

Inhibition of LSD1 in Non-Small Cell Lung Cancer – *in vitro* and *in vivo*

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. nat. med.
der Medizinischen Fakultät
und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Iris F. Macheleidt
aus Hemer, Deutschland

MIKROFORM,
Köln, 2017

Referenten: Prof. Dr. Matthias Fischer

PD Dr. Niels Gehring

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2017

Summary

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the Western world, and 55% of all lung cancer cases are characterized as the non-small cell lung cancer (NSCLC) subtype adenocarcinoma (LUAD). Despite new therapies that have been developed in recent years, the 5-year survival rate is still at 20%, which shows that even novel strategies are urgently needed. One of these new strategies is to target epigenetic modifiers and modifications, especially the lysine specific demethylase 1 (LSD1). This is of significant interest because LSD1 regulates transcription by demethylating histone 3 lysine 4 and 9 (H3K4 and H3K9), which leads to repression or activation of transcription, respectively.

First, a tissue microarray containing 182 well-characterized LUAD samples was established. Expression analysis revealed for the first time that LSD1 is overexpressed in LUAD. Furthermore, LSD1 upregulation was associated with the grade of the tumor and metastasis formation. Next, several LSD1 inhibitors were tested for their ability to inhibit LUAD cell growth. However, only HCI-2509, a reversible inhibitor, which is blocking the catalytic and the protein interaction site of LSD1, was shown to efficiently inhibit histone demethylation, cell growth, and migration and invasion capacities in all tested NSCLC cell lines. Comprehensive expression profiling by means of hybridization microarrays identified 890 transcripts, which are divergently regulated upon HCI-2509 treatment. Subsequent pathway analysis using a phosphorylation immune array revealed a reduction of EGFR signaling, an important pathway, which is often aberrantly activated in LUAD. A pronounced inhibition of tumor growth was not only demonstrated *in vitro*, but also *in vivo*, using two different transgenic mouse LUAD models. In the EGFR-driven tumor model, HCI-2509 treatment was started after evident tumor formation, which was verified by regular micro computed tomography (μ CT). In a conditional Cre-dependent KRAS-driven LUAD model, HCI-2509 was either applied continuously during tumor development or only in the last phase. In both cases, HCI-2509 treatment resulted in a marked and significant reduction of tumor growth and tumor formation.

The inhibition of LSD1, using RNA interference-mediating short hairpin constructs (shLSD1), resulted in the distinct reduction of cell growth and invasion capacities *in vitro*. Surprisingly, after crossbreeding doxycycline-inducible shLSD1 mice into KRAS mice, extreme tumor growth was observed. Other experimental designs demonstrated that the level of LSD1 is important, especially during the tumor initiation and tumor formation phases. Furthermore, in all experimental designs, shLSD1 mice displayed a stronger proliferation rate than in KRAS mice, in which LSD1 expression is not transcriptionally silenced by shLSD1. In further experiments, tumor growth was shown to be independent of doxycycline, and the immune response was also unaltered by LSD1 knockdown.

In conclusion, the immense effect on NSCLC tumor growth arrest by the non-conventional LSD1 inhibitor HCI-2509, which impedes LSD1 enzyme activity and also protein interactions, is discussed as a therapeutic option for novel drug combination strategies. The discrepancy between the tumor

growth inhibition by HCI-2509 and tumor growth acceleration by transcriptionally LSD1 repression – even when LSD1 is only repressed in the phase of cancer initiation – points to multifaceted functions of LSD1. For this reason, the versatile and condition-dependent functions of LSD1 in cancer development will be a central component of future studies.

Zusammenfassung

Lungenkrebs ist der führende Grund für krebsbedingte Todesfälle in der westlichen Welt; 55 % aller Lungenkrebsfälle gehören zum Subtyp Adenokarzinom (LUAD) des nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC). Obwohl in den letzten Jahren neue Therapien entwickelt wurden, liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate immer noch bei 20 %. Deshalb werden dringend neue therapeutische Strategien benötigt. Eine dieser Strategien hat zum Ziel, epigenetische Modifikationen und Modifikatoren zu inhibieren. Vor allem die Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) ist hierbei von hohem Interesse. Diese reguliert die Transkription durch die Demethylierung von Histon 3 Lysine 4 und 9 (H3K4 und H3K9), was wiederum zur Aktivierung oder Repression der Transkription führt.

Als erstes wurde ein Gewebe-Microarray (TMA) mit 182 gut charakterisierten LUAD-Proben etabliert. Eine Expressionsanalyse offenbarte zum ersten Mal, dass LSD1 im LUAD überexprimiert wird. Weiterhin war eine LSD1-Hochregulierung mit dem Tumorgrad sowie der Metastasierung assoziiert. Hiernach wurden LSD1-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit, das Wachstum von LUAD zu inhibieren, getestet. Allerdings zeigte nur HCI-2509, ein reversibler Inhibitor, der sowohl die enzymatische Aktivität als auch die Protein-Protein-Interaktionen von LSD1 inhibiert, eine effiziente Inhibierung von Histon-Demethylierung sowie des Zellwachstums, -migration und -invasion in allen getesteten NSCLC-Zelllinien. Mittels umfangreicher Expressionsanalysen durch einen Hybridisierungs-Microarray wurden 890 Transkripte identifiziert, die nach HCI-2509 Behandlung divergent exprimiert wurden. Die darauffolgende Signalweganalyse mittels eines Phosphorylierungs-ImmunoArrays deckte eine Reduzierung der Signalgabe des EGFR-Signalwegs auf. Das ist ein wichtiger Signalweg, der im LUAD häufig abweichend aktiviert vorliegt. Eine deutliche Reduzierung des Tumorwachstums konnte nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* mittels zweier verschiedener LUAD-Mausmodelle nachgewiesen werden. Im EGFR-getriebenen Tumormodell startete die HCI-2509-Behandlung, nachdem die Tumorentstehung durch *Micro-Computed Tomography* (μ CT) verifiziert wurde. In einem konditionellen Cre-aktivierten, KRAS-abhängigen Mausmodell wurde HCI-2509 entweder kontinuierlich während der Tumorentwicklung oder in der späten Phase gegeben. In beiden Modellen resultierte die Behandlung mit HCI-2509 in eine deutliche und signifikante Reduktion des Tumorwachstums und der Tumorentstehung.

Die Inhibierung von LSD1 mittels einer RNA-Interferenz durch *short hairpin*-Konstrukte (shLSD1) resultierte in einer eindeutigen Reduktion von Zellwachstum und Invasionsvermögen *in vitro*. Überraschenderweise wurde ein sehr starkes Tumorwachstum beobachtet, nachdem ein Doxycyclin-induzierbares shLSD1-eprimierendes Mausmodell in das KRAS-Modell eingekreuzt wurde. Weitere experimentelle Entwürfe zeigten, dass der Level von LSD1 vor allem während der Phasen der Tumorentstehung und Tumorentstehung wichtig ist. Außerdem wurde in allen Experimenten mit shLSD1-Mäusen festgestellt, dass diese Mäuse eine deutlich höhere Proliferationsrate haben als die Mäuse, deren LSD1-Gehalt normal war. In weiteren Experimenten wurde schließlich deutlich, dass

das Tumorwachstum unabhängig von der Doxycyclin-Gabe ist und auch die Herunterregulierung von LSD1 die Immunantwort nicht verändert.

Da der unkonventionelle LSD1-Inhibitor HCI-2509 einen immensen Effekt auf das NSCLC-Tumorwachstum hat, wird HCI-2509 als therapeutische Option für neue Kombinationsstrategien diskutiert. Die Diskrepanz zwischen dem wachstumsinhibierenden Effekt von HCI-2509 und dem starken Tumorwachstum nach transkriptioneller Repression von LSD1 – selbst, wenn letzteres nur während der Tumorentstehung herunterreguliert wird – deutet auf eine facettenreiche Funktion von LSD1 hin. Deshalb wird ein Hauptaugenmerk in zukünftigen Studien auf der vielseitigen und konditionsabhängigen Funktion von LSD1 während der Tumorentwicklung liegen.