



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

**Infantile neuroaxonale Dystrophie: Eisenmetabolismus in
Fibroblasten von Patienten mit PLA2G6-assoziiierter
Neurodegeneration**

verfasst von / submitted by

Jamana Husein

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Ao. Univ.-Prof. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar für die Möglichkeit bedanken, diese Diplomarbeit unter Ihrer Aufsicht verfassen zu dürfen.

Ihre Anleitung und wertvolle Unterstützung, sowie das Beantworten zahlreicher Fragen zu ihrem Fachgebiet haben wesentlich bei der Umsetzung dieser Arbeit geholfen.

Vor allem möchte ich mich für ihre Geduld, die aufbauenden Worte, die konstruktive Kritik und Verbesserungsvorschläge bedanken.

Bei Fragen und Unklarheiten konnte ich mich immer an sie wenden und sie hat sich genügend Zeit genommen mir zu helfen.

Von Herzen bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, Assma und Talib, die mich immer mit Stolz in allen Bereichen des Lebens unterstützen. Besonders dankbar bin ich für die Motivation, das Aufmuntern nach Misserfolgen, die langen Telefonate und die Zuversicht auch in schwierigen Zeiten. Ohne sie wäre meine Ausbildung nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Bruder, Ali bedanken, der mir vor allem im letzten Jahr immer helfend zur Seite stand und sich stets Zeit für kleine Kaffeepausen genommen hat und mich beim Lernen unterstützt hat.

Abstract

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) is a rare disease in a group of hereditary neurodegenerative diseases.

One form of NBIA is caused by a mutation in the PLA2G6-gene and can lead to infantile neuroaxonal dystrophy (INAD) in early childhood.

In this diploma thesis, fibroblasts of INAD patients and age- and sex-matched healthy volunteers were cultivated to analyze the labile iron pool and ferritin expression following the addition of various iron sources.

Hemin, iron sucrose and ferric ammonium citrate (FAC) were used as iron sources to investigate the pathological changes in the labile iron pool (LIP). The LIP was measured using the calcein-AM method. Ferritin-expression was carried out by means of a reverse phase protein assay as a function of increasing FAC-concentrations.

While the LIP increased with FAC only slowly and less strongly in the INAD-fibroblasts than in the fibroblasts of healthy volunteers, a strong increase in the LIP was observed with hemin in the most severely affected patient. Iron sucrose, a nanoparticle, showed no uniform influence on the LIP.

Ferritin-expression was increased in all cells by incubation with FAC, but FAC concentrations twice as high were necessary in INAD-cells to obtain the same ferritin-expression level.

This study shows that the mutation in PLA2G6 influences iron metabolism in fibroblasts. Although this type of cells is not directly affected by the disease, it is a good model to study the mechanism of the disease at the cellular level to identify possible therapeutic targets.

Zusammenfassung

Bei der Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn (NBIA; Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation) handelt es sich um eine Gruppe von seltenen erblich bedingten neurodegenerativen Erkrankungen.

Eine Form von NBIA wird durch eine Mutation im Gen PLA2G6 verursacht und kann in der frühkindlichen Ausprägung zu infantile neuroaxonale Dystrophie (INAD) führen.

In dieser Diplomarbeit wurden die Fibroblasten von INAD-Patienten und alters- und geschlechtsgepaarten gesunden Probanden kultiviert, um den labilen Eisenpool (LIP) und die Ferritin-Expression nach der Zugabe von Eisen in unterschiedlicher Darreichungsform zu analysieren.

Als Eisenquellen zur Untersuchung pathologischer Veränderung des LIPs wurden Hemin, Eisensaccharat und Eisen(III)ammoniumcitrat (FAC) verwendet. Die Messung des LIP erfolgte mittels der Calcein-AM-Methode. Die Ferritin-Expression wurde mittels Reverse Phase Protein Assay in Abhängigkeit steigender FAC-Konzentrationen durchgeführt.

Während der LIP mit FAC bei den INAD-Fibroblasten vorübergehend nur langsam und weniger stark anstieg als bei Fibroblasten von gesunden Probanden, konnte mit Hemin beim am stärksten betroffenen Patienten ein starker Anstieg im LIP beobachtet werden. Eisensaccharat, ein Nanopartikel zeigte bei der Inkubation der Zellen keine einheitliche Tendenz auf den labilen Eisenpool.

Die Ferritinexpression wurde in allen Zellen durch FAC erhöht, jedoch waren bei den INAD-Zellen etwa doppelt so hohe FAC-Konzentrationen nötig, um die gleichen Ferritinwerte zu erhalten.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Mutation in PLA2G6 einen Einfluss auf den Eisenmetabolismus in Fibroblasten hat. Dieser Zelltyp ist zwar nicht direkt von der Erkrankung betroffen, stellt allerdings ein gutes Modell dar, um den Mechanismus der Erkrankung auf zellulärer Ebene zu studieren und mögliche therapeutische Targets zu identifizieren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literaturübersicht	10
2.1	<i>Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn</i>	<i>10</i>
2.2	<i>Infantile neuroaxonale Dystrophie</i>	<i>11</i>
2.3	<i>Pathophysiologie und Therapieansätze</i>	<i>11</i>
2.4	<i>Physiologie von Eisen</i>	<i>12</i>
2.5	<i>Zelluläre Eisenhomöostase</i>	<i>14</i>
2.6	<i>Eisenchelatoren</i>	<i>14</i>
3	Materialien und Methoden	16
3.1	<i>Zellkultivierung</i>	<i>16</i>
3.1.1	<i>Zelllinien</i>	<i>17</i>
3.1.2	<i>Zellkulturmedium</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>Mediumwechsel</i>	<i>18</i>
3.1.4	<i>Subkultivierung</i>	<i>19</i>
3.1.5	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	<i>20</i>
3.2	<i>Gewinnung von Zelllysate aus kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden</i>	<i>20</i>
3.3	<i>Proteinbestimmung nach Bradford mittels 5x Roti-Quant Reagenz</i>	<i>22</i>
3.4	<i>Quantifizieren von Ferritin in kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden mittels Reverse Phase Protein Assay</i>	<i>24</i>
3.5	<i>LIP Messung in kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden</i>	<i>28</i>
3.6	<i>Statistische Auswertung</i>	<i>31</i>
4	Ergebnisse	32
4.1	<i>Einfluss der Inkubation von Hemin auf den labilen Eisenpool in Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden</i>	<i>33</i>
4.1.1	<i>Fibroblasten der Zelllinie 1 und 2</i>	<i>33</i>
4.1.2	<i>Fibroblasten der Zelllinie 3 und 4</i>	<i>35</i>
4.2	<i>Einfluss der Inkubation von Eisensaccharat (Venofer) auf den labilen Eisenpool in Fibroblasten von INAD-Patienten</i>	<i>37</i>
4.2.1	<i>Fibroblasten der Zelllinien 1 und 2</i>	<i>37</i>
4.2.2	<i>Fibroblasten der Zelllinien 3 und 4</i>	<i>39</i>
4.3	<i>Ferritinexpression der Zelllinien</i>	<i>41</i>
5	Schlussbetrachtung	43
6	Verzeichnisse	49
6.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>49</i>
6.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>50</i>
6.3	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>50</i>
6.4	<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>51</i>

1 Einleitung

In Nazi-Deutschland wurden im Rahmen der Rassenhygiene Menschen, die an physischen oder psychischen Beeinträchtigungen litten, in Konzentrationslager gebracht, um deren Diagnose zu verifizieren und anschließend durch Vergasung mit Kohlenstoffmonoxid zu töten. Dies gab Pathologen die Möglichkeit eine Reihe von Untersuchungen an Geweben von Euthanasieopfern durchzuführen (Shevell, 2003).

Im Jahre 1922 beschrieben die Ärzte Hallervorden und Spatz autosomal-rezessiv vererbte Krankheiten. Diese Kategorie von Erkrankungen wurde Hallervorden-Spatz-Syndrom genannt. (Hayflick et al., 2018).

Später wurde das Hallervorden-Spatz-Syndrom auf NBIA, Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn umbenannt. NBIA beschreibt als Überbegriff mehrerer Erkrankungen, die jedoch auf verschiedenen Genmutationen basieren.

Die häufigsten sind die Pantothenatkinase-assoziierte Neurodegeneration (PKAN) und die PLA2G6-assoziierte Neurodegeneration (PLAN).

Letztere umfasst eine Reihe von Erkrankungen, welche eine Mutation des Enzyms Phospholipase A₂ zeigt. Dazu gehört die infantile neuroaxonale Dystrophie (INAD) und die atypische neuroaxonale Dystrophie (NAD).

Für diese Arbeit wurden Fibroblasten zweier männlicher Patienten mit INAD, verwendet. Ebenso wurden die Fibroblasten zweier gesunden Probanden, die den Patienten vom Alter und Geschlecht her entsprechen als Kontrollen verwendet.

Es wurde der Ferritingehalt der Zellen mittels des Reverse Phase Protein Assay ermittelt.

Des Weiteren wurde der intrazelluläre zytosolische labile Eisenpool mit Hilfe der Calcein-AM-Methode fluorimetrisch untersucht.

Zwar sind die Fibroblasten nicht ein primär von der Erkrankung betroffenes Gewebe, stellen jedoch ein gutes Zellmodell dar, um die molekularen Mechanismen nachzuvollziehen, welche zur Neurodegeneration führen können.

2 Literaturübersicht

2.1 Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn

Die Neurodegeneration mit Eisenakkumulation im Gehirn (Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation, NBIA) umfasst eine Gruppe von erblich bedingten neurodegenerativen Erkrankungen. Die Eisenablagerung findet in den Basalganglien, im Globus Pallidus und der Substantia nigra statt. Die Prävalenz dieser Erkrankung wird auf 1:1 000 000 geschätzt (Gregory & Hayflick, 1993).

NBIA kann auf unterschiedlichen Gendefekten beruhen und zeigt sich dementsprechend in der Symptomatik.

NBIA	Form	Symptomatik
PKAN Pantothenatkinase-assoziierte Neurodegeneration	Klassische Form: früher Beginn, schnelle Progression	Gehstörungen, Sprechstörung, Retinitis pigmentosa
	Atypische Form: später Beginn, langsame Progression	Mildere Symptome
PLAN PLA2G6-assoziierte Neurodegeneration	INAD: infantile neuroaxonale Dystrophie: früher Beginn, schnelle Progression	Optikusatrophie, Muskelhypotonie, spastische Tetraparese, cerebelläre Atrophie, psychomotorische Regression
	NAD: atypische neuroaxonale Dystrophie: Später Beginn, langsame Progression	Dystonie, Dysarthrie, Optikusatrophie, Epilepsie, psychische Auffälligkeiten, psychomotorische Regression
MPAN Mitochondriale Membran-assoziierte Neurodegeneration	Im Kindes- / Jugendalter beginnend	Gangstörungen, progressive spastische Paraparese, Dystonie, Dysarthrie, kognitiver Abbau, Parkinsonismus
BPAN Beta-propeller-Protein assoziierte Neurodegeneration	Beginnt im Kindesalter	Psychomotorische Retardierung, schnelle Progression der Dystonie, Parkinsonismus

Tabelle 1: NBIA-Formen und deren klinische Symptomatik

2.2 Infantile neuroaxonale Dystrophie

Die infantile neuroaxonale Dystrophie ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte neurogenetische Erkrankung, die durch eine Mutation im PLA2G6-Gen ausgelöst wird, welches auf Chromosom 22q13.1 lokalisiert ist (Gregory & Hayflick, 1993). Eine Mutation dieses Gens wirkt sich auf das iPLA₂-Enzym aus, welches eine wichtige Rolle in der Zellmembransynthese durch die Regulierung der Phospholipide spielt.

Die klinische Vorstellung der Krankheit zeigt sich im Alter von 6 Monaten bis 3 Jahren und drückt sich durch allgemeine Entwicklungsrückbildungen und progressive spastische Tetraparese aus. Die Patienten können weitere Symptome präsentieren, wie Sehstörungen, kognitiver Rückgang und Verlust von Lautäußerung.

Die meisten betroffenen Kinder überleben nicht das 10. Lebensjahr (Atwal et al., 2020).

Mittels einer Anamnese und klinischen Untersuchungen, die MRT-Scans und molekulargenetische Diagnostik beinhalten, erfolgt die Diagnose INAD. Oft zeigen die MRT-Scans eine pathologische Eisenablagerung in den Basalganglien, sowie eine Kleinhirndegeneration. Eisenablagerungen in der Substantia nigra und im Globus Pallidus können ebenfalls sichtbar sein, sind allerdings in vielen Fällen nicht nachweisbar (Hayflick et al., 2018)

2.3 Pathophysiologie und Therapieansätze

Das PLA2G6 Gen codiert für das Enzym Phospholipase A2, welches für die mitochondriale Membranhomöostase wichtig ist. Inwiefern sich dieser Defekt auf die Erkrankung auswirkt, ist allerdings unbekannt (Hayflick et al., 2018).

Eine kausale Therapie gibt es zurzeit nicht. Patienten werden supportiv und symptomatisch behandelt.

Patienten werden je nach Krankheitsform und -verlauf mit der geeigneten medikamentösen Behandlung therapiert. Symptomatisch werden beispielweise Kontrakturen mittels Physiotherapie behandelt (Hayflick et al., 2018) (Atwal et al., 2020).

Ein möglicher Therapieansatz wären Enzyersatz, Genersatz oder eine Genkorrektur, da ein Enzymdefekt, welcher auf einen rezessiv vorliegenden Gendefekt beruht, durch einen Ersatz oder Supplementation des Enzyms korrigiert werden könnte. Dieses benötigt allerdings noch weitere Studien und Therapien, die das korrekte Gen oder Enzym vorweisen und eine signifikante Besserung zeigen. Da es sich bei INAD um eine Erkrankung handelt, die primär das Gehirn betrifft, würde ein Enzyersatz durch eine Infusion ins Gehirn erfolgen (Babin et al., 2018).

2.4 Physiologie von Eisen

Im Körper des Menschen sind 4 g Eisen enthalten. 2,5 g davon sind im Hämoglobin gebunden. 1 g kommen in der Leber vor. Dieses wird in Hepatozyten, in Makrophagen der Leber und der Milz in Form von Ferritin gespeichert. Myoglobin, Zytochrome und Eisenproteine beinhalten die Restmenge des Eisens (Ganz & Nemeth, 2012).

Weniger als 0,05% des Eisens verliert der Körper in Form von epithelialen Abschilfungen im Gastrointestinal Trakt und von der Haut, sowie durch die Menstruation bei Frauen.

Eine autonome Eisenaufnahme und -abgabe ist durch viele Zelltypen möglich. Dadurch können diese ihren Eisenhaushalt nach Bedarf regulieren (Ganz, 2007).

Der Eisenstoffwechsel (Aufnahme, Recycling, Speicherung und Freisetzung) wird durch drei Systeme beeinflusst.

- Systemischer Eisenspeicher
- Eisenbedarf für die Erythropoese
- Pathologische Effekte von Entzündungen

All diese Systeme steuern Hepcidin, ein Eisen-regulierendes Hormon, welches ein Schlüsselbestandteil der Eisen-Homöostase ist (Ganz, 2007).

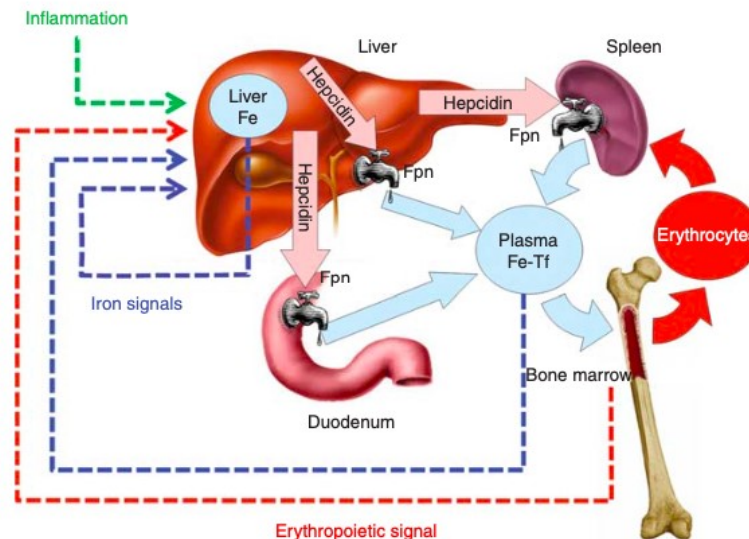


Abbildung 1: Eisenhomöostase (Ganz & Nemeth, 2012)

Bei Hepcidin handelt es sich um ein aus 25 Aminosäuren bestehendes, zirkulierendes Peptidhormon, welches auch als Hepcidin-25 bezeichnet wird. Es wird vor allem in den Hepatozyten (Leber) als Prä-Hepcidin (84 Aminosäuren) produziert, bis es über mehrere Vorstufen zum aktiven Hepcidin umgewandelt wird (De Domenico et al., 2008).

Auf Ebene der Transkription wird Hepcidin vor allem durch die Eisen- und Sauerstoffmenge im Organismus reguliert (Haase, 2013).

So sorgt eine Eisenüberladung bzw. -aufnahme, sowie Entzündungsprozesse für eine erhöhte Hepcidinproduktion. Die Produktion von Hepcidin wird vermindert durch Anämie und Hypoxie (Peyssonnaud et al., 2007).

Das Hepcidin ist ein Kernstück der Homöostase und Eisenresorption, wodurch es auch einen Einfluss auf den Eisengehalt im Plasma hat (De Domenico et al., 2008; Ganz & Nemeth, 2012; Peyssonnaud et al., 2007).

2.5 Zelluläre Eisenhomöostase

Der zelluläre Eisenstoffwechsel garantiert eine ausreichende und dennoch nicht übermäßige Versorgung der Zellen mit Eisen. Je nach individuellem Bedarf der Zellen wird Eisen unter anderem für die Synthese eisenhaltiger Proteine aufgenommen.

Dieses System wird posttranskriptional durch die Zusammenarbeit des Iron Responsive Element (IRE), welches auf der mRNA liegt und der Iron Regulatory Proteins (IRP 1&2) reguliert. Die IRPs messen die Eisenkonzentration im Zytosol und binden anschließend mit hoher Affinität an das IRE der mRNA.

Liegt nun ein Eisenmangel vor, bindet das IRP an das IRE am 5'-Ende der mRNA und sorgt für eine Hemmung der Translation von Ferritin. Somit wird Eisen nicht vermehrt in Ferritin gespeichert und das zytosolische Eisen bleibt erhalten.

Binden die IRP an die IRE's am 3'-Ende der mRNA des Transferrin-Rezeptors (TfR) oder an die mRNA des divalenten Metallionentransporters 1 (DMT-1), so führt dies zum Schutz jener mRNAs vor Degradation. Dieser Prozess kurbelt die Eisenaufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose in der Zelle an. Gleichzeitig kommt es zur intrazellulären Freisetzung des Eisens. Besteht ein hoher Eisenspiegel, so können die IRPs nicht mehr an IRE binden und es wird vermehrt Ferritin gebildet, welches in Folge Eisen vermehrt aus dem Zytosol aufnimmt und speichert. Die Blockade der IRE-Bindungsstellen auf der mRNA wird durch 4Fe-4S-Cluster erreicht. Außerdem kommt es zum Abbau der TfR- und DMT-1-mRNA (Ganz & Nemeth, 2012; Hentze & Kuhn, 1996).

2.6 Eisenchelatoren

Eisenchelatoren sind Arzneimittel, die bei Eisenüberladungen eingesetzt werden.

Die Eisenüberladungen können sowohl durch Eisenspeichererkrankungen als auch durch eine akute Eisenintoxikation ausgelöst werden.

Eisen, das im Körper in freier Form vorliegt, wird komplexiert und somit die Ausscheidung ermöglicht. Im Komplex bildet Eisen das Zentralion und trägt die Koordinationszahl 6. Dieses bedeutet, dass Eisen 6 einzähnige Liganden binden kann. Chelat-Liganden sind allerdings mehrzähnig.

Durch die Ausscheidung des Eisens über den Urin oder Stuhl wird eine gesenkte Eisenkonzentration im Serum ermöglicht, wodurch das Gleichgewicht der Eisenhomöostase intakt gehalten wird (Tam et al., 2003).

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurden humane Fibroblasten als Zellkultur verwendet, die *in vivo* aus einem Gewebeverband isoliert wurden und anschließend *in vitro* in einem geeigneten Nährmedium weiter kultiviert wurden.

Bei Fibroblasten handelt es sich um adhärente Zellen des Bindegewebes. Sie haben einen ovalen, flachen Kern und lange zytoplasmatische Zellfortsätze, welche mit anderen Zellfortsätzen in Kontakt treten können und somit tight-junctions ausbilden.

Im Rahmen der Arbeit mit Zellkulturen ist besonders auf die sterile Umgebung zu achten. Daher wurde eine sterile Werkbank – Laminar Air Flow (LAF) verwendet, um sicher zu stellen, dass die Arbeit in einem sterilen Bereich stattfindet.

Dies ist wichtig, da es einfach zur Kontamination durch Mikroorganismen wie zum Beispiel Pilzen, Bakterien und Viren kommen kann.

Alle Gegenstände, die in dem sterilen Bereich verwendet wurden, die Arbeitsoberfläche sowie die Handschuhe wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Mit Watte gestopfte Messpipetten und Pasteurpipetten (beide aus Glas) wurden bei einer Temperatur von 160°C für mindestens 10 Stunden mittels trockener Hitze sterilisiert.

Pipettenspitzen (Kunststoff) wurden mittels feuchter Hitze im Autoklaven bei einer Temperatur von 140°C und einem Druck von 2 bar für mindestens 60 Minuten autoklaviert.

Um das Wachstum der Zellen *in vitro* zu gewährleisten, ist es wichtig, dass die Umgebungsbedingungen möglichst jenen *in vivo* nahekomen. Die Bedingungen wurden durch das ausgewählte Nährmedium sowie durch die gewählte Temperatur (37°C) und CO₂-Konzentration (5%) in einem Brutschrank kontrolliert und optimiert.

Weitere Einflussfaktoren sind: Zell-Zell-Interaktion, lösliche Faktoren, Zell-Matrix-Interaktionen, Zellarchitektur und Zellpolarität.

3.1.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden vier Fibroblasten-Zelllinien verwendet. Bei zwei dieser Zelllinien handelte es sich um Zellen von betroffenen Patienten (Zelllinien 2 und 3). Bei den anderen beiden handelt es sich um Zellen von gesunden Probanden, die den Kranken in Alter und Geschlecht ähneln.

Die beiden Patienten, von denen Zelllinie 2 und 3 isoliert wurden, waren Träger der PLA2G6 Mutation und waren von infantiler neuroaxonomer Dystrophie betroffen.

„Die folgenden Zellen wurden vom NIGMS Human Genetic Cell Repository am Coriell Institute for Medical Research“ (Camden NJ, USA) bezogen [GM05565A, GM06432, GM11530, GM09503A]“ und im Institut für Medizinische Chemie und Pathobiochemie kultiviert.

Zelllinie	Mutation	Alter	Geschlecht	Bestellnummer
1	Keine/ Kontrolle	3 Jahre	männlich	GM05565A
2	NBIA	3 Jahre	männlich	GM06432
3	NBIA	10 Jahre	männlich	GM11530
4	Keine/ Kontrolle	10 Jahre	männlich	GM09503A

Tabelle 2: Zelllinien

3.1.2 Zellkulturmedium

Verwendetes Material:

Wachstumsmedium (Minimum Essential Medium Eagle plus, MEME) (flüssiges Fertigmedium, Sigma)

Fetales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert, Gibco)

L-Glutamin (200mmol/l) (PAA)

Amphotericin B (250µg/ml) (PAA)

Gentamycin (50mg/ml) (Gebru)

Durchführung:

Beim MEME handelt es sich um ein Fertigmedium, dem die oben genannten Zusätze beigelegt wurden. Zu 414 ml MEME wurde unter sterilen Bedingungen folgendes zugelegt:

75 ml FCS, 5 ml Amphotericin B, 0,5 ml Gentamycin und 5 ml L-Glutamin.

Gentamycin ist ein Aminoglykosidantibiotikum, welches gegen bakterielle Infektionen wirksam ist. Es hemmt irreversibel die 40 S-Untereinheit und verhindert somit die Proteinbiosynthese. Es ist bakterizid.

Amphotericin B ist ein Polyen-Antimykotikum, welches gegen Pilzbefall sehr effektiv ist. Es wirkt als Porenbildner in der Pilzplasmamembran. Es wird zwischen Ergosterol eingelagert. Somit wird die Membran für Ionen permeabel.

3.1.3 Mediumwechsel

Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt, um das Wachstum zu gewährleisten, da die Zellen Bestandteile des Mediums metabolisieren. Zu häufiger Mediumwechsel wurde verhindert, da Zellen bei jedem Mediumwechsel einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt werden.

Sinkt der Nährstoffgehalt im Medium und erhöht sich die Konzentration der Stoffwechselprodukte, so sinkt der pH-Wert und die Farbe des dem zugesetzten Medium pH-Indikators Methylrot wechselt von rot zu orange-gelb.

Bei jedem Mediumwechsel wurde das neue Medium zuvor auf 37°C erwärmt. Das alte, verbrauchte Medium wurde unter sterilen Bedingungen in der LAF abgesaugt und frisches Medium wurde unmittelbar zugesetzt.

Das Absaugen des Mediums erfolgte vorsichtig am Rand der Kulturflasche, um möglichst wenige Zellen abzusaugen.

3.1.4 Subkultivierung

Die sogenannte Konfluenz ist erreicht, sobald der Boden der Kulturflaschen mit Zellen bedeckt ist. Dadurch, dass die Dichte der Zellen sehr hoch ist, kommt es zu einem Proliferationsstopp. Somit war es nötig die Zellen zu „splitten“ bzw. passagieren, sodass sich die Zellen weiterhin vermehren können.

Für diesen Vorgang wurden frische Kulturflaschen, Trypsin/EDTA und frisches Kulturmedium benötigt.

Trypsin/EDTA und Medium wurden zunächst auf 37°C erwärmt. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen vollständig abgesaugt. Um verbleibendes Medium wegzuwaschen, wurden je nach Größe der Kulturflasche zwischen 1,5 und 3 ml Trypsin/EDTA zugegeben und sofort wieder entfernt und erneut 1,5-3 ml neues Trypsin/EDTA zugegeben und kurz (1-6 Minuten) bei 37°C im Inkubator inkubiert. Während das Trypsin dafür sorgt, dass die adhärennten Zellen sich vom Kulturboden lösen, induziert das EDTA das Aufbrechen der Zell-Zell-Verbindungen. Im Mikroskop wurde dieser Vorgang nach 1-6 Minuten beobachtet und kontrolliert. Die länglichen Zellen werden immer rundlicher bis sich ovale, sphärische Formen bilden und sich von der Kulturfläche loslösen.

Der Kontakt mit Trypsin wurde dabei so kurz wie möglich gehalten, um ein Verdauen der Proteine an der Zelloberfläche zu minimieren. Im Regelfall war eine Einwirkzeit von 6 min. ausreichend, um eine vollständige Zellsuspension zu erhalten.

Sobald das Ablösen der Zellen von der Kulturfläche erfolgte, wurde der Trypsin-Verdau durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Das im Medium vorhandene Serum hemmt dabei die Trypsinaktivität.

Um eine Zellsuspension mit möglichst einzelnen Zellen zu erhalten und Zellaggregate zu trennen, wurde die Zellsuspension mindestens zehn Mal mittels einer sterilen 10 ml Glaspipette auf- und absaugt und die Zellsuspension im Mikroskop auf Vereinzelung der Zellen kontrolliert.

Die Zellen wurden anschließend gezählt und die gewünschte Zelldichte durch Zugabe von neuem Medium eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend in neue evtl. größere Kulturflaschen aufgeteilt, um diese weiter zu züchten oder für die Versuche in Flaschen oder Well-Platten angesetzt.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die Zellzählung wurde 1 ml der Zellsuspension unter der LAF steril entnommen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Dieses wurde unter nicht-sterilen Bedingungen gevortext, um die Zellen möglichst gut zu trennen. Es wurden 0,2 ml der Zellsuspension entnommen und auf einen speziellen Objektträger aufgebracht. Diese wurden in einen automatischen Zellzähler Modell R1 von Olympus eingesteckt, welches automatisch die Zellzahl bestimmt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte dreimal in unmittelbar aufeinander folgenden Messungen. Das Gerät ermittelt die Zellzahl und gibt das Ergebnis in Millionen Zellen/ml an.

3.2 Gewinnung von Zelllysate aus kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden

Verwendete Materialien:

Phenylmethanolsulfonylfluorid (PMSF) 1 mmol/l in DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma)

Natriumfluorid (NaF) 10mmol/l in Aqua dest. (Merck)

Proteaseinhibitor Cocktail P8340 (SIGMA)

5x Cell lysis Buffer (Promega)

1x Cell lysis Buffer wird hergestellt durch Verdünnen von 1 Teil 5x Cell lysis Buffer und 4 Teilen Aqua dest.

Durchführung:

Die Zellen wurden in mittelgroßen Kulturflaschen (Wachstumsfläche 75cm²) gezüchtet. In jeder Flasche waren etwa 15 ml Medium enthalten. Sobald die Zellen konfluent waren und den Boden der Flasche ganz bedeckten, wurde das Medium von sieben Flaschen der gleichen Zelllinie gesammelt und vereint. Jeweils 10 ml wurden in die Kulturflaschen zurückgegeben. Das restliche Medium wurde auf sieben Röhrchen (je 5 ml) aufgeteilt und damit eine Konzentrationsreihe mit Eisenammoniumcitrat (FAC) hergestellt.

Jeder Kulturflasche wurde dann 5ml einer der FAC-Verdünnungen zugegeben und 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Flaschen auf Eis gelegt und das Medium mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Als nächstes wurde 50 μ M DTPA in PBS, pH 7,4 zugegeben, 5 Minuten inkubiert und abgesaugt. DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) ist ein nicht membrangängiger Eisenchelator und dient zum Entfernen des extrazellulären Eisens. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml PBS zu den Zellen pipettiert und mittels eines Cell Scrapers von der Kulturfläche manuell abgelöst.

Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Vollpipette in Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Röhrchen wurden 5 Minuten bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Zellpellet bei -20°C eingefroren.

Um die Zellpellets zu lysieren, wurde ein 1x Cell Culture Lysierungspuffer verwendet.

Zu 1000 μ L 1x Cell Culture Lysis Puffer wurden je 30 μ L Proteaseinhibitor PMSF und 30 μ L Natriumfluorid dazugegeben.

Der gesamte Prozess wurde weiterhin auf Eis durchgeführt. Um die Zellen noch besser aufzubrechen, wurden diese mittels des Ultraschallgeräts Branson Sonicator-12 behandelt. Das erhaltene Zelllysate wurde dann bei 4°C und 9600 rpm für 7,5 min in einer Eppendorfzentrifuge mit Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand (Zelllysate) wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt, welche im Anschluss gevortext und zur weiteren Verwendung eingefroren wurden. Das Pellet wurde verworfen.

3.3 Proteinbestimmung nach Bradford mittels 5x Roti-Quant Reagenz

Prinzip

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford ist es möglich die Proteinkonzentration in wässriger Lösung zu bestimmen. Dies beruht auf dem Prinzip der Protein-Farbstoffbindung.

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 trägt bei einem niedrigen pH-Wert anionische Sulfonat-Gruppen, welche an positiv-geladene Seitengruppen der Proteine bzw. Peptide binden. Nach der Komplexbildung kommt es zu einem Farbumschlag von rot-braun auf blau. Somit verschiebt sich ebenfalls das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm (Bradford, 1976; Kruger, 1994).

Verwendete Reagenzien

Zelllysate (siehe 2.2)

Aqua dest.

Albumin Fraktion V, proteasefrei (Fraktion V von Roth)

Albumin-Stocklösung 1mg/ml in Aqua dest.

5 x Roti-Quant (von Roth)

Durchführung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde zunächst der Proteingehalt geschätzt und eine gewisse Menge des Zelllysats verwendet. Es wurden 4 µL Zelllysate zur Bestimmung des Proteingehalts benutzt. Dazu wurden 4 µL der Zelllysate-Proben mit 796 µL destilliertem Wasser verdünnt und eiskühlt. Standards und Leerwerte (LW) wurden mittels Verdünnung von Albumin mit Aqua dest. laut untenstehender Tabelle hergestellt.

	μl Albumin (1mg/ml)	μL Aqua dest.
Standard 1	1	799
Standard 2	5	795
Standard 3	10	790
Standard 4	20	780
Standard 5	30	770
Standard 6	40	760
LW		800

Tabelle 3: BSA-Konzentrationen

Im Anschluss wurden zu allen Proben, Standards und Leerwerten je 200 μL 5x Roti-Quant (von Roth) hinzugefügt, gevortext und im Doppelansatz je 200 μL in eine 96-Well-Platte (von Greiner) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten erfolgte eine photometrische Messung bei 600 nm mittels Photometer VICTOR 2 Multilabel Counter (von HVD).



Abbildung 2: VICTOR 2 Photometer

3.4 Quantifizieren von Ferritin in kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden mittels Reverse Phase Protein Assay

Prinzip

Die RPPA ist eine sehr empfindliche und präzise Quantifizierungsmethode von Biomarkern. Es wird nur eine geringe Menge an Protein für die Analyse benötigt, um ein Protein in Zelllysaten zu quantifizieren. Bei dieser Messung handelt es sich um eine Kombination eines Immunoassays und einer Elektrochemilumineszenzdetektion.

Die vorbereiteten Zelllysate wurde auf die Arbeitselektrode einer schwarzen high-bindig 96-Well-Platte (Meso Scale Discovery, MSD) aufgetragen.

Die Methode des Immunoassays beruht auf dem Sandwichprinzip. Dabei verwendet man einen (primären) Antikörper, der sich gegen den zu interessierenden Analyten richtet, um diesen messen zu können. Außerdem wird ein zweiter (sekundärer) Antikörper verwendet, der sich wiederum gegen den ersten Antikörper richtet und mit einem Sulfo-Tag ausgestattet ist. Der zweite Antikörper wird auch als Detektionsantikörper bezeichnet.

Legt man eine Spannung an, so wird ein elektrisches Signal am Boden der Well-Platte erzeugt, welches in ein Lichtsignal, eine Elektrochemilumineszenz übersetzt wird. Dieses Lichtsignal entsteht durch die rasche Redoxreaktion des Read-Puffers mit dem Sulfo-Tag des sekundären Antikörpers. Um die Konzentration des Analyten in verschiedenen Zelllysaten vergleichen zu können, wird β -Actin als Housekeeping Protein verwendet (Boellner & Becker, 2015; Lu et al., 2016).

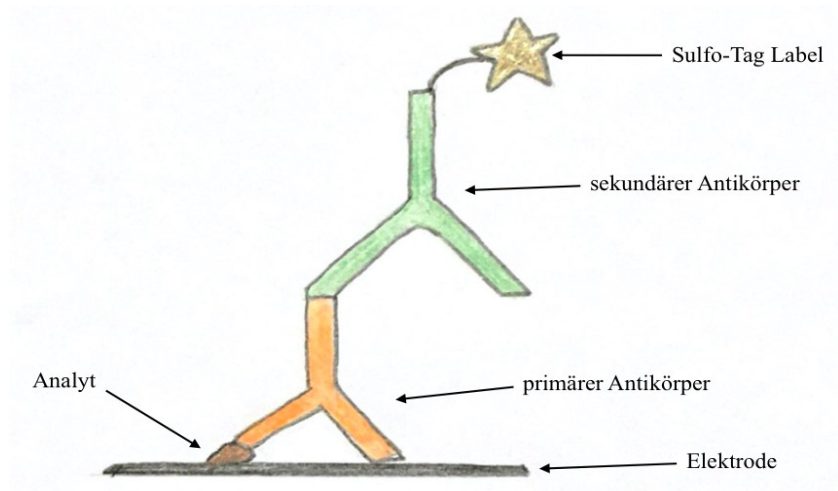


Abbildung 3: Prinzip der RPPA

Verwendete Reagenzien

Zelllysate

PBS, pH 7,4

Tween (Merck)

PBS-Tween 0,05%: 0,05ml Tween werden mit PBS, pH 7,4 auf 100ml aufgefüllt

Ferritin-Stammlösung (10 ng/ μ l)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1mmol/l in DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma)

Natriumfluorid (NaF) 10 mmol/l in Aqua dest. (Merck)

Proteaseinhibitor Cocktail P8340 (Sigma)

5x Cell lysis Buffer (Promega)

1x Cell lysis Buffer wird hergestellt durch Verdünnen von 1 Teil 5x Cell lysis Buffer (Promega) und 4 Teilen Aqua dest.

Blockierungslösung: 3% BSA (von MSD) in PBS-Tween 0,05%

Antikörpermix Ferritin: 1,5ml PBS Tween 0,05% mit 13 μ l rabbit-anti-human Ferritin-Antikörper (DAKO) und 6 μ l Goat-anti-rabbit MSD-Sulfo-Tag labelled Antikörper (MSD)

Antikörpermix β -Actin: 1ml PBS Tween 0,05% mit 1 μ l Mouse-anti β -Actin-Antikörper (Sigma) und 6 μ l Goat-anti-mouse MSD-SulfoTag labelled Antikörper von MSD

4x Read Buffer (von MSD)

1x Read Buffer: 1 Teil 4x Read Buffer + 3 Teile Aqua dest.

Durchführung

Da es sich beim RPPA um eine sehr empfindliche Analysemethode handelt und nur 6,25 μ g Protein Lysat / 100 μ L Ansatz nötig sind, wurde vorher die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt.

Ausgehend von einer Ferritin-Stammlösung und PBS-Tween 0,05%, wurden Ferritin-Standards mittels einer seriellen Verdünnungsreihe hergestellt (siehe untenstehende Tabelle).

Standard	PBS-Tween	Ferritin-Stammlösung
1	32 µL	8 µL
2	20 µl	20 µl aus STD 1
3	20 µl	20 µl aus STD 2
4	20 µl	20 µl aus STD 3
5	20 µl	20 µl aus STD 4
6	20 µl	20 µl aus STD 5
7	20 µl	20 µl aus STD 6
8	20 µl	20 µl aus STD 7
Leerwert	20 µl	---

Tabelle 4: Ferritinstandards Pipettierschema

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde mittels Proteinbestimmung (Proteinbestimmung nach Bradford) ermittelt und das Volumen an Lysat, welches 6,25 µg Protein enthielt für jede Probe berechnet. Von jeder Probe wurde ein Lysatvolumen (welches genau 6,25 µg Protein enthält) in ein Eppendorfgefäß transferiert und mit Lysis-Puffer auf ein Endvolumen von 8 µL aufgefüllt (alles auf Eis).

Zu jedem Eppendorfgefäß wurden anschließend 92 µL PBS-Tween 0,05% zugefügt, um eine Gesamtkonzentration von 6,25 µg in 100 µL Endvolumen zu erreichen. Diese verdünnten Proben der Zelllysate wurden dann für den weiteren Versuch verwendet.

Je 4 µL der verdünnten Proben, der Standards und des Leerwertes wurden in die Mitte eines Wells einer 96-Well-Microarray-Platte pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um das Protein auf der Carbon-Oberfläche des Wells zu binden. Danach wurde noch vorhandene Flüssigkeit in den Wells durch Ausklopfen der Platte auf Zellstoff entfernt.

Im nächsten Schritt wurden 150 µL Blockierungslösung pro Well pipettiert und wieder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte durch Ausklopfen ausgeleert und dreimal mit 150 µL PBS-Tween 0,05% pro Well gewaschen.

Anschließend wurden 25 µL des Ferritin- bzw. β-Actin Antikörpermixes in jedes Well revers-pipettiert, mit einer Folie abgedeckt und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst die Platte ausgeklopft und dreimal mit PBS-Tween 0,05% gewaschen, wobei die letzte Waschung nicht sofort entfernt wurde, damit die Antikörper nicht austrocknen, während die Messlösung (1x Read-Buffer) hergestellt wurde.

Unmittelbar vor der Messung wurden 150 μ L 1x Read Buffer in den leeren Wells reverse-pipettiert, um Luftblasen und somit Messfehler zu vermeiden.

Die Microarray-Platte wurde sofort in den Sector Imager 2400 Reader (von Meso Scale Discovery) gestellt und gemessen.

Ausgewertet wurden die Messdaten mit GraphPad Prism 7.



Abbildung 4: Sektor Imager 2400, MSD

3.5 LIP Messung in kultivierten Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden

Prinzip

Zur Quantifizierung des labilen Eisenpools (LIP) wird ein fluoreszenzspektroskopisches Prinzip mit Calcein (CAL), die CAL-Methode verwendet.

Der labile Eisenpool beschreibt einen im Zytoplasma befindlichen Eisenvorrat, welcher für die Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels wichtig ist und Eisen für die Synthese von eisenhaltigen Proteinen bereitstellt (Kruszewski, 2003).

Als Indikator dient Calcein, ein empfindlicher und fluoreszierender Eisenchelator. Mittels dieser Methode wird die Messung der intrazellulären Eisenkonzentration, des LIP in lebenden intakten Zellen ermöglicht (Uggeri et al., 2004).

Das Experiment erfolgt in zwei Schritten.

Für den Versuch wurden in schwarzen 96-well Platten mit klarem Boden kultivierte Fibroblasten verwendet. Die Zellen wurden mit Calcein-Acetoxymethylester versetzt, welches membranpermeabel, aber nicht-fluoreszierend ist. Intrazellulär wird der Ester durch Esterasen abgespalten und es entsteht freies Calcein, welches fluoresziert. Calcein bindet intrazelluläres chelatierbares Eisen, wodurch es zu einer Fluoreszenzlöschung des Calceins kommt. Diese ist direkt proportional zur LIP-Konzentration.

Um sicherzustellen, dass lediglich intrazelluläres Eisen gequenchet wird, wurde in die Wells ein Anti-Calcein-AK zugesetzt, welcher extrazelluläres CAL bindet und ebenfalls die Fluoreszenz des CAL löscht. Der Calcein-Antikörper ist nicht membranpermeabel und gelangt somit nicht in die Zelle.

Hier erfolgte die erste Fluoreszenzmessung (Messung 1).

Danach wurde zügig der Eisenchelator Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon (SIH) zu den Zellen hinzugefügt. Da SIH eine höhere Affinität hat als Calcein, wird Eisen aus dem Eisen-Calcein-Komplex von SIH komplexiert und es entsteht wieder Eisen-freies Calcein. Das Calcein liegt somit wieder in seiner freien Form vor und gewinnt somit seinen fluoreszierenden Charakter zurück.

3 Minuten nach Zugabe von SIH erfolgte die zweite Messung (Messung 2).

Anhand der Differenz von Messung 2 und 1 wurde der LIP quantifiziert
(Kakhlon & Cabantchik, 2002; Tenopoulou et al., 2007).

Der Einfluss von Hemin und Eisen Saccharat (Venofer) auf den LIP wurde in allen Fibroblasten Zelllinien untersucht.

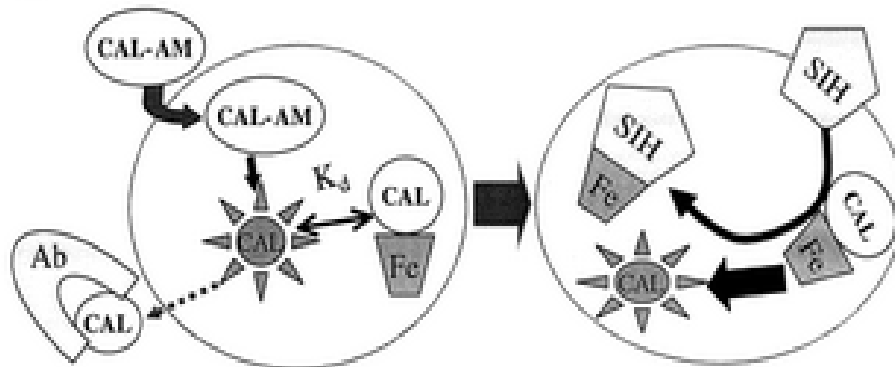


Abbildung 5: Prinzip der Cal-AM-Messung (Kakhlon & Cabantchik, 2002)

Verwendete Reagenzien

Wachstumsmedium

Eisen ammoniumcitrat (FAC) (Merck)

HEPES 400mmol/l, pH 7,3

DTPA 5mmol/l, pH 7,3

MEMEagles/ 20mM HEPES

MEMEagles/ 20mM HEPES/50μM DTPA

Eisensaccharat Venofer (20mg Eisen/ml) (Venofer, Vifor)

Hemin (Sigma)

Calcein-AM: 50μg/vial (Invitrogen)

Calcein-AM in DMSO: 100μl wasserfreies DMSO werden zu 50μl CA-Am zugesetzt und gründliche gevortex und à 10μl portioniert und bei -20°C gelagert (im Dunkeln)

Calcein-Am in MEME/HEPES (4μl Calcein-AM in DMSO pro 8 ml MEME/HEPES)

Anti-Calcein-AK (hergestellt von M. Herman, Wien)

Anti-Calcein-AK in MEME/HEPES: 5ml MEME/HEPES werden mit 50µl Anti-Calcein-AK gemixt.

Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon (SIH) 2,5mmol/l in DMSO/H₂O (von Prof. Des Richardson, Sydney, Australia)

Durchführung

Die Fibroblasten der zu untersuchenden Patienten und Gesunden wurden in schwarzen 96-Well Platten mit klarem Boden ausgesetzt und 2 Tage inkubiert.

Es wurden für die Untersuchungen Verdünnungen von Eisensaccharat (Venofer) und Hemin vorbereitet. Diese wurden frisch vor jedem Einsatz hergestellt.

Venofer: Konzentration: 0,3751 mmol/ml MEME kompl.

Hemin: 16,3 mg/ml in 0,5 ml NaOH (Stocklösung) → 20 µl Hemin-Stocklösung/ml MEME kompl.

Zu den Fibroblasten in den Wells wurden die Lösungen der jeweiligen Präparate pipettiert bzw. lediglich MEME kompl. als Kontrolle und für 0,5 h, 1 h, 2h, 3h, 4 h und 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, zu den Zellen MEMEagles/HEPES-DTPA pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. DTPA wird verwendet, um das extrazelluläre Eisen zu binden, da es nicht membranpermeabel ist. Danach wurden die Platten zweimal mit komplementiertem Medium gewaschen. Mittels einer 8-Kanal-Pipette wurden 100 µl einer Lösung aus 0,25 µl Calcein-AM in MEME/HEPES per Well hinzugefügt und für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 100 µl komplementierten Wachstumsmedium/Well gewaschen. Im abgedunkelten Raum wurden 100 µl pro Well einer Lösung aus Anti-Calcein-Antikörper in MEME/HEPES mittels einer 8-Kanal-Pipette pipettiert und die Fluoreszenz unmittelbar im Anthos Zenyth fluorescence plate reader (HVD, Wien) bei Ex 485 nm/ Em 535 nm bei 37°C gemessen.

Daraufhin wurden 10 µl 2,5 mmol/l SIH in DMSO/Aqua dest. dazugegeben und sofort wieder im Anthos die Fluoreszenz gemessen.

Im Anthos Zenyth fluorescence plate reader wurde die Platten in 4 aufeinander folgenden Zyklen gemessen.

Der LIP lässt sich aus dem Ausmaß der Fluoreszenzänderung der beiden Messschritte berechnen.

Die Auswertung erfolgt mittels Excel und GraphPadPrism 7.0.



Abbildung 6: Anthos Zenyth 3100

3.6 Statistische Auswertung

Der Originaldaten-Output vom Messgerät erfolgte im MS-Excel.

Für die weitere statistische Berechnungen und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 (der Firma GraphPad Software Inc.,USA).

Unterschiede in den Mittelwerten wurden mittels gepaarten t-Test bestätigt.

Signifikante Unterschiede in den Mittelwerten wurden angenommen, wenn der p-Wert $< 0,05$ war. Signifikante Unterschiede wurden in den Grafiken mit folgenden Symbolen markiert: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Nicht signifikante Unterschiede wurden nicht markiert.

4 Ergebnisse

In einer Vorstudie ist durch die Inkubation der Fibroblasten mit Eisenammoniumcitrat (FAC; low molecular weight iron) bei den Fibroblasten der gesunden Probanden der intrazelluläre labile Eisenpool (LIP) nach einer Stunde auf etwa 400% des Ausgangswertes angestiegen und fiel dann nach etwa 90 Minuten stark ab auf 100-150% des Ausgangswertes und blieb dann die nächsten eineinhalb Stunden bei etwa 200%.

Bei den INAD-Patienten kam es hingegen nur zu einem leichten Anstieg auf ca. 120% (Patient 2) bzw. praktisch gar keiner Erhöhung des LIP (Patient 3). Bei INAD-Patienten lag der LIP teilweise auch unter dem Ausgangswert (bei Patient 3, nach 90min und 220min).

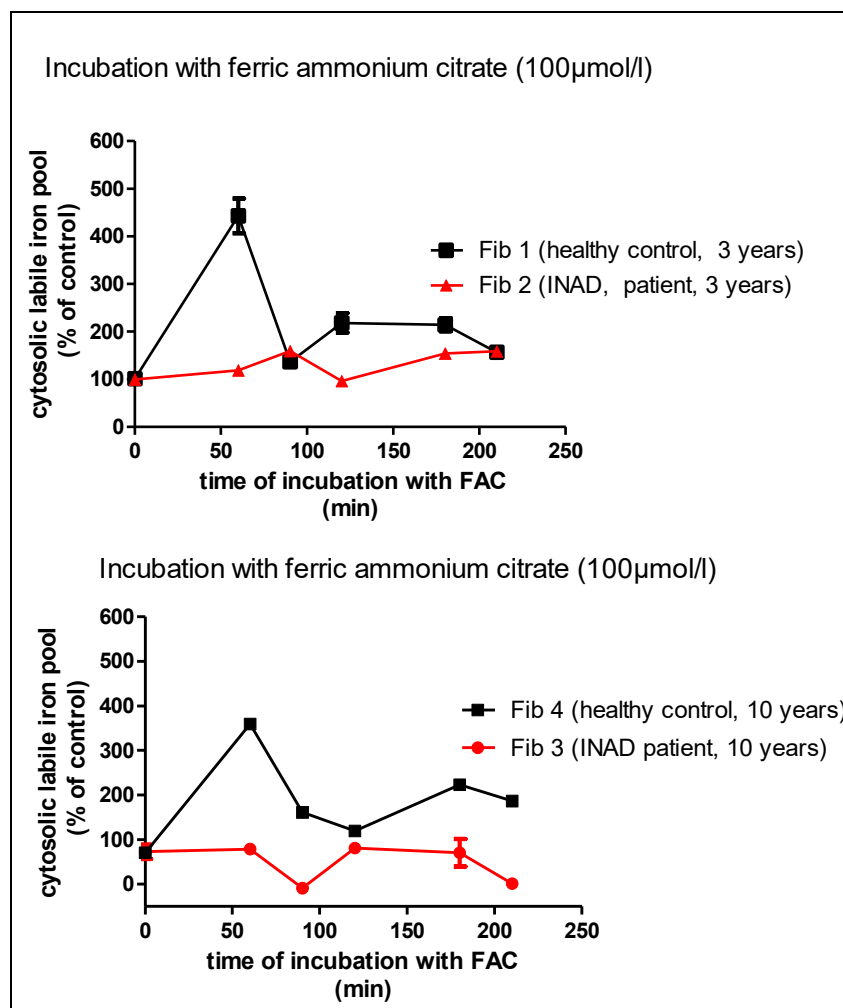


Abbildung 7: Einfluss von FAC auf den zytosolischen labilen Eisenpool

4.1 Einfluss der Inkubation von Hemin auf den labilen Eisenpool in Fibroblasten von INAD Patienten und gesunden Probanden

4.1.1 Fibroblasten der Zelllinie 1 und 2

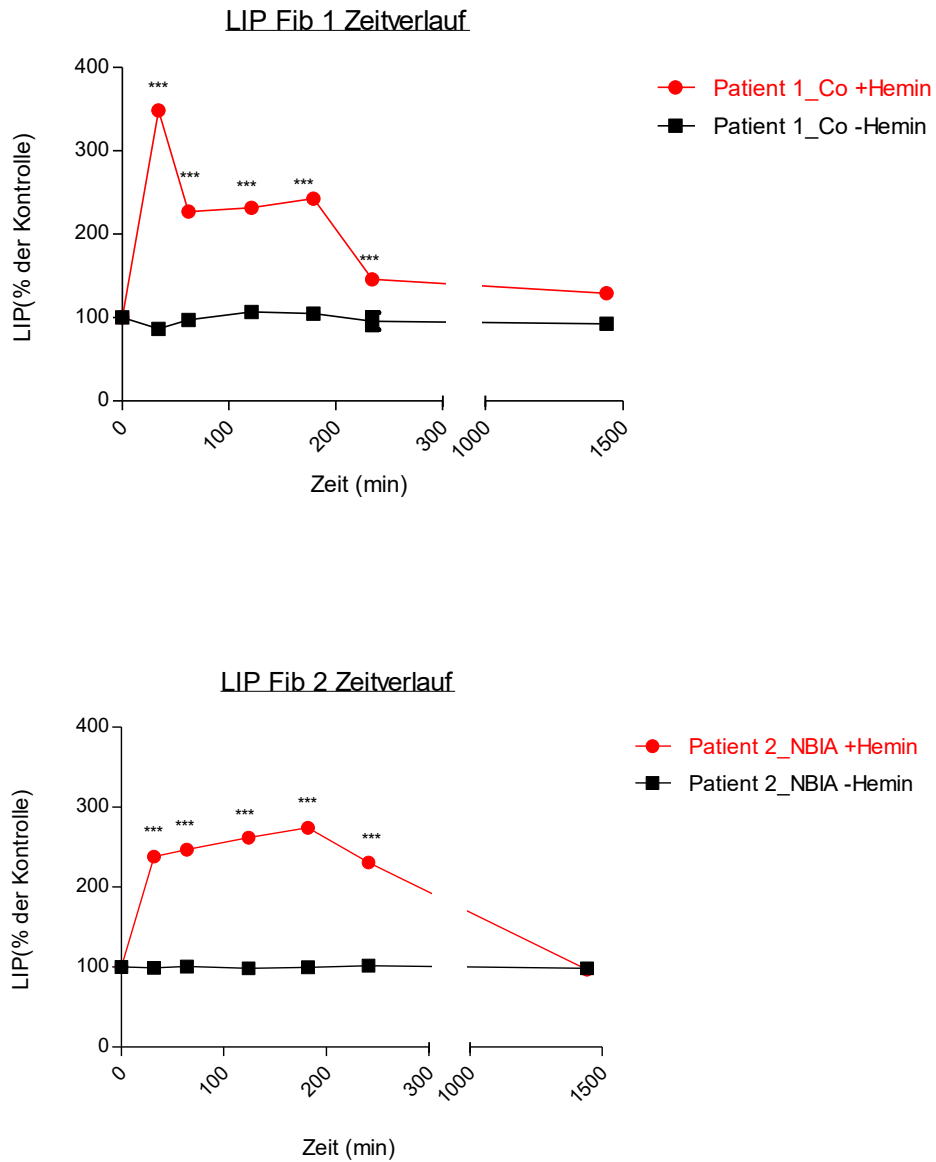


Abbildung 8: Einfluss von Hemin auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 1 und 2

Die Fibroblasten des gesunden Patienten (Patient 1) zeigten bei einer Zugabe von Hemin eine maximale Steigerung des labilen Eisenpools auf 350% innerhalb von 30 Minuten. Der LIP stabilisierte sich dann auf hohem Niveau bei etwa 220% des Ursprungswertes nach 60 Minuten, wobei dieser nach 121 Minuten wieder minimal angestiegen ist auf etwa 250%.

Dann ist der LIP rasch bis zur Minute 179 auf 150% abgesunken. Danach sank dieser langsam weiter ab, und erreicht innerhalb von 24 Stunden jedoch nicht mehr den Ausgangswert. Wurde kein Hemin zugeben blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

Im Vergleich dazu, sieht man einen Anstieg auf 250 % binnen 30 Minuten bei den Fibroblasten des dreijährigen Jungen mit infantiler neuronaler Dystrophie. Das Maximum des labilen Eisenpools wurde nach 182 Minuten erreicht und lag bei etwa 280 %. Ab der Minute 182 begann eine langsame, konstante Abnahme. Nach 24 Stunden wurde der Ausgangswert des LIP erreicht. Wurde kein Hemin zugeben, blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

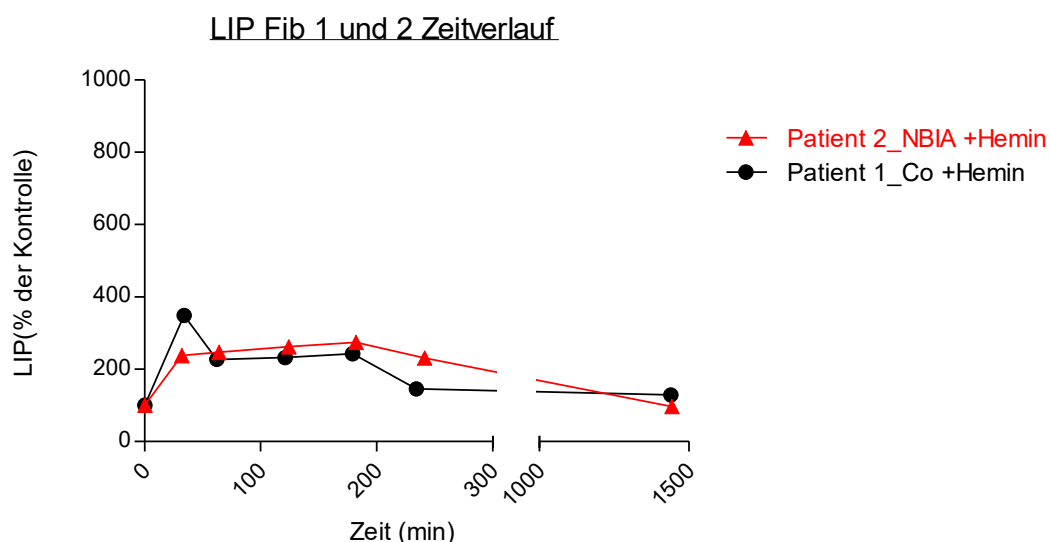


Abbildung 9: Direkter Vergleich der Patienten 1 und 2 bei der Inkubation mit Hemin

4.1.2 Fibroblasten der Zelllinie 3 und 4

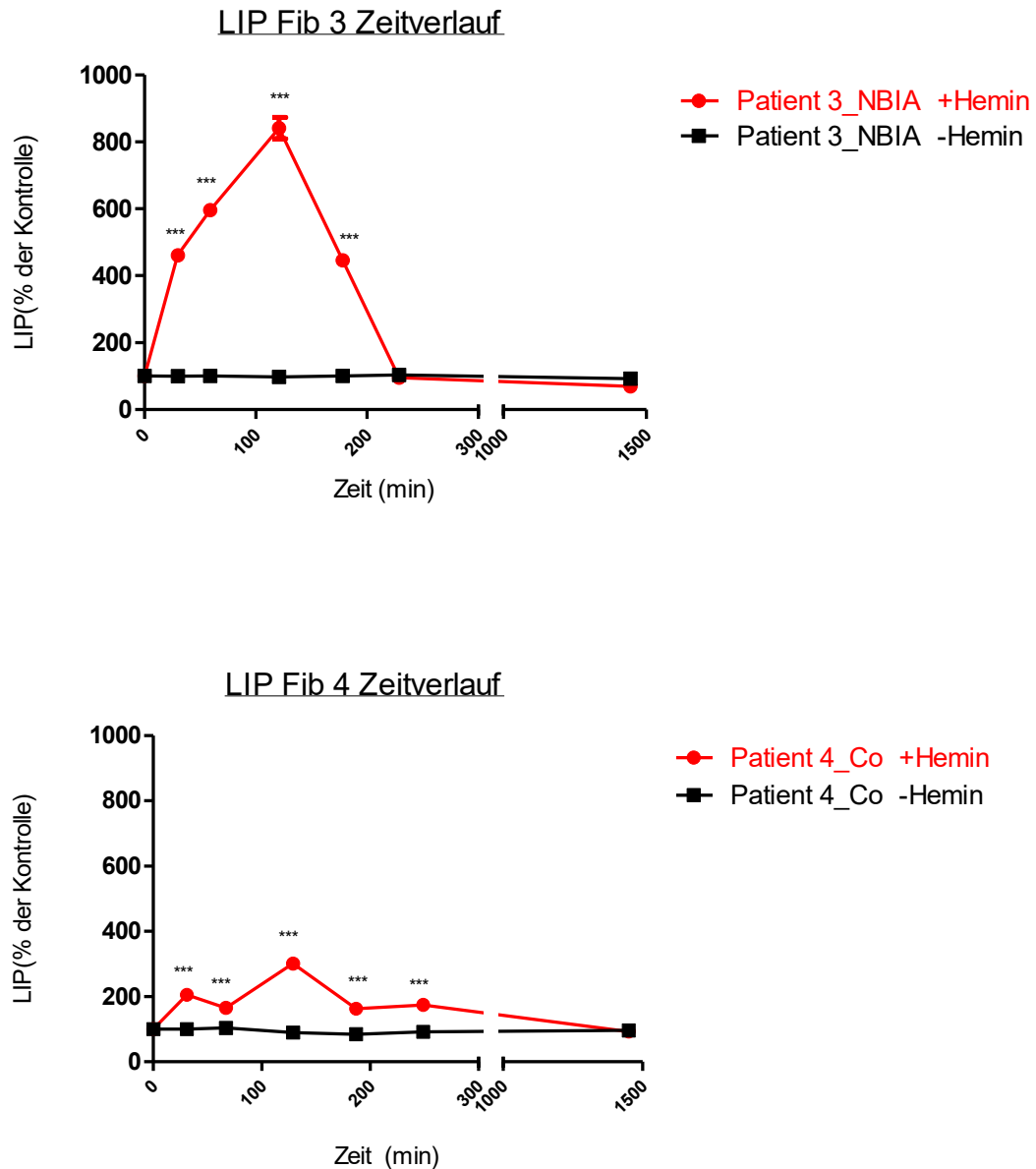


Abbildung 10: Einfluss von Hemin auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 3 und 4

Der labile Eisenpool der Zellen des gesunden Pobanden (Patient 4) bei der Zugabe von Hemin erreichte sein Maximum nach 129 Minuten, welcher bei etwa 360% lag und nahm danach ab. Grundsätzlich änderte sich wenig über den Beobachtungszeitraum und der LIP-Wert blieb zwischen 100 und 360%. Wurde kein Hemin zugeben blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

Bei den Fibroblasten des Patienten 3 (INAD) ist besonders auffällig, dass ein schnellerer und deutlich höherer Anstieg des LIPs erreicht wurde. So stieg der labile Eisenpool innerhalb von 30 Minuten auf mehr als 400 % an. Der maximale labile Eisenpool von 841 % wurde nach einem stetigen Anstieg nach 121 Minuten erreicht und sank danach steil ab. Ab der 229. Minute wurde der Ausgangswert des LIP wieder beobachtet. Wurde kein Hemin zugeben blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

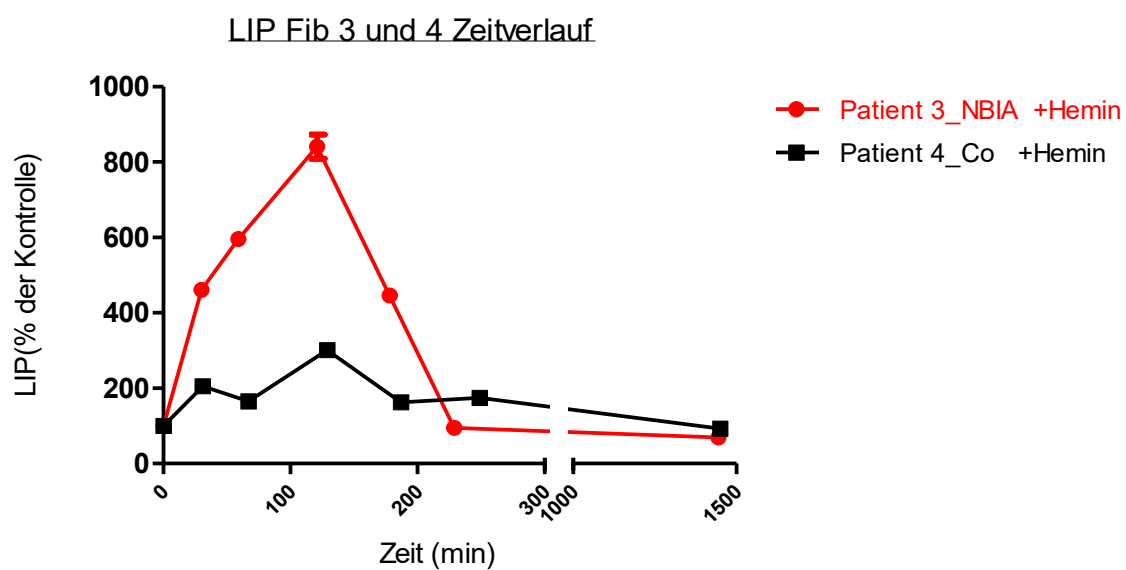


Abbildung 11: Direkter Vergleich der Patienten 3 und 4 bei der Inkubation mit Hemin

4.2 Einfluss der Inkubation von Eisensaccharat (Venofer) auf den labilen Eisenpool in Fibroblasten von INAD-Patienten

4.2.1 Fibroblasten der Zelllinien 1 und 2

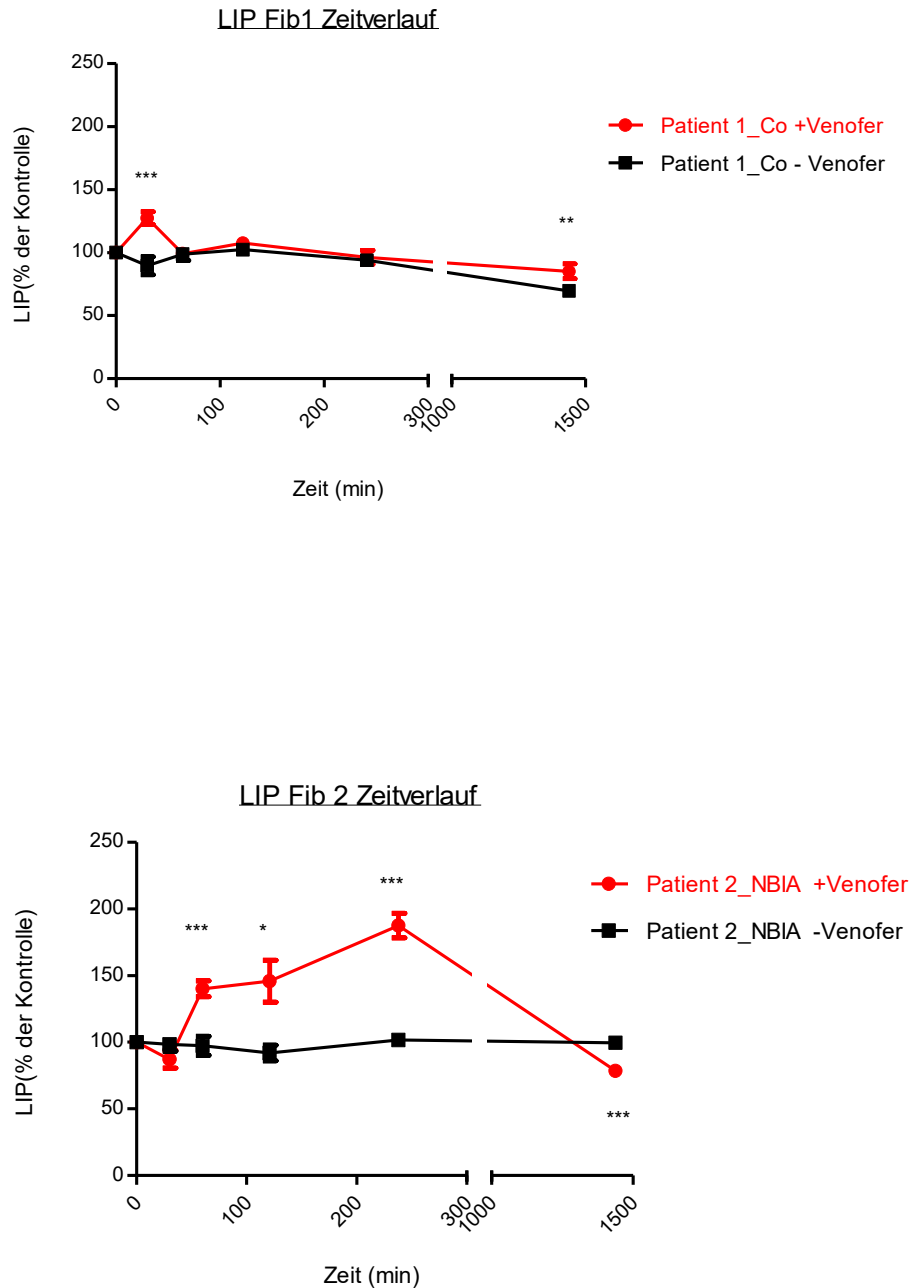


Abbildung 12: Einfluss von Venofer auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 1 und 2

Der labile Eisenpool des gesunden Patienten 1 stieg in 30 Minuten minimal auf etwa 150 % des Ausgangs-LIP-Wertes an und sank danach auf den Ausgangswert. Bis zur 122. Minute kam

es zu einem weiteren kleinen Anstieg des LIP. Anschließend folgte eine langsame Abnahme des LIP, welche daran liegen könnte, dass LIP- Eisen in Ferritin aufgenommen wurde.

Nach 241 Minuten kehrte der LIP auf den Ausgangswert zurück. Wurde kein Eisensaccharat zugeben, blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

Die Fibroblasten des 10-jährigen Patienten, der an INAD erkrankt ist, zeigten einen sehr langsamen Anstieg des labilen Eisenpools nach einer Stunde nach Zugabe von Venofer und in weiterer Folge wieder eine Abnahme auf den Ausgangswert. Nach 180 Minuten stieg der LIP neuerlich an, bis das Maximum von 187% nach 238 Minuten erreicht wurde. Nach 24 Stunden befand sich der LIP wieder beim ursprünglichen Wert (100%). Wurde kein Eisensaccharat zugeben, blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%.

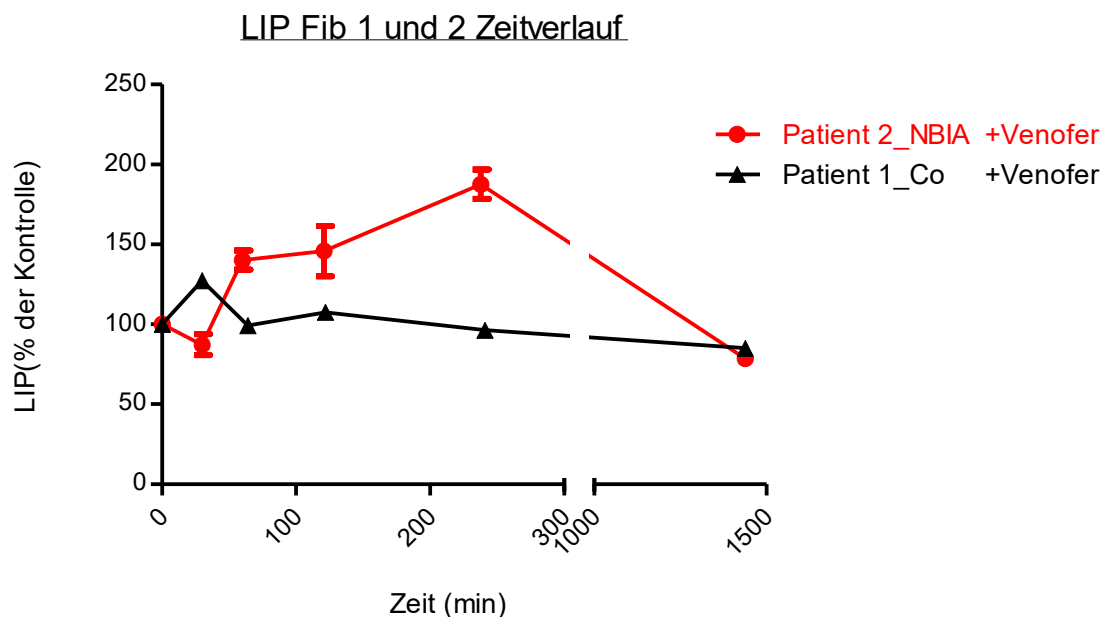


Abbildung 13: Direkter Vergleich der Patienten 1 und 2 bei der Inkubation mit Venofer

4.2.2 Fibroblasten der Zelllinien 3 und 4

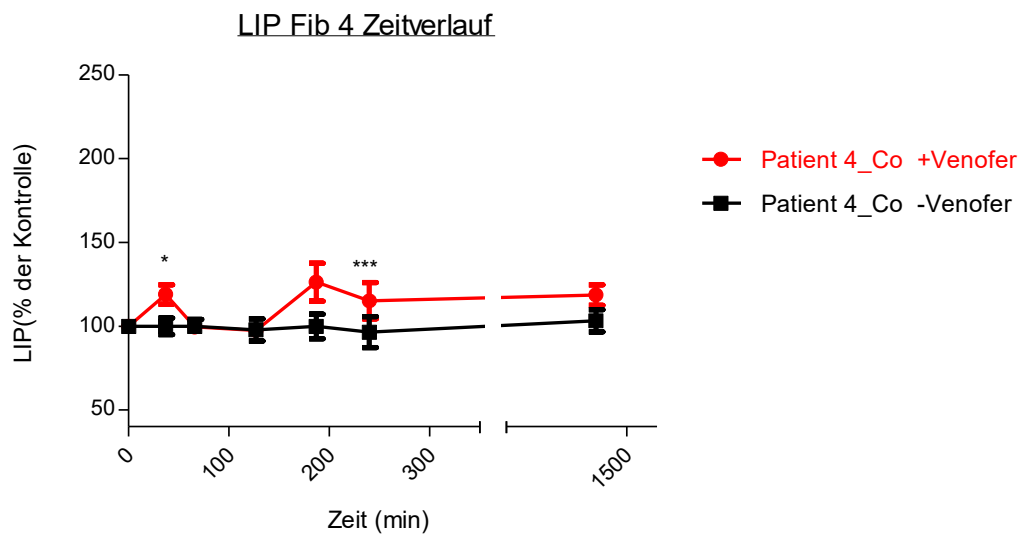
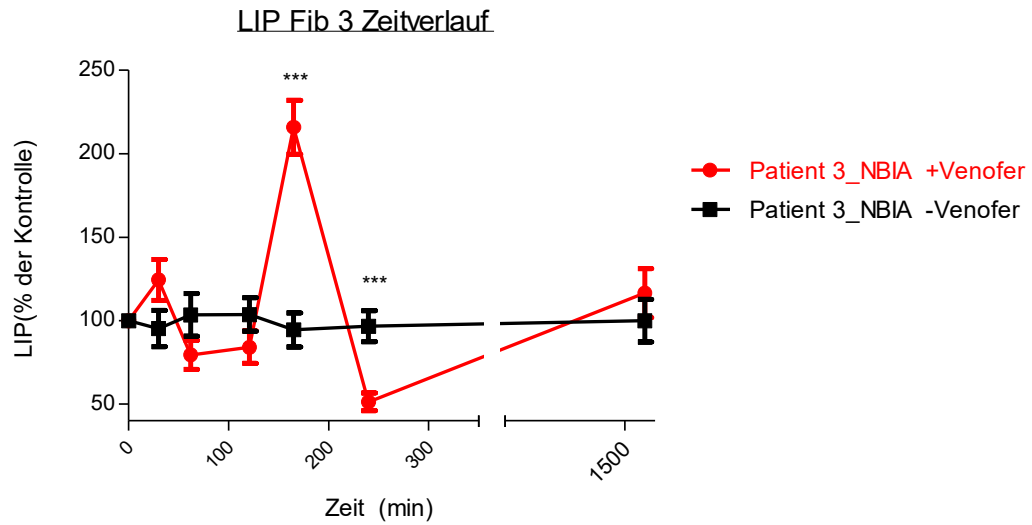


Abbildung 14: Einfluss von Venofer auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 3 und 4

Die Zellen des gesunden Probanden zeigen einen kleinen signifikanten Anstieg des LIP auf 120 % und einen sofortigen Abfall nach 30 Minuten. Nach zwei Stunden kommt es zu einem erneuten Anstieg, welcher den maximalen LIP von 120 % bei 180 Minuten markiert. Danach nimmt der LIP schleichend ab. Während des Beobachtungszeitraums wird der Ausgangswert

des LIP nicht mehr erreicht. Wurde kein Eisensaccharat zugeben blieb der LIP im Beobachtungszeitraum konstant beim Ausgangswert von 100%

Der labile Eisenpool des 10-jährigen INAD-Patienten zeigt eine Zunahme auf 125 % nach 30 Minuten. Danach ist ein starker Abfall des LIP zu beobachten, welche sogar unter den Ausgangswert fällt.

Nach 120 Minuten beginnt der LIP wieder zu steigen, bis der maximale LIP von 215 % nach 165 Minuten erreicht wurde. Dieser Anstieg fällt daraufhin schnell ab auf 50%. Folgend kommt es zu einer sehr langsamen Erhöhung zurück etwa zum Ausgangswert nach 24 Stunden.

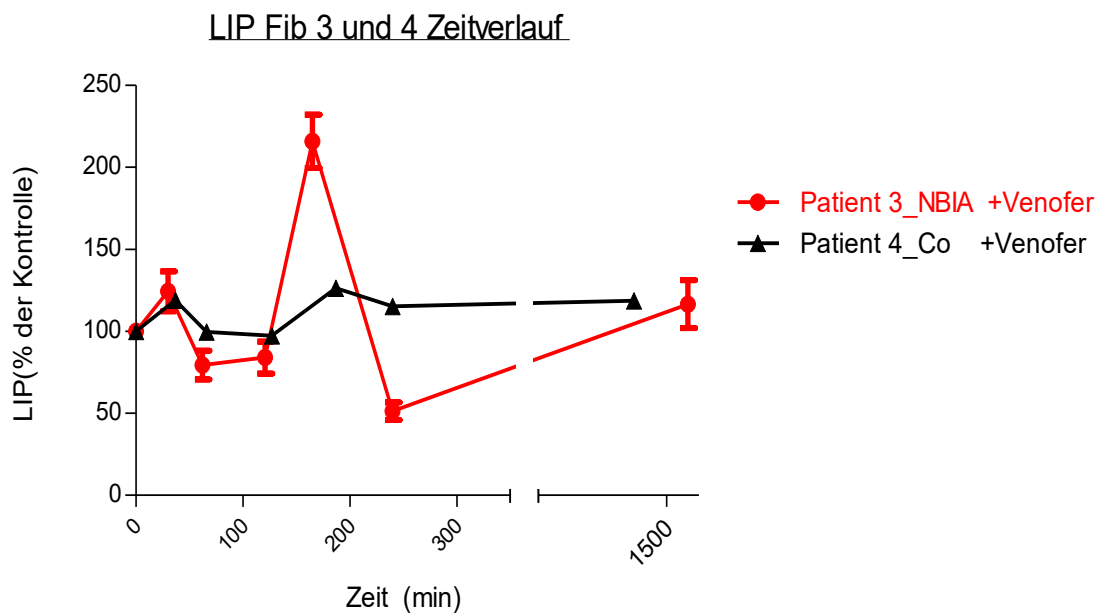


Abbildung 15: Direkter Vergleich der Patienten 3 und 4 bei der Inkubation mit Venofer

4.3 Ferritinexpression der Zelllinien

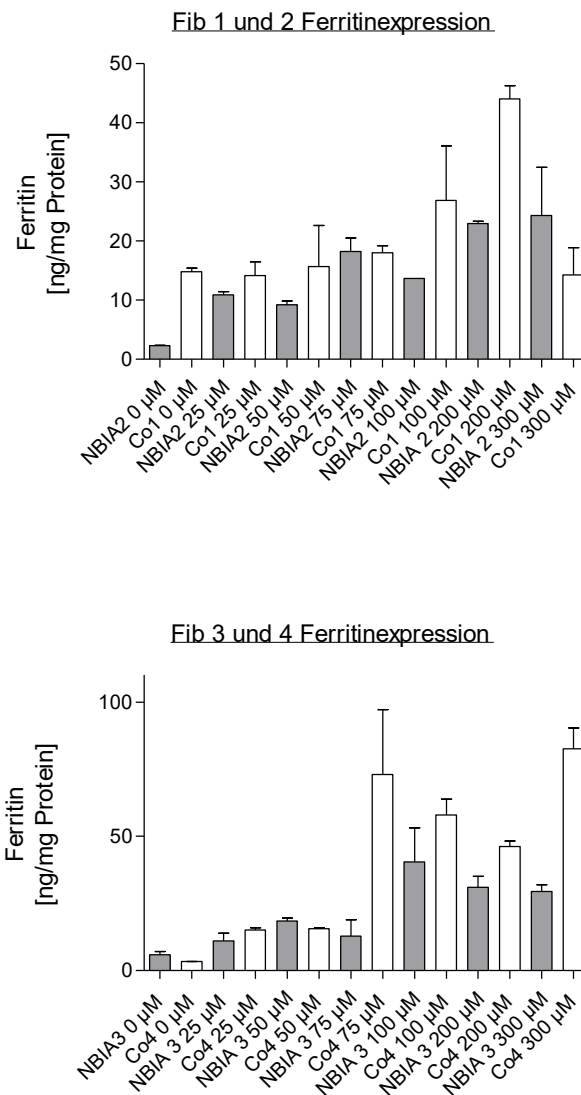


Abbildung 16: Einfluss der Eisenbeladung mit FAC auf die Ferritinexpression

Nach der Inkubation für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von FAC (0-300µmol/l) kam es zu einer Erhöhung der Ferritin-Expression bei allen untersuchten Zelllinien. Auffällig war dabei, dass die Fibroblasten der beiden gesunden Probanden um etwa 45% höhere maximale Ferritinwerte erreichten als die Fibroblasten der beiden INAD-Patienten. Wurde der Effekt der verschiedenen FAC-Konzentrationen auf die Ferritin-Expression genauer untersucht zeigt sich, dass bei INAD-Zellen doppelt so hohe FAC-Konzentrationen benötigt

wurden als bei den Zellen der gesunden Probanden um ähnliche Ferritinwerte nach 24 Stunden zu erreichen.

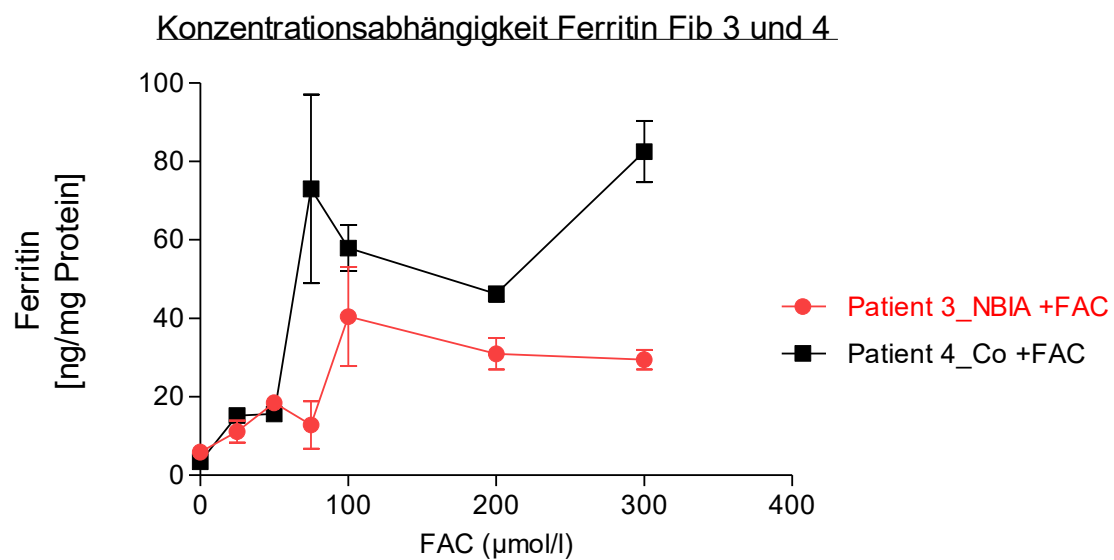
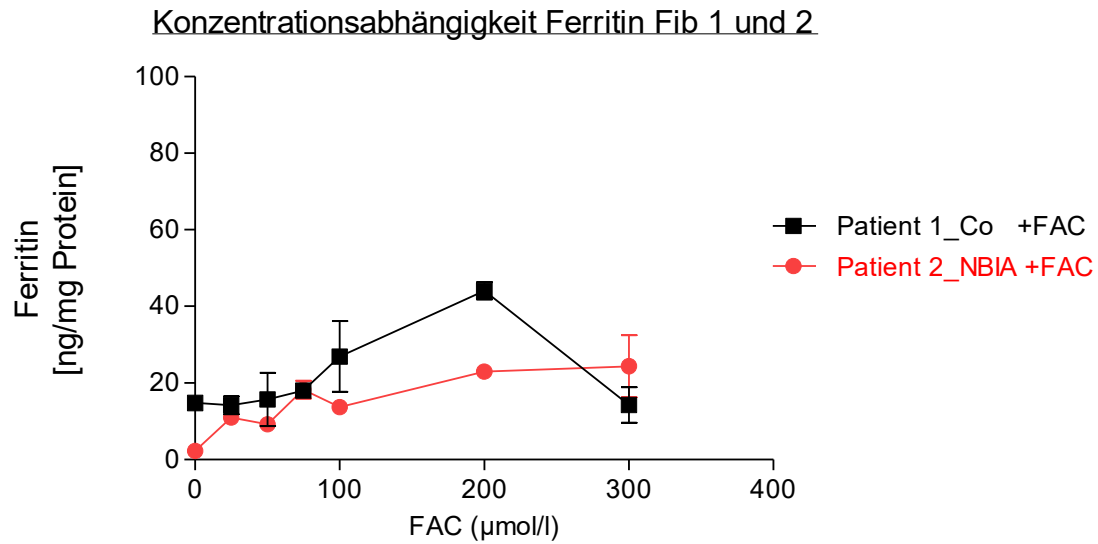


Abbildung 17: Einfluss von FAC auf die Ferritinkonzentration

5 Schlussbetrachtung

In dieser Studie wurde die Ferritin-Expression gemessen, nachdem den Zellen Eisenammoniumcitrat (FAC) in unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden angeboten wurde.

Beobachtet wurde, dass die Fibroblasten der gesunden Probanden um etwa 45 % höhere Ferritinwerte zeigten als die Zellen der INAD-Patienten. Insgesamt ergab sich, dass doppelt so hohe FAC-Konzentrationen in Patientenzellen benötigt wurden, um vergleichbare Ferritinwerte, wie in den Zellen der gesunden Probanden zu erreichen.

In dieser Arbeit wurde die Ferritin-Expression mit unterschiedlichen FAC Konzentrationen bei einer einheitlichen Inkubationsdauer von 24 Stunden durchgeführt. Interessant wäre nun in einer weiteren Studie auch noch den zeitlichen Verlauf der Ferritin-Expression unter Einfluss von FAC in Fibroblasten von INAD-Patienten versus gesunden Probanden zu untersuchen. Dies könnte die Frage klären, ob es durch die Mutation zu einer langsameren Eisenaufnahme von FAC-Eisen kommt, aber nach längeren Inkubationszeiten ebenso hohe Ferritin-Werte erreicht werden können.

Bei Inkubation der Fibroblasten mit Hemin war bei den Zellen des gesunden Probanden (Patient 1) in den ersten 30 Minuten ein Anstieg auf etwa 350 % zu beobachten, der nach längeren Inkubationsperioden bei 250-300 % des Ausgangswertes blieb und nach 24 Stunden wieder den ursprünglichen Wert erreichte. Bei Kontroll-Patient 4 stieg der LIP nach 30 Minuten auf etwa 200 % und schwankte in der Folge zwischen etwa 180 und 300 % und sank nach 25 Stunden ebenfalls wieder auf den Ausgangswert ab. Bei den INAD Patienten zeigte Patient 2 einen Anstieg auf 200 % des ursprünglichen LIP nach 30 Minuten, der in weitere Folge relativ konstant blieb und erst beim 24h-Wert wieder auf den Ausgangs-LIP-Wert herabsank. Bei Patient 3 hingegen kam es bereits nach 30 min. zu einem starken Anstieg auf 450 % des Ausgangs-LIP-Levels und zu einer weiteren starken Steigerung mit einem Maximum nach zwei Stunden auf etwa 900% des Ausgangswertes. Danach kam es zu einem starken Abfall auf 400% nach 3 Stunden und auf den Ursprungswert nach etwa 220 Minuten, der dann auch noch beim 24 Stundenwert zu beobachten war.

Wurden die Zellen mit Eisennanopartikeln (Eisensaccharat) inkubiert konnte bei beiden Kontrollen (Patient 1 und 4) nach 30 Minuten ein Anstieg des LIP um 120% verglichen mit dem Ausgangswert beobachtet werden und diese Veränderungen auch während den folgenden Stunden um die 100- 120% lag. Bei INAD-Patient 2 kam es erst nach 60 Minuten zu einer Erhöhung des LIP auf 150-200% während der ersten 4 Stunden.

Nur bei Patient 1 kam es zu einem extremen Anstieg zu einem einzigen Zeitpunkt (nach 3 Stunden) auf 800 % des ursprünglichen LIP-Wertes. Ein ähnlicher Anstieg konnte bei Kontroll-Patient 4 nicht beobachtet werden, der LIP blieb bei diesem Patienten durchgehend beim ursprünglichen Wert.

Bei INAD Patienten konnte bei Patient 2 eine leichte Erhöhung des LIP beobachtet werden nach etwa 1 Stunde auf rund 150% des Ausgangswertes, der nach 4 Stunden den höchsten Wert erreichte mit 200%. Nach 24 Stunden war wieder der Ausgangswert des LIP erreicht.

Bei INAD-Patient 3 kam es nach 30 Minuten zu einem ersten Anstieg im LIP auf 120% des Ausgangswertes und im weiteren Verlauf nach einem kurzen Absinken unter 100% zu einem starken Anstieg nach 3 Stunden auf 230%, gefolgt von einem Abfall auf nur 50% nach 4 Stunden und zu einer Rückkehr zum Ausgangswert nach 24 Stunden.

Ausgehend von der Beobachtung, dass beim Vergleich von Fibroblasten, die von nach Geschlecht und Alter gepaarten INAD-Patienten und gesunden Probanden stammten durch Inkubation mit Eisenammoniumcitrat (FAC) ganz unterschiedliche Zeitverläufe bei der Größe des intrazellulären chelatierbaren labilen Eisenpools (LIP) auftraten, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dieses Phänomen auch mit anderen Eisenquellen auftritt.

Während FAC niedermolekulares lösliches Eisen(III) darstellt, ist in Hemin das Eisen in einem Protoporphyrinring eingebaut.

Für den Transport von Eisen in die Zelle gibt es mehrere Möglichkeiten. So kann das angebotene Eisen im Plasma an Transferrin binden und dann anschließend von den Zellen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Zellen an der Plasmamembran Transferrin-Rezeptoren exprimieren (Chen-Roetling et al., 2014).

Daneben besteht noch die Möglichkeit sogenanntes Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI, non transferrin bound iron) über membranständige Eisentransporter aufzunehmen, unter anderem dem divalente Metalltransporter DMT-1 oder auch ZIP14.

Höhere molekulare Komplexe oder Eisennanopartikel hingegen können auch über Pinozytose von Zellen aufgenommen werden und dann intrazellulär abgebaut werden (Ganz & Nemeth, 2012).

Für alle Mechanismen der Eisenaufnahme sind Membranständige Rezeptoren (wie bei der Aufnahme von Transferrin, der Transferrin-Rezeptor) oder Transporter (wie DMT1 und ZIP 14) nötig. Bei der Pinozytose muss es auch zu einer Membraneinstülpung und in weiterer Folge zur Vesikelbildung und Verschmelzung mit lysosomalen Kompartimenten kommen, um die Nanopartikel abzubauen und das Eisen intrazellulär freizusetzen (Ganz & Nemeth, 2012; Pantopoulos, 2004).

In dieser Studie wurden Fibroblasten mit unterschiedlichen FAC-Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Ferritin-Expression mittels Reverse Phase Protein Assay (RPPA) unter Verwendung der Meso Scale Discovery Plattform gemessen.

FAC stellt niedermolekulares Eisen dar und kann einerseits unabhängig von Transferrin als sogenanntes NTBI (non transferrin bound iron) aufgenommen werden. Andererseits kann in der Gegenwart von Serum im Versuchsansatz das Eisen von FAC auch an das im Serum vorhandene Transferrin binden. Eisen kann dabei entweder an das im Serum vorhandene eisenfreie Apotransferrin binden, wodurch monoferrisches Transferrin und in weiterer Folge bei genügend Eisenangebot diferrisches Transferrin (auch als Holotransferrin bezeichnet) bilden.

Für die Eisenaufnahme in die Zellen ist im Wesentlichen Holotransferrin verantwortlich, da nur dieses eine hohe Affinität zum Transferrin-Rezeptor hat. Im Anschluss daran erfolgt die Aufnahme über Transferrinrezeptor-vermittelte Endozytose, wobei es zu einer Senkung der pH-Wertes auf pH5,5 in den gebildeten Endosomen kommt. Dadurch wird dann das Eisen von Transferrin freigesetzt, das Eisen dann weiter aus dem Endosom ins Zytosol transportiert wird. Im Zytosol angekommen ist das Eisen dann ein Teil des sogenannten zytosolischen labilen Eisenpools (LIP), der aus chelatierbarem Eisen besteht (Pantopoulos, 2004).

Der LIP ist für die posttranslationale Regulation der Expression von Ferritin, dem zytosolischen Eisenspeicherprotein verantwortlich. Kommt es zu einer Erhöhung des LIP wird über das IRE-IRP-System die Ferritin m-RNA stabilisiert und es kommt zu vermehrter Ferritin-Biosynthese (Muckenthaler et al., 2008).

In den Fibroblasten der beiden Kontrollpatienten ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der Ferritin-Expression zu beobachten, die die rasche transiente Erhöhung des labilen Eisenpools in diesen Zellen in der Vorstudie zu dieser Arbeit widerspiegelt. Bei den Fibroblasten der INAD-Patienten konnte ebenfalls eine Steigerung der Ferritin-Expression mit höheren FAC-Konzentrationen nach 24 Stunden beobachtet werden. Allerdings wurden um etwa 45 % geringere Ferritin-Level bei INAD-Betroffenen erreicht als in den alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollpatienten.

Eine mögliche Ursache könnte in einer von Drecourt und Kollegen beschriebenen fehlerhaften Palmitoylierung des Transferrin-Rezeptors (TfR1) und dadurch geringeren Zellmembrandichte liegen. Dadurch könnte die Aufnahme von FAC-Eisen und Beladung von Transferrin mit Eisen in die Zelle über Rezeptorvermittelte Endozytose weniger effektiv erfolgen. Diesem Phänomen der fehlerhaften bzw. verminderten Palmitoylierung könnte zu Grunde liegen, dass Acyl-CoA der einzige Acyl-Gruppen-Donor für Acyl-Transferasen ist. Somit würde ein CoA-Mangel bei PKAN-Patienten eine Verminderung der Palmitoylierung der Transferrin-Rezeptoren mit sich bringen. Dieses wurde auch bei Patienten mit einer PLA2G6 Mutation festgestellt. (Drecourt et al., 2018). Die abnormalen Eisenakkumulationen könnten also sowohl durch die Störung in der Palmitoylierung des TfR1 verursacht werden als auch durch die Verminderung des Recycling des Tf-Rezeptors (Petit et al., 2021). In dieser Hinsicht wären weitere Untersuchungen über einen längeren Zeitraum interessant, um herauszufinden ob nach längeren Inkubationszeiten mit FAC sich der Ferritin-Level angleicht.

In dieser Arbeit wurden neben FAC noch weitere Eisenquellen untersucht im Hinblick auf die Größe des intrazellulären zytosolischen labilen Eisenpools.

Dabei wurde eine zeitabhängige Inkubation mit den Eisenquellen durchgeführt und die Akkumulierung und Verstoffwechselung des Eisens und damit die Veränderung des LIP direkt in den lebenden Zellen verfolgt. Dies wurde mit der Calcein-AM Methode untersucht, wobei die

Fluoreszenz des Eisenchelators Calcein durch intrazelluläres labiles Eisen gequencht wird (Tenopoulou et al., 2007).

Hemin stellt, im Gegensatz zu FAC, Eisen in einer gebundenen Form dar. In Hemin bildet Eisen das Zentralion im Protoporphyrinring. Für die Aufnahme in Zellen wurden verschiedene Proteine vorgeschlagen wie HRG-1 (heme responsive gene 1) und FLVCR2 (feline leukemia virus subgroup C receptor related protein 2).

Intazellulär muss das Eisen dann aus dem Protoporphyrinring freigesetzt werden mittels Hämoxygenasespaltung. Das freigesetzte Eisen ist dann wieder Bestandteil des labilen Eisenpools. In allen Zelllinien konnte mit Hemin eine konstante Erhöhung des LIP über etwa 4 Stunden beobachtet werden, wobei der labile Eisenpool etwa konstant bei 250-300 % über dem ursprünglichen Wert lag. Bei dem am stärksten betroffenen INAD-Patienten (10-jähriger Junge) kam es zu einer extremen Erhöhung des LIP auf etwa 800 % des Ausgangswertes.

Der labile Eisenpool wird im physiologischen Zustand in relativ engen Grenzen gehalten, um die Bildung von Sauerstoffradikalen zu verhindern. Der beim am stärksten betroffenen Patienten beobachtete extreme Anstieg des labilen Eisenpools könnte mit dem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zusammenhängen, wo die üblichen transkriptionellen und posttranslationalen Regulationsmechanismen nicht mehr korrekt stattfinden.

Auch eine Überexpression der Hämoxygenase, die für die intrazelluläre Spaltung des Hemins und die Eisenfreisetzung benötigt wird, könnte in den Zellen des 10-jährigen INAD-Patienten vorliegen. Sinnvoll wäre daher eine Messung der Aktivität und Expression der Hämoxygenase in weiteren Studien zu untersuchen. Die Hämoxygenase katalysiert den Abbau von Häm zu Biliverdin, welches in weiterer Folge zu Bilirubin, einem Eisenion und einem Kohlenstoffmonoxid-Molekül reduziert wird. Eine erhöhte Hämoxygenase-Expression bzw Enzymaktivität könnte für die Patienten eine höhere Schutzfunktion auf zellulärer Ebene gegenüber Oxidantien und Radikalen mit sich bringen (Zhang et al., 2002).

In dieser Studie wurde neben FAC und Hemin auch noch eine Eisenquelle, die aus Eisennanopartikeln besteht, verwendet. Eisensaccharat besteht aus einem Eisen (III)-Kern und einer Kohlenhydrathülle aus Saccharose. Nanopartikel bilden in Gegenwart von Serumproteinen

eine sogenannte Proteincorona und die Aufnahme der Partikel erfolgt vermutlich über Pinozytose oder Endozytose, wobei die Nanopartikel intrazellulär metabolisiert werden müssen, um das Eisen freisetzen zu können. Dies könnte in den Endolysosomen in einem azidischen Milieu unter reduktiven Bedingungen erfolgen, wobei das Eisen für den labilen Eisenpool dabei freigesetzt wird. Bei Eisensaccharat konnte keine eindeutige Tendenz auf den labilen Eisenpool gefunden werden, bei den Fibroblasten des jüngeren INAD- Patienten (Patient 2) konnte nach ein bis vier Stunden Inkubation mit Eisensaccharat eine Erhöhung des LIP um 150-200% beobachtet werden, wohingegen beim im Krankheitsverlauf weiter fortgeschrittenen INAD-Patienten (Patient 3) ein kleineres LIP-Maximum nach 0,5 Stunden (120%) und ein größeres nach 3 Stunden (200%) beobachtet wurde, die übrigen Zeitpunkte aber LIP-Level unter dem Ausgangslevel lagen. Die höchsten erreichbaren LIP-Level lagen bei beiden INAD-Patienten über den LIP Werten der gepaarten gesunden Probanden. Die intrazelluläre Eisenfreisetzung die vermutlich reduktiven Bedingungen in einem sauren Milieu stattfinden muss scheint daher in einem größeren Ausmaß stattzufinden als in den Kontrollzellen. Hier wären weitere Untersuchungen zur Quantifizierung des zellulären Eisens sowie der Ferritin-Expression sinnvoll.

Eine Limitierung dieser Studie ist, dass nur zwei Paare von Patienten für diese Studie zur Verfügung standen die beide aus einer Zellsammlung vom NIGMS Human Genetic Cell Repository am Coriell Institute for Medical Research“ (Camden NJ, USA) bezogen wurden. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob in nicht betroffenen heterozygoten Carriern der PLA2G6-Mutation auch bereits Hinweise auf Veränderungen in der Eisenhomöostase vorliegen, die sich aber klinisch nicht auswirken.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BSA	Bovines Serum Albumin
CAL	Calcein
CAL-AM	Calcein-Acetoxymethylester
Co	Kontrolle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalenter Metalltransporter 1
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
Ex	Excitation/ Anregung
FAC	Eisen Ammoniumcitrat
Fib	Fibroblasten
FCS	Fetal Calf Serum
FPN	Ferroportin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)ethansulfonsäure
INAD	Infantile neuroaxonale Dystrophie
IRE	Iron Responsive Element
IRP	Iron Regularatory Protein
LAF	Lamina Air Flow
LIP	Labile iron pool (labiler Eisenpool)
MEME	Minimum Essential Medium Eagle
NBIA	Neurodegeneration with brain iron accumulation
PBS	Phosphate Buffer Saline
PLA2G6	Phospholipase A2 Gruppe VI
RPPA	Reverse Phase Protein Assay
SIH	Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon
TFR	Transferrin Rezeptor

6.2 Abbildungsverzeichnis

*Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.*

Abbildung 1: Eisenhomöostase (Ganz & Nemeth, 2012)	13
Abbildung 2: VICTOR 2 Photometer	23
Abbildung 3: Prinzip der RPPA	24
Abbildung 4: Sektor Imager 2400, MSD	27
Abbildung 5: Prinzip der Cal-AM-Messung (Kakhlon & Cabantchik, 2002)	29
Abbildung 6: Anthos Zenyth 3100	31
Abbildung 7: Einfluss von FAC auf den zytosolischen labilen Eisenpool	32
Abbildung 8: Einfluss von Hemin auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 1 und 2	33
Abbildung 9: Direkter Vergleich der Patienten 1 und 2 bei der Inkubation mit Hemin	34
Abbildung 10: Einfluss von Hemin auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 3 und 4	35
Abbildung 11: Direkter Vergleich der Patienten 3 und 4 bei der Inkubation mit Hemin	36
Abbildung 12: Einfluss von Venofer auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 1 und 2	37
Abbildung 13: Direkter Vergleich der Patienten 1 und 2 bei der Inkubation mit Venofer	38
Abbildung 14: Einfluss von Venofer auf den labilen Eisenpool in den Fibroblasten 3 und 4	39
Abbildung 15: Direkter Vergleich der Patienten 3 und 4 bei der Inkubation mit Venofer	40
Abbildung 16: Einfluss der Eisenbeladung mit FAC auf die Ferritinexpression	41
Abbildung 17: Einfluss von FAC auf die Ferritinkonzentration	42

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NBIA-Formen und deren klinische Symptomatik	10
Tabelle 2: Zelllinien	17
Tabelle 3: BSA-Konzentrationen	23
Tabelle 4: Ferritinstandards Pipettierschema	26

6.4 Literaturverzeichnis

- Atwal, P. S., Midei, M., Adams, D., Fay, A., Heerinckx, F., & Milner, P. (2020). The infantile neuroaxonal dystrophy rating scale (INAD-RS). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01479-5>
- Babin, P. L., Rao, S. N. R., Chacko, A., Alvina, F. B., Panwala, A., Panwala, L., & Fumagalli, D. C. (2018). Infantile Neuroaxonal Dystrophy: Diagnosis and Possible Treatments. *Frontiers in Genetics*, 9, 597. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00597>
- Boellner, S., & Becker, K.-F. (2015). Reverse Phase Protein Arrays—Quantitative Assessment of Multiple Biomarkers in Biopsies for Clinical Use. *Microarrays*, 4(2), 98–114. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020098>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chen-Roetling, J., Cai, Y., Lu, X., & Regan, R. F. (2014). Hemin Uptake and Release by Neurons and Glia. *Free radical research*, 48(2), 200–205. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.859386>
- De Domenico, I., McVey Ward, D., & Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 72–81. <https://doi.org/10.1038/nrm2295>
- Drecourt, A., Babbior, J., Dussiot, M., Petit, F., Goudin, N., Garfa-Traoré, M., Habarou, F., Bole-Feysot, C., Nitschké, P., Ottolenghi, C., Metodiev, M. D., Serre, V., Desguerre, I., Boddaert, N., Hermine, O., Munnich, A., & Rötig, A. (2018). Impaired Transferrin Re-

ceptor Palmitoylation and Recycling in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *American Journal of Human Genetics*, 102(2), 266–277.

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.003>

Ganz, T. (2007). Molecular Control of Iron Transport. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 394–400. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006070802>

Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), a011668.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011668>

Gregory, A., & Hayflick, S. (1993). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, G. Mirzaa, & A. Amemiya (Hrsg.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121988/>

Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood reviews*, 27(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003>

Hayflick, S. J., Kurian, M. A., & Hogarth, P. (2018). Neurodegeneration with brain iron accumulation. In *Handbook of Clinical Neurology* (Bd. 147, S. 293–305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00019-1>

Hentze, M. W., & Kuhn, L. C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8175–8182. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8175>

Kakhlon, O., & Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes¹ ¹This article is part of a series of reviews on

“Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(8), 1037–1046.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01006-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01006-7)

Kruger, N. J. (1994). The Bradford Method for Protein Quantitation. In J. M. Walker (Hrsg.), *Basic Protein and Peptide Protocols* (S. 9–15). Humana Press.

<https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>

Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research*, 531(1–2), 81–92.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004>

Lu, Y., Ling, S., Hegde, A. M., Byers, L. A., Coombes, K., Mills, G. B., & Akbani, R. (2016). Using reverse-phase protein arrays as pharmacodynamic assays for functional proteomics, biomarker discovery, and drug development in cancer. *Seminars in Oncology*, 43(4), 476–483. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.06.005>

Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Hentze, M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Review of Nutrition*, 28, 197–213. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>

Pantopoulos, K. (2004). Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1196/annals.1306.001>

Petit, F., Drecourt, A., Dussiot, M., Zangarelli, C., Hermine, O., Munnich, A., & Rötig, A.

(2021). Defective palmitoylation of transferrin receptor triggers iron overload in Friedreich ataxia fibroblasts. *Blood*, 137(15), 2090–2102.

<https://doi.org/10.1182/blood.2020006987>

- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V. H., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1926–1932. <https://doi.org/10.1172/JCI31370>
- Shevell, M. (2003). Hallervorden and History. *New England Journal of Medicine*, 348(1), 3–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMp020158>
- Tam, T. F., Leung-Toung, R., Li, W., Wang, Y., Karimian, K., & Spino, M. (2003). Iron chelator research: Past, present, and future. *Current Medicinal Chemistry*, 10(12), 983–995. <https://doi.org/10.2174/0929867033457593>
- Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.-T., Galaris, D., & Brunk, U. T. (2007). Does the calcein-AM method assay the total cellular „labile iron pool“ or only a fraction of it? *The Biochemical Journal*, 403(2), 261–266. <https://doi.org/10.1042/BJ20061840>
- Uggeri, J., Gatti, R., Belletti, S., Scandroglio, R., Corradini, R., Rotoli, B. M., & Orlandini, G. (2004). Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(5), 499–505. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0712-y>
- Zhang, M., Zhang, B. H., Chen, L., & An, W. (2002). Overexpression of heme oxygenase-1 protects smooth muscle cells against oxidative injury and inhibits cell proliferation. *Cell Research*, 12(2), 123–132. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290118>