

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, Klinische  
Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie)**

**Effekte von Eisenchelatoren auf den mTOR-  
Signalweg in myeloischen Leukämiezellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Richstein, Lidija**

**2019**

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H.-G. Kopp
2. Berichterstatter:	Professor Dr. B. Schitteck
Tag der Disputation:	04.07.2019

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Hämatopoese .....	1
1.2 Leukämie .....	2
1.2.1 Definition.....	2
1.2.2 Klassifikation.....	2
1.2.3 Akute myeloische Leukämie .....	3
1.3 Eisen.....	4
1.3.1 Bedeutung für den Organismus .....	4
1.3.2 Eisenstoffwechsel .....	4
1.3.3 Eisenstoffwechsel in Krebszellen .....	5
1.4 Apoptose .....	7
1.5 Eisenchelatoren .....	8
1.5.1 Eisenchelatoren in der Krebstherapie .....	8
1.5.2 Beeinflussung des mTOR Signalwegs .....	10
1.6 Fragestellung der vorliegenden Dissertation.....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Material.....	14
2.1.1 Zelllinien .....	14
2.1.2 Primer.....	14
2.1.3 Allgemeine Reagenzien .....	15
2.1.4 Geräte.....	16
2.1.5 Verbrauchsmaterial.....	16
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Kultivierung der Zellen .....	18
2.2.2 Zellviabilität .....	19
2.2.3 Zellapoptose .....	20
2.2.4 RNA Isolation aus Zellkulturen .....	20
2.2.5 cDNA-Synthese .....	21
2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR.....	21
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>

---

3.1	Viabilität .....	24
3.2	Apoptotische Wirkung .....	28
3.3	Beeinflussung der Expression.....	33
3.3.1	PDK1 .....	33
3.3.2	mTOR.....	34
3.3.3	RAPTOR.....	35
3.3.4	GβL.....	37
3.3.5	RICTOR.....	38
3.3.6	REDD-1 .....	39
3.3.7	p70S6 .....	41
3.3.8	eIF4B.....	42
3.3.9	4E-BP1 .....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Viabilität und Apoptose unter Eisenchelation .....	45
4.2	Beeinflussung des mTOR Signalwegs .....	46
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>53</b>
6.1	Zusammenstellung der Daten .....	53
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>66</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Modell der hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung .....	1
<b>Abb. 2</b> Eisenstoffwechsel .....	5
<b>Abb. 3</b> Strukturformeln .....	10
<b>Abb. 4</b> mTOR Signalweg .....	12
<b>Abb. 5</b> Light Cycler Multiwell Platte .....	22
<b>Abb. 6 (A) K562</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	25
<b>Abb. 7 (B) U937</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	25
<b>Abb. 8 (C) HL60</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	26
<b>Abb. 9 (D) PAT 1</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	26
<b>Abb. 10 (E) PAT 2</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	27
<b>Abb. 11 (F) PAT 3</b> Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration .....	27
<b>Abb. 12 (A) K562</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	28
<b>Abb. 13 (B) U937</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	29
<b>Abb. 14 (C) HL60</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	29
<b>Abb. 15 (D) PAT 1</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	30
<b>Abb. 16 (E) PAT 2</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	31
<b>Abb. 17 (F) PAT 2</b> Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung .....	31
<b>Abb. 18</b> Analyse der PDK1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien und der Patientenproben mit Deferasirox.....	33
<b>Abb. 19</b> Analyse der PDK1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit Deferipron und Deferoxamin .....	34
<b>Abb. 20</b> Analyse der mTOR Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox .....	35
<b>Abb. 21</b> Analyse der RAPTOR Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox .....	36
<b>Abb. 22</b> Analyse der RAPTOR Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, CD34+ und U937 mit Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron .....	36

---

<b>Abb. 23</b> Analyse der GβL Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL-60 und der Patientenproben DA-3 und MM-1 mit Deferasirox.....	37
<b>Abb. 24</b> Analyse der RICTOR Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron, Deferoxamin.....	38
<b>Abb. 25</b> Analyse der REDD-1 Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox .....	39
<b>Abb. 26</b> Analyse der REDD-1 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron.....	40
<b>Abb. 27</b> Analyse der p70S6 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron, Deferoxamin .....	41
<b>Abb. 28</b> Analyse der eIF4B Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937, HL60, der CD34+ Zellen und der Patientenproben mit Deferasirox.....	42
<b>Abb. 28</b> Analyse der 4E-BP1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien und der Patientenproben mit Deferasirox.....	43
<b>Abb. 30</b> Analyse der 4E-BP1 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937 und HL60 mit Deferoxamin und Deferipron .....	44
<b>Abb. 31</b> Veränderung der Expression von PDK1 unter Eisenchelation.....	53
<b>Abb. 32</b> Veränderung der Expression von mTOR unter Eisenchelation.....	53
<b>Abb. 33</b> Veränderung der Expression von RAPTOR unter Eisenchelation .....	54
<b>Abb. 34</b> Veränderung der Expression von GβL unter Eisenchelation .....	54
<b>Abb. 35</b> Veränderung der Expression von RICTOR unter Eisenchelation.....	55
<b>Abb. 36</b> Veränderung der Expression von REDD-1 unter Eisenchelation .....	55
<b>Abb. 37</b> Veränderung der Expression von p70S6 unter Eisenchelation.....	56
<b>Abb. 38</b> Veränderung der Expression von eIF4B unter Eisenchelation.....	56
<b>Abb. 39</b> Veränderung der Expression von 4E-BP unter Eisenchelation.....	57

## Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
C <sub>max</sub>	maximale Plasmakonzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DFO	Deferoxamine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
eIF4E-BP	eIF4E binding protein
FCS	Fetal Calf Serum
Fpn1	Ferroportin 1
GβL	G-protein β-subunit like protein
LKB1	Serin-Threonin-Kinase
MDM2	mouse double minute gene 2
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
mTORC2	mTOR complex 2



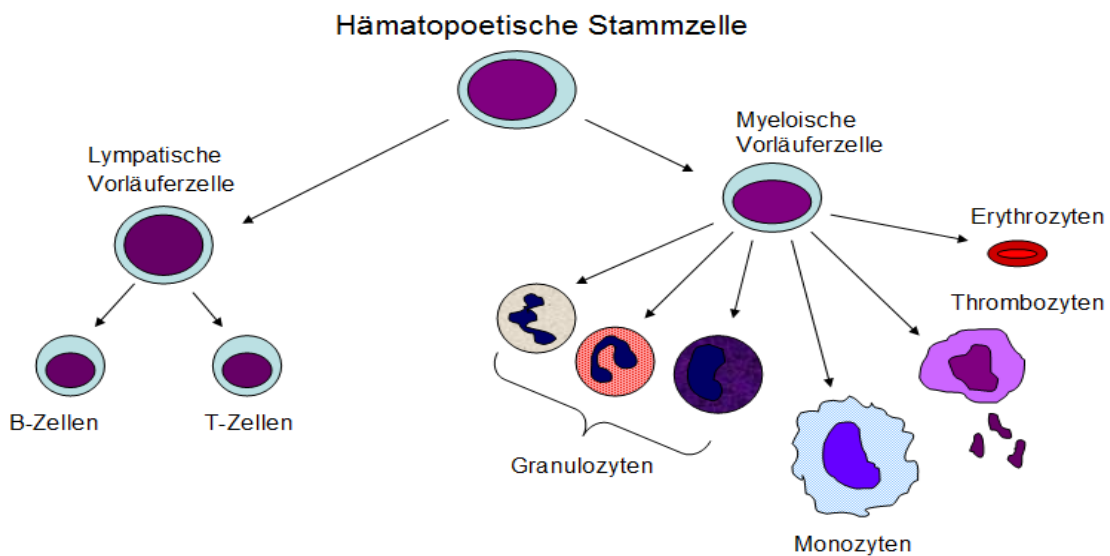
---

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosom 10
P70S6	Ribosomal protein S6 Kinase
RAPTOR	regulatory associated protein of mTOR
REDD1	regulated in development and DNA damage responses 1
Rheb	Ras-homolog-enriched-in-brain
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institut)
sog.	sogenannt
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
TSC	Tuberous Sclerosis Complex

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hämatopoese

Alle hämatopoetischen Zellen, sowohl die der myeloischen, als auch der lymphoiden Linie, haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, die sogenannte pluripotente Stammzelle. Nach der ersten Differenzierung können aus den lymphatischen Zellen nur noch B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen entstehen und aus den myeloischen Stammzellen nur Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten (Akashi et al. 2000). Das heißt ab diesem Zeitpunkt spricht man von determinierten Stammzellen.



**Abb. 1** Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Modell der hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung

## 1.2 Leukämie

### 1.2.1 Definition

Unter Leukämie versteht man die Entartung von Zellen in einem frühen Stadium der Hämatopoese. Hierdurch werden der normale Reifeprozess und die Differenzierung der Zellen gestört. Gleichzeitig ist es ihnen möglich sich unkontrolliert zu teilen. Es entsteht eine Vielzahl an funktionsunfähigen Zellen, die ihre eigentlichen Aufgaben nicht mehr ausführen können. Die entarteten Zellen reichern sich im Knochenmark an und verdrängen so das übrige Gewebe. Hierdurch kommt es zu einer gestörten Hämatopoese der gesunden Zellen. Die Bildung gesunder Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten ist verringert. Dies kann unter anderem zu erhöhten Infektionsgefahren, Anämien und verstärkter Blutungsneigung führen.

### 1.2.2 Klassifikation

Da die Störung der Hämatopoese auf verschiedenen Reifungsstufen erfolgen kann, werden auch verschiedene Formen der Leukämie unterschieden. Die Leukämieformen werden zunächst nach der Zellreihe unterteilt, von der die Entartung ausgeht. Die myeloische Leukämie oder die lymphatische Leukämie. Des Weiteren unterteilt man die Erkrankung nach der Art ihres Verlaufs in akute Leukämien und chronische Leukämien. Die akute Form tritt plötzlich auf und verläuft meist sehr schwerwiegend, hier finden sich sehr viele Zellen in einem sehr frühen, unreifen Stadium im Blut, die nahezu funktionslos sind. Die chronische Leukämie weist einen eher langsamen und schleichenden Verlauf auf. Im Blutbild findet man vor allem Zellen, die deutlich weiter entwickelt sind und bereits den reifen Blutzellen ähneln, jedoch nicht voll funktionsfähig sind.

Hieraus ergeben sich grob 4 Formen, die sich im Hinblick auf den Verlauf, die Symptome und die Therapiemöglichkeiten unterscheiden:

- Akute Lymphatische Leukämie (ALL)
- Akute Myeloische Leukämie (AML)
- Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)
- Chronische Myeloische Leukämie (CML)

Wobei die CLL den sogenannten Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet wird.

### 1.2.3 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie entsteht durch klonale Vermehrung myeloischer Vorläuferzellen, den sogenannten Blasten. Aufgrund der fehlenden Reifung sind diese Zellen nicht in der Lage die physiologischen Aufgaben der Infektabwehr zu übernehmen. Durch diese unkontrollierte Proliferation werden die übrigen Zellen im Knochenmark verdrängt. Die beeinträchtigte Reifung von Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten führt zu unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Fieber, Störung der Blutgerinnung und einer erhöhten Infektanfälligkeit. Durch eine erhöhte Abgabe der Blasten ins periphere Blut können auch andere Organe wie Milz, Leber oder das zentrale Nervensystem geschädigt werden (Bakst et al. 2011; Shihadeh et al. 2012).

#### 1.2.3.1 Pathogenese

Wie bei den meisten anderen hämato-onkologischen Erkrankungen, liegt der AML ebenfalls eine multifaktorielle Genese zu Grunde. Von Bedeutung sind dabei vor allem Risikofaktoren wie Tabakkonsum, ionisierende Strahlung und der Einsatz von Zytostatika (Little 1993; Austin et al. 1988).

Auch das Krankheitsbild des myelodysplastischen Syndroms kann in seinem Verlauf zu einer sekundären akuten myeloischen Leukämie führen (Greenberg et al. 1997).

Jedoch entstehen die meisten akuten myeloischen Leukämien spontan. Hier sind vor allem multiple, meist spontan auftretende Mutationen von Bedeutung. Die Mehrzahl dieser Mutationen ist nicht erblich bedingt, sondern wird im Laufe des Lebens erworben. Die häufigste genetische Veränderung sind sogenannte

balancierte Translokationen. Dabei wird ein Chromosomenabschnitt auf ein anderes Chromosom transloziert. Bedingt durch diese Mutationen kann es passieren, dass bestimmte Proto-Onkogene, wie zum Beispiel c-myc, unter den Einfluss bestimmter Transkriptionsverstärker (sog. Enhancer) gelangen und so eine Dysregulation herbeiführen (Yashiro-Ohtani et al. 2014).

## 1.3 Eisen

### 1.3.1 Bedeutung für den Organismus

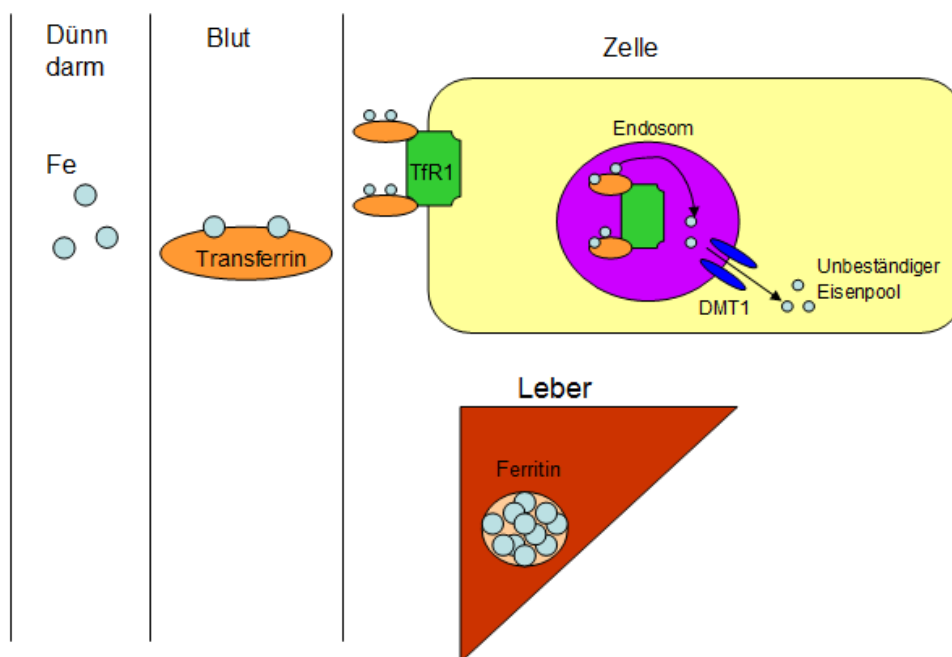
Eisen spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Funktionen (Zhang und Enns 2009). Zahlreiche wissenschaftliche Beweise lassen darauf schließen, dass Eisen für das Überleben und die Proliferation der Zellen benötigt wird. Des Weiteren zeigte sich, dass Störungen der Eisenaufnahme zur Hemmung des Zellwachstums sowohl in vivo als auch in vitro führen (Andrews 2008). Die Ribonukleotidreduktase ist ein wichtiges Enzym bei der DNA-Synthese. Da Eisen ein wichtiger Bestandteil dieses Enzyms ist, stellt es einen limitierenden Faktor bei der DNA-Synthese dar und somit auch für das Zellwachstum (Domenico et al. 2008)

### 1.3.2 Eisenstoffwechsel

Das über die Nahrung aufgenommene Eisen wird von den Enterozyten des Duodenums resorbiert und von dort aus weiter ins Blut transportiert, wo es an das Protein Transferrin gebunden wird (Richardson und Ponka 1997; Lane et al. 2015). Jedes Transferrinmolekül ist in der Lage jeweils zwei Atome des dreiwertigen Eisens mit hoher Affinität zu binden (Ponka et al. 1998). Transferrin spielt somit eine entscheidende Rolle beim Transport des im Dünndarm resorbierten, gebundenen Eisens, welches anschließend zu den Zellen oder zur Leber transportiert wird, um dort als Ferritin gespeichert zu werden.

Das Transferrin Rezeptor 1 (TfR1) Protein, welches sich an der Plasmamembran befindet, ist in der Lage zwei Transferrinmoleküle zu binden

und ermöglicht so eine Aufnahme in die Körperzellen (Richardson und Ponka 1997). Der Transferrin-TfR1-Komplex befindet sich nun im Inneren eines Endosoms. Hier wird das gebundene Eisen aufgrund des sauren Milieus freigesetzt. Anschließend erfolgt durch das Enzym Ferrireduktase die Reduzierung zu zweiwertigem Eisen (Ohgami et al. 2005). Mit Hilfe des bivalenten Metall-Transportproteins 1 (DMT1-divalent metal transporter 1) wird das Eisen über die endosomale Membran ins Zytosol freigesetzt (Fleming et al. 1998). Das Eisen befindet sich dann in einem unbeständigen Eisenpool, wo es sich an niedermolekulare Strukturen vorübergehend bindet wie zum Beispiel Citrat, ATP oder niedermolekulare Zucker (Kakhlon und Cabantchik 2002; Jacobs 1977). Allerdings gibt es dafür noch keine evidenzbasierten Nachweise (Richardson et al. 1996).



**Abb. 2** Eisensstoffwechsel

### 1.3.3 Eisensstoffwechsel in Krebszellen

Der modifizierte Eisensstoffwechsel ergibt sich durch Unterschiede sowohl bei der Eisenaufnahme, -ausscheidung als auch bei der Eisenspeicherung. Alle Faktoren führen letztendlich zu einer gesteigerten Anhäufung des Eisens, um

eine erhöhte Proliferationsrate zu gewährleisten (Am Merlot et al. 2013; Torti und Torti 2013).

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Krebszellen einen viel höheren TfR1-Spiegel aufweisen. Ebenso wurde bewiesen, dass eine erhöhte TfR1 Expression mit einem fortgeschrittenen Krebsstadium einhergeht (Am Merlot et al. 2013; Prutki et al. 2006; Soyer et al. 1987; Walker und Day 1986). Des Weiteren konnte in einer Studie von Taetle 1986 gezeigt werden, dass Antikörper gegen TfR1 zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen (Taetle et al. 1986).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des Membrantransportproteins Ferroportin (Fpn1) in Brustkrebszellen, Prostatakrebszellen und Leukämiezellen vermindert stattfindet. Diese Veränderungen konnten jedoch bei Gehirn- oder Ösophagustumoren nicht belegt werden (Jiang et al. 2010; Pinnix et al. 2010; Rhodes et al. 2007). Ferner zeigt sich, dass eine verringerte Fpn1-Expression bei Brustkrebspatienten mit einer schlechteren Prognose, unabhängig von anderen Risikofaktoren, einhergeht. Dieser könnte demzufolge als prognostischer Marker eingesetzt werden (Pinnix et al. 2010).

Des Weiteren zeigen einige Studien, dass sich auch die Eisenspeicherung in Krebszellen anders verhält als in gesunden Körperzellen (Am Merlot et al. 2013). Jedoch ergaben Überprüfungen des Ferritin-Spiegels in Krebszellen widersprüchliche Ergebnisse. Einige Studien beschreiben, dass die Ferritin-Expression hochreguliert wird (Vaughn et al. 1987), während andere Studien zeigen, dass die Expression herunterreguliert wird (Am Merlot et al. 2013; Pinnix et al. 2010). Berichten zufolge wird die Ferritin-Expression durch das Protoonkogen c-myc herabgesetzt. Dieses wiederum zeigt eine erhöhte Konzentration in maligne entarteten Zellen. Das lässt darauf schließen, dass vermehrt freies Eisen für die DNA-Synthese und das Zellwachstum zur Verfügung gestellt wird (Wu et al. 1999).

## 1.4 Apoptose

Unter dem Begriff der Apoptose versteht man charakteristische, morphologische Veränderungen in einer Zelle, die zu einem programmierten Zelltod führen. Dieser selbsteingeleitete Zelltod findet im menschlichen Körper in ca. 4-6 Milliarden Zellen pro Stunde statt (Kerr et al. 1972; Kroemer et al. 1995). Erst 20 Jahre später konnte man charakterisieren welche Gene für diesen komplexen Mechanismus verantwortlich sind. Die Erkenntnisse wurden bei der Untersuchung des Nematoden *C. elegans* gewonnen (Horvitz 2003).

Die Apoptose spielt genau wie das Zellwachstum eine entscheidende Rolle bei der Reifung, Differenzierung und Entwicklung von Geweben. Das Zusammenwirken von Zelltod und Zellproliferation ermöglicht die Regulation komplexer An- und Umbauprozesse und ermöglicht eine ständige Erneuerung in unserem Organismus. Kommt es zu Störungen dieses Gleichgewichts können schwere Organfehlbildungen oder die Entstehung maligner Tumore die Folge sein (Hanahan und Weinberg 2011). Eine weitere wichtige Aufgabe des programmierten Zelltodes besteht in der Kontrolle fehlerhafter Zellen. So werden zum Beispiel unreife B- und T-Zellen, welche im Verlauf ihrer Reifung keinen spezifischen Rezeptor ausbilden oder sich autoreaktiv verhalten beseitigt (Rathmell und Thompson 2002).

Kommt es durch bestimmte Reize zur Einleitung der Apoptose wird ein spezifischer Signaltransduktionsweg aktiviert, der über spezielle Proteasen, sog. Caspasen, zur Degeneration der Zelle samt ihrem Erbgut führt. Zunächst kommt es zur Schrumpfung der Zelle mit Kondensation sowohl des Zytoplasmas als auch des Chromatins. Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Fragmentierung des Zellkerns. Zuletzt wird die Zelle aufgelöst indem sich membranumhüllte Vesikel sog. „apoptotic bodies“ bilden. Diese Vesikel können auf Grund spezieller Transmembranproteine, wie beispielsweise Phosphatidylserin von Nachbarzellen oder Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Dieser Prozess gewährleistet, dass im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündung in der Umgebung stattfindet (Kerr et al. 1972; Kerr et al. 1994; Walker et al. 1988; Fadok et al. 2001; Wang et al. 2003).



## 1.5 Eisenchelatoren

### 1.5.1 Eisenchelatoren in der Krebstherapie

Nach wie vor ist die Entwicklung neuer und präziser Therapiemöglichkeiten das wichtigste Ziel der Tumorforschung. Eine dieser Strategien beruht darauf, gezielt in den zellulären Eisenstoffwechsel der Krebszellen einzugreifen, der sich bekanntermaßen deutlich von dem gesunder Körperzellen unterscheidet (Kalinowski und Richardson 2005; Am Merlot et al. 2013; Buss et al. 2004).

Ursprünglich wurde die Therapie mit Eisenchelatoren entwickelt, um eiseninduzierte Organschädigungen bei Eisenüberladung zu verhindern, wie sie zum Beispiel nach Transfusionen bei Patienten mit Beta-Thalassämie auftreten (Ceci et al. 2003).

Deferoxamin (DFO) ist ein Eisenchelator, der aus dem Bakterienstamm *Streptomyces pilosus* isoliert wurde. Derzeit gilt Deferoxamin (DFO) als „Goldstandard“ in der Behandlung von Eisenüberladungen bei Beta-Thalassämie (Sugerman et al. 1975). Jedoch muss das Medikament aufgrund der hohen Hydrophilie und der kurzen Plasmahalbwertszeit, subkutan über einen Zeitraum von 8-12 Stunden verabreicht werden (Dayani et al. 2004). Dies führt aufgrund der mühsamen Methode, bei der es sehr häufig zu Schmerzen und Schwellungen an der Einstichstelle kommt, zu einer schlechten Patientencompliance (Kontoghiorghes 1995).

Welches Potential Eisenchelatoren als Krebstherapeutikum besitzen, wurde als erstes in Studien an Leukämiekrebszelllinien und bei Leukämiepatienten untersucht (Kontoghiorghes et al. 1986; Estrov et al. 1987). Anschließend erfolgten Studien, bei denen Tumorzellen eines Neuroblastoms untersucht wurden (Blatt und Stitely 1987; Blatt et al. 1988) und klinische Studien bei Patienten mit Neuroblastomerkrankungen, die vielversprechende Ergebnisse zeigten (Donfrancesco et al. 1990). In diesen frühen Studien wurde DFO zusammen mit anderen chemotherapeutisch wirksamen Medikamenten verabreicht. Dazu gehörten zum Beispiel Cyclophosphamid, Etoposid und Carboplatin. 50 von 57 Patienten sprachen teilweise bis vollständige positiv

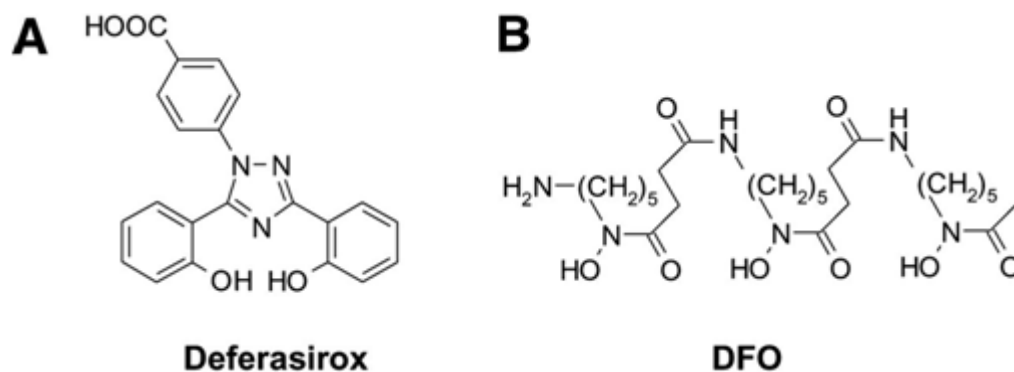
darauf an (Donfrancesco et al. 1995). Jedoch waren die berichteten Erfolge widersprüchlich, da einige Studien keine deutlichen Antitumoreffekte aufzeigen konnten (Blatt 1994; Selig et al. 1998). Diese Beobachtung ergibt sich möglicherweise aufgrund der kurzen Halbwertszeit und der schlechten Membranpermeabilität des Medikaments, was wiederum die Wirksamkeit der Eisenchelation und die Antitumor-Aktivität deutlich einschränkt (Kalinowski und Richardson 2005; Richardson et al. 1994).

Seither wurden einige synthetische Eisenchelatoren hergestellt, um einerseits die Wirksamkeit zu verbessern und andererseits, um die Toxizität und Nebenwirkungen zu minimieren. Ferner versuchte man Eisenchelatoren herzustellen, die auch eine orale Verabreichungsform ermöglichen (Kalinowski und Richardson 2005). Seit kurzem gibt es das Präparat Deferasirox, welches unter dem Namen EXJADE® von Novartis auf den Markt gebracht wurde. Es zeigte relativ schnell Erfolge in klinischen Studien bei der Behandlung von Patienten mit Eisenüberladung und wird zur Therapie der  $\beta$ -Thalassämie eingesetzt als lipophile, oral anwendbare Alternative zu DFO (Cappellini und Taher 2009). Die Daten aus Phase II und III der klinischen Studien zeigen, dass die Wirksamkeit von Deferasirox mit der von DFO vergleichbar ist bei der Behandlung von  $\beta$ -Thalassämiepatienten (Piga et al. 2006; Cappellini et al. 2006). Allerdings scheint Deferasirox sowohl von Kindern als auch Erwachsenen besser toleriert zu werden (Cappellini et al. 2006) und die Zahl schwerwiegender unerwünschter Zwischenfälle ist relativ gering (List et al. 2012).

In den vergangenen Jahren wuchs das Interesse an Deferasirox als potentielleres Krebstherapeutikum. Zum einen ist es bereits klinisch erprobt und wird von den Patienten gut vertragen, des Weiteren ist eine orale Verabreichungsform möglich (Cappellini und Taher 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Deferasirox das Wachstum von hepatozellulären Karzinomen, myeloischen Leukämiezellen und Mantelzelllymphomen hemmt (Ohyashiki et al. 2009; Chantrel-Groussard et al. 2006; Lescoat et al. 2007; Vazana-Barad et al. 2013).

Die Anwendung von Deferasirox bei Patienten mit chemotherapieresistenter akuter monozytärer Leukämie konnte bemerkenswerte Anti-Leukämie Effekte aufzeigen (Fukushima et al. 2011).

Insgesamt deuten alle diese Studien darauf hin, dass Deferasirox sich sehr gut als Chemotherapeutikum eignet, jedoch sind dafür noch zusätzliche umfangreiche Studien erforderlich (Lui et al. 2015).



**Abb. 3** Strukturformeln modifiziert nach (Lui et al. 2013)

### 1.5.2 Beeinflussung des mTOR Signalwegs

Der PI3K/AKT Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation und des Zellwachstums (Franke 2008).

Kommt es zu einer Bindung von Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin oder dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor an Wachstumsfaktor-Rezeptoren, bewirkt dies eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Dies führt dazu, dass die PI3K Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert (Manning und Cantley 2007; Chalhoub und Baker 2009). PIP<sub>3</sub> seinerseits wirkt nun als second messenger und bewirkt eine Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT und der Phosphoinositide-dependent Kinasen (PDKs) (Cheng et al. 2008).

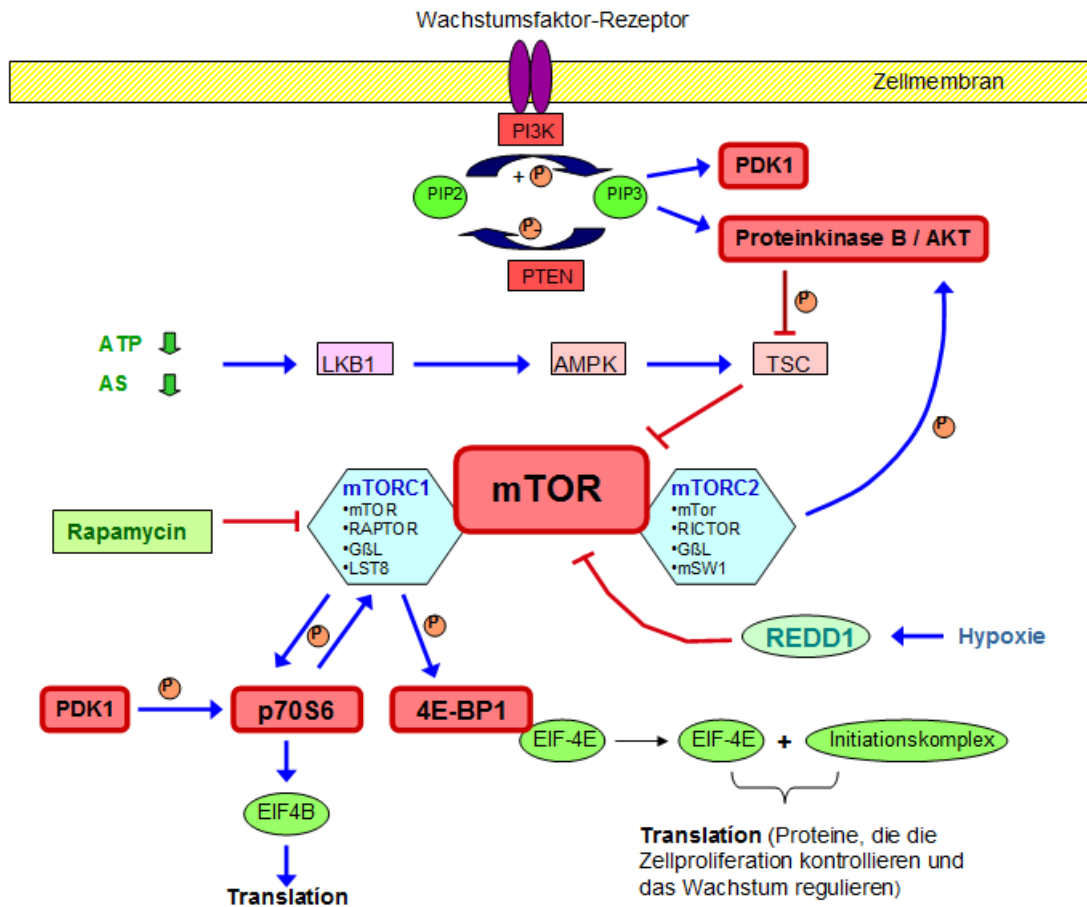
Der PIP<sub>3</sub> Spiegel wird in Zellen sehr eng kontrolliert, hauptsächlich verantwortliche hierfür ist die Tumor-Suppressor-Phosphatase PTEN

(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10), die PIP3 durch Desphosphorylierung wieder deaktiviert (Cantley und Neel 1999).

Die Aktivierung von AKT löst wiederum eine Reihe von kaskadenartigen Reaktionen aus, die maßgeblich für das Zellwachstum, die Proliferation und das Zellüberleben verantwortlich sind (Franke 2008).

Eine sehr wichtige Zielstruktur des PI3K/AKT Signalwegs ist die Serin/Threonin Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). Die Aktivierung von mTOR kann durch eine Vielzahl von Mechanismen erfolgen. Entweder durch die direkte Aktivierung vermittelt durch p-AKT selbst oder indirekt durch die Disinhibition der Wirkung des Tuberous Sclerosis Complex (TSC) auf mTOR. Die hemmende Wirkung von TSC erfolgt hauptsächlich dadurch, dass der Unterkomplex TSC2 die GTPase Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain) inaktiviert, die wiederum mTOR aktiviert (Inoki et al. 2002; Manning et al. 2002; Huang und Manning 2009).

Die mTOR-Aktivierung spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der Translation als auch beim Zellwachstum. Eine der wichtigsten Strukturen, die bei diesem Signalweg aktiviert werden, sind die p70S6-Kinase und das eIF4E-BP (eukaryotic translation initiation factor 4E binding proteins). Die Aktivierung dieser beiden Schlüsselproteine bewirkt eine gesteigerte Translation (Hay und Sonenberg 2004).



**Abb. 4** mTOR Signalweg

Es konnte gezeigt werden, dass der PI3K/AKT Signalweg in Krebszellen über verschiedene Mechanismen unkontrolliert aktiviert werden kann (Engelman 2009). Einer der ersten genetischen Mechanismen, die dabei entdeckt wurden, war der Verlust des Tumorsuppressors PTEN, was wiederum zu einer unkontrollierten Aktivierung von PI3K/AKT führte (Engelman 2009; Li et al. 1997).

Die gesteigerte Aktivierung von PI3K/AKT in Krebszellen bildet die Grundlage für die gezielte Therapie gegen diese Kaskade. Dazu zählen PI3K-mTOR Inhibitoren, PI3K Inhibitoren, AKT Inhibitoren und vor allem mTOR-Komplex Inhibitoren (Martini et al. 2014).

## 1.6 Fragestellung der vorliegenden Dissertation

In einer *in vitro* Studie von Ohyashiki et al. konnte gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Apoptose bei Myeloischen Leukämiezelllinien kommt, wenn sie mit Deferasirox behandelt wurden. Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität der Caspase-3/7 festgestellt, nachdem die Zelllinien K562, U937 und HL60 für 24 Stunden mit 50µM Deferasirox behandelt wurden. Zudem wurde gezeigt, dass durch Deferasirox der mTOR-Signalweg unterdrückt wird. Dies schließt man daraus, dass eine erhöhte Expression des REDD1 Proteins (development and DNA damage response protein) festgestellt werden konnte (Ohyashiki et al. 2009). REDD1 ist als Stressreaktionsgen bekannt, dessen Expression vor allem durch Hypoxie induziert wird (Schwarzer et al. 2005). Ebenso war die Expression von TSC2 erhöht, der wiederum die mTOR Aktivität hemmt. Zudem unterdrückt Deferasirox die Expression von S6 ribosomalem Protein und phosphoryliertem S6 (Ohyashiki et al. 2009). Demzufolge ist das Medikament Deferasirox nicht nur bei der Eisenchelation von großem Nutzen, sondern kann möglicherweise auch als antiproliferativer Wirkstoff zum Einsatz kommen. Besonders große Bedeutung kann dieses Medikament für Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen haben, die sowohl auf eine Eisenchelation, als auch auf den antiproliferativen Effekt auf die Leukämiezellen angewiesen sind (Ohyashiki et al. 2009).

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der bereits bekannten antiproliferativen Wirkung von Deferasirox aufzuklären, wurde der Einfluss der Substanz sowie zweier weiterer als Eisenchelatoren zugelassener Substanzen auf die Proliferation sowie die Expression der am mTOR-Signalweg beteiligten Proteine in Zelllinien sowie primären AML-Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

U 937	Bereitgestellt von der AG Salih	
HL 60	Bereitgestellt von der AG Salih	
K 562	Bereitgestellt von der AG Salih	
CD34 positive Zellen	aus Leukapheresen gewonnen	Entsprechende Einverständniserklärungen liegen vor
DA 3, GA 3, HL 1, MM 1	aus dem AML Patientenkollektiv der AG Salih	Entsprechende Einverständniserklärungen liegen vor

#### 2.1.2 Primer

PDK1	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
P70S6Kinase	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
REDD-1	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
REDD-2	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland

GßL	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
RICTOR	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
RAPTOR	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
mTOR	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland
EIF4B	Quantitect Primer assays, Qiagen	Hilden, Deutschland

### 2.1.3 Allgemeine Reagenzien

PBS	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic	Gibco/Life technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
RPMI	Gibco, Life technologies	Darmstadt, Deutschland
FCS	Biochrom	Berlin, Deutschland
Deferasirox	LKT laboratories	
Deferipron	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Deferoxamin	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Quanti Tect Reverse Transkriptions Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland



Sybr Select Master Mix	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
RNase free water	Promega	Mannheim, Deutschland
Trypanblau	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

#### 2.1.4 Geräte

Abzug	Waldner	Wangen, Deutschland
Countess	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Cytozentrifuge	Shandon, Cytospin3	
Kühlschrank	Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Light Cycler LC480	Roche	Grenzach-Whylen, Deutschland
Sterilbank HERA safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nanodrop	PEQLAB	Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	SANYO	München, Deutschland
Vortex Mixer	neoLab	Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge	Centra GP8R, Thermo Quest	Massachusetts, USA

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

Falconröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe Micro-Touch	Ansell	Tamworth, UK
Pipette serologisch Advant. 2	BD Flacon	Franklin Lakes, USA

ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml		
Pipetten 10 µl, 100µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen weiß 0,5-10µl	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen gelb 10-200µl	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen blau 100-1000µl	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Spritze 1,0 ml mit Kanüle	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Sterilfilterspitzen 100-1000 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Eppendorf-Gefäße	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Light cycler multwell Platte	Roche	Basel, Schweiz

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Folgende Zelllinien wurden untersucht: Die humane Histozyten-Zelllinie U937, die chronisch myeloische Leukämie-Linie K562 und die akute promyelozytäre Leukämie-Linie HL60.

Die Zellen werden als Suspension in FCS (fetal calf serum) und 10%er DMSO-Lösung (Dimethylsulfoxid) eingefroren. Zur Kultivierung wird zunächst das entsprechende Medium vorbereitet. Hierzu werden zu 500 ml RPMI-Medium 10% FCS und 1% Antibiotic-Antimycotic hinzugegeben. Nun werden die Falcons entsprechend der Zellbezeichnung beschriftet und jeweils 9 ml RPMI-Medium vorgelegt. Anschließend wird 1 ml der jeweiligen Zellsuspension aufgetaut, in die entsprechenden Falcons gegeben und gut durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert.

Um eine Zählung der Zellen durchzuführen werden 10 µl der Zelllösung zusammen mit 10 µl Trypanblau in ein Eppendorfgefäß gegeben und homogenisiert. Von dieser Lösung werden 10 µl entnommen und in eine Zählkammer (Cell counting chamber slide) gegeben und der Rest verworfen. Die Zählkammer wird nun in das Countess-Gerät (Invitrogen) gegeben, in welchem die Zellzählung stattfindet.

Die Falcons mit der Zellsuspension werden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend entfernt. Nun werden wiederum 6 ml RPMI-Medium dazugegeben und alles gut homogenisiert. Die Suspension wird in T25-Zellkulturflaschen für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit Deferasirox, Deferipron und Deferoxamin erfolgt am nächsten Tag.

Dazu werden die Zellen wieder durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und gleichmäßig auf 4 Falcons verteilt (je 1,5 ml) und anschließend mit 3,5 ml RPMI

auf 5 ml aufgefüllt. Nun wird das entsprechende Medikament (Aliquots a 50µl, 100mM) zu den Zellsuspensionen dazugegeben:

Kontrolle: 5 µl DMSO

10µM : 0,5 µl von der 100mM Medikamentenlösung

50µM : 2,5 µl von der 100mM Medikamentenlösung

100µM : 5 µl von der 100mM Medikamentenlösung

Nun werden erneut die Zellen in den Brutschrank bei 37°C und 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt für 24h gestellt.

Am nächsten Tag werden die Zellpellets hergestellt. Dazu werden jeweils 4 Fläschchen a 15 ml bereitgelegt und entsprechend beschriftet (z.B. K562-K-DMSO, K562-10µM-D-rox, K562-50µM-D-rox und K562-100µM-D-rox) sowie 4 Eppendorfgefäße. Die Zellsuspension wird aus dem Inkubator geholt, homogenisiert und in die vorbereiteten Fläschchen pipettiert. Anschließend bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt. Danach wird 1 ml PBS zum Waschen hinzugegeben und die Lösungen in die vorbereiteten Eppendorfgefäße pipettiert, zentrifugiert und nochmals mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS, die Zellpellets direkt bei -80°C einfrieren. Falls mit den Zellpellets sofort weitergearbeitet wird, wird RLT Puffer auf das Zellpellet gegeben.

### 2.2.2 Zellviabilität

Die Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Die Zellen wurden auf eine weiße 96-well Platte mit einer Dichte von 2000 Zellen pro well aufgetragen. Nach 2 Stunden wurden Eisenchelatoren in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurde die Viabilität der Zellen, die mit den unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Medikaments behandelt wurden, und die der unbehandelten Kontrollzellen in Quadrupeln gemessen.

### 2.2.3 Zellapoptose

Die Apoptose der Zellen wurde mit Hilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assay ermittelt. Auch hier wurden die Zellen mit einer Dichte von 2000 Zellen pro well auf eine weiße 96-well Platte aufgetragen. Nach 2 Stunden wurden verschiedene Eisenchelatoren in unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt. Die Apoptose wurde jeweils in drei wells für die jeweiligen Konzentrationen und die Kontrollgruppe gemessen. Zusätzlich wurde die höchste Konzentration des jeweils geeigneten Lösungsmittels für die Eisenchelatoren hinzugegeben, um mögliche Messfehler zu vermeiden. Die Messung erfolgte nach 24 Stunden.

### 2.2.4 RNA Isolation aus Zellkulturen

Zur Vorbereitung wurden zunächst 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) zu 1 ml RLT Puffer geben. Entsprechend der Angaben wurde Ethanol zum RPE Puffer dazugegeben. Alle Säulen und Eppendorf-Gefäße wurden beschriftet und die Puffer in der richtigen Reihenfolge vorbereitet. Als letztes wurden die Zellpellets aus dem Gefrierschrank geholt und auf Eis gestellt.

Anschließend wurden 350 µl RLT Puffer zum Zellpellet gegeben. Dieses wurde mit Hilfe einer Spritze und Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. Die Zelllösung wurde in eine gDNA Eliminatorsäule übertragen. Dies wurde für 40 Sekunden bei 10000 rpm (bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen. Zum Eluat wurden 350 µl 70%es Ethanol gegeben und mit Hilfe der Pipette gut durchmischt. Diese Probe wurde auf eine RNeasy Spin Säule aufgetragen. Das Ganze wurde für 30 Sekunden zentrifugiert und das Eluat anschließend verworfen. Nun wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde verschlossen und wieder für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder verworfen. Anschließend wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und nochmals für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder verworfen. Es wurden nochmals 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und für 2 min zentrifugiert. Die Säulen wurden vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und in ein neues 1,5 ml collection tube gestellt. Nun wurden 50 µl RNase-free water direkt auf die Säulenmembran gegeben. Nach

einer Einwirkzeit von 1 Minute wurden die Säulen 1 Minute lang zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung im Nanodrop. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 2.2.5 cDNA-Synthese

Der Umschrieb erfolgte mittels des Reverse Transkription Kits (QuantiTect). Für den Umschrieb wurde im Mastercycler das Programm „RTQIAGEN“ ausgewählt.

1  $\mu\text{g}$  der entsprechenden RNA wurde mit 2  $\mu\text{l}$  DNA W.-P. in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Das Ganze wurde mit der entsprechenden Menge aqua bidest auf 14  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, durchmischt und anschließend zentrifugiert. Die Lösung kam für 2 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  in den Mastercycler und wurde anschließend sofort auf Eis gestellt.

Anschließend erfolgte die Herstellung des Mastermix. Hierzu wurden zu 4  $\mu\text{l}$  des Quantiscript RT-Buffer 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase NM und 1  $\mu\text{l}$  des RT Primer pipettiert, dies wurde anschließend durchmischt und zentrifugiert. Man erhielt somit 6  $\mu\text{l}$  Mastermix pro Ansatz, der zur RNA pipettiert wurde. Anschließend kam alles für 15 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  in den Mastercycler. Das Programm läuft automatisch weiter mit  $95^{\circ}\text{C}$  für 3 min und kühlt dann auf  $4^{\circ}\text{C}$  herunter. Nach Ablauf des Programms wurden zur gewonnenen cDNA 20  $\mu\text{l}$  Nuclease free water gegeben.

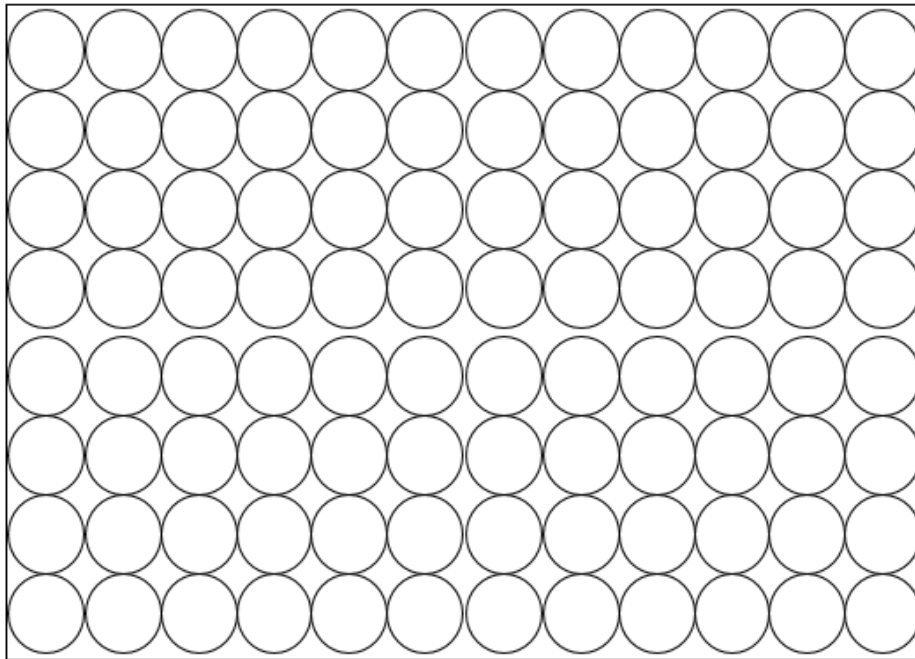
### 2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR

Um Veränderungen in der Transkription bei behandelten und unbehandelten Zellen zu untersuchen, wurde die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Hierfür wurde das Light Cycler System LC480 und SYBR Select Master Mix verwendet.

Folgender Ansatz wurde hergestellt: Zu 10  $\mu\text{l}$  SYBR Select Mastermix werden 1  $\mu\text{l}$  cDNA und 4  $\mu\text{l}$  RNase free water hinzugegeben. Zusätzlich wird ein Leerwert angesetzt mit 10  $\mu\text{l}$  SYBR Select Mastermix und 5  $\mu\text{l}$  RNase free water.

Jede Zellkultur wurde jeweils mit 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  des entsprechenden Medikaments behandelt, zusätzlich wurde eine Kontroll-Zellkultur angesetzt, die unbehandelte Zellen enthielt. Insgesamt wurden 9 Gene untersucht: PDK1, p70S6, REDD1, REDD2, G $\beta$ L, RICTOR, RAPTOR, mTOR, EIF4B. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt.

Die entsprechenden Ansätze wurden auf eine Light Cycler Multiwell Platte pipettiert:



**Abb. 5** Light Cycler Multiwell Platte

Jeweils 15 µl des hergestellten cDNA Ansatzes und 5 µl des Primers kamen in eine well. Die Reihen wurden nach den unterschiedlichen Zellkulturen eingeteilt und die Spalten entsprechend der Primer.

Im Light Cycler System LC480 wurde das vorgegebene Programm „RT2 Primer Assay Invitrogen“ angewandt. Die Auswertung erfolgte mit der LC480

Analysesoftware, indem die Ratio aus Ziel- und Referenzgen gebildet wurde.

Programm:

Zyklen	Dauer	Temperatur
1	2 min	50°C
1	2 min	95°C
45	15 sec	95°C
	1 min	60°C
	Schmelzkurve	



## 3 Ergebnisse

Wie in 1.5.1. beschrieben, konnte bereits gezeigt werden, dass Deferasirox das Wachstum bestimmter Malignome, insbesondere das der myeloischen Leukämiezellen, hemmt. Ohyashiki et al. diskutierte bereits 2009 die Beteiligung des m-TOR Signalweges, um zu erklären, wie es zu einer verminderten Proliferation und erhöhten Apoptose kommen kann, bei Zellen die mit Deferasirox behandelt wurden.

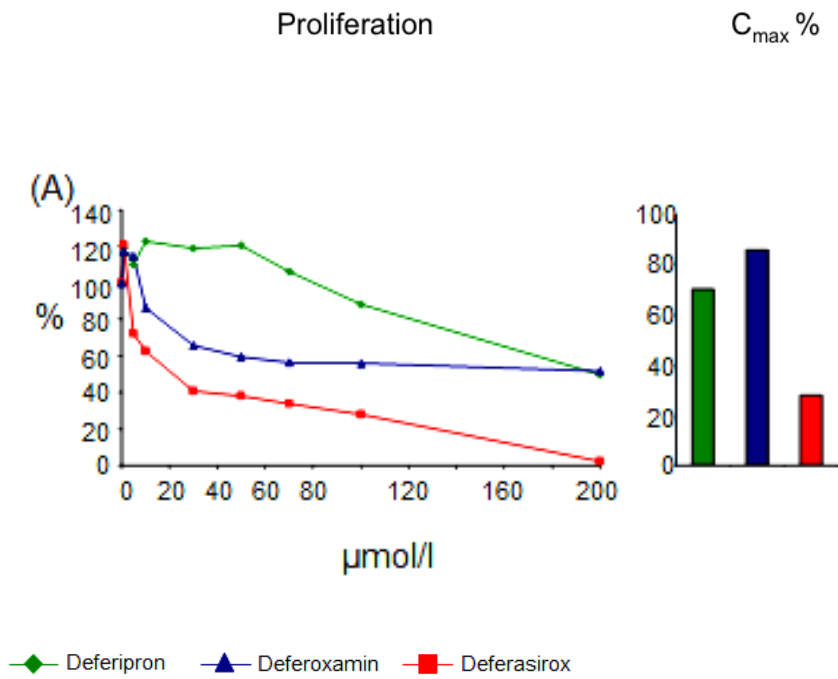
Aus diesem Grund wurden verschiedene Zelllinien sowie Zellen aus Blutproben von Patienten mit AML oder MDS mit Deferasirox und zwei weiteren Eisenchelatoren behandelt. Anschließend wurde die Proliferation mit dem Cell Titer Glo assay und die Apoptose mit dem Caspase 3/7 Glo assay gemessen. Des Weiteren wurde die Expression verschiedener, an diesem Signalweg beteiligter Gene des m-TOR Signalwegs verglichen.

Dem Signalweg entsprechend wurden folgende Gene untersucht: PDK1, mTOR, RAPTOR, G $\beta$ L, RICTOR, REDD1, p70S6, EIF4B und 4E-BP1.

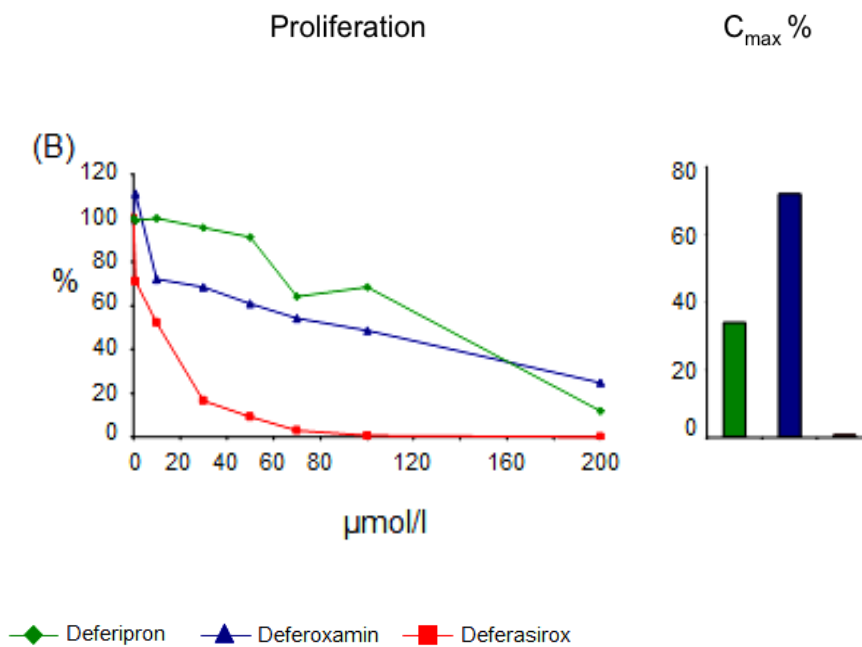
Die quantitative Veränderung in der Expression wurde mit Hilfe der real-time quantitativen PCR festgestellt. Hierbei erfolgt eine Fluoreszenzmessung, die in Echtzeit während der Kettenreaktion erfasst wird und so eine quantitative Aussage möglich macht.

### 3.1 Viabilität

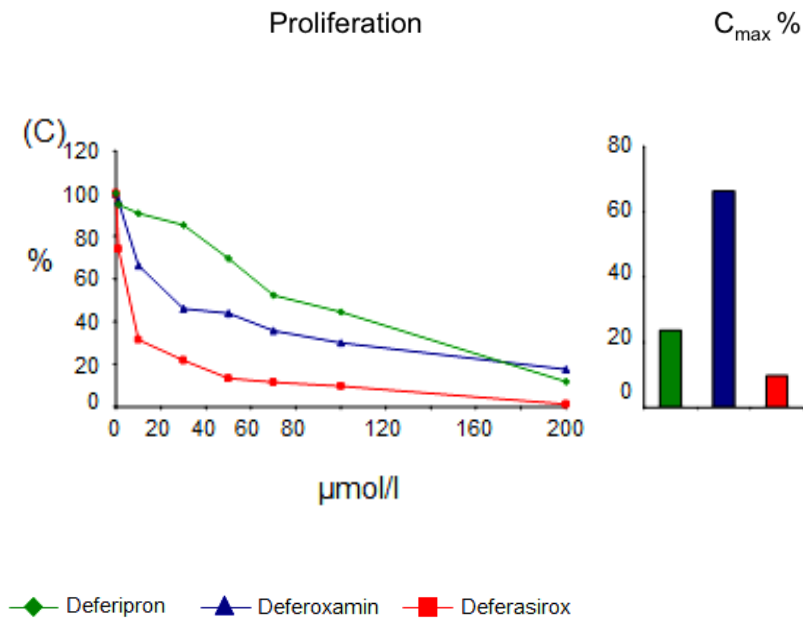
Die nachfolgenden Schaubilder zeigen die veränderte Viabilität von Zellen, die jeweils mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron behandelt wurden. Untersucht wurden die Zelllinien K562, U937 und HL60 sowie drei Patientenproben. Des Weiteren wird der prozentuale Anteil der noch lebenden Zellen bei maximaler Plasmakonzentration gezeigt. Die maximale Plasmakonzentration liegt für Deferasirox bei 100  $\mu$ M, für Deferoxamin bei 10  $\mu$ M und für Deferipron bei 158,8  $\mu$ M.



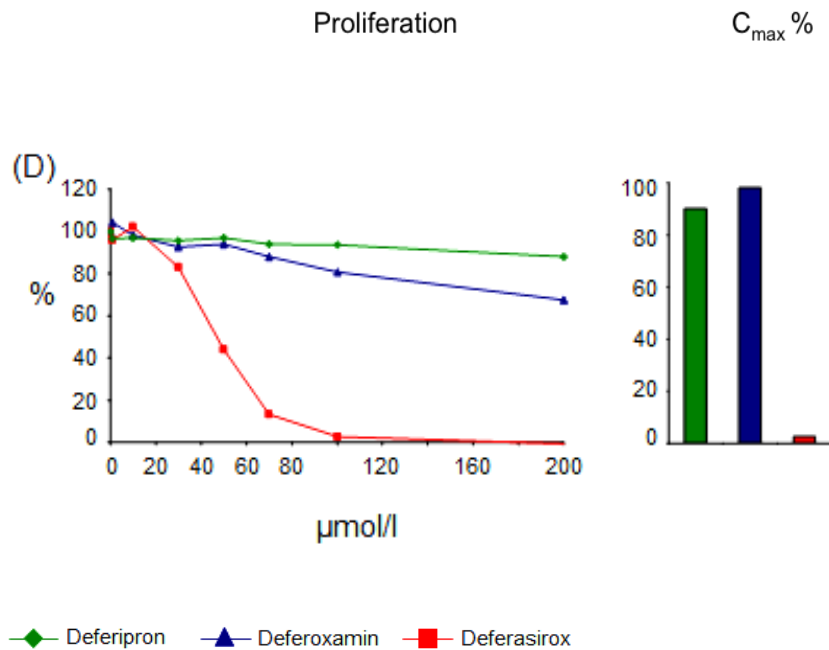
**Abb. 6 (A) K562** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration



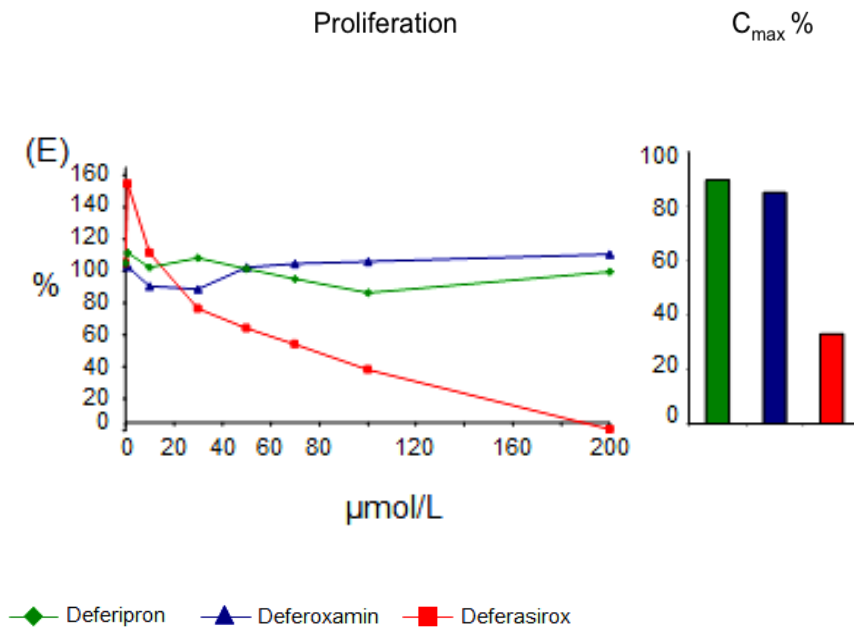
**Abb. 7 (B) U937** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration



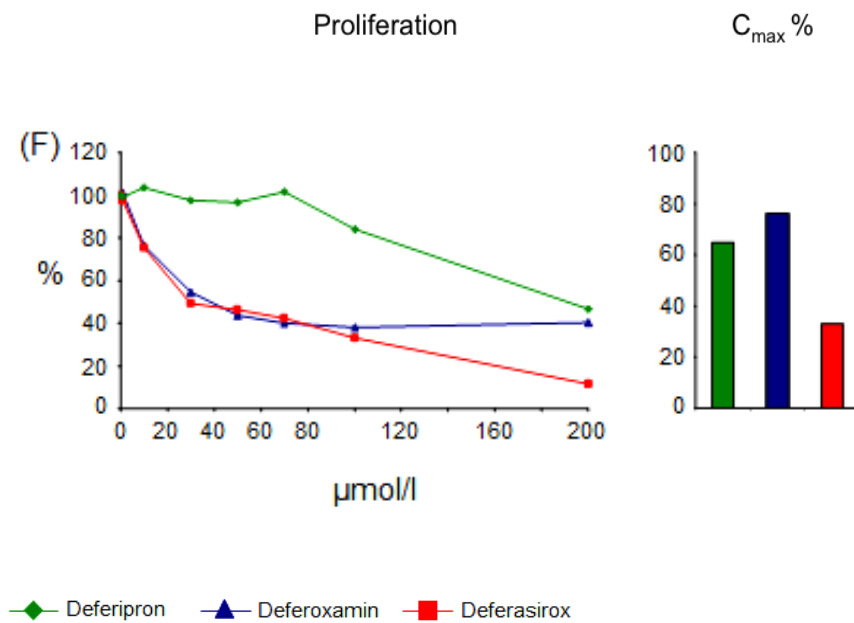
**Abb. 8 (C) HL60** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration



**Abb. 9 (D) PAT 1** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration



**Abb. 10 (E) PAT 2** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration



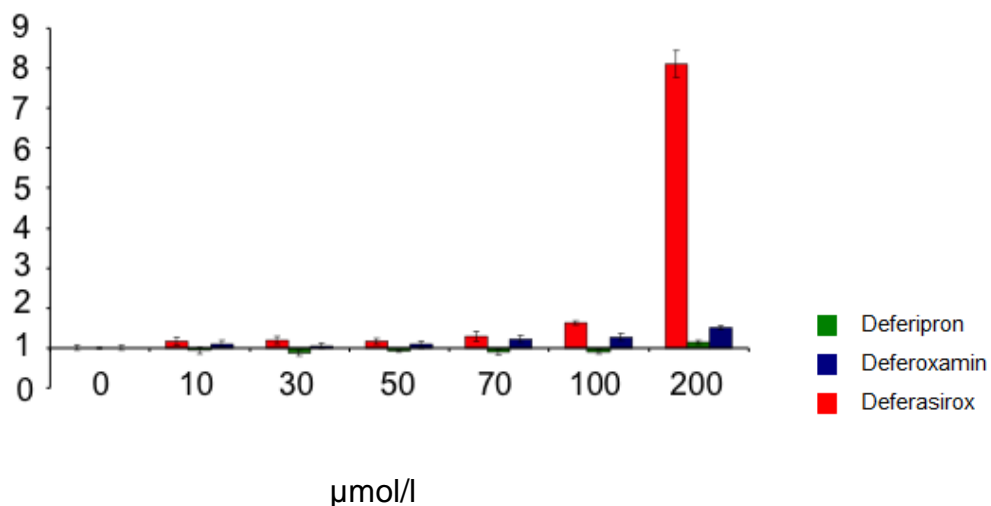
**Abb. 11 (F) PAT 3** Proliferationsrate und prozentualer Anteil noch lebender Zellen bei maximaler Plasmakonzentration

In allen Schaubildern ist zu erkennen, dass die Viabilität bei den Zellen, die mit Deferasirox behandelt wurden, am stärksten sinkt. Zudem zeigt sich, dass der prozentuale Anteil der noch lebenden Zellen bei Deferasirox bei maximaler Plasmakonzentration am geringsten ist. Bei Deferipron sinkt die Anzahl der noch lebenden Zellen kaum und für Deferoxamin zeigt sich nur bei den U937 und HL60 Zellen ein Absinken der prozentual noch lebenden Zellen.

### 3.2 Apoptotische Wirkung

Untersucht wurde der apoptotische Effekt auf Zellen, die mit Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron behandelt wurden. Die Schaubilder zeigen jeweils das Ansteigen oder Absinken der Apoptoserate bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen, wobei die Kontrolle gleich eins gesetzt wurde.

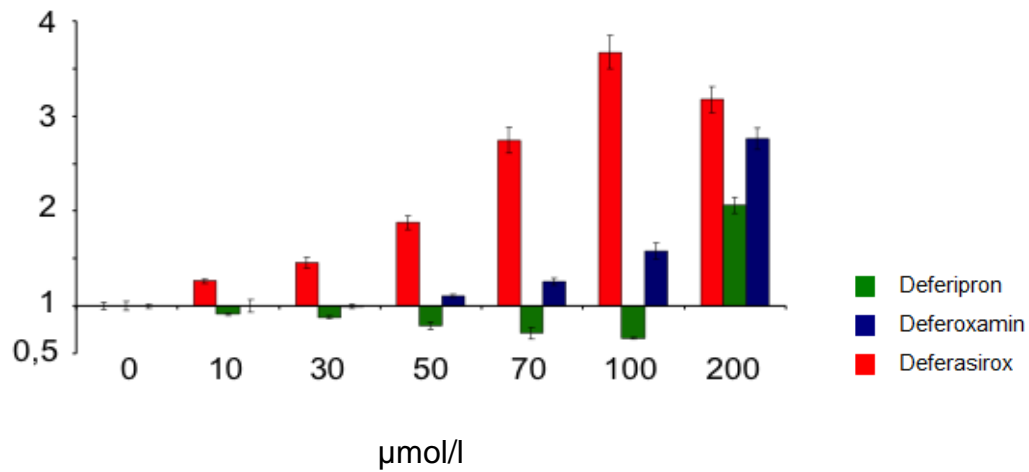
(A)



**Abb. 12 (A) K562** Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung

Das Schaubild zeigt eindeutig einen Anstieg der Apoptose der K562 Zellen, die mit 200 µM Deferasirox behandelt wurden, ansonsten kommt es zu keinen Veränderungen.

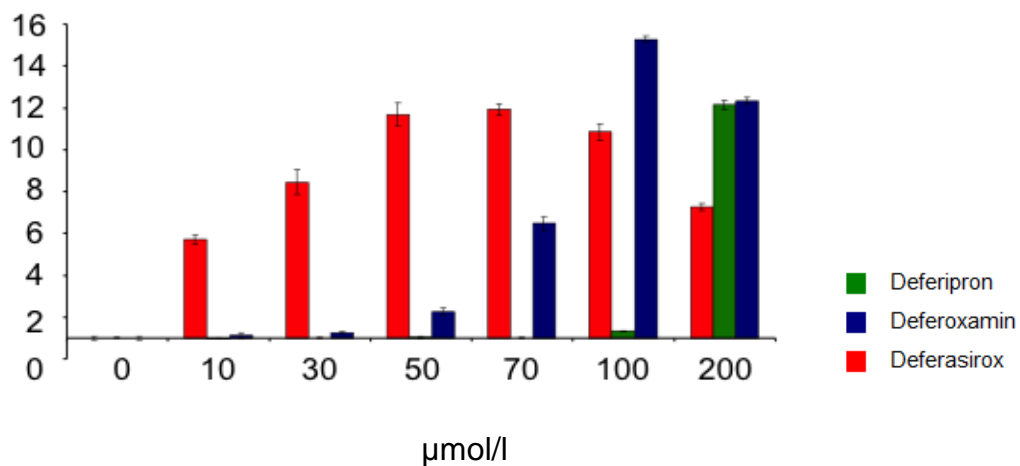
(B)



**Abb. 13 (B) U937** Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung

Bei allen U937 Zellen die mit Deferasirox behandelt wurden, zeigt sich schon ab 10 µM eine gesteigerte Apoptose, die dosisabhängig zunimmt. Die Zellen, die mit Deferipron und Deferasirox behandelt wurden zeigen erst ab 200 µM eine gesteigerte Apoptose auf.

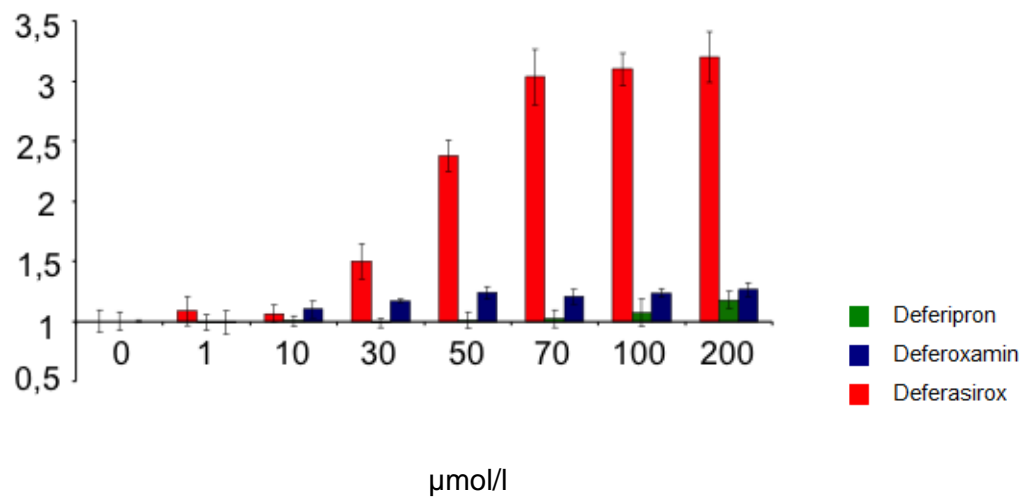
(C)



**Abb. 14 (C) HL60** Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung

Auch hier zeigt sich eine gesteigerte Apoptose bei den Zellen, die mit Deferasirox behandelt wurden bereits ab 10 µM. Bei Deferoxamin kommt es ab 70 µM zur gesteigerten Apoptose und bei Deferipron erst ab 200 µM.

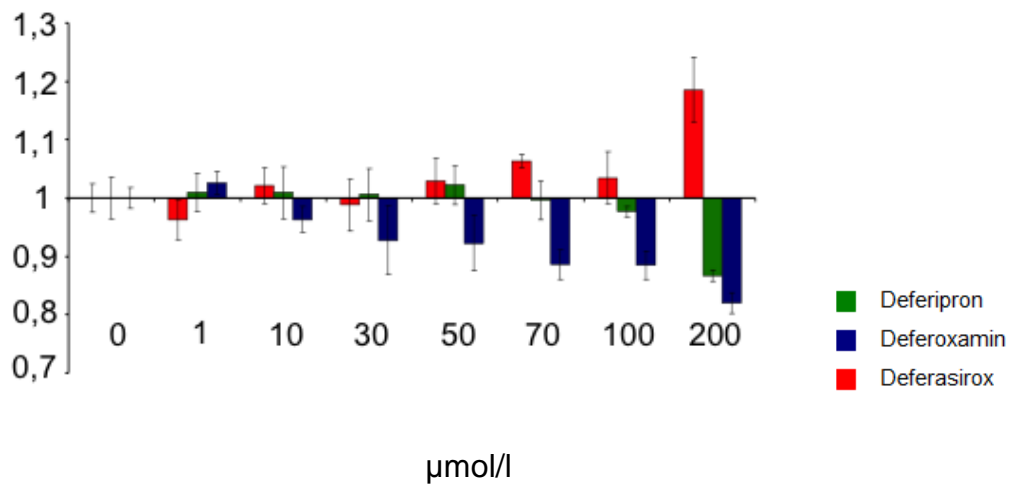
(D)



**Abb. 15 (D) PAT 1** Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung

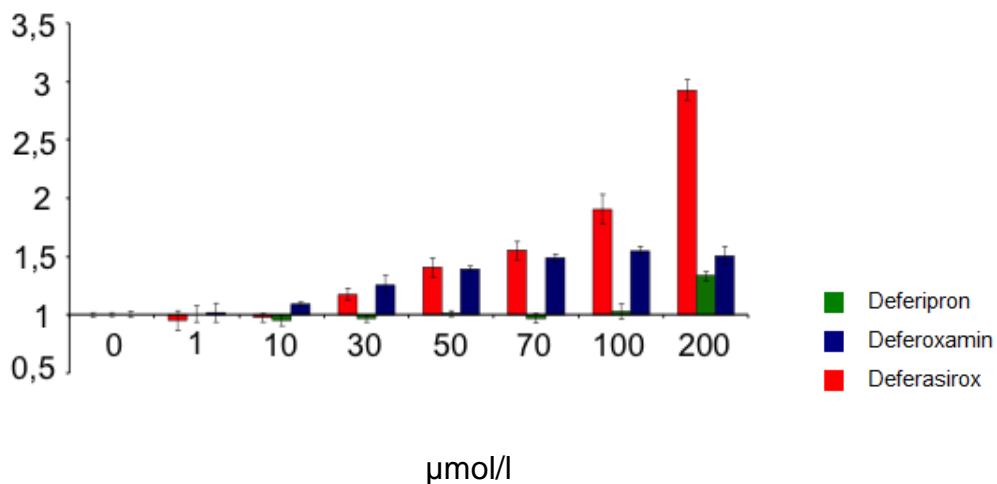
Die Untersuchung der ersten Patientenprobe ergibt einen eindeutigen Anstieg der Apoptose bei den Zellen die mit Deferasirox behandelt wurden. Die Behandlung mit Deferoxamin und Deferipron führt zu vergleichsweise geringen Veränderungen der Apoptose.

(E)

**Abb. 16 (E) PAT 2 Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung**

Auch hier zeigt sich die erhöhte Apoptoserate für Deferasirox behandelten Zellen. Die Behandlung mit Deferoxamin und Deferipron führt sogar zu einer verminderten Apoptose der Zellen im Vergleich zu der Kontrolle.

(F)

**Abb. 17 (F) PAT 2 Apoptose unter Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron Behandlung**



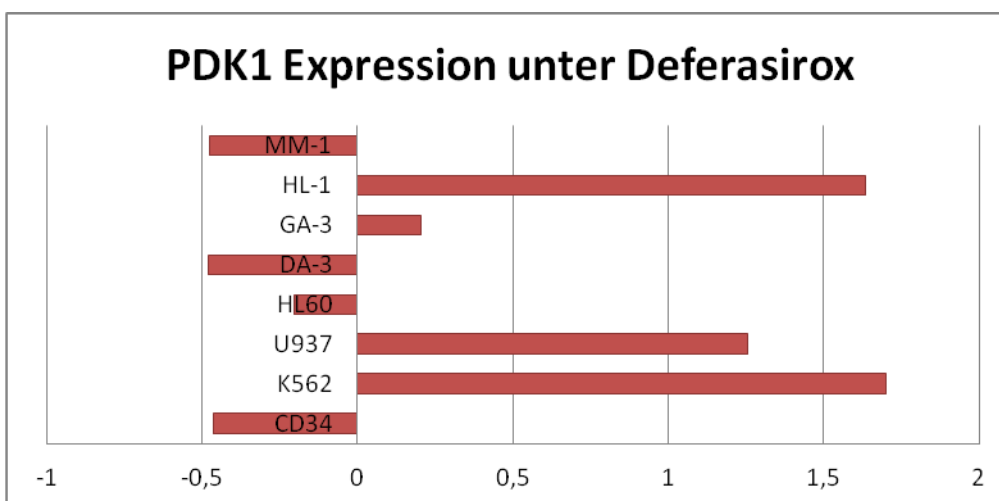
Das Schaubild zeigt einen deutlichen Anstieg der Apoptose für die Zellen, die mit Deferasirox behandelt wurden. Zudem kommt es zu einem leichten Anstieg der Apoptose bei Deferoxamine der sich jedoch geringer zeigt als bei Deferasirox. Bei Deferipron kommt es nur ab 200  $\mu\text{M}$  zu einem leichten Anstieg der Apoptose.

### 3.3 Beeinflussung der Expression

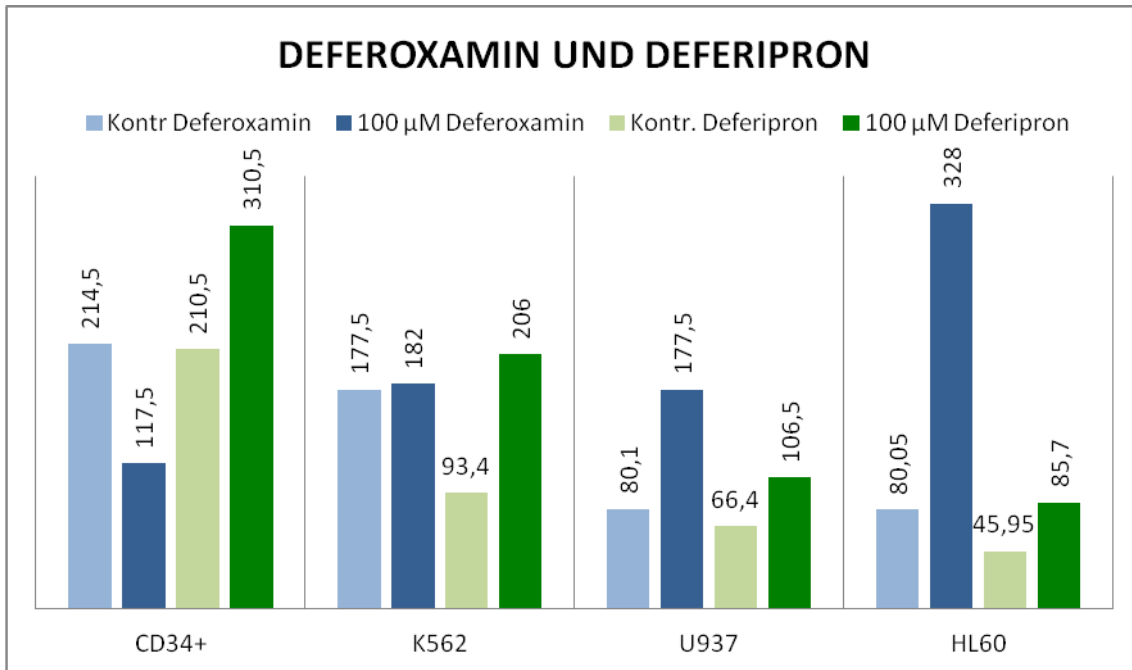
#### 3.3.1 PDK1

Die Ergebnisse der PDK1 Untersuchung zeigen, dass die Expression von PDK1 unter Deferipron- und Deferoxamin bei allen Zelllinien ansteigt, außer bei den Deferoxamin behandelten CD34 + Zellen, bei denen sich eine verminderte Expression zeigt. Das Absinken des PDK1 Wertes bei den CD34+ Zellen unter Deferasirox Gabe lässt sich durch einen Messfehler in der Kontrolle erklären, hierbei weichen die Einzelwerte trotz mehrfacher Wiederholung des Experiments sehr stark voneinander ab, sodass der gebildete Mittelwert nicht eindeutig zu interpretieren ist. Generell wurden bei allen fehlerhaften Messungen die Untersuchungen wiederholt, bei gleichbleibendem Fehler wurde mit Einzelwerten anstatt mit dem gebildeten Mittelwert gerechnet.

Betrachtet man die PDK1 Expression unter Deferasirox Gabe, kommt es sowohl bei den Zelllinien als auch bei den Patientenproben, sowohl zum Anstieg als auch zum Abfall der Werte.



**Abb. 18** Analyse der PDK1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien und der Patientenproben mit Deferasirox



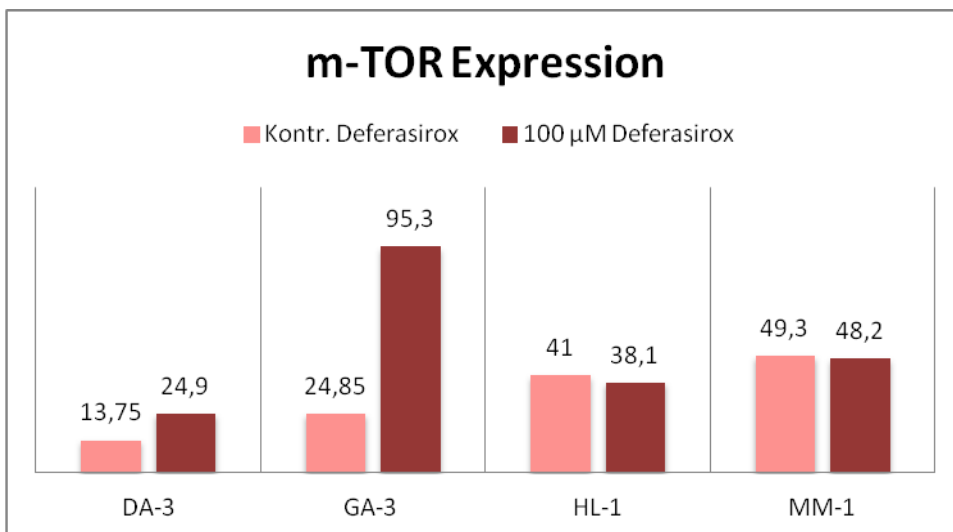
**Abb. 19** Analyse der PDK1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit Deferipron und Deferoxamin

### 3.3.2 mTOR

Die Analyse der mTOR Expression zeigt ein uneinheitliches Ergebnis bei den untersuchten Zelllinien. Jede Zelllinie verhält sich jeweils unterschiedlich bei der Expression von mTOR bei der jeweils ausgewählten Gabe der drei verwendeten Eisenchelatoren.

Bei den K562-Zellen ist beispielsweise ein Anstieg von mTOR unter Deferasirox und Deferipron zu verzeichnen und ein Abfall bei Deferoxamin Gabe. Die Zelllinien U937 und HL60 zeigen sowohl eine erhöhte Expression unter Deferoxamin als auch unter Deferipron aber es kommt zum Abfall des Wertes bei Deferasirox Gabe.

Bei den Patientenproben wiederum steigt mTOR unter Deferasirox an, beziehungsweise verhält sich annähernd gleichbleibend.



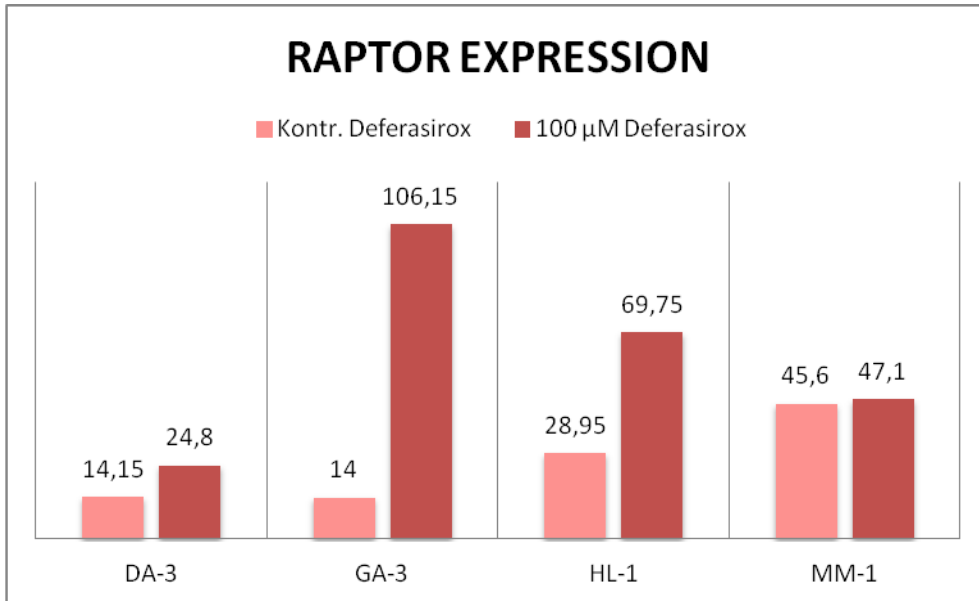
**Abb. 20** Analyse der mTOR Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox

### 3.3.3 RAPTOR

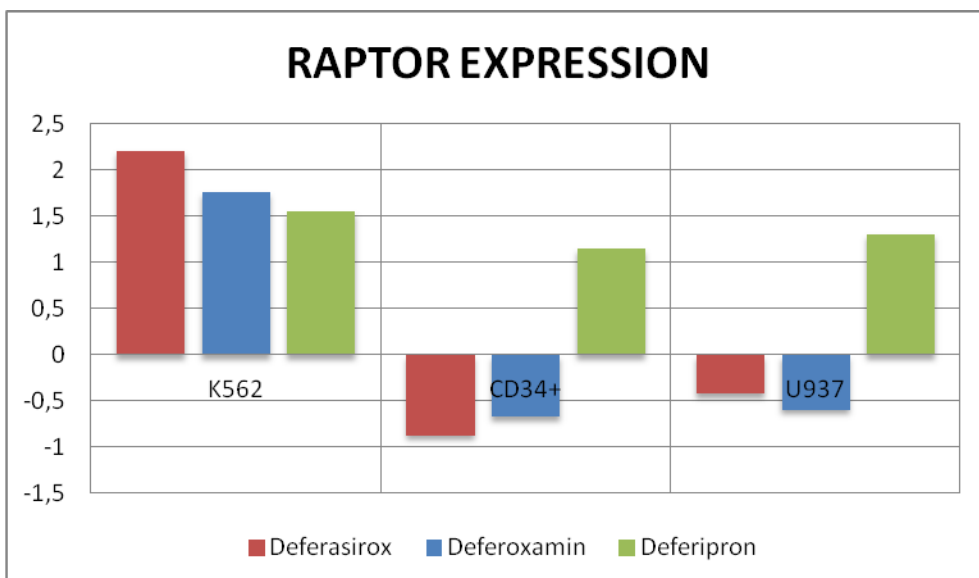
Bei allen Patientenproben ist ein Anstieg der RAPTOR Expression unter Deferasirox zu verzeichnen. Die Zelllinie der K562 Zellen verhält sich ähnlich. Auch hier kommt es zu einem Anstieg der Expression nach Gabe der jeweiligen Eisenchelatoren.

Vergleicht man die CD34+ Zellen und die Zelllinie U937 sieht man, dass es bei Beiden zu einem Anstieg der RAPTOR Expression unter Deferipron kommt. Jedoch kommt es zu einem Abfall der Werte unter Deferasirox und Deferoxamin.

Eine eindeutige Aussage über eine veränderte Expression bei der HL60 Zelllinie kann nicht getroffen werden. Trotz mehrmaligen Wiederholungen kommt es zu keinen klaren Messergebnissen bei den Zellen, die mit 100 µMol Deferoxamin behandelt wurden. Die HL60 Zellen die mit Deferasirox und Deferipron behandelt wurden, zeigen die gleichen veränderten Werte wie CD34+ und U937.



**Abb. 21** Analyse der RAPTOR Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox



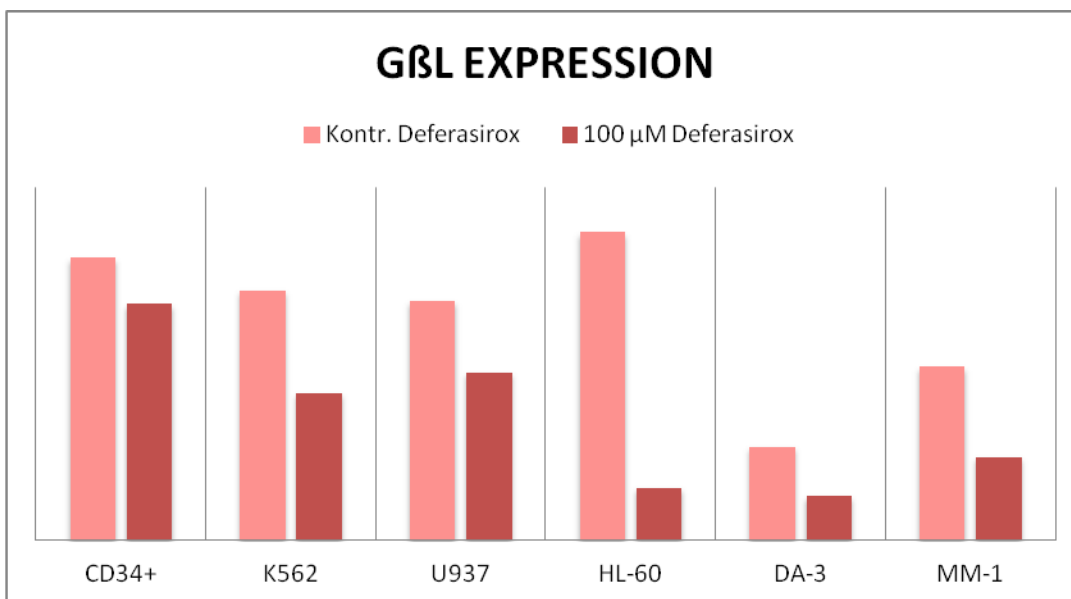
**Abb. 22** Analyse der RAPTOR Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, CD34+ und U937 mit Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron

### 3.3.4 G $\beta$ L

Bei allen Zelllinien sowie bei den Patientenproben DA-3 und MM-1 kommt es zu einer verminderten G $\beta$ L Expression unter Deferasirox.

Zudem zeigt sich ein Anstieg für die Zellen, die mit Deferipron behandelt wurden. Die Koinkubation der jeweiligen Zelllinie mit Deferoxamin ergibt keine einheitliche Veränderung, es kommt je nach Zelllinie sowohl zum Anstieg als auch zum Abfall des Wertes.

Die Patientenprobe GA-3 kann hierbei nicht berücksichtigt werden, da keine RNA des Target-Gens nachweisbar war.

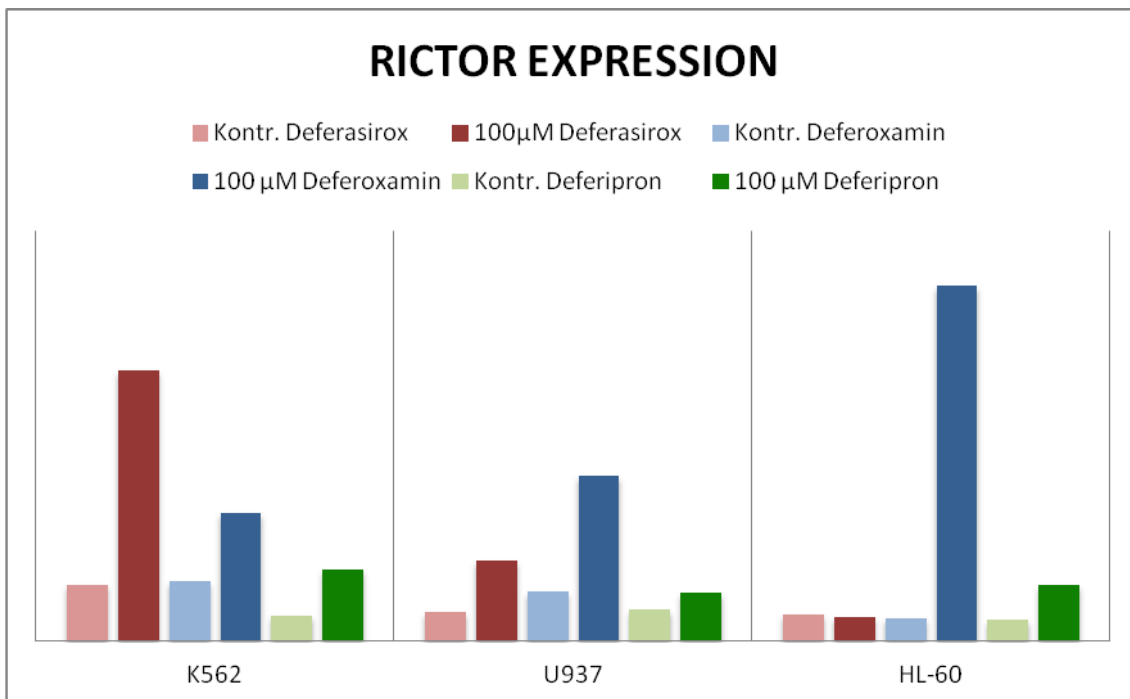


**Abb. 23** Analyse der G $\beta$ L Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL-60 und der Patientenproben DA-3 und MM-1 mit Deferasirox

### 3.3.5 RICTOR

Schaut man sich an, wie sich die Expression von RICTOR unter Eisenchelation verändert, zeigt sich ein eindeutiger Anstieg von RICTOR bei allen Patientenproben und bei der K562 Zelllinie sowie bei der U937 und HL60 Zelllinie oder verhält sich nahezu gleichbleibend.

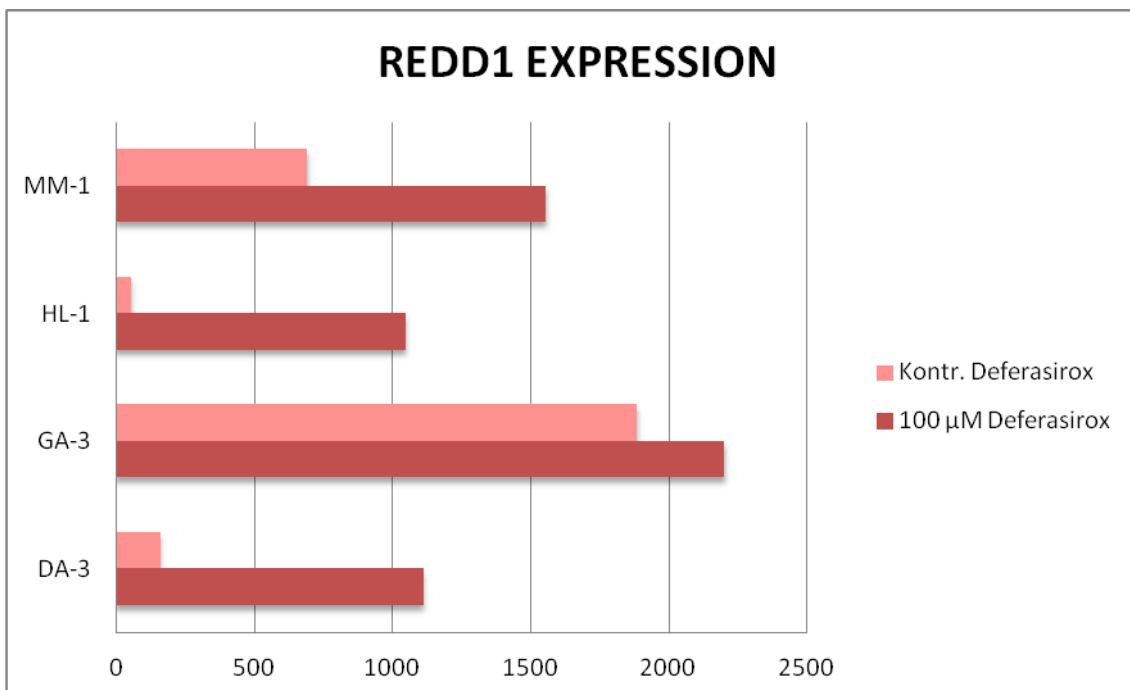
Die CD 34 + Zellen zeigen nur unter Deferipron einen Anstieg der Expression, ansonsten kommt es zu einem Abfall.



**Abb. 24** Analyse der RICTOR Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron, Deferoxamin

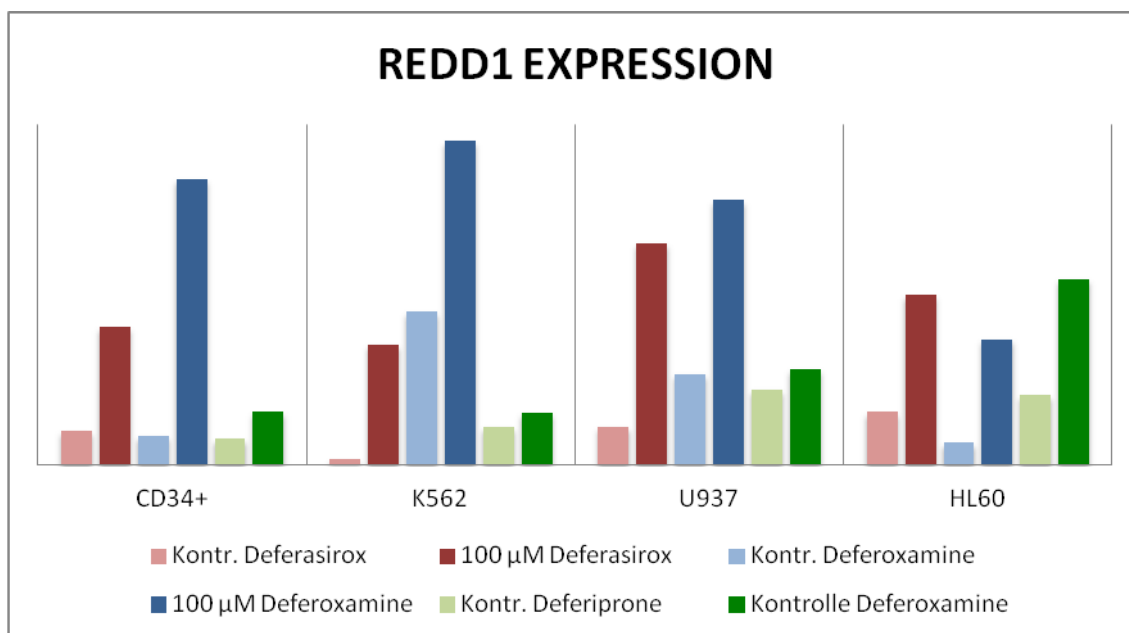
### 3.3.6 REDD-1

Bei der Analyse der REDD-1 Expression zeigt sich das eindeutigste Ergebnis. Hier kommt es zu einem einheitlichen Anstieg der REDD-1 Expression unter Eisenchelation. Sowohl bei Deferasirox als auch bei Deferipron und Deferoxamin. Dieses Ergebnis zeigt sich sowohl bei allen Patientenproben als auch bei den Zelllinien K562, U937 und HL60 und den CD34+ Zellen.



**Abb. 25** Analyse der REDD-1 Expression nach 24h Behandlung der Patientenproben mit Deferasirox





**Abb. 26** Analyse der REDD-1 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron

### 3.3.7 p70S6

Die Ergebnisse der p70S6 Expression zeigen für jede Zelllinie unterschiedliche Aussagen:

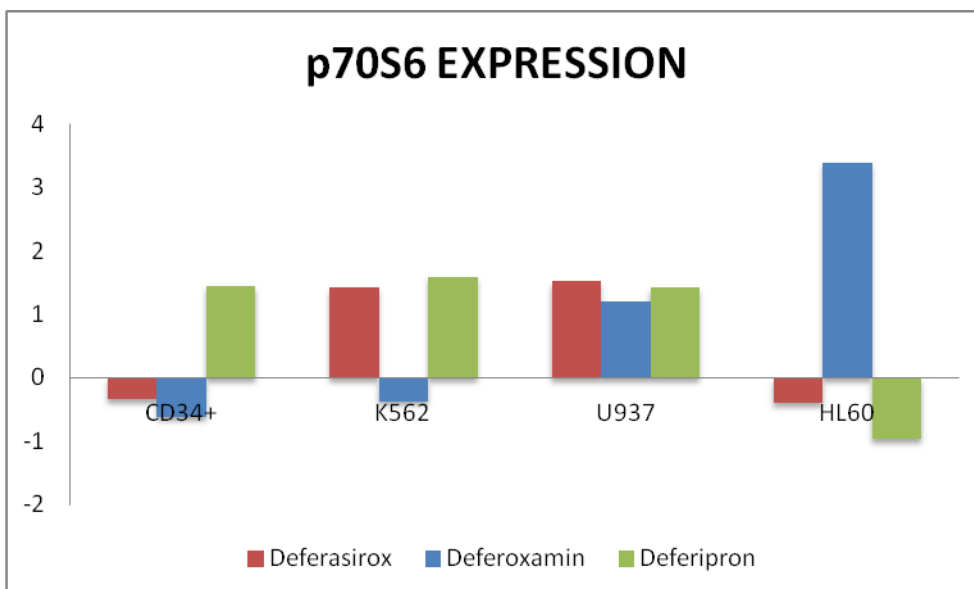
Bei den CD34+ Zellen zeigt sich ein Anstieg unter Deferipron und ein Abfall der Werte unter Deferasirox und Deferoxamin.

Die K562 Zellen weisen einen Anstieg der Expression von p70S6 unter Deferasirox und Deferipron auf. Unter Deferoxamin kommt es zum Abfall der Expression.

Die Ergebnisse bei der Untersuchung der U397 Zellen zeigen einen einheitlichen Anstieg bei allen drei untersuchten Eisenchelatoren.

Bei den HL60 Zellen kommt es zum Anstieg unter Deferoxamin aber zum Abfall der Expression unter Deferasirox und Deferipron.

Drei Patientenproben zeigen einen Anstieg unter Deferasirox Behandlung und eine Patientenprobe zeigt eine verringerte Expression von p70S6.



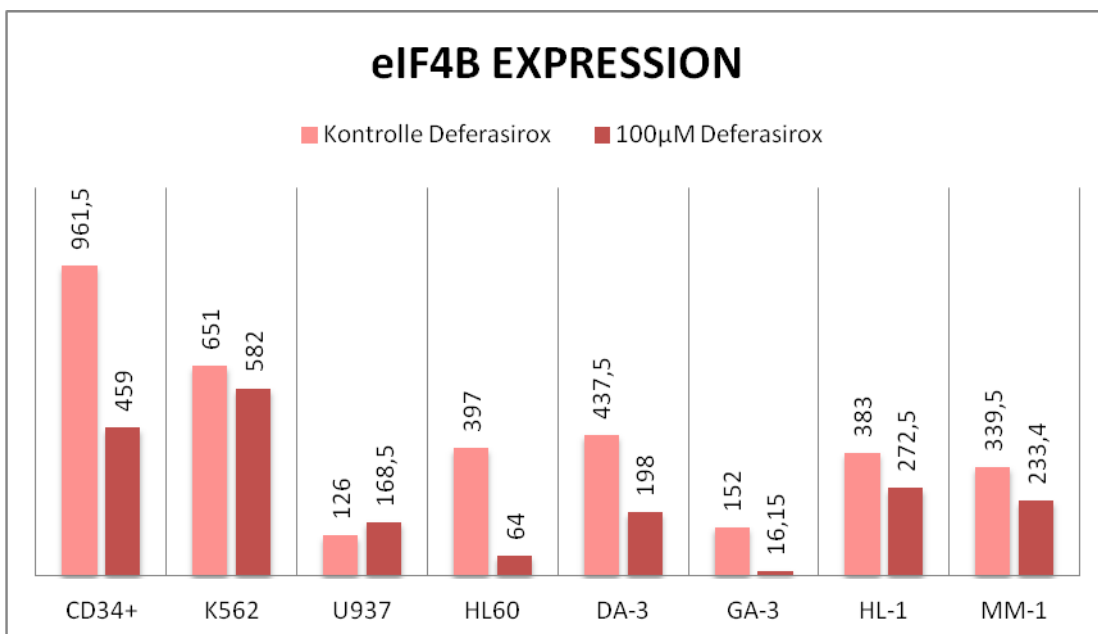
**Abb. 27** Analyse der p70S6 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien CD34+, K562, U937 und HL60 mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron, Deferoxamin

### 3.3.8 eIF4B

Sowohl bei allen Zelllinien als auch bei allen Patientenproben kommt es zu einem Abfall der eIF4B Expression unter Deferasirox außer bei U937.

Die Koinkubation der Zelllinien mit Deferipron führt zu einem Anstieg der eIF4B Expression.

Die Gabe von Deferoxamin zeigt ebenfalls einen Abfall der Expression bei den Zelllinien CD34+, K562 und HL60, nur bei der Zelllinie U937 ist ein Anstieg der Expression zu vermerken.



**Abb. 28** Analyse der eIF4B Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937, HL60, der CD34+ Zellen und der Patientenproben mit Deferasirox

### 3.3.9 4E-BP1

Die Analyse der 4E-BP1 Expression zeigt jeweils unterschiedliche Veränderungen der Expression.

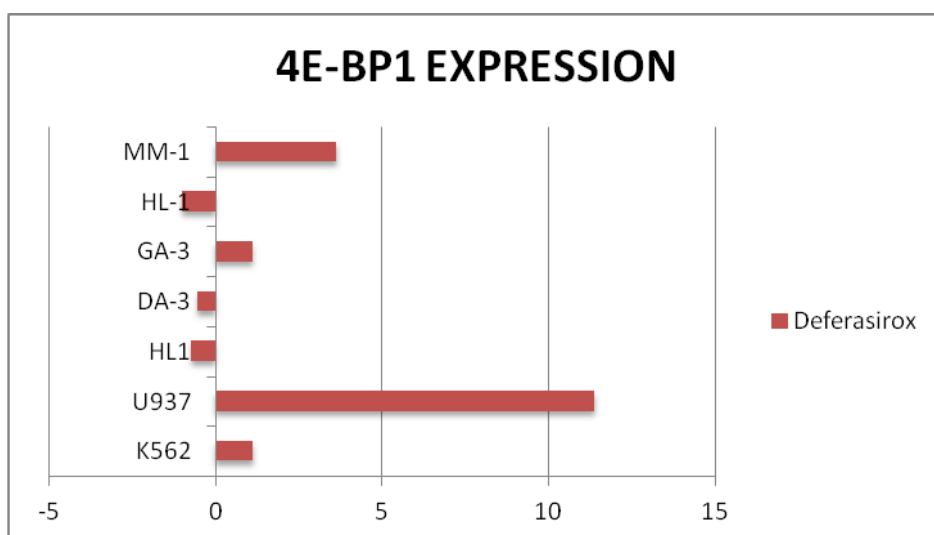
Die K562 Zellen zeigen einen Anstieg der Expression unter Deferasirox und Deferipron aber eine verminderte Expression unter Deferoxamin.

Bei den U937 Zellen kommt es zu einem Anstieg unter Deferasirox und Deferoxamin und zu einem Abfall des Expressionswertes von 4E-BP1 unter Deferipron.

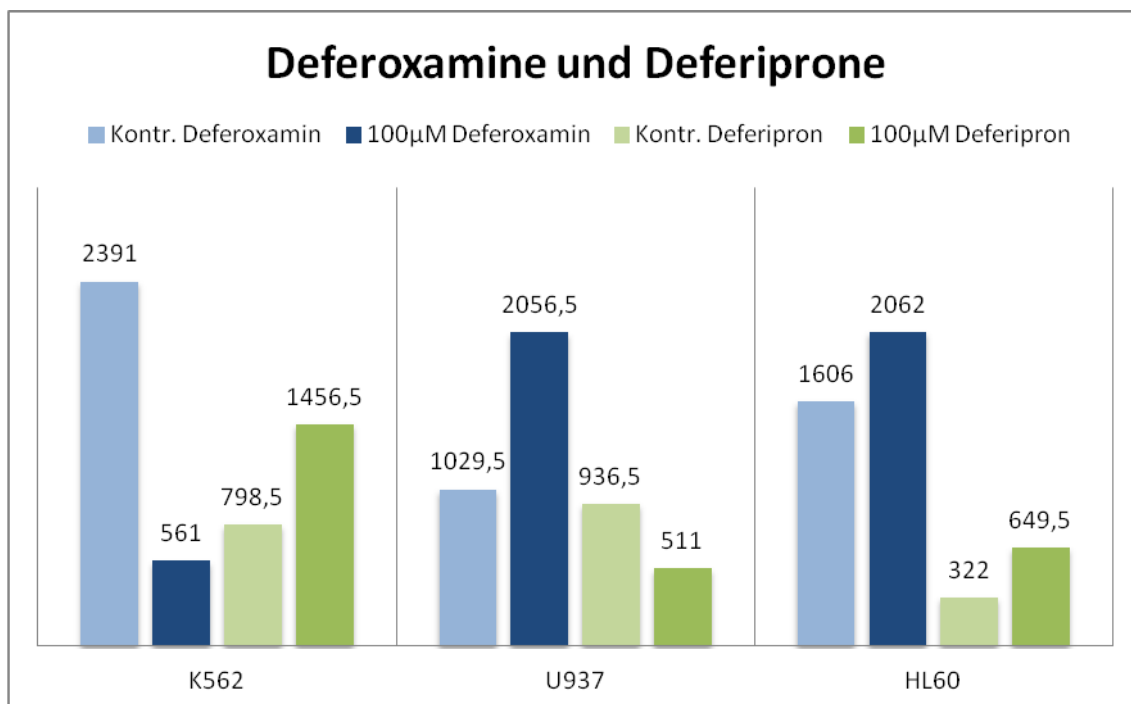
Die Untersuchung der HL60 Zellen ergibt eine erhöhte Expression unter Deferoxamin und Deferipron aber eine verminderte Expression unter Deferasirox.

Die CD34+ Zellen wurden nicht auf 4E-BP1 untersucht.

Bis auf eine Patientenprobe, die einen Anstieg der 4E-BP1 Expression zeigt, bleiben die Expressionswerte der anderen Patientenproben nahezu unverändert.



**Abb. 28** Analyse der 4E-BP1 Expression nach 24h Behandlung der verschiedenen Zelllinien und der Patientenproben mit Deferasirox



**Abb. 30** Analyse der 4E-BP1 Expression nach 24h Behandlung der Zelllinien K562, U937 und HL60 mit Deferoxamin und Deferiprone

## 4 Diskussion

Die in Kapitel 2 „Material und Methoden“ beschriebenen Versuche sollen sowohl die antiproliferativen Effekte von Deferasirox als auch dessen apoptotische Wirkung auf Leukämiezellen nachweisen. Weiterhin sollen die möglichen Mechanismen geklärt werden, die dafür verantwortlich sein könnten.

### 4.1 Viabilität und Apoptose unter Eisenchelation

Zur Feststellung der antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung von Deferasirox wurden drei Zelllinien (K562, U937 und HL60) sowie drei Patientenproben mit den drei Eisenchelatoren Deferasirox, Deferoxamin und Deferipron behandelt. Die untersuchten Patientenproben stammen von Patienten, die unter einer Akuten Myeloischen Leukämie leiden, ausgehend von einem Myelodysplastischen Syndrom. Die veränderte Viabilität wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen. Die Messung der Apoptose erfolgte mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay.

Bei diesen Messungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass ausschließlich Deferasirox einen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt auf die Zellen ausübt. Die Koinkubation der Zellen mit den jeweiligen Eisenchelatoren erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen. Für die Bewertung der Ergebnisse ist dabei die maximale Plasmakonzentration von größter Bedeutung. Sollten Veränderungen in der Viabilität oder eine erhöhte Apoptose bei Konzentrationen oberhalb der maximalen Plasmakonzentration feststellbar sein, sind diese schwierig zu bewerten, da solche Konzentrationen bei Einnahme der empfohlenen Dosis im menschlichen Organismus nicht erreicht werden.

In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass sich ein veränderter Eisenstoffwechsel in entarteten Körperzellen nachweisen lässt. Letztendlich führen Veränderungen in der Eisenaufnahme, -ausscheidung und -speicherung dazu, dass es zu einem erhöhten intrazellulären Eisengehalt kommt, um die

gesteigerte Proliferation zu gewährleisten (Am Merlot et al. 2013; Torti und Torti 2013).

Die Untersuchung der drei Zelllinien und der Patientenproben ergab aber nur für Deferasirox eine verminderte Proliferation und einen Anstieg der Apoptose. Dies ist besonders eindeutig zu sehen, wenn man die Anzahl der noch lebenden Zellen bei maximaler Plasmakonzentration der jeweiligen Substanz betrachtet. Diese liegt für Deferasirox bei 100  $\mu\text{M}$  bei einer Plasmahalbwertszeit von 7,2 -18,5 Stunden, für Deferoxamin bei 10  $\mu\text{M}$  und eine Plasmahalbwertszeit von 7,59 Stunden. Die maximale Plasmakonzentration für Deferipron liegt bei 158,8  $\mu\text{M}$  bei einer Plasmahalbwertszeit von 1,3 - 2,7 Stunden.

Da eine generelle Eisenchelation die Zellen nicht apoptotisch macht, führt dies zur Annahme, dass Deferasirox zusätzlich an anderer Stelle angreift.

## 4.2 Beeinflussung des mTOR Signalwegs

Die Messungen unter Eisenchelation ergaben, dass ausschließlich Deferasirox im Vergleich zu Deferoxamin und Deferipron zu einer verminderten Proliferation und erhöhten Apoptose führt. Ein weiterer möglicher Angriffspunkt für Deferasirox könnte der mTOR Signalweg sein. Dies wurde bereits 2009 von Ohyashiki et al. diskutiert. Aus diesem Grund wurden neun an diesem Signalweg beteiligte Gene untersucht: PDK1, mTOR, RAPTOR, G $\beta$ L, RICTOR, REDD1, p70S6, EIF4B und 4E-BP1. Untersucht wurden die drei Zelllinien K562, U937 und HL 60, CD34 positive Zellen und vier AML Patientenproben DA3, GA3, MM1 und HL1. Allen Zellen wurden jeweils mit den Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron und Deferoxamin behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der real-time quantitativen PCR eine quantitative Veränderung der Expression gemessen.

Ohyashiki et al. konnte in einer in vitro Studie belegen, dass es zu einer erhöhten Apoptose bei Myeloischen Leukämiezelllinien unter Deferasirox Behandlung kommt. Des Weiteren zeigten seine Ergebnisse, dass die Expression von REDD1 (development and DNA damage response protein)

ansteigt und die Expression von TSC2 erhöht ist. Beides führt zur Unterdrückung des mTOR Signalweges.

Auch in unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass alle Zellen, die mit Deferasirox behandelt wurden, eine verminderte Proliferation und eine erhöhte Apoptose aufweisen. Die Behandlung mit Deferoxamin und Deferipron zeigte diese Wirkung nicht. Dementsprechend könnte Deferasirox eine off-Target Funktion aufweisen. Das heißt Deferasirox hat möglicherweise einen weiteren Angriffspunkt außer der reinen Eisenchelation. Die Untersuchung der verschiedenen am mTOR Signalweg beteiligten Gene zeigt ein uneinheitliches Bild. Lediglich für REDD1 zeigt sich auch bei uns eine erhöhte Expression. Zusätzlich zu Deferasirox wurden die Zellen vergleichsweise auch mit Deferoxamin und Deferipron behandelt. Diese zeigten jedoch keine Proliferationshemmung und keine erhöhte Apoptose auf. Jedoch führte die Gabe von Deferoxamin und Deferipron ebenfalls bei allen untersuchten Zellen zu einer gesteigerten Expression von REDD1. Das bedeutet, dass der mTOR Signalweg auf Expressionsebene generell durch Eisenchelation gehemmt werden kann. Es zeigt sich eine eindeutige substanzspezifische Wirkung auf die Apoptose und die Proliferation aber nicht auf die Beeinflussung des mTOR Signalweges. Dementsprechend konnten wir die Ergebnisse von 2009 bezüglich der Unterdrückung des mTOR Signalweges durch Deferasirox reproduzieren. Zusätzlich zeigt sich aber, dass der mTOR Signalweg nicht nur durch Deferasirox, sondern generell durch Eisenchelation unterdrückt werden kann.

Somit muss es einen anderen Mechanismus geben, der für die apoptotische und antiproliferative Wirkung von Deferasirox verantwortlich ist.

Neuste Studien befassen sich damit, ob eine Eisenchelation die DNA-Synthese dahingehend beeinflusst, dass es zur Proliferationshemmung und Apoptose in malignen Zellen kommt. Diese haben aufgrund ihrer erhöhten Proliferationsrate einen erhöhten Eisenbedarf.



Eisen spielt eine wichtige Rolle für den Ablauf des Zellzyklus. Eine große Bedeutung hat das Eisen als Kofaktor für das Enzym Ribonukleotidreduktase. Dieses Enzym ist für die Reduktion der Ribonukleotide zu Desoxyribonukleotiden verantwortlich (Donfrancesco et al. 1990). Die Ribonukleotidreduktase besteht aus zwei Untereinheiten. Die R1 Untereinheit ist ein Homodimer, welches den katalytischen und substratbindenden Bereich beinhaltet. Die R2-Untereinheit ist ein Heterodimer, welches aus dem Zellkern ins Zytoplasma wandert, wenn es aktiviert wird. R2 beinhaltet ein Radikal an seiner Tyrosinseitenkette, welches durch Eisen stabilisiert wird und ist damit für die katalytische Reaktion von essentieller Bedeutung (Gräslund et al. 1982). Für eine funktionierende DNA-Synthese ist die Ribonukleotidreduktase Aktivität von größter Bedeutung, daher führt eine andauernde Eisenchelation zu einem G1/S Arrest (Green et al. 2001). Des Weiteren wurde eine alternative Form der R2 Untereinheit entdeckt, die Desoxyribonukleotide bei DNA Schäden für eine Reparatur zur Verfügung stellt. Da die Expression dieser Untereinheit maßgeblich durch p53 gesteigert werden kann, wird sie auch p53R2 genannt (Shang et al. 2011). Auch bei p53R2 findet sich ein Radikal an der Tyrosinseitenkette, welches durch Eisen stabilisiert wird (Wei et al. 2006).

p53 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und verantwortlich für die Stimulation der DNA-Reparatur. Über p53 kann ein Zellzyklus-Arrest in der G1/S Phase herbeigeführt oder Apoptose induziert werden. p53 wird im Wesentlichen durch das mouse double minute gene 2 (MDM2) reguliert, welches in der Lage ist p53 zu binden und dessen Abbau signalisiert. Der p53 Spiegel kann durch oxidativen Stress, DNA Schädigung, abnormales Zellwachstum oder Hypoxie erhöht werden (Chen et al. 2003a; Chen et al. 2003b). Einige Studien haben gezeigt, dass eine Eisenchelation die Transkription, Translation und die Affinität zur DNA Bindung von p53 erhöht, was letztendlich zu einem G1/S Zellzyklus Arrest und/oder zur Apoptose führt (Fukuchi et al. 1995; Liang und Richardson 2003; Saletta et al. 2010).

Sollte sich zeigen, dass eine Eisenchelation die DNA-Synthese in malignen Zellen hemmt, und dadurch zu einer verminderten Proliferation und zu einer gesteigerten Apoptose führt, bleibt weiterhin zu klären, aus welchem Grund

ausschließlich Deferasirox einen antiproliferativen und apoptotischen Effekt auf AML-Zellen hat.

Weiterhin befassen sich neuere Studien mit der Kombination aus Deferasirox und unterstützenden Substanzen. Paubelle et al. diskutierten 2013 die Wirksamkeit von Deferasirox und Vitamin D bei älteren Patienten, die unter AML leiden.

Die Prognose bei Patienten höheren Alters, bei denen eine Akute Myeloische Leukämie diagnostiziert wurde, ist leider noch schlechter bewertet als bei jüngeren Patienten und hat sich in den letzten Jahrzehnten kaum verändert (Burnett et al. 2011). Obwohl es bei 40 - 60 % dieser Patienten zu einer vollständigen Remission unter einer intensiven Chemotherapie kommt (Estey 2009), liegt die Gesamtüberlebensrate für diese Patientengruppe nur bei 4-7 Monaten (Fröhling et al. 2006; Kantarjian et al. 2012). Bei den meisten älteren AML-Patienten kommt es auf Grund notwendiger Bluttransfusionen zu einem Eisenüberschuss und in manchen Fällen zu einer ineffektiven Erythropoese (Lichtman et al. 1999). Interessanterweise deuten retrospektive Studien bei MDS-Patienten darauf hin, dass die Therapie mit Eisenchelatoren zu einer höheren Lebenserwartung führen kann. Des Weiteren kann das Risiko für die Transformation zur AML gesenkt werden. Obwohl die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dafür noch immer im Unklaren sind (Malcovati et al. 2005; Rose et al. 2010). In einer Studie von Paubelle et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine Kombination aus Deferasirox und Vitamin D erhalten haben, eine gesteigerte Überlebensrate aufzeigen. Dabei zeigte sich, dass die Höhe des Vitamin D-Spiegels eine positive Korrelation zur Überlebensrate aufweist.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Deferasirox einen positiven Effekt auf die Hämatopoese bei MDS Patienten hat und letztendlich dazu führen kann, dass die notwendigen Bluttransfusionen entweder reduziert oder in manchen Fällen sogar vollständig abgesetzt werden können (Messa et al. 2008;

Breccia et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten in einer aktuellen Studie von Meunier et al. (2017) reproduziert werden. Weiterhin zeigte sich in dieser Studie, dass eine niedrig dosierte Deferasiroxtherapie die Erythropoese in vitro verbessert, indem die Level, der reaktiven Sauerstoffspezies reduziert werden und NF-kappaB aktiviert wird. Der Nuclear Factor-kappa B gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine große Anzahl an Genen regulieren, die an vielen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehören, das Zellüberleben, Entzündungsreaktionen und Immunantworten (Lawrence 2009).

All diese Studien weisen eine Gemeinsamkeit auf. Sowohl die Eisenchelation als auch Deferasirox im speziellen weisen immer wieder antiproliferative und apoptotische Effekte bei malignen Zellen auf. Besonders bei AML und MDS lässt sich dies in zahlreichen Versuchen gut darstellen. Die Untersuchungen der verschiedenen Studien befassen sich jeweils mit unterschiedlichen Angriffspunkten. Dabei wird klar, dass der molekulare Wirkmechanismus von Deferasirox und anderen Eisenchelatoren sehr komplex ist. Man kann nicht nur von einem Angriffspunkt oder Signalweg ausgehen, der durch diese Substanzen beeinflusst wird.

Festgestellt werden konnte, dass sich sowohl eine generelle Eisenchelation positiv auf die Behandlung von malignen Erkrankungen auswirken kann, als auch dass eine off target Wirkung bei manchen Substanzen vorliegt, deren Wirkungsmechanismus weiterhin untersucht werden muss. Ebenfalls von Bedeutung für die zukünftige Tumorthherapie wird sein, herauszufinden inwiefern Deferasirox und andere Eisenchelatoren in Kombination mit bestehenden Chemotherapeutika oder weiteren Substanzen wirken und ob dabei synergistische oder antagonistische Effekte erzielt werden.

## 5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der mTOR Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und des Zellwachstums einnimmt. Des Weiteren stellte sich heraus, dass dieser Signalweg durch den Eisenchelator Deferasirox in myeloischen Leukämiezellen unterdrückt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Deferasirox im Vergleich zu zwei weiteren Eisenchelatoren einen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt auf myeloische Leukämiezellen ausübt. Weiterhin wurde untersucht, ob der mTOR Signalweg einen möglichen Angriffspunkt für die antiproliferative und apoptotische Wirkung von Deferasirox darstellt. Hier zeigt sich jedoch, dass neben Deferasirox auch die Eisenchelatoren Deferipron und Deferoxamin zu einer gesteigerten Expression von REDD1 und damit zu einer Unterdrückung des mTOR Signalwegs führen.

Zum Nachweis dieser Tatsache wurden drei Zelllinien K562, U937 und HL60 sowie vier Patientenproben mit den drei Eisenchelatoren Deferoxamin, Deferipron und Deferasirox behandelt. Die primären Leukämiezellen entstammen Patienten, die unter einer Akuten Myeloischen Leukämie leiden. Die veränderte Viabilität wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen. Mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay wurde die Apoptose festgestellt. Bei diesen Messungen zeigte sich, dass ausschließlich Deferasirox eine apoptotische und antiproliferative Wirkung aufweist.

Da der mTOR Signalweg einen möglichen Angriffspunkt für Deferasirox darstellt, wurden neun an diesem Signalweg beteiligten Gene untersucht: PDK1, mTOR, RAPTOR, GβL, RICTOR, REDD1, p70S6, EIF4B und 4E-BP1. Untersucht wurden wieder die drei Zelllinien K562, U937 und HL60 sowie vier Patientenproben. Auch hier wurden alle Zellen mit den drei Eisenchelatoren Deferasirox, Deferipron und Deferoxamin behandelt. Mit Hilfe der real-time quantitativen PCR konnte eine quantitative Veränderung der Expression

gemessen werden. Für alle drei Eisenchelatoren stellte sich heraus, dass es zu einer gesteigerten REDD1 Expression kommt. Dies wiederum bedingt eine Unterdrückung des mTOR Signalwegs. Dementsprechend kann der Signalweg auf Expressionsebene generell durch eine Eisenchelation gehemmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine substratspezifische Wirkung von Deferasirox auf die Apoptose und die Proliferation, aber nicht auf die Beeinflussung des mTOR-Signalwegs vorliegt. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieses möglichen off-target-Effektes sind wahrscheinlich multifaktoriell und sollten Anlass zu weiterführenden Untersuchungen geben.

## 6 Anhang

### 6.1 Zusammenstellung der Daten

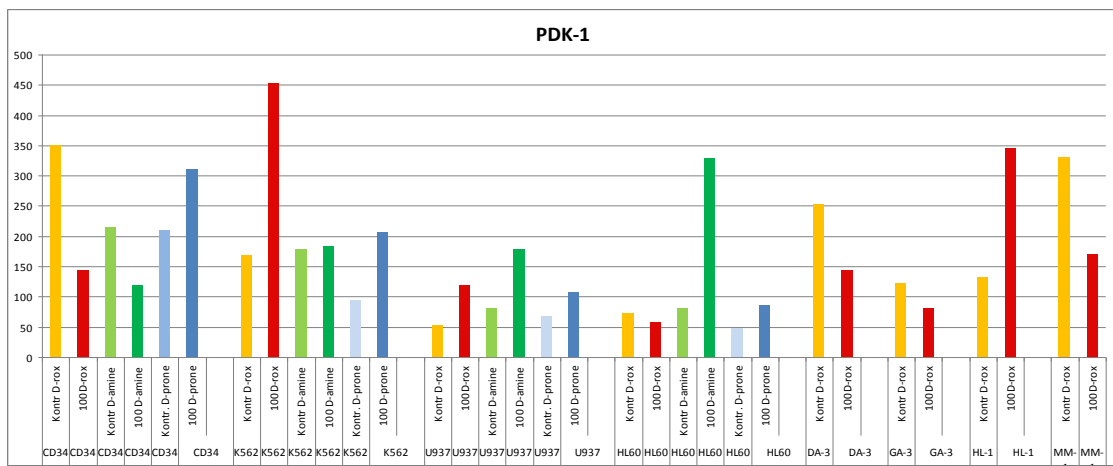


Abb. 31 Veränderung der Expression von PDK1 unter Eisenchelation

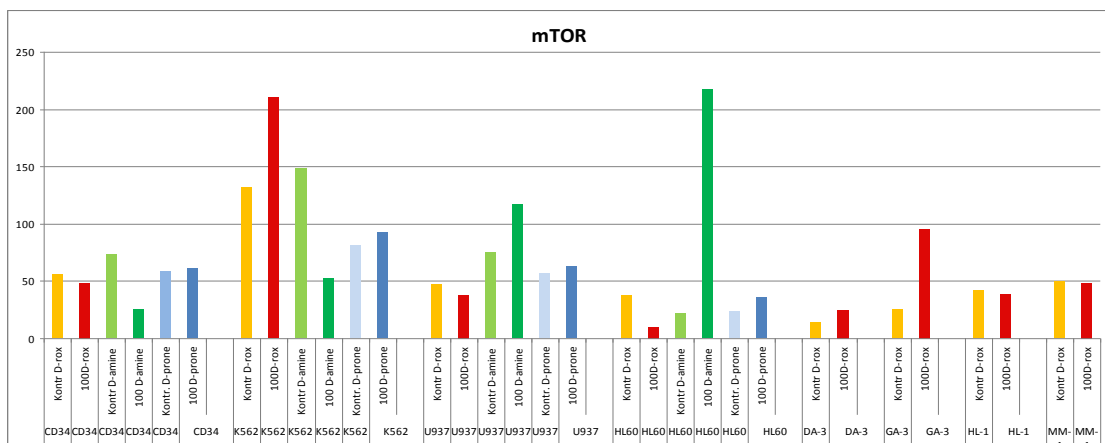


Abb. 32 Veränderung der Expression von mTOR unter Eisenchelation

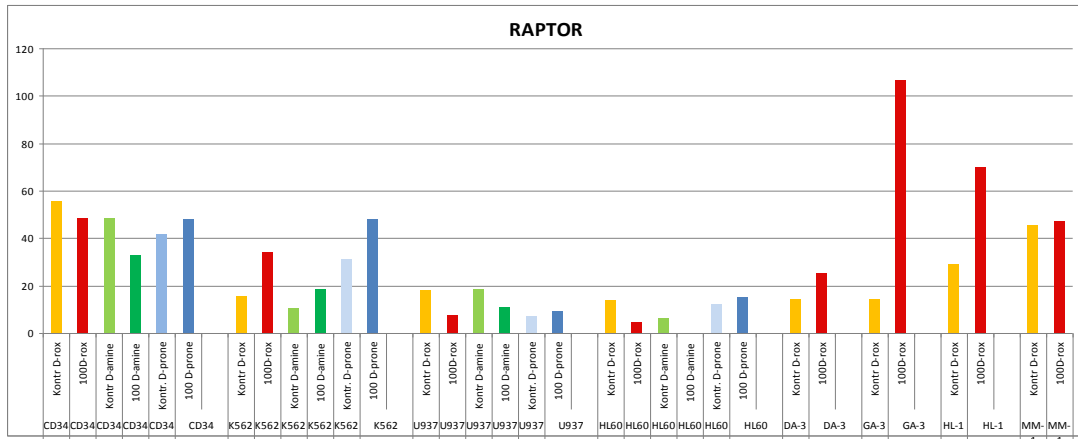


Abb. 33 Veränderung der Expression von RAPTOR unter Eisenchelation

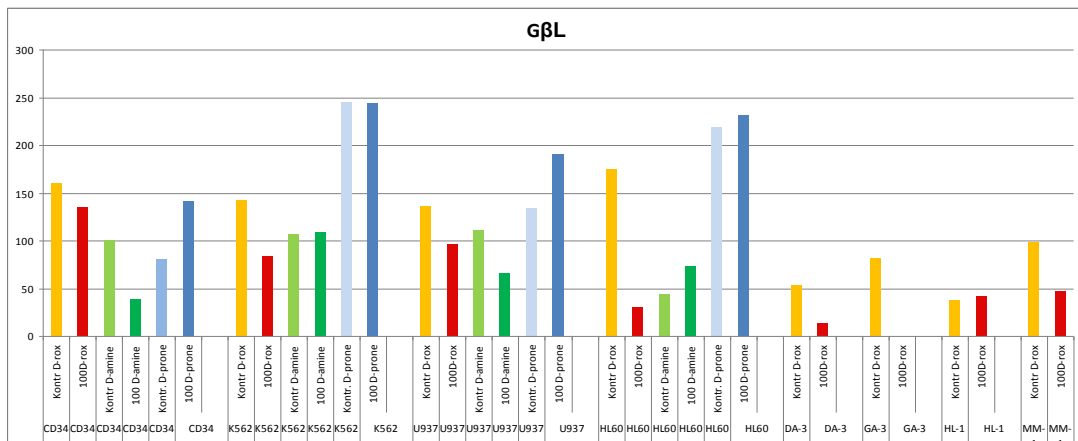


Abb. 34 Veränderung der Expression von GßL

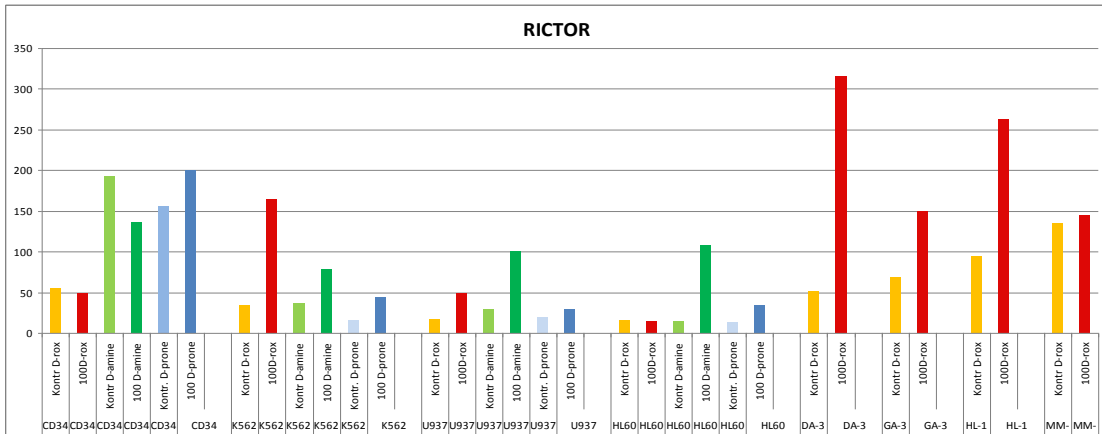


Abb. 35 Veränderung der Expression von RICTOR

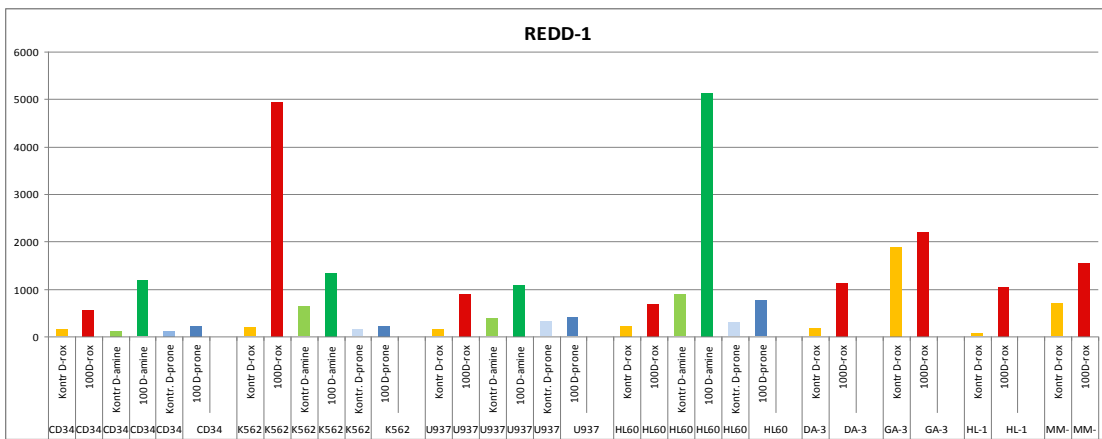


Abb. 36 Veränderung der Expression von REDD-1



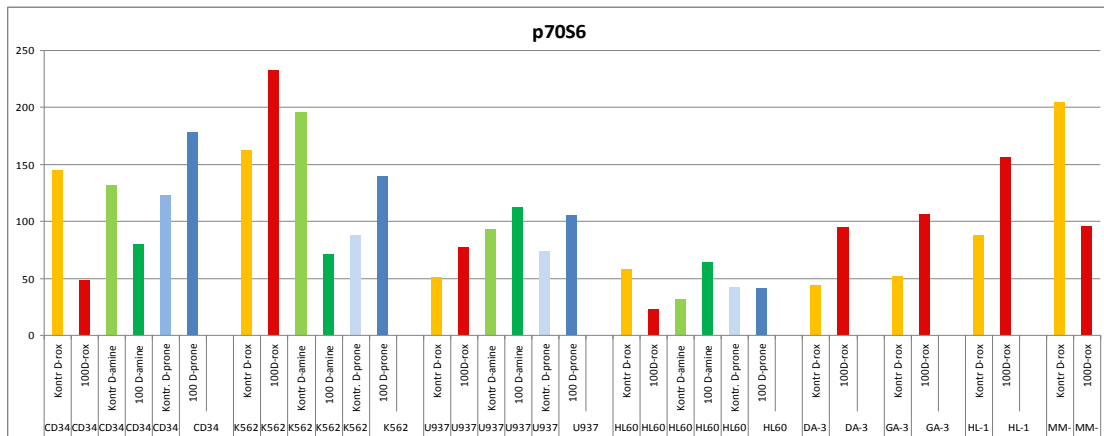


Abb. 37 Veränderung der Expression von p70S6

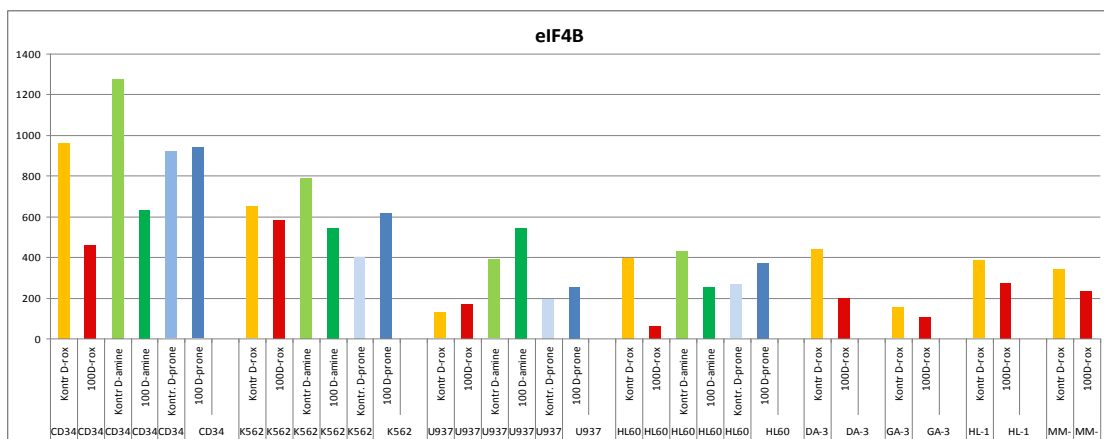
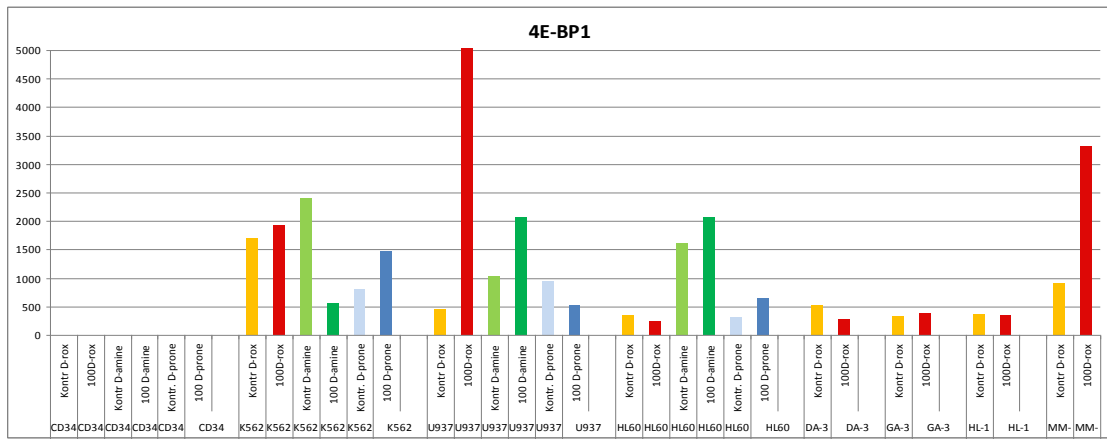


Abb. 38 Veränderung der Expression von eIF4B



**Abb. 39** Veränderung der Expression von 4E-BP1

## 7 Literaturverzeichnis

- Akashi, K.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. In: *Nature* 404 (6774), S. 193–197. DOI: 10.1038/35004599.
- Am Merlot; Kalinowski, D. S.; Richardson (2013): Novel chelators for cancer treatment: where are we now? In: *Antioxidants & redox signaling* 18 (8), S. 973–1006. DOI: 10.1089/ars.2012.4540.
- Andrews, N. C. (2008): Forging a field: the golden age of iron biology. In: *Blood* 112 (2), S. 219–230. DOI: 10.1182/blood-2007-12-077388.
- Austin, H.; Delzell, E.; Cole, P. (1988): Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. In: *American journal of epidemiology* 127 (3), S. 419–439.
- Bakst, Richard L.; Tallman, Martin S.; Douer, Dan; Yahalom, Joachim (2011): How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. In: *Blood* 118 (14), S. 3785–3793. DOI: 10.1182/blood-2011-04-347229.
- Blatt, J. (1994): Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. In: *Anticancer research* 14 (5B), S. 2109–2112.
- Blatt, J.; Stitely, S. (1987): Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. In: *Cancer research* 47 (7), S. 1749–1750.
- Blatt, J.; Taylor, S. R.; Stitely, S. (1988): Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine in vitro. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 112 (4), S. 433–436.
- Buss, J. L.; Greene, B. T.; Turner, J.; Torti, F. M.; Torti, S. V. (2004): Iron chelators in cancer chemotherapy. In: *Current topics in medicinal chemistry* 4 (15), S. 1623–1635.
- Cantley, L. C.; Neel, B. G. (1999): New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4240–4245.
- Cappellini, M. D.; Taher, A. (2009): Deferasirox (Exjade) for the treatment of iron overload. In: *Acta haematologica* 122 (2-3), S. 165–173. DOI: 10.1159/000243801.
- Cappellini, Maria Domenica; Cohen, Alan; Piga, Antonio; Bejaoui, Mohamed; Perrotta, Silverio; Agaoglu, Leyla et al. (2006): A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. In: *Blood* 107 (9), S. 3455–3462. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3430.
- Ceci, Adriana; Felisi, Mariagrazia; Sanctis, Vincenzo de; Mattia, Domenico de (2003): Pharmacotherapy of iron overload in thalassaemic patients. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* 4 (10), S. 1763–1774. DOI: 10.1517/14656566.4.10.1763.

- Chalhoub, Nader; Baker, Suzanne J. (2009): PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. In: *Annual review of pathology* 4, S. 127–150. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.
- Chantrel-Groussard, Karine; Gaboriau, Francois; Padeloup, Nicole; Havouis, Rene; Nick, Hanspeter; Pierre, Jean-Louis et al. (2006): The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. In: *European journal of pharmacology* 541 (3), S. 129–137. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.05.001.
- Cheng, George Z.; Park, Sungman; Shu, Shaokun; He, Lili; Kong, William; Zhang, Weizhou et al. (2008): Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. In: *Current cancer drug targets* 8 (1), S. 2–6.
- Dayani, Pouya N.; Bishop, Maria C.; Black, Keith; Zeltzer, Paul M. (2004): Desferoxamine (DFO)--mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. In: *Journal of neuro-oncology* 67 (3), S. 367–377.
- Domenico, I. de; McVey, Ward D.; Kaplan, J. (2008): Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (1), S. 72–81. DOI: 10.1038/nrm2295.
- Donfrancesco, A.; Bernardi, B. de; Carli, M.; Mancini, A.; Nigro, M.; Sio, L. de et al. (1995): Deferoxamine followed by cyclophosphamide, etoposide, carboplatin, thiotepa, induction regimen in advanced neuroblastoma: preliminary results. Italian Neuroblastoma Cooperative Group. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 31A (4), S. 612–615.
- Donfrancesco, A.; Deb, G.; Dominici, C.; Pileggi, D.; Castello, M. A.; Helson, L. (1990): Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. In: *Cancer research* 50 (16), S. 4929–4930.
- Engelman, Jeffrey A. (2009): Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (8), S. 550–562. DOI: 10.1038/nrc2664.
- Estrov, Z.; Tawa, A.; Wang, X. H.; Dube, I. D.; Sulh, H.; Cohen, A. et al. (1987): In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. In: *Blood* 69 (3), S. 757–761.
- Fadok, V. A.; Cathelineau, A. de; Daleke, D. L.; Henson, P. M.; Bratton, D. L. (2001): Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (2), S. 1071–1077. DOI: 10.1074/jbc.M003649200.
- Fleming, M. D.; Romano, M. A.; Su, M. A.; Garrick, L. M.; Garrick, M. D.; Andrews, N. C. (1998): Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3), S. 1148–1153.
- Franke, T. F. (2008): PI3K/Akt: getting it right matters. In: *Oncogene* 27 (50), S. 6473–6488. DOI: 10.1038/onc.2008.313.
- Fukushima, Toshihiro; Kawabata, Hiroshi; Nakamura, Takuji; Iwao, Haruka; Nakajima, Akio; Miki, Miyuki et al. (2011): Iron chelation therapy with deferasirox induced

complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. In: *Anticancer research* 31 (5), S. 1741–1744.

Greenberg, P.; Cox, C.; LeBeau, M. M.; Fenaux, P.; Morel, P.; Sanz, G. et al. (1997): International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. In: *Blood* 89 (6), S. 2079–2088.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hay, Nissim; Sonenberg, Nahum (2004): Upstream and downstream of mTOR. In: *Genes & development* 18 (16), S. 1926–1945. DOI: 10.1101/gad.1212704.

Horvitz, H. Robert (2003): Worms, life, and death (Nobel lecture). In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 4 (8), S. 697–711. DOI: 10.1002/cbic.200300614.

Huang, Jingxiang; Manning, Brendan D. (2009): A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. In: *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1), S. 217–222. DOI: 10.1042/BST0370217.

Inoki, Ken; Li, Yong; Zhu, Tianquan; Wu, Jun; Guan, Kun-Liang (2002): TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. In: *Nature cell biology* 4 (9), S. 648–657. DOI: 10.1038/ncb839.

Jacobs, A. (1977): Low molecular weight intracellular iron transport compounds. In: *Blood* 50 (3), S. 433–439.

Jiang, Xian P.; Elliott, Robert L.; Head, Jonathan F. (2010): Manipulation of iron transporter genes results in the suppression of human and mouse mammary adenocarcinomas. In: *Anticancer research* 30 (3), S. 759–765.

Kakhlon, O.; Cabantchik, Z. I. (2002): The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). In: *Free radical biology & medicine* 33 (8), S. 1037–1046.

Kalinowski, D. S.; Richardson (2005): The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 547–583. DOI: 10.1124/pr.57.4.2.

Kerr, J. F.; Winterford, C. M.; Harmon, B. V. (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. In: *Cancer* 73 (8), S. 2013–2026.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British journal of cancer* 26 (4), S. 239–257.

Kontoghiorghes, G. J. (1995): Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. In: *Toxicology letters* 80 (1-3), S. 1–18.

Kontoghiorghes, G. J.; Piga, A.; Hoffbrand, A. V. (1986): Cytotoxic and DNA-inhibitory effects of iron chelators on human leukaemic cell lines. In: *Hematological oncology* 4 (3), S. 195–204.

- Kroemer, G.; Petit, P.; Zamzami, N.; Vayssiere, J. L.; Mignotte, B. (1995): The biochemistry of programmed cell death. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (13), S. 1277–1287.
- Lane, D. J.; Bae, D. H.; Am Merlot; Sahni, S.; Richardson (2015): Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. In: *Nutrients* 7 (4), S. 2274–2296. DOI: 10.3390/nu7042274.
- Lescoat, G.; Chantrel-Groussard, K.; Padeloup, N.; Nick, H.; Brissot, P.; Gaboriau, F. (2007): Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. In: *Cell proliferation* 40 (5), S. 755–767. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2007.00468.x.
- Li, J.; Yen, C.; Liaw, D.; Podsypanina, K.; Bose, S.; Wang, S. I. et al. (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5308), S. 1943–1947.
- List, Alan F.; Baer, Maria R.; Steensma, David P.; Raza, Azra; Esposito, Jason; Martinez-Lopez, Noelia et al. (2012): Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (17), S. 2134–2139. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.1222.
- Little, J. B. (1993): Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 7 (2), S. 337–352.
- Lui, Goldie Y. L.; Kovacevic, Zaklina; Richardson, Vera; Merlot, Angelica M.; Kalinowski, Danuta S.; Des Richardson, R. (2015): Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. In: *Oncotarget* 6 (22), S. 18748–18779. DOI: 10.18632/oncotarget.4349.
- Lui, Goldie Y. L.; Obeidy, Peyman; Ford, Samuel J.; Tselepis, Chris; Sharp, Danae M.; Jansson, Patric J. et al. (2013): The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. In: *Molecular pharmacology* 83 (1), S. 179–190. DOI: 10.1124/mol.112.081893.
- Manning, Brendan D.; Cantley, Lewis C. (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. In: *Cell* 129 (7), S. 1261–1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Manning, Brendan D.; Tee, Andrew R.; Logsdon, M. Nicole; Blenis, John; Cantley, Lewis C. (2002): Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. In: *Molecular cell* 10 (1), S. 151–162.
- Martini, Miriam; Santis, Maria Chiara de; Braccini, Laura; Gulluni, Federico; Hirsch, Emilio (2014): PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. In: *Annals of medicine* 46 (6), S. 372–383. DOI: 10.3109/07853890.2014.912836.
- Ohgami, R. S.; Campagna; Greer, E. L.; Antiochos, B.; McDonald, A.; Chen, J. et al. (2005): Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. In: *Nature genetics* 37 (11), S. 1264–1269. DOI: 10.1038/ng1658.

- Ohyashiki, Junko H.; Kobayashi, Chiaki; Hamamura, Ryoko; Okabe, Seiichi; Tauchi, Tetsuzo; Ohyashiki, Kazuma (2009): The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. In: *Cancer science* 100 (5), S. 970–977. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01131.x.
- Piga, Antonio; Galanello, Renzo; Forni, Gian Luca; Cappellini, Maria Domenica; Origa, Raffaella; Zappu, Antonietta et al. (2006): Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. In: *Haematologica* 91 (7), S. 873–880.
- Pinnix, Zandra K.; Miller, Lance D.; Wang, Wei; D'Agostino, Ralph, JR; Kute, Tim; Willingham, Mark C. et al. (2010): Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. In: *Science translational medicine* 2 (43), S. 43ra56. DOI: 10.1126/scisignal.3001127.
- Ponka, P.; Beaumont, C.; Richardson (1998): Function and regulation of transferrin and ferritin. In: *Seminars in hematology* 35 (1), S. 35–54.
- Prutki, Maja; Poljak-Blazi, Marija; Jakopovic, Marko; Tomas, Davor; Stipancic, Igor; Zarkovic, Neven (2006): Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. In: *Cancer letters* 238 (2), S. 188–196. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.07.001.
- Rathmell, Jeffrey C.; Thompson, Craig B. (2002): Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. In: *Cell* 109 Suppl, S. S97-107.
- Rhodes, Daniel R.; Kalyana-Sundaram, Shanker; Mahavisno, Vasudeva; Varambally, Radhika; Yu, Jianjun; Briggs, Benjamin B. et al. (2007): Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 9 (2), S. 166–180.
- Richardson; Ponka, P. (1997): The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1331 (1), S. 1–40.
- Richardson; Ponka, P.; Vyoral, D. (1996): Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism. In: *Blood* 87 (8), S. 3477–3488.
- Richardson, D.; Ponka, P.; Baker, E. (1994): The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. In: *Cancer research* 54 (3), S. 685–689.
- Schwarzer, Rolf; Tondera, Daniel; Arnold, Wolfgang; Giese, Klaus; Klippel, Anke; Kaufmann, Jorg (2005): REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. In: *Oncogene* 24 (7), S. 1138–1149. DOI: 10.1038/sj.onc.1208236.
- Selig, R. A.; White, L.; Gramacho, C.; Sterling-Levis, K.; Fraser, I. W.; Naidoo, D. (1998): Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. In: *Cancer research* 58 (3), S. 473–478.

- Shihadeh, Ferial; Reed, Valerie; Faderl, Stefan; Medeiros, L. Jeffrey; Mazloom, Ali; Hadziahmetovic, Mersiha et al. (2012): Cytogenetic profile of patients with acute myeloid leukemia and central nervous system disease. In: *Cancer* 118 (1), S. 112–117. DOI: 10.1002/cncr.26253.
- Soyer, H. P.; Smolle, J.; Torne, R.; Kerl, H. (1987): Transferrin receptor expression in normal skin and in various cutaneous tumors. In: *Journal of cutaneous pathology* 14 (1), S. 1–5.
- Sugerman, A. A.; Mueller, P. S.; Swartzburg, M.; Rochford, J. (1975): Abbott-38579 (synthetic TRH) in the treatment of depression: a controlled study of oral administration. In: *Psychopharmacology bulletin* 11 (1), S. 30.
- Taetle, R.; Castagnola, J.; Mendelsohn, J. (1986): Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. In: *Cancer research* 46 (4 Pt 1), S. 1759–1763.
- Torti, Suzy V.; Torti, Frank M. (2013): Iron and cancer: more ore to be mined. In: *Nature reviews. Cancer* 13 (5), S. 342–355. DOI: 10.1038/nrc3495.
- Vaughn, C. B.; Weinstein, R.; Bond, B.; Rice, R.; Vaughn, R. W.; McKendrick, A. et al. (1987): Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue. In: *Cancer investigation* 5 (1), S. 7–10.
- Vazana-Barad, Liat; Granot, Galit; Mor-Tzuntz, Rahav; Levi, Itai; Dreyling, Martin; Nathan, Ilana; Shpilberg, Ofer (2013): Mechanism of the antitumoral activity of deferasirox, an iron chelation agent, on mantle cell lymphoma. In: *Leukemia & lymphoma* 54 (4), S. 851–859. DOI: 10.3109/10428194.2012.734614.
- Walker, N. I.; Harmon, B. V.; Gobe, G. C.; Kerr, J. F. (1988): Patterns of cell death. In: *Methods and achievements in experimental pathology* 13, S. 18–54.
- Walker, R. A.; Day, S. J. (1986): Transferrin receptor expression in non-malignant and malignant human breast tissue. In: *The Journal of pathology* 148 (3), S. 217–224. DOI: 10.1002/path.1711480305.
- Wang, Xiaochen; Wu, Yi-Chun; Fadok, Valerie A.; Lee, Ming-Chia; Gengyo-Ando, Keiko; Cheng, Li-Chun et al. (2003): Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5650), S. 1563–1566. DOI: 10.1126/science.1087641.
- Wu, K. J.; Polack, A.; Dalla-Favera, R. (1999): Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. In: *Science (New York, N.Y.)* 283 (5402), S. 676–679.
- Yashiro-Ohtani, Yumi; Wang, Hongfang; Zang, Chongzhi; Arnett, Kelly L.; Bailis, Will; Ho, Yugong et al. (2014): Long-range enhancer activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (46), S. E4946–53. DOI: 10.1073/pnas.1407079111.
- Zhang, A. S.; Enns, C. A. (2009): Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (2), S. 711–715. DOI: 10.1074/jbc.R800017200.



## Literaturverzeichnis Diskussion

Breccia, Massimo; Loglisci, Giuseppina; Salaroli, Adriano; Cannella, Laura; Santopietro, Michelina; Alimena, Giuliana (2010): Deferasirox treatment interruption in a transfusion-requiring myelodysplastic patient led to loss of erythroid response. In: *Acta haematologica* 124 (1), S. 46–48. DOI: 10.1159/000314961.

Burnett, Alan; Wetzler, Meir; Löwenberg, Bob (2011): Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (5), S. 487–494. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.1820

Chen, Delin; Li, Muyang; Luo, Jianyuan; Gu, Wei (2003a): Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13595–13598. DOI: 10.1074/jbc.C200694200.

Chen, Kai; Albano, Adam; Ho, Alan; Keaney, John F. (2003b): Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (41), S. 39527–39533. DOI: 10.1074/jbc.M304423200.

Donfrancesco, A.; Deb, G.; Dominici, C.; Pileggi, D.; Castello, M. A.; Helson, L. (1990): Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. In: *Cancer research* 50 (16), S. 4929–4930.

Estey, Elihu (2009): AML in older patients. Are we making progress? In: *Best practice & research. Clinical haematology* 22 (4), S. 529–536. DOI: 10.1016/j.beha.2009.08.007.

Fröhling, Stefan; Schlenk, Richard F.; Kayser, Sabine; Morhardt, Martina; Benner, Axel; Döhner, Konstanze; Döhner, Hartmut (2006): Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years. Results from AMLSG trial AML HD98-B. In: *Blood* 108 (10), S. 3280–3288. DOI: 10.1182/blood-2006-04-014324.

Fukuchi, K.; Tomoyasu, S.; Watanabe, H.; Kaetsu, S.; Tsuruoka, N.; Gomi, K. (1995): Iron deprivation results in an increase in p53 expression. In: *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 376 (10), S. 627–630.

Gräslund, A.; Ehrenberg, A.; Thelander, L. (1982): Characterization of the free radical of mammalian ribonucleotide reductase. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (10), S. 5711–5715.

Green, D. A.; Antholine, W. E.; Wong, S. J.; Richardson, D. R.; Chitambar, C. R. (2001): Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7 (11), S. 3574–3579.

Kantarjian, Hagop M.; Thomas, Xavier G.; Dmoszynska, Anna; Wierzbowska, Agnieszka; Mazur, Grzegorz; Mayer, Jiri et al. (2012): Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (21), S. 2670–2677. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.9429.

- Lawrence, Toby (2009): The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (6), a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.
- Liang, S. X.; Richardson, D. R. (2003): The effect of potent iron chelators on the regulation of p53. Examination of the expression, localization and DNA-binding activity of p53 and the transactivation of WAF1. In: *Carcinogenesis* 24 (10), S. 1601–1614. DOI: 10.1093/carcin/bgg116.
- Lichtman, S. M.; Attivissimo, L.; Goldman, I. S.; Schuster, M. W.; Buchbinder, A. (1999): Secondary hemochromatosis as a long-term complication of the treatment of hematologic malignancies. In: *American journal of hematology* 61 (4), S. 262–264.
- Malcovati, Luca; Della Porta, Matteo Giovanni; Pascutto, Cristiana; Invernizzi, Rosangela; Boni, Marina; Travaglino, Erica et al. (2005): Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria. A basis for clinical decision making. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (30), S. 7594–7603. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.7038.
- Saletta, Federica; Suryo Rahmanto, Yohan; Nulsri, Egarit; Des Richardson, R. (2010): Iron chelator-mediated alterations in gene expression. Identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53. In: *Molecular pharmacology* 77 (3), S. 443–458. DOI: 10.1124/mol.109.061028.
- Messa, E.; Cilloni, D.; Messa, F.; Arruga, F.; Roetto, A.; Saglio, G. (2008): Deferasirox treatment improved the hemoglobin level and decreased transfusion requirements in four patients with the myelodysplastic syndrome and primary myelofibrosis. In: *Acta haematologica* 120 (2), S. 70–74. DOI: 10.1159/000158631.
- Meunier, Mathieu; Ancelet, Sarah; Lefebvre, Christine; Arnaud, Josiane; Garrel, Catherine; Pezet, Mylène et al. (2017): Reactive oxygen species levels control NF-κB activation by low dose deferasirox in erythroid progenitors of low risk myelodysplastic syndromes. In: *Oncotarget* 8 (62), S. 105510–105524. DOI: 10.18632/oncotarget.22299.
- Paubelle, Etienne; Zylbersztejn, Florence; Alkhaeir, Sawsaneh; Suarez, Felipe; Callens, Céline; Dussiot, Michaël et al. (2013): Deferasirox and vitamin D improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. In: *PloS one* 8 (6), e65998. DOI: 10.1371/journal.pone.0065998.
- Rose, Christian; Brechignac, Sabine; Vassilief, Dominique; Pascal, Laurent; Stamatoullas, Aspasia; Guerci, Agnes et al. (2010): Does iron chelation therapy improve survival in regularly transfused lower risk MDS patients? A multicenter study by the GFM (Groupe Francophone des Myélodysplasies). In: *Leukemia research* 34 (7), S. 864–870. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.12.004.
- Shang, Hanqiao; Li, Qing; Feng, Guohui; Cui, Zongbin (2011): Molecular analysis and functions of p53R2 in zebrafish. In: *Gene* 475 (1), S. 30–38. DOI: 10.1016/j.gene.2010.12.008.
- Wei, Pin-pin; Tomter, Ane B.; Røhr, Asmund K.; Andersson, K. Kristoffer; Solomon, Edward I. (2006): Circular dichroism and magnetic circular dichroism studies of the active site of p53R2 from human and mouse. Iron binding and nature of the biferrous site relative to other ribonucleotide reductases. In: *Biochemistry* 45 (47), S. 14043–14051. DOI: 10.1021/b

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Georg Kopp, für die Möglichkeit diese Dissertation anzufertigen und für die vielen Hilfestellungen und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Elke Malenke bedanken, ohne ihre wertvollen Hinweise und Anregungen sowie konstruktiven Kritiken wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Vom Erklären labortechnischer Methoden über tolle Gespräche beim Mittagessen bis hin zum Korrekturlesen, warst du mir stets eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Salih für die Überlassung der Zelllinien: U937, HL60, und K562, sowie der Proben des AML-Patientenkollektivs bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Mann bedanken, die mir sowohl im Studium als auch während der Zeit des Schreibens dieser Dissertation immer mit Rat und Tat zur Seite standen.