektionsreagenz wurden unterschiedliche Protokolle genutzt. Für alle Transfektionsexperimente im 96-Well Format wurde zunächst eine Zellsuspension der Dichte 1×10^5 /ml für adhärenente Zellen und 2×10^5 /ml für Suspensionszellen hergestellt, davon wurden je 100 μ l/Well in einer 96-well Platte ausplattiert. Suspensionszellen wurden in einer Platte mit U-förmigen Boden ausplattiert.

- Lipofectamin2000 / RNAiMax: Pro Transfektionsbedingung wurde zunächst je 200 ng siRNA und 0,4-0,6 μ l von Lipofectamin2000 / RNAiMax in je 10 μ l Optimem verdünnt, diese wurden gemischt und dann 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lipofektionsmischung mit der Zellsuspension gemischt. Nach 4h Inkubationszeit wurde je 80 μ l Medium zugegeben, für ein Gesamtvolumen von 200 μ l.

Zur Transfektion von primären AML-Blasten wurden am Vortag eine 96-Wellplatte mit Feeder-Zellen vorbereitet (67). Am Folgetag wurden 50.000 Zellen/100 μ l ausplattiert und nach kurzer Inkubationszeit, wie oben beschrieben, transfiziert. Es wurde kein zusätzliches Medium hinzugegeben.

- Xtreme-GENE siRNA Transfection Reagent: Für jedes Well wurden 200 ng siRNA und 2 μ l X-tremeGENE in je 10 μ l DEMEM (ohne Zusätze) verdünnt. Nach Vermischen beider Lösungen wurde für 20 min inkubiert und das Reagenz anschließend zu den Zellen gegeben.
- DreamFect: 200 ng siRNA und 0,4 μ l Dreamfect wurden je in 10 μ l DEMEM (ohne Zusätze) verdünnt. Beide Ansätze wurden gemischt und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben.

Während der Optimierung der Lipofektion wurden folgende Reagenzien verwendet: HiPerFect, Interferin, Oligofectamin, Lullaby, TransIT. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.3.3. Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Transfektionsmethode, bei welcher die Zellmembran durch einen kurzen Stromstoß permeabel gemacht wird. So können beispielsweise siRNA-Moleküle ins Zytoplasma gelangen. In dieser Arbeit wurde die *Nucleofector*-Technologie des Herstellers Lonza genutzt. Sie zeichnet sich durch zelltypspezifische Transfektionsprogramme bestehend aus einem Transfektionspuffer kombiniert mit einer optimierten Elektroporation aus. Im Folgenden wird die Elektroporation mittels *Nucleofector*-Technologie als Nukleofektion bezeichnet.

Für die Transfektion wurde uns ein sog. „Amaya-Puffer“ von Philipp Guder (AG Molekulare Pädiatrie, LMU München) zur Verfügung gestellt. Es waren die folgenden Inhaltsstoffe enthalten:

Aqua		1000ml
Calciumnitrat	Ca(NO ₃) ₂	99,2 mg
Kaliumchlorid	KCL	399,6 mg
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	101,1 mg
Natriumchlorid	NaCl	6,02 g
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	2,0 g
Natriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	1,0 g
Glucose		2,0 g
HEPES		5,2 g
Glutathion		1 mg

Der pH war auf 7,3 eingestellt, es wurde eine N₂-Begasung sowie eine sterile Filtration durchgeführt. Der Puffer konnte bei 4°C gelagert werden. Die Zusammensetzung des Puffers wurde von Suttner, Kathrin (68) beschrieben.

Für die Nukleofektion wurde zunächst die siRNA in Amaya-Puffer verdünnt und in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Pro Bedingung wurden 200ng siRNA in 10µl eingesetzt. Zur Vorbereitung der Zellen wurden diese zunächst bei 100g zentrifugiert und in vorgewärmten Amaya-Puffer verdünnt. Pro Bedingung wurden 2x10⁵ Zellen in je 20 µl Puffer eingesetzt. Nach dem Vermischen der vorbereiteten siRNA mit der Zellsuspension, wurde die Mischung in eine Elektroporationsplatte übertragen und die Elektroporation durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl vorgewärmten RPMI mit Zusätzen resuspendiert und im Brutschrank für 10 min inkubiert. Zuletzt wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

Für primäre AML-Zellen wurde vom Hersteller kein optimiertes Transfektionsprogramm zur Verfügung gestellt. Um die geeigneten Elektroporationseinstellungen zu finden, wurden zunächst zahlreiche Elektroporationsprogramme getestet. Diese werden vom Hersteller programmiert und benannt. Wie sich die einzelnen Einstellungen, welche lediglich mit einer Kombination aus Buchstaben und Zahlen benannt sind, unterscheiden ist für den Nutzer nicht einsehbar. Für die Wahl des geeigneten Programmes war das Verhältnis zwischen Transfektionseffizienz und Viabilität nach Transfektion entscheidend. Für C1498 wurde in den gezeigten Experimenten in einem Nucleofector™ II Gerät die Programmeinstellung DG 137 verwendet, für primäre Blasten die Programmeinstellung DS 138.

2.3.4. Virusinfektion

Virusinfektionen wurden in Zellmedium ohne FCS durchgeführt. Für Western Blot wurden 4×10^5 Zellen in 1ml Medium in 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit Viren infiziert. Für Elisa wurden 50 000 Zellen in 100 µl Medium in 96-Well Platten ausplattiert. Je nach Virus wurde die geeignete *multiplicity of infection* (MOI) gewählt, diese beschreibt das Verhältnis infektiöser Partikel zu Zielzellen. VSV und VSV-M51R wurden mit einer MOI = 1 genutzt, Sendai Virus wurde mit 40 U/ml eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Zellen mit FCS-haltigem Medium aufgefüllt und weitere 23 h inkubiert.

2.3.5. Herstellung GFP-exprimierender Zelllinien

Die murinen AML-Zelllinien besitzen, wie auch die humanen AML-Formen, keinen eindeutigen Oberflächenmarker. Um die Leukämie im Mausmodell quantifizierbar zu machen, wurden GFP-exprimierende Zelllinien hergestellt. Zudem stellt das GFP einen potenziellen Modell-Kandidaten für den *knock-down* mit siRNA dar, dessen Expressionshemmung einfach mittels *Flowzytometrie* überprüft werden kann.

Für die Zelllinie Molm13 GFP wurde GFP-kodierender replikationsdefizienter Retrovirus von Fabian Kraus (Abteilung für klinische Pharmakologie, LMU München) mittels Transfektion von Hek293T-Zellen mit dem Vektor pmp71 mit der kodierenden Sequenz für GFP mit hergestellt (beschrieben in (69)). Für die Transduktion wurden zunächst 24-Well-Platten mit Retronectin (6,25 µg/ml) über Nacht beschichtet (4°C) und anschließend über 30 min mit 2% BSA geblockt. Dann wurde der virus-haltige Überstand in die Platte gegeben und bei 3000g, 36°C für 1,5h zentrifugiert. Molm 13 wurden in der virus-beschichteten Platte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transduzierten Zellen in eine weitere virus-beschichtete

Platte überführt und für weitere 11h inkubiert. Danach konnten die Zellen gesplittet werden. Nach 10 und 20 Tagen wurden GFP positive Zellen mittels FACS selektiert und abschließend eine Einzelzellklonierung durchgeführt.

Für die Zelllinie C1498-GFP 0614 wurde ein GFP Retrovirus in Plat E-Zellen hergestellt. Als Vektor wurde pmp71 mit der kodierenden Sequenz für GFP verwendet (beschrieben in (70)). Retronectin beschichtete 24-Well-Platten wurden hergestellt wie bereits für Molm GFP beschrieben. Der virushaltige Überstand wurde bei 3000g und 4°C für 2h abzentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension (3×10^5 C1498-Zellen/ml) in die virusbeschichtete Platte gegeben. Abschließend wurde eine erneute Zentrifugation bei 800g, 32°C für 30 min durchgeführt und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde erneut Virusüberstand zugegeben, 1ml pro Well im 24-Well-Format, bei 800g, 32°C für 90 min zentrifugiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden GFP positive Zellen mittels FACS isoliert und expandiert. 10 Tage nach dem FACS-Sort waren 99,9% der Zellen GFP positiv.

Die Zelllinie C1498-GFP 0614 zeigte eine sehr hohe Expression von GFP. Es wurde mittels klonaler Selektion der Zellklon c1 hergestellt, hier wurde gezielt mittels FACS ein Zellklon mit geringer GFP-Expression gewählt.

2.3.6. ELISA

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) beschreibt ein Verfahren, in dem Antigene durch die Reaktion mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden können. Je nach Menge des vorhandenen Antigens wird der enzymgekoppelte Antikörper gebunden, bei Zugabe des Enzymsubstrates kommt es zu einem Farbumschlag, welcher proportional zur Antigenmenge ist und photometrisch nachgewiesen werden kann.

Es wurden vorgefertigte Sets für Elisa mit der sogenannten „Sandwich-Technik“ eingesetzt. Dies beschreibt den Einsatz von zwei spezifischen Antikörpern gegen das Antigen, welche jedoch an unterschiedlichen Epitopen binden, um nicht zu konkurrieren. Der erste Antikörper (*capture*) wurde genutzt um die 96-well-Platte zu beschichten, zuvor wurde der Antikörper nach Herstellerangaben in Beschichtungspuffer oder PBS verdünnt. Nach Inkubation über Nacht wurden Rückstände abgewaschen und die Platte für 1h in ELISA-Verdünnungspuffer inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift konnten die Proben sowie eine Standardreihe bekannter Konzentration aufgetragen werden. Standard und Proben wurden in Elisa-

Verdünnungspuffer verdünnt. Nach 2h Inkubationszeit folgte ein erneuter Waschschrift, anschließend die Zugabe des zweiten, biotinylierten Antiköpers (*detection*), je nach Assay gemeinsam mit dem Streptavidin-Enzymkomplex oder nach einem weiteren Waschschrift. Vor Zugabe des Substrates wurde erneut gewaschen. Bei deutlicher Sichtbarkeit eines Farbumschlages der Standardreihe wurde der Vorgang abgestoppt und bei 450 nm im Mithras Platten-Leser ausgewertet. Die exakten Konzentrationen wurden anhand der Standardreihe berechnet.

Puffer	Zusammensetzung
Beschichtungspuffer	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5
Verdünnungspuffer	PBS mit 10% FCS
Waschpuffer	PBS mit 0,05% Tween
Lösung zum Abstoppen	1 M Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)

2.3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, Einzelzellen anhand ihres Lichtstreuungs- und Fluoreszenzverhaltens zu analysieren. Die Zellen werden als Einzelzellsuspension einzeln an einem oder mehreren Laserstrahlen vorbeigeführt. Dadurch entsteht Streulicht sowie ggf. ein Fluoreszenzsignal. Beim Streulicht wird das Vorwärtsstreulicht, sowie das Seitwärtsstreulicht, senkrecht zum Laserstrahl, detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (auch *forward scattered light*, FSC) wird maßgeblich durch die Zellgröße beeinflusst, das Seitwärtsstreulicht (auch *sideward scattered light*, SSC) durch die Granularität. Fluoreszierende Zellmarkierungen können je nach Wellenlänge des Lasers zum Leuchten angeregt und detektiert werden. Diese Methodik ermöglicht eine sehr schnelle und umfassende Charakterisierung der Zellprobe.

Durchflusszytometrie wird häufig, auch in dieser Arbeit, synonym zu FACS verwendet. FACS steht jedoch ursprünglich für *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Diese Methode ermöglicht zusätzlich zur Charakterisierung der Probe auch eine Trennung der Probe in unterschiedliche Bestandteile anhand der oben beschriebenen Kriterien.

In dieser Arbeit wurden die Flowzytometer FACSCalibur und FACSCanto II verwendet. FACSCalibur bietet einen blauen Laser (488 nm) und einen roten Laser (635 nm), es können vier Farben detektiert werden. FACSCanto II besitzt Laser in drei Wellenlängen – violett (405 nm), blau (488 nm) und rot (633 nm), bis zu acht Farben können erkannt werden. Zum Selektieren der GFP positiven Zellen wurde ein FACSAria III verwendet.

Die Expression von Oberflächenmolekülen wurde durch die Zugabe von Fluorochrom-markierten Antikörpern untersucht, apoptotische Zellen wurden durch Annexin-PI oder TO-PRO-3 ausgeschlossen. Zelltrümmer wurden anhand ihrer Größe und Granularität von der Auswertung ausgenommen. Bei den durchgeführten Tierexperimenten wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen als prozentualer Anteil aller lebenden Zellen angegeben.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden zunächst gewaschen und anschließend in Lysepuffer für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation bei 4°C, 2000g über 20 min entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Zusammensetzung Lysepuffer

50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.0)

150 mM NaCl

1% Triton X-100

0.05% Natrium deoxycholat

10 mM EDTA

2 mM Na₃VO₄

Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail (1:100)

2.4.2. Messung der Proteinkonzentration

Um die Konzentrationen der hergestellten Proteinlösungen zu messen, wurde ein zweischrittiges Verfahren verwendet. Dieses basiert auf dem Prinzip des Lowry-Assays und wird photometrisch ausgewertet. Im ersten Schritt wird durch Zugabe einer alkalischen Kupferratrat-Lösung zur Proteinlösung ein Farbstoff-Komplexes zwischen Kupfer und Proteinen gebildet. In einem zweiten Schritt wird das zugefügte Folinreagenz durch Kupfer reduziert und es kommt zu einem deutlichen Farbumschlag, dieser ist bei 750 nm messbar (71). Anhand eines Standards mit bovinem Serumalbumin verdünnt in Lysepuffer konnte die Proteinmenge bestimmt werden.

Für die Durchführung des Assays wurde das *DC Protein Assay* (BioRad) verwendet und nach Herstellerangaben für 96-Well Platten vorgegangen.

2.4.3. Gelelektrophorese

Um die isolierten Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt. Die Proteine werden zunächst denaturiert, dies erfolgt durch Erhitzen in Lämmli-Puffer. Dadurch werden Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat in Gel und Puffer wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, somit ist die Messung unabhängig von der Ladungsverteilung des Proteins. Nach dem Laden der Proben auf das Gel wird eine elektrische Spannung angelegt, die Proteine bewegen sich im elektrischen Feld in Richtung Anode. Das Tempo ist nun nur noch abhängig von der Proteingröße und Gelzusammensetzung, je kleiner das Protein, desto schneller die Migration.

Zunächst wurde der Proteingehalt aller Proben angeglichen. Die Proben wurden in Lämmli-Puffer verdünnt und auf 95°C über 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben in ein SDS Polyacrylamid-Gel, bestehend aus einem 5% Polyacrylamid Sammelgel und einem 10% Polyacrylamid Trenngel, eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 150V in Laufpuffer. Um die Proteingröße abzuschätzen wurde der Standard „PageRuler Prestained Protein Ladder“ aufgetragen.

Puffer	Zusammensetzung
1x Lämmli	0,1% 2-Mercaptoethanol, 0,0005% Bromphenol Blau, 10% Glycerol, 2% SDS, 63mM Tris-HCL (pH 6,8)
4x Trennpuffer	3 M Tris (pH 8.5), 0.4% SDS
4x Sammelpuffer	0.5 M Tris (pH 6.8), 0.4% SDS
10% Trenngel	2.5 ml H ₂ O, 2.5 ml Trennpuffer, 5 ml Acrylamid, 50 µl 10% APS, 5 µl TEMED
5% Sammelgel	2.5 ml H ₂ O, 1 ml Trennpuffer, 500 µl Acrylamid, 40 µl 10% APS, 4 µl TEMED
1x Laufpuffer	3.02 g Tris, 14.4 g Glycin, 1 g SDS in 1l ddH ₂ O

2.4.4. Western Blot

Western Blot bietet die Möglichkeit Proteine spezifisch nachzuweisen. Zunächst werden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (engl. *blot*), anschließend erfolgt dort der Nachweis mit Antikörpern. Zuerst wird der primäre Antikörper zugegeben, dieser bindet spezifisch an das Protein, dann wird der

sekundäre Antikörper hinzugefügt, dieser bindet an den Fc-Fragment des primären Antiköpers. Der sekundäre Antikörper trägt das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP), bei Zugabe eines Substrates katalysiert HRP eine Chemiluminiszenzreaktion, welche detektiert wird.

Die verwendeten Membranen wurden zunächst in Methanol aktiviert und dann auf das Gel geschichtet. Das Blotten erfolgte in Western Blot Transfer Puffer bei 300 mA für 1,5h, gekühlt wurde mit Eis. Anschließend wurde die Membran in TBST(*Tris-buffered saline with Tween20*) -Puffer gewaschen und über Nacht bei 4°C in Milchlösung geblockt, dieser Schritt verhindert eine unspezifische Bindung der Antikörper. Nach weiteren Waschsritten wurde der jeweilige Antikörper nach Herstellerprotokoll angewendet und die Chemiluminiszenzreaktion mit dem Kamerasystem LAS4000 mini detektiert.

Puffer	Zusammensetzung
Milchlösung	5g Milchpulver in 50 ml PBS
Western Blot Transfer Puffer (10x)	60,55g TRIS, 288g Glycin, Gesamtvolumen von 2l
Western Blot Transfer Puffer gebrauchsfertig (1x)	100ml Western Blot Transfer Puffer (10x), 200ml Methanol, Gesamtvolumen 1L
TBST Puffer	100 ml Western Blot Transfer Puffer (10x) 1ml Tween-20, Gesamtvolumen 1L

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. *In vitro*-Transkription

Die *In vitro*-Transkription (IVT) beschreibt ein molekularbiologisches Verfahren, um RNA enzymatisch auf der Basis eines DNA-*Templates* herzustellen. Durch Einsatz einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase kann ein RNA-Strang hergestellt werden, welcher komplementär zum DNA-*Template* ist. Eine Besonderheit der *in vitro* hergestellten RNA ist, dass am 5'-Ende ein Triphosphatgruppe verbleibt. Nach Abschluss der Transkription wird das DNA-*Template* verdaut und die RNA isoliert und aufgereinigt.

Um das *Template* herzustellen, wurde zunächst der Primer an das einzelsträngige *Template* gebunden. Dazu wurden 2 µl T7-*Promotor Primer* (100pm/ml), 2 µl DNA-*Template* (100pm/ml) und 10 µl siRNA-Puffer in einem PCR-Gefäß bei 70°C für 10 min

erhitzt, dann in Schritten von 0,01°C/s auf 4°C abgekühlt. Die DNA Doppelstrangsynthese erfolgte durch Zugabe von 2 µl Exo-Minus Klenow DNA Polymerase (20 U/ µl), 2 µl *Klenow Fill-in* Puffer (10x) und 2 µl dNTPs (2,5mM). Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C erhitzt, anschließend wurde die Polymerase bei 70°C für 10 min inaktiviert. Für die eigentliche Transkription wurde das *MEGAscript T7 Transcription Kit* verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 2 µl DNA-*Template*, 6 µl H₂O, 2 µl T7 Enzymmix, 8 µl NTPs (75 mM) und 2 µl 10x *reaction buffer* gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde das DNA-*Template* durch die Zugabe von 2 µl TURBO DNase und Inkubation bei 37°C über 30 min verdaut. Die DNase wurde durch Zugabe von 30 µl Ammoniumacetat Stopplösung inaktiviert, 230 µl RNase freies Wasser wurde zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte durch Mischung mit 300 µl Phenol-Chloroform-Amylalkohol und anschließender Zentrifugation bei 12 000 rpm über 5 min, die Phenolphase wurde abgenommen und erneut mit 300 µl Chloroform vermischt und zentrifugiert. Zur Phenolphase wurde 300 µl Ethanol (100%) zugegeben, um die RNA auszufällen. Nach 2h bei -20°C wurde die RNA abzentrifugiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete RNA konnte dann in je 50 µl H₂O resuspendiert werden. Um Fragmente < 8 Basenpaare zu entfernen, wurde die RNA in einem letzten Schritt mittels *Mini Quick Spin Oligo Columns* bei 1000g aufgereinigt. Die Konzentration der RNA wurde mittels Nanodrop 2000c photometrisch bestimmt.

2.5.2. Herstellung der bifunktionellen siRNA

Es wurden zwei Typen von siRNAs verwendet: Doppelsträngige siRNAs und siRNAs mit Haarnadelstruktur (engl. *hairpin*). Erstere bestehen je aus einem *sense* (s) und *antisense* (as) Strang und müssen aneinandergelagert werden (engl. *annealing*). Letztere sind selbstfaltend und benötigen keinen *annealing*-Schritt.

Um *sense* und *antisense* Strang zu *annealen*, wurden beide Einzelstränge in gleicher Menge in siRNA-Puffer gegeben und für 10 min auf 75°C erhitzt. Anschließend wurden die siRNAs in Schritten von 1°C pro Minute auf 4°C abgekühlt.

Im experimentellen Teil wird die Wirkung von siRNAs mit unterschiedlichen 5'-Modifikationen untersucht. Es wurden ausschließlich Doppelstränge untersucht. Zur Nomenklatur wurde das folgende System gewählt, dies wird auch nochmal bildlich unter Gliederungspunkt 3.5 dargestellt.

3p3p-RNA*	Doppelsträngige siRNA, beide Einzelstränge wurden mittels IVT hergestellt und tragen ein Triphosphat am 5'-Ende
3pOH-RNA	Doppelsträngige siRNA, der sense-Strang wurde mittels IVT hergestellt und trägt ein Triphosphat am 5'-Ende, der antisense-Strang wurde synthetisch hergestellt und trägt eine OH-Modifikation am 5'-Ende.
hp3p-RNA	Es handelt sich um eine siRNA mit Haarnadelstruktur (hp) welche mittels IVT hergestellt wurde und am 5'-Ende eine Triphosphatmodifikation trägt.

* „RNA“ wird dabei ggf durch das verwendete Zielgen der siRNA z.B. BRD4 ersetzt

2.5.3. RNA Extraktion

RNA aus Zellkultur und primären AML-Zellen wurde mittels *peqGOLD Total RNA Kit* nach Herstellerangaben extrahiert.

2.5.4. Reverse Transkription

Um die extrahierte RNA mittels quantitativer *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) zu analysieren, muss zunächst ein RNA-cDNA-Hybrid hergestellt werden. Eine Reverse Transkriptase synthetisiert den komplementären cDNA-Strang an die RNA. Als Primer dient ein Oligo-dT-Nukleotid.

In der Regel wurden 100-400 ng RNA umgeschrieben. Für einen Ansatz von 20 µl wurden die folgenden Reagenzien gemischt und anschließend in einem *Thermocycler* für 60 min auf 42°C erhitzt, danach für 10 min auf 70°C.

5x Reverse Transkriptase Puffer	4 µl
dNTP (10 µM)	2 µl
Oligo-dT (10 µM)	2 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,4 µl
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (200U/µl)	0,4 µl
RNA	100-400 ng in 11,2 µl H ₂ O

2.5.5. Quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) misst die Menge spezifischer DNA-Abschnitte. In dieser Arbeit wird sie genutzt, um Veränderungen von Genexpression auf mRNA-Ebene zu quantifizieren. Vor der eigentlichen Messung wird

die mRNA in cDNA umgeschrieben. Um spezifische Genabschnitte zu vervielfältigen, benötigt man zwei spezifische Primer, dNTPs sowie eine DNA-Polymerase. Für einen quantitativen Nachweis wird zusätzlich ein kurzes Oligonukleotid genutzt, welches an beiden Enden je ein fluoreszierendes Farbstoffmoleküle trägt. Fluorochrom 1 wird als *reporter* (engl. Berichten) bezeichnet, Fluorochrom 2 als *quencher* (engl. löschen). Dieses Konstrukt wird als Sonde bezeichnet, es ermöglicht einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET): Die nach Anregung von Fluorochrom 1 emittierte Strahlung entspricht dem Anregungsspektrum von Fluorochrom 2 und wird bei geringem Abstand der Fluorochrome vollständig absorbiert. Werden die beiden Fluorochrome räumlich getrennt kann das emittierte Licht von Fluorochrom 1 nicht mehr absorbiert werden und die Strahlung kann detektiert werden. Das beschriebene Oligonukleotid hybridisiert zwischen den beiden Primern. Bei Neustrangsynthese baut die Taq-Polymerase durch die 5'3'-Exonukleaseaktivität das Oligonukleotid ab, die beiden Fluorochrome werden räumlich getrennt und das Licht des *reporters* wird nachweisbar. Der Amplifikationszyklus in dem das Signal die Nachweisbarkeitsgrenze überschreitet wird *threshold cycle* (CT) genannt. Für die relative Quantifizierung der Genexpression wird der CT des Zielgens mit dem CT eines konstitutiv exprimierten Gens wie z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verglichen.

In dieser Arbeit wurden q-PCRs mittels LightCycler 480 durchgeführt. Es wurden fluoreszierende Sonden der *Universal Probe Library* (Roche) eingesetzt. Folgende Materialien wurden für einen 10 µl Ansatz eingesetzt:

cDNA	2 µl
Startprimer (10 µM)	0,2 µl
Endprimer (10 µM)	0,2 µl
Sonde (10 µM)	0,1 µl
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X)	5 µl
H ₂ O	2,5 µl

Für alle Untersuchungen wurde das Roche Protokoll *mono colour hydrolysis probes* eingesetzt, 45 Amplifikationszyklen wurden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in der *LightCycler 480 Software*.

2.5.6. Färbungen für Durchflusszytometrie

In den gezeigten Versuchen wurden FACSCanto II und FACSCalibur verwendet. Die Expression von Oberflächenmolekülen wurde mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper analysiert. Die Antikörper wurden nach Herstellerprotokoll dosiert. Tote

Zellen wurden entweder durch eine Färbung mit To-Pro (0,2 µl in 100 µl PBS) oder durch die Kombination von Annexin und PI oder von Annexin und Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506 ausgeschlossen. To-Pro und PI (0,5 µl in 100 µl PBS) wurden kurz vor der FACS-Analyse zugegeben. Vitalitätsfarbstoff eFluor™ 506 wurde im Verhältnis 1:500 zu den Proben gegeben. Alle Proben wurden auf Eis gelagert.

2.6. Tiermodell

2.6.1. Mäuse

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden über Janvier (Frankreich) bezogen. NOD scid gamma entstammten aus der Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung Innenstadt LMU. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland, TVA 55.2.1.54-2532-7-13).

2.6.2. Leukämieinduktion

Zellen für die Induktion einer Leukämie im Tiermodell wurden ca. 7-9 Tage vor Injektion aufgetaut. Bis zur Injektion wurden sie durchgängig in der kleinsten empfohlenen Zelldichte kultiviert (C1498: 1×10^5 /ml; Molm13: 2×10^5 /ml; MV4-11: 1×10^5 /ml). Vor Injektion wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Die Zellen wurden aufkonzentriert und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Die benötigte Zellmenge wurde in 100 µl PBS in die Schwanzvene injiziert. Die geeignete Zellzahl wurde bei C1498GFP durch Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe ermittelt. Bei MV4-11 und Molm13 wurden die Zellzahlen nach Empfehlung von Michaela Grunert (Hämatologikum, Helmholtz Zentrum München) eingesetzt.

Modell	Zellzahl pro Tier pro Injektion
C1498GFP	1×10^6
MV4-11GFP	1×10^6
Molm13GFP	1×10^5

Die Mäuse wurden regelmäßig gewogen und auf Krankheitszeichen kontrolliert. Spätestens bei Auftreten von Symptomen wurde das Tier getötet und analysiert. Als Symptom wurde gewertet:

- Gewichtsverlust > 2g im Vergleich zum Ausgangsgewicht
- Apathie

- struppiges Fell
- Auftreten von Hauttumoren, Organschwellungen, Aszites

2.6.3. Herstellung von Organlysaten

Nach dem Töten der Tiere wurden die Organe entnommen und zunächst in RPMI auf Eis gelagert. Anschließend wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, um diese mittels FACS zu analysieren. Je nach Organ wurde unterschiedlich vorgegangen.

Milz: Einzelzellsuspensionen wurden mittels eines 40 µm Zellsiebes hergestellt, anschließend wurde eine Erylyse durchgeführt

Lunge und Leber: Zunächst wurde das Gewebe in Stücke geschnitten, anschließend in 1 ml RPMI mit zugesetzter Kollagenase (1mg/ml) und DNase (0,05 mg/ml) für 30 min auf 37°C erwärmt. Das so vorbehandelte Gewebe konnte danach mit einem 100 und 70 µm Zellsieb in eine Einzelzellsuspension überführt werden.

Knochenmark: Aus Femur, Tibia und Humerus konnte Knochenmark isoliert werden. Die Epiphyse wurde abgetrennt, mittels einer Spritze gefüllt mit 2% FCS in PBS und einer 24 G Kanüle konnte das Knochenmark ausgespült werden. Anschließend wurde eine Erylyse und ggf. eine Filtration im 40 µm Zellsieb durchgeführt.

Blut: Die Blutentnahme erfolgte an der getöteten Maus mit einer 20 G Kanüle und einer heparinisierten Spritze aus dem Herzen. Erylyse wurde zwei Mal durchgeführt.

2.6.4. Auswertung von Organlysaten

Die Einzelzellsuspensionen wurden mittels FACS analysiert. Je nach Untersuchung wurden ggf. Oberflächenmarker gefärbt. In allen Fällen wurden tote Zellen durch Färbung ausgeschlossen.

2.7. Statistik und Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Software PRISM in den Versionen 7,8,10 verwendet. FACS-Daten wurden mittels Flow-Jo 7.6 und 10.6.2 ausgewertet.

Bearbeitung der Mikroskopbilder erfolgte mittels ImageJ Version 2.0.0-rc-69/1.52n. Zur Literaturverwaltung wurde Endnote X9 eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Eignung der Zelllinie C1498 als *in vitro*-Modell für therapeutische Anwendung von bifunktioneller siRNA

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die murine Zelllinie C1498 als *in vitro*-Modell für Therapieversuche mit bifunktioneller siRNA geeignet ist. Die Voraussetzungen für die Wirksamkeit von bifunktioneller siRNA sind: ein effizienter Transport ins Zytosol der Zelle (Transfektion), die Aktivierung der RIG-I-Signalkaskade und der *knock-down* der Zielgene durch RNA-Interferenz. Diese Aspekte sollen im Folgenden dargestellt werden.

In Pilotuntersuchungen wurden die Transfektionseffizienzen von zahlreichen kommerziell erhältlichen Lipofektionsreagenzien und von Nukleofektion bestimmt. Dazu wurde eine fluoreszierende siRNA in C1498-Zellen transfiziert. Der Anteil fluoreszenzmarkierter Zellen wurde mittels FACS gemessen.

Bei Nachweis einer fluoreszenten Zellpopulation wurde die Methodik weiter optimiert. Für Lipofektion wurde das Verhältnis von siRNA zu Reagenz angepasst. Für Nukleofektion konnte das Ergebnis durch eine Variation der Nukleofektionsprogramme erhöht werden. Eine verbesserte Viabilität konnte durch einen zusätzlichen Mediumwechsel mit calciumarmen RPMI-Medium erhöht werden.

Im Rahmen der Lipofektionsexperimente wurden die folgenden Transfektionsreagenzien untersucht: RNAiMax, Lipofectamin 2000, Xtreme Gene, Dreamfect, Lullaby, TransIT, HiPerFect, Interferin, Oligofectamin. In Abb. 3 A werden ausschließlich die Reagenzien gezeigt, welche nach den Pilotuntersuchungen für weitere Experimente genutzt wurden. Mit Lipofektion konnten im Mittel Transfektionseffizienzen zwischen 20 und 50% erreicht werden. Eine hohe Schwankungsbreite zeigte sich bei allen eingesetzten Reagenzien. Im Falle der Nukleofektion variierte die Effizienz zwischen den Repetitionen stark. Bei im Allgemeinen geringer Effizienz konnte kein überlegenes Transfektionsprotokoll identifiziert werden. (Abb. 3 A)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Transfektion von C1498 zumindest potentiell möglich ist, sollte in einem nächsten Schritt die *knock-down*-Effizienz der verwendeten siRNAs überprüft werden. Hierzu wurden Zelllinien eingesetzt, welche ein grün fluoreszierendes Protein (GFP, *green fluorescent protein*) exprimieren. Diese

wurden mit einer siRNA gegen das fluoreszierende Protein (siGFP-RNA) behandelt. Der Effekt sollte durch eine Veränderung der Fluoreszenzstärke mittels FACS nachgewiesen werden. Ein GFP exprimierender Zellklon der Zelllinie C1498 (C1498-GFP-c1) wurde mit siGFP-RNA behandelt. Die adhärent wachsende Zelllinie Hela-GFP wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die resultierende GFP-Expression wurde 24h und 48 h nach Transfektion mittels FACS quantifiziert. Als Kontrolle für einen *off-target* Effekt wurden zwei siRNAs verwendet, welche an unterschiedlichen Stellen die GFP-mRNA binden, siGFP 443 und siGFP 698. (Dadurch sollte kontrolliert werden, dass es sich um einen Target-spezifischen Effekt handelt.)

In der Zelllinie C1498-GFP-c1 konnte eine geringe Abnahme der GFP-Expression von ca. 11% nach 48 h für beide siRNAs gemessen werden, nach 72 h betrug die Abnahme ca. 14%. Eine zweite Transfektion nach 24 h oder die Anwendung von Nukleofektion führten nicht zu einem verstärkten *knock-down* (Daten nicht dargestellt). In der Positiv-Kontrolle mit Hela-GFP-Zellen zeigte sich ein wirksamer *knock-down* um 50-60% nach 48h und um 87% nach 72 h durch die verwendeten siRNAs. Beide siRNAs sind somit potentiell geeignet, einen GFP-*knock-down* durchzuführen. Die Effizienz ist jedoch in Hela-GFP-Zellen deutlich höher verglichen zu C1498-GFP-Zellen. In Hela-Zellen zeigten sich geringfügige Wirkunterschiede zwischen siGFP 443 und siGFP 698. (Abb. 3.B)

Aus den oben gezeigten Daten geht hervor, dass C1498 zwar grundsätzlich mit siRNAs transfizierbar sind. Der Effekt der transfizierten siRNA ist jedoch nur gering. Möglicherweise verhindert ein endosomaler Verbleib die Freisetzung ins Zytosol, den Wirkort der siRNA. Um eine solche Konstellation zu überprüfen, wurden die Zellen mit einer fluoreszierenden RNA transfiziert und der Verbleib nach 12 h mit dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Als Positivkontrolle diente die adhärent wachsende Zelllinie 1205Lu. Für diese Zelllinie waren aus den Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hohe, reproduzierbare Transfektionseffizienzen bekannt. In 1205Lu-Zellen zeigte sich eine deutliche zytosolische Aufnahme der fluoreszierenden siRNA bei allen verwendeten Transfektionsreagenzien bereits nach 12h. Im Gegensatz dazu kommt es bei C1498 Zellen zu diesem Zeitpunkt im Wesentlichen nur zu Anlagerung von RNA-enthaltenden Liposomen und nicht zur zytosolischen Aufnahme größerer Mengen siRNA. Die fluoreszierende siRNA befand sich in einzelnen Vesikeln lose im Zellmedium, ein endosomaler Verbleib wurde zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.

Ergebnisse

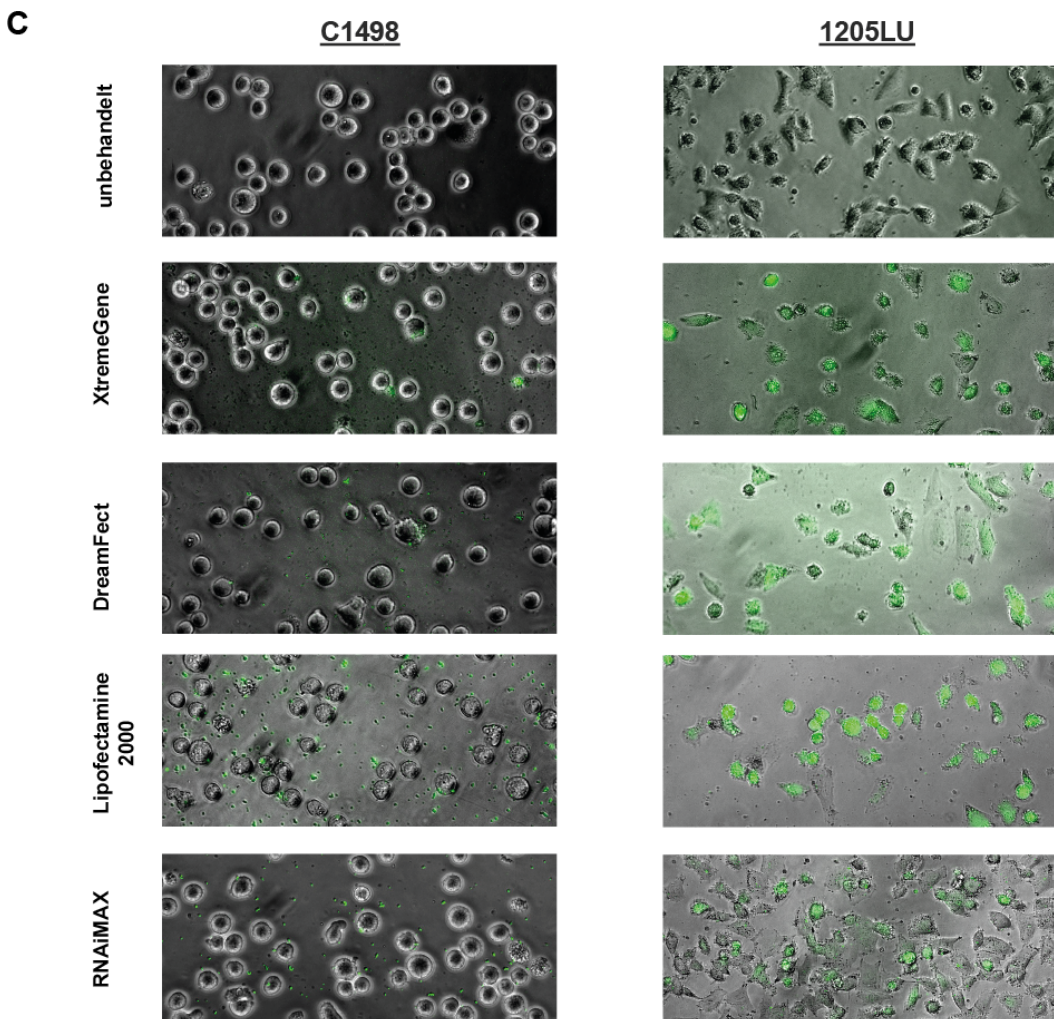
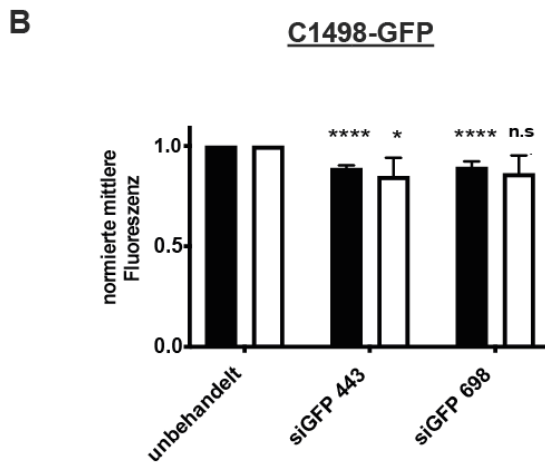
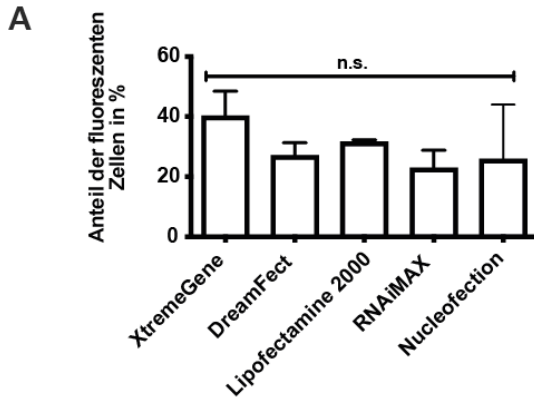


Abbildung 3. Anwendung von siRNA in der Zelllinie C1498

(A) C1498 Zellen wurden mit einer 5' Alexa-488-fluoreszenzmarkierten RNA transfiziert. Nach 4h wurde die Aufnahme mittels FACS gemessen. Im Balkendiagramm angezeigt sind Mittelwerte mit dem Standardfehler um den Mittelwert von unabhängigen Experimenten (X-tremeGene n = 7; Dreamfect n = 5; Lipofectamin 2000 n = 4; RNAiMax n = 5; Nukleofektion n = 2). In der *one-way* ANOVA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

(B) C1498-GFP-Zellen und Hela-GFP wurden mit siGFP-RNA transfiziert. Nach 48 und 72h wurde die mittlere Fluoreszenzintensität im FACS gemessen, die Werte werden relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Signifikanzniveaus wurden mittels *one-way* ANOVA und *Dunnnett's multiple comparisons test* verglichen zu unbehandelt bestimmt. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$. Für C1498-GFP-Zellen wurden n = 4 Experimente durchgeführt (davon n = 1 mit RNAiMax, n = 3 mit X-Treme Gene). Für Hela-GFP wurden n = 3 Experimente mit RNAiMax durchgeführt.

(C) C1498 und 1205Lu Zellen wurden mit 5'-Alexa-488-markierter siRNA (1 μ g/ml) mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien transfiziert. 12 h nach Transfektion wurde die Transfektion fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. (C1498: 40x Vergrößerung, 1205Lu: 20x Vergrößerung). Es werden Ergebnisse eines Versuches gezeigt (n = 2).

Bifunktionelle ppp-siRNAs vermitteln neben der RNA-Interferenz eine Aktivierung des RIG-I-*like* Rezeptor (RLR) Signalweges. Bisher gibt es keine Voruntersuchungen zur Funktionalität des Signalweges in der Zelllinie C1498. Wir untersuchten die antivirale Reaktion von C1498-Zellen nach Infektion mit RNA-Viren (*vesicular stomatitis* Virus, Sendai Virus) und Stimulation mit Interferonen und synthetischen RLR Liganden (Triphosphat-RNA und Poly(I:C)). Die Induzierbarkeit von RIG-I und des Schwestermoleküls MDA5 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen. Die folgende Freisetzung von IP-10 in den Zellüberstand wurde mittels Elisa quantifiziert.

Die Infektion mit der M51R Variante des *Vesicular stomatitis virus* (VSV-M51R) sowie die Stimulation mit IFN- α führte zu einer deutlichen Hochregulation der Proteine RIG-I und MDA5 (Abb. 4 A). VSV-M51R kann die Produktion von Interferon auf Grund der Mutation des M-Proteins schlechter hemmen als der Wildtyp (72). Die Stimulation durch Sendai Virus sowie IFN- β führte zu einer erheblich geringer ausgeprägten Induktion von RIG-I und MDA5, welche nicht in allen durchgeführten Experimenten nachweisbar war. Eine deutliche Freisetzung von IP10 konnte lediglich durch die Infektion mit VSV-M51R induziert werden (Abb. 4 B). Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass die RIG-I-Signalkaskade in C1498 funktionell aktiv ist.

Als synthetische Liganden wurden die Triphosphat-RNA 3pCO4 und die synthetische Doppelstrang-RNA Poly(I:C) eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde die OH-Variante ohne Triphosphat-Modifikation der Sequenz CO4 genutzt. Nach Transfektion dieser drei Liganden mittels RNAiMax zeigte sich lediglich nach Anwendung von Poly(I:C) eine minimale antivirale Reaktion der C1498-Zellen. Im Western Blot konnte RIG-I minimal vermehrt nachgewiesen werden, im Elisa zeigte sich keine veränderte IP-10

Ausschüttung (Abb.4). Zusammenfassend konnte mit den getesteten Transfektionsmethoden trotz einer intakten RIG-I Signalkaskade keine Immunstimulation durch Triphosphat-RNA erreicht werden.

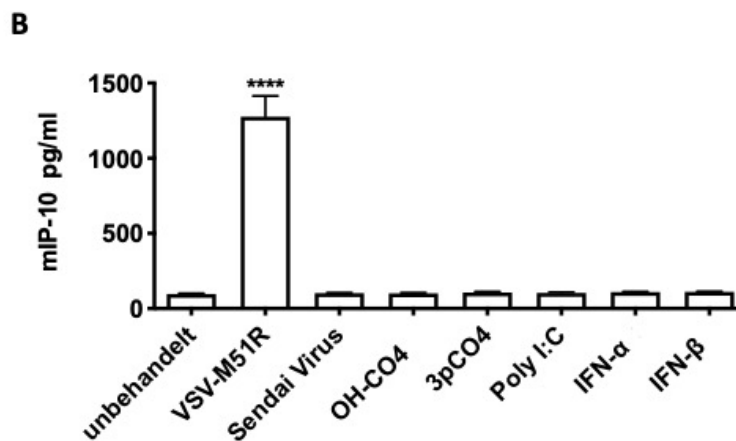
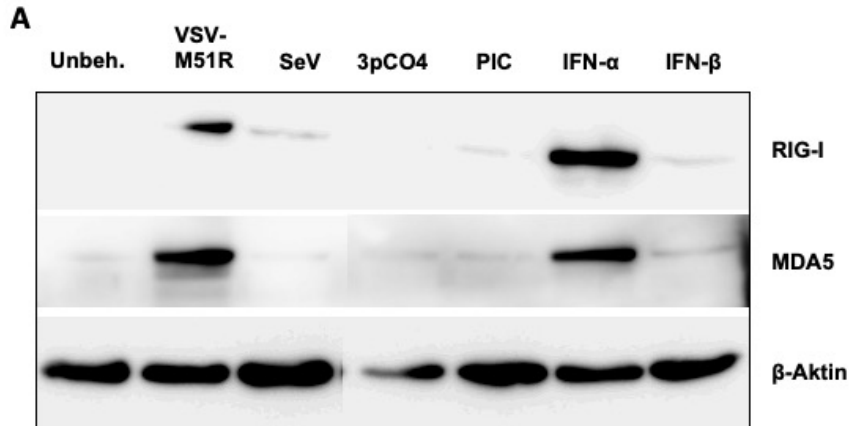


Abbildung 4. Funktionalität der RLR-Kaskade in C1498

C1498 Zellen wurden mit den Viren VSV-M51R (MOI 1) sowie Sendai Virus (40 U/ml) und den Interferonen α und β (je 1000 U/ml) stimuliert sowie mit den synthetischen RLR-Liganden (CO4, 3pCO4, Poly I:C je 500 ng/ml) mittels RNAiMax transfiziert (5,7 μ l/ μ g RNA).

(A) Nach 24h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Es ist ein repräsentativer Western Blot von insgesamt drei Experimenten gezeigt

(B) Die Freisetzung von IP-10 in den Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Signifikanzniveaus von drei unabhängigen Experimenten wurden mit *one-way ANOVA* und *Dunnnett's multiple comparisons test* berechnet, alle Bedingungen wurden mit unbehandelt verglichen. **** = $p \leq 0,0001$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

3.2. Charakterisierung des syngen AML-Mausmodells C1498-GFP-Zellen in C57BL/6

Die Wirksamkeit der bifunktionellen ppp-siRNA ist abhängig von Reaktion der einzelnen Zellen auf das Medikament, für den Therapieerfolg bei einer systemischen Erkrankung ist jedoch die systemische Reaktion des Immunsystems entscheidend. Um den systemischen Effekt zu prüfen, sind zukünftig Versuche im Mausmodell geplant. Da kein geeignetes Tiermodell zu Verfügung stand, sollte dies in einem ersten Schritt etabliert werden. Ziel war es, ein Mausmodell mit intaktem Immunsystem zu finden, welches der humanen AML möglichst ähnlich ist. Wichtige Kriterien waren die Immunkompetenz des Tieres, ein schnelles, gleichmäßiges Anwachsen in allen Tieren und die einfache Quantifizierbarkeit des Krankheitsverlaufs. Ob die Zelllinie C1498, verwendet in C57BL/6 Mäusen, diese Kriterien erfüllt, sollte geprüft werden.

Die Zelllinie C1498 exprimiert keine spezifischen Oberflächenmarker und ist somit schwierig zu identifizieren und von gesunden hämatopoetischen Zellen zu unterscheiden. Deshalb wurde eine GFP-exprimierende C1498 Zelllinie hergestellt. Die Expression von GFP ermöglicht die Differenzierung normalen murinen Gewebes von Leukämiezellen. So kann die Ausbreitung der Leukämie in der Maus mittels Durchflusszytometrie leicht quantifiziert werden. Zur Herstellung der Zelllinie wurde C1498 Zellen mit einem retroviralen GFP-kodierenden Vektor transduziert und anschließend durch *FACS-Sort* selektiert. Im Folgenden wird diese Zelllinie mit C1498-GFP bezeichnet. (Abb. 5 A)

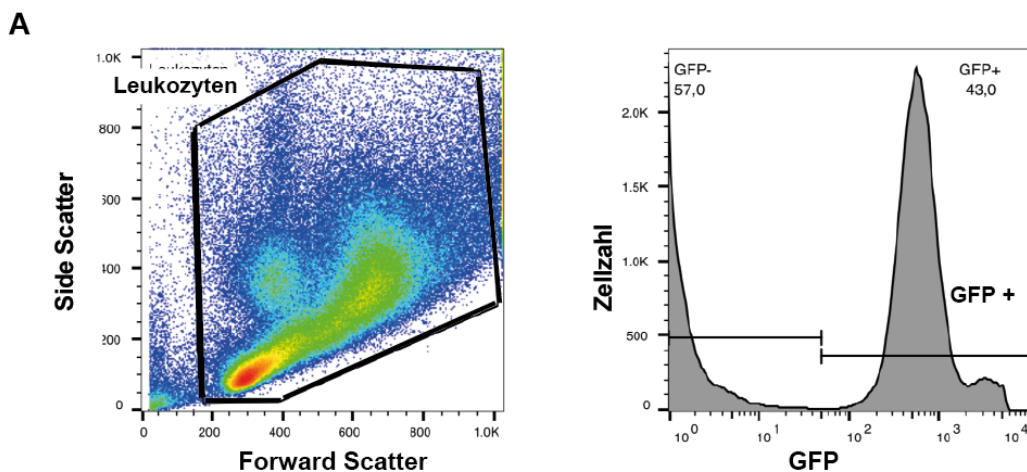
Die Leukämieinduktion in der Maus erfolgt durch eine Injektion der Leukämie-Zellen in die Schwanzvene. Im Rahmen von Vorarbeiten für dieses Projekt war bereits eine geeignete Zellzahl für ein zuverlässiges Anwachsen der Leukämie bestimmt worden. Ein gutes Anwachsen innerhalb von 17- 20 Tagen wurde bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ beobachtet.

Fremdproteine wie z.B. GFP können im immunkompetenten Tier zu einer immunologischen Abstoßungsreaktion führen und somit das Anwachsen der Leukämiezellen verhindern. Um dies auszuschließen, wurde das Überleben von Tieren nach Injektion mit C1498 und C1498-GFP verglichen. Zwischen dem Überleben der beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Tiere zeigen gleichermaßen sowohl nach Injektion mit C1498 und C1498-GFP starke Krankheitssymptome oder versterben zwischen Tag 17 und 21. Dies lässt vermuten,

Ergebnisse

dass es zu keiner relevanten Abstoßungsreaktion aufgrund des Fremdproteins-GFP in der C1498-GFP Zelllinie in BL6-Mäusen kommt. (Abb. 5 B)

Im Mausmodell verläuft die Entwicklung der AML über einen sehr kurzen Zeitraum. An Tag 16 zeigen die Tiere noch keine Krankheitszeichen, es sind jedoch in allen Tieren kleine Anzahlen von Leukämiezellen im peripheren Blut und Knochenmark nachweisbar. Vier Tage später zeigen die Tiere unter anderem Schwäche, Apathie und häufig eine Volumenzunahme des Bauches. Diese war durch Aszites, subkutane Tumoren oder eine Infiltration von Milz, Leber und Ovarien mit Tumorzellen bedingt. In der FACS-Analyse der verschiedenen Organe zeigt sich eine starke Vermehrung der Leukämiezellen. Der Anteil der Leukämiezellen in den verschiedenen Organen zeigt geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren. Das Anwachsen ist aber ausreichend gleichmäßig, um mit diesem Modell Therapieexperimente durchführen zu können. (Abb. 5 C)



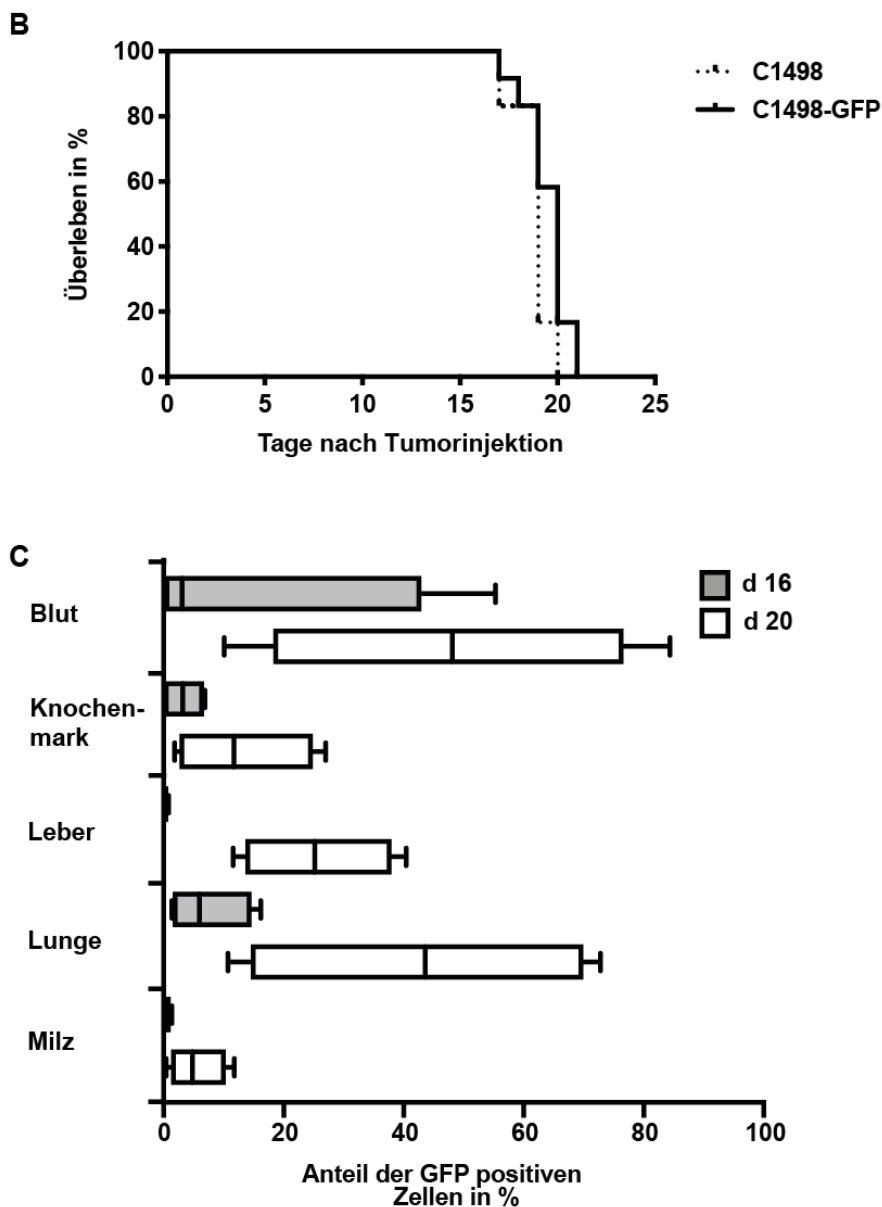


Abbildung 5. Eigenschaften des AML-Mausmodells C1498GFP in C57BL/6

(A) Darstellung von GFP positiven C1498 Zellen im Blut einer C57BL/6 Maus in der FACS-Messung an Tag 20 nach Injektion von 1×10^6 C1498-GFP-Zellen
 (B) C57BL/6 Mäuse wurden mit je 1×10^6 C1498-GFP-Zellen (n = 12) oder C1498-Zellen (n = 6) injiziert und täglich kontrolliert. Bei Auftreten von Symptomen (Apathie, Gewichtsverlust >2g, struppiges Fell) wurden die Tiere getötet und das symptomfreie Intervall dokumentiert.
 (C) C57BL/6 Mäuse wurden mit C1498-GFP-Zellen injiziert. An Tag 16 (n = 4) bzw. Tag 20 (n = 4) wurden die Tiere getötet und die Leukämie last mittels FACS quantifiziert.

3.3. Vergleich zweier Xenograft-Mausmodelle mit FLT3-Mutation

Die humanen AML-Formen werden u.a. anhand ihrer Treibermutationen unterschieden, welche entscheidend für das Risikoprofil und somit den Krankheitsverlauf sind. Eine mögliche Anwendung des siRNA-Teils der bifunktionellen ppp-siRNA ist es, genau diese Treiber-Mutationen stillzulegen und dadurch den Krankheitsverlauf zu bremsen. Langfristig soll dieser Effekt auch im Tiermodell untersucht werden, es fehlen jedoch geeignete Modelle. Wir setzten zwei humane Zelllinien (MV4-11-GFP und Molm13-GFP) in der immundefizienten NOD-SCID-Maus ein. Beide Zelllinien exprimieren auf Grund einer Mutation eine überaktive Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3, die durch entsprechende siRNAs stillgelegt werden könnte. In dieser Arbeit sollte zunächst eine genauere Charakterisierung des Leukämieverlaufs in beiden Modellen erfolgen.

Nach Injektion der Leukämiezellen wurden die Tiere täglich gewogen und auf Krankheitssymptome kontrolliert. Es zeigte sich ein divergenter Verlauf zwischen beiden Modellen. Die Molm13-GFP-Mäuse zeigten durchgehend ein konstantes Gewicht, an Tag 20 zeigten jedoch mehrere Tiere Krankheitssymptome. Daraufhin wurden alle Versuchstiere getötet, um das Befallsmuster zu analysieren. Das Anwachsen der Leukämiezellen in allen Tieren war sehr gleichmäßig (Abb. 6A). In den MV4-11-GFP-Mäusen zeigte sich hingegen ein deutlich variablerer Krankheitsverlauf. Das Experiment mit drei Tieren ergab eine sehr hohe Varianz bis zum Auftreten eines relevanten Gewichtsverlustes von >2g, dieser betrug zwischen 56 und 76 Tagen (Abb. 6 B). Zu diesem Zeitpunkt war Gewichtsverlust das einzige Krankheitssymptom, der Versuch wurde für das jeweilige Tier beendet.

In der Analyse der Organe zeigte sich im Molm13-GFP-Modell ein deutlicher Befall mit geringer Varianz zwischen den einzelnen Versuchstieren (Abb. 6 A links). Die höchste Zellzahl zeigte sich im Knochenmark sowie in der Lunge. Im MV4-11-GFP Modell zeigte sich auch das Befallsmuster sehr variant (Abb. 6 A rechts). Eines der Tiere zeigte einen sehr ausgeprägten Organbefall, in den anderen zwei Tieren ließ sich nur ein geringfügiger Organbefall messen, dort betrug die Zahl leukämischer Zellen weniger als 1% der erfassten Zellen. Die höchsten Zellzahlen waren im Knochenmark nachweisbar. In der FACS-Auswertung zeigte sich, dass es sich dabei um die leukämische Population handelt (Abb. 6 C).

Zusammenfassend zeigt die Zelllinie Molm13-GFP in NOD-SCID-Mäusen ein zügiges, gleichmäßiges Wachstum, wohingegen die Krankheitsverläufe nach Injektion von MV4-11-GFP sehr variabel sind.

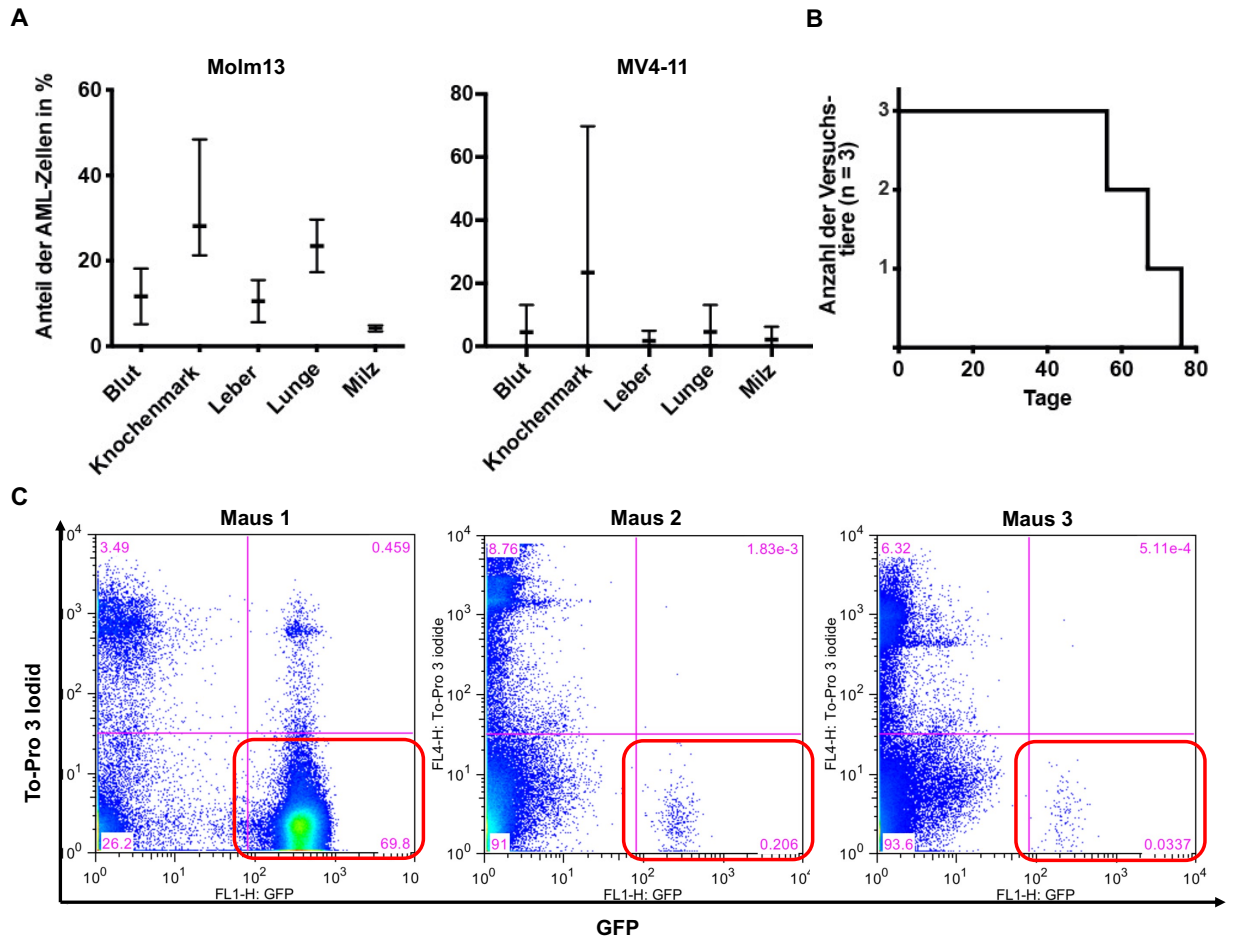


Abbildung 6. Vergleich von MV4-11-GFP und Molm13-GFP-Zellen in NOD SCID Mäusen

In NOD-SCID Mäusen wurde am Tag 0 durch Injektion von 1×10^6 MV4-11-GFP-Zellen in die Schwanzvene bzw. 1×10^5 Molm13-GFP-Zellen eine Leukämie induziert.

(A) Organbefall bestimmt durch den Anteil GFP-positiver Zellen im FACS an d20 nach Injektion von Molm13-GFP (n=5) bzw. nach Injektion von MV4-11-GFP zum Zeitpunkt des Abbruchs auf Grund einer symptomatischen Erkrankung (Tag 56-76). Dargestellt ist der Mittelwert mit Spannweite.

(B) Zeitliche Varianz bis zum Versuchsabbruch auf Grund einer symptomatischen Erkrankung (Gewichtsverlust) nach Injektion von MV4-11-GFP.

(C) Nachweis der MV4-11-GFP-Zellen im Knochenmark von drei Mäusen mittels FACS. Maus 1 mit sehr deutlichem Befall durch eine GFP positive Zellpopulation, Maus 2 und 3 mit einem geringer ausgeprägtem Befall. Anzahl der Tage nach Tumordinjektion: Maus 1 76d, Maus 2 67d, Maus 3 56d

3.4. Anwendung und Effekt von Triphosphat-RNA in primären AML-Zellen

Als primäre humane AML-Zellen wurden Leukämiezellen (Blasten), welche direkt aus dem Blut von Leukämiepatienten isoliert wurden, eingesetzt. Da sie einer realen Krankheitssituation entstammen, stellen sie ein ausgesprochen hochwertiges Testmodell dar. Im Folgenden soll zunächst isoliert die Anwendbarkeit und Wirkung von Triphosphat-RNA geprüft werden. Die Wirkung von siRNA und bifunktionellen pppRNAs ist Gegenstand des darauffolgenden Gliederungsabschnittes.

Wie auch schon für die Zelllinie C1498 gezeigt, ist das Einbringen der Triphosphat-RNA ins Zytosol der Zellen die Grundvoraussetzung für eine Aktivierung des RLR-Signalweges. Somit war auch bei primären AML-Zellen die Identifikation einer effektiven Transfektionsmethode von hoher Relevanz. Mit verschiedenen Lipofektionsreagenzien (DreamFect, HiPerFect, Interferin, Lullaby, Oligofectamine, TransIT, X-tremeGene, RNAiMax, Lipofectamin2000) und Nukleofektion wurde dafür eine fluoreszierende RNA in die Zellen transfiziert und anschließend der Anteil fluoreszierender, lebender Zellen im FACS gemessen. (Daten nicht gezeigt)

Nach Anwendung von Lipofectamin 2000 und RNAiMax sowie von Nukleofektion waren fluoreszierende Zellen im FACS nachweisbar. Nach Anwendung von Lipofektion fluoreszierten 3-13% der untersuchten Zellen, nach Nukleofektion war ein fluoreszierender Anteil von 63-76% der untersuchten Zellen nachweisbar. Die Zellviabilität nach Transfektion unterschied sich bei Lipofektion und Nukleofektion nicht wesentlich zur unbehandelten Kontrolle. (Abb. 7 A)

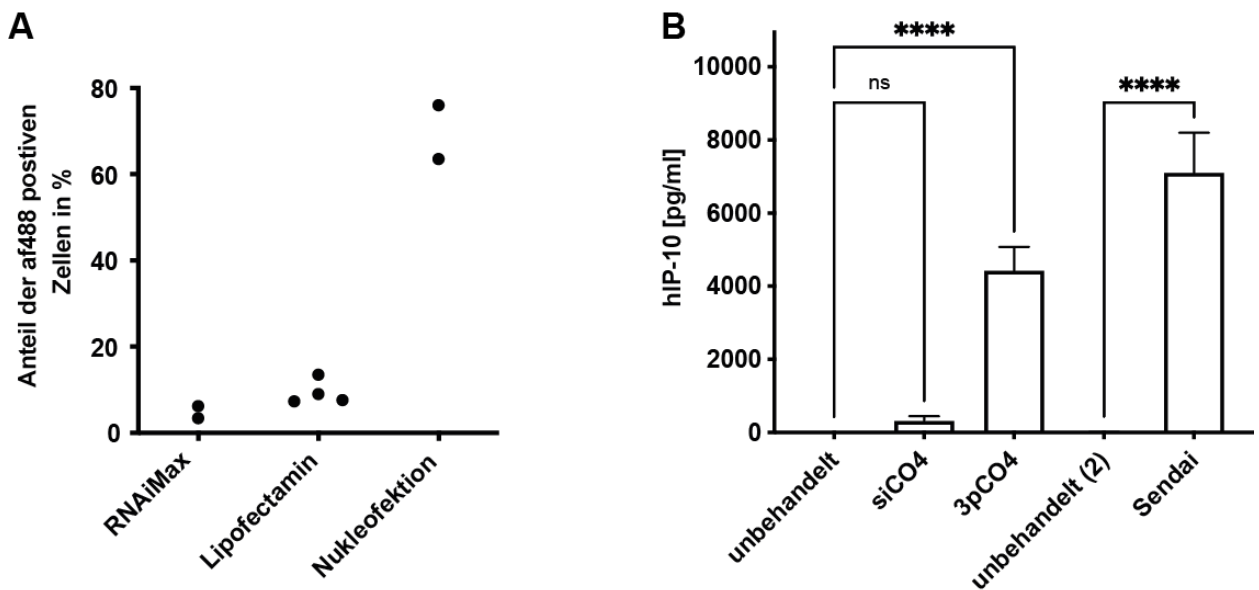
Als Nächstes wurde die Aktivierung der RLR-Kaskade in primären AML-Zellen durch Triphosphat-RNA abhängig von der Art der Transfektion quantifiziert. Die Zellen wurden dabei mittels Lipofektion oder Nukleofektion mit Triphosphat-RNA transfiziert, als Negativkontrolle wurde OH-CO4 eingesetzt. Als von der Transfektionsmethode unabhängige Positivkontrolle wurde die Infektion mit Sendai Virus verwendet. Um das Aktivierungsniveau der RLR-Signalkaskade zu quantifizieren, wurde nach Transfektion bzw. Infektion die Freisetzung von IP-10 in den Zellüberstand gemessen. Nach Lipofektion von Triphosphat-RNA ist die Freisetzung von IP-10 deutlich erhöht, in einer vergleichbaren Größenordnung wie nach einer Sendai Virusinfektion. Die Höhe der IP-10 Freisetzung war für die Transfektionsreagenzien RNAiMax und Lipofectamin vergleichbar ausgeprägt, (beide werden gleichermaßen in den folgenden

Ergebnisse

Experimenten verwendet). Die unspezifische Freisetzung von IP-10 nach Transfektion der Negativkontrolle OH-CO4 ist gering. (Abb. 7 B)

Nach Nukleofektion von Triphosphat-RNA konnte keine Aktivierung der RLR-Kaskade erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche mit Lipofektion durchgeführt.

Die Aktivierung der RLR-Signalkaskade wurde auf mRNA Ebene weiter charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression von nachgeschalteten Bestandteilen der Signalkaskade gemessen. Die Lipofektion von Triphosphat-RNA führt zu einer robusten Induktion von *interferon stimulated genes* (ISG): RIG-I, MDA5, IFN- β und ISG15 verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die Induktion von ISG durch OH-CO4 war nicht signifikant. (Abb. 7 C)



C

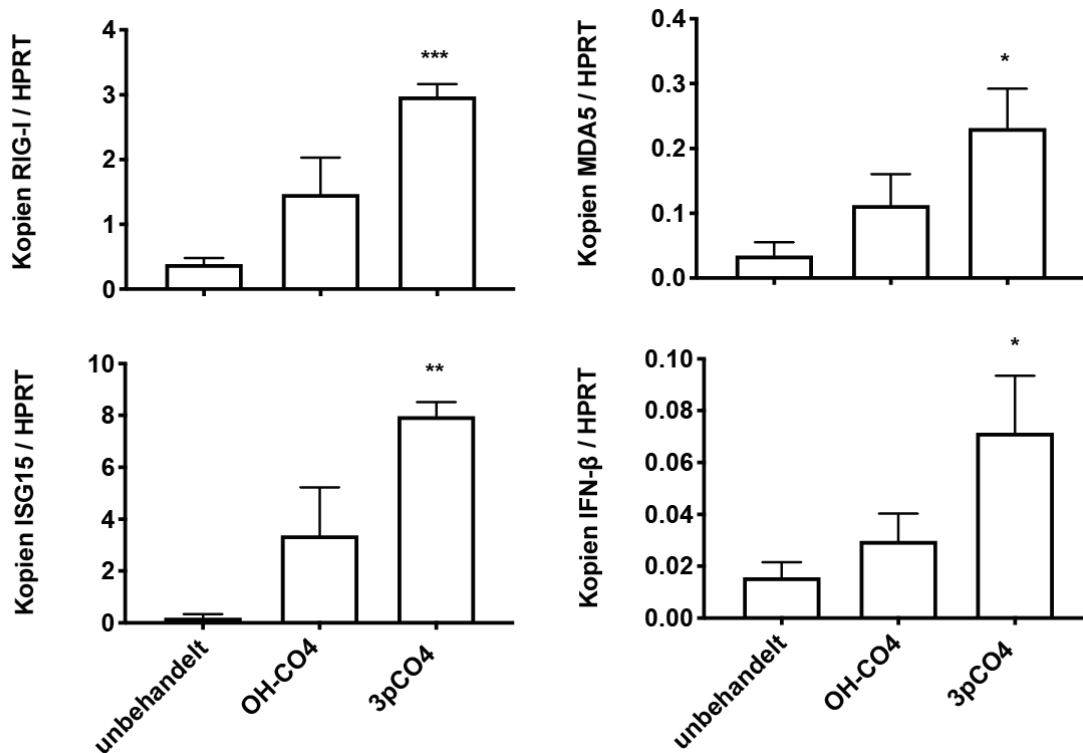


Abbildung 7. Der RLR-Signalweg kann durch Triphosphat-RNA in primären AML-Zellen aktiviert werden

(A) Primäre AML-Zellen wurden mit Alexa-488-markierter RNA transfiziert (RNAiMax n = 2; Lipofectamin 2000 n = 4; Nukleofektion n = 2). Bei Lipofektion wurden 200 ng RNA pro 20 000 Zellen eingesetzt, für Nukleofektion 200ng pro 200 000 Zellen, Einstellung DS 138. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wurde 4 h später mittels Flowzytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche nur mit Alexa-488-markierter RNA ohne Zugabe eines Transfektionsreagenz behandelt wurden.

(B) AML-Zellen wurden durch Lipofektion (Lipofectamin 2000) mit synthetischen RIG-I Liganden transfiziert. Die Konzentration von OH-CO4 und 3pCO4 betrug 1,7 µg/ml. Die Infektion mit Sendai Virus erfolgte in einem separaten Experiment mit 4000 U/ml, deshalb erfolgt die Darstellung einer separaten Negativkontrolle „unbehandelt (2)“. Nach 24 h wurde die Freisetzung von IP-10 in den Überstand mittels Elisa quantifiziert.

(C) Das mRNA-Expressionsmuster der Rezeptoren des RLR-Signalweges RIG-I und MDA5 wurde mittels q-PCR 24 h nach Lipofektion bestimmt. Experimentelles Vorgehen siehe (B)

Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an (B) n = 3; (C) n = 4. Signifikanzniveaus wurden mittels *one-way ANOVA* und *Dunnett's multiple comparisons test* verglichen zu unhandled bestimmt. . * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, **** = p ≤ 0.0001

Nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 kann es, insbesondere in Tumorzellen, zu einer Aktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen kommen. Dies zeigten Besch et al. (22). Ob diese Reaktion auch in AML Blasten ausgelöst wird ist bisher nicht bekannt und soll überprüft werden.

AML-Zellen wurden mit Triphosphat-RNA (3pCO4) behandelt, als Positivkontrolle wurde Staurosporin verwendet. Dies hemmt zahlreiche Proteinkinasen, arretiert die Zellteilung am G1 Checkpoint und führt somit zu Apoptose. Zudem wurde, wie bei Besch et al., poly I:C eingesetzt. Das Ausmaß der Apoptose wurde mittels Darstellung von Apoptosemarkern im FACS bestimmt. 72h nach Zugabe von Staurosporin zeigte sich eine signifikante Verringerung der Viabilität, verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Anwendung von Triphosphat-RNA führte ebenfalls zu einer verminderten Viabilität, jedoch ohne Signifikanz. Die Negativkontrolle OH-CO4 veränderte die Viabilität nicht. (Abb. 8 A)

Apoptose wird u.a. durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert (1). Besch et al. konnten zeigen, dass nach Aktivierung von RIG-I und MDA-5 die proapoptotischen Proteine Noxa und Puma aus der Familie der Bcl-2 Proteine stark hochreguliert werden. Noxa ist essentiell für die Initiierung der Apoptose nach RIG-I bzw. MDA5-Aktivierung. Puma wird bei Aktivierung von p53 induziert (22, 73). Besch et al. konnten in der Zelllinie 1205 Lu einen 5-20fachen Anstieg der Expression von Noxa und Puma auf RNA-Ebene zeigen.

Das folgende Experiment sollte diesen Zusammenhang in primären AML-Zellen untersuchen. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie 1205Lu mit den Stimuli 3pCO4 und Poly I:C verwendet, wie von Besch et al. gezeigt.

Das Expressionslevel von Noxa in primären Blasten war durch Stimulation mit 3pCO4 signifikant induzierbar. Das Expressionslevel von Puma in Blasten war gering und veränderte sich nach Stimulation nicht signifikant. In der Positivkontrolle mit 1205 Lu Zellen zeigt sich ein zu Besch et al. vergleichbares Ergebnis. (Abb. 8 B)

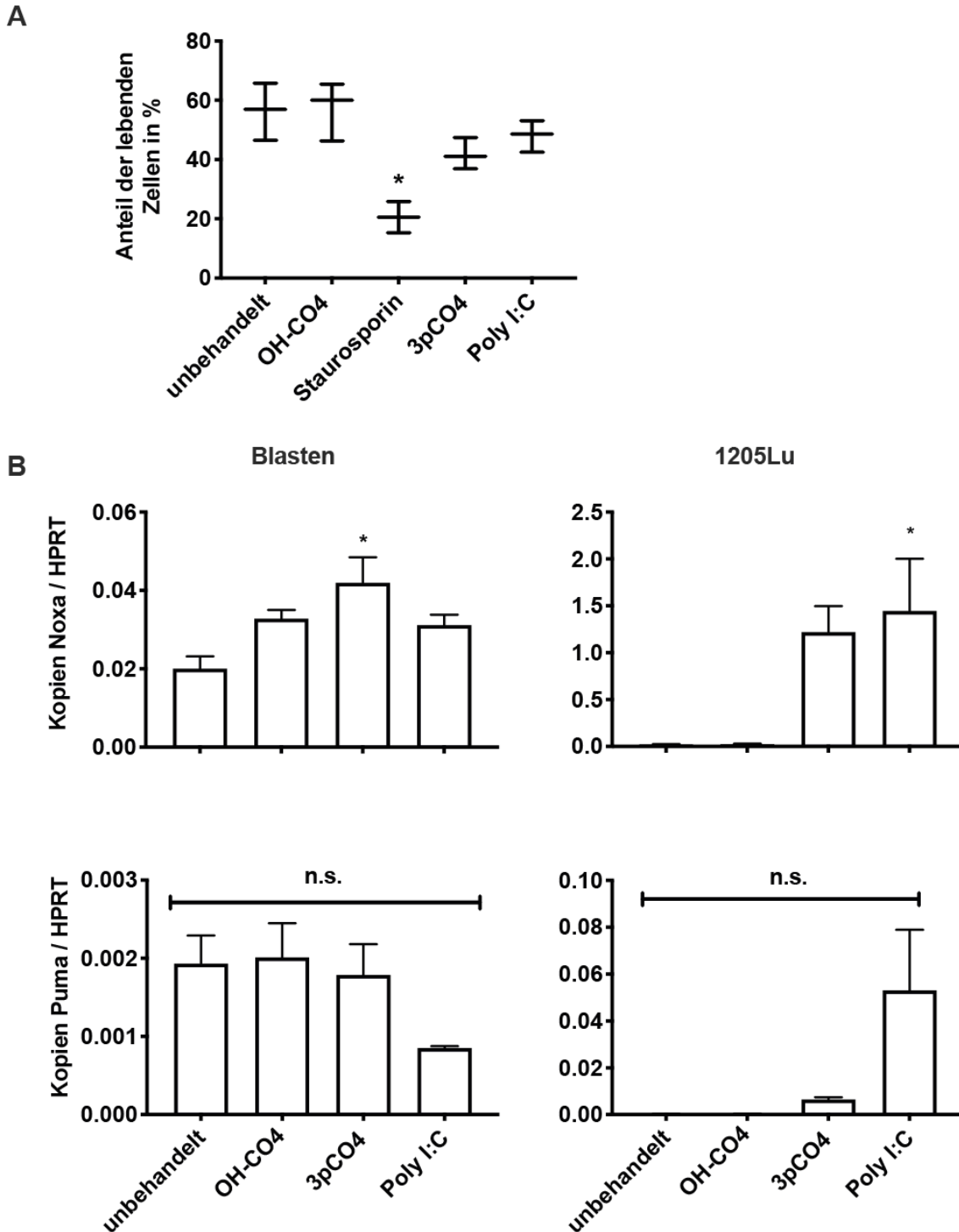


Abbildung 8. Verstärkte Apoptose nach Stimulation mit RLR-Liganden

(A) Die Auswirkung einer RLR-Aktivierung auf die Apoptose von leukämischen Blasten wurde durch einen Flowzytometrie-basierten Assay quantifiziert. 72 h nach Stimulation mit OH-CO4, 3pCO4 und Poly I:C (je 1,7 µg/ml) wurden die toten Zellen gefärbt und der Anteil der lebenden Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (10 µM, 4h) verwendet.

(B) Die Expression der pro-apoptotischen Proteine Noxa und Puma wurde mittels q-PCR 24 h nach der Transfektion von Blasten und 1205Lu gemessen.

Es werden die Daten von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Im Boxplot zeigen

die Whisker Minimal- und Maximalwerte an. Im Balkendiagramm wird der Standardfehler durch den Fehlerbalken angezeigt. Um das Signifikanzniveau zu bestimmen, wurde eine *one-way Anova* mit *Dunnnett's multiple comparisons test* durchgeführt. Alle Bedingungen wurden zur unbehandelten Kontrolle verglichen. * = $p \leq 0,05$ (n = 3)

3.5. Wirkung von bifunktioneller Triphosphat-modifizierter siRNA in primären AML-Zellen

Die vorhergehenden Versuche verdeutlichen, dass die Behandlung von primären AML-Blasten mit Triphosphat-RNA eine antivirale Immunantwort und Apoptose induziert. In den bisherigen Experimenten wurde ausschließlich die immunmodulatorische Komponente untersucht. Das bifunktionelle Molekül hat neben der beschriebenen immunstimulierenden Komponente auch eine *knock-down*-Funktion. Ob der *knock-down* wachstumsregulierender Gene in primären AML-Zellen möglich ist, soll im Folgenden gezeigt werden.

Es wurden siRNAs gegen die Gene *Polo-like kinase 1* (PLK1), *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) und *bromodomain-containing 4* (BRD4) verwendet.

Zusammenfassend sind alle diese Gene relevant für die unkontrollierte Vermehrung von AML-Zellen. Diese drei Zielgene wurden aus praktischen Gründen gewählt, da Vorarbeiten in AML-Zellkulturen (60) einen relevanten wachstumshemmenden Effekt von siRNAs gegen diese Gene zeigten. PLK1 ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, welche eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, insbesondere während der Mitosephase (74). FLT3 ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche an mehreren Signalkaskaden im Bereich von Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Sie stellt somit eine zentrale Zielstruktur bei AML-Zellen dar, Mutationen treten bei 30% der neu diagnostizierten AML-Erkrankungen auf (75). BRD4 gehört zur Familie der *Bromodomain und Extraterminal* (BET) Proteine. Es reguliert unter anderem die Genexpression (76).

Um einen Einfluss der Art der Triphosphat-Modifikation und von Sekundärstrukturen auf den *knock-down* zu untersuchen, wurden siRNA mit unterschiedlichem Aufbau verwendet. Bei Herstellung von synthetischer siRNA kann am 5'-Ende u.a. ein Triphosphat (3p)- oder OH-Molekül vorliegen. Anschließend können zwei modifizierte siRNA-Einzelstränge ligiert werden. Da für die Bifunktionalität mindestens eine 5'Triphosphatgruppe enthalten sein muss, können entweder zwei 3p-modifizierte siRNA (3p3p) oder eine 3p-modifizierte mit einer OH-modifizierten siRNA (3pOH) ligiert werden. Zum Ausschluss von Effektmodifikationen durch die Sekundärstruktur wurden

siRNA mit Haarnadelstruktur (*hairpin*, abgekürzt hp) eingesetzt. (Abb. 9) Im Einzelnen verwendeten wir eine *hairpin*-siRNA mit der Sequenz PKL (3pPLK1) und siRNA aus ligierten Einzelsträngen der Sequenzen FLT3 und BRD4 (3p3p FLT3, 3pOH FLT3, 3p3p BRD4, 3pOH BRD4). Verglichen wurden sie zu nicht-stimulierenden siRNAs der gleichen Sequenz (siPLK1, siFLT3, siBRD4). Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion (RNAiMax, Lipofectamin 2000).

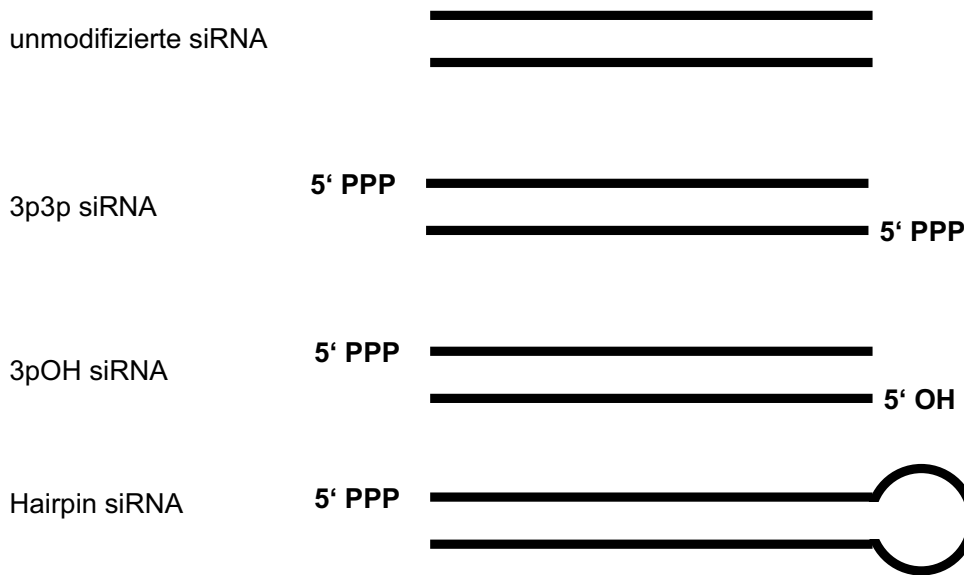


Abbildung 9. Unterschiedliche Modifikationen und Sekundärstrukturen der bifunktionellen siRNAs

Insgesamt zeigt sich in fast allen Bedingungen ein schwacher *knock-down* durch die verwendeten siRNAs. Durch 3pPLK, 3p3p FLT3 und siBRD4 konnte ein signifikanter *knock-down* erreicht werden (Abb. 10 A-C). Durch Nukleofektion konnte kein *knock-down* erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

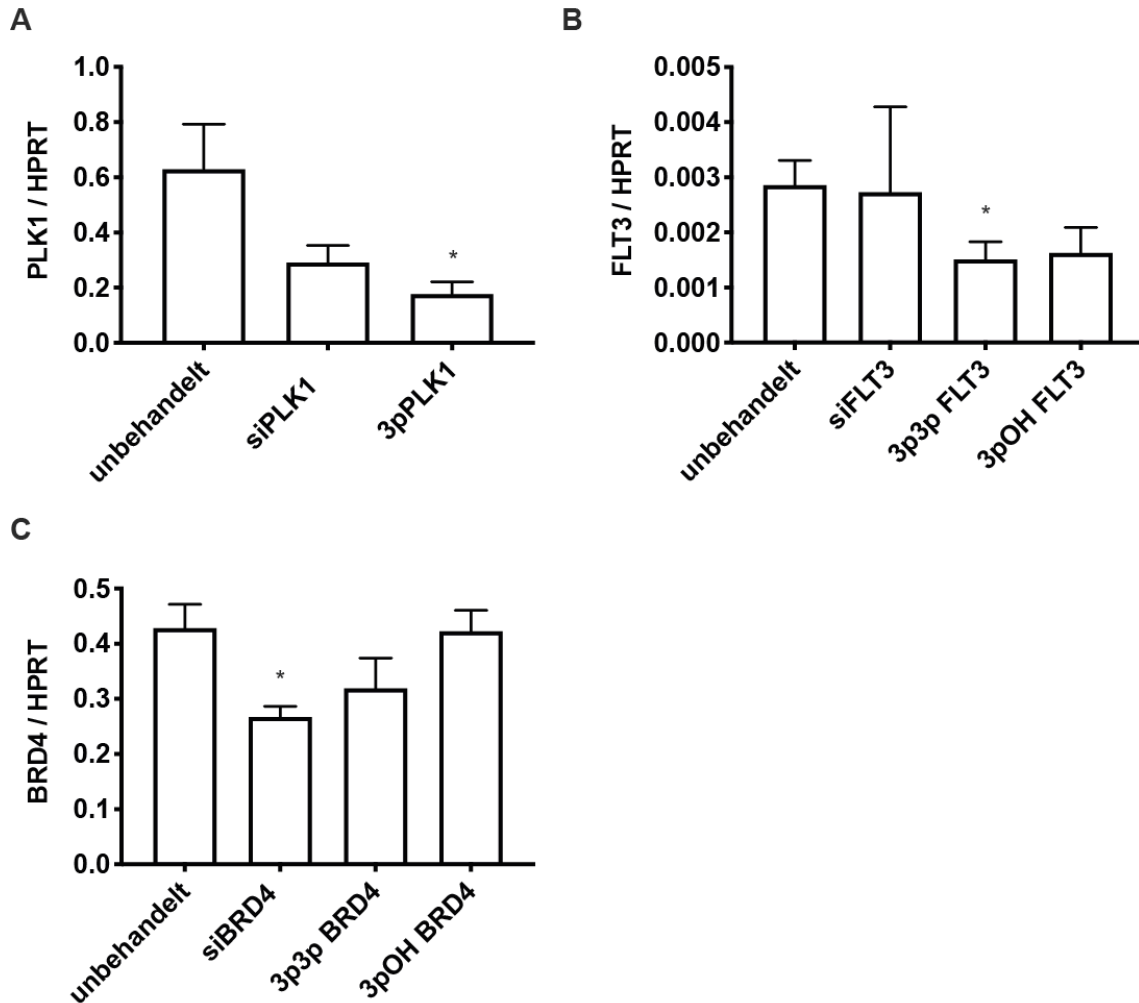


Abbildung 10. Knock-down von PLK1, FLT3 und BRD4 in primären AML-Blasten

In primären AML-Blasten wurde ein *knock-down* von PLK1 (A), FLT3 (B) und BRD4 (C) durchgeführt. Die siRNAs wurden in der Konzentration 1,7 µg/ml durch Lipofectamin 2000 in die Zellen eingebracht. Nach 24 h Inkubationsdauer wurde das Expressionslevel mittels q-PCR bestimmt.

Die Diagramme zeigen die Daten von drei unabhängigen Experimenten, der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. Zur Bestimmung der Signifikanzniveaus wurde ein one-sided, unpaired t-Test eingesetzt. Alle Bedingungen wurden mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. * = $p \leq 0,05$

Neben dem *knock-down* Leukämie-relevanter Zielgene durch bifunktionelle ppp-siRNAs *in vitro*, wurde im Folgenden die immunstimulatorische Kapazität der synthetisierten bifunktionellen siRNAs geprüft. Es wurden nicht stimulierende siRNAs sowie bifunktionelle 3p-modifizierte siRNAs verwendet. Die Sequenz der siRNAs richtete sich gegen die im Vorversuch beschriebenen, wachstumsregulierenden Gene. Es wurde zunächst die Freisetzung von IP-10 gemessen und anschließend die Veränderung der Expression der Gene von RLR, Interferon und ISG bestimmt.

Ergebnisse

Die IP10-Ausschüttung zeigte sich gering bei Verwendung einer nicht-stimulierenden siRNA. Die bifunktionellen 3p-modifizierten siRNAs induzierten eine signifikante IP-10 Freisetzung, deren Höhe mit der Freisetzung nach Virusinfektion der Zelle vergleichbar war. In dieser Untersuchung führte die Art der Modifikation sowie die Sekundärstruktur nicht zu einer relevanten Differenz in der Stimulationskapazität. (Abb. 11 A)

Die Expression der Interferon-stimulierten Gene RIG-I, MDA5, IFN- β und ISG 15 wurde 24h nach Transfektion gemessen. Nach Behandlung mit bifunktionaler ppp-siRNA zeigt sich in fast allen Stimulationsbedingungen eine gesteigerte Expression der untersuchten ISGs. Insbesondere für MDA5 und IFN- β ließen sich auch signifikante Unterschiede zeigen. Nicht stimulierende siRNAs zeigen einen geringen aktivierenden Effekt v.a. auf Ebene der ISG-Expression. Dieser könnte durch die Erkennung von RNA durch die *Toll-Like* Rezeptoren TLR-3,7 und 8 vermittelt sein. (Abb. 11 B)

In der Gesamtschau der dargestellten Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass bifunktionelle ppp-siRNAs in transfizierten AML-Blasten eine deutliche antivirale Immunantwort, ausgehend von einer RIG-I Aktivierung, induzieren.

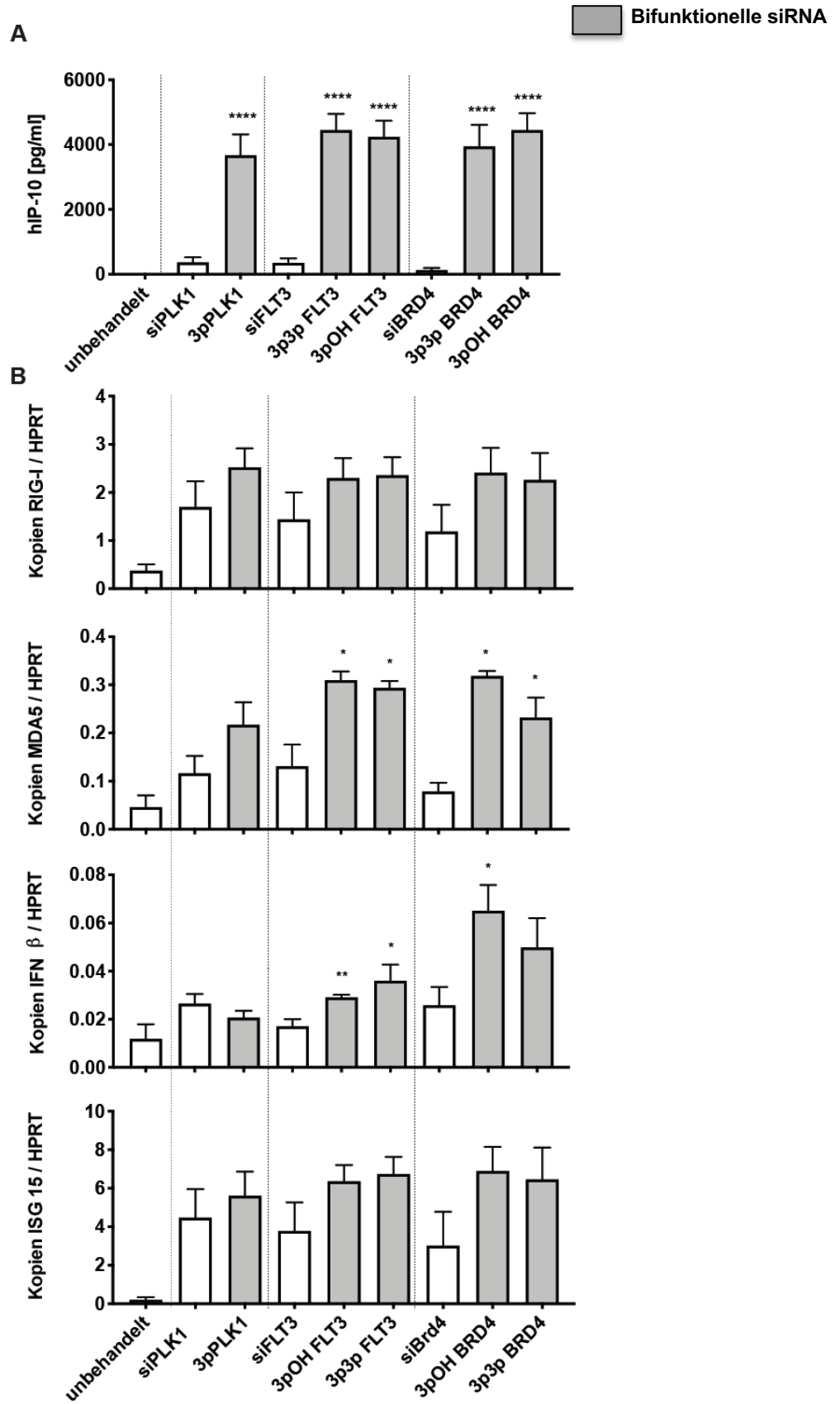


Abbildung 11. Aktivierung des RIG-I Signalwegs in primären AML-Blasten nach Stimulation mit bifunktionellen ppp-siRNA

(A) Primäre humane AML Blasten wurden mit herkömmlicher oder bifunktioneller ppp-siRNA (1,7 ug/ml) mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Nach 24 h wurde IP-10 im Überstand der Zellen mittels Elisa nachgewiesen.

Die Abbildung zeigt die Daten von drei unabhängigen Experimenten, der Standardfehler wird durch die Fehlerbalken dargestellt. Eine Analyse mittels *one-way* Anova mit *Dunnnett's multiple comparisons test* wurde zur Bestimmung der Signifikanzniveaus genutzt. Alle Bedingungen wurden mit der unbehandelten Bedingung verglichen. ****= $p \leq 0,0001$

(B) Die Auswirkung der Stimulation der Blasten auf die mRNA-Expression wichtiger Rezeptoren des RLR-Signalweges wurde mittels q-PCR analysiert. 24h nach Behandlung der Blasten mit herkömmlicher oder bifunktioneller ppp-siRNA wurde die Expression von RIG-I, MDA5 sowie von IFN- β und ISG15 quantifiziert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten einseitigen t-Test berechnet. Bedingungen mit bifunktioneller siRNA wurden jeweils mit der zugehörigen siRNA verglichen. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$

Zur Erfassung des therapeutischen Effekts von bifunktionellen ppp-siRNAs, wurde die Viabilität der Blastenkulturen im Rahmen des oben stehenden Versuches mittels FACS gemessen. Als Positivkontrolle diente Staurosporin. Es zeigte sich eine Reduktion der Zellviabilität nach Anwendung von bifunktioneller ppp-siRNA. Eine Verminderung der Zellviabilität nach Anwendung von siRNA ohne Triphosphatmodifikation war allenfalls minimal. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass über den hemmenden Effekt auf die Zellteilung durch den *knock-down* auf Grund des kurzen Beobachtungszeitraum in diesem Assay keine Aussage gemacht werden kann. (Abb. 12)

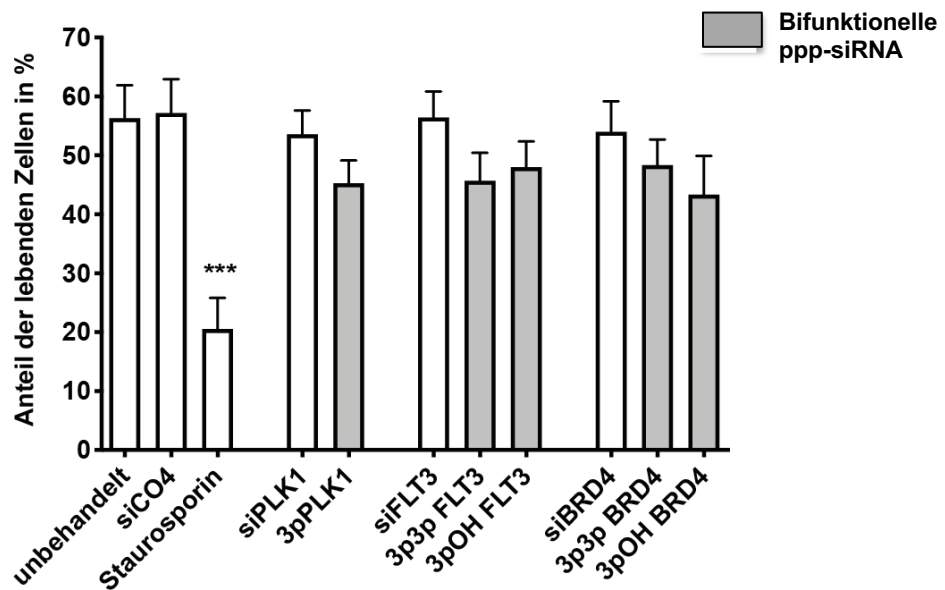


Abbildung 12. Zellviabilität von AML-Blasten 72h nach Behandlung mit triphosphat-modifizierter bifunktioneller siRNA

Die zytotoxische Wirkung der bifunktionellen ppp-siRNAs wurde mittels FACS gemessen. 72 h nach Transfektion der RNAs (1,7 µg/ml, Lipofectamin 2000) wurde der Anteil der lebenden Blasten bezogen auf alle erfassten Einzelzellen bestimmt. Staurosporin 10 µM (4 h) wurde als Positivkontrolle verwendet. Als lebende Blasten wurden Zellen mit Expression von CD33 gewertet, welche negativ für murines CD29 sowie die Zelltodmarker Annexin-PI oder *Annexin Viability Dye* waren. Es werden die Daten von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. In einer *one-way* Anova Analyse mit *Dunnnett's multiple comparisons test* wurden behandelte Zellen zur siCO4-Kontrolle verglichen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *** = $p \leq 0,001$

4. Diskussion

4.1. Ergebnisüberblick

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bifunktionelle ppp-siRNA effektiv gegen humane AML-Zellen *in vitro* sind. Nach Transfektion einer Triphosphat-RNA zeigte sich eine antivirale Immunantwort sowie verstärkte Apoptose. Durch den Einsatz von siRNA gegen wachstumsfördernde Gene (z.B. BRD4, FLT3, PLK1) ließ sich die Geschwindigkeit der Zellvermehrung hemmen. Die gleichzeitige Anwendung beider Komponenten mittels einer bifunktionellen ppp-siRNA mit siRNA-Sequenzen von siBRD4 zeigte einen kumulativen Effekt. Als problematisch erwies sich jedoch die Varianz hinsichtlich Transfizierbarkeit sowie Effektstärke abhängig von der eingesetzten Zelllinie im *in vitro*-Modell (60). Im herkömmlichen *in vitro*-Modell kann die Wirksamkeit des bifunktionellen Moleküls nur teilweise abgebildet werden, da systemische Effekte durch das Immunsystem nicht berücksichtigt werden. Um die Wirksamkeit dieser neuartigen, multimodalen Therapiestrategie für AML zu untersuchen, sind Modelle notwendig, welche die Wirkung der einzelnen Komponenten des bifunktionellen Moleküls und den Gesamteffekt abbilden können. Bisher gibt es keine etablierten Modellsysteme für diese Fragestellung. In der vorliegenden Arbeit werden daher weitere Modelle hinsichtlich der Anwendung von bifunktioneller ppp-siRNA evaluiert. Diese umfassen ein murines Zellkulturmodell (C1498), primäre AML-Blasten sowie ein syngenes Mausmodell (C1498-GFP Zellen in C57BL/6-Mäusen) und zwei Xenograft-Mausmodelle (MV4-11-GFP und Molm13-GFP Zellen in NOD-SCID-Mäusen).

Die Zelllinie C1498 ist eine murine AML-Zelllinie. Übergeordnetes Ziel war es, diese Zelllinie für Therapieversuche in einem *in vivo* Modell einzusetzen. Zu diesem Zweck sollte zunächst die Anwendung und Wirksamkeit der bifunktionellen ppp-siRNA *in vitro* untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die RIG-I Signalkaskade in C1498-Zellen durch eine Virusinfektion aktiviert werden kann, jedoch nicht durch Triphosphat-RNA. In der Zelllinie C1498-GFP zeigte sich nach Applikation von siGFP nur ein geringfügiger *knock-down*, verglichen zur Positiv-Kontrolle Hela-GFP. Diese Ergebnisse standen in Diskrepanz zu den akzeptablen Transfektionseffizienzen, welche mittels FACS unter Anwendung einer 5' Alexa-488-fluoreszenzmarkierten RNA ermittelt wurden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte visualisiert werden, dass die fluoreszierende RNA enthaltenden Liposomen im Wesentlichen an die Zellen angelagert waren. Dadurch kam es im FACS zu einem positiven Signal obwohl keine

zytosolische Aufnahme erfolgt war. Durch die Nachweisbarkeit einer RIG-I Aktivierung sowie des möglichen *knock-down* von GFP erfüllt die Zelllinie C1498 prinzipiell die relevanten Voraussetzungen für eine Therapie mit bifunktionaler ppp-siRNA, hat jedoch durch auf Grund der schlechten Transfizierbarkeit *in vitro* nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

Da *in vivo* andere Transfektionsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, entschieden wir uns für eine Etablierung eines Mausmodells auf Basis der C1498-Zelllinie. Nach Injektion der syngenen C1498-GFP Zellen in C57BL/6 zeigte sich ein akuter Krankheitsverlauf mit schneller Vermehrung der Tumorzellen in Blut und Organen. Der Krankheitsverlauf war bei allen Versuchstieren sehr ähnlich und gut vergleichbar mit humanen AML. In vergleichenden Experimenten mit C1498 ergab sich kein Hinweis auf eine relevante Abstoßungsreaktion der C1498-GFP Zellen durch das Fremdprotein GFP.

Zusätzlich zum murinen Modell wurden zwei Xenograft-Modelle etabliert und der Krankheitsverlauf beobachtet. Die Zelllinien MV4-11-GFP und Molm13-GFP wurden in NOD-SCID-Mäusen implantiert. Die Modelle zeigten einen divergenten Verlauf. MV4-11 Zellen zeigten einen variablen Krankheitsverlauf mit variantem Befallsmuster der Organe. Molm13-GFP hingegen zeigten ein gut vergleichbares und zügiges Anwachsen der Zellen.

Zusätzlich zu den murinen Modellen wurden Experimente an primären, humanen AML-Blasten durchgeführt. Zunächst wurde auch hier die Transfizierbarkeit mit unterschiedlichen Transfektionsmethoden getestet. Durch Nukleofektion und Lipofektion von 5' Alexa-488-fluoreszenzmarkierten RNA konnten im FACS fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden. Die Aktivierung der RIG-I Signalkaskade auf Protein- und mRNA Ebene zeigte sich nur nach Lipofektion, nicht nach Nukleofektion.

Die Aktivierung von RIG-I kann pro-apoptische Signalwege induzieren (22). In AML-Blasten zeigte sich nach der Behandlung mit Triphosphat-RNA eine verminderte Viabilität, diese war jedoch nicht signifikant verglichen zu unbehandelten Zellen und Kontrollen mit nicht-stimulierender RNA.

Besch et al. (22) hatten gezeigt, dass die Proteine Noxa und Puma die apoptotische Wirkung von ppp-RNA vermitteln. In AML-Blasten zeigte sich nach Applikation von Triphosphat-RNA v.a. eine gesteigerte Expression von Noxa. Das Expressionslevel von Puma war gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen.

Auch in AML-Blasten sollte eine mögliche *knock-down*-Komponente untersucht werden. Im Gegensatz zum artifiziellen Zielgen GFP in murinen Zellen können in den AML-Blasten Gene adressiert werden, welche für die unkontrollierte Zellvermehrung einer AML relevant sind. Die verwendeten siRNAs und bifunktionellen ppp-siRNAs hatten unterschiedliche Zielgene und Sekundärstrukturen. Ein schwacher *knock-down* konnte für fast alle eingesetzten siRNAs und bifunktionelle ppp-siRNAs gezeigt werden, bei einzelnen war auch ein signifikanter *knock-down* möglich. Ein Einfluss der Sekundärstruktur zeigte sich nicht. Eine anschließende Untersuchung der bifunktionellen Moleküle hinsichtlich der Aktivierung von RIG-I zeigte eine Immunantwort der AML-Blasten auf mRNA- wie auf Proteinebene.

Abschließend wurde der Effekt von bifunktionellen ppp-siRNAs auf die Viabilität der leukämischen Blasten verglichen zu siRNA untersucht. Hier konnte 24h nach Applikation der bifunktionellen ppp-siRNA eine verminderte Viabilität der Blasten verglichen zur siRNA-Kontrolle gezeigt werden.

Im Rahmen der folgenden Diskussion werden die grundsätzlichen Voraussetzungen für die Anwendung von bifunktioneller ppp-siRNA - Transfizierbarkeit (4.2) und Expression einer funktionellen RIG-I-Kaskade sowie eines Zielgens (4.3) - beleuchtet. Zudem werden Effekte und Besonderheiten der Effektmessung in primären AML-Zellen diskutiert (4.4). Die Aussagekraft der *ex vivo*-Kultur primärer AML-Zellen sowie unterschiedlicher Mausmodelle soll kritisch betrachtet werden (4.5-4.6).

Michael Ruzicka konnte, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, zeigen, dass die Applikation von Triphosphat-RNAs (ohne siRNA-Komponente) im C1498-Mausmodell wirksam ist. Triphosphat-RNAs reduzierten die Tumorlast und führten in einem relevanten Teil der Tiere zu einer vollständigen Remission der AML-Erkrankung mit Bildung eines immunologischen Gedächtnisses (65).

4.2. Transfektion von Leukämiezellen ist problematisch

Ein Mangel an erfolgreichen Transfektionsmethoden stellt aktuell eines der Hauptprobleme von siRNA-basierter Therapie der Leukämie dar (55, 58, 77, 78). Da sich bisher keine Transfektionsmethode als überlegen dargestellt hat, entschieden wir uns, häufig eingesetzte Transfektionsreagenzien sowie Nukleofektion systematisch zu testen und zu vergleichen. Entscheidende Vergleichsgrößen sind Effizienz und die Zellviabilität nach Transfektion. In Arbeiten mit leicht transfizierbaren Zelllinien wird häufig keine Messung der Transfektionseffizienz vorgenommen. Bei der Arbeit mit

schwer transfizierbaren Zelllinien oder primären Zellen wird die Menge der eingebrachten siRNA unterschiedlich abgeschätzt. Entweder indirekt durch die Messung der reduzierten Genexpression auf mRNA-Ebene (55, 79) oder durch die Nutzung von fluoreszierender RNA in einer FACS-Analyse (56, 80, 81). Wir entschieden uns für letzteres und nutzen die Detektion von RNA, welche mit einem synthetischen Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor 488) markiert war.

Wir konnten zeigen, dass einzelne Transfektionsreagenzien sowie Nukleofektion in der Lage sind, eine Alexa-488-positive Zellpopulation in der FACS-Auswertung zu erzeugen. Für die Zelllinie C1498 zeigten sich die Transfektionsreagenzien XtremeGene und RNAiMax am effektivsten. Für die untersuchten Patientenproben mit AML-Blasten erwiesen sich Lipofectamin2000 und RNAiMax als beste Möglichkeit. Auch nach Nukleofektion ließen sich Alexa-488-positive C1498-Zellen und Blasten nachweisen. Für C1498-Zellen zeigten sich in der FACS-Messung Transfektionseffizienzen im Bereich von ca. 20-50% für die getesteten Nukleofektionsprotokolle. Für AML-Blasten zeigte sich bei Lipofektion eine mittlere Transfektionseffizienz von ca. 10%. Bei Nukleofektion konnten Effizienzen von ca. 70% nachgewiesen werden.

In der Literatur gibt es für C1498 keine Vergleichsdaten. Für primäre Leukämiezellen gibt es lediglich drei Arbeiten, welche sich mit Transfektion beschäftigten. Larsen et al. nutzten Nukleofektion und Lipofektion (56) zur Transfektion von primären AML-Blasten. Nach Nukleofektion wurden Transfektionseffizienzen zwischen 23 und 65 % erreicht. In Pilotexperimenten mit Lipofektion konnte keine relevante Transfektion nachgewiesen werden. Die Transfektionseffizienz wurde mittels FACS-Nachweis von gelabelter siRNA ermittelt. Withey et al. (81) arbeiteten mit primären CML-Zellen und dem Lipofektionsreagenz Oligofectamin. Mit fluoreszenzmarkierter siRNA konnte eine Effizienz von 26% gemessen werden, die Abnahme der Expression des anvisierten bcr-abl Transkriptes lag bei ca. 26% auf mRNA-Ebene. Zur Toxizität der Transfektion wurde keine Aussage gemacht. Ein Nanopartikel zum Transport einer siCD44-RNA wurde von Gul-Uludag et al. (82) eingesetzt. Es wurde eine Abnahme der Oberflächenexpression von CD44 auf Patientenproben von 16-20% beobachtet, die Zellviabilität wurde nicht beeinträchtigt.

Überraschend an den in dieser Arbeit erhobenen Daten war, dass sich in C1498 Zellen und primären AML-Zellen trotz der gemessenen Transfektionseffizienzen nur sehr geringe bis keine Stimulations- und *knock-down*-Effekte zeigten. Bei AML-Blasten war dies insbesondere bei Nukleofektion der Fall. Die Diskrepanz zwischen gemessener

Effizienz der RNA-Aufnahme und beobachteter Effektstärke wurde auch von Larsen et al. (56) in humanen Leukämiezelllinien beobachtet. Die Ursache wurde nicht genauer untersucht. Die Autoren nahmen an, dass die Ursache in der verwendeten siRNA oder in der Ausschöpfung der maximal erreichbaren *knock-down*-Kapazität liegen könnte. Withey et al. (81) gingen davon aus, dass es auf Grund von strukturellen Unterschieden zwischen markierten und unmarkierten siRNAs nicht möglich sei, aus Transfektionsexperimenten mit markierter siRNA Rückschlüsse auf die Wirkung nicht-markierter siRNA zu ziehen. Um Klarheit zu schaffen, untersuchten wir die Lage der transfizierten siRNA fluoreszenzmikroskopisch. Es konnte gezeigt werden, dass bei C1498-Zellen durch Lipofektion keine oder nur eine sehr geringe zytoplasmatische Lage der siRNA erreicht werden konnte. Eine FACS-Messung kann eine zytoplasmatische Lage nicht eindeutig erkennen. Auf Grund dieser Ergebnisse halten wir FACS-Messungen in der Nachschau in diesem Setting nicht für geeignet, um die relevante Transfektionseffizienz ins Zytoplasma zu quantifizieren. Sollte die FACS basierte Messung für weiterführende Experimente eingesetzt werden, empfehlen wir die fluoreszenzmikroskopische Korrelation. Zellen nach Nukleofektion wurden nicht fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Es gibt zahlreiche weiterführende Ansätze, um siRNA in Leukämiezellen einzubringen. Die siRNA kann z.B. an Antikörper gekoppelt werden (83, 84). Einen ähnlichen Ansatz verfolgt der TLR9 vermittelte Eintrag von siRNA (85). Zahlreiche Nanopartikel unterschiedlichster Zusammensetzung wurden in ihrer Wirksamkeit geprüft (58, 79, 86). In der Grundlagenforschung spielt auch Elektroporation eine wichtige Rolle (56, 57, 87), ist jedoch für den klinischen Einsatz nicht zielführend. Zum aktuellen Zeitpunkt sind fünf Wirkstoffe auf siRNA-Basis in Europa zugelassen (Givorsiran, Lumasiran, Patisiran, Vutirisan und Inclisiran) (88). Patisiran wird durch einen *lipid nanoparticle* (LNP) transportiert. Die Wirkstoffe Givorsiran, Lumasiran, Vutirisan und Inclisiran werden gebunden an *N-acetylgalactosamine* (GalNAc) durch den vorwiegend hepatischen *asialoglycoprotein*-Rezeptors (ASGPR) endozytiert. Primärer Wirkort ist bei allen Wirkstoffen die Leber (35).

Mehrere Autoren (56, 58) weisen darauf hin, dass die erhobenen Daten möglicherweise nur begrenzt auf andere Leukämiezelllinien bzw. Patienten übertragbar sind. Auf Grund starker Heterogenität der Zellen sehen sie Anhaltspunkte, dass sich die Effizienz eines Trägersystems und der siRNA innerhalb der Subklone einer Leukämie sowie zwischen mehreren Patienten unterscheidet. Somit bestünde die

Gefahr, dass einzelne Patienten nicht von einer Therapie profitieren sowie, dass relevante Subklone innerhalb einer Leukämie nicht erreicht und somit selektiert würden. Dieser wichtige Aspekt konnte in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden. Insbesondere bei den geplanten *in vivo* Arbeiten sollte auf die Entstehung „transfektionsresistenter“ Subklone geachtet werden.

4.3. Eignung von C1498-Zellen und primären AML-Blasten als *in vitro*-Modelle für Anwendung von bifunktioneller ppp-siRNA

Ein *in vitro*-Modell für die Anwendung bifunktioneller ppp-siRNA muss mehrere Kriterien erfüllen. Das Kriterium der Transfizierbarkeit wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt diskutiert. Zusätzlich muss eine intakte RLR-Signalkaskade vorhanden und ein geeignetes Zielgen bekannt sein. In wie fern diese Kriterien von den untersuchten Modellen erfüllt werden, soll im Folgenden diskutiert werden.

Für die murine Zelllinie C1498 gibt es bisher keine Untersuchungen zur Expression und Funktionalität von RIG-I. Für primäre AML-Zellen konnten Li et al. (89) zeigen, dass RIG-I in Knochenmarksproben von 46 AML-Patienten in unterschiedlicher Höhe exprimiert wird, die Funktionalität der Signalkaskade wurde jedoch nicht untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass C1498-Zellen den Rezeptor RIG-I auf Proteinebene exprimieren. Durch Stimulation mit Interferon sowie mit Viren wurde eine Hochregulation von RIG-I erreicht. Das Zytokin IP10 konnte nur nach Infektion mit VSV-M51R nachgewiesen werden. Das Fehlen eines IP-10-Nachweises in den anderen Versuchsbedingungen erklärt sich möglicherweise im Rahmen der fehlenden Aufnahme der RLR-Liganden mittels Lipofektion bzw. unterschiedlichen Kinetik der RLR-Signalkaskade, je nach Stimulus. Zudem stellt VSV-M51R einen höher potenten Stimulus dar, da diese Mutante nicht in der Lage ist, die Interferonproduktion der Zellen zu hemmen. Aus dem Vorhandensein des Rezeptors, der Induzierbarkeit und der IP-10 Freisetzung nach Infektion mit VSV-M51R leiteten wir ab, dass die RLR-Signalkaskade intakt ist. Ähnlich gingen auch Ellermeier et al. (16) vor. Nach Transfektion von siRNA in C1498 konnte mit keiner der getesteten Transfektionsmethoden ein relevanter Effekt erreicht werden. Die Ursache sehen wir im Nachhinein in der fehlenden Aufnahme der RNA ins Zytoplasma, dies wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt dargestellt.

Im Falle der verwendeten primären AML-Zellen (aus zwei Patientenproben) konnte nach Transfektion von Triphosphat-RNA und nach Virusinfektion eine relevante Freisetzung des Chemokins IP10 in den Zellüberstand nachgewiesen werden. Qualitativ vergleichbare Effekte wurden auch in primären Ovarialkarzinomzellen (17) und humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien beobachtet (16, 24).

Auf Ebene der mRNA kam es zur Hochregulation der RIG-I, MDA5, IFN- β und ISG15. In der Zusammenschau der Expressionsdaten mit dem Nachweis von IP10 gehen wir davon aus, dass die zwei untersuchten Patientenproben eine funktionelle RIG-Kaskade exprimieren. Die Veränderung der Expression von IFN- β wurde durch andere Autoren in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht, die Ergebnisse waren ähnlich (24, 25, 37).

Diese Untersuchung stellt eine ausgesprochen kleine Stichprobe dar. Trotzdem gehen wir davon aus, dass AML-Zellen in der Regel eine funktionelle RIG-I Kaskade exprimieren und sich somit für die Therapie mit bifunktionellen siRNA eignen. Diese Annahme beruht darauf, dass für die Entstehung einer AML eine vergleichsweise geringe Anzahl von Mutationen notwendig ist (90) und somit das mathematische Risiko für eine relevante Mutation von RIG-I gering ist. Zudem ist in der Literatur lediglich ein Einzelfallbericht über eine natürlich vorkommende RIG-I Mutation beschrieben (91).

In allen Experimenten mit primären AML-Zellen zeigten sich unterschiedlich stark ausgeprägte unspezifische Reaktionen nach Transfektion einer nicht-stimulierenden siRNA (OH-CO4, siFLT3, siBRD4, siPLK). Dies ist möglicherweise durch eine Aktivierung von TLR3 und TLR7/8 bedingt. Diese führen zu einer Ausschüttung Typ I Interferonen, die ihrerseits zu einer Hochregulierung der RLR-Signalkaskade führen (92).

AML-Blasten und C1498-Zellen zeigen somit beide eine funktionelle RLR-Signalkaskade, die Induzierbarkeit durch die Transfektion von Triphosphat-RNA konnte jedoch lediglich für primäre AML-Zellen hinreichend gezeigt werden.

Der Effekt der bifunktionellen siRNA soll, neben der Aktivierung von RIG-I, auch durch den *knock-down* von *driver*-Mutationen entstehen. In C1498-Zellen ist zum aktuellen Zeitpunkt keine *driver*-Mutation bekannt. Um trotzdem den Effekt einer bifunktionellen siRNA in dieser Zelllinie quantifizieren zu können wurde die Zelllinie C1498-GFP hergestellt. Diese ermöglicht *knock-down*-Experimente von GFP durchzuführen und den Effekt durch eine Abnahme der grünen Fluoreszenz im FACS zu messen. In den von uns durchgeführten Experimenten war der Effekt jedoch maßgeblich durch die

geringe Transfektionseffizienz limitiert. *Driver*-Mutationen stellen pathophysiologisch eine hochattraktive Zielstruktur dar. Es ist jedoch zu erwarten, dass auch der *knock-down* von Targets, welche nicht auf die AML-Zelle beschränkt sind, wie z.B. des *programmed death-ligand 1* (PD-L1) oder des *transforming growth factor β* (TGF- β), zu guten Effekten führt.

In primären AML-Blasten werden *driver*-Mutationen bereits regelhaft im Rahmen der klinischen Routine bestimmt. Das Risikoprofil des Patienten wird u.a. durch diese Mutationen bestimmt. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass sich das Zellwachstum von AML-Zelllinien durch Einsatz einer siRNA gegen das mutierte Gen hemmen lässt. Der Effekt der siRNA-Behandlung von primären Blasten soll im folgenden Gliederungsabschnitt diskutiert werden.

Ein relevanter Vorteil der primären AML-Zellen im Vergleich zu Zelllinien ist, dass diese nach Entnahme aus dem Patienten keinerlei zusätzliche Mutationen oder Adaptation an Zellkultur erlangen können. Ben-David et al. (93) untersuchte häufig verwendete Tumorzelllinien. Sie konnten zeigen, dass Zelllinien in Kultur genetische Veränderungen erfahren. Diese können die Genexpression beeinflussen und zu veränderter Zellmorphologie, Proliferation sowie Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika innerhalb einer Zelllinie führen.

Zusammenfassend haben beide Modelle einen intakten RLR-Signalweg und eignen sich daher grundsätzlich für die Untersuchung eines RIG-I Liganden. Die geringe (zytoplasmatische) Transfektionseffizienz von C1498-Zellen schränkt jedoch die Nutzung dieses Modelles für die *in vitro* Testung von Wirkstoffen auf der Basis von siRNA oder RIG-I Liganden stark ein. Da *in vivo* andere Transfektionsmethoden zur Verfügung stehen, ist die Zelllinie auf Grund ihrer Vorteile als syngenes Mausmodell (siehe Abschnitt 4.6) für *in vivo* Experimente, wenn auch mit deutlichen Limitationen, einsetzbar.

In AML-Blasten waren die Ergebnisse für Stimulation und *knock-down* deutlich vielversprechender verglichen zu C1498. Primäre AML-Zellen stellen zudem das klinisch relevantere *in vitro*-Modell dar, sie bilden die akute Krankheitssituation eines Patienten erheblich besser ab als ein murines Modell mit artifizieller Mutation.

4.4. Effekt von bifunktionellen siRNAs in *ex vivo* kultivierten primären AML-Blasten

Bifunktionelle ppp-siRNAs zeigten sich bereits in einigen Forschungsarbeiten als vielversprechende neue Option in der Immuntherapie von Tumoren. Angesichts der Vielfalt der molekularen Treiber innerhalb der akuten myeloischen Leukämien hat RNA-Interferenz ein hohes Potential in der personalisierten Therapie (78). Die in primären AML-Zellen beobachteten Effekte im Hinblick auf *knock-down*-Kapazität, Apoptoseinduktion und Viabilität sollen im Folgenden mit *in vitro* Daten anderer Tumorentitäten verglichen werden.

Zunächst untersuchten wir die *knock-down*-Kapazität von bifunktionellen siRNAs unterschiedlicher Sequenz, Sekundärstruktur und Modifikation in primären AML-Zellen. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine unbefriedigende Effizienz. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression, verglichen zu unbehandelten Zellen, ließ sich lediglich für ein einzelne bifunktionelle ppp-siRNA zeigen. Die bisher gezeigten Daten sprechen dafür, die Ursache am ehesten in der Transfektionseffizienz und nicht in der Sequenz, Modifikation oder Sekundärstruktur zu suchen. Zudem zeigten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit den gleichen bifunktionellen ppp-siRNAs ein befriedigendes Ergebnis in anderen AML-Zelllinien (60).

Die Aktivierung von RIG-I kann interferonabhängig und interferonunabhängig zur Induktion von Apoptose führen (28). Es gibt Hinweise, dass Tumorzellen sensitiver für den interferonunabhängigen Weg sind (22, 94). Wu et al. stellen dar, dass noch nicht alle Faktoren der RIG-I abhängigen Apoptose bekannt sind (28). Welche Apoptoseform in AML-Zellen nach RIG-I-Aktivierung führend ist, ist bisher nicht bekannt. Dengzhe et al. (23) konnten zeigen, dass die intrinsische Apoptose in den AML-Zelllinien HL-60/Adr und K562/Adr eine wichtige Rolle spielt. Die intrinsische Apoptose wird durch *BH3-only* Proteine der Bcl-2 Familie vermittelt. Genauere Untersuchungen der Bcl-2 Familie erfolgten durch Besch et al. (22). Sie konnten zeigen, dass RIG-I Aktivierung zur Hochregulation von Noxa und Puma führt. Der Einfluss auf andere Proteine (Bim, Bik, Bad, Bid und Hrk) war deutlich geringer bis nicht vorhanden.

Analog zu Besch et al. untersuchten wir die Expressionsveränderungen von Noxa und Puma. In den von uns untersuchten primären AML-Zellen zeigte sich nach Stimulation mit Triphosphat-RNA eine signifikante Erhöhung von Noxa, jedoch nicht von Puma. Die Aktivierung von Puma ist in Melanomzellen streng abhängig vom Tumorsuppressor p53 (22). Möglicherweise ist die fehlende Reaktion von Puma durch diese

Abhängigkeit bedingt: 7% der neudiagnostizierten akuten myeloischen Leukämien sind p53-mutiert, bei Leukämien mit komplexen Karyotyp beträgt der Anteil fast 60% (95). Eine *loss-of-function* von p53 Mutation könnte die Hochregulation von Puma verhindern. Auch Matsushima-Miyagi et al. (96) sahen keine Veränderung der Expression von Puma nach RIG-I Aktivierung in Prostatakarzinomzellen. In Melanomzellen war die Ausprägung der Apoptose unabhängig von Puma (22). Passend zu diesen Ergebnissen konnten zwei Autoren zeigen, dass die RIG-I induzierte Apoptose unabhängig vom p53-Mutationsstatus ist (16, 22).

Die Noxa-Expression der untersuchten Patientenprobe verdoppelte sich nach Transfektion von Triphosphat-RNA. In humanen Melanomzelllinien wurde nach Transfektion von Triphosphat-RNA ein Anstieg von Noxa und Puma um ca. das 5-fache beobachtet (22). Im murinen Pankreaskarzinom wurde ein ungefähr 2 bis 4-facher Anstieg beider Proteine festgestellt (16). In primären Ovarialkarzinomzellen zeigte sich ein Anstieg von Noxa um das 10 bis 20-fache, die Ergebnisse zeigten relevante Differenzen zwischen den beiden untersuchten Patientenproben.

Nachdem lange Unklarheit über den genauen Ablauf der RIG-I induzierten Apoptose bestanden hatte, zeigten Böhmer et al. in Melanomzellen (27), dass die triphosphatinduzierte Apoptose ein zweistufiger Prozess ist, welcher aus einer RIG-I-abhängigen Initialisierungsphase und einer RNase L-abhängigen Effektorphase besteht. In der Initialisierungsphase kommt es u.a. zur Hochregulation von Noxa, welches essenziell, jedoch nicht ausreichend zur Induktion von Zelltod ist. Erst durch die Aktivität des OAS/RNase L Systems wird ein Translationsstillstand ausgelöst, welcher zu intrinsischer Apoptose führt. Inwiefern PUMA eine Rolle in der Apoptoseinduktion spielen könnte, wird in der genannten Arbeit nicht ausführlich diskutiert. Die Autoren räumen ein, dass auch zelltypspezifische Rezeptorrepertoires zu einer Variabilität im Ablauf der Zelltodinduktion führen könnten.

In der Zusammenschau ergeben sich aus den gezeigten Daten Hinweise, dass auch in primären Blasten die intrinsische Apoptose, vermittelt durch Noxa, nach RIG-I Aktivierung eine wichtige Rolle spielt. Zur genaueren Einordnung müssten weitere Experimente z.B. analog Böhmer et al. (27) durchgeführt werden

Blasten zeigten nach Transfektion von Triphosphat-RNA eine verminderte Viabilität, verglichen zu unbehandelten Kontrollen, jedoch ohne Signifikanz. In der Kontrollbedingung mit nicht stimulierender siRNA war keine unspezifische Reaktion nachweisbar. Kübler et al. (17) beobachtete in Kulturen primärer Ovarialkarzinomzellen bei ähnlicher Konzentration der Triphosphat-RNA auch lediglich

eine geringfügige Zunahme der Apoptose. Ein größerer Effekt zeigte sich bei Anwendung in humanen Zelllinien von Lungen- und Pankreaskarzinom, bei ähnlichen oder geringeren Konzentrationen der Triphosphat-RNA. Es wurden Konzentrationen von 1-2 µg/ml über 48h eingesetzt und eine Zunahme von apoptotischen Zellen von ca. 10-25% beobachtet (16, 37). Die schlechte Transfizierbarkeit primärer Zellen im Vergleich zu Zelllinien könnte eine Ursache für die Differenz der Effekte sein. Besch et al. (22) beobachtete einen pro-apoptischen Effekt von 3p-RNA in humanen Melanomzelllinien, zwischen den einzelnen Zelllinien bestanden jedoch deutliche Unterschiede in der Effektstärke. Zusammenfassend ergeben sich in dieser Arbeit deutliche Hinweise auf einen pro-apoptischen Effekt der Therapie mit Triphosphat-RNA. Auf Grund der hohen Variabilität der Effektstärke müssten weitere Patientenproben untersucht werden, um eine verallgemeinerbare Aussage zu treffen.

Das bifunktionelle ppp-siRNA Molekül sollte durch das Stilllegen einer *driver*-Mutation einen additiven Effekt, verglichen zur reinen RIG-I Aktivierung, aufweisen. Dengzhe et al. beobachteten einen verstärkten Effekt in AML-Zelllinien (23). Meng et al. (38) wiesen eine gesteigerte Wirkung in Glioblastomzelllinien und im Pankreaskarzinom nach. In den untersuchten primären AML-Blasten war zwar eine Abnahme der Zellviabilität nach Triphosphat-RNA sichtbar, ein additiver Effekt durch die siRNA-Komponente konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gesamtbild mit den oben gezeigten Daten zur geringen *knock-down*-Kapazität ist dieses Ergebnis stimmig. Zudem bildet die Auswertung mittels des verwendeten FACS-Assays in erster Linie die Apoptose-fördernde Wirkung der eingesetzten siRNAs ab. Ein längerfristiger wachstumshemmender Effekt kann nicht überprüft werden. Dies wäre eine relevante Fragestellung für weiterführende Experimente. Um die Wirkung der adaptiven Immunantwort nach Therapie mit bifunktionellen siRNAs abzuschätzen, könnte zusätzlich eine Kokultur mit mononukleären Zellen (PBMC) erfolgen.

Die Datenlage für Therapie mit RNA-Interferenz in Leukämien ist vielversprechend (23, 58, 78). Unsere Ergebnisse konnten keinen Wirksamkeitsnachweis für RNA-Interferenz in primären AML-Zellen erbringen. Dies ist wohl in erster Linie auf die geringe Transfektionseffizienz zurückzuführen. Auf Grund der deutlichen Effekte der Immunstimulation durch Triphosphat-RNA und der Option auf eine spezifische Therapie durch siRNAs sollte der Ansatz von bifunktioneller siRNA trotzdem weiterverfolgt werden.

4.5. Aussagekraft von Therapieversuchen in ex vivo-Kulturen von primären AML-Blasten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit primären AML-Zellen wurden in einer Sonderform des in vitro Versuches durchgeführt. Es handelt sich um eine *ex vivo*-Kultur von primären AML-Zellen mit einer Schicht muriner Feederzellen. Diese Stromazellen geben den nicht-adhären AML-Zellen ein Gerüst und sekretieren Zytokine, zudem wird ein Medium mit Zusatz von Zytokinen verwendet. Dies ermöglicht eine Kultivierung der Zellen über bis zu 5 Wochen (67).

Cucchi et al. diskutiert in seinem Review (97) unterschiedliche Techniken der *ex-vivo* Kulturen primärer AML-Zellen mit ihren Vor- und Nachteilen. Der Autor beschreibt die Vorteile von primären AML-Zellen verglichen zu Zelllinien: Zelllinien akquirieren im Rahmen der üblichen Zellkultur eine Reihe an Mutationen wohingegen AMLs als mutationsarme Tumorerkrankung gelten. In Zelllinien ist von einer genetisch homogenen Zellpopulation auszugehen, eine humane AML hingegen weist funktionell unterschiedliche Subklone auf (98). Als zusätzlicher Kritikpunkt wird angeführt, dass die Anzahl der verfügbaren AML-Zelllinien gering ist. Auf Grund dieser relevanten Differenzen wurden unterschiedliche Methoden entwickelt um primäre AML-Blasten *ex vivo* zu kultivieren. Zu diesen Methoden gehören Kultur von Suspensionszellen, Kokultur von primären Blasten mit Endothel- oder Stromazellen (sog. *Feeder*-Zellen) und 3D-Kulturen. All diesen Methoden ist eine hohe Variabilität zwischen den Experimenten und unterschiedlichen Forschungsgruppen gemein. Zudem wurde festgestellt, dass das Ansprechen auf Medikamente abhängig von der verwendeten Kulturmethode ist.

Die hohe Variabilität führt der Autor im Allgemeinen auf Unterschiede bei der Wahl der primären Probe, der Kulturtechnik und der Auswertung zurück. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden primäre Proben genutzt, welche im Rahmen von Leukaphoresen angefallen waren. Diese Therapie wird im Ausnahmefall bei Patienten mit sehr hohem Blastenanteil im Blut und drohenden oder bereits bestehenden Zeichen von Leukostase angewandt (42). Eine so ausgeprägte Proliferation der Blasten spricht für einen aggressiven Krankheitsverlauf, somit werden mutmaßlich aggressivere Leukämieformen selektiert. Eine weitere Aufreinigung der Zellen erfolgte nicht, nach Leukaphorese bestand ein Blastenanteil von >95% bzw. 91%. Die verbleibenden nicht-blastären Zellen könnten einen Einfluss auf die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen haben. Die Zusammensetzung des Kulturmediums mit Zusätzen wurde auch von anderen Autoren erfolgreich eingesetzt (67, 99, 100). Bisher wurde

jedoch nicht untersucht, ob durch die Zusammensetzung des Mediums und insbesondere der enthaltenen Zytokine Subklone selektiert werden.

Im speziellen Fall der *ex-vivo* Kultur mit *Feeder*-Zellen sieht der Autor relevante Einflüsse durch die Wahl der *Feeder*-Zellen. Je nach Zellart werden unterschiedliche Zytokine produziert, welche Auswirkungen auf Proliferation und Überleben der Blasten haben. Der Autor bezieht sich auf nicht-bestrahlte Zellen, in wie fern dies bei bestrahlten *Feeder*-Zellen zutrifft wurde nicht untersucht. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Feeder*-Zellen die Sensitivität der AML-Blasten auf Therapeutika verändern, verglichen zu Zellkulturen ohne *Feeder*-Zellen und auch abhängig von den verwendeten *Feeder*-Zellen. Wir hatten den Verdacht, dass *Feeder*-Zellen Einfluss auf die Transfizierbarkeit der AML-Zellen haben könnten. *Feeder*-Zellen führen zu einer Adhärenz der Blasten an der Kulturplatte und adhärenz Zellen sind im Allgemeinen leichter zu transfizieren.

Im Review werden noch andere, deutlich komplexere, Kulturmethoden (z.B. 3D-Kulturen) diskutiert. Cucchi et al. schreibt jedoch, dass das Modell der *ex vivo*-Kultur primärer Zellen auf *Feeder*-Zellen zwar noch weiterer Untersuchung bedarf, es jedoch möglicherweise einen optimalen Kompromiss zwischen einer relativ einfachen Methodik und einer angemessenen Widerspiegelung der *in vivo* Verhältnisse darstellen könnte.

Die unmittelbare Umgebung von Leukämiezellen im Knochenmark, wird auch als *Tumor-Microenvironment* bezeichnet. Diesem wird eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf von Leukämien sowie in der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapie zugeschrieben (101, 102). Inwiefern das Knochenmark als *Tumor-Microenvironment* der AML in unterschiedlichen *in vitro*- und *in vivo*- Modellen der AML abgebildet wird, diskutieren Dhami et al. (103) in ihrem Review. Ein Modell von Griessinger et al. (99) wurde hervorgehoben. Griessinger et al. untersuchten in einem einfachen Modell den Einfluss des Knochenmarks auf die Medikamentenresistenz von AML-Zellen. Ihre Ergebnisse waren vergleichbar mit Untersuchungen im murinen *in vivo* Modell. Dhami et al. zieht daraus die Schlussfolgerung, dass möglicherweise nicht alle Funktionen des Knochenmarks in einem Modell abgebildet werden müssen, um valide Ergebnisse in Therapieversuchen zu erreichen. Das von Griessinger et al. verwendete Modell deckt sich in den meisten Aspekten mit der in dieser Arbeit eingesetzten Methodik. Hauptunterschiede waren, dass in der vorliegenden Arbeit bestrahlte *Feeder*-Zellen eingesetzt wurden und die Zellkultur bei 20% O₂, statt 3% O₂ kultiviert wurde. Das Verhältnis von AML- und *Feeder*-Zellen wurde bei Griessinger et

al. nicht angegeben. Auch bei geringen Unterschieden zum beschriebenen Modell, gehen wir davon aus, dass die Aussagekraft und Relevanz der in diesem Rahmen generierten Daten vergleichbar hoch ist. Vor dem Hintergrund des *Tumor-Microenvironment* schätzen wir die Aussagekraft der hier erhobenen Daten höher ein als Daten aus Experimenten ohne *Feeder*-Zellen. Diese Modelle hinsichtlich der Vergleichbarkeit anhand von murinen *in vivo* Modellen zu validieren, wie von Griessinger et al. durchgeführt, ist eine nachvollziehbare Option. Eine andere Option das Modell zu validieren, wäre die Behandlung von *ex-vivo* kultivierten Blasten mit den üblichen Chemotherapeutika und der Abgleich des Therapieansprechens mit dem des betreffenden Patienten unter Chemotherapie.

4.6. Eignung unterschiedlicher Mausmodelle der AML als *in vivo*-Modelle für die Anwendung von bifunktioneller siRNA

In den vorhergehenden Abschnitten wurden ausführlich die Ergebnisse der Anwendung bifunktioneller ppp-siRNA in Zellkulturen *in vitro* dargestellt und diskutiert. Zusätzlich zur Untersuchungen *in vitro* in Zellkulturen war die Evaluierung von bifunktioneller ppp-siRNA auch *in vivo* im Tiermodell vorgesehen. Wir entschieden uns dafür, im Mausmodell zu arbeiten. Zunächst sollte ein geeignetes Tiermodell gewählt und etabliert werden. Das ideale Modell für die Untersuchung von bifunktioneller ppp-siRNA wäre ein immunkompetentes Tier, welchem eine syngene AML transplantiert werden kann. Die transplantierte Zelllinie sollte ähnliche Wachstums- und Verteilungseigenschaften wie eine humane AML ausweisen, sowie klinisch einen ähnlichen Krankheitsverlauf aufweisen. Zudem sollte sie molekulargenetisch einer humanen AML ähnlich sein, insbesondere im Vorhandensein ähnlicher *driver*-Mutationen, um die Translatierung des Therapieprinzips zu erleichtern. Ein solches perfektes Modell war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht verfügbar (104, 105). Im Folgenden sollen die untersuchten Mausmodelle im Hinblick auf die Eignung für Therapieversuche mit bifunktioneller ppp-siRNA diskutiert werden.

Für den therapeutischen Effekt von Triphosphat-RNA ist, neben dem immunogenen Zelltod, die Induktion einer adaptiven Immunantwort analog einer endogenen Vakzine ein entscheidender Faktor für die Wirksamkeit der Therapie. Dieser Effekt lässt sich ausschließlich in einem immunkompetenten Modell untersuchen. Zu diesem Zweck kann in einer immunkompetenten Maus eine Leukämie induziert werden. Dies erfolgt

z.B. durch Transplantation einer syngenen Zelllinie in eine immunkompetente Maus oder im Xenograft-Modell durch Rekonstitution eines Immunsystems. Diese sogenannte „Humanisierung“ ist jedoch sehr komplex, teuer und zeitaufwendig. Da zunächst das „*proof of concept*“ geplant war, entschieden wir uns zunächst ein einfaches, syngenes Modell zu nutzen. Wir setzten die Zelllinie C1498-GFP nach systemischer Gabe über die Schwanzvene in C57BL/6 Mäuse ein. Durch die GFP-Markierung war hierbei eine einfache Quantifizierung der Leukämielast möglich.

Die Zelllinie C1498 wurde bereits von anderen Autoren zur Induktion einer AML in C57BL/6 Mäusen genutzt. Einige Autoren nutzten sie dabei durch subkutane Implantation als solides Tumormodell (106-109) andere als Leukämiemodell (109-112). Auch ein intraperitoneales Wachstum ist möglich (110, 113). Alle erwähnten Arbeiten, mit Ausnahme der Untersuchung von Goldie et al. (113), untersuchten tumorimmunologische Fragestellungen.

Die Tumorentität der C1498-Leukämie im Mausmodell ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Sie wurde als myelomonozytäre (110); und NK-Zell Leukämie (114) klassifiziert. Die aktuellste Arbeit von Mopin et al. (115) legt sich unter Einbeziehung früherer Arbeiten auf eine Klassifikation als myelomonozytäre Leukämie fest. Die myelomonozytäre Leukämie ist mit einer Häufigkeit von 20-30% (116) eine der häufigsten AML-Formen des Erwachsenen. Somit bildet dieses Modell eine klinisch relevante Unterform der AML ab.

Wir konnten zeigen, dass C1498-Zellen eine funktionelle RIG-I Kaskade exprimieren. Auf Grund der schlechten Transfizierbarkeit für RNA war jedoch kein Wirksamkeitsnachweis der bifunktionellen siRNA *in vitro* möglich. Trotz dieser Limitation entschieden wir uns, die C1498 Zelllinie als einzige zur C57BL/6-Maus syngene AML-Zelllinie als Modell für die Wirksamkeit von Triphosphat-RNA weiter zu verfolgen. Einerseits stehen im Mausmodell andere Transfektionsreagenzien zur Verfügung, andererseits können durch die systemische Gabe der bifunktionellen siRNA neben den Tumorzellen selbst auch andere Targetzellen eine systemische antivirale Reaktion auslösen, die dann indirekt zu einer T-Zell-vermittelten Antitumorantwort führen. Anstatt *driver*-Gene der Leukämiezellen zu adressieren, wäre es möglich, siRNAs zu verwenden welche in immunmodulierende Signalwege des Knochenmarks eingreifen. Ähnlich gingen bereits Ellermeier et al. mit einer bifunktionellen ppp-siRNA bei murinen Pankreaskarzinomen vor, welche sich gegen TGF- β richtet (16). Bei systemischer Therapieanwendung ist somit ein

immunstimulatorisch wirksamer Effekt ggf. auch unabhängig von einer erfolgreichen Transfektion der AML-Zellen zu erreichen.

Zwei Arbeiten setzten sich mit der Immunogenität der C1498-Leukämie *in vivo* auseinander. Graham et al. (117) beobachtet eine starke granulozytäre Reaktion nach steriler Transplantation der C1498-Zellen. Daraus wird abgeleitet, dass C1498-Zellen von C57BL/6 geringgradig als fremd erkannt werden. Driss et al. (118) untersuchte bei Subklonen der Zelllinie die Tumorentwicklung und Immunreaktion der Empfänger. Je nach Subklon änderte sich die Aggressivität der Erkrankung, gegen einzelne Subklone konnten die Mäuse eine suffiziente T-Zell-Antwort entwickeln und überlebten die Erkrankung. Somit lässt sich vermuten, dass die Zelllinie C1498 eine eher hohe Immunogenität hat. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ein „*proof of concept*“ in diesem Modell gut durchführbar ist. Jedoch werden immuntherapeutische Effekte in diesem Modell möglicherweise überschätzt.

Der Krankheitsverlauf im Modell sollte einer humanen AML möglichst ähnlich sein. Die unbehandelte humane AML hat einen sehr raschen Krankheitsverlauf mit schlechter Prognose (119). Eine Organinfiltration ist häufig. In Autopsiestudien an AML-Patienten zeigten sich eine Leberinfiltration bei ca. 35% der Patienten sowie eine Lungeninfiltration bei 25% (120). Eine Hepato- oder Splenomegalie trat bei je ca. 10% der Patienten auf (121). Extramedulläre Manifestationen sind bei der myelomonozytären AML besonders häufig (42), eine Knochenmarksinfiltration ist Teil der Diagnosekriterien und liegt somit zum Zeitpunkt der Diagnose bei allen Patienten vor. Das C1498-Modell zeigt einen akuten Krankheitsverlauf, die Tiere versterben 20-22 Tage nach Transplantation. Eine Organinfiltration sowie eine Hepatosplenomegalie ist regelmäßig vorhanden. Der klinische Krankheitsverlauf der murinen C1498-Leukämie ist somit der humanen (myelomonozytären) AML sehr ähnlich und somit ein gut geeignetes Modell.

Ein entscheidender Unterschied zwischen der humanen AML und der C1498-Leukämie besteht im Wissen über aufgetretene *driver*-Mutationen. Eine solche Mutation lässt sich mit den aktuellen diagnostischen Möglichkeiten bei ca. 97% der Patienten feststellen (122). Über *driver*-Mutationen in der Zelllinie C1498 ist nichts bekannt. Somit ist es in diesem Modell nicht möglich, den wachstumshemmenden Effekt einer siRNA gegen eine definierte Mutation zu messen. Es lässt sich also nur ein Teileffekt der bifunktionellen siRNA untersuchen. Ein Nachweis einer funktionellen RNA-Interferenz in diesem Modell wäre jedoch möglich, indem siRNA gegen das

artifiziiell exprimierte GFP-Protein eingesetzt wird. Der Therapieerfolg könnte durch eine Abnahme der grünen Fluoreszenz im FACS quantifiziert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es sich beim C1498-Modell um ein Modell für eine häufige Form der AML handelt und der klinische Verlauf im Tiermodell gut abgebildet ist. Aufgrund der erhöhten Immunogenität ist sie für tumorimmunologische Fragestellungen gut geeignet.

Da sich das C1498-Modell nur bedingt eignet, um den *knock-down*-Effekt der siRNA zu überprüfen, bestand der Bedarf nach Mausmodellen mit einer Mutation, welche durch siRNA stillgelegt werden kann. Zum aktuellen Zeitpunkt stehen dazu lediglich Xenograft-Modelle zur Verfügung.

In Hinblick auf geplante Experimente untersuchten wir die Eignung zweier humaner Zelllinien, MV4-11 GFP und Molm-13 GFP in immundefizienten NOD scid gamma Mäusen (NSG). Beide Zelllinien tragen eine interne Tandemdublikation der Rezeptortyrosinkinase FLT3, diese Mutation kommt in ca. 25% aller AML-Fälle vor (75). Die Zelllinie MV4-11 transplantiert in NSG-Mäuse wurde bereits von anderen Autoren eingesetzt (123-125). Die Anzahl der zur Induktion eingesetzten Zellzahlen korrelierten wider Erwarten nicht mit der Überlebensdauer. Das mediane Überleben betrug 29 d bei Induktion mit 2×10^5 Zellen (125) und 36d bei Induktion mit 3×10^6 Zellen (124). Wir beobachteten bei Induktion mit 1×10^6 Zellen Überlebenszeiten zwischen 56 und 76 Tagen. Diese Unterschiede sind möglicherweise dadurch bedingt, dass Rahmani et al. (124) Zellen mit zusätzlicher Luciferase-Expression verwendete, dies könnte eine geringere Zellwachstums- und Teilungsrate bedingen. Zudem wurden unterschiedlich alte Tiere verwendet, auch dies könnte eine Schwankung hervorrufen. Ein Organbefall wurde in den genannten Arbeiten nicht untersucht. In unserer Untersuchung waren die gemessenen Zellzahlen in den Organen sehr klein. Der große Schwankungsbereich im Überleben und der variable Leukämiebefall würden einen Effektnachweis in diesem Modell stark erschweren, deshalb wurde es nicht weiterverfolgt.

Auch Molm-13 Zellen wurden bereits in NSG-Mäusen verwendet (126-128). In zwei Arbeiten wurde vor Transplantation eine medikamentöse Immunsuppression (128) oder eine Bestrahlung durchgeführt (127). Die injizierten Zellzahlen variierten von $0,7 \times 10^6$ bis zu 6×10^6 pro Tier. Die angegebenen Überlebensdauern variierten von 15-16 d für die niedrigste Zelldosis ohne Vorbehandlung bis zu 8-13 Tage für die höchste Dosis nach Bestrahlung. Auch in diesen Arbeiten wurde das Modell nicht weiter hinsichtlich des Organbefalls charakterisiert. Nach Leukämieinduktion beobachteten

wir einen gleichmäßigen Krankheitsverlauf in allen Tieren mit hohen Anzahlen an nachweisbaren Leukämiezellen in allen untersuchten Organen. Somit bietet dieses Modell die Voraussetzungen um die siRNA-Komponente sowie die direkte zytotoxische Wirkung von RIG-I Aktivierung der bifunktionellen ppp-siRNA zu untersuchen. Der Effekt des adaptiven Immunsystems könnte ggf. durch ein humanisiertes Immunsystem in der Form der Injektion von humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) abgeschätzt werden (65).

4.7. Zusammenfassung: Modelle für die Untersuchung bifunktioneller ppp-siRNAs in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Leukämie mit schlechter Langzeitprognose. Eine Heilung ist möglich durch intensive Chemotherapie oder Stammzelltransplantation. Die zumeist älteren Patienten qualifizieren sich jedoch häufig nicht für eine solche Therapie. Für viele (solide) Tumorarten sind bereits wirksame immuntherapeutische Ansätze bekannt, welche die Prognose dieser Erkrankungen teils deutlich verbessert haben. Im Fall der AML spielen immuntherapeutische Ansätze bisher kaum eine Rolle. Bei AML sind die genetischen Mutationen, welche die Erkrankung verursachen häufig bekannt, sie charakterisieren die Erkrankung und bestimmen die Prognose.

Neuartige bifunktionelle ppp-siRNAs stellen einen neuen Therapieansatz dar, welche Immuntherapie und Genexpressionsinhibition verbinden. Die Genexpression wird durch den Mechanismus der RNA-Interferenz unterdrückt. Die immunstimulatorische Komponente entsteht durch die spezielle Struktur der siRNA, welche sie gleichermaßen zum Liganden von *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) macht. Dieser Rezeptor hat seine ursprüngliche Rolle in der Detektion von RNA-Viren. Die ausgelöste Signalkaskade führt zu einer antiviralen Immunantwort sowie zu Apoptose. Das Therapieprinzip wurde bereits *in vitro* an AML-Zelllinien mit vielversprechenden Ergebnissen getestet. Zur Weiterentwicklung diese komplexen Therapieansatzes sind weitere Modelle notwendig, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere AML-Modelle charakterisiert und überprüft, ob eine therapeutische Wirksamkeit von bifunktioneller ppp-siRNA in ihnen untersucht werden kann. Neben einem *in vitro* Modell mit murinen C1498-Zellen wurden die *ex*

vivo-Kultur von primären AML-Blasten sowie zwei AML-Mausmodelle etabliert und evaluiert.

Die Kultur von Patientenzellen auf einem Gerüst auf murinen *Feeder*-Zellen stellt ein sehr hochwertiges Modell für eine AML dar. Zum einen können Patientenzellen direkt in Kultur genommen werden und akquirieren somit keinerlei zusätzliche Mutationen oder Adaptation an Zellkultur. Zum anderen wird durch die *Feeder*-Zellen auch das *Tumor-Microenvironment* abgebildet. Nach Transfektion bifunktioneller ppp-siRNAs zeigte sich eine Freisetzung von Zytokinen, eine Hochregulation von Interferon-stimulierten Genen sowie eine vermehrte Apoptoseneigung. Der Effekt eines *knock-down* konnte bei sehr niedriger Transfektionseffizienz jedoch nicht nachgewiesen werden. Die schwierige Transfizierbarkeit stellt eine Limitation dieses Modells dar. Hier besteht ein hoher Forschungsbedarf nach geeigneten Trägermolekülen für den Transport von siRNA in AML-Zellen.

C1498-Zellen sehen wir auf Grund schlechter Transfizierbarkeit *in vitro* als nur eingeschränkt nutzbar, eine Nutzung im murinen *in vivo* Modell ist jedoch möglich.

Die Mausmodelle C1498-Zellen in C57BL/6-Mäusen sowie Molm13-Zellen in NSG-Mäusen können jeweils nur einen Teilaspekt der Therapie mit bifunktioneller ppp-siRNA abbilden. In C1498-Mäusen kann der Effekt der Induktion einer adaptiven Immunantwort gegen AML-Zellen durch Triphosphat-RNA untersucht werden, in Molm13-Mäusen der Effekt der RNA-Interferenz sowie der direkte Effekt der aktivierten RIG-Kaskade. Für einen Nachweis der Gesamtwirkung müssten im Molm13-Modell „humanisierte Mäuse“ eingesetzt werden, dies würde Komplexität und Kosten der Untersuchung erhöhen. Im C1498-Modell müssten *driver*-Mutationen identifiziert und ein Transfektionsvehikel gefunden werden das *in vivo* zur verbesserten Aufnahme von ppp-siRNA in das Zytoplasma der AML-Zellen führt. Beide Modelle bilden dabei Aspekte des Krankheitsverlaufs einer AML gut ab und sind in der Summe sehr gut geeignet für *proof-of-concept* Untersuchungen mit bifunktioneller siRNA.

Zusammenfassend konnten drei vielversprechende Modelle für weiterführende Therapiestudien mit bifunktioneller ppp-siRNA bei akuter myeloischer Leukämie charakterisiert werden. Im *ex vivo*-Modell mit AML-Blasten konnte dabei ein additiver Therapieeffekt der beiden Wirkungskomponenten von bifunktioneller ppp-siRNA bestehend aus RIG-I Aktivierung und Inhibition eines mutierten *driver*-Gens durch RNA-Interferenz gezeigt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, Weaver C, Mowat A, Berg L, Chaplin D, Seidler L, et al. Janeway Immunologie. 9. Aufl. 2018 ed. 1 Online-Ressource p.
2. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
3. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015;479-480:110-21.
4. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(9):537-51.
5. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Puijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, et al. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*. 2014;514(7522):372-5.
6. Schlee M, Hartmann G. The chase for the RIG-I ligand--recent advances. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(7):1254-62.
7. Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009;31(1):25-34.
8. Hartmann G. Chapter Four - Nucleic Acid Immunity. In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology*. 133: Academic Press; 2017. p. 121-69.
9. Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, et al. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell reports*. 2012;2(5):1187-96.
10. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Sato E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008;205(7):1601-10.
11. Dias Junior AG, Sampaio NG, Rehwinkel J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol*. 2019;27(1):75-85.

12. Liu B, Gao C. Regulation of MAVS activation through post-translational modifications. *Curr Opin Immunol*. 2018;50:75-81.
13. Chow KT, Jr. MG, Loo Y-M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annual Review of Immunology*. 2018;36(1):667-94.
14. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146(3):448-61.
15. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 2005;122(5):669-82.
16. Ellermeier J, Wei J, DUEWELL P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, et al. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer research*. 2013;73(6):1709-20.
17. Kubler K, Gehrke N, Riemann S, Bohnert V, Zillinger T, Hartmann E, et al. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer research*. 2010;70(13):5293-304.
18. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):231-42.
19. Crosse KM, Monson EA, Beard MR, Helbig KJ. Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *J Innate Immun*. 2018;10(2):85-93.
20. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87-103.
21. Sun L, Liu S, Chen ZJ. SnapShot: pathways of antiviral innate immunity. *Cell*. 2010;140(3):436- e2.
22. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(8):2399-411.

23. Dengzhe L, RPYG, L.; Baoxia, L.; Yuan, W.; Dongmei, D.; Mei, Z. 5'-Triphosphate siRNA targeting MDR1 reverses multi-drug resistance and activates RIG-I-induced immune-stimulatory and apoptotic effects against human myeloid leukaemia cells. *Leukemia Research*. 2017;58:23 - 30.
24. DUEWELL P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, et al. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(12):1825-37.
25. ELION DL, Jacobson ME, Hicks DJ, Rahman B, Sanchez V, Gonzales-Ericsson PI, et al. Therapeutically Active RIG-I Agonist Induces Immunogenic Tumor Cell Killing in Breast Cancers. *Cancer research*. 2018;78(21):6183-95.
26. SCHOCK SN, Chandra NV, Sun Y, Irie T, Kitagawa Y, Gotoh B, et al. Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway. *Cell Death Differ*. 2017;24(4):615-25.
27. BOEHMER DFR, Formisano S, de Oliveira Mann CC, Mueller SA, Kluge M, Metzger P, et al. OAS1/RNase L executes RIG-I ligand-dependent tumor cell apoptosis. *Sci Immunol*. 2021;6(61).
28. WU Y, Wu X, Wu L, Wang X, Liu Z. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy. *Transl Res*. 2017;190:51-60.
29. VINAY DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S185-S98.
30. ELION DL, Cook RS. Harnessing RIG-I and intrinsic immunity in the tumor microenvironment for therapeutic cancer treatment. *Oncotarget*. 2018;9(48):29007-17.
31. SUCH L, Zhao F, Liu D, Thier B, Le-Trilling VTK, Sucker A, et al. Targeting the innate immunoreceptor RIG-I overcomes melanoma-intrinsic resistance to T cell immunotherapy. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(8):4266-81.
32. MORENO V, Calvo E, Middleton MR, Barlesi F, Gaudy-Marqueste C, Italiano A, et al. Treatment with a retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) agonist as monotherapy and in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors: results from two phase 1 studies. *Cancer Immunol Immunother*. 2022;71(12):2985-98.

33. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. 2009;457(7228):396-404.
34. Medizin-Nobelpreis würdigt RNA-Interferenz. *Deutsches Ärzteblatt*. 2006.
35. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):101.
36. Wang K, Chen X, Yan F, Xing Y, Yang X, Tu J, et al. 5'-triphosphate-siRNA against survivin gene induces interferon production and inhibits proliferation of lung cancer cells in vitro. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2013;36(5):294-304.
37. Yuan D, Xia M, Meng G, Xu C, Song Y, Wei J. Anti-angiogenic efficacy of 5'-triphosphate siRNA combining VEGF silencing and RIG-I activation in NSCLCs. *Oncotarget*. 2015;6(30):29664-74.
38. Meng G, Xia M, Xu C, Yuan D, Schnurr M, Wei J. Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation. *Int J Cancer*. 2014;134(8):1958-71.
39. Matheis F, Besch R. Bifunctional siRNAs for tumor therapy. *Methods Mol Biol*. 2014;1169:181-92.
40. Becker H, Pfeifer D, Afonso JD, Nimer SD, Veelken H, Schwabe M, et al. Two cell lines of t(8;21) acute myeloid leukemia with activating KIT exon 17 mutation: models for the 'second hit' hypothesis. *Leukemia*. 2008;22(9):1792-4.
41. Stock WT, M.;. Pathogenesis of acute myeloid leukemia uptodate.com 2020 [updated 26.09.2020. Available from: https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia/print?sectionName=Leukemic%20stem%20cells&search=aml&topicRef=94786&anchor=H4&source=see_link.
42. Onkopedia - Akute Myeloische Leukämie (AML) [Internet]. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. 2019.
43. Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).

44. Heuser M, Thol F, Ganser A. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(18):317-22.
45. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-87.
46. Uckelmann HK, S.; Wong, E.;1, Hatton, C.; Giovinazzo, H.; Gadrey, J.; Krivtsov, A.; Rücker, F.; Döhner, K.; McGeehan, G.; Levine, R.; Bullinger, L.; Vassiliou, G.; Armstrong, S.;. Therapeutic targeting of preleukemia cells in a mouse model of NPM1 mutant acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2020;367(6477):586-90.
47. Barrett AJ. Acute myeloid leukaemia and the immune system: implications for immunotherapy. *Br J Haematol.* 2020;188(1):147-58.
48. Andersen MH. The targeting of immunosuppressive mechanisms in hematological malignancies. *Leukemia.* 2014;28(9):1784-92.
49. Institute NC. Acute Myeloid Leukemia (AML) - SEER Survival Rates by Time Since Diagnosis, 2000-2016 [Available from: https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=96&data_type=4&graph_type=6&compareBy=sex&chk_sex_1=1&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&race=1&age_range=1&hdn_stage=101&adopt_precision=1&adopt_display=2.
50. Mavroudis D, Barrett J. The graft-versus-leukemia effect. *Curr Opin Hematol.* 1996;3(6):423-9.
51. Gambacorta V, Gnani D, Vago L, Di Micco R. Epigenetic Therapies for Acute Myeloid Leukemia and Their Immune-Related Effects. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:207.
52. Licht JD. DNA Methylation Inhibitors in Cancer Therapy: The Immunity Dimension. *Cell.* 2015;162(5):938-9.
53. Duchmann M, Itzykson R. Clinical update on hypomethylating agents. *Int J Hematol.* 2019;110(2):161-9.
54. Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Kohnke T, Subklewe M. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):142.

55. Landry B, Aliabadi HM, Samuel A, Gul-Uludag H, Jiang X, Kutsch O, et al. Effective non-viral delivery of siRNA to acute myeloid leukemia cells with lipid-substituted polyethylenimines. *PLoS one*. 2012;7(8):e44197.
56. Larsen HO, Roug AS, Nielsen K, Sondergaard CS, Hokland P. Nonviral transfection of leukemic primary cells and cell lines by siRNA—a direct comparison between Nucleofection and Accell delivery. *Exp Hematol*. 2011;39(11):1081-9.
57. Schakowski F, Buttgereit P, Mazur M, Marten A, Schottker B, Gorschluter M, et al. Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genetic vaccines and therapy*. 2004;2(1):1.
58. Uludag H, Landry B, Valencia-Serna J, Remant-Bahadur KC, Meneksedag-Erol D. Current attempts to implement siRNA-based RNAi in leukemia models. *Drug Discov Today*. 2016;21(9):1412-20.
59. Bourquin C, Pommier A, Hotz C. Harnessing the immune system to fight cancer with Toll-like receptor and RIG-I-like receptor agonists. *Pharmacological research*. 2020;154:104192.
60. Lausmann H. In vitro Evaluation RIG-I-aktivierender, bifunktioneller siRNAs zur Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie: LMU München; 2020.
61. Kohnken R, Porcu P, Mishra A. Overview of the Use of Murine Models in Leukemia and Lymphoma Research. *Frontiers in oncology*. 2017;7:22.
62. DiMasi JA, Reichert JM, Feldman L, Malins A. Clinical approval success rates for investigational cancer drugs. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2013;94(3):329-35.
63. Stroh M, Duda DG, Takimoto CH, Yamazaki S, Vicini P. Translation of anticancer efficacy from nonclinical models to the clinic. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3:e128.
64. Mendez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(5):285-98.
65. Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, Boehmer DFR, Vick B, Heuer E-M, et al. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*. 2020;34(4):1017-26.

66. Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, et al. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12067-72.
67. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bogeholz J, Kohnke T, et al. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 2014;123(3):356-65.
68. Suttner KL. Charakterisierung von genetischen Varianten in den immunregulatorischen Transkriptionsfaktoren TBX21, HLX1 und GATA3 und deren funktionelle Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale: Technische Universität München; 2010.
69. Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, Grassmann S, Henkel J, Castoldi R, et al. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(1):364.
70. Kraus F. PD-1-CD28-Fusionsrezeptor-transduzierte CD4+ T-Zellen für die adoptive T-Zell-Therapie von murinen Pankreaskarzinom- und Non-Hodgkin-Lymphommodellen: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2021.
71. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
72. Ahmed M, McKenzie MO, Puckett S, Hojnacki M, Poliquin L, Lyles DS. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol*. 2003;77(8):4646-57.
73. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular cell*. 2001;7(3):683-94.
74. Gjertsen BT, Schoffski P. Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy. *Leukemia*. 2015;29(1):11-9.
75. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299-312.
76. Donati B, Lorenzini E, Ciarrocchi A. BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Molecular cancer*. 2018;17(1):164.

77. Kolosenko I, Edsbacker E, Bjorklund AC, Hamil AS, Goroshchuk O, Grander D, et al. RNAi prodrugs targeting Plk1 induce specific gene silencing in primary cells from pediatric T-acute lymphoblastic leukemia patients. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2017;261:199-206.
78. Landry B, Valencia-Serna J, Gul-Uludag H, Jiang X, Janowska-Wieczorek A, Brandwein J, et al. Progress in RNAi-mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4:e240.
79. He W, Bennett MJ, Luistro L, Carvajal D, Nevins T, Smith M, et al. Discovery of siRNA lipid nanoparticles to transfect suspension leukemia cells and provide in vivo delivery capability. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014;22(2):359-70.
80. Maess MB, Wittig B, Lorkowski S. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(91):e51960.
81. Withey JME, Marley SB, Kaeda J, Harvey AJ, Crompton MR, Gordon MY. Targeting primary human leukaemia cells with RNA interference: Bcr-Abl targeting inhibits myeloid progenitor self-renewal in chronic myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology*. 2005;129(3):377-80.
82. Gul-Uludag H, Valencia-Serna J, Kucharski C, Marquez-Curtis LA, Jiang X, Larratt L, et al. Polymeric nanoparticle-mediated silencing of CD44 receptor in CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 2014;38(11):1299-308.
83. Lee YK, Kim KS, Kim JS, Baek JE, Park SI, Jeong HY, et al. Leukemia-specific siRNA delivery by immunonanoplexes consisting of anti-JL1 minibody conjugated to oligo-9 Arg-peptides. *Molecules and cells*. 2010;29(5):457-62.
84. Tushir-Singh J. Antibody-siRNA conjugates: drugging the undruggable for anti-leukemic therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2017;17(3):325-38.
85. Zhang Q, Hossain DM, Nechaev S, Kozłowska A, Zhang W, Liu Y, et al. TLR9-mediated siRNA delivery for targeting of normal and malignant human hematopoietic cells in vivo. *Blood*. 2013;121(8):1304-15.
86. Jacobson ME, Wang-Bishop L, Becker KW, Wilson JT. Delivery of 5'-triphosphate RNA with endosomolytic nanoparticles potently activates RIG-I to improve cancer immunotherapy. *Biomaterials science*. 2019;7(2):547-59.

87. Agarwal A, Tyner JW. RNAi Screening of Leukemia Cells Using Electroporation. *Methods Mol Biol.* 2016;1470:85-94.
88. EMA. Website der European Medicines Agency's [Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>].
89. Li XY, Jiang LJ, Chen L, Ding ML, Guo HZ, Zhang W, et al. RIG-I modulates Src-mediated AKT activation to restrain leukemic stemness. *Molecular cell.* 2014;53(3):407-19.
90. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214-8.
91. Jorgensen SE, Christiansen M, Ryo LB, Gad HH, Gjedsted J, Staeheli P, et al. Defective RNA sensing by RIG-I in severe influenza virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2018;192(3):366-76.
92. Meng Z, Lu M. RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Front Immunol.* 2017;8:331.
93. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature.* 2018;560(7718):325-30.
94. Kaneda Y. The RIG-I/MAVS signaling pathway in cancer cell-selective apoptosis. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e23566.
95. Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Lin LI, Tseng MH, et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood Cancer J.* 2015;5:e331.
96. Matsushima-Miyagi T, Hatano K, Nomura M, Li-Wen L, Nishikawa T, Saga K, et al. TRAIL and Noxa are selectively upregulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by nonreplicating Sendai virus particles. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6271-83.
97. Cucchi DGJ, Groen RWJ, Janssen J, Cloos J. Ex vivo cultures and drug testing of primary acute myeloid leukemia samples: Current techniques and implications for experimental design and outcome. *Drug Resist Updat.* 2020;53:100730.

98. Klco JM, Spencer DH, Miller CA, Griffith M, Lamprecht TL, O'Laughlin M, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*. 2014;25(3):379-92.
99. Griessinger E, Anjos-Afonso F, Pizzitola I, Rouault-Pierre K, Vargaftig J, Taussig D, et al. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(4):520-9.
100. van Gosliga D, Schepers H, Rizo A, van der Kolk D, Vellenga E, Schuringa JJ. Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. 2007;35(10):1538-49.
101. Bernasconi P, Borsani O. Targeting Leukemia Stem Cell-Niche Dynamics: A New Challenge in AML Treatment. *J Oncol*. 2019;2019:8323592.
102. Rashidi A, DiPersio JF. Targeting the leukemia-stroma interaction in acute myeloid leukemia: rationale and latest evidence. *Therapeutic advances in hematology*. 2016;7(1):40-51.
103. Dhami SPS, Kappala SS, Thompson A, Szegezdi E. Three-dimensional ex vivo co-culture models of the leukaemic bone marrow niche for functional drug testing. *Drug Discovery Today*. 2016;21(9):1464-71.
104. Cook GJ, Pardee TS. Animal models of leukemia: any closer to the real thing? *Cancer metastasis reviews*. 2013;32(1-2):63-76.
105. McCormack E, Bruserud O, Gjertsen BT. Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives. *Leukemia*. 2005;19(5):687-706.
106. De Luca R, Soltermann A, Pretto F, Pemberton-Ross C, Pellegrini G, Wulhfard S, et al. Potency-matched Dual Cytokine-Antibody Fusion Proteins for Cancer Therapy. *Molecular cancer therapeutics*. 2017;16(11):2442-51.
107. Gutbrodt KL, Casi G, Neri D. Antibody-based delivery of IL2 and cytotoxics eradicates tumors in immunocompetent mice. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(7):1772-6.

108. LaBelle JL, Hanke CA, Blazar BR, Truitt RL. Negative effect of CTLA-4 on induction of T-cell immunity in vivo to B7-1+, but not B7-2+, murine myelogenous leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2146-53.
109. Shen W, Patnaik MM, Ruiz A, Russell SJ, Peng KW. Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(11):1449-58.
110. Boyer MW, Orchard PJ, Gorden KB, Anderson PM, McLvor RS, Blazar BR. Dependency on intercellular adhesion molecule recognition and local interleukin-2 provision in generation of an in vivo CD8+ T-cell immune response to murine myeloid leukemia. *Blood*. 1995;85(9):2498-506.
111. Vivek Mahajan TB, Ian Belle, Edgar Wood, Lindsay Usher, Elizabeth Rainbolt, Shasta Kidder, Aidan Synnott, David Harris., editor Therapeutic response to PD1/PDL1 axis in a disseminated C1498 syngeneic tumor model [abstract]. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018; 2018; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR.
112. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009;114(8):1545-52.
113. Goldie H, Butler CH, Anderson MM, Maxwell MC, Hahn PF. Growth characteristics of free C1498 granulocytic leukemia tumor cells in the peritoneal fluid and the blood of C57 mice. *Cancer research*. 1953;13(2):125-9.
114. LaBelle JL, Truitt RL. Characterization of a murine NKT cell tumor previously described as an acute myelogenous leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2002;43(8):1637-44.
115. Mopin A, Driss V, Brinster C. A Detailed Protocol for Characterizing the Murine C1498 Cell Line and its Associated Leukemia Mouse Model. *Journal of Visualized Experiments*. 2016(116).
116. Hehn. FAB-Klassifikation der AML [updated 20.05.2015. Available from: <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/klassifikation/>.
117. Graham JDW, Carol McMahon; Patchen, Myra L. Studies of an Implanted Murine Myelogenous Leukemia C1498. *Ohio Journal of Science*. 1975;75(4):202-8.

118. Driss V, Lepretre F, Briche I, Mopin A, Villenet C, Figeac M, et al. Sub-clonal analysis of the murine C1498 acute myeloid leukaemia cell line reveals genomic and immunogenic diversity. *Immunol Lett.* 2017;192:27-34.
119. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer.* 1951;4(1):39-59.
120. Van de Louw A, Lewis AM, Yang Z. Autopsy findings in patients with acute myeloid leukemia and non-Hodgkin lymphoma in the modern era: a focus on lung pathology and acute respiratory failure. *Ann Hematol.* 2019;98(1):119-29.
121. Byrd JC. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002;100(13):4325-36.
122. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Gorlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016;128(5):686-98.
123. Buettner R, Nguyen LXT, Kumar B, Morales C, Liu C, Chen LS, et al. 8-chloro-adenosine activity in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Journal of cellular physiology.* 2019.
124. Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, Pei X, Parker RE, Kmiecik M, et al. Cotargeting BCL-2 and PI3K Induces BAX-Dependent Mitochondrial Apoptosis in AML Cells. *Cancer research.* 2018;78(11):3075-86.
125. Stamm H, Klingler F, Grossjohann EM, Muschhammer J, Vettorazzi E, Heuser M, et al. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene.* 2018;37(39):5269-80.
126. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, et al. Selective BCL-2 Inhibition by ABT-199 Causes On-Target Cell Death in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discovery.* 2013;4(3):362-75.
127. Wang L, Wang J, Blaser BW, Duchemin AM, Kusewitt DF, Liu T, et al. Pharmacologic inhibition of CDK4/6: mechanistic evidence for selective activity or acquired resistance in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007;110(6):2075-83.

128. Yamaura T, Nakatani T, Uda K, Ogura H, Shin W, Kurokawa N, et al. A novel irreversible FLT3 inhibitor, FF-10101, shows excellent efficacy against AML cells with FLT3 mutations. *Blood*. 2018;131(4):426-38.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die RIG-I Signalkaskade (Adaptiert nach (4, 12))	11
Abbildung 2. Funktionsweise der bifunktionellen ppp-siRNA.....	14
Abbildung 3. Anwendung von siRNA in der Zelllinie C1498	47
Abbildung 4. Funktionalität der RLR-Kaskade in C1498	48
Abbildung 5. Eigenschaften des AML-Mausmodells C1498GFP in C57BL/6	51
Abbildung 6. Vergleich von MV4-11-GFP und Molm13-GFP-Zellen in NOD SCID Mäusen.....	53
Abbildung 7. Der RLR-Signalweg kann durch Triphosphat-RNA in primären AML-Zellen aktiviert werden	56
Abbildung 8. Verstärkte Apoptose nach Stimulation mit RLR-Liganden	58
Abbildung 9. Unterschiedliche Modifikationen und Sekundärstrukturen der bifunktionellen siRNAs.....	60
Abbildung 10. <i>Knock-down</i> von PLK1, FLT3 und BRD4 in primären AML- Blasten	61
Abbildung 11. Aktivierung des RIG-I Signalwegs in primären AML-Blasten nach Stimulation mit bifunktionellen ppp-siRNA.....	64
Abbildung 12. Zellviabilität von AML-Blasten 72h nach Behandlung mit triphosphat-modifizierter bifunktioneller siRNA	65

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AML	Akute Myeloische Leukämie
AML1/Eto	<i>acute myeloid leukemia 1 - Eight-twentyone chromosome components</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRD4	<i>bromodomain-containing 4</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CHIP	<i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
CLR	C-Typ Lektin Rezeptor
CR	<i>complete remission</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methytransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calve serum</i> (fetales Kälberserum)
FLT3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scattered light</i>
G1	Abschnitt der Interphase G für engl. <i>gap</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- α	Alpha-Interferon
IFN- β	Beta-Interferon
IKK ϵ	I κ B kinase- ϵ
IL	Interleukin
IP-10	Interferon <i>gamma-induced</i> Protein 10
ITD	interne Tandemdublikation
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
ISG	interferon-stimulierte Gene
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
JAK	Janus Kinase
LPG2	<i>laboratory of genetics and physiology-2</i>
LPS	Lipopolysaccharide

Abkürzungsverzeichnis

MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCT	<i>national clinical trial</i>
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	<i>non obese diabetic</i>
NPM1	Nucleophosmin 1
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OAS1	Oligoadenylatsynthetase 1
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PI	Propiumiodid
PLK1	Polo-like Kinase 1
poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidin-Säure
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTD	partielle Tandemdublikation
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
q-PCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RISC	RNA-induzierter <i>silencing</i> Komplex
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scattered light</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBK1	TANK-binding Kinase 1
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TKD	Tyrosinkinase Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-M51R	<i>vesicular stomatitis virus</i> Variante M51R
WT1	Wilms-Tumor-Proteins 1

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Promotionsarbeit zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß für kontinuierliche und intensive wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Die persönliche Förderung in einer familiären Arbeitsgruppe schaffte die Grundlage für mein wissenschaftliches Arbeiten. Ebenso bedanke ich mich bei den betreuenden Post-Docs Dr. Felix Lichtenegger und Dr. Lars König für die wissenschaftliche und insbesondere methodische Anleitung. Ein ganz herzlicher Dank gilt allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und der *Abteilung für klinische Pharmakologie*, welche jederzeit für technische Fragen und wissenschaftliche Diskussionen mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank hier an meine Mitdoktoranden Viktoria Bothe, Johannes Rädler, Johannes Rückel und Christine Heuer. Ebenso gilt mein Dank Markus Zeitlhöfler, Hanna Lausmann und Michael Ruzicka für die kollegiale Bearbeitung von Fragestellungen zur Immuntherapie der AML mit RIG-I Liganden.

Für die hervorragende Zusammenarbeit bedanke ich mich bei zahlreichen wissenschaftlichen Kollegen im Bereich des Campus LMU Innenstadt und Großhadern, welche mir mit ihrer Expertise und Infrastruktur zu Verfügung standen. Insbesondere gilt mein Dank Philipp Guder (Abteilung für angeborene Stoffwechselerkrankungen) und Christina Krupka (III. Medizinische Klinik LMU).

Bei Herrn Prof. Dr. med. Endres möchte ich mich für sein großes Engagement in Ausbildung und Förderung von jungen Ärzten und Wissenschaftlern an der LMU und insbesondere in der *Abteilung für Klinische Pharmakologie* bedanken.

Außerdem bedanke ich mich für die wissenschaftliche und finanzielle Förderung im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München.

Abschließend bedanke ich mich von Herzen bei meiner Familie und Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung und für den Rückhalt während Studium und Promotion.

9. Veröffentlichungen

9.1. Originalarbeiten

Ruzicka, M., et al., RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*, 2020. 34(4): p. 1017-1026.

9.2. Vorträge

Targeted immunotherapy of acute myeloid leukemia with bifunctional immunoactive siRNAs

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2014, Bonn

Targeted immunotherapy of acute myeloid leukemia with bifunctional immunoactive siRNAs

Berichtskolloquium Promotionsstudium "Molekulare Medizin" und „Systembiologische Medizin“, Mai 2015, Herrsching

9.3. Posterpräsentation

Targeted immunotherapy of acute myeloid leukemia with bifunctional immunoactive siRNAs

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2014, Bonn