

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik 2 (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie,
Rheumatologie, Infektiologie)
Direktor: Prof. Dr. Hubert Serve

**Die tumorsuppressive MicroRNA-193b in Wirkstoff induzierter
Differenzierung und Proliferation in Akuter Myeloischer und
Promyeloischer Leukämie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
René Pojeti

aus Bonn

Frankfurt am Main, 2022

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Michael Rieger
Korreferent/in:
Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	VII
2	Summary.....	IX
3	Abbildungsverzeichnis.....	XI
4	Tabellenverzeichnis	XII
5	Abkürzungsverzeichnis	XIII
6	Einleitung	1
6.1	Akute Myeloische Leukämie	1
6.2	Akute Promyelozyten Leukämie.....	4
6.3	MicroRNAs und ihre Rolle in Tumorerkrankungen.....	7
6.4	MiR-193b als Tumorsuppressor in AML.....	10
6.5	Die Rolle der miR-193b bei GSK-LSD1-vermittelter LSD1-Inhibition	11
6.6	Zielsetzung der Arbeit	14
7	Materialien.....	16
7.1	Zelllinien.....	16
7.2	Lentiviren	16
7.3	Chemikalien und Lösungen.....	16
7.4	Antikörper.....	17
7.5	Primer	17
7.6	Substanzen	18
7.7	MicroRNA-Inhibitoren.....	18
7.8	Kits.....	18
7.9	Verbrauchsmaterialien	18
7.10	Geräte.....	19
7.11	Softwares	20
8	Methoden	21
8.1	Molekularbiologie	21

8.1.1	Konzentrationsbestimmung der MicroRNA.....	21
8.1.2	MicroRNA-Isolation.....	21
8.1.3	Reverse Transkription und qPCR	21
8.2	Zellkultur	23
8.2.1	Zellkultur-Medien	23
8.2.2	Kultivierung der Zellen	23
8.2.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	23
8.3	Zellzählung.....	24
8.4	Lentivirale Transduktion	24
8.5	LNA-Transfektion	24
8.6	Durchflusszytometrie	25
8.7	Bestimmung der kumulativen Zellzahl	26
8.8	Versuchsablauf bei Experimenten mit differenzierungsinduzierenden Wirkstoffen und LNA/ lentiviraler Überexpression.....	26
8.9	Statistische Analyse	27
9	Ergebnisse	29
9.1	Einfluss eines modifizierten MicroRNA-193b-Levels auf Zelldifferenzierung und -proliferation in AML-Zelllinien	29
9.1.1	LNA reduzieren die zelluläre Menge von MicroRNA-193b.....	29
9.1.2	Überexpression von MicroRNA-193b erhöht effektiv das zelluläre miR-Level.....	31
9.1.3	Veränderte MicroRNA-193b-Level haben keinen Einfluss auf Differenzierung und Proliferation von AML-Zelllinien	32
9.2	Die Rolle von miR-193b in der mechanistischen Umsetzung des therapeutischen Effekts von GSK-LSD1 in AML und APL	35
9.2.1	GSK-LSD1-induzierte miR-193b-Hochregulation ist nicht allein für die Umsetzung des Behandlungseffekts in AML verantwortlich	35
9.2.2	Erhöhte miR-193b-Level führen in Kombination mit GSK-LSD1 zu synergistischem Effekt in AML	36

9.2.3	Reduktion von miR-193b beeinflusst nicht den Behandlungseffekt von GSK-LSD1 in NB-4-Zellen (APL).....	38
9.3	Bedeutung der miR-193b für Überleben und Differenzierung in APL	40
9.3.1	APL-Zelllinie NB-4 weist deutlich höhere miR-193b-Level auf als AML-Zelllinien	40
9.3.2	APL-Zelllinie NB-4 ist nicht auf miR-193b angewiesen.....	41
9.4	Die Rolle von miR-193b bei der Umsetzung des therapeutischen Effekts von ATRA in APL und AML.....	42
9.4.1	ATRA-Behandlung führt zu erhöhten miR-193b-Levels in NB-4 und ML-2.....	42
9.4.2	MiR-193b ist für die Umsetzung des Effekts von ATRA in NB-4 nicht notwendig	43
9.4.3	ATRA-Behandlung initiiert Differenzierung in AML	45
9.4.4	Der Behandlungseffekt von ATRA in AML ist nicht von miR-193b abhängig	46
9.4.5	MiR-193b-Überexpression führt in Kombination mit ATRA zu synergistischem Effekt in AML	48
10	Diskussion.....	50
10.1	Synergismus von miR-193b & ATRA/ GSK-LSD1 in AML	50
10.2	Antileukämischer Effekt von LSD1-Inhibition ist in AML und APL nicht von miR-193b abhängig	53
10.3	Antileukämischer Effekt von ATRA ist in APL und AML nicht von miR-193b abhängig.....	56
10.4	NB-4 ist nicht auf hohe miR-193b-Level angewiesen	57
10.5	Zusammenfassung und Ausblick	58
11	Literatur.....	60
12	Anhang.....	73
12.1	Danksagung.....	73

12.2	Schriftliche Erklärung	74
------	------------------------------	----

1 Zusammenfassung

Die MicroRNA-193b (miR-193b) fungiert in Akuter Myeloischer Leukämie (AML) als Tumorsuppressor und als Biomarker zur Prädiktion der Überlebenswahrscheinlichkeit bei erwachsenen sowie kindlichen AML-Patienten. Die Expression der miR-193b ist in allen AML-Entitäten reduziert, mit Ausnahme der Akuten Promyelozyten Leukämie (APL), bei der das Level an miR-193b erhöht ist. APL ist auch die einzige Form der AML, bei der All-Trans-Retinoinsäure (ATRA) leitliniengerecht und effektiv zur Therapie angewendet wird.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der antileukämische irreversible Inhibitor der Lysin-spezifischen Histon Demethylase 1 (LSD1) GSK-LSD1 die Expression von miR-193b induziert. Dadurch wird in murinen Homeobox protein A9 (Hoxa9)/Meis Homeobox Protein 1 (Meis1) AML-Zellen zumindest ein Teil der tumorsuppressiven Wirkung von GSK-LSD1 über die Hochregulation von miR-193b vermittelt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Gültigkeit des potenziellen GSK-LSD1-Wirkmechanismus über die Induktion von miR-193b in humanen Zellen zu untersuchen. Weitere Ziele waren die Erforschung der Rolle der miR-193b bei dem Behandlungseffekt von ATRA in humaner AML und APL sowie die Untersuchung einer potenziell protoonkogenen Eigenschaft der miR-193b in APL. Der methodische Ansatz dieser Arbeit basierte auf einer Senkung bzw. Erhöhung des intrazellulären miR-193b-Levels mittels Locked nucleic acids (LNA) bzw. lentiviraler miR-193b-Überexpression und anschließender Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen. Es wurden Proliferationskurven erstellt und der Differenzierungsgrad durchflusszytometrisch bestimmt. Eine hohe Aufnahmeeffizienz und Effektivität der LNA und des lentiviralen Überexpressionsvektors wurde durchflusszytometrisch und per quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestätigt.

Zur Untersuchung der Rolle der miR-193b bei dem Behandlungseffekt von GSK-LSD1 wurden die AML-Linien ML-2 und MOLM-13 sowie die APL-Zelllinie NB-4 mit LNA transfiziert bzw. mit dem Überexpressionsvektor transduziert und mit GSK-LSD1 behandelt. Die Populationen mit reduziertem miR-193b-Level wiesen nach 96 Stunden eine unverändert reduzierte Proliferation und Differenzierung auf. Hingegen zeigten miR-193b-überexprimierende Zellen nach GSK-LSD1-

Behandlung einen signifikant stärkeren antiproliferativen Effekt. ML-2 Zellen wiesen zudem eine signifikant gesteigerte Differenzierung auf, gemessen an der Expression des Differenzierungsmarkers CD11b.

Die erhöhten miR-193b-Level in APL-Patienten konnten in der APL-Zelllinie NB-4 mittels qPCR bestätigt werden. NB-4 weist eine über 60-fach höhere miR-193b Expression als ML-2 (AML) auf. Zur Überprüfung einer onkogenen Eigenschaft der miR-193b in APL wurde das zelluläre miR-193b-Level in NB-4-Zellen durch LNA reduziert und anschließend die Proliferationskurve über 12 Tage bestimmt und die Differenzierungsmarker CD11b und CD13 gemessen. Proliferation und Differenzierungsgrad blieben nach Reduktion der miR-193b in NB-4-Zellen unverändert.

Die gleichzeitige Behandlung von NB-4 mit ATRA und miR-193b-LNA zeigte nach 96 Stunden den gleichen antiproliferativen und differenzierungsinduzierenden Effekt wie bei ATRA allein. Auch bei den AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 wirkte die ATRA-Behandlung bei reduziertem miR-193b-Level unverändert differenzierungsinduzierend und antiproliferativ. Hingegen führte eine ATRA-Behandlung der AML-Zelllinien bei erhöhtem miR-193b-Level zu einer Verstärkung des antiproliferativen Effekts. Bei beiden AML-Zelllinien wurde die Proliferation mehr als doppelt so stark reduziert als bei alleiniger ATRA-Behandlung.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass miR-193b kein Protoonkogen in der APL-Zelllinie NB-4 ist. Außerdem weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Wirkungseffekte von sowohl GSK-LSD1 als auch von ATRA, weder in APL noch in AML, über die Induktion der miR-193b vermittelt werden. Hingegen zeigt sich bei beiden Wirkstoffen in AML-Zellen ein additiver antileukämischer Effekt bei Behandlung mit gleichzeitiger Erhöhung des miR-193b-Levels. Die molekulare Begründung hierfür ist möglicherweise eine gemeinsame Modulation der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Signaltransduktionskaskade und bedarf weiterer Experimente zur Überprüfung dieser Hypothese. Ausblickend stellen die Ergebnisse dieser Arbeit die miR-193b als einen interessanten Kombinationspartner für die Therapie mit GSK-LSD1 oder ATRA, bzw. generell für den MAPK Signalweg beeinflussende Medikamente, dar, sobald eine sichere und effiziente Einschleusung von MicroRNAs in Patienten möglich ist.

2 Summary

MicroRNA-193b (miR-193b) acts as a tumor suppressor in acute myeloid leukemia (AML) and serves as a biomarker to predict the probability of survival in adult and pediatric AML-patients. The expression of miR-193b is reduced in all AML entities, apart from acute promyelocyte leukemia, in which the miR-193b-Level is increased. APL is also the only AML entity in which all-trans retinoic acid (ATRA) is used effectively for therapy in accordance with guidelines.

Previous experiments demonstrated that the antileukemic irreversible inhibitor of the lysine-specific histone demethylase 1A (LSD1) GSK-LSD1 was a potent up-regulator of miR-193b. Therefore, at least part of the tumor suppressive effect of GSK-LSD1 in murine *Hoxa9 / Meis1* AML cells is mediated via miR-193b.

The aim of this work was to investigate the potential GSK-LSD1 mode of action by the induction of miR-193b in human cells. Further goals of the work were to investigate the role of miR-193b in the treatment effect of ATRA in human AML and APL as well as the interrogation of a potential proto-oncogenic function of miR-193b in APL. The methodical approach of this work was based on loss and gain of intracellular miR-193b by LNA or lentiviral miR-193b overexpression and subsequent treatment with the compounds. Proliferation curves were generated and the degree of differentiation was determined by flow cytometry.

A high uptake efficiency and effectiveness of the LNA and the lentiviral overexpression vector were confirmed by flow cytometry and by qPCR.

To investigate the role of miR-193b in the treatment effect of GSK-LSD1, ML-2 and MOLM-13 (AML) as well as NB-4 (APL) were transfected with LNA or transduced with the miR-193b overexpression vector and then treated with GSK-LSD1. Cells with a reduced miR-193b level showed the same reduced proliferation and differentiation as the control group after 96 hours of GSK-LSD1 treatment. Interestingly, miR-193b overexpressing cells showed a significantly stronger antiproliferative effect after GSK-LSD1 treatment than cells with an endogenous miR-193b level. ML-2 cells also showed a significantly increased differentiation, measured by the expression of the differentiation marker CD11b.

The increased miR-193b level in APL-patients could be confirmed in the APL cell line NB-4 by qPCR. MiR-193b expression in NB-4 is over 60 times higher than in ML-2 (AML). To test for an oncogenic property of miR-193b in APL, the cellular miR-193b level in NB-4 cells was reduced by LNA and then the proliferation curve of the cells was determined over a period of 12 days. Also the two differentiation markers CD11b and CD13 were determined by flow cytometry. The proliferation and the degree of differentiation were unchanged in NB-4 cells upon reduction of miR-193b in comparison to the control.

After 96 hours of simultaneous ATRA and miR-193b LNA treatment, an identical antiproliferative effect and induction of differentiation of CD13 and CD11b was found as with ATRA alone. Likewise, ATRA treatment of the AML cell lines ML-2 and MOLM-13 at a reduced miR-193b level resulted in equally strong differentiation-inducing and antiproliferative effect. In contrast, ATRA treatment in AML cell lines with an increased miR-193b level boosted the antiproliferative effect. In both AML cell lines the proliferation was reduced more than two-fold than with ATRA treatment alone.

In conclusion this study showed that miR-193b does not act as a protooncogene in the APL cell line NB-4. In addition, the results of this work indicate that the mode of action of both GSK-LSD1 and ATRA, neither in APL nor in AML, are mediated by miR-193b. Importantly, a synergistic or additive antileukemic effect is shown with both compounds in AML cells when treated with a simultaneous increase of the miR-193b level. The molecular justification for this is possibly a joint modulation of the MAPK signal transduction cascade and requires further experiments to test this hypothesis. Looking ahead, the results of this work present miR-193b as an interesting combination partner for therapy with GSK-LSD1 or ATRA, or in general for drugs that influence the MAPK signaling pathway, as soon as a safe and efficient delivery of miRs into patients is possible.

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Versuchsablauf bei Experimenten mit differenzierungsinduzierenden Wirkstoffen und LNA/ lentiviraler Überexpression	27
Abbildung 2: LNA reduzieren effektiv die Menge an MicroRNA-193b in den Zellen.	30
Abbildung 3: LNA bleiben über mehrere Tage stabil in den Zellen.....	30
Abbildung 4: Der miR-193b-Überexpressionsvektor weist eine hohe Transduktionseffizienz auf.....	31
Abbildung 5: MiR-193b-Überexpression erhöht das miR-Level signifikant.....	32
Abbildung 6: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von ML-2 und MOLM-13	33
Abbildung 7: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von ML-2 und MOLM-13	34
Abbildung 8: Erhöhtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von ML-2 und MOLM-13	34
Abbildung 9: Erhöhtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von ML-2 und MOLM-13	34
Abbildung 10: Reduzierte miR-193b-Level beeinflussen nicht die anti-proliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2 und MOLM-13	36
Abbildung 11: Erhöhte miR-193b-Level verstärken die antiproliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2 und MOLM-13.....	37
Abbildung 12: Erhöhtes miR-193b-Level verstärkt die differenzierungsinduzierende Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2	37
Abbildung 13: Reduziertes miR-193b-Level beeinflusst nicht die anti-proliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf NB-4	39
Abbildung 14: Erniedrigtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den Effekt von GSK-LSD1 auf NB-4.....	39
Abbildung 15: Die APL-Zelllinie NB-4 hat signifikant höhere miR-193b-Level als AML-Zelllinien.....	40
Abbildung 16: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von NB-4	41

Abbildung 17: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von NB-4	42
Abbildung 18: ATRA erhöht das miR-193b-Level in ML-2 und NB-4 signifikant	43
Abbildung 19: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die anti-proliferative Wirkung von ATRA auf NB-4	44
Abbildung 20: Erniedrigtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den differenzierungsinduzierenden Effekt von ATRA auf NB-4.....	45
Abbildung 21: ATRA initiiert Differenzierung in ML-2 und MOLM-13.....	46
Abbildung 22: Verringertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den anti-proliferativen Effekt von ATRA auf ML-2 und MOLM-13	47
Abbildung 23: Verringertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den differenzierungsinduzierenden Effekt von ATRA auf ML-2 und MOLM-13	48
Abbildung 24: Erhöhte miR-193b-Level verstärken die antiproliferative Wirkung von ATRA auf ML-2 und MOLM-13	49

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	16
Tabelle 2: Verwendete Lentiviren	16
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer und Reagenzien.....	16
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	17
Tabelle 5: Verwendete Primer für die qPCR	17
Tabelle 6: Verwendete Substanzen.....	18
Tabelle 7: Verwendete MicroRNA-Inhibitoren	18
Tabelle 8: Verwendete Kits.....	18
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 10: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 11: Verwendete Softwares.....	20
Tabelle 12: Pippetier-Ansatz der Reversen Transkription	22
Tabelle 13: Pippetier-Ansatz der qPCR.....	22
Tabelle 14: Temperaturschema der Reversen Transkription	22
Tabelle 15: Temperaturschema der qPCR.....	22

5 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
AML	Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
ATO	Arsentrioxid
ATRA	All-Trans-Retinoinsäure
BFP	Blaues Fluoreszentes Protein
CCND1	Cyclin D1
CDK	Cyclin abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
d2GFP	destabilisiertes GFP
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Erk	Extracellular-signal regulated kinases
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAM	Fluoreszein Amidite
GFI1b	Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Hoxa9	Homeobox protein A9, Homeobox protein A9
IRF8	Interferon Regulatory Factor 8
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
LNA	Locked Nucleic Acids
LNGFR	Low-affinity nerve growth factor receptor
LSD1	Lysin-spezifische Histon Demethylase 1
MAPK	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase
Meis1	Meis Homebox Protein 1
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
miR-193b	MicroRNA-193b
MOI	Multiplicity of infection
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger RNA
mTORC1	mTOR Complex 1

PI.1	Protease Inhibitor 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PML	Promyelozytische Leukämie
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RARA	Retinsäurerezeptor alpha
RARE	Retinsäure Response Elemente
RXR	Retinoid X Rezeptor Protein
STAT5	Signalüberträger und Aktivator der Transkription 5
TCP	Tranylcypromin
TF	Transkriptionsfaktor
TRM	Therapie assoziierte Mortalität
UTR	Untranslatierte Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation

6 Einleitung

6.1 Akute Myeloische Leukämie

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei der klonale Subpopulationen der myeloischen Linie akkumulieren. Sie wird definiert ab einem Anteil von mindestens 20% Myeloblasten im Knochenmark oder Blut (1). AML kann de novo oder sekundär aus einem myelodysplastischen Syndrom entstehen (2). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet in ihren aktualisierten Richtlinien aus 2016 zwischen sechs verschiedenen Formen. Auch unabhängig von der Myeloblastenzahl führen bestimmte genetische Abnormalitäten zur Diagnosestellung einer AML (3).

AML ist insbesondere eine Erkrankung des Alters. In 2015 war in den USA die Inzidenz der AML-Fälle, bezogen auf 100.000 Einwohner, bei über 65-Jährigen beinahe zehnmal so hoch wie bei der Bevölkerung unter 65 Jahren (4). Mit über 80% aller akuten Leukämien bei Erwachsenen stellt AML den größten Vertreter dieser Gruppe dar (5).

Die AML entsteht aus präleukämischen Stammzellen. Diese können zu verschiedenen leukämischen Zelltypen differenzieren, sodass innerhalb eines Individuums unterschiedliche leukämische klonale Subpopulationen entstehen können. Dies und die Tatsache, dass die präleukämischen Stammzellen eine Rolle in der Behandlungsresistenz spielen, da sie in der Lage sind Chemotherapien zu überstehen, macht die Behandlung der Erkrankung umso komplexer (6).

Selten entsteht die AML kausal nachvollziehbar als Folge von Chemotherapie oder Exposition gegenüber gewissen chemischen Substanzen; der Großteil jedoch durch spontane genetische Veränderungen, wie beispielsweise Chromosomen-Abnormalitäten oder isolierte genetische Mutationen (7). Genetische Veränderungen sind bei über 97% der AML-Fälle vorhanden (8). Nach dem klassischen Model zur Entstehung der AML sind zwei Arten von Mutationen für die Pathogenese entscheidend: Zum einen Mutationen, die dazu führen, dass proliferative Signalwege überaktiviert sind; zum anderen Mutationen, die dazu führen, dass die normale hämatopoetische Differenzierung nicht mehr stattfinden kann (9).

Neben genetischen Veränderungen spielen auch epigenetische Veränderungen bei der Leukämie-Entwicklung eine Rolle, die wiederum die Proliferation und

Differenzierung der Zellen beeinflussen können. Nennenswert sind in diesem Kontext mutierte Gene, die die DNA-Methylierung beeinflussen, wie zum Beispiel DNMT3A oder TET2. Solche Mutationen lassen sich in über 40% aller AML-Fälle finden (8, 10).

Es ist hervorzuheben, dass vor allem die Kombination verschiedener Mutationen innerhalb eines Individuums prognostisch entscheidend ist. Die Prognose einer einzelnen Mutation für den Krankheitsverlauf kann durch die An- oder Abwesenheit einer anderen Mutation stark beeinflusst werden (11).

Durch die große Heterogenität von AML ist die Erkrankung schwer therapierbar. Fortschritte bei der Behandlung von AML führten zwar zur Verbesserung der Prognose für junge Patienten, ältere Patienten jedoch, die den Großteil aller AML-Fälle ausmachen, haben immer noch eine schlechte Prognose (12).

Die generelle 5-Jahres-Überlebensrate von AML liegt bei unter 50% und nur 20% der älteren Patienten sind 2 Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben (13). Innerhalb des ersten Jahres nach Diagnose versterben 70% der über 65-jährigen Patienten an der Erkrankung (14). Eine Erklärung für die schlechtere Prognose für ältere Patienten könnte sein, dass einige von ihnen tatsächlich eine sekundäre AML haben. Ungefähr ein Drittel der Patienten mit klinisch diagnostizierter primärer AML weist Mutationen auf, die spezifisch für sekundäre AML sind. Dies zeigt sich auch darin, dass diese Patienten eine Prognose aufweisen, die der von sekundärer AML ähnelt (15).

Bei Rezidiven präsentiert sich eine deutlich schlechtere Prognose: Die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Rezidiven beträgt nur 5-20% (16). Für solche rezidivierenden, therapierefraktären AML-Formen sind bisher keine effizienten Therapieansätze vorhanden (17). Refraktäre AML wird dadurch definiert, dass bereits zwei Durchgänge der Standard-Induktionstherapie fehlgeschlagen sind (3).

Patienten kann man bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung während einer Therapie in drei prognostische Risikogruppen einteilen: günstig, mittel und ungünstig. Diese Klassifikation basiert auf der Zytogenetik und den Mutationen der Leukämie-Zellen (3). Bei der Entscheidung für eine geeignete Therapie gilt es Überlebenswahrscheinlichkeit, Wahrscheinlichkeit auf Therapieansprechen sowie individuelle Risikofaktoren für beispielsweise Therapie

assoziierte Mortalität (TRM) miteinander abzuwägen. TRM wird klassischerweise als Tod in den ersten 30 Tagen nach Beginn der Induktionstherapie definiert (18). Es gibt bestimmte klinische Faktoren, welche mit einer geringeren Rate an Remission und niedrigerer genereller Überlebenswahrscheinlichkeit korrelieren. Dazu zählen insbesondere ein erhöhtes Alter und eine schlechte physische Verfassung (12, 19).

Für Patienten mit mittlerem und günstigem zytogenetischen Risikoprofil, die ein niedriges Risiko für Behandlungs-assoziierten Tod aufweisen, stellt die sogenannte „7+3“ – Therapie den Standard für die Induktionstherapie dar. Diese beinhaltet eine siebentägige Infusion mit Cytarabin, in Kombination mit Anthrazyklinen für drei Tage (20). Bei Patientengruppen mit mittlerem bzw. günstigem Risikoprofil führt die 7+3-Induktionstherapie zu kompletter Remission der Erkrankung in 50-60% bzw. bei bis zu 80% aller Patienten (21). Für ältere Patienten über 65 Jahre konnte bisher noch kein optimales Therapieregime entwickelt werden, da sie häufig ein ungünstiges zytogenetisches Risikoprofil aufweisen. Sie sind anfälliger für Behandlungs-assoziierte Toxizität und können daher keine optimale Chemotherapie oder Stammzelltransplantation erhalten (22). Die 7+3-Therapie führt bei ungünstigem Risikoprofil-Patienten lediglich in etwa 40% der Fälle zu einer kompletten Remission und die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit nach Diagnose beträgt etwa 12 bis 18 Monate (23). Für das Therapieversagen - und damit die hohe Mortalität - ist als wichtigster Faktor die Behandlungsresistenz der leukämischen Zellen gegenüber den Therapeutika zu nennen. Sie äußert sich durch ein Rezidiv nach temporärer Remission (24).

Um den Therapieerfolg nach Induktion zu kontrollieren, wird die sogenannte minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) gemessen. Die Messung erfolgt entweder mittels qPCR oder Durchflusszytometrie. Wenn geeignete molekulare Marker vorhanden sind, ist die qPCR sensitiver für verbleibende leukämische Zellen als die Durchflusszytometrie. Eine Remission mit nicht nachweisbarer MRD wird gegenüber Remission mit MRD als überlegen eingestuft, weil dies mit einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht (3).

Sobald eine komplette Remission erreicht ist, wird eine Post-Remissionstherapie bzw. eine Konsolidierungstherapie durchgeführt. Ziel ist es, damit einen Rückfall der AML zu verhindern. Hierfür stehen zwei gängige Methoden zur Verfügung: 1. Fortgeführte Chemotherapie (z.B. Hochdosis Cytarabin) mit oder ohne targeted Therapie und 2. Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation. Die Entscheidung ist individuell zu treffen (23). Die Konsolidierungstherapie für Patienten mit günstigem Risikoprofil besteht aus Chemotherapie, während für die beiden anderen Risikoprofile, unabhängig vom Alter, allogene Stammzelltransplantation zur Konsolidierung in der ersten kompletten Remission am effizientesten scheint (25–29). Bei Patienten, für die nur noch palliative Behandlung in Frage kommt sowie bei Patienten mit ungünstigem zytogenetischen Risikoprofil sollte man Azacitidin in die Therapie mit einbeziehen (30).

Zusammenfassend kann man sagen, dass insbesondere durch die Kombination von neuartigen „targeted-Therapie“-Medikamenten mit der traditionellen 7+3-Induktionstherapie, die Behandlung der günstigen und mittleren Risikoprofilgruppen in den letzten Jahren weiter optimiert werden konnte. Therapie der Patienten mit ungünstigem Risikoprofil stellt hingegen weiterhin eine große Herausforderung in der AML-Behandlung dar.

Einige Medikamente, die zunächst vielversprechend schienen, enttäuschten leider in klinischen Studien. CPX351 und Venetoclax + ein hypomethylierender Wirkstoff konnten kürzlich vielversprechende Resultate erzielen und lassen Hoffnung zu (23).

Das Ziel besteht in Zukunft darin, für jeden AML-Patienten eine personalisierte, individuelle Therapie, je nach genomischem Profil, anbieten zu können (23).

6.2 Akute Promyelozyten Leukämie

Akute Promyelozyten Leukämie ist eine Form der AML und stellt etwa 10-15% aller AML-Fälle dar (31). Charakteristisch für die APL ist die t(15;17)(q24;q21) Translokation, bei der es zur pathologischen Fusion der Gene Promyelozytische Leukämie (PML) und Retinsäurerezeptor alpha (RARA) kommt (32).

Dabei entsteht das onkogene Fusionsprotein PML-RARA, das bei etwa 98% aller APL-Fälle vorhanden ist (31). PML-RARA führt zu einem myeloischen Differenzierungsblock, sodass die Differenzierung im Rahmen der Myelopoese auf dem

Stand von Promyelozyten endet (32). Morphologisch wird es durch das Französisch-Amerikanisch-Britische (FAB) System als AML-M3 klassifiziert (33).

Der nukleäre Hormonrezeptor RARA bildet, zusammen mit dem Retinoid X Rezeptor Protein (RXR), einen Heterodimer. Zusammen stellen sie einen Transkriptionsaktivator dar, der an die Retinsäure Response Elemente (RARE) bindet (34). Die Aktivierung der Transkription ist essenziell für die physiologische Differenzierung der Promyelozyten. In Abwesenheit von ATRA bewirkt der RAR-RXR-Heterodimer eine Repression der Transkription, indem er Co-Repressoren rekrutiert. Wenn der Ligand (ATRA) vorhanden ist, bindet er an seinen Rezeptor, wodurch sich die Co-Repressoren lösen und es in der Folge zu einer Aktivierung der Transkription kommt (35). Bei der APL sind jedoch deutlich höhere Konzentrationen von ATRA notwendig, als sie physiologisch vorkommen. Therapeutische ATRA-Konzentrationen führen neben einer Transkriptionsaktivierung, durch Dissoziation der Co-Repressoren von PML-RARA, ebenfalls zu einer Degradation des Fusionsproteins (35, 36).

Sobald ein Verdacht auf APL besteht, ist eine frühzeitige stationäre Therapie mit ATRA zu empfehlen, um das Risiko von früher Mortalität, also das Sterben bereits vor oder kurz nach Behandlungsbeginn, möglichst zu reduzieren. Der Verdacht muss genetisch durch erfahrene Labore bestätigt werden (37). Die häufigsten Gründe für frühe Mortalität sind intrazerebrale und pulmonale Blutungen. Ursächlich hierfür sind komplexe Koagulopathien, die mit der Erkrankung APL einhergehen (37). Daher sollte bereits bei Verdacht auf APL unverzüglich Fibrinogen, Thrombozyten und Plasma transfundiert werden, bis sowohl klinisch als auch laborchemisch, keine Anzeichen mehr für eine Koagulopathie zu erkennen sind (37).

Vor der Entwicklung von ATRA als Therapeutikum bei APL, bis etwa Mitte der 1980er, war APL eine Erkrankung mit sehr hoher Sterblichkeit (33).

Seit der Entdeckung von ATRA für die APL-Behandlung konnte die Prognose für die Patienten drastisch verbessert werden. Mit ATRA-basierten Therapieverfahren gibt es kaum noch Therapieresistenz in der APL-Behandlung, sodass eine komplette Remission in 90-95% aller Patienten mit genetisch bestätigtem PML-RARA erreicht wird. Die Langzeit-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt

heutzutage 85-90% (37–39). Bei einem Großteil der Patienten mit PML-RARA führt eine Behandlung mit ATRA zu einer Ausdifferenzierung der unreifen leukämischen Promyelozyten zu reifen Granulozyten (31).

Da es zu Beginn der Therapie zu einer massiven Differenzierung der zuvor differenzierungsgeblockten Promyelozyten kommen kann, besteht die Gefahr eines APL-Differenzierungssyndroms. Sofern sich nach Therapiebeginn Zeichen für das APL-Differenzierungssyndrom erkennen lassen, sollten unverzüglich Kortikosteroide verabreicht und die aktuelle Therapie diskontinuuiert werden. Sobald das Syndrom nicht mehr nachweisbar ist, kann die Therapie fortgeführt werden (37).

Die heutige Standardinduktionstherapie für Patienten mit niedrig- oder mittelrisikanter APL beinhaltet die Kombination von ATRA und Arsentrioxid (ATO). In Ländern, in denen ATO nicht verfügbar oder zu teuer ist, stellt der ältere Algorithmus von ATRA + Chemotherapie ebenfalls eine akzeptable Option dar (37), ist ATRA + ATO jedoch unterlegen (38–40). Idarubicin oder Daunorubicin + Cytarabin, bzw. Hydroxyurea, Idarubicin oder Gemtuzumab Ozogamicin stellen die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika dar (37). Das gute Zusammenwirken von ATRA und ATO begründet sich darin, dass sie verschiedene molekulare Wirkweisen haben; während sich ATO gegen PML richtet, wirkt ATRA am RARA (33). ATRA wirkt auf transkriptioneller Ebene und ATO auf Proteom-Ebene (41). Hochrisiko-APL-Patienten werden definiert ab einer Leukozytenzahl im Blut von über $10 \times 10^9/L$. Für diese Patientengruppe stehen prinzipiell zwei Therapieansätze für die Induktionstherapie zur Verfügung: 1. ATRA + ATO + Chemotherapie und 2. ATRA + Chemotherapie. Obwohl sich keiner der beiden Ansätze bisher als überlegen herausgestellt hat, wird häufig die zweite Option angewandt, da ATO in den USA und in Europa nicht für die Behandlung von Hochrisiko-Patienten zugelassen ist (37).

Zur Konsolidierung sowie zur Behandlung von Rückfällen werden, je nach Therapieansatz, ebenfalls eine Kombination aus ATRA, ATO und Chemotherapie empfohlen. Das Ziel der Rückfallbehandlung ist ein erneutes Erreichen von molekularer Remission, um anschließend eine hämatopoetische Stammzelltransplantation durchzuführen (37).

Zur Therapiekontrolle kann auch bei der APL die MRD gemessen werden. Hierfür überprüft man per qPCR das Vorhandensein von PML-RARA. Sollte die Messung keine MRD aufweisen, ist dies ein prognostischer Indiz für eine Langzeitremission, während der Nachweis von PML-RARA höchstwahrscheinlich auf einen Rückfall der Erkrankung hindeutet (42).

6.3 MicroRNAs und ihre Rolle in Tumorerkrankungen

MicroRNAs (miRs) sind 18-25 Nukleotide lange und nicht kodierende RNAs (43) und können die Genexpression auf posttranskriptionellem Level beeinflussen. Um die Genexpression runterzuregulieren, haben miRs zwei Möglichkeiten; Sie induzieren entweder eine Degradation der Messenger RNA (mRNA), oder inhibieren die Translation (44, 45). Welche der beiden Möglichkeiten abläuft, hängt davon ab, wie komplementär sie zu ihrer Binde-Zielsequenz sind (46).

Es gibt weit über 1000 verschiedene MicroRNAs. Pro miR-Familie gibt es schätzungsweise 500 verschiedene Zielsequenzen in verschiedenen Genen, wodurch jede einzelne miR Hunderte von Genen „downstream“ beeinflussen kann. Dadurch wird geschätzt, dass ungefähr ein Drittel des gesamten humanen Genoms durch miRs reguliert wird (47).

Die Synthese von miRs beginnt damit, dass sie meist durch die RNA Polymerase II zu langen Primärtranskripten transkribiert werden, die einige Kilobasen lang sind und sich pri-miRNA nennen (48). Diese werden im Nukleus durch einen Mikroprozessorkomplex, der unter anderem die RNase Drosha beinhaltet, zur sogenannten pre-miR geschnitten, welche etwa eine Länge von 70 Nukleotiden aufweist (49, 50). Nachdem das eine Ende der reifen miR bereits durch die Prozessierung durch Drosha im Nukleus stattgefunden hat, wird das andere Ende der miR, nach Transport ins Zytoplasma, durch die RNase Dicer geschnitten. Dabei entstehende reife miRs sind 18-25 Nukleotide lang. Je miR gibt es einen dominanten Strang, der zu den Zielsequenzen komplementär ist und einen nicht-dominanten Strang ohne biologische Funktion (50).

MicroRNA-Level sind häufig dysreguliert in Tumorerkrankungen, wodurch zellbiologische Prozesse wie die Proliferation oder Apoptose beeinflusst werden.

Durch Beeinflussung von Tumorsuppressor- und Onkogenen spielen sie eine Rolle in der Tumorentwicklung (47, 51). MiRs, die in die Tumorigenese involviert sind, als Onkogene oder als Tumorsuppressoren, werden auch oncomiRs genannt (52).

Sie eignen sich gut als prognostische Marker für Tumorerkrankungen, da sie sowohl in fixierten Geweben als auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können (53, 54). MiR-Profile können Informationen darüber geben, ob es sich um einen Tumor oder normales Gewebe handelt, um welche Tumor-Untergruppe es sich handelt und sogar Informationen über das Therapieansprechen und den Therapieerfolg geben (55).

Aufgrund ihrer wesentlichen Rolle bei der Tumorentstehung hat sich seit einigen Jahren ein großes Interesse an miRs als potenzielle Therapeutika entwickelt. MicroRNA-basierte Therapieverfahren haben den Vorteil, dass sie viele unterschiedliche Gene beeinflussen können. Damit gehen allerdings auch mitunter die schwierigsten Hindernisse in der miR-Therapie einher, nämlich off-target-Effekte und dadurch resultierende Sicherheitsrisiken (47, 56). Insbesondere durch das unspezifische Binden an nur teilweise komplementäre Sequenzen, kann es zur Degradierung von mRNAs kommen (57). Ein weiteres Problem beim Einsatz von exogenen miRs stellt die Sättigung der endogenen RNAi-Verarbeitungsmechanismen dar, wodurch es weitreichende off-target-Effekte bei der Prozessierung vieler miRs geben kann (58). Hinzu kommt das Problem eines effizienten und sicheren Transports der miRs in das Gewebe und die Tatsache, dass sie in vivo eine geringe Stabilität aufweisen. Um das Problem der niedrigen Stabilität zu reduzieren, versucht man beispielsweise die miRs durch chemische Modifikationen vor einer schnellen Degradierung zu schützen. Um die miRs zielgerichtet transportieren zu können, kann man für den Tumor spezifische Liganden an die Transportpartikel binden (47).

Es werden häufig Vektor-Transportsysteme genutzt, da miRs aufgrund ihrer Ladung sowie der Ladung der Zellmembran eine schlechte Zellaufnahme aufweisen. Die grundsätzlich aktuell genutzten Verfahren sind zum einen virale und zum anderen synthetisch hergestellte Transportsysteme. Während letztere einfach herzustellen sind und eine geringere Immunität aufweisen, zeigen sie auch eine geringe Effizienz. Virale Systeme hingegen sind deutlich effektiver, induzieren

jedoch eine starke Immunantwort und weisen oft eine unspezifische Aufnahme in das Gewebe auf (59, 60). Die am häufigsten zum Transport genutzten nicht-viralen Vektorsysteme sind lipid-basierte Nanopartikel (61). Eine starke Immunreaktion spielt besonders bei Adenovirus-basierten viralen Transportsystemen eine Rolle. Zudem führt sie nur zu einer kurzfristigen Veränderung der miR-Expression. Auf der anderen Seite würde eine Integration ins Genom durch Lentiviren ein zu großes Sicherheitsrisiko darstellen (62). Unabhängig von den Transportmethode führen exogen zugeführte miRs zu einer Aktivierung des Immunsystems und werden häufig phagozytiert (63).

Es gibt zwei grundsätzliche Therapieprinzipien der miR-Therapie: 1. Endogene miRs reduzieren, die überexprimiert sind und 2. Endogene miRs erhöhen, die herunterreguliert sind. Dies kann entweder durch eine direkte Inhibition oder Ersatz geschehen, oder aber indirekt, indem die miR-Expression beeinflusst wird. Eine einfache Methode, um die miR-Level zu reduzieren, ist der Einsatz von antagonomiRs. Dies sind Oligonukleotide, die komplementär an miRs binden, wodurch diese wiederum nicht an ihre Zielsequenzen binden können. Auf der anderen Seite kann man miR-mimics verwenden, die die gleiche Sequenz wie die miRs aufweisen, um ihr Level zu erhöhen (47).

MiRs sind in der Lage Tumore gegenüber Medikamenten zu sensitivieren (64). Außerdem können sie aufgrund ihrer Fähigkeit an verschiedene Ziele entlang von Resistenz-Kaskaden zu binden der Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten vorbeugen, insbesondere der von Chemotherapeutika (65).

MRX34 stellt den ersten miR-mimic dar, der in klinischen Studien untersucht wurde. Er ist ein mimic der tumorsuppressiven miR-34 und wurde unter anderem in der Therapie von Nieren- und Lebertumoren eingesetzt. Nachdem zunächst vielversprechende Resultate erzielt werden konnten, musste die Studie leider vorzeitig beendet werden, da vereinzelt schwere, zum Tode führende Nebenwirkungen aufgetreten sind (66).

6.4 MiR-193b als Tumorsuppressor in AML

Zu der miR-193b-Familie gehört miR-193a und miR-193b, die sich jeweils auf Chromosom 17, bzw. 16 befinden. Sie sind beide 22 Nukleotid lange nicht-kodierende RNAs. Aus der pre-miR-193b, die etwa 70 Nukleotide lang ist, entsteht die miR-193b-3p und die miR-193b-5p, von denen der 3p-Strang den Dominanten bildet (67). MiR-193 kann die Zellzyklusregulation und die Proliferation in normalen Zellen einschränken, ist aber auch an der Krankheitsentwicklung verschiedener Erkrankungen beteiligt. Die miR-193-Familie beeinflusst u.a. Nieren- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie die Pathogenese von Parkinson und Schizophrenie (67). Des Weiteren beeinflusst sie die Tumorigenese verschiedener Tumortypen, indem sie bestimmte Gene herauf- oder herunterreguliert, die u.a. Proliferation und Metastasierung in Tumorzellen beeinflussen (67). Sie spielt beispielsweise eine Rolle beim malignem Melanom (68), Pankreaskarzinom (69), Brustkrebs (70, 71), akuter lymphoblastischer T-Zell Leukämie (72), Ovarialkarzinom (73), Magenkarzinom (74), Prostatakarzinom (75), Kolorektalkarzinom (76), Hepatozellulärem Karzinom (77) und Gliom (78).

Die MicroRNA-193b steht seit Jahren im Mittelpunkt von Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe; sowohl ihre Rolle im Rahmen der Hämatopoese als auch in AML. Wir konnten zeigen, dass unkontrollierte Expansion hämatopoetischer Stamm- und Vorläufer-Zellen mittels Inhibition von Zytokinrezeptor-Signalwegen wie Signalüberträger und Aktivator der Transkription 5 (STAT5), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT) und MAPK/Extracellular-signal regulated kinases (Erk) durch miR-193b begrenzt wird (79).

Weiterhin konnte meine Arbeitsgruppe miR-193b als einen zentralen Tumorsuppressor in der AML identifizieren, der in allen Subtypen der AML herunterreguliert ist, mit Ausnahme der t(15;17) Akuten Promyelozytischen Leukämie. Niedrige miR-193b-Level korrelieren mit einer geringeren Überlebenszeit, sowohl bei pädiatrischen als auch bei adulten AML-Patienten. MiR-193b ist ein wichtiger, unabhängiger prognostischer Biomarker, selbst in Hochrisiko-Patientengruppen. Die Abwesenheit von miR-193b führte in murinen Hoxa9 /Meis1-induzierten Leukämie-Modellen zu einer progredienten leukämischen Entartung und einer verringerten Überlebenszeit von Empfängermäusen. Eine Re-Expression von miR-

193b hingegen bewirkte eine Verhinderung des leukämischen Wachstums (80). Nach Transduktion von AML-Patientenzellen wiesen die Zellen in vitro sowie bei Xenotransplantationsmodellen in Mäusen, eine geringere Proliferation auf (80). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die miR-193b in der AML als Tumorsuppressor fungiert. Die molekularen Ursachen dieses Effektes wurden ebenfalls untersucht. MiR-193b induziert einen G1/S-Phasen-Block, indem sie unterschiedliche Schritte des MAPK-Signalwegs und den Zellzyklusregulator Cyclin D1 (CCND1) direkt inhibiert, was zu der beobachteten erhöhten Apoptose-rate führt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von miR-193b ebenso wie in normalen hämatopoetischen Zellen, auch in leukämischen Zellen zur Hyperaktivierung von STAT5-, AKT- und Erk-Signalwegen führt.

Vorteilhaft an miR-193b ist, dass die tumorsuppressive Wirkung unabhängig vom Alter und, mit Ausnahme der t(15;17)-positiven Leukämien, unabhängig vom zygotischen AML-Subtyp ist. Gepaart mit der für miRs charakteristischen Eigenschaft, an verschiedene Stellen entlang einer Signalkaskade binden zu können (80), wodurch seltener Resistenzen entstehen, macht dies die miR-193b zu einer interessanten und vielversprechenden therapeutischen Zielstruktur.

6.5 Die Rolle der miR-193b bei GSK-LSD1-vermittelter LSD1-Inhibition

Aufgrund der Tatsache, dass es bislang noch keine zuverlässigen und effektiven Methoden gibt, miRs für therapeutische Zwecke in die Zellen zu schleusen, haben wir uns für die Strategie entschieden, die endogene Expression von miR-193b in AML-Zellen pharmakologisch zu erhöhen. Mein Promotionsprojekt basiert auf bisherigen Ergebnissen von Esther Braun, die bei einem Drug Library-Screening mittels Durchflusszytometrie (u.a. eine epigenetische Substanzenbibliothek und eine Bibliothek mit Food-and-Drug-Administration-genehmigten Substanzen) verschiedene Moleküle identifiziert hat, die die endogene miR-193b-Konzentration in AML-Zelllinien erhöhen (81). Hierfür haben wir einen lentiviralen Expressionsreporter (Vektor) entworfen, der die endogenen Expressionslevel der miR-193b mittels Grün fluoreszierendem Protein (GFP)-Fluoreszenz anzeigt. Dieser Vektor enthält am 3' Ende der Untranslatierten Region (UTR) eines destabilisierten GFPs (d2GFP) Zielsequenzen der miR-193b. Je höher die miR-

193b-Konzentration ist, desto weniger GFP wird exprimiert, da die mRNA degradiert wird. Dadurch entsteht eine inverse Korrelation zwischen der miR-193b und der GFP-Expression, gemessen auf Einzelzellebene mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) (82). Die Expression des GFP-Reporters wird durch einen bidirektionalen Promoter gesteuert, um eine interne vektorbasierte Genexpressionskontrolle mit dem Oberflächenprotein Low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) zu bewirken.

Insgesamt haben wir über 1000 Substanzen in drei verschiedenen Substanzbibliotheken gescreent. Im Rahmen der epigenetischen Substanzbibliothek, die 48 Substanzen beinhaltet, konnten wir JQ-1, GSK-LSD1, SGC-0946 und TP-064 identifizieren, die zu einer reproduzierbaren und statistisch signifikanten Abschwächung des GFP-Signals führten. Mittels qPCR konnten wir die Hochregulation der miR-193b durch die Inhibitoren GSK-LSD1 und TP-064 zeigen. Weiterhin führten die irreversiblen LSD1-Inhibitoren TCP, AW69 und Namoline durchflusszytometrisch zu Abschwächung des GFP-Signals. Von diesen Wirkstoffen konnte AW69 per qPCR als miR-193b-steigernd identifiziert werden. Die einzige Substanz, die über das Screening hinaus sowohl bei der Zelllinie ML-2 als auch MOLM-13 mittels qPCR als miR-193b-steigernd identifiziert werden konnte, ist der irreversible LSD1-Inhibitor GSK-LSD1 (81). Wir wählten diese Zelllinien aus, da sie auch von Bhayadia et al. genutzt wurden, als die tumorsuppressive Wirkung der miR-193b aufgezeigt wurde (80).

Die Methyltransferase bzw. Lysin-spezifische-Demethylase LSD1 (auch KDM1A genannt) ist ein epigenetischer Regulator, der Methylierungen beeinflusst. Sie ist schon länger als onkogenes Protein bei der AML-Entstehung bekannt. Eine Inhibition dieses Proteins konnte in murinen AML-Leukämie-Modellen eine Differenzierung bewirken sowie zu einer Verringerung von leukämischen Stammzellen führen. Damit ist sie als potenzielle Zielstruktur für Therapeutika von Interesse (83). Neben AML sind noch weitere Tumorerkrankungen bekannt, in denen an LSD1 als möglicher therapeutischer Zielstruktur geforscht wird. Darunter fallen beispielsweise Prostata- und Brusttumore (84). Zudem fungiert LSD1 als Regulator der Hämatopoese, indem er für die Hämatopoese essenzielle Gene, wie

Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor (GFI1b), Meis1 und Hoxa9 moduliert (85).

An unserem Institut konnte von Barth et al. gezeigt werden, dass irreversible LSD1-Inhibition - unter anderem durch GSK-LSD1 - neben einer Differenzierungsinduktion auch zu einem Überlebensvorteil sowie zu einer gesteigerten ATRA-Sensitivität in murinen Hoxa9/Meis1-Leukämiemodellen führt (86). Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass irreversible LSD1-Inhibition zu einer Sensitivierung gegenüber ATRA führt, differenzierungsinduzierend wirkt und das Engraftment von AML-Zellen nach Transplantationsexperimenten verringerte (87).

Außerdem konnten Barth et al. zeigen, dass eine Expressionsregulation verschiedener Gene, wie z.B. GFI1B und Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8), durch LSD1 stattfindet. Diese werden wiederum durch die myeloischen Transkriptionsfaktoren GFI1 und Protease Inhibitor 1 (PI.1) reguliert (86). Einige irreversible LSD1-Inhibitoren konnten die beschriebenen Effekte erzielen; reversible LSD1-Inhibitoren hingegen nicht. Reversible Inhibitoren inhibieren lediglich temporär die enzymatische Aktivität von LSD1, während die irreversiblen Inhibitoren durch ihre dauerhafte Bindung auch die strukturelle Funktion bzw. Interaktion von LSD1 unterdrücken. Die strukturelle Funktion von LSD1 besteht darin, dass es über den Transkriptionsfaktor (TF) GFI1 als Mediator zu den Zielen des TF PU.1 rekrutiert wird und schließlich zu deren Repression führt. Durch Transplantationsversuche in Mäusen mit einem homozygoten, konditionalen, enzymatisch inaktiven LSD1 Knock-In- (KI) Gen haben Barth et al. herausgefunden, dass zu therapeutischen Zwecken insbesondere die strukturelle Funktion von LSD1 inhibiert werden muss. Das enzymatisch inaktive LSD1 führte zwar ebenfalls zu einer Differenzierung, jedoch nicht zu einem Überlebensvorteil der Mäuse (86).

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Vinyard et al. Auch sie zeigten, dass für den tumorsuppressiven Effekt in AML nicht die enzymatische Funktion von LSD1 relevant ist, sondern seine strukturelle Funktion. LSD1-Inhibitoren entfalten somit ihre antileukämische Wirkung nicht durch Hemmung der Enzymaktivität, sondern durch Blockade der strukturellen Interaktion von LSD1 und den für die Differenzierung notwendigen Transkriptionsfaktoren (88).

Einige LSD1-Inhibitoren werden gegenwärtig klinisch erforscht. Der irreversible LSD1-Inhibitor Tranylcypromin wird aktuell in klinischen Studien der AML-Therapie untersucht (89).

Esther Braun konnte zeigen, dass miR-193b in AML-Zellen eine essenzielle Rolle bei der durch LSD1-Inhibitoren induzierten Differenzierung und Proliferationsreduktion spielt. Der irreversible LSD1-Inhibitor GSK-LSD1 bewirkt bei Hoxa9/Meis1-transduzierten miR-193b Knock-Out- (KO) Zellen aus murinem Knochenmark sowohl einen geringeren antiproliferativen Effekt als auch einen geringeren Grad an Differenzierungsinduktion. Dabei wurde der Grad der Differenzierung mittels des Differenzierungsmarkers c-kit bestimmt (81), der schon von Barth et al. zur Messung der differenzierungsinduzierenden Wirkung von LSD1-Inhibitoren in murinen Hoxa9/Meis1 Zellen genutzt wurde (86). Dies lässt den Schluss zu, dass miR-193b kausal an der mechanistischen Umsetzung des therapeutischen Effekts von LSD1-Inhibitoren beteiligt ist, bzw. die antileukämische Wirkung von GSK-LSD1 über miR-193b mediiert wird (81). Erniedrigte miR-193b-Expression könnte somit ein Biomarker zur Identifizierung von Patienten sein, die von einer LSD1-Inhibitor-Therapie profitieren könnten.

6.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war, die Rolle der miR-193b in AML und APL sowie in der Wirkungsumsetzung der beiden Wirkstoffe GSK-LSD1 und ATRA zu erforschen.

Die Hypothese, dass ein Teil der Wirkung von GSK-LSD1 über die miR-193b mediiert wird, wurde basierend auf Daten in murinen Zellen abgeleitet. Daher sollte ein Ziel dieser Arbeit sein, die Übertragbarkeit dieser Hypothese auf die humanen AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 zu verifizieren. Hierdurch sollte zudem ein tieferes Verständnis über die Wirkweise der Substanzen und über die molekularen Mechanismen der miR-193b-Verringerung erlangt werden. Die gleiche Fragestellung sollte auch bei der APL-Zelllinie NB-4 untersucht werden.

Die miR-193b ist bei Patienten mit APL als einziger AML-Entität erhöht. Daraus wurde die Hypothese einer protoonkogenen Eigenschaft der miR-193b in APL entwickelt. Dies zu überprüfen, sollte Gegenstand dieser Arbeit sein. APL ist die einzige AML-Form, bei der ATRA klinisch zum Einsatz kommt. Daher war ein weiteres Ziel der Arbeit, die Notwendigkeit des erhöhten miR-193b-Niveaus in APL für die Wirkung von ATRA zu untersuchen. Ebenso sollte eine potenzielle Rolle der miR-193b in dem Behandlungseffekt von ATRA in AML-Zelllinien erforscht werden.

Neben der Rolle der miR-193b bei den Wirkungen von GSK-LSD1 und ATRA, war ein Ziel der Arbeit, einen potenziellen Synergismus zwischen den Wirkstoffen und der miR-193b zu untersuchen. Hierdurch sollten Informationen für ein tieferes molekulares Verständnis der Wirkweisen der beiden Substanzen sowie der miR-193b gewonnen werden. Außerdem kann ein tieferes Verständnis über die Mechanismen eines potenziellen Synergismus perspektivisch von Interesse sein, sobald eine effiziente Einschleusung von miRs in Patienten möglich sein wird. Die miR-193b wäre wegen ihrer für einen Wirkstoff günstigen Eigenschaften ein interessantes Kombinationstherapeutikum: MiRs generell wirken entlang verschiedener Ziele einer Signalkaskade, wodurch eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlicher ist. Die miR-193b ist ein Tumorsuppressor in verschiedenen AML-Alters- und Schwereklassen und fungiert gut als prognostischer Biomarker.

7 Materialien

7.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
ML-2	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
MOLM-13	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
MOLM-14	Arbeitsgruppe Prof. Michael Rieger, Frankfurt
NB-4	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

7.2 Lentiviren

Tabelle 2: Verwendete Lentiviren

Lentivirus	Herkunft
Kontrollvektor (5172)	Arbeitsgruppe Prof. Michael Rieger, Frankfurt
MiR-193b-Überexpressionsvektor (5534)	Arbeitsgruppe Prof. Michael Rieger, Frankfurt

7.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Ethanol, absolut (≥99,8 %)	Roth
FACS Clean	Becton Dickinson
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson

Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
GlutaMAX 100x (100 ml)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffered Saline (PBS), 1X	Gibco, Thermo Fisher Scientific
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG	Thermo Fisher Scientific
Trypanblau-Lösung, 0,4%	Sigma-Aldrich

7.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
APC anti-human CD11b, Klon D12	BD Bioscience
APC-H7 anti-human CD14, Klon MφP9	BD Bioscience
BV421 anti-human CD16, Klon 3G8	BD Bioscience
eBioscience™ Viability Dye eFluor™ 506	Thermo Fisher Scientific
LIVE/DEAD™ Fixable Red Dead Cell Stain Kit, for 488 nm excitation	Thermo Fisher Scientific
PE anti-human CD13, Klon L138	BD Bioscience
PerCP-Cy™5.5 anti-human CD16, Klon 3G8	BD Bioscience

7.5 Primer

Tabelle 5: Verwendete Primer für die qPCR

Primer	Hersteller
TaqMan™ MicroRNA Assay hsa-miR- 193b-3p	Thermo Fisher Scientific
TaqMan™ MicroRNA Assay RNU48	Thermo Fisher Scientific

7.6 Substanzen

Tabelle 6: Verwendete Substanzen

Substanz	Herkunft
GSK-LSD1	Sigma-Aldrich
Retinsäure (ATRA)	Sigma-Aldrich

7.7 MicroRNA-Inhibitoren

Tabelle 7: Verwendete MicroRNA-Inhibitoren

Inhibitor	Herkunft
Hsa-miR-193b-3p miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor, 5' FAM-markiert	Qiagen
MiRCURY LNA miRNA Power Inhibitor Control B, 5' FAM-markiert	Qiagen

7.8 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Qiagen miRNeasy Mini Kit	Qiagen
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific

7.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual-Chamber	Bio-Rad
Cryotubes (1 und 2 ml)	Thermo Fisher Scientific
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One

Falcon Zentrifugenröhrchen (5, 15, 50 ml) Greiner Bio-One

Gefrierbox	neoLab
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
PCR-Reaktionsröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Pipetten P2, P10, P200, P1000	Gilson
Pipettenspitzen 10, 100, 200, 1000µl	Gilson
Round Bottom Röhrchen, 14 ml	Greiner Bio-One
Schutzhandschuhe (Latex, Nitril)	Meditrade
Sterile Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar
Zählkammer C-Chip, Neubauer improved	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Cellstar
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Greiner Bio-One

7.10 Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACSCelesta	Becton Dickinson
BD LSRFortessall	Becton Dickinson
Clean bench, HERAsafe KSP	Thermo Fisher Scientific
CO ₂ -Inkubator, HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -20°C und Kühlschränke	Liebherr
Gefrierschrank -80°C, Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Inkubator, Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop 1000 Spektrometer	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe PipetBoy	Integra Biosciences

QuantStudio® 5 Real-Time PCR system Thermo Fisher Scientific

TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad
Vakuumpumpe	Integra Biosciences
Vortex Minishaker	Roth
Zentrifuge Rotanta 200 220R	Hettich
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific

7.11 Softwares

Tabelle 11: Verwendete Softwares

Software	Hersteller
BD FACSDiva V8.0	Becton Dickinson
Excel, Microsoft Office 2020	Microsoft Corporation
GraphPad Prism V8.1.1	GraphPad Software
Quant-Studio Design and Analysis Software (qPCR) V1.5.0	Thermo Fisher Scientific

8 Methoden

8.1 Molekularbiologie

8.1.1 Konzentrationsbestimmung der MicroRNA

Die Bestimmung der MicroRNA-Konzentration erfolgte durch den NanoDrop 1000 mittels UV-Vis Spektrophotometrie. Zunächst wurde als Kontrolle 1µl des miR- Lösungsmittels (Nuklease-freies Wasser) auf den Messpunkt gegeben und anschließend 1µl der miR-Lösung. Die Bestimmung der miR-Konzentration erfolgte automatisiert durch Bestimmung der optischen Dichte.

8.1.2 MicroRNA-Isolation

Die MicroRNA-Isolation aus den Zellen wurde entsprechend des Protokolls des Qiagen miRNeasy Kits durchgeführt. Nach der Isolation wurde die erzielte miR-Konzentration per Nanodrop bestimmt und das Isolat bei -80°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

8.1.3 Reverse Transkription und qPCR

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde das TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit benutzt. Als Kontrolle für die MicroRNA wurde RNU48 verwendet. Im ersten Schritt wurde mithilfe eines T100 Thermal Cyclers die MicroRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Im zweiten Schritt wurde mittels dieser, zusammen mit spezifischen TaqMan™ Primern, die qPCR in einem QuantStudio® 5 Real-Time PCR System angesetzt. Beide Experimente wurden nach Protokoll des Herstellers (thermofisher) durchgeführt; Genaue Angaben über die verwendeten Pippetier-Ansätze für die einzelnen Proben der Reversen Transkription und qPCR sowie über das Temperaturschema finden sich im Nachfolgenden:

Tabelle 12: Pippetier-Ansatz der Reversen Transkription

Reagenzien	Menge
100mM dNTPs	0,15µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1µl
50U/µl	
10x Reverse Transcription Buffer	1,5µl
RNA-Isolat	9,16µl
RNase Inhibitor 20U/µl	0,19µl
Primer	3 µl

Tabelle 13: Pippetier-Ansatz der qPCR

Reagenzien	Menge
TaqMan 2x PCR Master Mix No UNG	10µl
Nuclease-free water	8µl
TaqMan Primer	1µl
cDNA	1µl

Tabelle 14: Temperaturschema der Reversen Transkription

Zeit	Temperatur
30 Minuten	16°C
30 Minuten	42°C
5 Minuten	85°C
∞	4°C

Tabelle 15: Temperaturschema der qPCR

Zeit	Temperatur
10 Minuten	95°C
40 Zyklen:	
I. 15 Sekunden	95°C
II. 60 Sekunden	60°C

8.2 Zellkultur

8.2.1 Zellkultur-Medien

Medium für MOLM-13, ML-2 und NB-4-Zellen:

- RPMI
- 10% FBS
- 1% PenStrep
- 1% GlutaMAX

Allgemeines Gefriermedium:

- RPMI
- 50% FBS
- 10% DMSO

8.2.2 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen und/oder – Platten in Brutschränken kultiviert, in denen die Atmosphäre auf 37°C erwärmt und auf 5% CO₂ angereichert ist. Alle drei verwendeten Zelllinien, ML-2, MOLM-13 und NB-4, wurden alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 mit vorgewärmtem Medium gesplittet. Sie wurden bei einer Konzentration von 0,5-2x10⁶/ml kultiviert.

8.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in einem Gefriermedium nach oben genannter Zusammensetzung. Hierbei wurden 5-10⁶ Zellen/ml in 1 bis 2ml Gefriermedium resuspendiert und in Cryotubes überführt. Anschließend erfolgte die Herunterkühlung der Proben in einer Isopropanol-Box über mindestens 48 Stunden in einem -80°C Kühlschrank. Danach wurden die Cryotubes in Tanks mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die aufgetauten Zellen in vorgewärmtem, regulärem Medium resuspendiert und für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Letztlich folgte eine erneute Resuspension in frischem, regulärem Medium, bevor die

Zellen temporär in Zellkulturplatten überführt wurden. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt, um sie darin zu kultivieren. Die Bestimmung der Konzentration der aufgetauten Zellen wurde mittels eines Zellzählers durchgeführt.

8.3 Zellzählung

Zum Zählen der Zellen bzw. zur Bestimmung von Konzentrationen in Zellsuspensionen wurde der TC20™ Automated Cell Counter (Bio Rad) verwendet. Hierfür wurde die Probe zunächst resuspendiert. Anschließend wurden 10µl der Probe entnommen und mit 10µl Trypanblau gemischt. 10µl des Gemischs wurden in die Zählkammer eines Zellzählungs-Kammerobjektträgers pipettiert. Die Zählung erfolgte automatisiert durch den Zellzähler.

8.4 Lentivirale Transduktion

Zur Überexpression der miR wurde ein miR-193b-Überexpressionsvektor genutzt. Die Vektorkonstruktion erfolgte durch Haetscher et al. (79). Die Lentiviren 5534 (miR-193b-Überexpression) und 5172 (Kontrolle) wurden mit HEK293-Zellen und durch Calcium-Phosphat-Präzipitation Transfektion hergestellt (81). Der Titer des 5534-Virus betrug $1,2 \times 10^8$ /ml und des 5172-Virus $8,3 \times 10^8$ /ml. Vektoren und Lentiviren wurden mir für diese Arbeit dankenswerter Weise von Nadine Haetscher und Esther Braun zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien wurden im Verhältnis 1:5 mit Lentiviren transduziert, es wurde also eine Multiplicity of infection (MOI) von 5 verwendet. Dafür wurden zwischen 500 und 1000µl Zellen mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ /ml in 24- oder 48-well-Platten mit dem Virus gemischt und anschließend inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte eine Resuspension des Gemischs. Die Transduktionseffizienz wurde per Durchflusszytometrie bestimmt.

8.5 LNA-Transfektion

Um die Menge an MicroRNA in den Zellen zu reduzieren, wurden Fluoreszenzmarkierte miRCURY Locked Nucleic Acids (LNA) von Qiagen benutzt. LNA sind

Antisense Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz zu ihren Zielstrukturen. Sie binden stabil an die miR und verhindern folglich, dass die miR an ihre physiologischen Zielsequenzen binden kann. Die bei dieser Arbeit angewandte Technik nennt sich Gymnosis. Hierbei wird die LNA direkt zu den Zellen in das Kulturmedium gegeben; es wird kein Transfektionsmedium benötigt, das potenzielle Nebeneffekte hervorrufen könnte. Neue LNA wurden nach Resuspension in einer 50µM Stammlösung bei -20°C tiefgefroren. Sie wurden in 2µl Aliquots aufbewahrt, um wiederholtes Auftauen und Tieffrieren zu vermeiden. Für ML-2 und MOLM-13 wurde eine Endkonzentration der LNA von 500nM und für NB-4 eine von 1000nM verwendet, bei einer Konzentration der Zellen von $0,5 \times 10^6$ /ml.

8.6 Durchflusszytometrie

Mithilfe eines Durchflusszytometers kann die Morphologie von Zellen und Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche auf Einzelzellebene beurteilt werden. Die Zellen fließen einzeln nacheinander durch eine Messkammer und werden dort mit einem Laser angestrahlt. Das dadurch entstehende Streulicht lässt Rückschlüsse auf die Morphologie der Zellen zu. Wenn die Zellen vor der Messung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern behandelt werden, kann man bei der Messung die Expression von Zelloberflächen-Antigenen beurteilen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Messungen wurden an einer BD LSRFortessa durchgeführt und die Software BD FACSDiva verwendet. Zur Einstellung eines adäquaten Gates wurde bei allen Messungen eine ungefärbte Probe als Negativkontrolle mit gemessen, nach welcher das Gate ausgerichtet wurde. Bei jeder Messung wurde ein viability dye benutzt, sodass ausschließlich die lebenden Zellen analysiert wurden. Bei den Versuchen mit LNA bzw. lentiviraler Überexpression wurde zudem auf Blaues Fluoreszentes Protein (BFP)- bzw. Fluoreszein Amidite (FAM)-positive Zellen gated, wodurch nur die Zellen, die die LNA bzw. das Virus aufgenommen haben, ausgewertet wurden. Zur Auswertung der Oberflächenmarker wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) gemessen und die Werte von der Kontrollgruppe mit denen der Experimentalgruppen verglichen.

Als Vorbereitung der Messung wurden die Proben resuspendiert, gewaschen, in ca. 200µl Flüssigkeit mit den Antikörpern gefärbt und anschließend etwa 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Darauf folgte ein erneutes Waschen, um die Antikörper, die an keine Zellen gebunden haben, zu entfernen. Die fertigen Proben wurden lichtgeschützt aufbewahrt und innerhalb von einer Stunde gemessen.

8.7 Bestimmung der kumulativen Zellzahl

Bei den Experimenten, in denen das Wachstum der Zellpopulation über mehrere Tage hinweg beobachtet wurde, war ein Splitten der Zellen und die Zugabe von frischem Medium während des Experiments notwendig. Für die Berechnung der kumulativen Zellzahl wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{\text{Gesamt } n \text{ des jeweiligen } d}{\text{Gesamt } n \text{ des vorherigen } d \times \text{Splitfaktor des vorherigen } d} \times \text{Kumulative } n \text{ des vorherigen } d$$

$n = \text{Zellzahl}$

$d = \text{Tag}$

8.8 Versuchsablauf bei Experimenten mit differenzierungsinduzierenden Wirkstoffen und LNA/ lentiviraler Überexpression

Um zu untersuchen, inwiefern eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der MicroRNA-193b den Effekt der Wirkstoffe auf die Zelllinien beeinflusst, wurden LNA bzw. Lentiviren verwendet. Für diese Versuche wurden die Zellen bereits mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn mit den LNA transfiziert bzw. mit den Lentiviren transduziert. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass am Tag 0 des Versuchsbeginns die LNA bereits sicher an die miR gebunden haben bzw. die Überexpression der miR bereits stattgefunden hat. Bei Versuchsbeginn wurden die Zellen erneut auf die Konzentration von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und jeweils 100µl auf 96-well-Platten ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Wirkstoffe hinzugegeben. Zudem wurde bei den LNA-Versuchen die LNA-Konzentration in den

Proben erneut auf 500nM bei ML-2 und MOLM-13 sowie auf 1000nM bei NB-4 eingestellt.

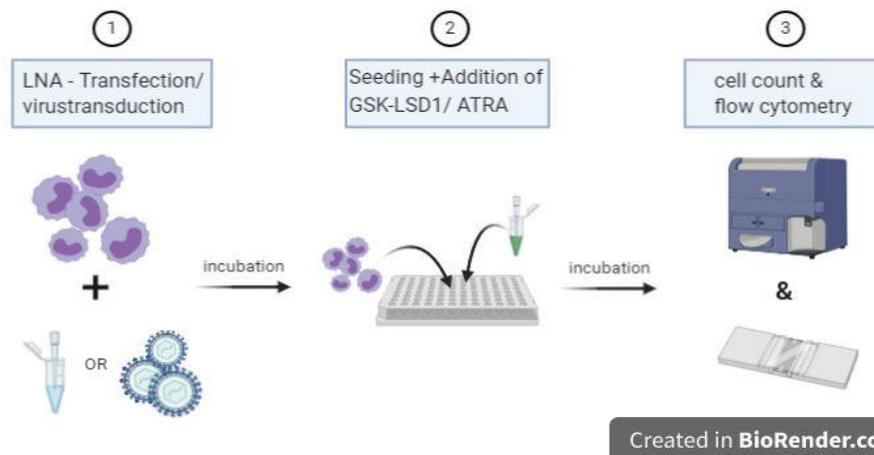


Abbildung 1: Allgemeiner Versuchsablauf bei Experimenten mit differenzierungsinduzierenden Wirkstoffen und LNA/ lentiviraler Überexpression

8.9 Statistische Analyse

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Wirkstoffe allein bzw. die Wirkstoffe nach erhöhtem/verringertem miR-193b-Level auf den Differenzierungsgrad der Zellen auswirken, wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) von verschiedenen Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt. Die Experimente wurden mehrfach durchgeführt und jeweils der Mittelwert der technischen Replikate gebildet, anhand derer die statistische Analyse erfolgte. Die Werte innerhalb eines Experiments wurden standardisiert und die Werte der Experimentalgruppen in Relation zur Kontrollgruppe ausgedrückt, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Berechnung der Mittelwerte der MFIs sowie die Standardisierung zur Kontrollgruppe erfolgte mittels Excel. Die anschließende Berechnung der statistischen Signifikanz und die Erstellung der Graphen erfolgte mithilfe von GraphPad Prism. Für die Berechnung der Signifikanz verschiedener Expressionsunterschiede nach qPCRs wurde der students t-test angewandt. Hierfür wurde jeweils der CT-Mittelwert aus drei technischen Replikaten des jeweiligen Experiments gebildet und mittels der Delta-Delta CT Methode der „Expression Fold Change“ berechnet. Beim Vergleich der Differenzierung von zwei Gruppen wurde ebenfalls der Students t-test angewandt. Hingegen wurde zur statistischen Berechnung von drei Gruppen der Tukey-Test im Rahmen einer ordinary one-way-Anova verwendet.

Zur Analyse von Zellzahlen aus mehreren Gruppen und zu verschiedenen Zeitpunkten kam ebenfalls der Students t-test (zusammen mit der Holm-Šídák-Methode) in Form eines multiple t-test zum Einsatz. Auch hierbei wurden zur statistischen Berechnung jeweils die Mittelwerte aus mehreren Experimenten verwendet. Bei jeglichen statistischen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

9 Ergebnisse

9.1 Einfluss eines modifizierten MicroRNA-193b-Levels auf Zelldifferenzierung und -proliferation in AML-Zelllinien

9.1.1 LNA reduzieren die zelluläre Menge von MicroRNA-193b

Um die Auswirkungen von veränderten MicroRNA-193b-Levels auf die Differenzierung und Proliferation der Zelllinien sowie auf den Einfluss der Wirkstoffe auf die Zellen zu untersuchen, war es zunächst notwendig, die Wirkung und Effektivität der LNA bzw. des Überexpressionsvektors zu untersuchen. Zu den beiden AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 sowie der APL-Zelllinie NB-4 wurde miR-193b-3p LNA hinzugegeben. Dabei wurden die AML-Zelllinien mit 500nM und die APL-Zelllinie mit 1000nM LNA für jeweils 48 Stunden inkubiert. Die notwendigen Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt. Nach 48 Stunden wurden die MicroRNAs isoliert und mittels qPCR gemessen (Abb. 2). Bei allen drei Zelllinien führte eine Behandlung mit LNA zu einer signifikanten Senkung der Konzentration von miR-193b: Bei NB-4 etwa um das 17-fache, bei ML-2 etwa um das 4-fache, bei MOLM-13 etwa um das 3-fache.

Um zu überprüfen, wie hoch die Transfektionseffizienz der LNA war und wie lange die LNA stabil in den Zellen verblieben, wurde von ihrer fluoreszierenden Eigenschaft Gebrauch gemacht. Die LNA sind mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FAM markiert. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag und von acht Tagen wurden die Zellen mithilfe eines FACS-Gerätes gemessen (Abb. 3). In den FACS Blots war zu erkennen, dass in allen drei Zelllinien (links ML-2, in der Mitte MOLM-13, rechts NB-4) sowohl bereits nach einem als auch nach acht Tagen fast 100% der Zellen die LNA aufgenommen haben. Somit konnte gezeigt werden, dass die LNA in Hinsicht auf Aufnahme, Verbleib in den Zellen und Verringerung des zellulären miR-193b-Gehaltes gut funktionieren und damit für weitere Experimente geeignet waren. Ebenso musste der Überexpressionsvektor auf die gleichen Qualitätsmerkmale untersucht werden.

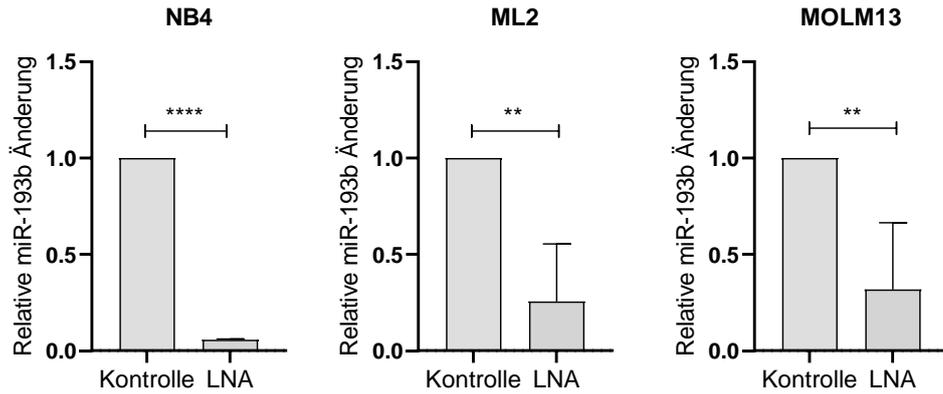


Abbildung 2: LNA reduzieren effektiv die Menge an MicroRNA-193b in den Zellen. Darstellung der veränderten Menge an miR-193b in den Zelllinien mittels qPCR 48 Stunden nach Zugabe der LNA. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben angegeben. Konzentration bei ML-2 und MOLM-13: 500nM; Konzentration bei NB-4: 1000nM. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung bei n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

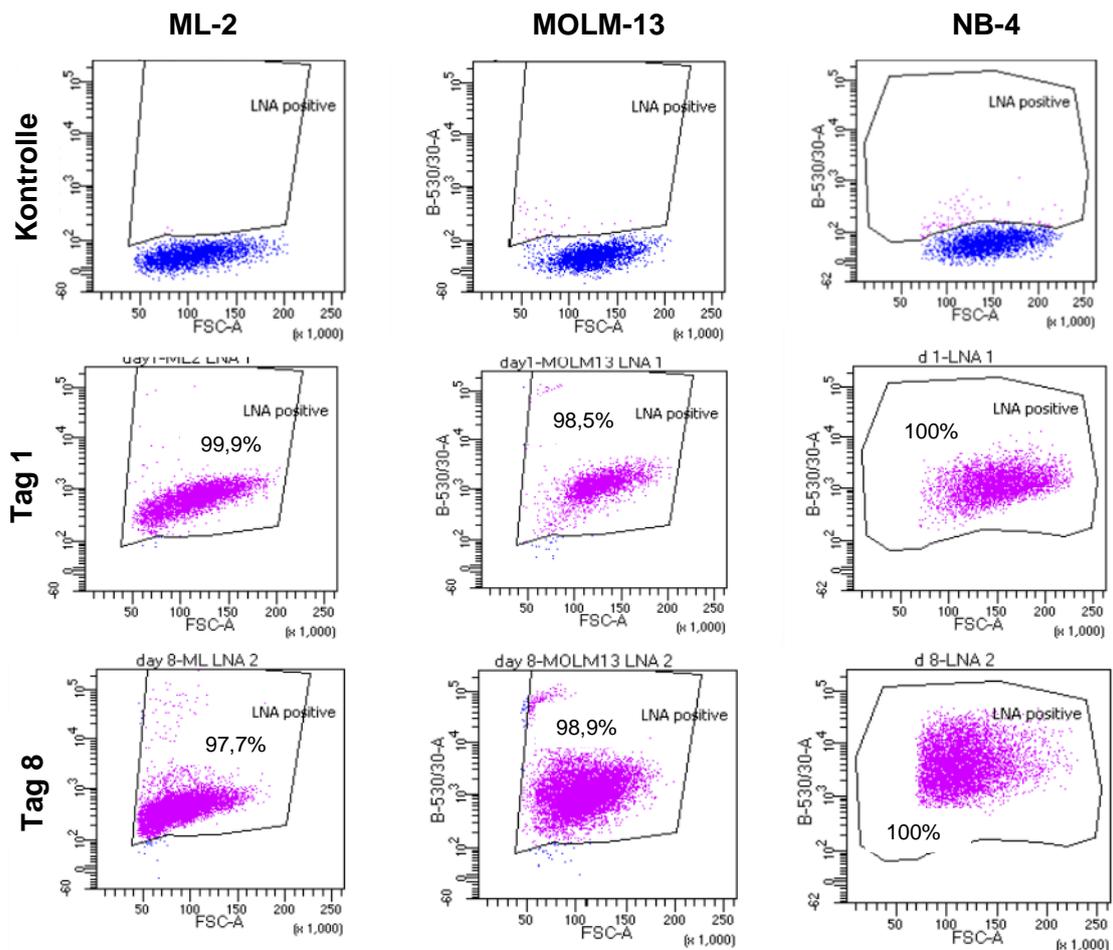


Abbildung 3: LNA bleiben über mehrere Tage stabil in den Zellen. FACS Dot Plots von ML-2, MOLM-13 und NB-4 nach 1 und 8 Tagen nach Zugabe der durch FAM-Fluoreszenz-markierten LNA. Darstellung der FAM-positiven Zellen. Konzentration bei ML-2 und MOLM-13: 500nM; Konzentration bei NB-4: 1000nM. Dargestellt ist exemplarisch die Messung eines technischen Replikats; N=1.

9.1.2 Überexpression von MicroRNA-193b erhöht effektiv das zelluläre miR-Level

Während LNA benutzt wurden, um eine Erniedrigung des zellulären miR-193b-Gehaltes zu erreichen, wurde zur Erhöhung des miR-Levels im Rahmen dieser Arbeit ein lentiviraler Überexpressionsvektor genutzt. Auch diesen galt es auf seine Qualität zu überprüfen. Zellen, die den Überexpressionsvektor aufgenommen haben, exprimierten BFP als Fluoreszenzreporter. Die transduzierten Zelllinien ML-2 und MOLM-13 wurden mittels FACS gemessen (Abb. 4). ML-2 (links in Abb. 4) wies eine Transduktionseffizienz von 67% auf und MOLM-13 (rechts) eine von 89%. Nach Messung des miR-193b-Gehalts der mit miR-193b-Überexpressionsvektor transduzierten Zellen mittels qPCR zeigte sich im Vergleich zu der Kontrolle bei ML-2 etwa ein 8000-fach und bei MOLM-13 ein knapp 9000-fach höheres miR-193b-Level (Abb. 5).

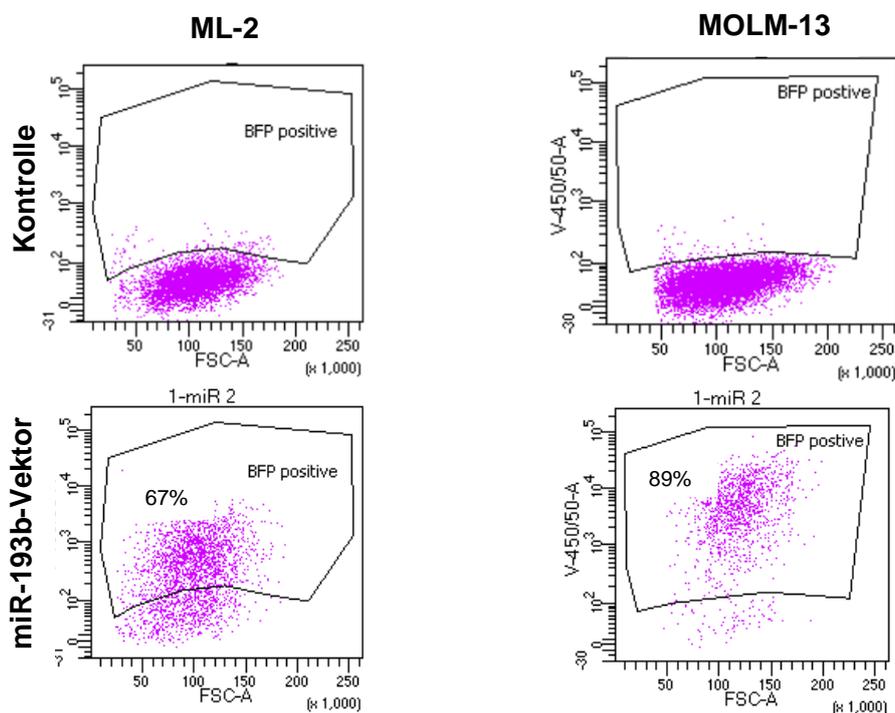


Abbildung 4: Der miR-193b-Überexpressionsvektor weist eine hohe Transduktionseffizienz auf. FACS Dot Plots von ML-2 und MOLM-13 nach Transduktion der durch BFP-Fluoreszenz-markierten Überexpressionsvektoren. Darstellung der BFP-positiven Zellen. MOI=5. Dargestellt ist exemplarisch die Messung eines technischen Replikats aus n=2.

Insgesamt wurde deutlich, dass der miR-193b-Überexpressionsvektor eine hohe Effizienz aufweist und damit ebenfalls für Folgeversuche geeignet war.

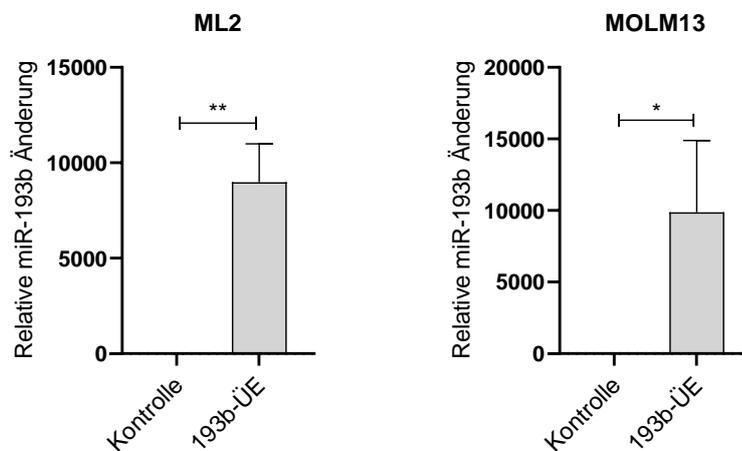


Abbildung 5: MiR-193b-Überexpression erhöht das miR-Level signifikant. Darstellung der veränderten Menge an miR-193b in den Zelllinien mittels qPCR nach Transduktion mit dem miR-193b-Überexpressionsvektor. Die mit Überexpressionsvektor behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-Vektor behandelten Proben angegeben. MOI=1. ÜE= Überexpression. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

9.1.3 Veränderte MicroRNA-193b-Level haben keinen Einfluss auf Differenzierung und Proliferation von AML-Zelllinien

Bevor die Fragestellung untersucht wurde, inwiefern erhöhte oder verringerte miR-193b-Level die Auswirkungen von Wirkstoffen auf die Zelle beeinflussen, war es nötig herauszufinden, ob veränderte miR-193b-Level an sich bereits einen Einfluss auf die Zelllinien haben. Ein potenzieller Einfluss wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Messung der Proliferation und der Zelldifferenzierung untersucht. Aufgrund der tumorsuppressiven Eigenschaft der miR-193b und ihrer niedrigen Konzentration in AML-Zellen war zunächst davon auszugehen, dass eine Überexpression einen differenzierungsinduzierenden und antiproliferativen Effekt zur Folge haben könnte. Um die Auswirkungen veränderter miR-193b-Level auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die beiden AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 mit den LNA transfiziert bzw. dem Überexpressionsvektor transduziert. Die Zellen wurden erneut ausgesät und die Proliferation über einen Zeitraum von 96 Stunden beobachtet sowie die Zellzahl gemessen. Dies geschah nach mindestens drei Tagen, um sicher zu stellen, dass eine Aufnahme in die Zellen stattgefunden hat (siehe auch Methoden-Kapitel). In beiden Fällen, nach LNA-Transfektion (Abb. 6) und nach Transduktion mit dem Überexpressionsvektor (Abb. 8),

war nach 96 Stunden kein signifikanter Unterschied zu den Proliferationskurven der Kontrollgruppen zu vermerken. Das miR-193b-Level zu erhöhen oder zu verringern hat damit keinen Einfluss auf die Proliferation der Zelllinien innerhalb der ersten 96 Stunden.

Die Frage nach einer eventuellen differenzierungsmodifizierenden Wirkung durch veränderte miR-193b-Level wurde mit Hilfe von FACS-basierter Messung von typischen AML-Differenzierungsmarkern untersucht. Nach 96-stündiger Inkubation der Zellen nach Transfektion mit LNA bzw. Transduktion mit dem Vektor wurden die Zellen mit Antikörpern für die beiden Differenzierungsmarker CD11b und CD16 angefärbt. Ihre MFIs wurden im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle mittels FACS bestimmt. Sowohl nach Reduktion der miR-193b durch die LNA (Abb. 7) als auch nach Erhöhung der miR-193b durch den Überexpressionsvektor (Abb. 9) gaben die beiden myeloischen Marker CD11b und CD16 keinen Hinweis darauf, dass die veränderten miR-193b-Level die Differenzierung in diesen Zelllinien beeinflussen.

Somit lässt sich insgesamt aus diesen Ergebnissen schließen, dass ML-2 und MOLM-13 hinsichtlich Differenzierung und Proliferation nicht auf miR-193b angewiesen sind. Zudem führte in dem gemessenen Zeitraum eine Überexpression der miR-193b nicht zu einem Proliferations-modifizierenden oder differenzierungsinduzierenden Effekt. Die Ausgangshypothese konnte im Rahmen dieser Experimente nicht bestätigt werden.

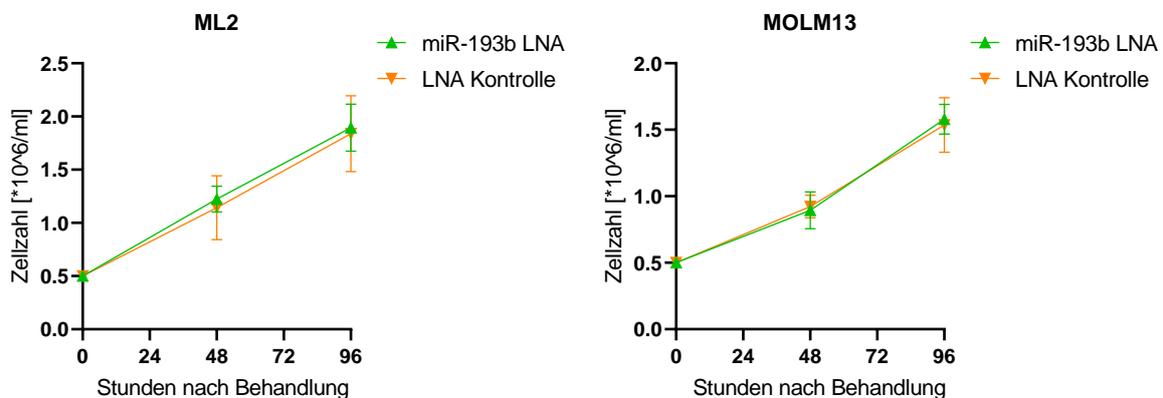


Abbildung 6: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von ML-2 und MOLM-13. Darstellung der Proliferationskurven nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA. Konzentration der LNA: 500nM. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$.

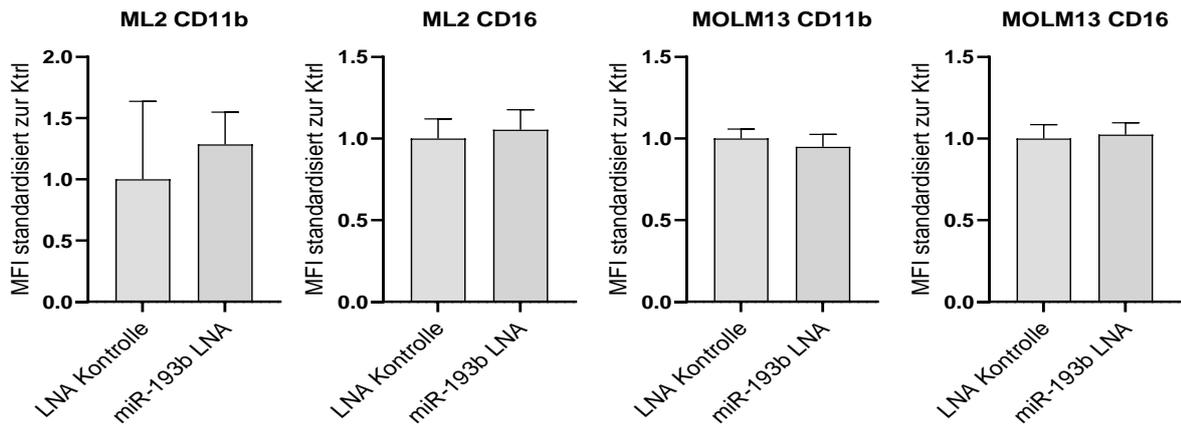


Abbildung 7: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von ML-2 und MOLM-13. Darstellung der MFI der Differenzierungsmarker CD11b und CD16 96 Stunden nach Experimentbeginn. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben standardisiert. Konzentration der LNA: 500nM. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$.

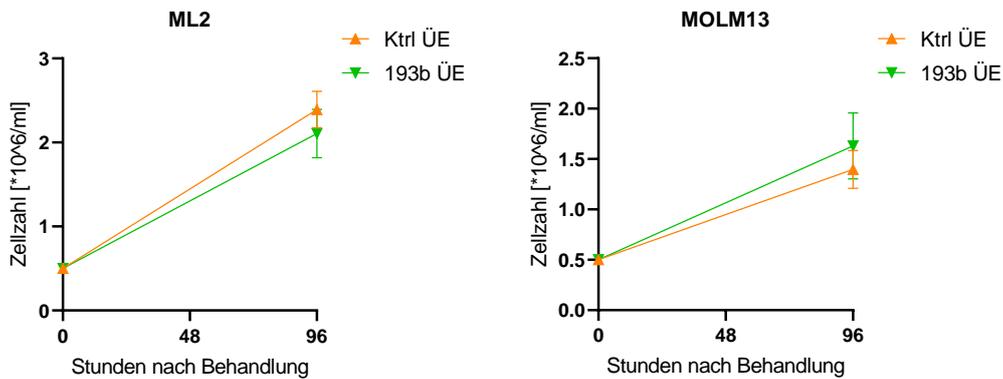


Abbildung 8: Erhöhtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von ML-2 und MOLM-13. Darstellung der MFI der Differenzierungsmarker CD11b und CD16 96 Stunden nach Experimentbeginn. Die mit miR-193b-Überexpressionsvektor behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-Vektor behandelten Proben standardisiert. MOI=5. ÜE= Überexpression. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=6. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$.

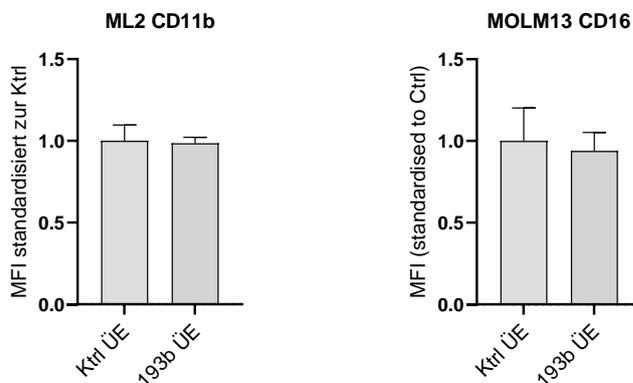


Abbildung 9: Erhöhtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von ML-2 und MOLM-13. Darstellung der MFI der Differenzierungsmarker CD11b und CD16 96 Stunden nach Experimentbeginn. Die mit miR-193b-Überexpressionsvektor behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-Vektor behandelten Proben standardisiert. MOI=5. ÜE= Überexpression. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=6. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$.

9.2 Die Rolle von miR-193b in der mechanistischen Umsetzung des therapeutischen Effekts von GSK-LSD1 in AML und APL

9.2.1 GSK-LSD1-induzierte miR-193b-Hochregulation ist nicht allein für die Umsetzung des Behandlungseffekts in AML verantwortlich

Nachdem wir feststellen konnten, dass eine veränderte Menge an miR-193b nicht zu einer veränderten Differenzierung oder Proliferation in AML führt, war es von Interesse zu untersuchen, welche Rolle sie bei der Umsetzung des Behandlungseffekts des Wirkstoffes GSK-LSD1 spielt. Die Hypothese lautete, dass, ebenso wie in den murinen Zellen, die miR-193b-Hochregulation durch GSK-LSD1 zur tumorsuppressiven Wirkung von GSK-LSD1 beiträgt. Hierzu wurde der zelluläre miR-193b-Gehalt mithilfe von miR-193b-LNA reduziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zelllinien mit GSK-LSD1, gefolgt von einer 96-stündigen Inkubationszeit. In diesem Zeitraum wurden die Zellen jeweils nach 48 und nach 96 Stunden gezählt und Proliferationskurven erstellt. Von besonderem Interesse war der Vergleich der Zellpopulationen, die bei regulären miR-193b-Level mit GSK-LSD1 behandelt wurden (mit LNA-Kontrolle behandelt), mit denjenigen, bei welchen vor GSK-LSD1-Zugabe der Gehalt der miR-193b reduziert wurde. Die Zellen mit regulärem miR-193b-Level wiesen bei GSK-LSD1-Behandlung eine deutlich verringerte Proliferationskurve auf. Dies war basierend auf Vorversuchen an den murinen Zellen sowie aufgrund der in der Literatur beschriebenen Wirkung von GSK-LSD1 zu erwarten (Abb. 10). Die Gruppe, bei der das miR-193b-Level während der Behandlung mit GSK-LSD1 durch LNA verringert wurde, wies im Vergleich dazu jedoch keinen Unterschied auf; die Proliferation verhielt sich - sowohl bei ML-2 als auch MOLM-13 - genauso wie bei der Population mit unverändertem miR-Level. Hieraus lässt sich ableiten, dass die durch GSK-LSD1 induzierte miR-193b-Erhöhung nicht bzw. nicht allein für die Umsetzung des Behandlungseffekts von GSK-LSD1 in AML verantwortlich ist. Damit konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, dass der antileukämische Effekt von GSK-LSD1 maßgeblich durch die Erhöhung von miR-193b erfolgt.

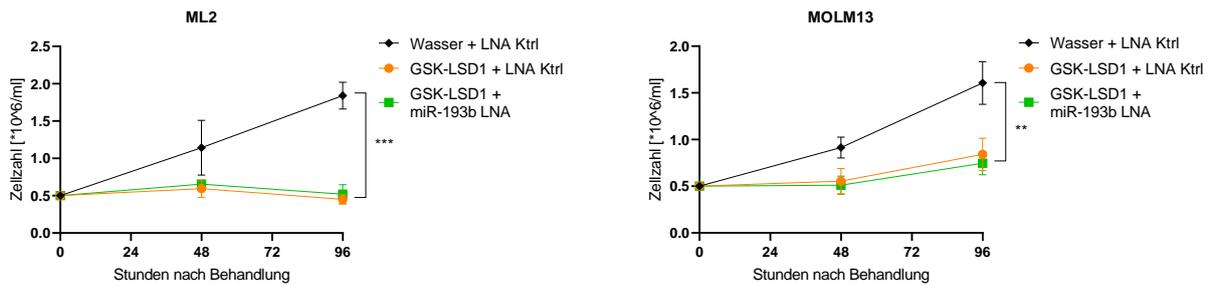


Abbildung 10: Reduzierte miR-193b-Level beeinflussen nicht die antiproliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2 und MOLM-13. Darstellung der Proliferationskurven nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA und gleichzeitiger GSK-LSD1-Behandlung. GSK-LSD1 reduziert die Proliferation der Zelllinien; eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner Veränderung. Konzentration der LNA: 500nM. Konzentration von GSK-LSD1 und Wasser als Kontrollsubstanz: 0,1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus $n=3$. Signifikanz berechnet mittels t -Test. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

9.2.2 Erhöhte miR-193b-Level führen in Kombination mit GSK-LSD1 zu synergistischem Effekt in AML

Wir wollten herausfinden, welchen Einfluss ein erhöhtes miR-193b-Level auf die Auswirkungen des Wirkstoffs GSK-LSD1 auf AML-Zellen hat. Entsprechend der Ausgangshypothese, dass die tumorsuppressive Wirkung von GSK-LSD1 miR-193b-vermittelt erfolgt, war anzunehmen, dass ein gesteigertes miR-Level zu einem verstärkten antileukämischen Effekt führen würde. Dies sollte zu einem besseren Verständnis über die Wirkungsweise von GSK-LSD1 sowie über die Rolle von miR-193b beitragen. Außerdem wollten wir mögliche synergistische Effekte untersuchen. Hierzu wurden die Zelllinien ML-2 und MOLM-13 mit einem miR-193b-Überexpressions- bzw. Kontrollvektor transduziert, um die zellulären miR-193b-Level zu erhöhen, und anschließend mit GSK-LSD1 behandelt. Nach 96-stündiger Inkubation wurden die Zellen gezählt und die Proliferationskurven miteinander verglichen. Zudem wurde mittels FACS die MFI des Differenzierungsmarkers CD11b gemessen. Hierbei zeigte sich, dass diejenigen Zellpopulationen, die mit GSK-LSD1 in Kombination mit dem miR-193b-Überexpressionsvektor behandelt wurden, im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor behandelten Populationen signifikant niedrigere Proliferationskurven aufwiesen (Abb. 11). Dabei wurde der antiproliferative Effekt von GSK-LSD1 bei ML-2 geringfügig, bei MOLM-13 etwa doppelt so stark wie bei der Kontrollgruppe verstärkt. Zudem war nach 96 Stunden die MFI des Differenzierungsmarkers CD11b bei ML-2 in der

Gruppe, bei der das miR-193b-Level mittels Überexpressionsvektor erhöht und gleichzeitig mit GSK-LSD1 behandelt wurde, am höchsten (Abb. 12). Die Gruppe, die lediglich mit GSK-LSD1 bei normalem miR-193b-Niveau behandelt wurde, wies ebenfalls eine erhöhte Expression von CD11b auf; Die Differenzierung wurde jedoch am meisten bei den Zellen induziert, dessen miR-193b-Level erhöht wurde und eine gleichzeitige Behandlung mit GSK-LSD1 stattfand. Damit konnte gezeigt werden, dass ein gesteigertes miR-193b-Level den antiproliferativen und differenzierungsinduzierenden Einfluss von GSK-LSD1 auf AML-Zellen verstärkt. MiR-193b und GSK-LSD1 präsentieren damit einen additiven oder synergistischen Effekt.

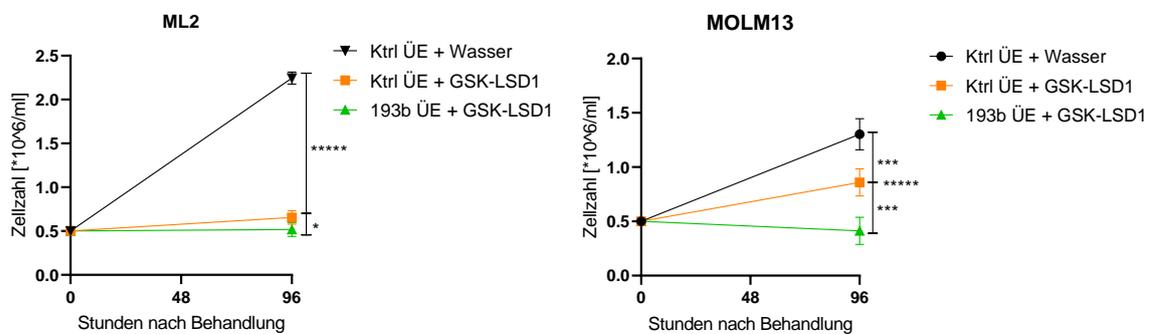


Abbildung 11: Erhöhte miR-193b-Level verstärken die antiproliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2 und MOLM-13. Darstellung der Proliferationskurven nach Transduktion der Zellen mit miR-193b-Überexpressions- bzw. Kontrollvektor und gleichzeitiger GSK-LSD1-Behandlung. GSK-LSD1 reduziert die Proliferation der Zelllinien; eine gleichzeitige Erhöhung der miR-193b-Menge via lentiviraler Überexpression führt zu einem synergistischen anti-proliferativen Effekt. MOI=5. ÜE= Überexpression. Konzentration von GSK-LSD1 und Wasser als Kontrollsubstanz: 0,1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=6. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; **** $p<0,00001$.

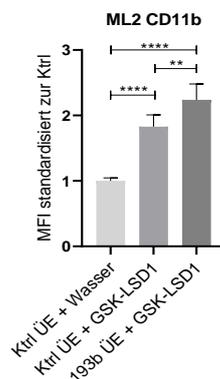


Abbildung 12: Erhöhtes miR-193b-Level verstärkt die differenzierungsinduzierende Wirkung von GSK-LSD1 auf ML-2. Darstellung der MFI des Differenzierungsmarkers CD11b 96 Stunden nach Experimentbeginn. GSK-LSD1 induziert Differenzierung; eine gleichzeitige Erhöhung der miR-193b-Menge via lentiviraler Überexpression führt zu einem synergistischen Effekt. Die mit miR-193b-Überexpressionsvektor behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-Vektor behandelten Proben standardisiert. MOI=5. ÜE= Überexpression. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=6. Signifikanz berechnet mittels ordinary one-way-Anova. $\alpha=0,05$. ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

9.2.3 Reduktion von miR-193b beeinflusst nicht den Behandlungseffekt von GSK-LSD1 in NB-4-Zellen (APL)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben den AML-Zelllinien auch in der APL-Zelllinie NB-4 die potenziellen Auswirkungen eines veränderten miR-193b-Levels auf den Behandlungseffekt von GSK-LSD1 untersucht. Entsprechend der für die AML-Zelllinien aufgestellten Hypothese, dass die Wirkung von GSK-LSD1 über eine miR-193b-Erhöhung vermittelt wird, war auch bei NB-4-Zellen zunächst davon auszugehen, dass es durch eine miR-193b-Senkung zu einem Rescue des antiproliferativen Effekts kommen würde. Eine GSK-LSD1-bedingte Erhöhung des miR-193b-Levels konnte für NB-4, genauso wie für AML, in Vorversuchen gezeigt werden. Parallel zu dem Ansatz mit AML-Zellen wurde das miR-193b-Level mithilfe von miR-193b-LNA reduziert und anschließend eine GSK-LSD1-Behandlung durchgeführt. Nach 48 und 96 Stunden wurden die Zellen gezählt und Proliferationskurven erstellt. Ebenso wurde die Differenzierung anhand des Differenzierungsmarkers CD11b nach 48 Stunden bestimmt. GSK-LSD1 hatte einen stark signifikanten, antiproliferativen Effekt in NB-4. Dieser, durch GSK-LSD1 induzierte antiproliferative Effekt, blieb jedoch unverändert bei Behandlung von Zellen, bei denen das miR-193b-Level durch LNA reduziert wurde (Abb. 13). Auch die Differenzierung war bei beiden mit GSK-LSD1 behandelten Gruppen gleich, unabhängig davon, ob das miR-193b-Level unverändert oder reduziert war (Abb. 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass in der APL-Zelllinie NB-4, gleichermaßen wie in AML-Zellen, der antileukämische, antiproliferative Effekt durch GSK-LSD1 nicht über eine Erhöhung des miR-193b-Levels erfolgt. Für APL trifft die Ausgangshypothese damit ebenso nicht zu wie für AML.

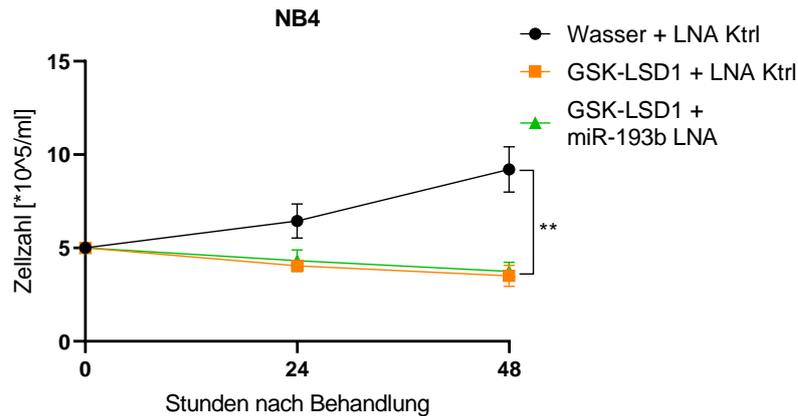


Abbildung 13: Reduziertes miR-193b-Level beeinflusst nicht die antiproliferative Wirkung von GSK-LSD1 auf NB-4. Darstellung der Proliferationskurve nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA und gleichzeitiger GSK-LSD1-Behandlung. GSK-LSD1 reduziert die Proliferation der Zelllinie; eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner Veränderung. Konzentration der LNA: 1000nM. Konzentration von GSK-LSD1 und Wasser als Kontrollsubstanz: 0,1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

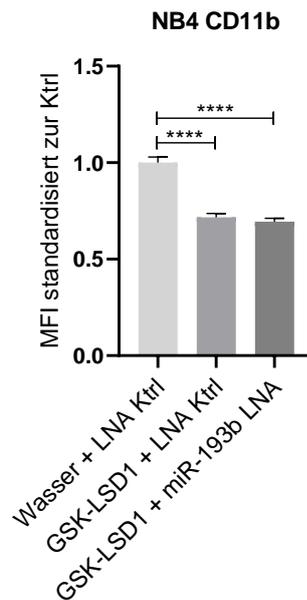


Abbildung 14: Erniedrigtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den Effekt von GSK-LSD1 auf NB-4. Darstellung der MFI des Differenzierungsmarkers CD11b 48 Stunden nach Experimentbeginn. Eine Erniedrigung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner veränderten Wirkung von GSK-LSD1 auf die Zellen. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben standardisiert. Konzentration der LNA: 1000nM. Konzentration von GSK-LSD1 und Wasser als Kontrollsubstanz: 0,1 μ M. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=3. Signifikanz berechnet mittels ordinary one-way-Anova. $\alpha=0,05$. **** $p<0,0001$.

9.3 Bedeutung der miR-193b für Überleben und Differenzierung in APL

9.3.1 APL-Zelllinie NB-4 weist deutlich höhere miR-193b-Level auf als AML-Zelllinien

Die zweite große Fragestellung dieser Arbeit war, ob NB-4 in Hinsicht auf das Überleben und die Differenzierung auf die miR-193b angewiesen ist. Bhayadia et al. (80) konnten in Patientenproben zeigen, dass das miR-193b-Level in allen AML-Entitäten verringert ist, mit Ausnahme von APL. In APL ist das miR-193b-Level im Vergleich zu Gesunden sogar erhöht. Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass APL auf dieses erhöhte miR-193b-Level angewiesen ist. Diese Daten stammen aus Analysen von humanen Proben im Rahmen einer klinischen Studie. Somit galt zunächst, dieses Ergebnis auch in den für diese Arbeit genutzten Zelllinien zu reproduzieren. Hierzu wurde aus der APL-Zelllinie NB-4 sowie aus den AML-Zelllinien ML-2, MOLM-13 und MOLM-14 die RNA isoliert und anschließend mittels qPCR das Expressionslevel der miR-193b bestimmt und verglichen (Abb. 15). Dabei wurden die Expressionslevel jeweils relativ zu demjenigen von ML-2 dargestellt. MOLM-13 und MOLM-14 wiesen im Vergleich zu ML-2 ein höheres Level an miR-193b auf, während das miR-193b-Level in NB-4 deutlich höher als in allen AML-Zelllinien war. Somit konnten die Ergebnisse von Bhayadia et al. in den Zellkulturen reproduziert werden.

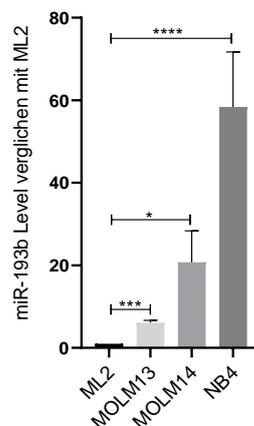


Abbildung 15: Die APL-Zelllinie NB-4 hat signifikant höhere miR-193b-Level als AML-Zelllinien. Dargestellt sind die mittels qPCR ermittelten unterschiedlichen miR-193b-Expressionen in der APL-Zelllinie NB-4 und den AML-Zelllinien ML-2, MOLM-13 und MOLM-14. Die ermittelte Expression ist jeweils im Verhältnis zu derjenigen der Zelllinie ML-2 angegeben. NB-4 weist eine signifikant höhere miR-193b-Expression auf als die anderen untersuchten Zelllinien. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung bei $n=3$. Signifikanz berechnet mittels t -Test. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

9.3.2 APL-Zelllinie NB-4 ist nicht auf miR-193b angewiesen

Nachdem wir zeigen konnten, dass sich die Ergebnisse bezüglich des miR-193b-Levels auch auf die verwendeten Zelllinien übertragen lassen, überprüften wir die Frage, ob NB-4 auf das erhöhte miR-193b-Level angewiesen ist. NB-4 wurde mit miR-193b- bzw. Kontroll-LNA transformiert und damit das zelluläre miR-193b-Level reduziert. Anschließend wurde regelmäßig die Zellzahl beider Gruppen bestimmt und das Wachstum über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet (Abb. 16). Die Proliferationskurve der Zellen, bei denen das miR-193b-Level reduziert wurde, unterscheidet sich nicht von derjenigen, bei der das miR-Level unverändert blieb. Des Weiteren haben wir untersucht, ob sich der Differenzierungsgrad bei NB-4 mit reduziertem miR-193b-Level, im Vergleich zur Kontrolle, unterscheidet. Dazu wurden die Zellen mit LNA behandelt und nach 96 Stunden mithilfe von FACS die MFIs der Differenzierungsmarker CD11b und CD13 bestimmt. Bei beiden Markern war kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (Abb. 17). Die Ergebnisse dieser Versuche weisen darauf hin, dass NB-4 weder hinsichtlich Überleben und Proliferation noch bezogen auf Differenzierung auf das erhöhte miR-193b-Level angewiesen ist. Damit konnte gezeigt werden, dass die APL-Zelllinie NB-4 während des Beobachtungszeitraums nicht von dem erhöhten miR-193b-Level abhängig zu sein scheint und dass sich die Hypothese folglich nicht bestätigen lässt.

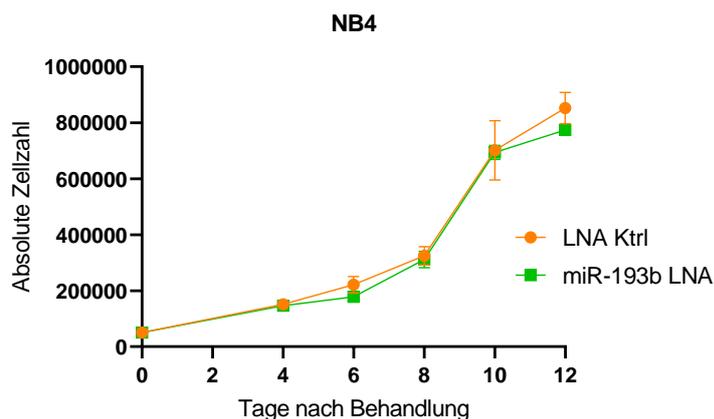


Abbildung 16: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Proliferation von NB-4. Darstellung der Proliferationskurven nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA. Konzentration der LNA: 1000nM. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus $n=3$. Signifikanz berechnet mittels t -Test. $\alpha=0,05$.

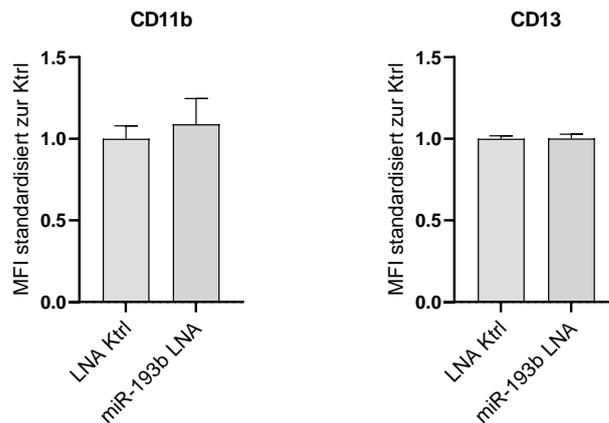


Abbildung 17: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von NB-4. Darstellung der MFI der Differenzierungsmarker CD11b und CD13 96 Stunden nach Experimentbeginn. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben standardisiert. Konzentration der LNA: 1000nM. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung bei n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$.

9.4 Die Rolle von miR-193b bei der Umsetzung des therapeutischen Effekts von ATRA in APL und AML

9.4.1 ATRA-Behandlung führt zu erhöhten miR-193b-Levels in NB-4 und ML-2

Der dritte und letzte Themenkomplex dieser Forschungsarbeit beschäftigte sich mit der Rolle von miR-193b im Rahmen des Behandlungseffekts von ATRA bei APL sowie bei AML. MiR-193b ist in APL als einzige AML-Entität erhöht. Zudem wird ATRA hauptsächlich in APL routinemäßig im klinischen Alltag erfolgreich therapeutisch genutzt. Daher fragten wir uns, ob es einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten miR-193b-Level und der Effizienz der ATRA-Therapie in APL gibt, bzw. ob ATRA hinsichtlich des Behandlungseffekts auf die hohen miR-193b-Level angewiesen ist. Es war für uns ebenfalls von Interesse diese Fragestellung für AML-Zelllinien zu untersuchen.

Zunächst haben wir untersucht, ob eine ATRA-Behandlung das miR-193b-Level in der APL-Zelllinie NB-4 und in den AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 erhöht. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit ATRA bzw. DMSO, als Kontrolle, behandelt und nach 96 Stunden Inkubationszeit die miR-193b-Expressionslevel mittels qPCR gemessen (Abb. 18). In NB-4 war das miR-193b-Level nach ATRA-Behandlung etwa um das Vierfache und in ML-2 ca. um das Achtfache, relativ zur

Kontrollgruppe, gesteigert. Bei MOLM-13 war nach ATRA-Behandlung keine Erhöhung des miR-193b-Levels festzustellen.

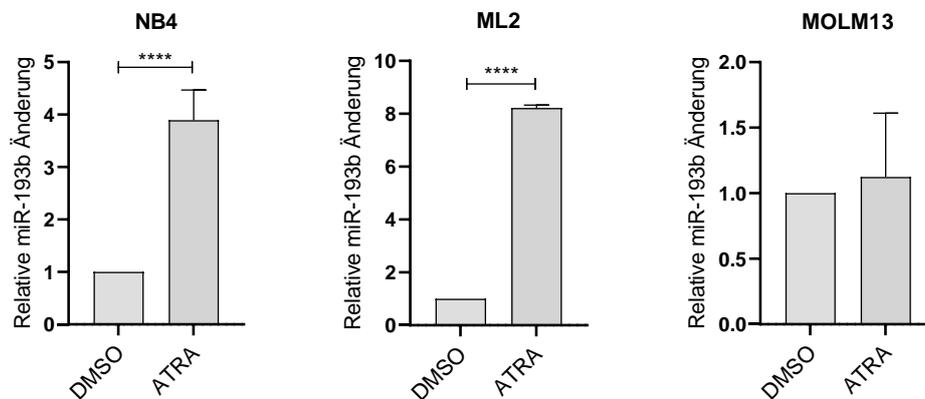


Abbildung 18: ATRA erhöht das miR-193b-Level in ML-2 und NB-4 signifikant. Darstellung der veränderten Menge an miR-193b in den Zelllinien NB-4, ML-2 und MOLM-13 mittels qPCR nach 96 Stunden Inkubation mit ATRA. Die mit ATRA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit DMSO behandelten Kontroll-Proben angegeben. ATRA führt in den beiden Zelllinien NB-4 und ML-2 zu einer Erhöhung von miR-193b; in MOLM-13 bleibt die Menge unverändert. Konzentration von ATRA und der Kontrollsubstanz DMSO: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung bei n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

9.4.2 MiR-193b ist für die Umsetzung des Effekts von ATRA in NB-4 nicht notwendig

Zunächst verfolgten wir die Frage, ob miR-193b für die Umsetzung des Behandlungseffekts von ATRA in NB-4, einer APL-Zelllinie, notwendig ist. Die Hypothese lautete, dass die differenzierungsinduzierende Wirkung von ATRA auf die hohen miR-193b-Level in APL angewiesen ist. Die Zellen wurden entweder mit Kontroll-LNA oder miR-193b-LNA transformiert und anschließend mit ATRA behandelt. Die Zellen wurden nach 48 und 96 Stunden gezählt und Wachstumskurven erstellt. Ebenso wurde 96 Stunden nach ATRA-Zugabe die Differenzierung mittels FACS bestimmt. Hierzu wurden die MFIs der beiden Differenzierungsmarker CD11b und CD13 ermittelt. Die Proliferation wurde erwartungsgemäß durch ATRA signifikant reduziert, jedoch erst nach 96 Stunden. Eine ATRA-Behandlung der Zellen bei erniedrigtem miR-193b-Level reduzierte die Proliferation allerdings gleichermaßen wie ATRA-Behandlung bei unverändertem miR-Level (Abb. 19); nach 48 Stunden war noch kein Unterschied zu erkennen, nach 96 Stunden war das Wachstum signifikant reduziert. Es kam zu keinem Rescue der Proliferation. Hinsichtlich der Differenzierung war zu erkennen, dass ATRA erwartungsgemäß

einen starken differenzierungsinduzierenden Effekt auf NB-4 ausübte. Die MFIs des Differenzierungsmarker CD11b war nach ATRA-Zugabe im Verhältnis zur nicht mit ATRA behandelten Kontrolle signifikant erhöht bzw. verringert bei CD13. Die veränderten Expressionslevel der Differenzierungsmarker waren bei den Populationen, die mit ATRA bei erniedrigtem miR-193b-Level behandelt wurden, gleichermaßen festzustellen (Abb. 20). Parallel zur Proliferation kam es bei der Differenzierung durch erniedrigte miR-193b-Level zu keinem modifizierenden Einfluss auf die ATRA-Behandlung. Eine Reduktion des miR-193b-Levels durch LNA hat somit keinen Einfluss auf den Behandlungseffekt von ATRA in der APL-Zelllinie NB-4, weder bei der Proliferation noch bei der Differenzierung. ATRA ist demzufolge nicht auf miR-193b angewiesen, um seinen Effekt in APL umzusetzen. Anschließend wurde diese Fragestellung für AML-Zellen untersucht.

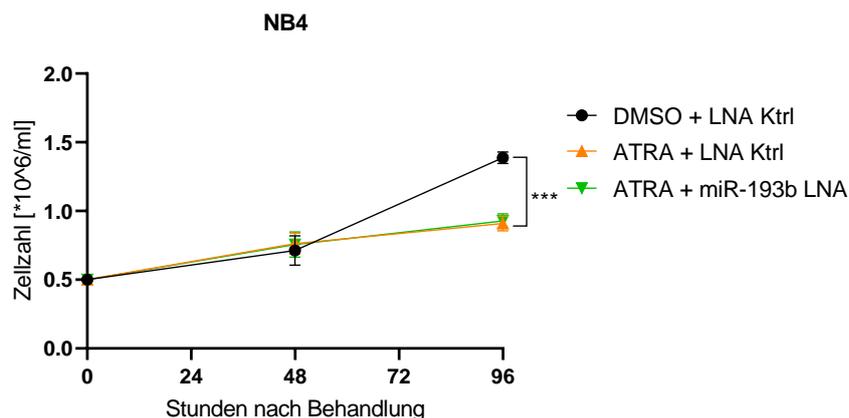


Abbildung 19: Reduziertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf die antiproliferative Wirkung von ATRA auf NB-4. Darstellung der Proliferationskurven nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA und gleichzeitiger ATRA-Behandlung. ATRA reduziert die Proliferation der Zelllinie NB-4; eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keinem rescue hinsichtlich des antiproliferativen Effekts. Konzentration der LNA: 1000nM. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. *** $p<0,001$.

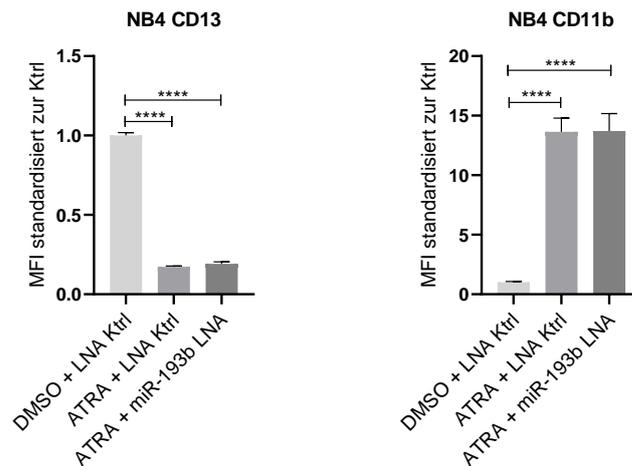


Abbildung 20: Erniedrigtes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den differenzierungsinduzierenden Effekt von ATRA auf NB-4. Darstellung der MFI der Differenzierungsmarkers CD11b und CD13 96 Stunden nach Experimentbeginn. ATRA induziert Differenzierung in NB-4; Eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner veränderten Wirkung von ATRA auf die Zellen. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben standardisiert. Konzentration der LNA: 1000nM. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=3. Signifikanz berechnet mittels ordinary one-way-Anova. $\alpha=0,05$. **** $p<0,0001$.

9.4.3 ATRA-Behandlung initiiert Differenzierung in AML

Bevor untersucht wurde, inwiefern miR-193b bei der Umsetzung des Effekts von ATRA in AML beteiligt ist, war es zunächst erforderlich herauszufinden, ob ATRA in den für die Arbeit genutzten AML-Zelllinien Differenzierung induziert. Um dies zu untersuchen, wurden ML-2 und MOLM-13 mit ATRA behandelt, für 96 Stunden inkubiert und anschließend der Differenzierungsgrad per FACS bestimmt. Hierfür wurde auf die Zellen gated, welche positiv für CD11b waren. Nach ATRA-Behandlung gab es deutlich mehr Zellen, die CD11b-positiv waren (Abb. 21). Wir konnten zeigen, dass ATRA-Behandlung dazu führt, dass der Differenzierungsmarker CD11b häufiger exprimiert wird, was auf eine gesteigerte Differenzierung hinweist. Nachdem die differenzierungsinduzierende Wirkung von ATRA in den AML-Zelllinien gezeigt werden konnte, wurde die Rolle der miR-193b in diesem Prozess untersucht.

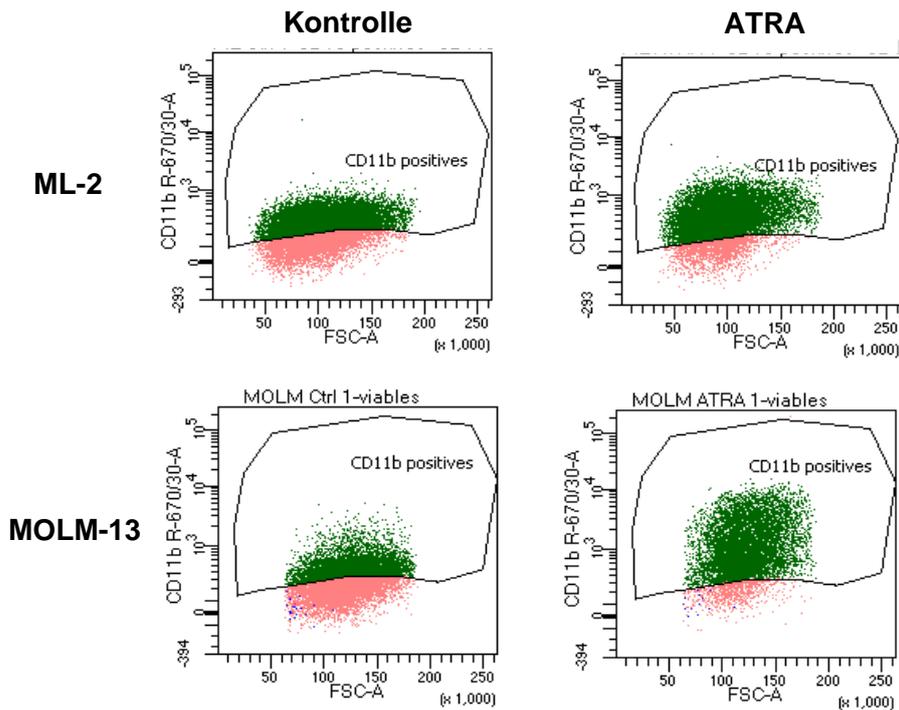


Abbildung 21: ATRA initiiert Differenzierung in ML-2 und MOLM-13. Darstellung von FACS Dot Plots des Differenzierungsmarkers CD11b nach 96 Stunden Inkubation mit DMSO oder ATRA. ATRA führt zu einem erhöhten Anteil an CD11b-positiven Zellen in ML-2 und MOLM-13. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Dargestellt ist exemplarisch die Messung eines technischen Replikats. N=1.

9.4.4 Der Behandlungseffekt von ATRA in AML ist nicht von miR-193b abhängig

Um eine potenzielle Abhängigkeit von ATRA von miR-193b hinsichtlich der Umsetzung des Behandlungseffekts in AML zu überprüfen, wurde der gleiche Versuchsansatz wie bei NB-4 gewählt. Zur Verringerung des miR-193b-Levels wurden LNA verwendet. Die Zellen wurden mit miR-193b-LNA sowie ATRA behandelt und mit Zellen verglichen, die nur mit ATRA oder einer Kontrolle behandelt wurden. Danach wurde die Proliferation der verschiedenen Gruppen für 96 Stunden beobachtet und jeweils nach 48 und 96 Stunden wurden die Zellen gezählt. Bei ML-2 zeigte sich beim Wachstum 48 Stunden nach ATRA-Zugabe noch kein Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Nach 96 Stunden war das Wachstum leicht, aber signifikant reduziert. Die Wachstumskurve von MOLM-13 war 48 Stunden nach ATRA-Zugabe minimal verringert. Nach 96 Stunden war das Wachstum durch ATRA-Behandlung beinahe um die Hälfte reduziert. Die Zellen, die bei verringertem miR-193b-Level mit ATRA behandelt

wurden, zeigten im Vergleich dazu keinen Unterschied; ihr Wachstum war gleichermaßen eingeschränkt (Abb. 22). Eine gleichzeitige Behandlung mit ATRA und miR-193b-LNA hatte, verglichen mit alleiniger ATRA-Behandlung, keinen Einfluss auf die Proliferation. Der Einfluss von miR-193b auf den differenzierungsinduzierenden Effekt von ATRA wurde durch Messung des Differenzierungsmarkers CD11b nach 96 Stunden bestimmt. Sowohl in ML-2 als auch in MOLM-13 war die CD11b-MFI bei den mit ATRA behandelten Zellen mehr als doppelt so hoch als bei der Kontrolle. Diejenigen Zellen, die zusätzlich mit miR-193b-LNA behandelt wurden, wiesen genau den gleichen Grad an Steigerung der MFI von CD11b auf (Abb. 23). ATRA induzierte die Differenzierung bei verringertem miR-193b-Level gleichermaßen. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die miR-193b nicht essenziell für die Umsetzung des Behandlungseffekts von ATRA in AML ist.

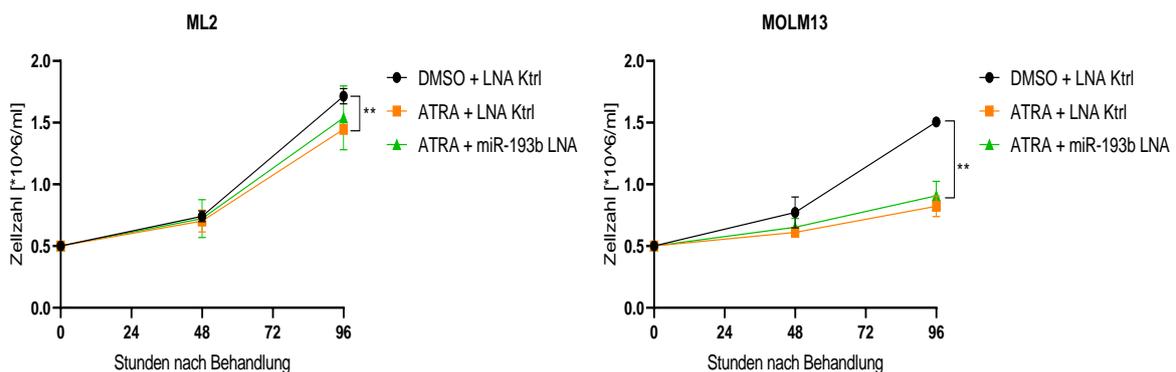


Abbildung 22: Verringertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von ATRA auf ML-2 und MOLM-13. Darstellung der Proliferationskurven nach Zugabe der LNA bzw. Kontroll-LNA und gleichzeitiger ATRA-Behandlung. ATRA reduziert die Proliferation der Zelllinien ML-2 und MOLM-13; eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner Veränderung. Konzentration der LNA: 500nM. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. ** $p<0,01$.

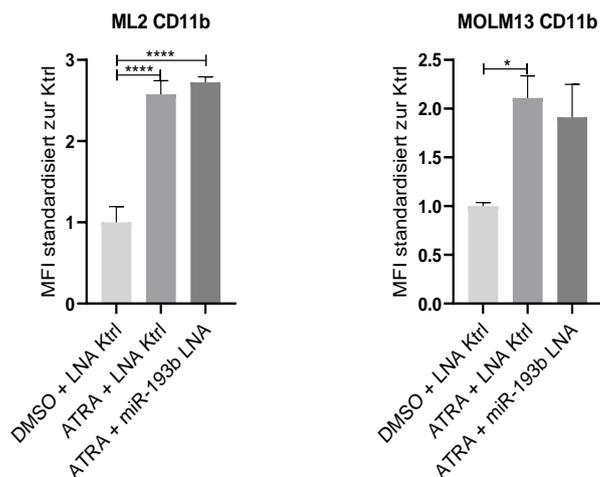


Abbildung 23: Verringertes miR-193b-Level hat keinen Einfluss auf den differenzierungsinduzierenden Effekt von ATRA auf ML-2 und MOLM-13. Darstellung der MFI des Differenzierungsmarkers CD11b 96 Stunden nach Experimentbeginn. ATRA führt zu einer Erhöhung des Signals von CD11b; Eine gleichzeitige Verringerung der miR-193b-Menge via LNA führt zu keiner veränderten Wirkung von ATRA auf die Differenzierung der Zellen. Die mit LNA behandelten Proben sind im Verhältnis zu den mit Kontroll-LNA behandelten Proben standardisiert. Konzentration der LNA: 500nM. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts der MFIs mit Standardabweichung. N=3. Signifikanz berechnet mittels ordinary one-way-Anova. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; **** $p<0,0001$.

9.4.5 MiR-193b-Überexpression führt in Kombination mit ATRA zu synergistischem Effekt in AML

Auch haben wir untersucht, inwiefern sich eine Erhöhung des miR-193b-Levels auf den antiproliferativen Effekt von ATRA auf AML auswirkt. Um das zelluläre miR-193b-Level zu erhöhen, wurden ML-2 und MOLM-13 mit einem miR-193b-Überexpressionsvektor transduziert. Anschließend fand eine Behandlung mit ATRA statt. Nach 96 Stunden wurde das Wachstum verglichen. Das durch ATRA verringerte Wachstum der Zellen wurde durch erhöhte miR193b-Level noch weiter reduziert (Abb. 24). Diejenigen Zellen, die mit dem miR-193b-Überexpressionsvektor transduziert und gleichzeitig mit ATRA behandelt wurden, zeigten in beiden AML-Zelllinien die am stärksten reduzierte Proliferation. Dabei wurde die antiproliferative Wirkung von ATRA mehr als verdoppelt. Gesteigerte miR-193b-Level führten zu einer Verstärkung des Behandlungseffekts von ATRA. Damit konnten wir einen Synergismus zwischen miR-193b und ATRA aufdecken.

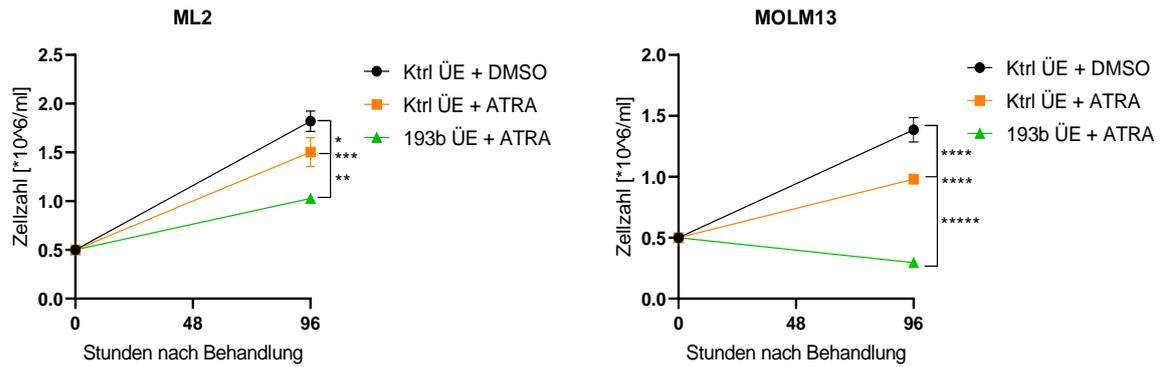


Abbildung 24: Erhöhte miR-193b-Level verstärken die antiproliferative Wirkung von ATRA auf ML-2 und MOLM-13. Darstellung der Proliferationskurven nach Transduktion der Zellen mit miR-193b-Überexpressions- bzw. Kontrollvektor und gleichzeitiger ATRA-Behandlung. ATRA reduziert die Proliferation der Zelllinien; eine gleichzeitige Erhöhung der miR-193b-Menge via lentiviraler Überexpression führt zu einem synergistischen antiproliferativen Effekt. MOI=5. ÜE= Überexpression. Konzentration von ATRA und DMSO als Kontrollsubstanz: 1 μ M. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus n=3. Signifikanz berechnet mittels t-Test. $\alpha=0,05$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; ***** $p<0,00001$.

10 Diskussion

10.1 Synergismus von miR-193b & ATRA/ GSK-LSD1 in AML

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass der antileukämische Effekt der beiden Wirkstoffe ATRA und GSK-LSD1 über eine miR-193b-Induktion vermittelt wird. Wir konnten zeigen, dass dieser Effekt bei den humanen AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 sowie bei der APL-Zelllinie NB-4 nicht über die miR-193b vermittelt ist. Außerdem konnte eine bislang nicht beschriebene synergistische Wirkung einer Kombinationsbehandlung von jeweils GSK-LSD1 bzw. ATRA mit der miR-193b aufgedeckt werden.

Eine alleinige Hochregulation der miR-193b durch lentivirale Transduktion zeigte keine Effekte in Proliferation oder Differenzierung der Zellen. Bhayadia et al. beschrieben einen solchen Effekt, verwendeten jedoch im Gegensatz zu dieser Arbeit zusätzlich den Differenzierungsinduktor Calcitriol (80), was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Um einen potenziellen additiven Effekt bzw. Synergismus zwischen der tumorsuppressiven miR-193b und den beiden Wirkstoffen zu untersuchen, bestand der experimentelle Ansatz in einer lentiviralen Überexpression der miR-193b in den beiden AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 und anschließender Behandlung mit jeweils ATRA oder GSK-LSD1. Bei beiden Kombinationen, ATRA + miR-193b-Überexpression sowie GSK-LSD1 + miR-193b-Überexpression, zeigte sich eine Verstärkung des antiproliferativen Effekts gegenüber der alleinigen Anwendung der Wirkstoffe. Der Effekt der ATRA-basierten Kombinationstherapie ist bei den Zelllinien ML-2 und MOLM-13 etwa gleich. Bei der Kombination von GSK-LSD1 + Überexpression ist bei MOLM-13 ein stärkerer antiproliferativer Effekt zu beobachten. Bei ML-2 wird die stark antiproliferative Wirkung von GSK-LSD1 nur leicht verstärkt. Dafür wird die differenzierungsinduzierende Wirkung von GSK-LSD1 durch die miR-193b-Überexpression in ML-2 deutlich gesteigert. Hier lässt sich eine Parallele zu den Ergebnissen von Bhayadia et al. erkennen, wo eine Behandlung mit miR-193b nach Calcitriol Zugabe ebenso nur bei ML-2 zu einer gesteigerten Differenzierung führte (80). Ein potenzieller Synergismus oder additiver Effekt zwischen miR-193b und ATRA/GSK-LSD1 wurde bisher noch nicht erforscht. Um die sich verstärkende Wirkung der miR-193b und der beiden Wirkstoffe verstehen zu können, wird im Folgenden auf ihre Wirkweise eingegangen.

Die miR-193b induziert einen G1/S-Phasen-Block des Zellzyklus, indem sie verschiedene Schritte des MAPK-Signalwegs sowie den Zellzyklusregulator CCND1 (Cyclin D1) direkt inhibiert (80). GSK-LSD1 inhibiert die Expressionsregulation verschiedener Gene durch LSD1, darunter beispielsweise GFI1B und IRF8 (86). Die antileukämische Wirkung von LSD1-Inhibitoren findet jedoch nicht durch die Hemmung der Enzymaktivität, sondern durch Blockade der strukturellen Interaktion von LSD1 und Transkriptionsfaktoren statt (86, 88). Eine Inhibition von LSD1 führt u.a. zu einer gesteigerten Differenzierung und einer erhöhten Apoptoserate (90). ATRA wirkt auf transkriptioneller Ebene durch Bindung an den Rezeptor RARA. RARA bildet zusammen mit RXR einen Heterodimer, der in Abwesenheit von ATRA zu einer Repression der Transkription führt. Dies bewirkt einen Differenzierungsblock (35). Ist eine ausreichend hohe ATRA-Konzentration vorhanden, induziert dies Zelltod sowie Differenzierung und inhibiert die Proliferation (91).

Da die miR-193b ihre tumorsuppressive Wirkung hauptsächlich entlang des MAPK-Signalwegs entfaltet (80), liegt es nahe, dass sich die synergistische Wirkung mit den beiden Wirkstoffen GSK-LSD1 und ATRA durch eine Interaktion am MAPK-Weg begründet.

Deb et al. haben herausgefunden, dass LSD1-Inhibition in MLL-translozierter AML zu einer verringerten Aktivierung des mTOR Komplex 1 (mTORC1)-Signalwegs führt (92, 93). Dieser Signalweg ist in AML dysreguliert und im Vergleich zu gesunden Zellen stärker aktiv (94). Der mTORC1 Komplex spielt eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus der Zellen (93). Carracedo et al. fanden heraus, dass eine mTORC1-Inhibierung zu einer gesteigerten MAPK-Aktivität führt. Durch diese Ergebnisse schlossen sie auf einen potenziellen Nutzen einer dualen Kombinationstherapie von mTORC1 Inhibitoren und MAPK Inhibitoren, indem die Tumorzellen auf zwei wichtigen Signaltransduktionskaskaden gleichzeitig angegriffen werden (95). Der beobachtete synergistische Effekt im Rahmen dieser Arbeit lässt sich eventuell durch ein Modell erklären, in dem diese Interaktionen ablaufen: GSK-LSD1 inhibiert LSD1 und folglich kommt es zu einer verringerten mTORC1 Aktivität. Dies führt zu einer Steigerung des MAPK-Signalwegs. Die gesteigerte MAPK-Signalübertragung

wird durch die miR-193b jedoch inhibiert. Somit fungieren die beiden Wirkstoffe GSK-LSD1 und miR-193b auf synergistische Art und Weise und führen zu dem beobachteten verstärkten tumorsuppressiven Effekt bei AML. Möglicherweise liegt die Erklärung für die beobachtete sich verstärkende Wirkung jedoch auch lediglich in einer Addition von jeweils verschiedenen, durch die beiden Wirkstoffe eingeleiteten Mechanismen. Die Wirkung durch den von der miR-193b gehemmten MAPK-Signalweg könnte sich mit der differenzierungsinduzierenden und antiproliferativen Wirkung von GSK-LSD1 durch Beeinflussung eines anderen Signalwegs, addieren.

Die Wirkung von ATRA in Tumoren wird zum einen durch RAR vermittelt, zum anderen aktiviert ATRA verschiedene Signalwege, u.a. den MAPK-Signalweg. In der Folge beeinflussen sich die Transkriptionsaktivität von RAR sowie andere Transkriptionsfaktoren gegenseitig durch Phosphorylierung (96). Der tumorsuppressive Synergismus von ATRA mit der miR-193b könnte also sowohl durch die ATRA-induzierte veränderte Transkription durch RAR, also auch durch eine ATRA-induzierte Modulation von Signaltransduktionskaskaden erfolgen.

Hu et al. konnten zeigen, dass ATRA-Behandlung von APL-Zellen zu einer geringeren Aktivierung von Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) führte, was letztendlich in einer gesteigerten myeloischen Differenzierung resultierte (97). Außerdem konnte in Mesangiumzellen gezeigt werden, dass ATRA-Behandlung zu einer erhöhten Transkription von CDK-Inhibitoren führt, wodurch es zu einer Inhibition des Zellzyklus in der G1 Phase kommt (98). Zudem führt eine ATRA-Behandlung in APL-Zellen zu einer Ubiquitinierung von Cyclin D1, das folglich proteosomal degradiert wird, wodurch es zu einer Hemmung des Zellzyklus kommt (99). Die Anwendung von Kinase-Inhibitoren, die c-Raf und die Src-Familie inhibieren, führten bei Jensen et al. zu einer gesteigerten ATRA-induzierten Reifung von AML-Zellen (100). Des Weiteren verstärken Die Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib die Wirkung von ATRA auf AML-Zellen, indem sie die Aktivierung von u.a. p38MAPK inhibieren (101). Auch verstärkt Gefitinib die ATRA-induzierte Differenzierung in AML-Zelllinien durch eine Hemmung von Rezeptor Tyrosin Kinasen und Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs (102). Da die miR-193b zu einer Inhibition des MAPK-Signalwegs, Cyclin

D1 und CDKs führt (80), könnte dies eine Erklärung für den Synergismus mit ATRA darstellen.

Es ist zudem beschrieben, dass eine epigenetische Reprogrammierung durch LSD1-Inhibition eine effektive Wirkung von ATRA in AML entfalten kann (87). Die Wirksamkeit der Kombination des LSD1-Inhibitors TCP mit ATRA konnte in einer klinischen Phase 1/2-Pilotstudie nachgewiesen werden (103). Daher scheint es wahrscheinlich, dass die miR-193b ebenfalls durch ihre epigenetische Einflussnahme auf die Zellen zu einer Wirkungsverstärkung von ATRA führt. Denkbar wäre neben der Wirkung über den MAPK-Signalweg auch eine durch die miR-193b induzierte epigenetische RARA-Hochregulation in den AML-Zellen, die zu einer gesteigerten ATRA-Sensitivität führt. Hierzu ist weitere Forschung notwendig, um diese Hypothese zu untersuchen.

10.2 Antileukämischer Effekt von LSD1-Inhibition ist in AML und APL nicht von miR-193b abhängig

Esther Braun hat in ihrer Dissertation herausgefunden, dass der antileukämische Effekt des irreversiblen LSD1-Inhibitors GSK-LSD1 zumindest teilweise über eine Steigerung der miR-193b-Konzentration in murinen Leukämiezellen vermittelt sein könnte. Ihre Ergebnisse zeigen, dass der antiproliferative und differenzierungsinduzierende Effekt von GSK-LSD1 in murinen Hoxa9/Meis1-transduzierten Zellen durch einen miR-193b-K.O. abgeschwächt wird (81). Im Rahmen dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin zu untersuchen, inwiefern diese Ergebnisse auch bei humanen AML-Zelllinien zutreffen. Zudem wurde diese Fragestellung auch an der humanen APL-Zelllinie NB-4 untersucht.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das zelluläre Level der miR-193b in den beiden AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 mittels LNA reduziert, bevor die Zellen mit GSK-LSD1 behandelt wurden. Hierbei zeigte sich, dass sich die Proliferation in beiden Zelllinien gleichermaßen verringert, unabhängig vom Level der miR-193b. Die Ergebnisse, die von Esther Braun in murinen Zellen gezeigt wurden, konnten damit in diesen zwei humanen Zelllinien nicht gezeigt werden. Aufgrund der Überprüfung der Effektivität der LNA ist davon auszugehen, dass die verwendete Methodik für diese Experimente funktioniert hat und zu einer

Senkung des zellulären miR-193b-Levels führte. Dennoch besteht in dieser Methodik ein grundlegender Unterschied zu dem von Esther Braun gewählten Ansatz der miR-193b-Senkung. Sie hat einen genetischen Knockout benutzt (81). Dadurch hat sie die Expression der miR-193b unterdrückt, während LNA die bereits exprimierten miRs binden und dadurch die freie Menge reduzieren. Eine gewisse Menge an freien miRs bleibt weiterhin vorhanden. Möglicherweise reicht diese reduzierte Menge aus, um den antiproliferativen Effekt von GSK-LSD1 zu vermitteln. Dennoch wäre zu erwarten, dass eine leichte Abschwächung des antiproliferativen Effekts zu erkennen wäre. Eine Frage, die zudem offenbleibt, ist, wie schnell die durch GSK-LSD1 erhöhte miR-193b durch LNA gebunden wird. Theoretisch wäre das Binden der miR-193b an ihre Zielsequenzen möglich, bevor sie von den LNA gebunden wird und damit ihre Funktion unterdrückt wird. Da das gesamte zelluläre miR-193b-Level durch die LNA vermindert ist, scheint es jedoch unwahrscheinlich, dass die erhöhte Menge der miRs ihre antiproliferative Wirkung derart schnell entfaltet. Überprüfen könnte man die Kinetik des Bindens der LNA beispielsweise durch MicroRNA-Isolation zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten Stunden nach LNA-Transfektion. Mittels qPCR könnte man aus den Isolaten die Konzentration an freier miR-193b untersuchen. Außerdem wurden die Versuche von Esther Braun an murinen Zellen durchgeführt, während im Rahmen dieser Arbeit humane Zellen genutzt wurden. Es kann sein, dass miR-193b-vermittelte Mechanismen in murinen Zellen anders als in menschlichen Zellen verlaufen. Denkbar wären andere Zielsequenzen der miR-193b bei murinen und humanen Zellen. Esther Braun untersuchte lediglich c-KIT als Indikator für den Differenzierungsgrad. Humanes c-KIT weist im Vergleich zu murinen Zellen jedoch keine Bindungsstelle für die miR-193b auf. In der Studie von Esther Braun stellte sich die Differenzierungsinduktion durch GSK-LSD1 in den murinen Hoxa9/Meis1 Zellen durch eine c-KIT Reduktion dar. Eine weniger starke Reduktion von c-KIT bei den miR-193b K.O.-Zellen wurde daher als Abschwächung der Differenzierung gedeutet. C-KIT ist jedoch ein direktes Ziel der miR-193b (80) und wird von ihr reduziert, sodass sich die Ergebnisse von Esther Braun hierdurch erklären lassen könnten. In dieser Arbeit wurden andere Surrogatmarker für den Differenzierungsgrad verwendet, die anders reguliert sein

können als c-KIT. Eine morphologische Auswertung der Zelldifferenzierung erfolgte nicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass die antileukämische Wirkung von GSK-LSD1 in humanen AML-Zellen nicht über eine miR-193b-Steigerung vermittelt ist.

Die Hypothese einer Vermittlung des antileukämischen Effektes von GSK-LSD1 durch die miR-193b wurde im Rahmen dieser Arbeit auch in der APL-Zelllinie NB-4 überprüft. Die miR-193b ist nicht als Tumorsuppressor in APL bekannt und diese Hypothese wurde bisher nicht wissenschaftlich überprüft. Die Proliferation der NB-4-Zellen wurde nach Behandlung mit GSK-LSD1 stark reduziert. Dieser starke antiproliferative Effekt von dem Tranylcypromin (TCP)-Derivat GSK-LSD1 bei NB-4 steht im Einklang mit aktuellen Ergebnissen, bei denen von TCP abgeleitete LSD1-Inhibitoren eine starke Reduktion der Proliferation in NB-4 bewirkten (104). Durch die Behandlung wurde ebenfalls die Differenzierung induziert. Eine GSK-LSD1-Behandlung von Zellen mit reduziertem miR-193b-Level weist jedoch identische Resultate auf, sowohl bezogen auf die Proliferation als auch auf die Differenzierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Rückschluss zu, dass der in NB-4 vorhandene, durch GSK-LSD1 induzierte, antiproliferative und differenzierungsinduzierende Effekt, nicht durch die miR-193b vermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die antileukämische Wirkung von GSK-LSD1 in humanen AML- und APL-Zellen nicht über die miR-193b vermittelt zu sein scheint. Bevor diese Hypothese endgültig verworfen wird, sollte eine Wiederholung der Experimente die Verwendung eines K.O. des miR-193b-Gens statt der LNA beinhalten. Für den Fall, dass sich mit einem K.O. die Hypothese bestätigen ließe, wäre im nächsten Schritt eine Erforschung des Mechanismus der gesteigerten miR-193b-Level durch GSK-LSD1 von Interesse, beispielsweise durch eine Promotermethylierungsstudie oder durch Untersuchung der beiden miR-Schneideenzyme Drosha und Dicer.

10.3 Antileukämischer Effekt von ATRA ist in APL und AML nicht von miR-193b abhängig

APL ist die einzige Form von AML, bei der ATRA zu einer Differenzierung führt und klinisch erfolgreich angewendet wird (35). Außerdem ist nur bei der APL die miR-193b erhöht (80). Daraus entwickelte sich die Fragestellung, ob die miR-193b in die Umsetzung des Effekts von ATRA in APL involviert ist, bzw. ob ihr hohes Level eine Voraussetzung für die erfolgreiche ATRA-Therapie darstellt. Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die miR-193b möglicherweise eine bis jetzt unbekannte Rolle bei der ATRA-Behandlung von AML-Zellen spielt. Pharmakologische Konzentrationen von ATRA führen in APL zur Überwindung des Differenzierungsblocks und damit zu einer Differenzierung der Promyelozyten zu reifen Granulozyten (32). AML-Zellen sind hingegen resistent gegenüber einer ATRA-induzierten Differenzierung. Auch wenn die Datenlage für die Ursachen nicht eindeutig ist, liegt der wahrscheinlichste Grund in einer epigenetisch bedingten Herunterregulation des für die Differenzierung notwendigen RARA-Proteins (105). Trotz einzelner Berichte über eine *in vitro* Wirkung von ATRA bei AML-Zellen (106), konnte eine differenzierungsinduzierende Therapie bei AML-Patienten durch ATRA klinisch bisher nicht erfolgreich angewandt werden (106, 107). In dieser Arbeit hat die Behandlung der beiden AML-Zelllinien ML-2 und MOLM-13 mit ATRA zu einer signifikanten Proliferationsreduktion geführt. Die Expression des Differenzierungsmarkers CD11b hat sich nach ATRA-Behandlung bei beiden AML-Zelllinien mehr als verdoppelt, insofern ist von einer Differenzierungsinduktion durch ATRA auszugehen. Eine ATRA-Behandlung der Zellen mit reduziertem miR-193b-Level führte jedoch in unserer Studie zu dem gleichen antiproliferativen und differenzierungsinduzierenden Effekt. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass miR-193b keine Rolle beim Behandlungseffekt von ATRA in AML-Zelllinien spielt.

Die Behandlung der APL-Zelllinie NB-4 führte erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg des Differenzierungsmarkers CD11b und einem antiproliferativen Effekt. MiRs, die eine Rolle bei ATRA-induzierter Differenzierung in APL spielen, sind beispielsweise die miR-382 (108) und der miR-17-92-Cluster (109). Eine Behandlung von NB-4-Zellen mit ATRA in Kombination mit miR-382-mimics führte

zu einer abgeschwächten Differenzierung und die Kombination aus ATRA und reduziertem miR-382-Level zu einer gesteigerten Differenzierung im Vergleich zu ATRA-Behandlung allein. MiR-382 bindet an die mRNA des von ATRA regulierten Tumorsuppressors Phosphatase and tensin homolog (PTEN) (108). Yu et al. fanden heraus, dass eine Überexpression des miR-clusters miR-17-92 die ATRA-induzierte Differenzierung in NB-4 verhindert (109). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Überprüfung einer potenziellen Rolle der miR-193b bei ATRA-induzierter Differenzierung die NB-4-Zellen gleichzeitig mit ATRA und miR-193b-LNA behandelt. Die Resultate der Experimentalgruppe waren annähernd die gleichen wie bei der Kontrollgruppe, sowohl auf Differenzierung als auch auf Proliferation bezogen.

Folglich zeigen die Resultate dieser Arbeit auf, dass miR-193b keine Rolle in ATRA-induzierter Differenzierung bei NB-4 spielt.

10.4 NB-4 ist nicht auf hohe miR-193b-Level angewiesen

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die miR-193b ein Protoonkogen in der APL-Zelllinie NB-4 darstellt. Die miR-193b-Expressionsdaten in unterschiedlichen AML-Subtypen von Bhayadia et al. zeigten, dass die miR-193b bei APL als einziger AML-Entität hochreguliert ist (80). Erhöhte miR-193b-Level könnten die Differenzierung zu reifen Granulozyten in APL verhindern und somit eine Voraussetzung für das Überleben der APL-Zellen darstellen. Dass miRs bei APL als Protoonkogene fungieren, wurde bereits häufiger beschrieben. So sind beispielsweise die miR-181 (110), miR-382 (108) und der miR-17-92 Cluster (109) als Protoonkogene in APL bekannt. Sie alle sind in APL-Zellen hochreguliert und inhibieren eine durch physiologische ATRA-Level bedingte Differenzierung. Wir konnten zeigen, dass das zelluläre miR-193b-Level in der APL-Zelllinie NB-4 jeweils fast 60-mal, bzw. mehr als 10-mal so hoch wie in den beiden AML-Zelllinien ML-2 bzw. MOLM-13 ist. Daher repräsentierten NB-4 Zellen das Bild, das in APL-Patientenzellen gemessen wurde und eigneten sich zur Untersuchung erhöhter miR-193b-Level in APL. Als nächstes wurde das miR-193b-Level von NB-4 durch LNA reduziert und anschließend die Proliferation über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet sowie der Differenzierungsgrad

durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Senkung des miR-193b-Levels durch miR-Inhibitoren wurde z.B. durch Liu et al. (108) erfolgreich durchgeführt.

Über den gesamten Versuchszeitraum ließ sich bei den Zellen mit reduziertem miR-193b-Level kein Unterschied in den Proliferationskurven im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Auch die Expression der beiden Differenzierungsmarker CD11b und CD13 blieb unverändert bei den mit miR-193b-LNA behandelten Zellen. Interessanterweise führte eine ATRA-induzierte Differenzierung der NB-4-Zellen zu einem miR-193b Anstieg. Im Gegensatz dazu wurde nach ATRA-Behandlung eine Senkung des miR-Levels bei den protoonkogenen miRs miR-382 und dem miR-17-82 Cluster beobachtet (108, 109). Die Stabilität der LNA, eine hohe Transfektionseffizienz und eine effiziente Senkung des miR-193b-Levels bei NB-4 wurden in Vorversuchen bestimmt, wodurch eine fehlerhafte Methodik nahezu ausgeschlossen werden kann.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die miR-193b in der APL-Zelllinie NB-4 kein Protoonkogen darstellt, das die Differenzierung der Promyelozyten verhindert. Weshalb sie bei APL als einziger AML-Entität erhöht ist (80) bedarf weiterer Forschung, auch an Primärzellen von Patienten mit APL.

10.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Hypothese, dass die miR-193b in der APL-Zelllinie NB-4 ein Protoonkogen darstellt ist durch die Ergebnisse dieser Arbeit zu verwerfen. Ebenso scheint weder die Wirkung von GSK-LSD1 noch ATRA über die miR-193b vermittelt zu sein. Eine Möglichkeit zur weiteren Validierung wäre der Einsatz eines genetischen knockout der miR-193b, anstatt die miR via LNA zu senken.

Für beide Wirkstoffen konnte jedoch ein bislang nicht bekannter tumorsuppressiver synergistischer Effekt in AML-Zellen beobachtet werden. Die miR-193b entfaltet ihre Wirkung hauptsächlich über die MAPK-Signaltransduktionskaskade. GSK-LSD1 und ATRA beeinflussen ebenso auf vielfältige Art die Aktivität dieses Signalwegs. Daher könnte sich der zugrundeliegende Mechanismus des Synergismus in einer gemeinsamen Modulation des MAPK-Signalwegs begründen. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind weitere Experimente von Interesse sowie notwendig.

Sobald eine effektive, gezielte und sichere Einschleusung der miRs in Patienten möglich ist, stellt eine Kombinationstherapie von einem der beiden bereits klinisch erprobten Wirkstoffen, GSK-LSD1 oder ATRA, mit der miR-193b perspektivisch einen interessanten Therapieansatz dar. Hierbei würde man von der synergistischen Wirkungsverstärkung Gebrauch machen. Zudem würde man von den günstigen Eigenschaften einer miR-basierten Therapie, wie einer geringen Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung, profitieren.

11 Literatur

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20):2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Walter MJ. What came first: MDS or AML? *Blood* 2015; 125(9):1357–8. doi: 10.1182/blood-2015-01-621193.
3. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(1):5–29. doi: 10.3322/caac.21254.
5. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* 2008; 19(4):379–90. doi: 10.1007/s10552-007-9097-2.
6. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014; 506(7488):328–33. doi: 10.1038/nature13038.
7. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016; 127(1):29–41. doi: 10.1182/blood-2015-07-604496.
8. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12):1079–89. doi: 10.1056/NEJMoa1112304.
9. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2011; 4:36. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.
10. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson AG et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368(22):2059–74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689.

11. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016; 374(23):2209–21. doi: 10.1056/NEJMoa1516192.
12. Shah A, Andersson TM-L, Racht B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol* 2013; 162(4):509–16. doi: 10.1111/bjh.12425.
13. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017; 31(1):63–76. doi: 10.1016/j.blre.2016.08.005.
14. Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Appl Health Econ Health Policy* 2013; 11(3):275–86. doi: 10.1007/s40258-013-0032-2.
15. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood* 2018; 131(5):496–504. doi: 10.1182/blood-2017-07-746453.
16. Ganzel C, Sun Z, Cripe LD, Fernandez HF, Douer D, Rowe JM et al. Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML-Patients: The ECOG-ACRIN experience. *Am J Hematol* 2018. doi: 10.1002/ajh.25162.
17. Medeiros BC. Is there a standard of care for relapsed AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31(4):384–6. doi: 10.1016/j.beha.2018.09.006.
18. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2018; 93(10):1267–91. doi: 10.1002/ajh.25214.
19. Kantarjian H, O'brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer* 2006; 106(5):1090–8. doi: 10.1002/cncr.21723.

20. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2014; 89(11):1063–81. doi: 10.1002/ajh.23834.
21. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009; 361(13):1249–59. doi: 10.1056/NEJMoa0904544.
22. Kouchkovsky I de, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J* 2016; 6(7):e441. doi: 10.1038/bcj.2016.50.
23. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013) 2020; 103(3):38–40.
24. Yanada M, Garcia-Manero G, Borthakur G, Ravandi F, Kantarjian H, Estey E. Relapse and death during first remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93(4):633–4. doi: 10.3324/haematol.12366.
25. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 2009; 301(22):2349–61. doi: 10.1001/jama.2009.813.
26. Li D, Wang L, Zhu H, Dou L, Liu D, Fu L et al. Efficacy of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia Adult Patients in First Complete Remission: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One* 2015; 10(7):e0132620. doi: 10.1371/journal.pone.0132620.
27. Østgård LSG, Lund JL, Nørgaard JM, Nørgaard M, Medeiros BC, Nielsen B et al. Impact of Allogeneic Stem Cell Transplantation in First Complete Remission in Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24(2):314–23. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.10.019.
28. Schetelig J, Schaich M, Schäfer-Eckart K, Hänel M, Aulitzky WE, Einsele H et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with intermediate and

- high-risk AML: results from the randomized Study Alliance Leukemia (SAL) AML 2003 trial. *Leukemia* 2015; 29(5):1060–8. doi: 10.1038/leu.2014.335.
29. Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 2005; 103(8):1652–8. doi: 10.1002/cncr.20945.
30. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with 30% blasts. *Blood* 2015; 126(3):291–9. doi: 10.1182/blood-2015-01-621664.
31. Braekeleer E de, Douet-Guilbert N, Braekeleer M de. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert review of hematology* 2014; 7(3):347–57. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24720386/>.
32. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 1993; 74(3):423–31. doi: 10.1016/0092-8674(93)80044-F.
33. Wang Z-Y, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008; 111(5):2505–15. doi: 10.1182/blood-2007-07-102798.
34. Nagpal S, Friant S, Nakshatri H, Chambon P. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J* 1993; 12(6):2349–60.
35. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 2013; 97(6):717–25. doi: 10.1007/s12185-013-1354-4.
36. Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honoré N, Chelbi-Alix M, Koken M et al. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RAR α) and oncogenic RAR α fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(26):14807–12. doi: 10.1073/pnas.96.26.14807.

37. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood* 2019; 133(15):1630–43. doi: 10.1182/blood-2019-01-894980.
38. Iland HJ, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Collins M, Hertzberg M et al. All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood* 2012; 120(8):1570-80; quiz 1752. doi: 10.1182/blood-2012-02-410746.
39. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369(2):111–21. doi: 10.1056/NEJMoa1300874.
40. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Bowen D, Kell J, Knapper S et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2015; 16(13):1295–305. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00193-X.
41. Zheng P-Z, Wang K-K, Zhang Q-Y, Huang Q-H, Du Y-Z, Zhang Q-H et al. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(21):7653–8. doi: 10.1073/pnas.0502825102.
42. Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Miller WH. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001; 98(9):2651–6. doi: 10.1182/blood.v98.9.2651.
43. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annual review of medicine* 2009; 60:167–79. Verfügbar unter: <https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/19630570/>.
44. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell* 2004; 116(2):281–97. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

45. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
46. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(10):775–89. doi: 10.1038/nrd3179.
47. Rothschild SI. microRNA therapies in cancer. *Mol Cell Ther* 2014; 2:7. doi: 10.1186/2052-8426-2-7.
48. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23(20):4051–60. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
49. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432(7014):231–5. doi: 10.1038/nature03049.
50. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956):415–9. doi: 10.1038/nature01957.
51. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66(15):7390–4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0800.
52. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4):259–69. doi: 10.1038/nrc1840.
53. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141(5):672–5. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x.
54. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30):10513–8. doi: 10.1073/pnas.0804549105.

55. Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33(6):1126–33. doi: 10.1093/carcin/bgs140.
56. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(2-3):75–86. doi: 10.1016/j.addr.2007.03.005.
57. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 2006; 12(7):1179–87. doi: 10.1261/rna.25706.
58. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(1):57–67. doi: 10.1038/nrd3010.
59. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* 2006; 114(1):100–9. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.014.
60. Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(4):467–86. doi: 10.1016/j.addr.2006.03.007.
61. Campani V, Rosa G de, Misso G, Zarone MR, Grimaldi A. Lipid Nanoparticles to Deliver miRNA in Cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2016; 17(8):741–9. doi: 10.2174/138920101708160517234941.
62. Kortylewski M, Nechaev S. How to train your dragon: targeted delivery of microRNA to cancer cells in vivo. *Mol Ther* 2014; 22(6):1070–1. doi: 10.1038/mt.2014.73.
63. Kabilova TO, Meschaninova MI, Venyaminova AG, Nikolin VP, Zenkova MA, Vlassov VV et al. Short double-stranded RNA with immunostimulatory activity: sequence dependence. *Nucleic Acid Ther* 2012; 22(3):196–204. doi: 10.1089/nat.2011.0328.
64. Di Stefano C, Mirone G, Perna S, Marfe G. The roles of microRNAs in the pathogenesis and drug resistance of chronic myelogenous leukemia (Review). *Oncol Rep* 2016; 35(2):614–24. doi: 10.3892/or.2015.4456.

65. Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res* 2007; 67(23):11111–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2858.
66. Hong DS, Kang Y-K, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2020; 122(11):1630–7. doi: 10.1038/s41416-020-0802-1.
67. Khordadmehr M, Shahbazi R, Sadreddini S, Baradaran B. miR-193: A new weapon against cancer. *J Cell Physiol* 2019; 234(10):16861–72. doi: 10.1002/jcp.28368.
68. Chen J, Zhang X, Lentz C, Abi-Daoud M, Paré GC, Yang X et al. miR-193b Regulates Mcl-1 in Melanoma. *Am J Pathol* 2011; 179(5):2162–8. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.010.
69. Jin X, Sun Y, Yang H, Li J, Yu S, Chang X et al. Deregulation of the MiR-193b-KRAS Axis Contributes to Impaired Cell Growth in Pancreatic Cancer. *PLoS One* 2015; 10(4):e0125515. doi: 10.1371/journal.pone.0125515.
70. Leivonen S-K, Mäkelä R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene* 2009; 28(44):3926–36. doi: 10.1038/onc.2009.241.
71. Li X-F, Yan P-J, Shao Z-M. Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer. *Oncogene* 2009; 28(44):3937–48. doi: 10.1038/onc.2009.245.
72. Mets E, van der Meulen J, van Peer G, Boice M, Mestdagh P, van de Walle I et al. MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015; 29(4):798–806. doi: 10.1038/leu.2014.276.

73. Mitra AK, Chiang CY, Tiwari P, Tomar S, Watters KM, Peter ME et al. Microenvironment-induced downregulation of miR-193b drives ovarian cancer metastasis. *Oncogene* 2015; 34(48):5923–32. doi: 10.1038/onc.2015.43.
74. Mu Y-P, Tang S, Sun W-J, Gao W-M, Wang M, Su X-L. Association of miR-193b down-regulation and miR-196a up-regulation with clinicopathological features and prognosis in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(20):8893–900. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8893.
75. Rauhala HE, Jalava SE, Isotalo J, Bracken H, Lehmusvaara S, Tammela TLJ et al. miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(6):1363–72. doi: 10.1002/ijc.25162.
76. Wu K, Zhao Z, Ma J, Chen J, Peng J, Yang S et al. Deregulation of miR-193b affects the growth of colon cancer cells via transforming growth factor- β and regulation of the SMAD3 pathway. *Oncol Lett* 2017; 13(4):2557–62. doi: 10.3892/ol.2017.5763.
77. Xu C, Liu S, Fu H, Li S, Tie Y, Zhu J et al. MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Cancer* 2010; 46(15):2828–36. doi: 10.1016/j.ejca.2010.06.127.
78. Zhong Q, Wang T, Lu P, Zhang R, Zou J, Yuan S. miR-193b promotes cell proliferation by targeting Smad3 in human glioma. *J Neurosci Res* 2014; 92(5):619–26. doi: 10.1002/jnr.23339.
79. Haetscher N, Feuermann Y, Wingert S, Rehage M, Thalheimer FB, Weiser C et al. STAT5-regulated microRNA-193b controls haematopoietic stem and progenitor cell expansion by modulating cytokine receptor signalling. *Nat Commun* 2015; 6:8928. doi: 10.1038/ncomms9928.
80. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A et al. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b: Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2018; 36(10):1007–16. doi: 10.1200/JCO.2017.75.2204.
81. Braun E. Identifikation von Regulatoren der tumorsuppressiven microRNA-193b in der akuten myeloischen Leukämie 2021.

82. Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 2006; 12(5):585–91. doi: 10.1038/nm1398.
83. Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell* 2012; 21(4):473–87. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.014.
84. Abdel-Magid AF. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors as Potential Treatment for Different Types of Cancers. *ACS Med Chem Lett* 2017; 8(11):1134–5. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00426.
85. Sprüssel A, Schulte JH, Weber S, Necke M, Händschke K, Thor T et al. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia* 2012; 26(9):2039–51. doi: 10.1038/leu.2012.157.
86. Barth J, Abou-El-Ardat K, Dalic D, Kurrle N, Maier A-M, Mohr S et al. LSD1 inhibition by tranylcyproline derivatives interferes with GFI1-mediated repression of PU.1 target genes and induces differentiation in AML. *Leukemia* 2019; 33(6):1411–26. doi: 10.1038/s41375-018-0375-7.
87. Schenk T, Chen WC, Göllner S, Howell L, Jin L, Hebestreit K et al. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2012; 18(4):605–11. doi: 10.1038/nm.2661.
88. Vinyard ME, Su C, Siegenfeld AP, Waterbury AL, Freedy AM, Gosavi PM et al. CRISPR-suppressor scanning reveals a nonenzymatic role of LSD1 in AML. *Nat Chem Biol* 2019; 15(5):529–39. doi: 10.1038/s41589-019-0263-0.
89. Fang Y, Liao G, Yu B. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *J Hematol Oncol* 2019; 12(1):129. doi: 10.1186/s13045-019-0811-9.

90. Feng Z, Yao Y, Zhou C, Chen F, Wu F, Wei L et al. Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia. *J Hematol Oncol* 2016; 9:24. doi: 10.1186/s13045-016-0252-7.
91. Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2000; 60(7):2040–8.
92. Deb G, Wingelhofer B, Amaral FMR, Maiques-Diaz A, Chadwick JA, Spencer GJ et al. Pre-clinical activity of combined LSD1 and mTORC1 inhibition in MLL-translocated acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2020; 34(5):1266–77. doi: 10.1038/s41375-019-0659-6.
93. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; 168(6):960–76. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
94. Herschbein L, Liesveld JL. Dueling for dual inhibition: Means to enhance effectiveness of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in AML. *Blood Rev* 2018; 32(3):235–48. doi: 10.1016/j.blre.2017.11.006.
95. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008; 118(9):3065–74. doi: 10.1172/JCI34739.
96. Ni X, Hu G, Cai X. The success and the challenge of all-trans retinoic acid in the treatment of cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019; 59(sup1):S71-S80. doi: 10.1080/10408398.2018.1509201.
97. Hu XT, Zuckerman KS. Role of cell cycle regulatory molecules in retinoic acid- and vitamin D3-induced differentiation of acute myeloid leukaemia cells. *Cell Prolif* 2014; 47(3):200–10. doi: 10.1111/cpr.12100.
98. Su B, Chen X, Zhong C, Guo N, He J, Fan Y. All-trans retinoic acid inhibits mesangial cell proliferation by up-regulating p21Waf1/Cip1 and p27Kip1 and down-regulating Skp2. *J Nephrol* 2012; 25(6):1031–40. doi: 10.5301/jn.5000090.
99. Khanna-Gupta A, Berliner N. ATRA: Finding targeted APL therapy targets. *Blood* 2007; 110(2):476–7. doi: 10.1182/blood-2007-04-086348.

100. Jensen HA, Bunaciu RP, Varner JD, Yen A. GW5074 and PP2 kinase inhibitors implicate nontraditional c-Raf and Lyn function as drivers of retinoic acid-induced maturation. *Cell Signal* 2015; 27(8):1666–75. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.03.014.
101. Lainey E, Wolfromm A, Sukkurwala AQ, Micol J-B, Fenaux P, Galluzzi L et al. EGFR inhibitors exacerbate differentiation and cell cycle arrest induced by retinoic acid and vitamin D3 in acute myeloid leukemia cells. *Cell Cycle* 2013; 12(18):2978–91. doi: 10.4161/cc.26016.
102. Miranda MB, Duan R, Thomas SM, Grandis JR, Redner RL, Jones JE et al. Gefitinib potentiates myeloid cell differentiation by ATRA. *Leukemia* 2008; 22(8):1624–7. doi: 10.1038/leu.2008.28.
103. Wass M, Göllner S, Besenbeck B, Schlenk RF, Mundmann P, Göthert JR et al. A proof of concept phase I/II pilot trial of LSD1 inhibition by tranlycypromine combined with ATRA in refractory/relapsed AML-Patients not eligible for intensive therapy. *Leukemia* 2021; 35(3):701–11. doi: 10.1038/s41375-020-0892-z.
104. Fioravanti R, Romanelli A, Mautone N, Di Bello E, Rovere A, Corinti D et al. Tranlycypromine-Based LSD1 Inhibitors: Structure-Activity Relationships, Antiproliferative Effects in Leukemia, and Gene Target Modulation. *ChemMedChem* 2020; 15(7):643–58. doi: 10.1002/cmdc.201900730.
105. Glasow A, Barrett A, Petrie K, Gupta R, Boix-Chornet M, Zhou D-C et al. DNA methylation-independent loss of RARA gene expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111(4):2374–7. doi: 10.1182/blood-2007-05-088344.
106. Su M, Alonso S, Jones JW, Yu J, Kane MA, Jones RJ et al. All-Trans Retinoic Acid Activity in Acute Myeloid Leukemia: Role of Cytochrome P450 Enzyme Expression by the Microenvironment. *PLoS One* 2015; 10(6):e0127790. doi: 10.1371/journal.pone.0127790.
107. Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S et al. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and

- predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* 2007; 110(5):1639–47. doi: 10.1182/blood-2007-03-080523.
108. Liu D, Zhong L, Yuan Z, Yao J, Zhong P, Liu J et al. miR-382-5p modulates the ATRA-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia by targeting tumor suppressor PTEN. *Cell Signal* 2019; 54:1–9. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.11.012.
109. Yu X, Hu Y, Wu Y, Fang C, Lai J, Chen S et al. The c-Myc-regulated miR-17-92 cluster mediates ATRA-induced APL cell differentiation. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 2019; 15(6):364–70. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31264378/>.
110. Bräuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, Gerloff D, Katzerke C, Verga Falzacappa MV et al. PML/RAR α -Regulated miR-181a/b Cluster Targets the Tumor Suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Res* 2015; 75(16):3411–24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3521.

12 Anhang

12.1 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Michael Rieger für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, seine für mich stets offene Tür sowie die vielen Korrekturen und Anregungen bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Ich möchte mich zudem bei meiner Arbeitsgruppe für die fortwährende Unterstützung und die vielen hilfreichen Ratschläge während meiner Laborarbeiten bedanken.

Ein besonderer Dank gilt der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischen Onkologie und der Dr. Werner Jackstädt Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch das Dr. Werner Jackstädt-DGHO-Promotionsstipendium.

12.2 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die tumorsuppressive MicroRNA-193b in Wirkstoff induzierter Differenzierung und Proliferation in Akuter Myeloischer und Promyeloischer Leukämie

in der Medizinischen Klinik 2 (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Rheumatologie, Infektiologie) am Zentrum der Inneren Medizin unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Michael Rieger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)