



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Antioxidantien auf die Frataxinexpression

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Corinna Aichinger
Matrikel-Nummer: 0101569
Studienrichtung (lt. Studienblatt): Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer: Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

Wien, am 14.8.2008

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Abbildungsverzeichnis.....	V
III. Tabellenverzeichnis.....	VIII
IV. Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick.....	3
2.1 Friedreich´s Ataxie (FRDA).....	3
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Molekulare Genetik.....	4
2.1.2.1 Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang.....	6
2.1.3 Pathogenese.....	6
2.1.4 Friedreich´s Ataxie und oxidativer Stress.....	8
2.2 Frataxin (FXN).....	11
2.2.1 Mögliche Funktionen	13
2.2.1.1 Mitochondrialer Eisenmetabolismus.....	13
2.2.1.2 Frataxin als Eisenspeicherprotein	14
2.2.1.3 Frataxin und Biogenese von Eisen-Schwefel-Cluster.....	14
2.2.1.4 Frataxin und Häm-Biosynthese.....	15
2.2.1.5 Frataxin als Antioxidant.....	17
2.3 Mögliche Therapieformen	18
2.3.1 Antioxidantien.....	18
2.3.1.1 Idebenone	19
2.3.1.2 Vitamin E	20

2.3.1.3 N-Acetyl-Cystein (NAC)	21
2.3.1.4 Natrium-Selenit	22
2.3.1.5 Curcumin	23
2.3.1.6 Chlorophyllin	24
2.3.1.7 Ascorbinsäure	25
2.3.1.8 Kaffeesäure	26
2.3.1.9 Antioxidantien mit neuroprotektiver Wirkung	26
2.3.1.9.1 Ellagsäure	27
2.3.1.9.2 Ferulasäure	27
2.3.1.9.3 Resveratrol	28
2.3.2 Eisenchelatoren	28
2.3.3 Steigerung der Frataxinexpression	30

3. Material und Methoden32

3.1 Zellkultur32

3.1.1 Zelllinie	32
3.1.2 Herstellung des Zellkulturmediums	34
3.1.2.1 RPMI Medium	34
3.1.2.2 Komplementieren des RPMI Mediums	34
3.1.3 Kultivieren der SY5Y-Zelllinie	35
3.1.3.1 Splitten von adherenten Zellen	35
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	36
3.1.5 Einfrieren der Zellen	36
3.1.6 Auftauen der Zellen	37
3.1.7 Inkubation der Zellen	37
3.1.7.1 Verwendete Substanzen	38
3.1.8 Waschen und Einfrieren der inkubierten Zellen	40
3.1.9 Lysieren der Zellen	40
3.1.10 Proteinbestimmung nach Bradford	41

3.2 Sandwich-ELISA..... 42

3.2.1 ELISA Durchführung	44
3.2.1.1 ELISA-Auswertung im Graph Pad Prism	46

3.2.1.2 Student's t-Test	47
3.3 MSD-ELISA	47
3.3.1 MSD-ELISA-Durchführung	49
3.4 Real-Time-PCR	51
3.4.1 Quantifizierung der Genexpression.....	53
3.4.2 Auswertung der Real-Time-PCR-Ergebnisse	54
3.4.3 Real-Time-PCR-Durchführung.....	54
3.4.4 Lysieren der Zellen mit TRI-Reagenz zur RNA-Isolierung	54
3.4.5 Umschreibung der RNA in cDNA	56
3.4.6 StepOne Real-Time-PCR.....	57
4. Ergebnisse und Diskussion	59
4.1 Einfluss von Antioxidantien auf die Expression des Proteins Frataxin	59
4.1.1 Idebenone	60
4.1.2 N-Acetyl-Cystein (NAC)	61
4.1.3 Curcumin.....	63
4.1.4 Kaffeesäure	64
4.1.5 Ascorbinsäure.....	65
4.1.6 Mg-Chlorophyllin (CHLN).....	66
4.1.7 α -Tocopherol-Succinat und Trolox.....	67
4.1.8 Einfluss von Natrium-Selenit, Resveratrol, Ferulasäure und Ellagsäure auf die Frataxinexpression in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y ...	69
4.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4.2 Einfluss von Radikalbildner auf die Expression des Proteins Frataxin.....	70
4.2.1 Antimycin A.....	71
4.2.2 Eisen-III-Ammoniumcitrat (FAC)	72
4.2.3 Kupfersulfat (CuSO ₄).....	73
4.2.4 Tert-Butylhydroperoxid (TBH).....	73
4.3 Einfluss von Antioxidantien auf die Expression der Frataxin-mRNA in SH- SY5Y-Zellen.....	74
4.3.1 Ascorbinsäure.....	76

4.3.2 Mg-Chlorophyllin	77
4.3.3 Idebenone	78
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	78
5. Schlussbetrachtung	80
6. Zusammenfassung	83
7. Literaturverzeichnis	85

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Abbildung eines Friedreich Fuß und einer Friedreich Hand [http://www.fataxie.net/cms/upload/pdf/FA.pdf]	4
Abbildung 2	Das FXN-Gen befindet sich am längeren Teil (q) des Chromosoms 9, zwischen den Positionen 13 und 21.1 [ghr.nlm.nih.gov/gene=fxn].....	5
Abbildung 3	Funktion und oxidativer Stress in Friedreich's Ataxie [PANDOLFO; 2008].....	11
Abbildung 4	Frataxinstruktur [DHE - PAGANON et al., 2000]	12
Abbildung 5	Moleküloberfläche von Frataxin [DHE - PAGANON et al., 2000]	12
Abbildung 6	Rolle des Frataxins in ISC's und Hämsynthese [MACKENZIE et al., 2008].....	16
Abbildung 7	Strukturformel Idebenone [http://www.sigmaaldrich.com].....	19
Abbildung 8	Strukturformel Vitamin E [http://www.sigmaaldrich.com].....	20
Abbildung 9	Strukturformel NAC [http://www.sigmaaldrich.com].....	21
Abbildung 10	Strukturformel Natrium-Selenit [http://www.sigmaaldrich.com].....	22
Abbildung 11	Strukturformel Curcumin [http://www.sigmaaldrich.com]	23
Abbildung 12	Strukturformel Chlorophyllin (freie Säure) [http://chemdb2.niaid.nih.gov/struct_search/images/structures/ 154381.gif]	24
Abbildung 13	Strukturformel Ascorbinsäure [http://www.sigmaaldrich.com]	25
Abbildung 14	Strukturformel Kaffeesäure [http://www.sigmaaldrich.com]	26
Abbildung 15	Strukturformel Ellagsäure [http://www.sigmaaldrich.com].....	27
Abbildung 16	Strukturformel Ferulasäure [http://www.sigmaaldrich.com].....	27
Abbildung 17	Strukturformel Resveratrol [http://www.sigmaaldrich.com].....	28
Abbildung 18	SH-SY5Y Zellen[http://www.unilim.fr/theses/2003/sante/ 2003limo0008/these_body.html]	33
Abbildung 19	Schematische Darstellung eines Sandwich- ELISA's [http://www.cellsignal.com/ddt/elisa.html].....	43
Abbildung 20	Erstellung einer Eichgeraden im Graph Pad Prism.....	47
Abbildung 21	Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA auf einer MSD.....	48

Abbildung 22 Schematische Darstellung einer Real Time PCR mit TaqMan [®] - Sonde [http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001].	52
Abbildung 23 Einfluss einer Inkubation mit Idebenone (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	61
Abbildung 24 Einfluss einer Inkubation mit NAC (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	62
Abbildung 25 Einfluss einer Inkubation mit Curcumin (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	63
Abbildung 26 Einfluss einer Inkubation mit Kaffeesäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	64
Abbildung 27 Einfluss einer Inkubation mit Ascorbinsäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	65
Abbildung 28 Einfluss einer Inkubation mit Mg-Chlorophyllin (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	67
Abbildung 29 Einfluss einer Inkubation mit α -Tocopherol-Succinat (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	68
Abbildung 30 Einfluss einer Inkubation mit Trolox (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	69
Abbildung 31 Einfluss einer Inkubation mit Trolox (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	71
Abbildung 32 Einfluss einer Inkubation mit FAC (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	72
Abbildung 33 Einfluss einer Inkubation mit CuSO ₄ (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	73
Abbildung 34 Einfluss einer Inkubation mit TBH (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen	73
Abbildung 35 Frataxinexpression [GATCHEL et al., 2005]	75
Abbildung 36 Einfluss einer Inkubation mit Ascorbinsäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen	76
Abbildung 37 Einfluss einer Inkubation mit Mg-Chlorophyllin (24 Stunden) auf die Frataxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen	77

Abbildung 38 Einfluss einer Inkubation mit Idebenone (24 Stunden) auf die Fratxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen	78
--	----

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber 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.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Substanzen mit jeweiligem Pipettierschema	39
Tabelle 2	Mengenangaben Lysispuffer	40
Tabelle 3	Pipettierschema Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
Tabelle 4	Pipettierschema Frataxinstandards Sandwich-ELISA	45
Tabelle 5	Pipettieranordnung ELISA-Platte	45
Tabelle 6	Pipettierschema Frataxinstandards MSD-ELISA	50
Tabelle 7	Pipettierschema cDNA Reverse Transcription Kit	56
Tabelle 8	Thermocycler Programm	56
Tabelle 9	Pipettierschema Real Time PCR Master Mix	57

IV. Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
BML-210	N-(2-Aminophenyl)-N'-phenyloctanediamid
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CAPE	Kaffeesäurephenylethylester
CHLN	Chlorophyllin
COX-2	Cyclooxygenase-2
Deferiprone	3-hydroxy-1,2-dimethylpyridine-4-one
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ETF	Elektronübergangsflavoprotein
FAEE	Ferulasäure Ethyl Ester
FRDA	Friedreich's Ataxie
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GXP	Glutathionperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSC-20	Hitzeschockprotein 20
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1
iNOS	intrinsische Stickstoffmonoxid-Synthetase
ISC	Eisen-Schwefel-Cluster
ISC-S	Cystein Desulfurase
IscU	Eisen-Schwefel-Cluster scaffold Protein
MnSOD2	Mangan-Superoxide-Dismutase-2
NF-κB	nuklearer Faktor-kappa B

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCIH	2 – Pyridylcarboxaldehyd Isonicotinoyl Hydrazone
3-NP	3-Nitropropionsäure
PEC	peritoneal exudate cells
PIH	Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazon
PKC	Proteinkinase C
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SDS	Sodium dodecyl Sulfate
SOD	Superoxid–Dismutase
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
Verd.faktor	Verdünnungsfaktor
8-OH-dG	8 Hydroxy-2 '-Deoxyguanosin

1. Einleitung und Fragestellung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Auswirkung verschiedener Antioxidantien und Oxidantien auf die Expression von Frataxin, einem 18 kDalton schweren mitochondrialen Protein, untersucht.

Ein Frataxinmangel, welcher durch einen FXN-Gendefekt am Chromosom 9 ausgelöst wird, gilt als Ursache für die autosomal rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung Friedreich's Ataxie. Friedreich's Ataxie hat in Mitteleuropa eine Inzidenz von ungefähr 1 zu 30 000 – 50 000 [BENCZE et al., 2006] und ist somit die häufigste unter den erblichen Ataxien [SCHULZ, 2007]. Diese Krankheit manifestiert sich in der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter. Zu den Merkmalen der Friedreich's Ataxie gehören unter anderem Störungen des zentralen Nervensystems, progressive Glied- und Gangataxien, Skelettverformungen (Friedreich Fuß, Friedreich Hand, Skoliose), fehlende Sehnenreflexe in den unteren Extremitäten, Verlust des Lagesinns und des Vibrationsempfindens. Eine Kardiomyopathie zählt zu einer der Haupttodesursachen der langsam progressiven Krankheit [ALPER et al., 2003].

Die Pathogenese der Friedreich's Ataxie ist das Ergebnis einer mitochondrialen Dysfunktion. Es wird davon ausgegangen, dass eine zu geringe Menge des mitochondrialen Proteins Frataxin zu einer mitochondrialen Eisenakkumulation und bzw. oder zu einem Eisen-Schwefel-Cluster (ISC) Defekt führt. Dies bewirkt letztlich eine Beeinträchtigung der Energieproduktion in den Mitochondrien sowie eine Erhöhung von oxidativem Stress. Durch den Frataxinmangel betroffen sind primär Gewebe, welche einen hohen Anteil an Mitochondrien haben (z.B. Nervengewebe und Herzgewebe aber auch Leber und Milz).

Die genaue Funktion von Frataxin ist noch unklar. Man vermutet jedoch, dass Frataxin wichtige Funktionen bei der Synthese von ISC-Proteinen, der Regulation des zellulären Eisenhaushaltes und bei der Hämsynthese übernimmt [NAPOLI et al., 2006].

Weiters wird vermutet, dass erhöhter oxidativer Stress bei FRDA einerseits durch die Ansammlung von Hydroxylradikalen, die durch die Eisen-katalysierte Fenton-Reaktion verursacht werden, und/oder andererseits durch einen Mangel an ISC-Proteinen bzw. durch defekte ISC-Proteine entsteht [TOZZI et al., 2002]. Die mögliche Rolle von oxidativem Stress in der Pathogenese der Krankheit war bereits Anlass für die Durchführung einiger Therapieversuche mit Antioxidantien. Weitere Therapieansätze sind eine Behandlung mit Eisenchelatoren und mit Substanzen, welche die Frataxinexpression erhöhen.

Hauptziel dieser Diplomarbeit war es, den möglichen Einfluss von Antioxidantien wie z. B. Idebenone, Mg-Chlorophyllin, N-Acetyl-Cystein, Natrium-Selenit, Kaffeesäure und Curcumin, die bereits laut einigen Studien mit Friedreich's Ataxie in Verbindung gebracht werden konnten, auf die Frataxinexpression zu bestimmen. Weitere Untersuchungen wurden mit möglichen potentiellen Antioxidantien mit bekannter neuroprotektiver Wirkung wie z.B. Ascorbinsäure, Resveratrol, Ellagsäure und Ferulasäure durchgeführt.

Alle Versuche wurden an der humanen Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y durchgeführt. Die Änderung des Frataxingehalts auf Proteinebene wurde durch einen Sandwich-ELISA und durch einen MSD-ECCIA bestimmt. Mit der quantitativen Real-Time-PCR wurden Veränderungen der messenger-RNA-Expression untersucht.

Da dem Protein Frataxin auch eine antioxidative Wirkung zugesprochen wird, wurde im Zuge dieser Diplomarbeit die Auswirkung von induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner wie Antimycin A und TBH (Tert-Butylhydroperoxid) und durch Metalle wie Eisen und Kupfer (FAC, CuSo₄) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y Zellen untersucht.

2. Literaturüberblick

2.1 Friedreich's Ataxie (FRDA)

Als Ataxie wird eine allgemeine Störung der Koordination von Bewegungsabläufen, meist infolge von Asynergie und Dysmetrie, bezeichnet. Zeichen einer Ataxie sind Störungen der Okulomotorik und Diadochokinese, Dysarthrie, Intentionstremor, Stand-, Gang- und Rumpfataxie [PSCHYREMBEL, 1993].

Bei der Friedreich's Ataxie handelt es sich um eine spinale Form der Heredoataxie.

Sie ist eine autosomal, rezessiv vererbte, neurodegenerative Erkrankung, welche auf eine genetische Mutation am Chromosom 9/q13-q21.1. zurückzuführen ist.

Diese Mutation hat einen Mangel des Proteins Frataxin zur Folge [ALPER et al., 2003].

Friedreich's Ataxie wurde erstmals im Jahr 1863 vom Deutschen Internisten und Neurologen Nicolaus Friedreich (1825 - 1882) beschrieben.

Friedreich's Ataxie manifestiert sich in der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter. Bei ungefähr 20 Prozent der Patienten verläuft die Krankheit atypisch, indem sie sich erst nach dem 20. Lebensjahr manifestiert (Late-onset-FRDA) [ALPER et al., 2003].

Laut Harding gehören zu den Merkmalen der FRDA unter anderem Störungen des zentralen Nervensystems, insbesondere die Störungen der Pyramidenbahnen, progressive Glied- und Gangataxien, Skelettverformungen (Friedreich Fuß, Friedreich Hand, Skoliose), fehlende Sehnenreflexe in den unteren Extremitäten, Verlust des Lagesinns und des Vibrationsempfindens [HARDING et al., 1989].

Als weitere neurologische Störungen können okulomotorische Abnormalitäten, Nystagmus, Optikusatropie, Hörverlust und Diabetes mellitus auftreten.

Die sehr häufig auftretende Kardiomyopathie zählt zu einer der Haupttodesursachen der langsam progressiven Krankheit [ALPER et al., 2003].



Abbildung 1 Abbildung eines Friedreich Fuß und einer Friedreich Hand
[<http://www.fataxie.net/cms/upload/pdf/FA.pdf>]

2.1.1 Epidemiologie

Friedreich's Ataxie ist eine seltene, aber schwere neuromuskuläre Erkrankung. Die durchschnittliche Lebenserwartung von FRDA-Patienten beträgt je nach erstmaligem Auftreten der Erkrankung ungefähr 35 bis 50 Jahre. FRDA betrifft die männliche und weibliche europäischstämmige Bevölkerung gleichermaßen. Schätzungsweise 1 Prozent dieser Bevölkerung trägt das defekte Gen in sich. In Nordamerika und Europa gibt es ungefähr 20 000 Patienten. Alleine in den USA sind zirka 3 000 – 5 000 Menschen betroffen. Friedreich's Ataxie hat in Mitteleuropa eine Inzidenz von ungefähr 1 zu 30 000 – 50 000 [BENCZE et al., 2006], sie ist somit die häufigste unter den erblichen Ataxien [SCHULZ, 2007].

2.1.2 Molekulare Genetik

Friedreich's Ataxie wird durch einen genetischen Defekt in dem für Frataxin kodierenden Gen verursacht. Dieses Gen ist am Chromosom 9q13-q21.1 lokalisiert. Es wird als X25 oder FXN-Gen bezeichnet und beinhaltet sieben Exons. Es kodiert für Frataxin, ein aus 210 Aminosäuren bestehendes mitochondriales Protein.

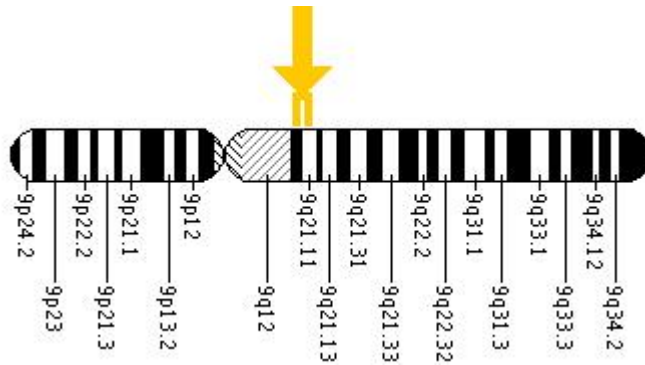


Abbildung 2 Das FXN-Gen befindet sich am längeren Teil (q) des Chromosoms 9, zwischen den Positionen 13 und 21.1 [ghr.nlm.nih.gov/gene=fxn]

Die Mutation, die als Ursache für die Friedreich's Ataxie gilt, ist im ersten Intron des Gens lokalisiert. Dabei handelt es sich um eine Expansion eines GAA (Guanin–Adenosin–Adenosin-Sequenz)–Triplet–Repeats. 98 Prozent der Patienten weisen diese GAA-Trinukleotid–Repeat-Sequenz auf beiden Allelen im ersten Intron des FXN-Gens auf. Es handelt sich dabei um die homozygote Form der Krankheit. Bei ungefähr 2 Prozent findet man diese GAA-Wiederholungen nur am ersten Allel, am zweiten findet man Punktmutationen. Normalerweise enthalten die Allele, auf denen sich die GAA-Wiederholungen befinden, 6 – 34 Wiederholungen. Bei den bei Friedreich's Ataxie Patienten expandierten Allelen befinden sich 66 bis 1700 Wiederholungen [WELLS et al., 2008]. Allele, die mehr als hundert GAA-Wiederholungen enthalten, neigen zur Expansion und können innerhalb einer Generation mehrere hundert Kopien expandieren [KRASILNIKOVA et al., 2004].

Die Folge dafür ist, dass die DNA an dieser Stelle keinen normalen Doppelhelix bilden kann, sondern sich ein DNA-Triplex („sticky“ DNA) bildet. Diese vermindert die Transkriptionsaktivität des FXN-Gens. Dies führt dazu, dass Frataxin nicht mehr ausreichend produziert werden kann.

2.1.2.1 Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang

Trotz der allgemeinen Genotyp-Phänotyp-Wechselbeziehung ist es nicht möglich, einen genauen Krankheitsverlauf vorherzusagen.

Das Erkrankungsalter, der Schweregrad der Krankheitssymptome sowie die Dauer bis zum Rollstuhlgebrauch korrelieren mit der Anzahl der GAA-Wiederholungen [WELLS et al., 2008] [DURR et al., 1996].

Weiters ist die Länge der GAA-Sequenz umgekehrt proportional zur Produktion von Frataxin [WELLS et al., 2008].

Die Reduktion von Frataxin messenger-RNA und des Proteins Frataxin ist proportional zur Größe der kleineren Allele mit den GAA-Wiederholungen [GELLERA et al., 2007].

Es scheint, dass GAA-Wiederholungen, die unter einer Allelengröße von 500 liegen, mit einem späteren Auftreten der ersten Symptome (Late-onset-Patienten) in Verbindung stehen [BHIDAYASIRI et al., 2005].

2.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese der Friedreich's Ataxie ist das Ergebnis einer mitochondrialen Dysfunktion. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass eine zu geringe Menge des mitochondrialen Proteins Frataxin zu einer mitochondrialen Eisenakkumulation und zu einem Defekt in der Eisen-Schwefel-Cluster (ISC) Synthese führt. Dies bewirkt letztlich eine Beeinträchtigung der Energieproduktion in den Mitochondrien sowie eine Erhöhung von oxidativem Stress. Primär durch den Frataxin-Mangel betroffen sind jene Gewebe, welche einen hohen Anteil an Mitochondrien haben wie z.B. Nervengewebe und Herzgewebe, aber auch Leber und Milz.

Im Hefemodell *Saccharomyces cerevisiae* wurde das Gen Yfh1p, welches ein Frataxinhomolog darstellt, identifiziert. Es wurde festgestellt, dass bei einem Mangel

am Yfh1p-Gen eine mitochondriale Eisenakkumulation, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, Zerstörung mitochondrialer DNA, verringerte Aktivität der ISC-Enzyme und verminderte Atmung auftritt [MUHLENHOFF et al., 2002].

Auch in Säugetierzellen mit Frataxinmangel wurde eine hohe Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress festgestellt [CHANTREL-GROUSSARD et al., 2001].

Dies konnte aber nicht im FRDA-Mausmodell beobachtet werden [SEZNEC et al., 2005]. Im Mausmodell tritt Eisenakkumulation erst im Endstadium der Erkrankung auf [PUCCIO et al., 2001]. Sturm et al. weisen jedoch darauf hin, dass die Rolle von Frataxin in Säugetierzellen komplizierter und umstrittener ist als die in der Hefe. So findet man nicht in allen Säugetierzellen mit Frataxinmangel mitochondriale Eisenansammlungen [STURM et al., 2005].

Die Biogenese der ISC-Proteine, welche am Hefemodell untersucht wurde, zeigte, dass Frataxin unter Nutzung einer Elektronentransportkette an der ISC-Synthese beteiligt ist. Frataxin spielt somit eine bedeutende Rolle in der Synthese der Enzyme der Atmungskettenkomplexe I-III und der Aconitase. Bei einer Herzbiopsie von Friedreich's Ataxie Patienten wurde ein Mangel an ISC-Proteine aufgedeckt [RÖTING et al. 1997]. In einem FRDA-Mausmodell fand man heraus, dass ein ISC-Protein-Mangel der Eisenhomöostase vorausgeht [PUCCIO et al., 2001].

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine mangelnde Frataxinexpression Veränderungen des zellulären Eisenhaushaltes verursachen sowie Defekte in den ISC's. Vermutlich wirkt Frataxin in der Eisenhomöostase des Mitochondriums mit, indem es bei der Eiseneliminierung agiert und so eventuell eine Eisenakkumulation verhindert. Freies Eisen führt zu einer Bildung freier Radikale, die wiederum zu Zellschäden führen. Folgen des Frataxinmangels sind somit unter anderem oxidativer Stress und verminderte oxidative Phosphorylierung.

Die genaue Funktion von Frataxin ist jedoch zum momentanen Zeitpunkt unklar.

2.1.4 Friedreich's Ataxie und oxidativer Stress

Eine Vielzahl von zellulären Verbindungen werden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) geschädigt. Sie entstehen unter anderem durch äußere Einflüsse oder im Zuge der oxidativen Phosphorylierung. Zellen besitzen diverse Schutzmechanismen, um freien Radikalen entgegenzuwirken. Durch verschiedene zelluläre Antioxidantien und antioxidative Enzyme wie Glutathion, Superoxid-Dismutase (SOD), Thioredoxin, Katalase und Peroxidase wird die übermäßige Radikalbildung vermieden. Reduzierende Verbindungen wie Glutathion wirken auch als Radikalfänger und machen diese unschädlich. Zwischen oxidativen und reduktiven Prozessen besteht normalerweise ein scheinbares dynamisches Gleichgewicht. Wenn dieses auf der Seite der oxidativen Reaktionen liegt, spricht man vom „oxidativem Stress“. Dabei reichern sich oxidierte Verbindungen an und schädigen auf verschiedene Weise die Zellen [BECKMAN et al., 1998]. Ein erhöhter Gehalt an Superoxiden und Peroxiden führt zu einer gesteigerten Glutathionperoxidase-Aktivität (GPx), welche diese durch reduziertes Glutathion (GSH) zu H₂O bzw. zu Alkoholen reduziert.

Napoli et al. stellten eine Erhöhung der GPx-Aktivität in FRDA-Lymphoblasten im Vergleich zu Kontroll-Lymphoblasten fest. Auch der Level an oxidiertem Glutathion (GSSG) ist in Zellen mit Frataxinmangel erhöht. Der erhöhte GSSG / GSH Level ist ein Indikator für erhöhten oxidativen Stress bei FRDA [NAPOLI et al., 2006].

Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion werden mit neurodegenerativen Störungen wie Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Friedreich's Ataxie in Verbindung gebracht. Der komplexe Zusammenhang von Frataxinmangel, verändertem Eisenhaushalt, verminderter Eisen-Schwefel-Protein-Aktivität und oxidativem Stress ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass der Grund für den oxidativen Stress eine durch Frataxinmangel bedingte mitochondriale Eisenakkumulation ist. Diese führt zu einer erhöhten Bildung von freien Radikalen durch die Fenton-Reaktion [TAN et al., 2001].

Bereits im Hefemodell konnte gezeigt werden, dass es bei Mangel des Frataxinhomologs Yfh1p zu einer vermehrten Reaktion gegenüber oxidativem Stress kommt.

Dies wurde auch an Gewebeproben von FRDA-Patienten [RÖTING et al., 1997], [BRADLEY et al., 2000], FRDA-Fibroblasten und FRDA-Lymphoblasten [WONG et al., 1999], [TAN et al., 2001] sowie an verschiedenen Frataxin Knock-out-Mausmodellen [PUCCIO et al., 2001], [RISTOW et al., 2003] festgestellt.

Erhöhter oxidativer Stress kann bei FRDA-Patienten anhand bestimmter Marker nachgewiesen werden [SCHULZ et al., 2000].

So wurden zum Beispiel im Urin von FRDA-Patienten erhöhte Konzentrationen von 8-OH-dG (8 Hydroxy-2'-Deoxyguanosin), einem Marker für oxidative DNA-Schäden, gefunden. Weiters fanden Edmond et al. erhöhte Konzentrationen des Lipidperoxidationsproduktes Malondialdehyd [EDMOND et al., 2000]. Piemonte et al. und Napoli et al. weisen auf eine Konzentrationssenkung des freien Glutathion im Blut der FRDA-Patienten hin [PIEMONTE et al., 2006] [NAPOLI et al., 2006].

Diese Studien unterstützen die Vermutung, dass freie Radikale eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie bei FRDA spielen [PUCCIO et al., 2002], [NAPOLI et al., 2006].

In Herzmuskelproben von FRDA-Patienten konnte eine verminderte oxidative Phosphorylierung, erhebliche Einschränkungen in den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen I und II/III sowie eine erniedrigte Akonitaseaktivität festgestellt werden. Dies kann in Verbindung gebracht werden mit niedrigeren Konzentrationen an mitochondrialer DNA und mit erhöhter Eisenakkumulation in Herz, Leber und Milz [BRADLEY et al., 2000].

In einem Modell, in dem Frataxin überexprimiert wurde, konnte man beobachten, dass eine Frataxinüberexpression zu einer vermehrten oxidativen Phosphorylierung führte [RISTOW et al., 2000].

Auch Shoichet et al. stellten fest, dass eine Überexpression von Frataxin in FRDA-Fibroblasten Schädigungen durch oxidativem Stress vermindert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Überexpression von Frataxin zu einer erhöhten antioxidativen

Abwehr führt und die durch ROS verursachten Schäden dadurch verringert. Dies wurde in Zellkulturen und im Mausmodell beobachtet [SHOICHET et al., 2002].

Es wird angenommen, dass oxidativer Stress in FRDA durch die verminderte Superoxid-Dismutase resultiert und letztendlich am neuronalen und zellulären Tod beteiligt ist. In FRDA-Fibroblasten, welche mit Eisen beladen wurden, wurde keine Erhöhung des mitochondrialen Enzyms MnSOD, ein Enzym das an der mitochondrialen antioxidativen Abwehr beteiligt ist, nachgewiesen [CHANTREL-GROUSSARD et al., 2001].

Sez nec et al. veröffentlichten anhand eines FRDA-Mausemodells eine Studie, laut der, im Gegensatz zur allgemeinen Erkenntnis, kein Zusammenhang zwischen Friedreich's Ataxie und oxidativem Stress besteht. Die Autoren beobachteten, dass ein kompletter Frataxinmangel in neuronalen Geweben weder oxidativen Stress verursachte noch die MnSOD-Expression änderte. Der mögliche Effekt einer erhöhten antioxidativen Abwehr wurde durch Verwendung einer Überexpression von MnSOD, Cu und ZnSOD ausgetestet [SEZNEC et al., 2005].

Laut Sturm et al. weisen Lymphoblasten und Fibroblasten von FRDA-Patienten trotz Reduktion von mitochondrialem Frataxin keine mitochondriale Eisenakkumulation auf. Weiters gab es keinen Hinweis auf eine Veränderung in der Eisenhämeostase bzw. im Eisenmetabolismus. Die Ergebnisse von Sturm et al. sind gegensätzlich zu der allgemeinen Vermutung, dass die Anhäufung von Eisen im Mitochondrium verantwortlich für den gesteigerten oxidativen Stress in FRDA-Zellen ist. Weitere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Frataxinmangel bei FRDA-Patienten auf einer defekten antioxidativen Abwehrreaktion gegen extramitochondriale Radikale beruht [STURM et al., 2005].

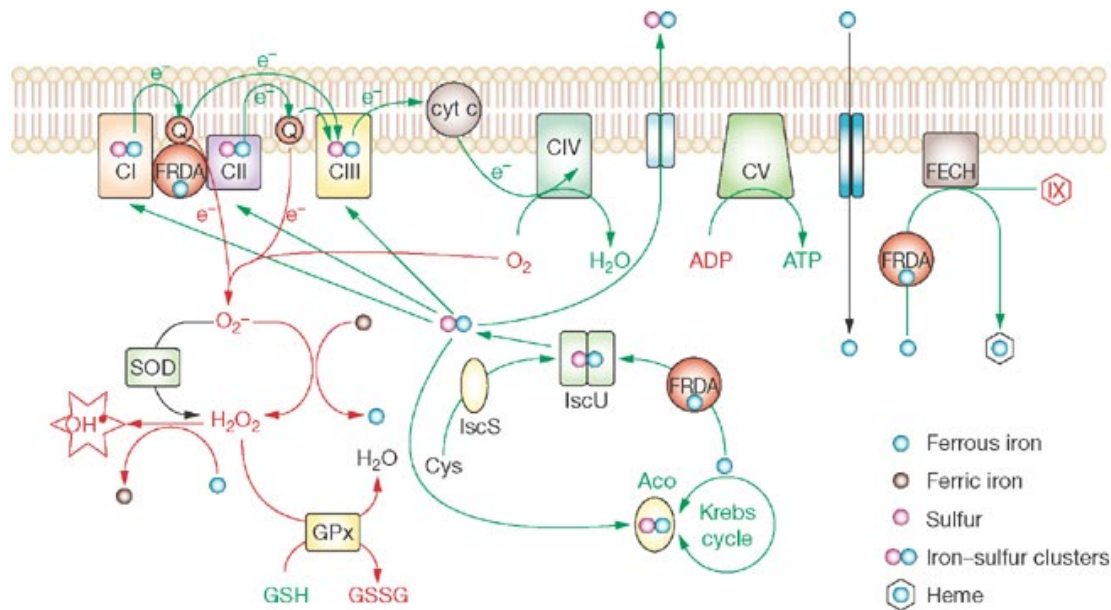


Abbildung 3 Funktion und oxidativer Stress in Friedreich's Ataxie [PANDOLFO; 2008]

Mehrere der vermuteten Frataxin-Funktionen sind in dieser Abbildung dargestellt, einschließlich die des Eisens in Bezug auf ISC's und die der Hämsynthese sowie die vermutliche Interaktion mit den Komplexen der Atmungskette. Die grünen Pfeile zeigen die verringerte Aktivität von Molekülen und Synthesewegen bei Frataxinmangel an. Die roten Pfeile weisen auf alle Aktivitäten hin, die bei Frataxinmangel steigen.

Abkürzungen: Aco, aconitase; Ci, Atmungskettenkomplex I; CII, Atmungskettenkomplex II; CIII, Atmungskettenkomplex III; CIV, Atmungskettenkomplex IV; CV, Atmungskettenkomplex V; Cys, Cystein; cyt c, Cytochrom c; e, Elektron; FECH, Ferrochelatase; FRDA, Frataxin; GPx, Glutathionperoxidase; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; IscS, Cystein desulfurase; IscU, Eisen-Schwefel-Cluster scaffold Protein; IX, Protoporphyrin IX; OH•, Hydroxylradikale; Q, Coenzym Q; SOD, Superoxiddismutase [PANDOLFO; 2008]

2.2 Frataxin (FXN)

Frataxin ist ein 18 kDalton schweres mitochondriales Protein, welches an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist. Es ist im menschlichen Gewebe ubiquitär exprimiert. Größere Konzentrationen findet man vor allem im Kleinhirn, in motorischen Nervenzellen, Pankreaszellen und Zellen des Herzmuskels. Beim Menschen sind

verschiedene Defekte des FXN-Gens auf Chromosom 9 bekannt. Die häufigste Mutation ist eine Expansion von GAA-Trinukleotiden im ersten Intron des Gens, welche eine verminderte Bildung von Frataxin zur Folge hat. Dieser Mangel an Frataxin gilt als Ursache für die neurodegenerative Erkrankung Friedreich's Ataxie.

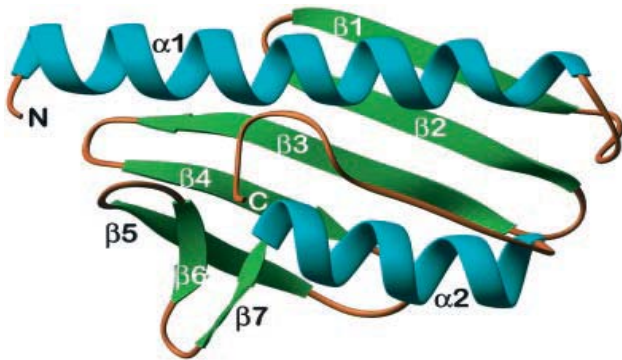


Abbildung 4 Frataxinstruktur [DHE - PAGANON et al., 2000]

Die Struktur vom menschlichen Frataxin ist ein kompaktes $\alpha\beta$ -Sandwich mit α Helices, welche in der oberen Abbildung türkis dargestellt sind, und β -Stränge, welche in grün abgebildet sind. Die Stränge $\beta 1$ – $\beta 5$ bilden ein nicht paralleles Faltblatt. Dieses flache Faltblatt interagiert mit den zwei zueinander fast parallel stehenden $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Helices. Die C-Termini von $\beta 5$ und der Stränge $\beta 6$ und $\beta 7$ bilden ein zweites, kleineres β -Faltblatt. Die Struktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse kristallisierter Proteine ermittelt [DHE-PAGANON et al., 2000].

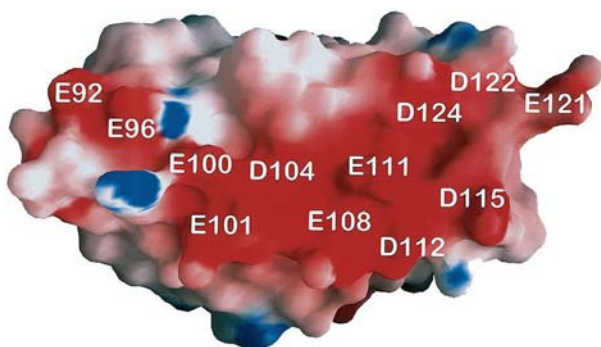


Abbildung 5 Moleküloberfläche von Frataxin [DHE - PAGANON et al., 2000]

2.2.1 Mögliche Funktionen

Frataxin wird eine Rolle im ISC-Metabolismus, im Häm-Metabolismus, im mitochondrialen ROS-Metabolismus, im Eisentransport, der Eisenspeicherung und bei der oxidativen Phosphorylierung zugesprochen [NAPOLI et al., 2006].

Trotz umfassender Studien ist die Funktion des Frataxins im Stoffwechsel noch immer nicht aufgeklärt. Dies liegt an den oft widersprüchlichen Ergebnissen zahlreicher Studien.

2.2.1.1 Mitochondrialer Eisenmetabolismus

Eisen ist in zahlreichen lebenswichtigen biologischen Prozessen involviert, unter anderem beim Sauerstofftransport, bei der oxidativen Phosphorylierung und bei der DNA-Biosynthese. Eisen ist ein Bestandteil wichtiger Proteine wie z.B. Hämoglobin, Cytochrome, Oxygenasen, Flavoproteinen und Redoxinen [HENTZE et al., 2004], [MACKENZIE et al., 2008]. Während zelluläres Eisen hauptsächlich im Zytoplasma gespeichert wird, findet man in den Mitochondrien den Hauptanteil des metabolisch aktiven Eisens. Ferritin ist ein Eisen speicherndes Protein in den Zellen. Es speichert Eisen in seiner nicht reaktiven Form als Fe^{3+} und ist verantwortlich für die Eliminierung des schädlichen, reaktiven Eisens. Weiters schützt Ferritin vor ROS-Bildung durch die Fenton-Reaktion. Ferritin kommt ubiquitär im Gewebe und im Plasma vor [MACKENZIE et al., 2008].

Eine Eisenakkumulation führt zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen, welche Schäden an Zellen, Organen und Geweben verursachen. Abweichungen vom normalen Eisenniveau konnten mit der Pathogenese des Alterns, mit neurodegenerativen Krankheiten, mit Krebs und Infektionen in Verbindung gebracht werden [BISHOP et al., 2002], [KAUR et al., 2004], [LEE et al., 2006].

2.2.1.2 Frataxin als Eisenspeicherprotein

Hauptsächlich wird Eisen in der Zelle im Eisenspeicherprotein Ferritin gespeichert. Ein geringer Teil des Eisens liegt in aktiver Form an Liganden gebunden vor und gilt als ein entscheidender Faktor in der Pathogenese verschiedener Formen der Zellschädigung.

Die Vermutung, Frataxin hätte die gleichen Funktionen wie das mitochondriale Ferritin, beruht auf Zellstudien. Bei diesen Versuchen entstanden durch Polymerisation von Frataxinmonomeren durch einen Überschuss an Eisen neue Frataxinnahe-moleküle. Diese hatten eine Ferroxidaseaktivität. Jedoch ist eine vermutliche Rolle von Frataxin als Eisenspeicherprotein noch sehr widersprüchlich. Trotzdem könnte Frataxin als Eisenchaperon eine Rolle spielen [PARK et al., 2003] [NAPIER et al., 2005].

2.2.1.3 Frataxin und Biogenese von Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster sind anorganische Cofaktoren zahlreicher Proteine. Sie sind ubiquitär in allen Organismen zu finden. Ihre Synthese findet im Mitochondrium statt, und sie übernehmen wichtige Aufgaben beim Elektronentransport, in der Genregulation, in Enzymkatalysen und in der Regulation der Eisenaufnahme. In Eukaryoten wird die Reifung dieser Proteine von drei komplexen Maschinerien übernommen. Zu den ISC-hältigen Proteinen zählen unter anderem die Enzyme Ferrochelatase, Aconitase, Succinat-Dehydrogenase, Enzyme der Atmungskettenkomplexe I und III sowie Enzyme des Zitratzyklus.

Obwohl die genaue Funktion von Frataxin im Stoffwechsel unklar ist, wird ihm eine Rolle in der Biosynthese und in der Reparatur von ISC's sowie ein Einfluss auf die Eisen-Bioverfügbarkeit zugesprochen [LILL et al., 2005].

An rekombinanten Frataxin ist dessen Interaktion mit den IscU-Proteinen (ISC scaffold Protein) und mit den ISC-Proteinen, Ferrochelatase, mitochondrialen Aconitase und ISD 11 gezeigt worden [YOON et al., 2004], [BULTEAU et al., 2004], [SHAN et al., 2007]. Experimente im Hefemodell haben gezeigt, dass das Frataxinhomolog Yfh1p eine Wirkung auf das Eisen-Schwefel-Protein Isu1 und der Cystein-Desulfurase Nsf1

hat. Ein Mangel an Yfh1p hemmt die Entwicklung der ISC-Proteine [MUHLENHOFF et al., 2003]. In der Hefe scheint Yfh1p als ein mitochondriales Eisenchaperon aufzutreten, das auf Mitglieder der ISC-Protein-Biosynthese mit Ferrochelatase, mit Succinatdehydrogenase und dem Elektronübertragungsflavoprotein ETF einwirkt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass es als Eisenspeicherprotein wirken [GERBER et al., 2003], [ZHANG et al., 2005], [GONZALEZ-CABO et al., 2005], [CAVADINI et al., 2002].

Napoli et al. wiesen erst kürzlich auf einen Defekt in der Aktivität der ISC-abhängigen Enzyme in FRDA-Lymphoblasten hin. Sie demonstrierten in vitro, dass das Protein Frataxin direkt mit mitochondrialem IscU2 interagiert, nicht aber mit ISC-S (Cystein Desulfurase), Rhodanat, HSP-20 (Hitzeschockprotein 20) oder Ferrochelatase. Die Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass die mangelnde Aktivität von Cytochrom C, Häm und Cytochromoxidase in mutierten Zellen vermutlich die Konsequenz eines ISC-Defekts sind [NAPOLI et al., 2006].

In einem FRDA-Mausmodell wurde gezeigt, dass Defekte in den ISC-Enzymen der Eisenansammlung und dem Zelltod voraus gehen [PUCCIO et al., 2001].

Eine Studie an menschlichen Zellen zeigte, dass Schädigungen an ISC-Enzymen im Anfangsstadium eines Frataxinmangels auftreten [STEHLING et al., 2004].

2.2.1.4 Frataxin und Häm-Biosynthese

Der Hämsyntheseweg ist deshalb in der Pathologie von FRDA von Interesse, weil der letzte Schritt in der Synthese sowohl Eisen als auch ISC-Proteine benötigt. Ferrochelatase, das letzte Enzym in der Hämbiosynthese, lagert Eisen in Protoporphyrin IX ein [SCHÖNFELD et al., 2005]. Mehrere Studien weisen auf eine Interaktion zwischen Frataxin und Ferrochelatase hin. Protoporphyrin IX senkt vermutlich die Frataxinexpression [YOON et al., 2004], [BECKER et al., 2002].

2.2.1.5 Frataxin als Antioxidans

Wie bereits im Kapitel 2.1.4 erwähnt, schützt eine Überexpression an Frataxin in FRDA-Fibroblasten diese vor Schädigungen durch oxidativem Stress.

Die durch ROS verursachten Schäden werden dadurch verringert [SHOICHET et al., 2002].

Eine neue Studie mit *Drosophila* kam zu dem Ergebnis, dass eine Frataxinüberexpression die Zellen vor oxidativem Stress schützt. Dies führte zur Verlängerung der Lebensdauer dieser Fliegen [RUNKO et al., 2008].

Turano et al. beobachteten eine Erhöhung der Frataxinexpression in FRDA-Lymphoblasten und Frataxin-überexprimierenden PC-12-Zellen, nachdem sie mit dem Oxidans 3-NP (3-Nitropropionsäure) behandelt worden waren [TURANO et al., 2003].

Auch Daniela Stupphan hat am Institut für Medizinische Chemie Wien im Zuge ihrer Diplomarbeit den Einfluss von induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner wie Antimycin A und TBH (Tert-Butylhydroperoxid) und durch Metalle wie Eisen und Kupfer (FAC, CuSo₄) untersucht und einen Anstieg der Frataxinexpression in K562-Zellen beobachtet.

Napoli et al. beobachteten eine mitochondriale ROS-Stimulation durch Antimycin A (hemmt Komplex III) in der Lymphoblastenkontrollgruppe. In den FRDA-Lymphoblasten führte eine Inkubation mit Antimycin A hingegen zu einer erheblich geringeren ROS-Stimulation. Wahrscheinlich besitzen die FRDA-Zellen eine Eigenschaft, welche die Induktion von ROS durch Antimycin A verringert wie z.B. eine Abnahme an Cytochrom C. Bei der Behandlung mit Rotenon, das den Komplex I hemmt, konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und FRDA-Lymphoblasten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte mit Zyanid (KCN) (hemmt Cytochrom Oxidase) in der Kontrolle ein signifikanter Anstieg an Superoxid festgestellt werden. In FRDA-Lymphoblasten konnte dies jedoch nicht beobachtet werden [NAPOLI et al., 2006], [TURRENS, 2003].

Es stellt sich die Frage, inwieweit Frataxin selbst ein Antioxidans ist oder antioxidative Wirkungen besitzt, um oxidativem Stress entgegenzuwirken, ob die Erhöhung von Frataxin in FRDA-Lymphoblasten, bei denen oxidativer Stress induziert wurde, eine direkte Folge der erhöhten mitochondrialen ROS Bildung ist, oder ob der Anstieg eine generelle Antwort auf oxidativem Stress ist.

2.3 Mögliche Therapieformen

Eine gezielte Therapie für Friedreich's Ataxie Patienten gibt es bis jetzt nicht. Eine Verbesserung des Allgemeinzustandes der FRDA-Patienten kann durch eine Therapie der Symptome und der Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes Mellitus erreicht werden. Hauptsächlich geschieht dies durch physikalische Maßnahmen wie Krankengymnastik, orthopädische Hilfsmittel und durch die konventionelle Therapie der Begleiterkrankungen.

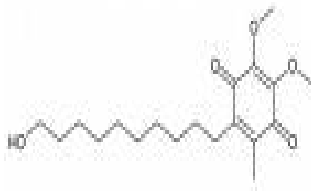
Mögliche therapeutisch wirksame Substanzen, die eventuell für die Behandlung von FRDA von Bedeutung sind, sind Thema mehrerer Studien. Die Ergebnisse sind aber oft widersprüchlich und unausgereift, da sie nur anhand von Zellmodellen erforscht wurden. Folgende Therapieformen werden zur Zeit diskutiert:

2.3.1 Antioxidantien

Es wird vermutet, dass erhöhter oxidativer Stress bei FRDA einerseits durch die Ansammlung von Hydroxylradikalen und/oder andererseits durch einen Mangel an ISC-Proteinen bzw. durch defekte ISC-Proteine entsteht [TOZZI et al., 2002]. Die mögliche Rolle des oxidativem Stress in der Pathogenese der Krankheit war Anlass für die Durchführung einiger Therapieversuche mit Antioxidantien.

Einige Antioxidantien wurden in Betracht gezogen, aber placebokontrollierte, doppelblinde Studien sind momentan nur mit Idebenone durchgeführt worden.

2.3.1.1 Idebenone



In den meisten Studien wurde das Benzochinon Idebenone, ein synthetisches kurzkettiges Analog des Coenzym Q10, verwendet. Es wird angenommen, dass Idebenone das Redox-Gleichgewicht und den Elektronenfluss in den Mitochondrien verbessert und dadurch die Energieproduktion in den Nerven- und Muskelzellen steigert. Weiters ist Idebenone ein sehr guter Radikalfänger [MARIOTTI et al., 2003].

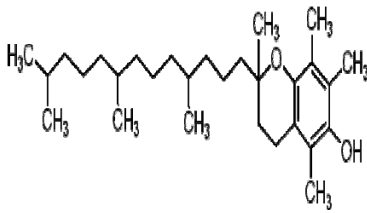
Abbildung 7 Strukturformel Idebenone [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Obwohl Idebenone zu einer Steigerung der Aktivität der Komplexe I bis IV, zu einer Aconitase-Aktivitätssteigerung und zur Abnahme der 8 Hydroxy-2'-Deoxyguanosin-Ausscheidung führte, konnte man bei den Patienten keine Verbesserung der neurologischen Symptome feststellen. Es wurde jedoch eine Verkleinerung der Herzhypertrophie beobachtet [RUSTIN et al., 2004], [SCHULZ et al., 2000], [BUYSE et al., 2003].

Eine erst kürzlich veröffentlichte prospektive Langzeit-Kohorten-Studie, an der 104 FRDA-Patienten teilnahmen, kam zu ähnlichen Ergebnissen. Darin wurden neurologische, kardiologische und okulomotorische Zeichen regelmäßig und systematisch über eine Zeitspanne von 7 Jahren ausgewertet. Wie bereits in vorangegangenen Studien kam es auch während dieser Studie zu einer langsamen Verschlechterung des neurologischen Zustands der FRDA-Patienten. Obwohl sich die Herzhypertrophie unter der Behandlung mit Idebenone verringerte, verbesserte sich die Herzfunktion nicht. In Bezug auf neurologische und okulomotorische Merkmale gab es keinen Unterschied zu FRDA-Patienten ohne Behandlung mit Idebenone. Die FRDA-Patienten wurden neurologisch eingestuft unter Verwendung der semiquantitativen International-Cooperative-Ataxia-Rating-Skala (ICARS) [RIBAI et al., 2007].

Zur Zeit findet in den USA und in Europa eine Phase-II-III Studie mit dem Ziel die Wirksamkeit von Idebenone für die Behandlung von neurologischen Störungen bei FRDA zu testen, statt [FRIEDMANN et al., 2008].

2.3.1.2 Vitamin E



Da FRDA der Ataxie mit Vitamin E Mangel (AVED) klinisch sehr ähnlich ist, hoffte man auch bei FRDA auf einen Therapieerfolg mit Vitamin E Supplementen.

AVED wird durch einen Defekt im α -Tocopheroltransferprotein verursacht und führt durch

erhöhte Gaben von Vitamin E zu einer Verbesserung der Symptomatik. Bei FRDA konnte aber bereits in kleinen Open-Label-Versuchen mit Vitamin E kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden [KÖNIG; 2001]. Die Kombination mit anderen Antioxidantien lässt jedoch auf eine positive synergetische Wirkung hoffen.

Abbildung 8 Strukturformel Vitamin E [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Rustin et al. stellten bei zehn FRDA Patienten bei Gabe von Coenzym Q10 (400 mg/Tag) und Vitamin E (2.100 IU/Tag) über einen Zeitraum von 6 Monaten eine Erhöhung des Herzphosphocreatin:ATP-Verhältnisses fest. Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits vorangegangene Studien [RUSTIN et al., 2004], [SCHULZ et al., 2000], [BUYSE et al., 2003]. Auch Hart et al. beobachteten während einer 3-jährigen Therapie mit Coenzym Q10 und Vitamin E eine bedeutende Verbesserung der Herz- und Skelettmuskelbioenergetik. Die Steigerung der mitochondrialen Energiesynthese ging mit einer langsameren Entwicklung bestimmter klinischer Merkmale und einer bedeutenden Verbesserung der Herzfunktion einher [HART et al., 2005].

Auch eine equimolare Mischung von Idebenone und Vitamin E wirkt stärker gegen oxidativen Stress in FRDA-Fibroblasten als die jeweilige Substanz alleine. Eine erhöhte Abwehr gegen oxidativen Stress wurde auch mit einem neuen synthetischen Antioxidant (Fe-Aox 29), welches die aktiven Gruppen von Idebenone und von Vitamin E vereint, beobachtet [JAUSLIN et al., 2007].

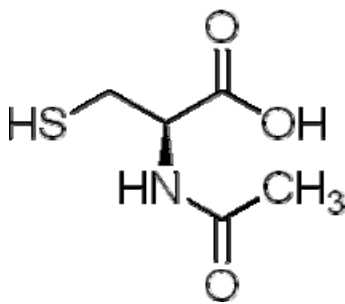
Die Wirksamkeit dieser Antioxidantien in den Mitochondrien ist jedoch begrenzt. Da sie sich im extrazellulären und intrazellulären Raum verteilen, sammelt sich nur ein kleiner Teil in den Mitochondrien an. Durch eine Änderung der Ubichinonstruktur kann

man eine Verstärkung der antioxidativen Wirkung von Vitamin E und Idebenone herbeiführen. Dadurch kann ihre Konzentration in den Mitochondrien erhöht werden.

Die Antioxidantien werden mit einem lipophilen Kation verbunden. Die daraus entstehenden mitochondrienspezifischen Antioxidantien MitoQ und Mito E zeigen in FRDA-Fibroblasten einen stark erhöhten Schutz vor endogenem oxidativem Stress an. Mito E ist 350 mal effektiver als das Vitamin E Analog Trolox [JAUSLIN et al., 2003].

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin E Analog. Es hemmt die Lipidperoxidation und schützt den Komplex IV vor NO induzierten Schäden [CALABRESE et al., 2006].

2.3.1.3 N-Acetyl-Cystein (NAC)



N-Acetyl-Cystein ist ein etabliertes Mukolytikum. Es regt die Glutathionsynthese an und fungiert als Radikalfänger. Seine schützende Wirkung als Antioxidans ist in mehreren Zellstudien demonstriert worden. NAC verhindert die Apoptose in neuronalen Zellen. In Zellen der glatten Muskulatur scheint es jedoch Apoptose zu verursachen. Es wird berichtet, dass es die HIV-Reproduktion hemmt. Vermutlich dient es als Substrat für mikrosomale Glutathiontransferase [AITIO; 2006]

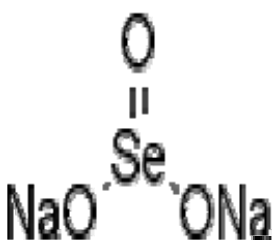
Abbildung 9 Strukturformel NAC [<http://www.sigmaaldrich.com>]

In synaptischen Mitochondrien von alten Mäusen erhöht NAC, in vivo und in vitro, die Aktivität in den Komplexen I und IV. Aufgrund der oben genannten Wirkungen und der Unbedenklichkeit hinsichtlich der Toxizität vermutet Banaclocha, dass das Thiol NAC eine Behandlungsmöglichkeit für neurodegenerative Erkrankungen darstellt [BANACLOCHA; 2001].

In den 90-iger Jahren nahmen viele FRDA-Patienten NAC häufig in Verbindung mit Selen und anderen Antioxidantien. Einen wissenschaftlichen Beweis für die positive Wirkung von NAC gab es jedoch nicht [PANDOLFO; 2008].

Studien an embryonalen P19-Zellen weisen auf einen schützenden Effekt hin, der relevant für FRDA-Patienten sein könnte. Die Behandlung mit NAC führte jedoch nur bei der Zelllinie P19 zu einem Anstieg an überlebenden Zellen und zu einer Abnahme der ROS. Bei den zu Neuronen differenzierten Zellen mit Frataxinmangel zeigte NAC keine Wirkung [SANTOS et al., 2001].

2.3.1.4 Natrium-Selenit



Selen wirkt als Antioxidans, da es in Selenoenzymen wie Glutathionperoxidase (GPx) und Thioredoxinreduktase enthalten ist. Diese ubiquitär vorkommenden Enzyme haben unter anderem einen Einfluss auf die Arachidonsäurekaskade und auf die Aktivierung der NF-κB-Transkription. Selen wird für die GPx-Aktivität, welche für die Entgiftung von Peroxiden verantwortlich ist, benötigt. Natrium-Selenit wird bei Studien über Zellproliferation und in der Krebsforschung eingesetzt [FORCEVILLE et al., 2007].

Abbildung 10 Strukturformel Natrium-Selenit [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Einen weiteren Therapieansatz für FRDA-Patienten könnte die Gabe von Selen darstellen, da ein Mangel an diesem Mikronährstoff auch bei FRDA-Patienten beobachtet wurde.

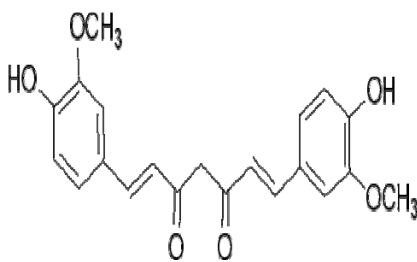
Mit Selen inkubierte FRDA-Fibroblasten weisen eine Steigerung in der Entwicklungsfähigkeit auf. Basale Selenkonzentrationen genügen jedoch nicht, um eine ausreichende Zunahme der GPx-Aktivität in FRDA-Fibroblasten zu gewährleisten. Laut den Ergebnissen dieser Studie könnte die verminderte GPx-Aktivität bei FRDA-Patienten auf einen Selenmangel zurückzuführen sein [JAUSLIN et al., 2002].

Es gibt histologische Ähnlichkeiten zwischen der Kardiomyopathie bei FRDA-Patienten und der Keshan-Krankheit, welche durch einen Selenmangel ausgelöst wird. Ein zu niedriger Selenstatus mindert die selenabhängige Glutathionperoxidase-Aktivität. Calabrese et al. weisen darauf hin, dass eine Selensupplementierung die

antioxidative Aktivität der myokardialen Glutathionperoxidase normalisieren könnte und somit eine für FRDA typische Kardiomyopathie verzögern würde [CALABRESE et al., 2005].

Helveston et al. beobachteten bei einer 21-jährigen Frau mit FRDA einen Anstieg der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase-Aktivität nach einer 13-monatigen Behandlung mit Selen. Der erhöhte Gehalt an ROS sank und man konnte neurologische Verbesserungen betreffend die Ataxie und das Vibrationsempfindens in ihren Beinen beobachten. Auch Helveston et al. vermuten, dass ein Selenmangel, wie er bei FRDA auftritt, ein Grund für den gesteigerten Umsatz von antioxidativ wirkenden Enzymen und deren Cofaktoren ist [HELVESTON et al., 1996].

2.3.1.5 Curcumin



Das aus der Wurzel der Curcuma Longa Pflanze gewonnene Curcumin (Diferuloylmethan) wird als Lebensmittelzusatzstoff und als Gewürz verwendet. Curcumin, ein natürliches Phenol, hemmt die Lipidperoxidation, entgiftet ROS sowie freie NO-

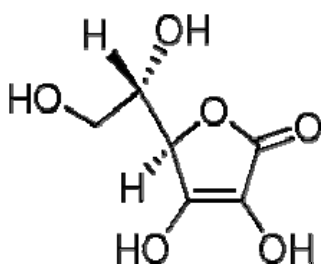
Radikale. Es interagiert mit Glutathion, hemmt die EGFR-Tyrosinkinase und die I κ B-Kinase. Neben der antioxidativen Wirkung wird Curcumin auch eine Funktion als Entzündungshemmer, als Amyloidaktivitätshemmer und als Anti-Tumor-Mittel zugesprochen. In vivo Studien zeigen, dass Curcumin Apoptose in Krebszellen initiiert und die Proteinkinase C (PKC) Aktivität hemmt. In vitro konnte eine antiproliferative Aktivität gegen Tumorzellen festgestellt werden [COLE et al., 2007].

Abbildung 11 Strukturformel Curcumin [http://www.sigmaaldrich.com]

Curcumin wird eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen. Studien an Neuroblastoma Zellen zeigten, dass es die NF- κ B-Aktivierung hemmt und neuronale Zellen vor dem Zelltod schützt. Es wird berichtet, dass Curcumin das Heat-Schock-Protein HO-1 (Häm

Trotz der Vermutung, dass CHLN intestinal schlecht absorbiert wird, konnte Sharma et al. eine immunmodulierende Wirkung nachweisen. Eine Behandlung mit Chlorophyllin führte bei Mäusen zu einer Vergrößerung der Milz und zur Zunahme der Peritonealexsudatzellen (PEC), T-Zellen, B-Zellen und der Makrophagen in der Milz. Auch die humorale und zelluläre Immunantwort konnte mit gesteigert werden [SHARMA et al., 2007].

2.3.1.7 Ascorbinsäure



Vitamin C hat eine antioxidative und eine pro-oxidative Wirkung. Ascorbinsäure stärkt die zelluläre Immunabwehr und die hormonelle Abwehr. Sie ist ein Cofaktor für die Enzyme Hydroxylase und Monooxygenase, welche in der Synthese von Kollagen, Carnitin und von Neurotransmittern involviert sind. Somit ist Ascorbinsäure ein wichtiger Cofaktor bei Hydroxylierungsreaktionen und spielt eine Rolle beim Aufbau von Aminosäuren. Unter anderem konnte auch eine neuroprotektive Wirkung beobachtet werden [NAIDU; 2003].

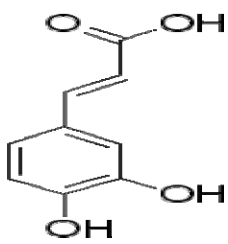
Abbildung 13 Strukturformel Ascorbinsäure [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Ascorbinsäure steigert die Verfügbarkeit und die Absorption des Eisens aus nicht-Häm-Eisenquellen. Es wurde beobachtet, dass eine Supplementierung mit Ascorbinsäure die Eisenabsorption aus der Nahrung verbessert. Weiters wird vermutet, dass in Anwesenheit von aktivem Eisen, Ascorbinsäure pro-oxidativ wirkt und zur Bildung von Hydroxylradikalen beiträgt, welche oxidative Schäden an Biomolekülen verursachen. Proteggente et al., konnten jedoch weder bei Anwesenheit noch bei Abwesenheit von Eisen einen DNA-Schaden, der aufgrund einer Ascorbinsäuresupplementierung vermutet wurde, beobachten [NAIDU; 2003], [PROTEGGENTE et al., 2000].

Berger et al. beobachteten, dass die Lipidperoxidation, welche durch eine Eisenakkumulation im menschlichen Plasma verursacht wurde, durch Ascorbinsäure gehemmt wurde [BERGER et al., 1992].

Rustin et al. vermuten, dass hochdosierte Konzentrationen an Antioxidantien wie Vitamin C und Glutathion den Eisenüberschuss im Mitochondrium vom Oxidationsstatus Fe^{3+} auf Fe^{2+} reduzieren und dabei vermehrt ROS katalysieren [RUSTIN et al., 1999].

2.3.1.8 Kaffeesäure



Kaffeesäure ist ein phenolischer Pflanzenbestandteil mit einer antioxidativen Wirkung. Sie hemmt die Synthese von Leukotrienen, welche in der Immunregulation, bei Entzündungen und bei Allergien involviert sind. Kaffeesäure hemmt die durch Cu^{2+} induzierte LDL-Oxidation [OLTHOF et al., 2001].

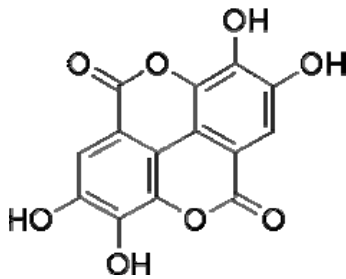
Abbildung 14 Strukturformel Kaffeesäure [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Kaffeesäurephenylethylester (CAPE), ein Derivat der Kaffeesäure, zeigte im Zellmodell eine Wirkung als HO-1-Induktor. HO-1 (Hämoxygenase 1) Induktion ist vermutlich ein potentieller Schutz gegen oxidativen Stress im Gehirn. Es gibt eine Ähnlichkeit zwischen CAPE und Curcumin. CAPE wirkt auch entzündungshemmend, antioxidativ, immunmodulierend und anti-kanzerogen. Es scheint, dass CAPE die Aktivität von antioxidativen Enzymen und Hämoxygenase beeinflusst [CALABRESE et al., 2005].

2.3.1.9 Antioxidantien mit neuroprotektiver Wirkung

Polyphenole sind als potentielle Radikalfänger und Antioxidantien bekannt. Sie zeigen diese Wirkungen in kultivierten Zellen und in vivo. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass Bevölkerungen, deren Ernährung einen hohen Gehalt an diesen Phytochemikalien aufweist, eine geringere Inzidenz haben an chronischen Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen wie z.B. Atherosklerose, Diabetes, neurodegenerative Erkrankungen und Krebs, zu erkranken.

2.3.1.9.1 Ellagsäure

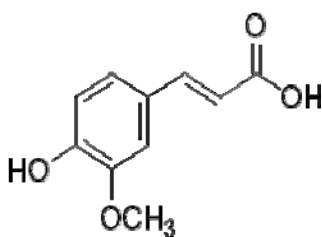


Ellagsäure ist ein pflanzliches Polyphenol, welches in Früchten und Beeren enthalten ist. Polyphenole sind bekannt für ihr großes antioxidatives Potenzial. Die Ellagsäure ist ein idealer Radikalfänger. Sie schützt die DNA–Doppelhelix vor Schädigungen durch karzinogene Stoffe und wirkt somit antimutagen, antikanzerogen und entzündungshemmend. Im Norepinephrin–Myocarditis–Ratten-Modell zeigte die Ellagsäure auch eine kardioprotektive Wirkung [LAKOVLEVA et al., 1998].

Abbildung 15 Strukturformel Ellagsäure [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass Ellagsäure die Apoptose in menschlichen pankreatischen Adenokarzinomzellen stimuliert und die Proliferation um das 20-fache senkt. Ellagsäure hat zwar keinen direkten Einfluss auf die Mitochondrien, aber sie stimuliert in den Karzinomzellen den mitochondrialen Apoptoseweg, welcher in Zusammenhang mit mitochondrialer Depolarisation und der Cytochrom-C-Abgabe steht [EDDERKAOUÏ et al., 2008].

2.3.1.9.2 Ferulasäure



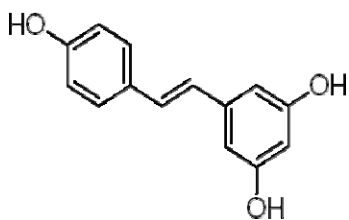
Ferulasäure ist ein natürliches Antioxidant und ist im Weizen, Mais, Reis, Tomaten, Spinat und Kohl enthalten. Neben der Wirkung als Radikalfänger besitzt sie auch eine entzündungshemmende und eine neuroprotektive Wirkung.

Laut Cheng et al. deutet die durch Ferulasäure induzierte verringerte interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)-Expression in der mRNA in zerebral ischämischen Ratten auf eine neuroprotektive Wirkung gegen einen durch oxidativen Stress ausgelösten Zelltod hin [CHENG et al., 2008].

Abbildung 16 Strukturformel Ferulasäure [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Sultana et al. verweisen auf eine neuroprotektive Wirkung von Ferulasäure-Ethyl-Ester (FAEE) in Bezug auf oxidativem Stress und Neurotoxizität. Nach einer Behandlung mit FAEE erhöhte sich die Häm-Oxygenase-1 und das Hitzeschockprotein-72-Level, welches wahrscheinlich Neuronen vor induziertem oxidativem Stress durch β -Amyloid-Peptid (1-42) schützt [SULTANA et al., 2005].

2.3.1.9.3 Resveratrol



Ein weiteres Polyphenol mit hoher antioxidativer Wirkung ist Resveratrol. Es verschließt direkt an den Mitochondrien die „Protonenleaks“ und neutralisiert gleichzeitig reaktive Sauerstoffradikale [LEONARD et al., 2003].

Abbildung 17 Strukturformel Resveratrol [<http://www.sigmaaldrich.com>]

Es stimuliert körpereigene antioxidative Enzymsysteme wie Superoxiddismutase und Katalase und verhindert die Lipidperoxidation. Weitere Funktionen sind Hemmung der Plättchenaggregation, Vasodilation und Hemmung von Entzündungsfaktoren. Es hemmt die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die intrinsische Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS). Resveratrol hemmt in vitro das NF- κ B. Resveratrol schützte in vivo vor ischämischen Schäden während der myokardialen Infarktbildung [TSAI et al., 1999], [BAUR et al., 2006].

An Ratten konnte in vivo eine neuroprotektive Wirkung von Resveratrol nachgewiesen werden [SAVASKAN et al., 2003].

2.3.2 Eisenchelatoren

Eisenchelatoren besitzen die Eigenschaft, Eisen zu binden. Sie werden zur Behandlung von Krebs und Krankheiten eingesetzt, bei denen eine Eisenakkumulation auftritt. Durch eine Koordination mit intrazellulärem und extrazellulärem Eisen fördern sie die

Ausscheidung und folglich die Entleerung von Eisen aus den biologischen Systemen. Eisenchelatoren bestehen aus verschiedenen bidentaten, tridentaten und hexadentaten Liganden, wobei deren jeweiligen Atome in der Lage sind, mit Eisen oktaedrische Komplexe zu bilden. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte der Einsatz mitochondrienspezifischer Eisenchelatoren eine mögliche Therapie zur Senkung des intramitochondrialen Eisenüberschusses bei FRDA sein [KALINOWSKI et al., 2005].

In Zellstudien konnte gezeigt werden, dass die spezifischen mitochondrialen Eisenchelatoren Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazon (PIH) und 2 – Pyridylcarboxaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon Analog (PCIH) die mitochondriale Eisenakkumulation vermindern können [MACKENZIE et al., 2008].

Vor kurzem wurde eine Studie, bei der 20 – 30 mg Deferiprone (3-hydroxy-1,2-dimethylpyridine-4-one) pro kg an FRDA-Patienten verabreicht wurden, präsentiert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Eisenchelatoren Funktionen hinsichtlich Membranpermeabilität, Überwindung der Blut–Hirn–Schranke und Übertragung von chelatiertem Eisen auf Transferrin übernehmen. Weiters senken Eisenchelatoren die Eisenansammlung im Gehirn, ohne dabei eine hämatologische oder neurologische schädliche Wirkungen zu haben [BODDAERT et al., 2007].

Laut Sohn et al. erleichtert der oral aktive Eisenchelator Deferiprone die Eisenübertragung vom Extrazellulärraum in den Kern und in das Mitochondrium, vom Kern zum Mitochondrium, vom Endosom zum Kern und von den intrazellulären Kompartimenten auf extrazelluläres Apotransferrin. Außerdem mobilisierte es Eisen von eisengeladenen Zellen für die Hämoglobinsynthese, egal ob Transferrin vorhanden ist oder nicht. Deferiprone könnte aufgrund dieser Ergebnisse die mitochondriale Eisenakkumulation, wie sie bei FRDA-Patienten beschrieben wird, vermindern und wäre somit eine Therapiemöglichkeit zur Behandlung dieser Krankheit [SOHN et al., 2008].

Nicht spezifische Eisenchelatoren wie z.B. Desferrioxamin sind nicht geeignet für eine spezifische Reduktion einer mitochondrialen Eisenansammlung [RICHARDSON et al., 2001].

Bei einer Studie an FRDA-Patienten wurden als Parameter Serumeisen und Serumferritin beobachtet. Bei allen FRDA-Patienten waren die Messdaten im normalen Bereich. Laut Lodi et al. sind diese Resultate nicht völlig unerwartet, da vermutet wird, dass es sich bei FRDA eher um eine Umverteilung des Eisens als um eine Zunahme des Gesamteisenspeichers handelt. Studien am FRDA-Hefemodell zeigten eine kleine Zunahme des zellulären Gesamteisens in Verbindung mit einer Erhöhung des mitochondrialen Eisengehaltes um das 10 - 12-fache. Ähnliche Ansammlungen von intramitochondrialem Eisen sind in Fibroblasten und in Herzproben der FRDA-Patienten gefunden worden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine Therapie mit Eisenchelatoren nicht geeignet ist [LODI et al., 2006].

2.3.3 Steigerung der Frataxinexpression

Da eine verminderte Frataxinexpression Ursache der Friedreich's Ataxie ist, wurde in einigen Studien nach Wirkstoffen, welche die Frataxinexpression steigern, gesucht. Eine Erhöhung des Frataxins konnte im Zellmodell bei Hämin, Natriumbutyrat [SARSERO et al., 2003], Cisplatin [GAZIZADEH et al., 2003] und Erythropoietin festgestellt werden [STURM et al., 2005].

Gefunden wurden auch DNA-Sequenz-spezifische Polyamide und Chemikalien, die an die GAA-Triplets spezifisch binden können, wodurch die Anordnung des Triplets verändert wird. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung der Frataxintranskription.

Weitere Versuche, die Frataxinexpression bei FRDA zu steigern, wurden mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie BML-210 (N-(2-Aminophenyl)-N'-Phenyl-octandiamid), welches die Abnahme der Frataxinexpression durch Chromatinrelaxation (Lysinacetylierung von Histon H3 und H4) rückgängig macht, durchgeführt [HERMAN et al., 2006], [MACKENZIE et al., 2008]. Auch Pandolfo sieht in der Wiederherstellung der Frataxintranskription eine Möglichkeit für die Behandlung von FRDA. Histon-Deacetylase-Inhibitoren könnten diesbezüglich einen positiven Effekt haben [PANDOLFO, 2008].

Um den möglichen therapeutischen Nutzen dieser Substanzen zu bestätigen, bedarf es jedoch noch vieler umfassender klinischer Studien. Von Interesse könnte auch eine Gentherapie mit dem Ziel der Steigerung der Frataxinexpression sein.

Obwohl es viele verschiedene Forschungsansätze bzw. Therapievorschläge gibt, können diese nur die Symptome der FRDA verzögern bzw. vermindern. Eine Heilung der Krankheit ist damit jedoch zur Zeit noch nicht möglich.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Mit Zellkulturen wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Gegenstände wie Glaspipetten, Glasflaschen und Pasteurpipetten werden mit einem Sterilisierband versehen und für acht Stunden bei 160°C im Heißluftsterilisator (Binder) sterilisiert. Destilliertes Wasser für den Brutschrank und Kunststoffspitzen für die Pipetten werden vor der Verwendung autoklaviert. Der Autoklav (Varioklav, Uni Equip) wird 2 - 3 cm mit destilliertem Wasser befüllt, das Gut wird mit einem Autoklavierband versehen und hineingestellt. Der Baranzeiger wird auf null gestellt und der schwarze Schrauben am Deckel wird leicht zuge dreht. Autoklaviert wird bei 120 -140°C und 2 bar 30 Minuten lang.

Im abgeschalteten Zustand wird die verschlossene Sterilbank (Clan LAF VFR 906) mit einer UV-Lampe keimfrei gemacht. Zehn Minuten vor Verwendung wird sie eingeschaltet. Alle Geräte, Gegenstände, Hände bzw. Handschuhe sowie die Arbeitsfläche der Sterilbank werden mit 70 %-igem Ethanol und Papierhandtüchern vor Verwendung gereinigt. Auch während der Arbeit mit der Zellkultur müssen die Hände des öfteren mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert werden. Lösungen wie z.B. Trypsin oder Lösungen mit denen die Zellen inkubiert werden, müssen durch einen Sterilfilter (Nalgene) mit einer Porengröße von 0,20 µm filtriert werden. Alle Lösungen, die für die Zellkultur verwendet werden, müssen im Wasserbad (Köttermann Labortechnik) auf 37°C erwärmt werden.

3.1.1 Zelllinie

Für die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuche wurde die Zelllinie SH-SY5Y (humane Neuroblastoma Zellen) verwendet. Diese Zelllinie ist ein Subklon der Linie SK-N-SH in dritter Generation. Dieser Subklon wurde 1970 aus einer

Knochenmetastase einer weiblichen Patientin mit einem metastasierendem Neuroblastom gewonnen. SH-SY5Y-Zellen weisen eine moderate Dopamin-Beta-Hydroxylase-Aktivität auf. Sie wirken acetylcholinergisch und sie wandeln Glutamat in GABA um.

Es wird eine Verwendung nach der zwanzigsten Passage nicht empfohlen, da sie mit steigender Passagezahl ihre neuronalen Eigenschaften verlieren.

Die Zellen können mit Retinsäure angeregt bzw. stimuliert werden. Es handelt sich hier um adherente bzw. festsitzende Zellen, welche in einem komplementierten RPMI-Medium und in sterilen Kulturflaschen (IWAKI) bei 37°C in einem Luft/CO₂ (5 %)-Gemisch kultiviert wurden [BIEDLER et al., 1973], [JALAVA et al., 1990].

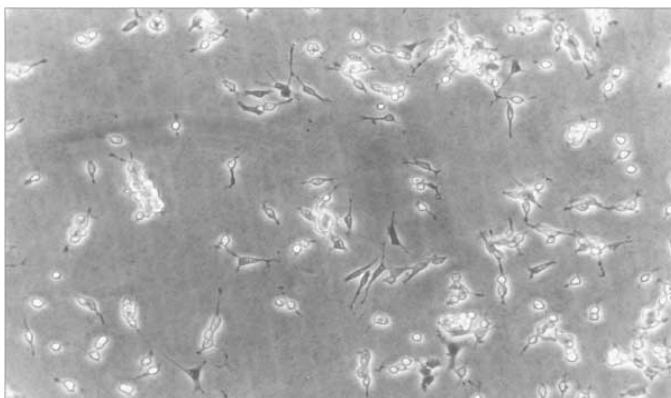
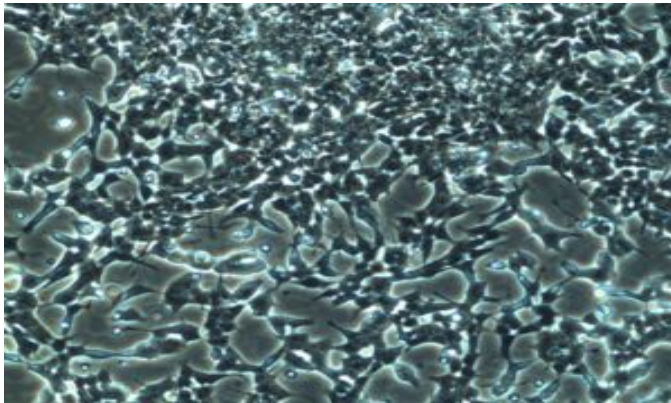


Abbildung 18 SH-SY5Y-Zellen

[http://www.unilim.fr/theses/2003/sante/2003limo0008/these_body.html]

3.1.2 Herstellung des Zellkulturmediums

Das Zellkulturmedium RPMI 1640 (Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium) ist ein Nährmedium für normale und neoplastische Leukozyten sowie andere humane und tierische Zelltypen. Es besitzt ein Hydrogencarbonat-Puffersystem, um den pH-Wert zu stabilisieren, und um Stoffwechselaktivitäten und Stoffwechselprodukte anzuzeigen. Als pH-Indikator dient Phenolrot [<http://de.wikipedia.org/wiki/N%C3%A4hrmedium>].

3.1.2.1 RPMI Medium

Das Pulver des RPMI 1640 Mediums (Biochrom KG) wird in 7 Liter destilliertem Wasser vollständig am Magnetrührer gelöst und 20 g Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Mit dem pH-Meter (Schotts Instruments) wird der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 7,2 eingestellt.

Mit destilliertem Wasser wird auf ein Endvolumen von 10 Liter aufgefüllt und anschließend eine Stunde lang am Magnetrührer gerührt.

Die zum Abfüllen benötigten ½-L-Glasflaschen, welche mit einem Plastikring am Gewinde versehen sind, werden mit destilliertem Wasser ausgespült und mit einem mit Plastik beschichteten Deckel nur leicht verschlossen. Die mit Alufolie geschützten Flaschen werden vor der Abfüllung sterilisiert.

Die Abfüllung des Nullmediums (RPMI) erfolgt unter der Sterilbank, wobei je 500 ml des Mediums mittels einer Schlauchpumpe (Masterflex, Cole Parmer Instrument Co) und eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,20 µm (Sartolab P plus, Sartorius) in sterilisierte Glasflaschen gefüllt werden. Das Nullmedium wird bei 4 °C gelagert.

3.1.2.2. Komplementieren des RPMI Mediums

Zur Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen muss das Medium mit weiteren Komponenten ergänzt werden, damit die Zellen wachsen können und gleichzeitig das Wachsen von Bakterien gehemmt wird. Unter der Sterilbank wird das auf 37°C im Wasserbad

erwärmte Nullmedium komplettiert. Zuerst leert man 50 ml des Nullmediums in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen (Greiner). Nun wird zu den 450 ml Medium 50 ml FCS 10 % (fetal calf serum (nicht Hitze inaktiviert)) (GIBCO), 5 ml L-Glutamin (2 mM) (PAA Laboratories GmbH) und 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml) (GERBU Biotechnik GmbH) zugegeben. Das komplementierte Medium wird bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.3 Kultivieren der SY5Y-Zelllinie

Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um eine adherente (festsitzende) Zelllinie. Die Zellen werden in sterilen Zellkulturflaschen (IWAKI (100 cm², 75 cm² oder 25 cm²)) kultiviert. Bei diesen Zellkulturflaschen muss darauf geachtet werden, dass der Verschluss nicht ganz zuge dreht wird, damit ein Gasaustausch gewährleistet ist.

Voraussetzung für das logarithmische Zellwachstum ist ein funktionierender Stoffwechsel der Zellen, dabei verarbeiten sie die Nährstoffe im Medium. Dies führt zu einer pH-Wert-Änderung, wodurch die Farbe des Mediums sich ändert.

Damit ein optimales Zellwachstum gewährleistet ist, wird das Medium alle 2 - 3 Tage erneuert. Einmal pro Woche werden die Zellen gesplittet.

Die Zellen werden im Brutschrank (Binder; Tabai) bei einer Temperatur von 37°C und 5%-iger CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Im Brutschrank befindet sich eine Wanne mit autoklaviertem Wasser in dem 2 - 3 Löffel Kupfer-II-Sulfat gelöst sind. Dies dient als Verdunstungsschutz für das Nährmedium der Zellen.

3.1.3.1 Splitten von adherenten Zellen

Das RPMI-Nährmedium wird mit einer Glaspipette und der Absaugpumpe, ohne Berühren der mit den Zellen bewachsenen Flaschenwand, abgesaugt. Die auf 37 °C erwärmte Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (1 x) (PBS 5 x wird 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnt) (Biochrom AG) wird auf die Zellen pipettiert. Je nach Flaschengröße werden 1 - 2 ml Trypsin benötigt. Durch die Trypsinlösung wird der Oberflächenzusammenhalt der Zellen herabgesetzt, und die Zellen beginnen sich von

der Wand zu lösen. Nach 2 Minuten wird das Trypsin wieder abgesaugt und die Flasche wird für ca. 5 Minuten zurück in den Brutschrank gelegt. Danach wird die Flasche gegen die flache Hand geschlagen, damit sich die Zellen vollständig von der Flaschenwand lösen. Unter der Sterilbank wird nun frisches Medium zu den Zellen pipettiert und anschließend 10 x resuspendiert. Die Zellen werden gezählt, um die gewünschte Zelldichte zur Weiterkultivierung einstellen zu können. Danach werden sie in neue, sterile Kulturflaschen überführt, aufgeteilt und wieder in frischem Medium resuspendiert.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit einem automatischen Zellzähler (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex) bestimmt. Mit dieser Methode kann nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Damit die Zellen mit einer bestimmten Dichte zur Weiterkultivierung oder zum Anlegen einer Arbeitskulturer ausgesetzt werden können, müssen sie zuerst gezählt werden. Mit einer Glaspipette wird unter der Sterilbank 1 ml der Zellsuspension entnommen. Davon werden 200 µl in ein spezielles Countergefäß pipettiert. Zu dieser nunmehr unsterilen Zellsuspension werden 9,8 ml Counterflüssigkeit (Cellpack PK-30, Fa. Sysmex) dazugegeben und anschließend wird zweimal mit dem Zellzähler gemessen. Der Mittelwert in Millionen/ml Zellsuspension zweier solcher Messungen ergibt die Zellzahl.

3.1.5 Einfrieren der Zellen

Die SH-SY5Y-Zelllinie kann über längere Zeit bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die Zelldichte wird auf 10 Millionen Zellen pro 10 ml Zellsuspension eingestellt und anschließend 5 Minuten bei 1800 rpm und 37 °C zentrifugiert (Eppendorf 5403). Das Medium wird vom Pellet abgesaugt. Anschließend wird zum

Pellet ein Einfriermedium (900 μ l Nährmedium + 100 μ l DMSO (Sigma Aldrich)) zugegeben.

Diese Zellsuspension wird nun in 2ml Kryoröhrchen (Fa. Nunc) pipettiert und in einem Kühlbehälter 1 - 2 Tage auf -80°C heruntergekühlt. Danach wird das Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfrieren der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen.

3.1.6 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen werden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und 1 - 2 Minuten bei Raumtemperatur angetaut. Anschließend wird das Röhrchen für 1 Minute ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und mit 10 ml Kulturmedium vermischt. Nachdem die Zellen 5 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert wurde, wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem neuen Nährmedium gelöst. Die Kultivierung erfolgt in kleinen Zellkulturflaschen.

3.1.7 Inkubation der Zellen

Nach dem Zählen der Zellen wird die Zellsuspension auf die gewünschte Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit Medium eingestellt.

Die Zellen werden unter sterilen Bedingungen in 6-Well-Platten (IWAKI) ausgesetzt. Pro Well werden 2 ml Zellsuspension pipettiert. Daraus ergibt sich eine ungefähre Zelldichte von 10^6 Zellen/Well. Damit sich die Zellen festsetzen, inkubiert man die 6-Well-Platten im Brutschrank (Binder) bei 37°C ungefähr 24 Stunden.

Nach dem Absaugen des Mediums, werden die Zellen mit den im Kapitel 3.1.7.1 angeführten Substanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen jeweils 24 Stunden und 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen gerntet und eingefroren.

3.1.7.1 Verwendete Substanzen

ANTIOXIDANTIEN	Stocklösung mg/10ml	Pipettierschema 2ml/Well				
Alpha-Tocopherol-Succinate semisynthetic: 530,78 g/l (Sigma)	26,54mg + 10ml Ethanol (Merck)	Konzentration Verd.faktor	10µM 500	20µM 250	30µM 166,7	50µM 100
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	4	8	12	20
		µl Medium/Well	1996	1992	1988	1980
L-Ascorbic-Acid: 176,12 g/l (Merck)	8,81mg + 10ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	10µM 500	25µM 200	50µM 100	100µM 50
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	4	10	20	40
		µl Medium/Well	1996	1990	1980	1960
Caffeic-Acid: 180,16 g/l (Sigma)	0,18mg + 0,5ml DMSO (Sigma) + 9,5ml heißes H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	0,1µM 1000	0,5µM 200	1µM 100	10µM 10
0,1mM (100µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	10	20	200
		µl Medium/Well	1998	1990	1980	1800
Curcumin: 368,38 g/l (Sigma)	18,42mg + 10ml Ethanol (Merck)	Konzentration Verd.faktor	1µM 5000	2µM 2500	5µM 1000	10µM 500
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	0,4	0,8	2	4
		µl Medium/Well	2000	1999	1998	1996
Na-Mg-Chlorophyllin (ungekupfert): 724,1 g/l (Paninkret)	7,24mg + 10ml PBS	Konzentration Verd.faktor	2,5µM 400	5µM 200	10µM 100	50µM 20
1mM (1000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	5	10	20	100
		µl Medium/Well	1995	1990	1980	1900
Trans-Ferulasäure: 194,18 g/l (Aldrich)	9,71mg + 10ml Ethanol (Merck)	Konzentration Verd.faktor	10µM 500	20µM 250	25µM 200	30µM 166,7
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	4	8	10	12
		µl Medium/Well	1996	1992	1990	1988
Idebenone: 338 g/l (Takeda Italia Farmaceutical S.p.A)	33,8mg + 10ml DMSO (Sigma)	Konzentration Verd.faktor	10µM 1000	50µM 200	100µM 100	300µM 33,3
10mM (10000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	10	20	60
		µl Medium/Well	1998	1990	1980	1940
N-Acetyl-L-Cysteine (NAC): 162,2g/l (Sigma)	1,62mg + 10ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	1µM 1000	5µM 200	10µM 100	15µM 66,6
1mM (100µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	10	20	30
		µl Medium/Well	1998	1990	1980	1970

Resveratrol: 228,24 g/l (Sigma)	8,11mg + 3,5ml DMSO + 6,5ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	5µM 1000	10µM 500	15µM 333,3	25µM 200
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	4	6	10
		µl Medium/Well	1998	1996	1994	1990
Sodium-Selenite: 172,94g/l (Sigma)	0,17mg + 10ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	0,1µM 1000	0,5µM 200	1µM 100	5µM 20
0,1mM (100µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	10	20	100
		µl Medium/Well	1998	1990	1980	1900
Trolox: 250,29 g/l (Aldrich)	12,51mg + 1,5ml DMSO + 8,5 ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	10µM 5000	20µM 250	50µM 100	100µM 50
5mM (5000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	4	8	20	40
		µl Medium/Well	1996	1992	1980	1960
Ellagic-Acid: 338,2 g/l (Sigma)	3,38mg + 10ml Ethanol (Merck)	Konzentration Verd.faktor	1µM 1000	5µM 200	10µM 100	20µM 50
1mM (1000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	10	20	40
		µl Medium/Well	1998	1990	1980	1960

OXIDANTIEN	Stocklösung mg/10ml	Pipettierschema 2ml/Well				
Antimycin A: 548,625 g/l (Sigma)	50mg + 9,1ml Ethanol (Merck)	Konzentration Verd.faktor	10µM 1000	20µM 500	50µM 200	100µM 100
10mM(10000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	2	4	10	20
		µl Medium/Well	1998	1996	1990	1980
Tert-Butylhydroperoxid (TBH): 90,12g/l (Aldrich)	70% Lösung: 13µl + 10ml PBS (1x)	Konzentration Verd.faktor	5µM 2000	10µM 1000	20µM 500	50µM 200
10mM(10000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	1	2	4	10
		µl Medium/Well	1999	1998	1996	1990
Kupfer(II)Sulfat (CuSO₄): 159,61 g/l (Merck)	15,96mg + 10ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	5µM 2000	10µM 1000	50µM 200	70µM 142,86
10mM (10000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	1	2	10	14
		µl Medium/Well	1999	1998	1990	1986
Ammonium Eisen (III) Citrat (FAC): 548,625 g/l (Merck)	16mg + 20ml H ₂ O	Konzentration Verd.faktor	40µM 80	100µM 40	150µM 26,6	200µM 20
4mM (4000µM/L) Stammlösung		µl Substanz	25	50	75	100
		µl Medium/Well	1975	1950	1925	1900

Tabelle 1 **Verwendete Substanzen mit jeweiligem Pipettierschema**

3.1.8 Waschen und Einfrieren der inkubierten Zellen

Nach einer Inkubationszeit der Zellen mit der jeweiligen Substanz von 24 und 48 Stunden wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden 2 x mit je 500 µl PBS (1x) gewaschen. Anschließend werden die verschlossenen 6-Well-Platten bei -20 °C gelagert.

3.1.9 Lysieren der Zellen

Beim Ernten der Zellen muss darauf geachtet werden, dass alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden, um den Zellstoffwechsel zu verlangsamen.

- Für die Herstellung des Lysispuffers werden die Substanzen laut Tabelle gemeinsam in ein 50 ml Becherglas eingewogen und anschließend mit 50 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Zum Schluss werden 0,5 ml Triton X-100 (Merck) dazu pipettiert. Der Lysispuffer wird zu je 2 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

150 mM Natriumchlorid	438,3 mg
20 mM Tris	121,14 mg
1 mM EDTA	18,612 mg
1 mM EGTA	19,018 mg

Tabelle 2 Mengenangaben Lysispuffer

- Kurz bevor man den auf Eis aufgetauten Lysispuffer verwendet, muss er mit 10 µl Phosphatase-Inhibitor 1 (100 x Stammlösung) pro ml Lysispuffer, 10 µl Phosphatase- Inhibitor 2 (100 x Stammlösung) pro ml Lysispuffer und mit 10 µl 1 M NaF (Natriumfluorid) Stammlösung (41,99 mg/ml) pro ml Lysispuffer komplementiert werden.
- Die 6-Wellplatte wird auf Eis aufgetaut.
- Pro Well werden 100 µl komplementierter Lysispuffer pipettiert. Mit Hilfe eines Cell Scraper (Greiner) werden die Zellen nun vom Boden des Wells abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt.

- Das Zelllysat wird für 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit Ultraschall behandelt.
- Nachdem für 6 Minuten bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde, wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Proben werden bei -80 °C gelagert.

3.1.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Für jede Probe wird eine Proteinbestimmung durchgeführt, da beim anschließenden ELISA auf einen Proteingehalt der Proben von 20 µg Protein/ml Probe eingestellt werden muss.

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm durch Bindung an eine Peptidbindung. Das Farbreagenz (BIO RAD) reagiert zu einem blauen Farbkomplex. Der Proteingehalt der Proben wird mittels einer mit Rinderserumalbumin (BSA) kalibrierten Eichgerade bestimmt.

- Zuerst wird eine Verdünnungsreihe des Standardproteins in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA/ml hergestellt. Zuvor wird die BSA-Stammlösung (1 mg BSA/ml) 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.
- Die Proben mit dem unbekanntem Proteingehalt sowie der Standard werden auf ein Volumen von 800 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.
- Zu den vorbereiteten Standards und Proben werden nun mit einem Dispenser (Eppendorf) 200 µl Farbreagenz (Bio Rad, Protein Assay) pipettiert.
- Die Plastikeprouvetten werden gut gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Standard:						
Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	2	4	6	8	10
μl destilliertes Wasser	800	780	760	740	720	700
μl BSA (1:10 verdünnt)	0	20	40	60	80	100
μl Biorad Reagenz		200	200	200	200	200

Proben:	
μl destilliertes Wasser	800
Probe	2
Biorad Reagenz	200

Tabelle 3 Pipettierschema Proteinbestimmung nach Bradford

- Nach der Inkubationszeit werden die Proben wieder gevortext und jeweils im Doppelansatz 200 μl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner) pipettiert.
- Bei 600 nm erfolgt die photometrische Messung im Platten-Spektrophotometer (Zenyth 3100, Anthos) der Extinktion. Ausgewertet werden die Messungen mit der Statistik Software Graph Pad Prism 3.

3.2 Sandwich-ELISA

Als Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren das eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung mit einer enzymatischen Farbreaktion nachweist.

Der bei dieser Diplomarbeit verwendete ELISA wird als Sandwich-ELISA bezeichnet. Er ermöglicht die Detektion eines bestimmten Proteins, in diesem Fall Frataxin aus einem umfangreichen Proteingemisch. Dafür muss zuerst der Gesamtproteingehalt der Probe mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt werden.

Es werden folgende Antikörper (AK) für den Sandwich-ELISA verwendet:

1. AK: monoklonaler Anti-Frataxin-AK (Chemicon)
2. AK: polyklonaler Rabbit-Anti-Frataxin-AK (Prof. Marcela Hermann)

3. AK: polyklonaler Goat–Anti–Rabbit–AK gelabelt mit dem Enzym
Horseradish-Peroxidase (HRP) (Dako Cytomation)

Als Substrat wird SureBlueReserve-TMB-Microwell-Peroxidasesubstrat (KPL, Wien) eingesetzt, welches von der HRP zu einem blau gefärbten Produkt umgesetzt wird. Um die Farbreaktion zu beenden, wird eine 1M H_2SO_4 zum Absenken des pH-Wertes verwendet. Dabei erhält man ein gelbes Endprodukt, dessen Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen wird.

Mit den Standards wird im Computerprogramm Graph Pad Prism 3 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, California, USA) eine Standardgerade erstellt und anhand dieser der Frataxingehalt in den Proben ermittelt.

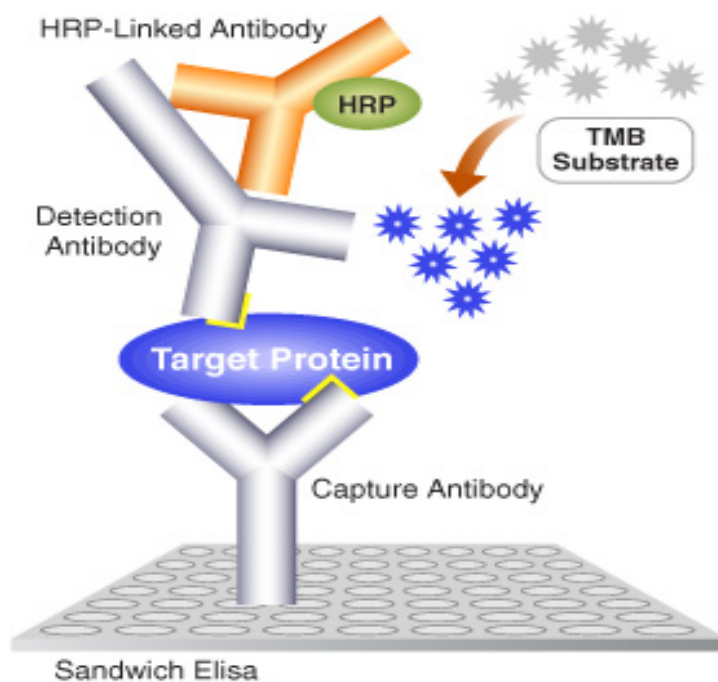


Abbildung 19 Schematische Darstellung eines Sandwich- ELISA's
[<http://www.cellsignal.com/ddt/elisa.html>]

3.2.1 ELISA Durchführung

- Eine 96-Mikrotiterplatte (Greiner) wird mit dem monoklonalen anti-Frataxin-Antikörper (Chemicon International) gecoatet.
Dafür wird zuerst die Coating-Solution (KPL (10 x)) 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Mit dieser Verdünnung wird der erste Antikörper 1:15000 verdünnt (1 µl + 15 ml Coating-Solution). Mit einer Mehrkanalpipette werden 100 µl des verdünnten AK in alle benötigten Wells pipettiert.
Abschließend wird die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.
- Lösungen:
 - a. Blocking-Solution: Die 10 % BSA-Blocking-Solution wird auf Raumtemperatur erwärmt und 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. (= 1 % BSA-Lösung)
 - b. 0,1 % BSA: 1 ml der 1 % Blocking-Solution wird 1:10 verdünnt.
 - c. Waschlösung: 1:20 Verdünnung der Waschlösung (KPL, Wien (20 x)) mit destilliertem Wasser.
- Blockierung der unbesetzten Bindungsstellen auf der Platte, damit keine unspezifischen Bindungen auftreten.
Die Platte wird über dem Waschbecken ausgeleert und auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Anschließend werden 200 µl 1 % Blocking-Solution in alle Wells pipettiert.
- Die Platte wird mit Klebefolie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer (Linder Labortechnik) inkubiert.
- Vorbereitung des Standards und der Proben:
Stammlösung für die Frataxinstandards vorbereiten (1 µl Frataxin + 499 µl 0,1 % BSA) und die Standards mit 0,1 % BSA lt. Pipettierschema verdünnen.

KONZENTRATION	0pg	2pg	4pg	6pg	8pg	10pg
$\mu\text{l BSA (0,1 \%)}$	220	198	176	154	132	110
$\mu\text{l Frataxin Stammlösung}$	0	22	44	66	88	110

Tabelle 4 Pipettierschema Frataxinstandards Sandwich-ELISA

Proben laut Pipettierschema in Epruvetten pipettieren. Die Proben mit einem Proteingehalt von 20 μg werden mit destilliertem Wasser und Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS (10 x)), welches 0,05 % des Gesamtvolumen ausmacht, gemischt.

Bei den vorzubereitenden Endvolumen muss berücksichtigt werden, dass Proben und Standards im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen werden.

- Waschen der Platte nach dem Blockieren:

Platte einmal mit 200 μl , anschließend 3mal mit je 110 μl Waschlösung waschen. Nach jedem Waschvorgang wird die Platte für jeweils 3 Minuten auf den Belly Dancer gestellt, danach ausgeleert und gut ausgeklopft.

- Auftragen der Standardreihe und der Proben:

Je 100 μl der Frataxinstandards und der Proben auf die ELISA-Platte auftragen. Die aufgetragenen Proben und Standards werden mit einer 0,1 % BSA-Lösung eingegrenzt (0).

0	0	0	0	0	0	0
0	Standard 1	Standard 1	0	Probe 1	Probe 1	0
0	Standard 2	Standard 2	0	Probe 2	Probe 2	0
0	Standard 3	Standard 3	0	Probe 3	Probe 3	0
0	Standard 4	Standard 4	0	Probe 4	Probe 4	0
0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5 Pipettieranordnung ELISA-Platte

- Die Platte wird mit einer Klebefolie abgeklebt und 1 Stunde am Belly Dancer inkubiert.

- Zugabe von je 100 µl des zweiten polyklonalen rabbit-anti-Frataxin-Antikörpers (Prof. Marcela Hermann), nachdem er 1:2500 mit einer 1 % Blocking-Solution verdünnt wurde (11 µl Blocking Solution + 4,4 µl AK 2).
- Mit einer Klebefolie abdecken und 1 Stunde am Belly Dancer inkubieren lassen.
- Waschen der Platte (4 x)
- Zugabe von je 100µl des dritten polyklonalen goat-anti-rabbit-Antikörpers (HRP)(Dako Cytomation), der zuvor mit 1 % Blocking-Solution 1:5000 verdünnt wurde (2,2 µl + 11 ml Blocking Solution).
- Mit einer Klebefolie abdecken und 1 Stunde am Belly Dancer inkubieren lassen.
- Waschen der Platte (4 x)
- 100 µl SureBlueReserve-Reagenz (Raumtemperatur) unverdünnt auftragen, mit Alufolie abdecken und 20 Minuten auf dem Belly Dancer inkubieren lassen.
- Die Zugabe von 100 µl Stopplösung (1M H₂SO₄) stoppt die Farbreaktion und es findet ein Farbumschlag von Blau auf Gelb statt.
- Adsorptionsmessung mittels Photometer bei 450 nm.

3.2.1.1 ELISA-Auswertung im Graph Pad Prism

Wie bei der Proteinbestimmung wird anhand der bekannten Frataxinstandard-Konzentrationen und deren gemessenen Extinktionen eine Standardgerade, aus der sich die Frataxinkonzentrationen (pg Frataxin/20 µg Protein) der einzelnen Proben ergeben, erstellt.

Da in der Probe 20µg Protein enthalten ist, muss die Menge an Protein auf 1 µg zurückgerechnet werden.

Die statistische Berechnung der Frataxinkonzentration in inkubierten Zellen im Vergleich zu einer nicht inkubierten Kontrolle wurde mittels Student's t-Test durchgeführt.

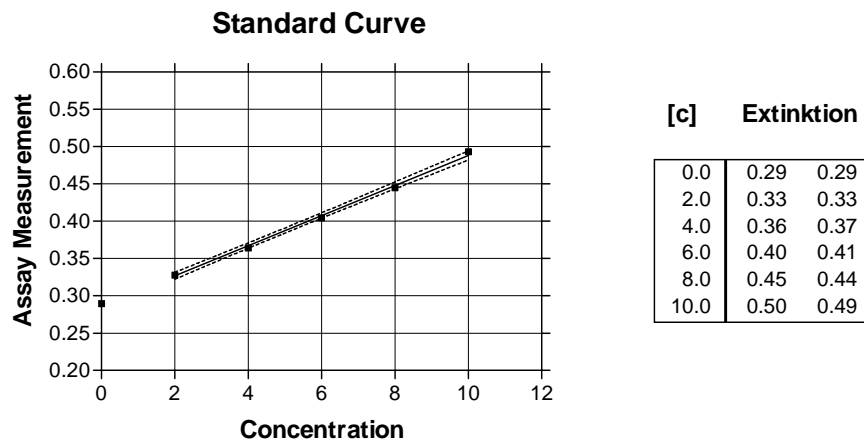


Abbildung 20 Erstellung einer Eichgeraden im Graph Pad Prism

3.2.1.2 Student's t-Test

Der t-Test nach Student vergleicht zwei Stichprobenkennwerte. Er ermittelt ob die beiden Stichproben einer Grundgesamtheit angehören oder diese sich voneinander signifikant unterscheiden. Voraussetzung für die Anwendung des t - Tests sind zwei voneinander unabhängige, normalverteilte Stichproben. Es wurde das Signifikanzniveau ermittelt. Alle Tests wurden mit dem zweigeteilten und ungepaarten t-Test durchgeführt.

3.3 MSD-ELISA

Meso-Scale-Discovery-multy-array[®]-technology ist eine Kombination von Elektrochemilumineszenz-Detektion und vorgefertigten Multi-Array-Mikrotiterplatten. Für die MSD-Elektrochemilumineszenz-Detektion wird ein SULFO-TAG[™] gelabelter (Ruthenium (II) tris-bipyridine-(4-methylsulfonate) NHS Ester) Antikörper verwendet. Dieser strahlt als Signal Licht ab. Grund dafür ist die von der Elektrodenoberfläche auf der Multi-Array-Platte initiierte elektrochemische Stimulation. Diese Technologie hat laut Angaben des Herstellers eine 100-fach höhere Sensitivität als der herkömmliche ELISA. Da nur mehr eine Proteinmenge von 5µg/Well benötigt wird, kann eine höhere Verdünnung der Probe verwendet werden. Ein weiterer Vorteil ist die geringe

Sensitivität gegenüber Matrixeffekten, was zu einer Minimierung von Hintergrundsignalen führt. Der MSD-ELISA bindet auch AK mit einer niedrigeren Affinität. Diese AK gehen beim herkömmlichen ELISA größtenteils durch Waschschriffe nach dem Auftragen der Probe verloren.

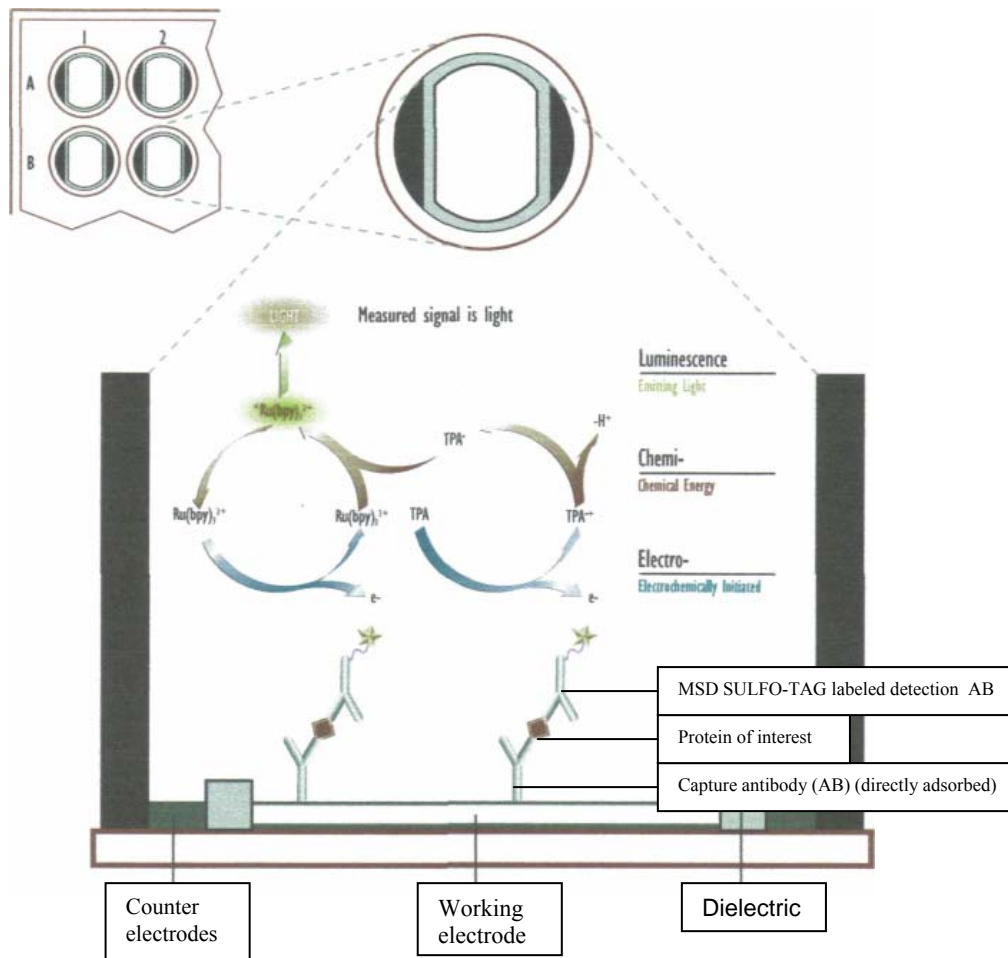


Abbildung 21 Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA auf einer MSD-Multi-Array-Platte [<http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/WebRoot/literature/brochures/pdf/techBrochure.pdf>]

Eine 96-Well Multi-Arrayplatte wird mit dem ersten monoklonalen AK (capture antibody) ge-coated. Anschließend werden die Proben und die Standards aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubation wird der zweite polyklonale Antikörper (Santa

Cruz) aufgetragen. Der dritte AK, der aufgetragen wird, ist ein mit Elektrochemilumineszenz-Bestandteil gelabelter (MSD-SULFO-TAG-Label) Detektions-AK.

Durch Zugabe des MSD-Read-Buffer's werden die chemischen Voraussetzungen für die Elektrochemilumineszenz-Detektion geschaffen. Die Platte wird in das Analysegerät, den MSD Sektor 2400, gestellt. An die Plattenelektrode wird nun eine Spannung angelegt, welche den gelabelten AK zum Abstrahlen von Licht anregt, welches gemessen wird. Die Lichtemission findet bei 620 nm statt.

3.3.1 MSD-ELISA-Durchführung

- Eine ungecoatete 96-Well Multi-Arrayplatte (MSD) wird mit dem ersten Antikörper gecoatet.

Dafür wird zuerst eine in PBS (1 x) 1:9000 verdünnte AK-Stammlösung hergestellt (9 ml PBS (1 x) + 1 µl AK 1). Diese Stammlösung wird 1:27 verdünnt (3,9 ml PBS + 150 µl Stocklösung). Der Antikörper ist somit 1:243000 verdünnt. Mit einer Mehrkanalpipette werden 30 µl des verdünnten AK in alle benötigten Wells durch „Reversed pipetting“ aufgetragen und gut verteilt.

Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

- Lösungen:
 - a. Blocking-Solution: 3g BSA werden mit 100 ml PBS (1 x) gelöst (= 3 % BSA-Lösung).
 - b. 1 % BSA: 1g BSA werden mit 100 ml PBS (1 x) gelöst (= 1 % BSA-Lösung)
 - c. Waschlösung: In 500 ml PBS (1 x) werden 250 µl TWEEN 20 (Merck) pipettiert.
- Die Platte wird über dem Waschbecken ausgeleert und auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Anschließend werden 150 µl 3 % Blocking-Solution in alle Wells pipettiert.
- Die Platte wird mit Klebefolie abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer (Linder Labortechnik) inkubiert.

- Waschen der Platte nach dem Blockieren: Die Platte wird dreimal mit 150 µl Waschlösung gewaschen.
- Standard und Proben vorbereiten:
Stammlösung für die Frataxinstandards vorbereiten (1 µl Frataxin + 399 µl 1 % BSA); diese wird jeweils mit 1 % BSA lt. Pipettierschema verdünnt (150 µl Stammlösung/Standard + 300 µl 1 % BSA).

	KONZENTRATIONEN	VERDÜNNUNGEN	PIPETTIERSCHEMA
Standard 1	5,625 pg	1:400	Stammlösung
Standard 2	1,875 pg	1:1200	150 µl Standard 1 + 300µl BSA 1 %
Standard 3	0,626 pg	1:3600	150 µl Standard 2 + 300µl BSA 1 %
Standard 4	0,2083 pg	1:10800	150 µl Standard 3 + 300µl BSA 1 %
Standard 5	0,06944 pg	1:32400	150 µl Standard 4 + 300µl BSA 1 %
Standard 6	0,023 pg	1:97200	150 µl Standard 5 + 300µl BSA 1 %
Standard 7	0,00766 pg	1:291600	150 µl Standard 6 + 300µl BSA 1 %
Standard 8	0 pg	Leerwert	1 % BSA

Tabelle 6 Pipettierschema Frataxinstandards MSD-ELISA

Die Proben laut Pipettierschema in Epprouvetten pipettieren. Anschließend werden sie mit 1% BSA auf einen Proteingehalt von 5 µg Protein/25 µl Probenansatz verdünnt.

Bei den vorzubereitenden Endvolumen muss berücksichtigt werden, dass Proben und Standards im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen werden.

- Auftragen der Standardreihe und der Proben: Je 25 µl von dem Frataxinstandard und von der Probe pro Well der MSD-ELISA-Platte auftragen.
- Mit einer Klebefolie abdecken und 1 Stunde am Belly Dancer inkubieren lassen.
- Platte dreimal mit 150 µl Waschlösung waschen.
- Zugabe von je 30 µl des zweiten Antikörpers, nachdem er 1:2000 mit 1 % BSA verdünnt wurde (4 ml 1 % BSA + 2 µl AK 2).
- Mit einer Klebefolie abdecken und 1 Stunde am Belly Dancer inkubieren lassen.
- Platte dreimal mit 150 µl Waschlösung waschen.
- Zugabe von je 30 µl des dritten Antikörpers (SULFO-TAG-NHS-Ester), der zuvor mit 1 % BSA auf 0,75 mg/ml verdünnt wurde (6 µl AK3 + 4 ml 1 % BSA).

- Mit einer Klebefolie abdecken und 1 Stunde am Belly Dancer inkubieren lassen.
- Platte dreimal mit 150 µl Waschlösung waschen.
- 150 µl Reading-Buffer (1 x) auftragen, gut verteilen und sofort im MSD Sektor 2400 messen.

3.4 Real-Time-PCR

Die Quantitative Real-Time-PCR (polymerase-chain-reaction) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, bei der bestimmte Nukleinsäureabschnitte durch ein Primerpaar vervielfältigt und nach deren gelelektrophoretischen Auftrennung durch Anfärben sichtbar gemacht werden.

Bei der Real-Time-PCR wird zusätzlich eine Quantifizierung durch eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Die Detektion von PCR-Produkten erfolgt sequenzspezifisch mittels fluoreszenzmarkierter Sonden. Die als TaqMan[®]-probes oder auch als Hydrolyse-Sonden bezeichneten Sonden werden zusätzlich zu den beiden Primern benötigt. Diese Oligonukleotide sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sonden binden an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern und sind zum Abschnitt der zu analysierenden cDNA komplementär.

Alle im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführten Real-Time-PCR-Messungen wurden mit dem TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Dieser PCR-Mix enthält alle benötigten Sonden (Probes) für die Detektion von cDNA-Sequenzen.

Die TaqMan[®]-Sonde ist intakt, wenn beide Fluoreszenzfarbstoffe räumlich nahe zusammen sind. Durch optische Anregung mit einer LED-Lampe, welche sich im PCR-Gerät StepOne (Applied Biosystems) befindet, wird die Energie des Reporterfarbstoffes, der sich am 5'-Ende der Sonde befindet, auf den fluoreszenzlöschenden Quencherfarbstoff, der am 3'-Ende platziert ist, übertragen. Der Quencherfarbstoff unterdrückt dabei die Abstrahlung von Licht. Während der PCR werden beide Primer durch die AmpliTaq[®]-Gold-DNA-Polymerase (Applied

Biosystems) so lange verlängert bis sie auf die Sonde treffen. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase baut die Sonde ab. Dabei entfernen sich Quencherfarbstoff und Reporterfarbstoff voneinander. Es findet kein Energietransfer mehr statt und dadurch steigt die Reporterfluoreszenz. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes nimmt proportional mit der gebildeten Menge an cDNA von Zyklus zu Zyklus zu. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wird in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen [http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Real-TimePCR/TaqManvsSYBRGreenChemistries/index.htm].

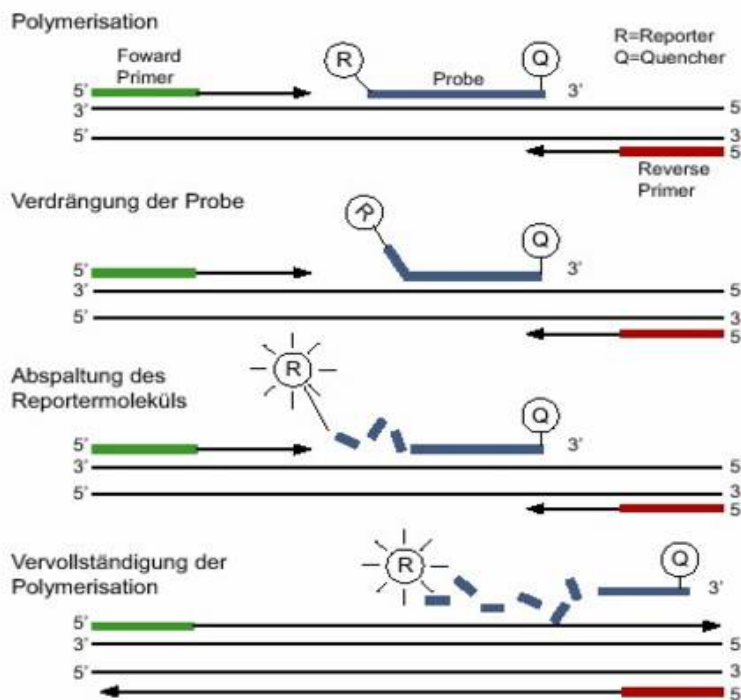


Abbildung 22 Schematische Darstellung einer Real-Time-PCR mit TaqMan[®]-Sonde [<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001>]

3.4.1 Quantifizierung der Genexpression

Bei der Quantifizierung der Expression eines Gens kann eine absolute oder eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge an Genkopien (Templates) ermittelt. Dafür wird ein genauer Standard zur Erstellung einer Standardgeraden benötigt.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Erhöhung bzw. die Reduktion der Expression des Zielgens (Frataxin (Applied Biosystems)) in Bezug auf ein Referenzgen (HPRT 1 (1-Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1) (Applied Biosystems)) ermittelt. Dieses als Housekeepinggen bezeichnete Referenzgen dient zur Durchführung eines relativen Mengenvergleichs. Für die Quantifizierung wird der Fluoreszenz-Schwellenwert, der so genannte Threshold-Cycle oder C_T -Wert, berechnet.

Der C_T -Wert ist jener Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt und die Amplifikation, die gezielte Bildung von Doppelstrang-cDNA, exponentiell ist. Er ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten Menge an cDNA des entsprechenden Gens.

Je mehr cDNA-Template eingebracht wurde, umso geringer ist die Anzahl an Zyklen, nach denen das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist. Das heißt, je niedriger der C_T -Wert ist, desto höher ist die Zielgen-Expression.

Zur Berechnung des C_T -Wertes beziehungsweise der Bestimmung der relativen Expression kommen drei Formeln zur Anwendung:

1. $\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielgen} - \Delta C_T \text{ Endogene Kontrolle}$:

Mit dieser Formel wird der Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen berechnet. Es wird auf das Housekeepinggen, die endogene Kontrolle, normalisiert.

2. $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielgen} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$:

Bevor die relative Genexpression bestimmt werden kann, muss zuerst der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt werden. Dazu wird ein Kalibrator bestimmt. Dabei handelt es sich um die cDNA Probe, bei der die Genexpression, also die cDNA Probe mit dem

höchsten ΔC_T - Wert, am niedrigsten war. Der ΔC_T -Wert des Kalibrators wird von den ΔC_T -Werten aller cDNA Proben abgezogen.

3. $RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$

Die relative Genexpression (RGE) wird mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ bestimmt. Sie gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an

[<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4476/pdf/KowalewskiMariusz-2007-01-16.pdf>].

3.4.2 Auswertung der Real-Time-PCR-Ergebnisse

Die Auswertung der Real-Time-PCR-Daten erfolgt mit dem Computerprogramm StepOne v. 2 (Applied Biosystems).

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der Statistik Software Graph Pad Prism 3. Zur statistischen Berechnung der Frataxinexpression in inkubierten Zellen im Vergleich zu einer nichtinkubierten Kontrolle wurde der t-Test angewendet.

3.4.3 Real-Time-PCR-Durchführung

Bevor man mit der RNA-Isolierung beginnt, müssen alle Behelfsgegenstände sowie der RNase-freie Laminar-Flow mit Ethanol gereinigt werden. Pipettenspitzen und Epprouvetten müssen RNase-frei sein.

3.4.4 Lysieren der Zellen mit TRI-Reagenz zur RNA-Isolierung

- Die 6-Wellplatte, auf der sich die gewaschenen, inkubierten Zellen befinden, wird auf Eis aufgetaut.

- Unter einem Abzug werden 1000 µl TRI-Reagenz (Applied Biosystems) in jedes Well pipettiert.
- Mit Hilfe eines Cell Scraper (Greiner) werden die Zellen nun vom Boden des Wells abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt.
- Bei Raumtemperatur wird das Zelllysate 5 Minuten inkubiert und anschließend gut gevortext.
- Je nach Proteingehalt kann man optional 10 Minuten bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- 200 µl Chloroform/ml TRI-Reagenz müssen nun zur Probe pipettiert werden.
- Das Zelllysate wird 15 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Zentrifugation bei 9000 rpm 10 - 15 Minuten bei 4 °C.
- Die obere farblose Phase wird in eine neue Epprovette überführt. Die Zwischenphase und die organische Phase werden verworfen. In ihnen befindet sich DNA.
- 500 µl Isopropanol/ml Tri-Reagent werden nun zur Probe pipettiert.
- Es muss wieder 10 - 15 Sekunden gevortext und 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden.
- Zentrifugation bei 9000 rpm 8 Minuten bei 4 °C.
- Der Überstand wird vorsichtig vom Pellet entfernt und pro ml TR - Reagenz 1 ml 75%igem Ethanol zum Pellet dazupipettiert.
- Zentrifugation bei 6000 rpm 5 Minuten bei 4 °C.
- Das Ethanol wird vom Pellet entfernt. Wenn nötig kann ein weiteres Mal leicht zentrifugiert werden, um mit einer Fine-Tipp-Pipette das restliche Ethanol vorsichtig entfernen zu können.
- Das Pellet wird 3 - 5 Minuten luftgetrocknet, anschließend in 25 µl nuklease-freiem Wasser gelöst, aliquotiert und abschließend bei -20 °C bis zur Umschreibung von RNA in cDNA zwischengelagert.

3.4.5 Umschreibung der RNA in cDNA

- Zum Umschreiben der RNA in cDNA wird der High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit (Applied Biosystems) verwendet. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.
- Zu Beginn wird der Kit auf Eis aufgetaut und die benötigten Komponentenmengen berechnet. Die im Pipettierschema angegebenen Mengen entsprechen einem Ansatz mit 10µl Probe. Anschließend werden die Komponenten des Kits in eine RNase-freie Epprouvette pipettiert, gemischt und auf Eis gestellt.

KIT-KOMPONENTEN	µl/10µl Probe
10* RT Buffer	2
25*dNTP mix (100mM)	0,8
10*RT Random Primers	2
Multi Scribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	1
Nuclease free water	4,2

Tabelle 7 Pipettierschema cDNA-Reverse-Transcription-Kit

- Die RNA-Probe wird auf Eis aufgetaut.
- In Mini-Epprouvetten werden zu den 10µl des cDNA-Reverse-Transcription-Mix 10µl Probe pipettiert und gut gemischt. Wenn notwendig werden die Mini-Epprouvetten leicht zentrifugiert, um den Inhalt der Epprouvette nach unten zu bringen und Luftblasen zu vermeiden.
- Der Thermocycler wird laut nachfolgender Tabelle programmiert und mit den beschrifteten Proben befüllt.

	STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
TEMPERATUR	25°C	37°C	85°C	4°C
ZEIT	10 Minuten	120 Minuten	5 Sekunden	∞

Tabelle 8 Thermocycler Programm

3.4.6 StepOne Real-Time-PCR

- Für die StepOne Real-Time-PCR muss vor Vorbereitung der Proben im Computerprogramm StepOne v. 2 (Applied Biosystems) der Versuchsablauf programmiert werden. Dafür wählt man folgende Menüpunkte aus:
(Step One Instrument 48 Well, Quantitation, TaqMan, Comparative CT, Standard 2 Stunden, cDNA compl.DNA).
- Als Assay-Mix werden das Zielgen, Frataxin und das Housekeepinggen HPRT1 angegeben. Weiteres wird die Probenanzahl, die Anzahl der Wiederholungen und die Anzahl der Negativkontrollen angegeben. Wenn die Proben beschriftet wurden, geht man im Menü weiter und gibt das Gesamtvolumen (15 µl/Well) ein. Im berechneten Pipettierschema ist die Menge an Master-Mix und Assay-Mix angegeben. Nach Ausdruck des Pipettierschemas wird der Programmablauf auf ein Speichermedium gespeichert und über dieses auf das StepOne-Gerät überspielt. Im Hauptmenü des Real Time - Analysegerätes werden folgende Menüpunkte angeklickt:
(Browse/New Experiment, Folder, USB, Gewünschte Datei)
- Der für die Real Time PCR benötigte TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems) wird mit dem Assay-Mix, der entweder das Zielgen (Frataxin) oder das Housekeepinggen (HPRT1) enthält, unter der RNase-freien Werkbank laut Pipettierschema gemischt. Die Volumina müssen mit der Anzahl der benötigten Wells auf der 48-Well Reaktionsplatte multipliziert werden. Zusätzlich müssen noch zwei Ansätze für die Negativkontrolle und für die Pipettierhilfe dazugerechnet werden.

	µl/RT PCR Well
MASTER MIX	7,5
ASSAY MIX (Frataxin oder HPRT1)	0,756
NUCLEASE FREIES WASSER	5,25
Gesamt Volumen/Well	13,5

Tabelle 9 Pipettierschema Real Time PCR Master Mix

- cDNA Proben werden auf Eis aufgetaut.
- Die 48-Wellplatte wird in eine aus Kunststoff bestehende Pipettierhilfe gestellt.

- Zuerst wird die Mastermix-Mischung „reverse“ laut ausgedruckten Pipettierschema in jedes vorgesehene Well pipettiert.
- Anschließend werden 1,5 µl Probe dazu pipettiert.
- Die 48-Wellplatte wird nun mit einer Folie unter Zuhilfenahme eines Plastischabers fest verschlossen. Die Platte wird einmal kurz nach hinten gezogen, damit die Luftblasen am Boden nach oben steigen können. Die Platte wird ins Gerät gestellt und der „Run“ wird gestartet. Am Monitor kann der Versuchsablauf verfolgt werden.

Unter dem Menüpunkt „Collect Results“ können die Daten auf einen Datenträger gespeichert werden. Die Auswertung erfolgt im Computerprogramm StepOne v. 2. Die statistische Auswertung erfolgt mittels t-Test im Graph Pad Prism 3.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde der mögliche Einfluss von Antioxidantien und Oxidantien auf die Frataxinexpression untersucht. Da bei der Friedreich's Ataxie hauptsächlich Gewebe mit hohem mitochondrialem Anteil insbesondere Nervengewebe und Herzgewebe sowie Leber und Milz betroffen sind, wurden alle Versuche an den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y durchgeführt. Die für die Versuche ausgewählten Antioxidantien haben entweder einen bereits in anderen Studien festgestellten Einfluss auf das Protein Frataxin oder sind bekannt für eine generelle neuroprotektive Wirkung.

Weitere Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, basieren auf der Vermutung, dass das Protein Frataxin eine antioxidative Wirkung hat. Die Auswirkung von induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner wie Antimycin A und TBH (Tert-Butylhydroperoxid) und Metalle wie Eisen und Kupfer (FAC, CuSO₄) auf die Frataxinexpression wurden ebenfalls an der Zelllinie SH-SY5Y untersucht.

Die Änderung des Frataxingehalts auf Proteinebene wurde durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Mit der quantitativen Real-Time-PCR wurden transkriptionale Veränderungen der messenger-RNA-Expression untersucht.

4.1 Einfluss von Antioxidantien auf die Expression des Proteins Frataxin

Wie bereits im Kapitel 2.1.4 erleutert, werden oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion mit neurodegenerativen Störungen wie Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Friedreich's Ataxie in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass erhöhter oxidativer Stress bei FRDA einerseits durch die Ansammlung von Hydroxylradikalen und/oder andererseits durch einen Mangel an ISC-Proteinen bzw. durch defekte ISC-Proteine entsteht [TOZZI et al., 2002].

Bei den Versuchen im Zuge dieser Diplomarbeit wurden potentiell neuroprotektiv wirkende Antioxidantien verwendet. Einigen von ihnen wurde bereits in vitro und in vivo eine mögliche therapeutische Wirkung in der Behandlung der Symptomatik bzw.

der Begleiterkrankungen von FRDA bestätigt. Placebokontrollierte, doppelblinde Studien sind aber nur mit Idebenone durchgeführt worden.

Folgende Antioxidantien wurden verwendet:

- | | |
|--------------------|---------------------------------|
| - Idebenone | - α -Tocopherol-Succinat |
| - N-Acetyl-Cystein | - Trolox |
| - Curcumin | - Natrium-Selenit |
| - Kaffeesäure | - Resveratrol |
| - Ascorbinsäure | - Ferulasäure |
| - Mg-Chlorophyllin | - Ellagsäure |

Es wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Dabei wurden die im RPMI-Medium kultivierten SH-SY5Y-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antioxidans für jeweils 24 und 48 Stunden inkubiert. Pro Versuchsansatz wurden zwei Sandwich-ELISA's durchgeführt. Beim Versuchsansatz mit Idebenone wurde zusätzlich zum Sandwich-ELISA ein MSD-ELISA durchgeführt. Der Frataxingehalt wurde jeweils im Doppelansatz bestimmt. Die Auswertung erfolgte im Grafikprogramm GraphPad Prism3. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweigeteilten, ungepaarten Student's t-Test festgestellt. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($< 0,01$) gekennzeichnet.

4.1.1 Idebenone

Das Benzochinon Idebenone, ein synthetisches kurzkettiges Analog des Coenzym Q10, steigert die Energieproduktion in den Nerven- und Muskelzellen. Es schützt diese vor dem Zelltod. Idebenone wirkt als sehr guter Radikalfänger [MARIOTTI et al., 2003].

In mehreren Versuchen führte die Behandlung mit Idebenone zwar zu einer Verkleinerung der Herzhypertrophie, aber zu keiner Verbesserung der neurologischen Symptome [RIBAI et al., 2007]. Zur Zeit findet in den USA und in Europa eine Phase-II-III-Studie statt, mit dem Ziel die Wirksamkeit von Idebenone für die Behandlung von neurologischen Störungen bei FRDA zu testen [FRIEDMANN et al., 2008].

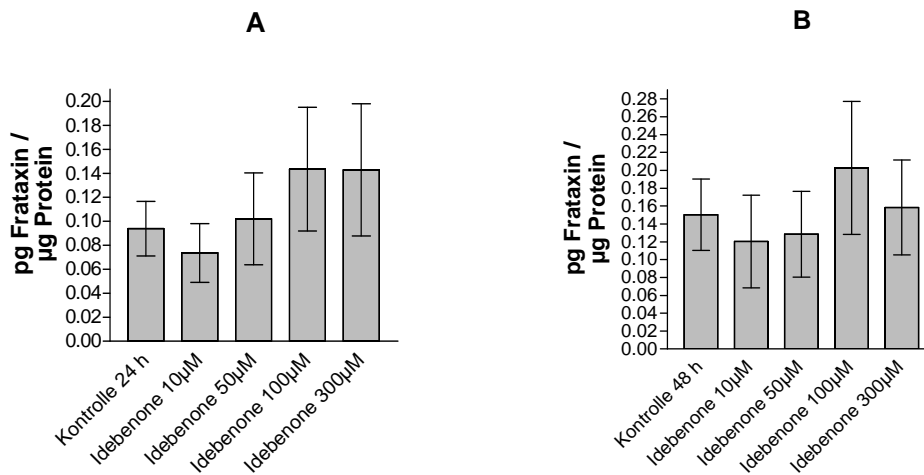


Abbildung 23 Einfluss einer Inkubation mit Idebenone (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

*SH-SY5Y-Zellen wurden im RPMI-Medium kultiviert und mit Idebenone (10 µM, 50 µM, 100 µM und 300 µM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, geerntet und lysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde der Frataxingehalt mittels Sandwich-ELISA und MSD-ELISA gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweigeteilten, ungepaarten Student's t-Test festgestellt. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.*

Abbildung 23 zeigt, dass es durch die Inkubation mit Idebenone für 24 und 48 Stunden zu keiner signifikanten Veränderung der Frataxinexpression kommt. Bei diesem Versuch wurde jedoch nicht die Reinsubstanz Idebenone verwendet, sondern ein Idebenonepräparat, welches nur ca. 1/7 der Reinsubstanz enthält. Der Rest war Stärke.

4.1.2 N-Acetyl-Cystein (NAC)

NAC regt die Glutathionsynthese an, fungiert als Radikalfänger und verhindert die Apoptose in neuronalen Zellen. In synaptischen Mitochondrien von alten Mäusen erhöht NAC, in vivo und in vitro, die Aktivität in den Komplexen I und IV. Aufgrund der oben genannten Wirkungen und der Unbedenklichkeit hinsichtlich der Toxizität

vermutet Banaclocha, dass das Thiol NAC eine Behandlungsmöglichkeit für neurodegenerative Erkrankungen darstellt [BANACLOCHA, 2001].

Studien an embryonalen P 19-Zellen weisen auf einen für FRDA-Patienten relevanten schützenden Effekt hin. Die Behandlung mit NAC führte jedoch nur bei der Zelllinie P19 zu einem Anstieg an überlebenden Zellen und zu einer Abnahme der ROS. Bei den zu Neuronen differenzierten Zellen mit Frataxinmangel zeigte NAC keine Wirkung [SANTOS et al, 2001].

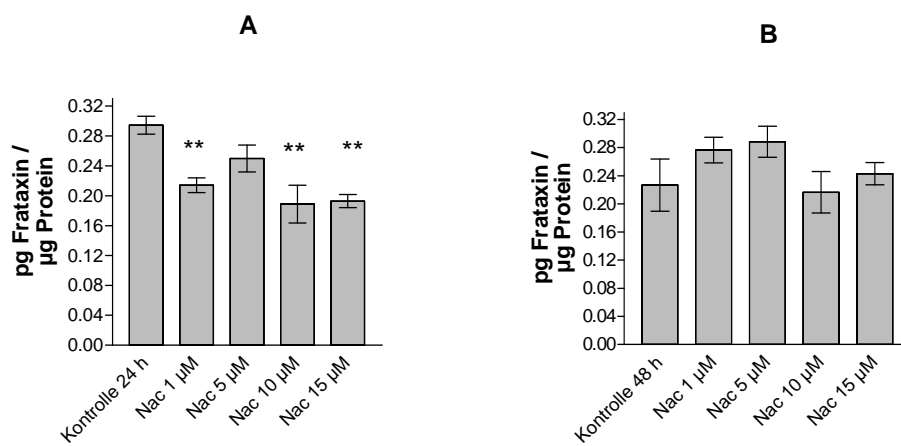


Abbildung 24 Einfluss einer Inkubation mit NAC (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden im RPMI-Medium kultiviert und mit NAC (1 µM, 5 µM, 10 µM und 15 µM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, geerntet und lysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde der Frataxingehalt mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweigeteilten, ungepaarten Student's t-Test festgestellt. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

Die Inkubation mit NAC für 24 Stunden führte zu einem signifikanten Abfall der FrataxinKonzentration. Bei einer 48-stündigen Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit NAC konnten keine Änderungen der Frataxinexpression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

4.1.3 Curcumin

Das als Lebensmittelzusatzstoff und Gewürz verwendete Curcumin hemmt die Lipidperoxidation, entgiftet ROS sowie freie NO-Radikale, und es interagiert mit Glutathion. Neben der antioxidativen Wirkung wird Curcumin auch eine Funktion als Entzündungshemmer, Amyloidaktivitätshemmer und als Anti-Tumor-Mittel zugesprochen. Curcumin wird auch eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen. Studien an Neuroblastomazellen zeigten, dass es die NF- κ B-Aktivierung hemmt und neuronale Zellen vor dem Zelltod schützt. Es wird berichtet, dass Curcumin das Protein HO-1 (Häm Oxygenase-1) in vaskulären Endothelzellen induziert [CALABRESE et al., 2005].

Ergebnisse aus Versuchen an neuronalen Zellen und an Tieren weisen auf die potentielle neuroprotektive Wirkung von Curcumin hin. Cole et al. vermuten, dass Curcumin eine wichtige Rolle in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson spielen könnte [COLE et al., 2007].

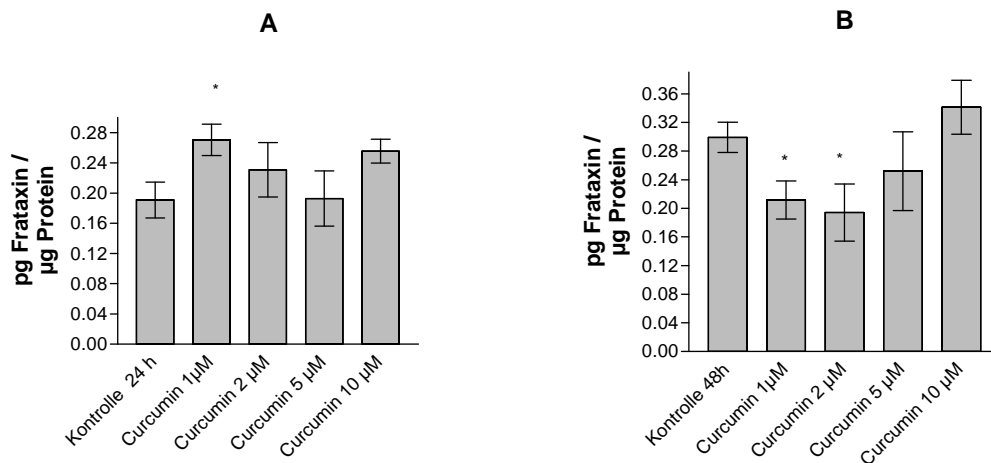


Abbildung 25 Einfluss einer Inkubation mit Curcumin (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Curcumin (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M und 10 μ M) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Abbildung 25 zeigt, dass es durch eine 24-stündige Inkubation mit Curcumin bei einer Konzentration von 1 μM zu einem signifikanten Anstieg der Frataxinexpression kommt. Bei einer 48-stündigen Inkubation mit Curcumin konnte, im Vergleich zur Kontrolle in SH-SY5Y-Zellen, ein signifikanter Abfall der Frataxinexpression bei den gleichen Konzentrationen, die bei 24-stündiger Inkubation einen Anstieg verursachten, beobachtet werden.

4.1.4 Kaffeesäure

Kaffeesäure ist ein phenolischer Pflanzenbestandteil mit einer antioxidativen Wirkung. Sie hemmt die Synthese von Leukotrienen, welche in der Immunregulation, bei Entzündungen und bei Allergien involviert sind. Kaffeesäure hemmt die durch Cu^{2+} induzierte LDL-Oxidation [OLTHOF et al., 2001].

Kaffeesäurephenylethylester (CAPE), ein Derivat der Kaffeesäure, zeigte im Zellmodell eine Wirkung als HO-1 (Hämoxigenase 1)-Induktor. HO-1-Induktion gilt als potentieller Schutz gegen oxidativen Stress im Gehirn. Es gibt eine Ähnlichkeit bei CAPE und Curcumin. CAPE wirkt wie Curcumin auch entzündungshemmend, antioxidativ, immunmodulierend und anti-kanzerogen. Es scheint, dass CAPE die Aktivität von antioxidativen Enzymen und Hämoxigenase beeinflusst [CALABRESE et al., 2005].

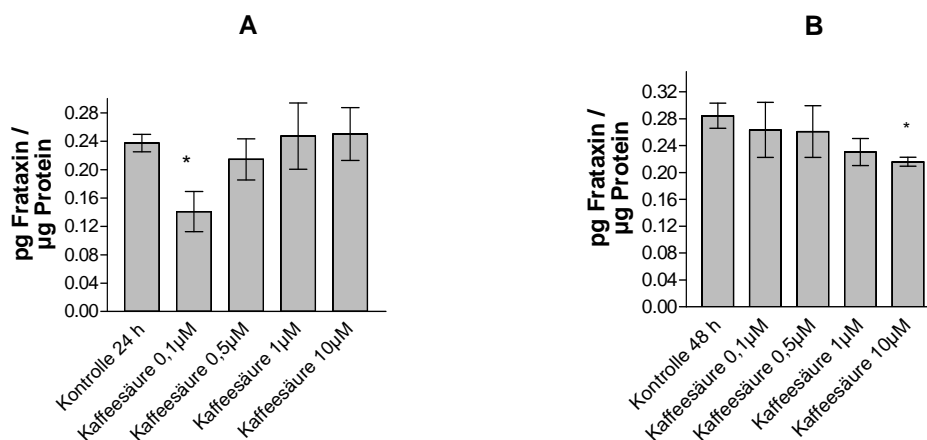


Abbildung 26 Einfluss einer Inkubation mit Kaffeesäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Kaffeesäure (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 10 μM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Abbildung 26 zeigt, dass es durch die Inkubation mit Kaffeesäure für 24 Stunden bei einer Konzentration von 0,1 μM zu einem signifikanten Abfall der Frataxinexpression kommt. Bei einer 48-stündigen Inkubation mit Kaffeesäure konnte, im Vergleich zur Kontrolle, ein signifikanter Abfall der Frataxinexpression erst bei einer Kaffeesäurekonzentration von 10 μM beobachtet werden.

4.1.5 Ascorbinsäure

Die antioxidative Wirkung und die Funktion als Radikalfänger ist im Allgemeinen bekannt. Weiters stärkt Vitamin C die zelluläre Immunabwehr und die hormonelle Abwehr. Rustin et al. vermuten, dass hochdosierte Konzentrationen an Vitamin C und Glutathion den Eisenüberschuss im Mitochondrium vom Oxidationsstatus Fe^{3+} auf Fe^{2+} reduzieren und dabei vermehrt ROS katalysieren [RUSTIN et al., 1999].

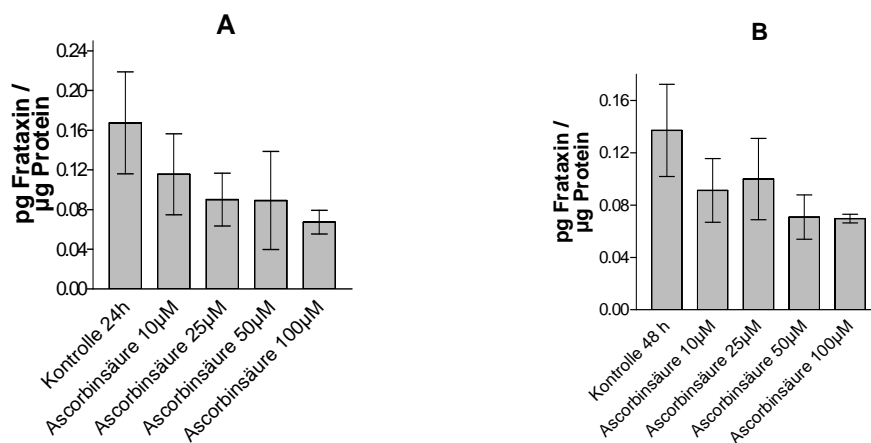


Abbildung 27 Einfluss einer Inkubation mit Ascorbinsäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Ascorbinsäure (10 μM , 25 μM , 50 μM und 100 μM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, kann durch eine Inkubation mit Ascorbinsäure eine nicht signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Frataxinexpression nach 24 und nach 48 Stunden beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 100 μM ist der Frataxingehalt am geringsten.

4.1.6 Mg-Chlorophyllin (CHLN)

Chlorophyllin wirkt antioxidativ, immunmodulierend, antimutagen und antikanzerogen. Ebenso wird ihm eine Funktion als Komplexbildner mit kanzerogenen Chemikalien zugesprochen. Zhang et al. beobachteten, dass CHLN die HO-1-Expression und Flavoprotein NQO1-Expression induziert [ZHANG et al., 2008]. Chlorophyllin (CHLN) hemmt die Lipidperoxidation in vitro. In vivo zeigten mit CHLN behandelte Mauslymphoblasten eine gesteigerte Aktivität der Superoxid-Dismutase, Glutathionperoxidase und Katalase [KUMAR et al., 2004]. Eine immunmodulierende Wirkung konnten Sharma et al. nachweisen [SHARMA et al., 2007].

Daniela Stupphan hat am Institut für Medizinische Chemie Wien im Zuge ihrer Diplomarbeit bereits den Einfluss von Mg-Chlorophyllin auf die Frataxinexpression an der Zelllinie K562 ausgetestet und eine Steigerung festgestellt. In einer folgenden Diplomarbeit konnte Nina Kager eine kurzfristige mRNA-Steigerung durch Mg-Chlorophyllin in humanen Lymphoblasten beobachten.

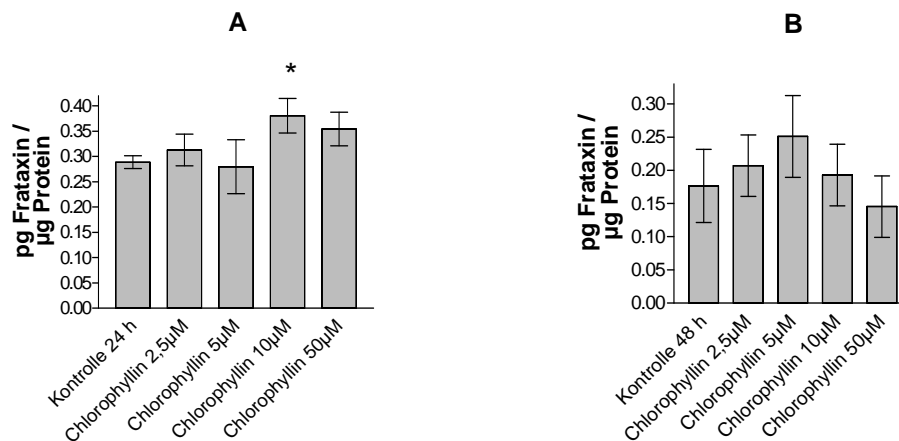


Abbildung 28 Einfluss einer Inkubation mit Mg-Chlorophyllin (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Mg-Chlorophyllin (2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 50 µM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Bei einer 24-stündigen Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit Mg-Chlorophyllin konnte, wie in Abbildung 28 ersichtlich, ab einer Konzentration von 10 µM ein signifikanter Anstieg der Frataxinexpression beobachtet werden. Bei einer 48-stündigen Inkubation mit Mg-Chlorophyllin konnte, im Vergleich zur Kontrolle, kein signifikanter Anstieg der Frataxinexpression gemessen werden.

Wie die zuvor erwähnte Steigerung der Frataxinexpression in K-562-Zellen und der Steigerung der mRNA-Expression in humanen Lymphoblasten konnte auch an der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y eine Erhöhung des Frataxingehaltes durch Mg-Chlorophyllin beobachtet werden.

4.1.7 α-Tocopherol-Succinat und Trolox

Das mitochondrienspezifische Antioxidant Mito E zeigte in FRDA-Fibroblasten einen stark erhöhten Schutz vor endogenem oxidativem Stress. Mito E ist 350mal effektiver als das Vitamin E-Analog Trolox [JAUSLIN et al., 2003].

Mito E ist als Medikament nicht zugelassen. Im Internet werden diverse angeblich mitochondrien-spezifisch-wirkende Vitaminpräparate angeboten. Als Hauptwirkstoff wird dabei meistens α -Tocopherol-Succinat angeführt.

α -Tocopherol-Succinat, ein Vitamin E-Succinatester, weist eine stärkere antitumor und antiproliferative Wirksamkeit auf als andere Vitamin-E-Analoga. In vitro wirkt es wachstumshemmend auf verschiedene Krebszelllinien. In vivo hemmt es das Tumorwachstum. Membranpotential-Änderungen durch die Succinylgruppe werden wahrscheinlich durch α -Tocopherol-Succinat, welches hier als Detergens wirkt, verursacht. Dies führt wahrscheinlich zur Apoptose in Leukämiezellen [KUMAR et al., 2008].

Eine Supplementierung mit Vitamin-E-Succinat führte zu einer Anhäufung von α -Tocopherol-Succinat in der Membran von Herzmitochondrien. Diese reichten aber nicht aus, um vor Doxorubicin (DOX) induziertem oxidativem Stress zu schützen [BERTHIAUME et al., 2005].

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin-E-Analog. Es hemmt die Lipidperoxidation und schützt den Komplex IV vor NO induzierten Schäden [CALABRESE et al., 2006].

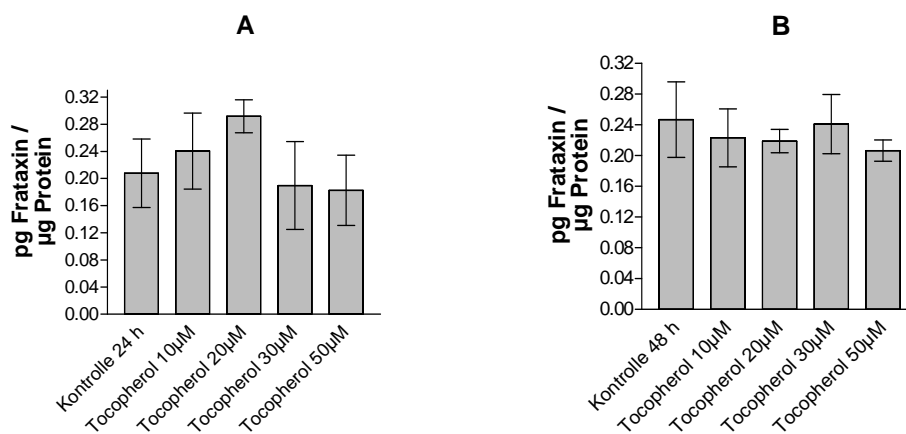


Abbildung 29 Einfluss einer Inkubation mit α -Tocopherol-Succinat (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit *α*-Tocopherol-Succinat (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M und 50 μ M) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Bei einer Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit *α*-Tocopherol-Succinat konnte, wie in Abbildung 29 ersichtlich, kein signifikanter Anstieg der Frataxinexpression beobachtet werden. Bei einer 48-stündigen Inkubation konnte kein Einfluss auf die Frataxinexpression beobachtet werden.

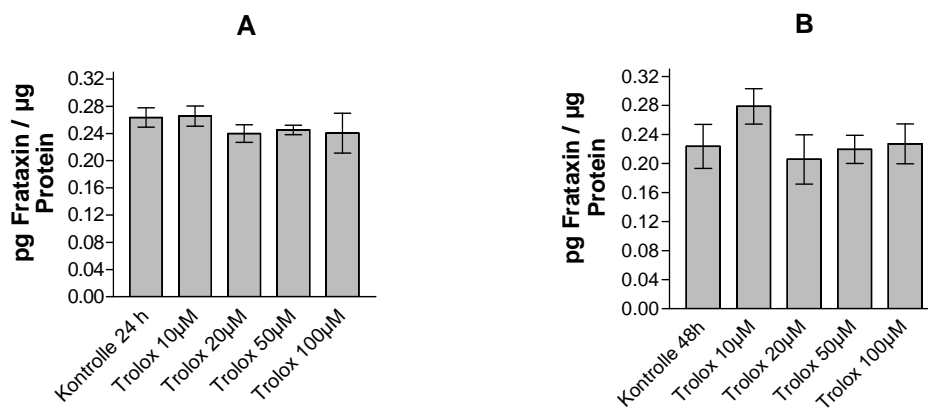


Abbildung 30 Einfluss einer Inkubation mit Trolox (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit den Trolox (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M und 100 μ M) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 24.

Wie in Abbildung 30 ersichtlich, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Frataxinexpression beobachtet werden.

4.1.8 Einfluss von Natrium-Selenit, Resveratrol, Ferulasäure und Ellagsäure auf die Frataxinexpression in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y

Die in dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuche mit Natrium-Selenit, Resveratrol, Ferulasäure und Ellagsäure führten in SH-SY5Y-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Frataxinexpression im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrolle.

4.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt bei den Antioxidantien α -Tocopherol-Succinat und Mg-Chlorophyllin einen nicht signifikanten Anstieg der Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen. Bei den Antioxidantien NAC, Idebenone, Curcumin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure hingegen konnte eine teilweise signifikante Senkung der Frataxingehalte in SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass Frataxin vermutlich selbst als Antioxidant wirkt, und dass beim Vorhandensein von anderen Antioxidantien seine Expression vermindert wird. Im Allgemeinen kann aber anhand der folgenden Ergebnisse diese Vermutung nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse zeigen lediglich, dass die einzelnen Antioxidantien unterschiedliche Einflüsse auf die Frataxinexpression haben.

Die Antioxidantien Resveratrol, Ferulasäure, Ellagsäure und Natrium-Selenit führten in SH-SY5Y-Zellen zu keiner Beeinflussung der Frataxinexpression im Vergleich zur nicht inkubierten Kontrolle.

4.2 Einfluss von Radikalbildner auf die Expression des Proteins Frataxin

Im Mausmodell und in FRDA-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression an Frataxin vor Schädigungen durch oxidativen Stress schützt. Dabei steigert es die zelluläre antioxidative Abwehr. Die durch ROS verursachten Schäden wurden dadurch verringert [SHOICHET et al., 2002]. Auch Studien mit *Drosophila* zeigten, dass eine Frataxinüberexpression diese vor oxidativem Stress schützte und zur Verlängerung der Lebensdauer dieser Fliegen führte [RUNKO et al., 2008].

Turano et al. konnten einen Anstieg der Frataxinexpression in FRDA-Lymphoblasten und in frataxinüberexpressierenden PC12-Zellen, nach dem sie mit dem Oxidant 3-NP (3-Nitropropionsäure) behandelt wurden, feststellen [TURANO et al., 2003].

Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Funktion von Frataxin als Antioxidans, bzw. auf eine antioxidative Wirksamkeit hin. Aufgrund dieser Vermutung stellte sich

die Frage, ob nach Induktion von oxidativem Stress die Frataxinexpression im Zuge der antioxidativen Abwehr steigt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner wie Antimycin A und TBH und durch Metalle wie FAC und CuSO_4 auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen untersucht.

4.2.1 Antimycin A

Antimycin A hemmt den Komplex III in der Atmungskette. Es steigert dadurch vermutlich die ROS-Bildung durch den Q-Zyklus, indem Q durch ein einzelnes Elektron zu einem Q-Radikal reduziert wird. Dieses Q-Radikal reduziert nun O_2 zu einem O_2 -Radikal [TURRENS; 2003]. Weiters hemmt Antimycin A den Verbrauch an Sauerstoff im Komplex IV und die Synthese von ATP im Komplex V der Atmungskette [NAPOLI et al., 2006].

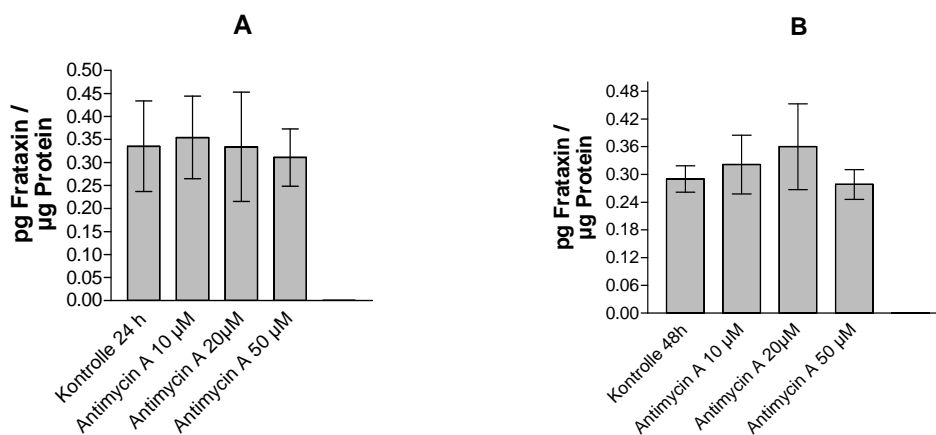


Abbildung 31 Einfluss einer Inkubation mit Antimycin A (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Antimycin A (10 μM , 20 μM und 50 μM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, geerntet und lysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde der Frataxingehalt mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem

zweigeteilten, ungepaarten Student's *t*-Test festgestellt. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

Nach 24 Stunden kann, wie Abbildung 31 zeigt, kein Einfluss auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen durch die Inkubation mit dem Radikalbildner Antimycin A festgestellt werden. Zu diesem Ergebnis kommt man auch nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen.

4.2.2 Eisen-III-Ammoniumcitrat (FAC)

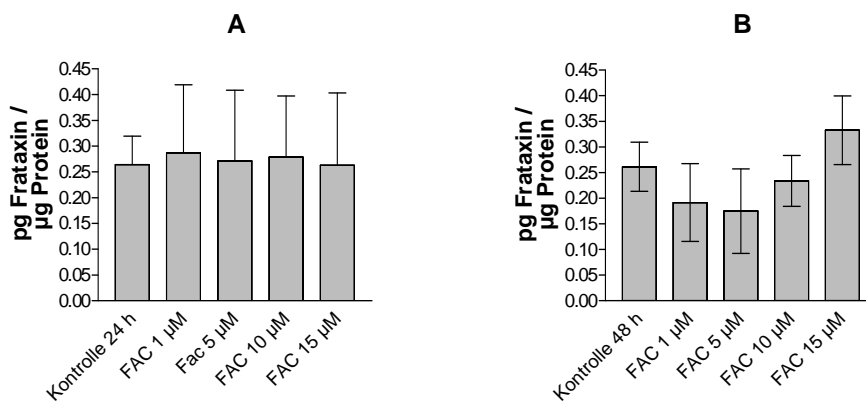


Abbildung 32 Einfluss einer Inkubation mit FAC (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit FAC (1 µM, 5 µM, 10 µM und 15 µM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 31.

Die Inkubation mit FAC hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen.

4.2.3 Kupfersulfat (CuSO₄)

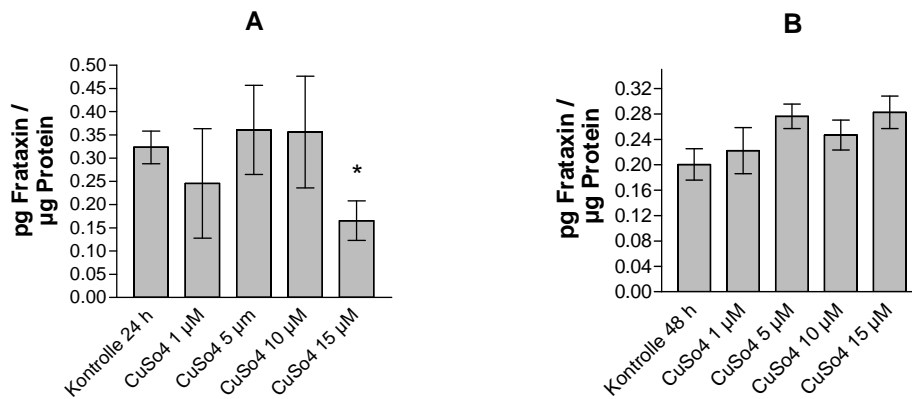


Abbildung 33 Einfluss einer Inkubation mit CuSO₄ (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit CuSO₄ (1 µM, 5 µM, 10 µM und 15 µM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 31.

Bei einer Inkubation der Zellen mit CuSO₄ konnte bei einer Konzentration von 15 µM nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Frataxinexpression festgestellt werden.

4.2.4 Tert-Butylhydroperoxid (TBH)

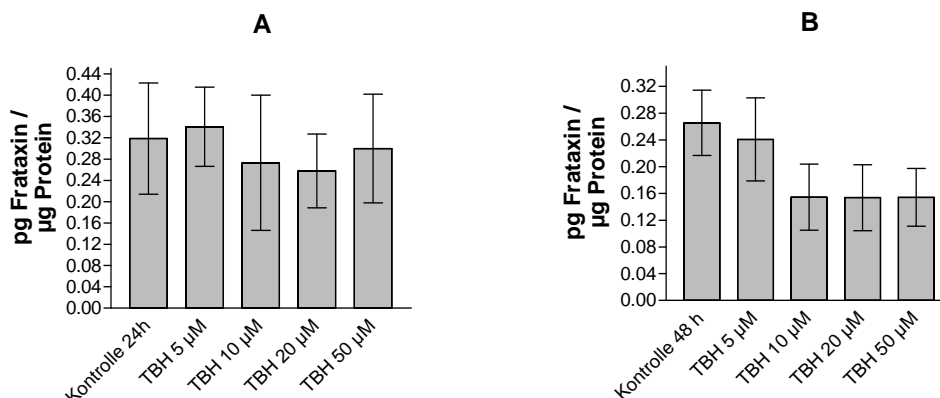


Abbildung 34 Einfluss einer Inkubation mit TBH (24 und 48 Stunden) auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit TBH (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 50 μ M) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 31.

Es konnte bei einer 24-stündigen Inkubation mit TBH kein Einfluss auf die Frataxinexpression festgestellt werden. Wie in Abbildung 34 ersichtlich, sinkt der Frataxingehalt nach einer Inkubation von 48 Stunden ab einer TBH-Konzentration von 10 μ M. Eine mögliche toxische Wirkung von TBH auf die SH-SY5Y-Zellen könnte dafür die Ursache sein.

4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Versuche konnte bei keinem der Oxidantien eine signifikante Steigerung des Proteins Frataxin in SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich ein nicht signifikanter Anstieg bei FAC und CuSO₄ nach einer Inkubation von 48 Stunden.

Bei den Radikalbildnern TBH (48-Stunden-Inkubation) und CuSO₄ (24-Stunden-Inkubation) sinkt der Frataxingehalt. Grund dafür könnte eine zu hohe Konzentration dieser Oxidantien sein, welche vermutlich eine toxische Wirkung auf die Zellen haben. Die Vermutung, dass das Frataxin als Antioxidans wirkt, und dass sich folglich die Expression nach induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner und Metalle erhöht, konnte im Zuge dieser Arbeit an der Zelllinie SH-SY5Y nicht bestätigt werden.

4.3 Einfluss von Antioxidantien auf die Expression der Frataxin-mRNA in SH-SY5Y-Zellen

Friedreich's Ataxie ist die häufigste Form der erblichen Ataxien. Die meisten Patienten haben eine homozygote Expansion von GAA-Triplet-Repeats im ersten Intron des Frataxingens. Diese vermehrten GAA-Wiederholungen verursachen eine Senkung der Frataxin-mRNA-Levels und der Frataxinproteinlevels. Die durch diese Expansion verlängerte Prä-mRNA verhindert ein effektives Splicing. Dadurch kann das Protein nicht korrekt hergestellt werden.

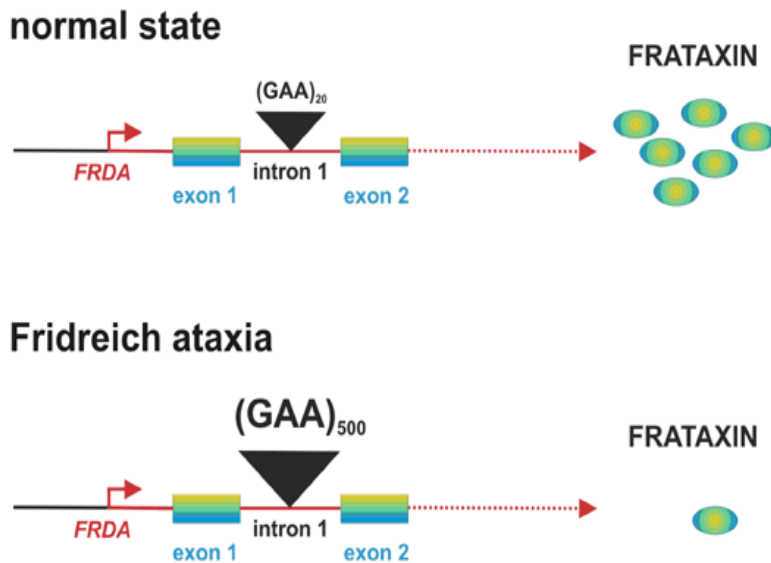


Abbildung 35 Frataxinexpression [GATCHEL et al., 2005]

In den vorangegangenen Kapiteln 4.1 und 4.2 wurde ein möglicher Einfluss von Antioxidantien und Oxidantien auf die Frataxinproteinexpression untersucht. Im letzten Teil dieser Diplomarbeit wurde, um die Ergebnisse des ELISA's zu bestätigen, auch der Einfluss von Antioxidantien auf Ebene der Transkription untersucht. Dafür wurde eine relative Quantifizierung der Frataxinexpression mittels Real-Time-PCR durchgeführt, wobei die Erhöhung bzw. die Reduktion der Expression des Zielgens (Frataxin) in Bezug auf ein Referenzgen (HPRT1) ermittelt wurde. Dieses als Housekeepinggen bezeichnete Referenzgen dient zur Durchführung eines relativen Mengenvergleichs, d.h. die Quantifizierung wird durch HPRT1 normalisiert. Für die Quantifizierung wird der Fluoreszenz-Schwellenwert, der so genannte Threshold-Cycle oder C_T -Wert, berechnet. Die relative Genexpression (RGE) wird mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ bestimmt. Sie gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an. Die Auswertung der Real-Time-PCR-Daten erfolgte mit dem Computerprogramm StepOne v. 2. Zur statistischen Berechnung der Frataxinexpression in inkubierten Zellen im Vergleich zu einer nicht inkubierten Kontrolle wurde der Student's t-Test angewendet.

Für die Frataxin-mRNA-Expressionsbestimmung wurden die Antioxidantien Mg-Chlorophyllin, Ascorbinsäure und Idebenone ausgewählt. Die mit den unterschiedlichen Antioxidantien inkubierten SH-SY5Y-Zellen wurden für die RNA-Isolierung mit 1 ml TRI-Reagenz lysiert. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde der High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit verwendet. Der für die Real-Time-PCR benötigte TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix wurde mit dem Assay-Mix, der entweder das Zielgen (Frataxin) oder das Housekeepinggen (HPRT1) enthält, gemischt.

4.3.1 Ascorbinsäure

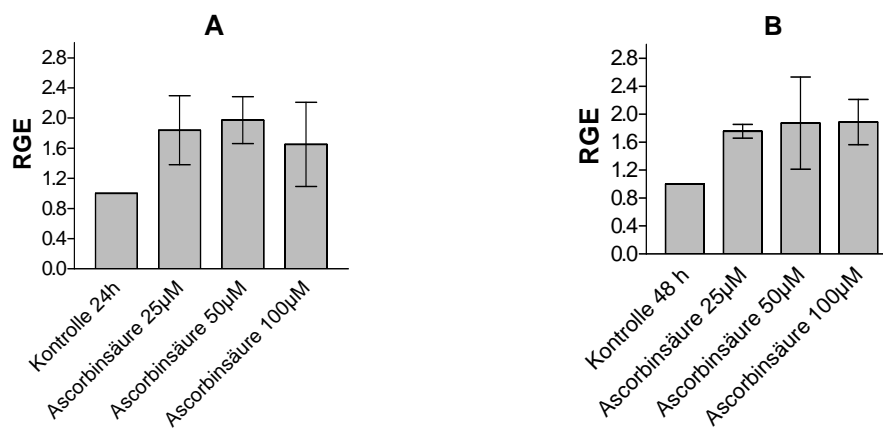


Abbildung 36 Einfluss einer Inkubation mit Ascorbinsäure (24 und 48 Stunden) auf die Frataxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen

Die mit Ascorbinsäure (25 μM , 50 μM und 100 μM) 24 (A) und 48 (B) Stunden inkubierten SH-SY5Y-Zellen wurden für die RNA-Isolierung mit 1 ml TRI-Reagenz lysiert. Der High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit diente zur Umschreibung der RNA in cDNA. Für die Real-Time-PCR wurde der TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix entweder mit dem Zielgen oder mit dem Housekeepinggen gemischt. Die relative Genexpression (RGE) wurde mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ bestimmt. Zur statistischen Berechnung der Frataxin-m-RNA-Expression in inkubierten Zellen zum Vergleich von einer nicht inkubierten Kontrolle wurde der Student's t-Test angewendet.

Wie in Abbildung 36 ersichtlich ist, kommt es nach einer Inkubation von 24 und 48 Stunden zu keiner signifikanten Erhöhung der Frataxin-mRNA-Level.

4.3.2 Mg-Chlorophyllin

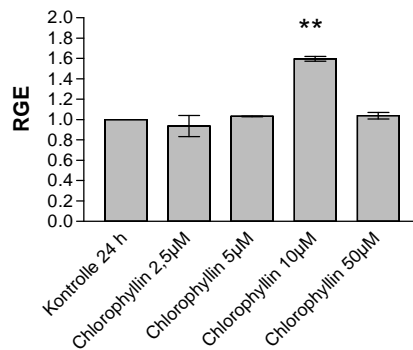


Abbildung 37 Einfluss einer Inkubation mit Mg-Chlorophyllin (24 Stunden) auf die Frataxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Mg-Chlorophyllin (2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 50 µM) 24 Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 36.

Wie in Abbildung 37 ersichtlich, konnte nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10µM Mg-Chlorophyllin ein signifikanter Anstieg der relativen Frataxingenexpression festgestellt werden. Es scheint, dass durch Mg-Chlorophyllin die Frataxinproduktion angeregt wird.

4.3.3 Idebenone

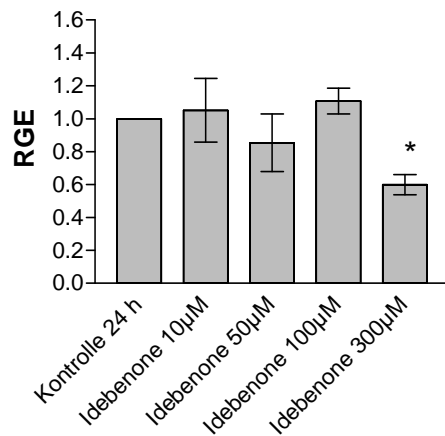


Abbildung 38 Einfluss einer Inkubation mit Idebenone (24 Stunden) auf die Frataxin-mRNA-Expression in SH-SY5Y-Zellen

Die Zellen wurden mit Idebenone (10 µM, 50 µM, 100 µM und 300 µM) 24 Stunden inkubiert. Für den weiteren Versuchsablauf siehe Abbildung 36.

Abbildung 38 zeigt nach 24 Stunden bei einer Inkubation mit 300µM Idebenone einen signifikanten Abfall der RGE (Relativen Genexpression). Anzumerken ist zu diesem Versuch, dass nicht die Reinsubstanz verwendet wurde, sondern ein Idebenonepräparat, welches nur ca. 1/7 der Reinsubstanz enthält.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass bis zu einer Idebenonekonzentration von 100 µM kein Einfluss auf die mRNA-Expression beobachtet werden konnte. Bei einer Konzentration von 300µM sinkt diese signifikant. Diese Ergebnisse können nicht in Zusammenhang mit den Ergebnissen des Sandwich-ELISA's gebracht werden. Beim ELISA sinkt die Frataxinexpression anfänglich und steigt anschließend konzentrationsabhängig.

Bei Mg-Chlorophyllin konnte bei einer Konzentration von 10 μM nach 24-stündiger Inkubation genauso wie bei der Expressionsbestimmung des Frataxinproteins ein Anstieg des mRNA-Gehaltes beobachtet werden.

Die Real-Time-PCR-Ergebnisse von Ascorbinsäureinkubierten SH-SY5Y-Zellen sind den Ergebnissen der ELISA-Auswertung gegensätzlich. Im Unterschied zur Frataxinsenkung auf Proteinebene steigt im Vergleich zur Kontrolle die relative Frataxingenexpression auf mRNA-Ebene an. Grund dafür könnte sein, dass Ascorbinsäure eventuell einen Mechanismus bei der Translation stört. Dies würde die Anhäufung von Frataxin-mRNA zum Einen und die verminderte Frataxinprotein-Expression zum Anderen erklären.

5. Schlussbetrachtung

Die neurodegenerative Erkrankung Friedreich's Ataxie (FRDA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch eine genetische Mutation am Chromosom 9/q13-q21.1 ausgelöst wird. Diese Mutation, welche die Ursache des Frataxinmangels bei FRDA ist, ist im ersten Intron des Frataxins lokalisiert. Dabei handelt es sich um eine Expansion eines GAA-Triplett-Repeats. Diese vermehrten GAA-Wiederholungen verursachen eine Senkung der Frataxin-mRNA-Levels und der Frataxinproteinlevels.

Die Pathogenese der Friedreich's Ataxie ist auf eine geringere Menge des mitochondrialen Proteins Frataxin zurückzuführen. Dies führt zu einer mitochondrialen Eisenakkumulation und bzw. oder zu einem Eisen-Schwefel-Cluster (ISC)-Defekt. In der Folge bewirkt dies letztlich eine Beeinträchtigung der Energieproduktion in den Mitochondrien sowie eine Erhöhung von oxidativem Stress.

Eine Heilung der Krankheit bzw. eine gezielte Therapie für Friedreich's Ataxie Patienten gibt es bis jetzt nicht. Eine Verbesserung des Allgemeinzustandes der FRDA-Patienten kann durch eine Therapie der Symptome und der Begleiterkrankungen erreicht werden. Zur Zeit werden mehrere Behandlungsstrategien mit möglichen therapeutisch wirksamen Substanzen, die eventuell für die Behandlung von FRDA von Bedeutung sind, verfolgt.

Ein möglicher Therapieansatz ist die Behandlung mit Eisenchelatoren wie PIH, PCIH und Deferiprone, die vermutlich zur Senkung der intramitochondrialen Eisenakkumulation beitragen [MACKENZIE et al., 2008].

Eine weitere Behandlungsstrategie, welche die Steigerung der Frataxinexpression zum Ziel hatte, zeigte, dass die Substanzen Hämin, Natriumbutyrat [SARSERO et al., 2003], Cisplatin [GAZIZADEH et al., 2003], Deacetylase-Inhibitoren wie BML-210 [HERMAN et al., 2006] und Erythropoietin [STURM et al., 2005] eine frataxinexpressionsteigernde Wirkung haben. Es wird ebenfalls eine Gen- bzw. eine

Proteintherapie in Betracht gezogen, um eine Steigerung der Frataxinexpression zu bewirken.

Oxidativer Stress spielt in der Pathologie von FRDA eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass erhöhter oxidativer Stress bei FRDA zum Einen durch die Ansammlung von Hydroxylradikalen und/oder zum Anderen durch einen Mangel an ISC-Proteinen bzw. durch defekte ISC-Proteine entsteht [TOZZI et al., 2002]. Therapieversuche mit verschiedenen Antioxidantien zeigten eine teilweise Verbesserung der Symptome. Antioxidantien die geeignet wären für eine gezielte Therapie oder für eine Heilung der Krankheit konnten bislang jedoch nicht gefunden werden.

Aufgrund der Vermutung, dass Frataxin selbst als Antioxidant wirkt, müsste folglich seine Expression in Gegenwart von anderen Antioxidantien sinken.

In der vorliegenden Arbeit wurde der mögliche Einfluss von verschiedenen Antioxidantien mit bekannter neuroprotektiver Wirkung auf die Frataxinexpression in der humanen Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y untersucht. Einige der Antioxidantien haben eine bereits in anderen Studien festgestellten Einfluss auf das Protein Frataxin.

Die Ergebnisse zeigten auf Proteinebene bei den Antioxidantien α -Tocopherol-Succinat und Mg-Chlorophyllin einen Anstieg der Frataxinexpression in SH-SY5Y-Zellen. Bei den Antioxidantien NAC, Idebenone, Curcumin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure hingegen konnte eine Senkung der Frataxingehalte in SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden. Auf mRNA-Ebene bewirkte Mg-Chlorophyllin wie auch auf Proteinebene bei einer Konzentration von 10 μ M nach 24-stündiger Inkubation einen Anstieg der Frataxin-mRNA-Expression. Bei Idebenone sank die Frataxinexpression auf Proteinebene nur anfänglich. Auf Transkriptionsebene hingegen konnte bis zu einer Idebenonekonzentration von 100 μ M kein Einfluss auf die mRNA-Expression beobachtet werden. Erst bei einer Konzentration von 300 μ M sank diese signifikant. In mit Ascorbinsäure inkubierten Zellen stieg auf mRNA-Ebene, im Gegensatz zur Proteinebene die relative Frataxingenexpression an. Die Anhäufung von Frataxin-mRNA zum Einen und die verminderte Frataxinproteinexpression zum Anderen könnte

damit erklärt werden, dass Ascorbinsäure eventuell einen Mechanismus bei der Translation stört.

Diese Ergebnisse zeigen lediglich, dass die einzelnen Antioxidantien unterschiedliche Einflüsse auf die Frataxinexpression haben. Die Vermutung, dass Frataxin selbst als Antioxidans wirkt, und dass beim Vorhandensein von anderen Antioxidantien seine Expression vermindert wird, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression an Frataxin vor Schädigungen durch oxidativen Stress schützt ([SHOICHET et al., 2002], [RUNKO et al., 2008], [RISTOW et al., 2000]).

Diese Ergebnisse weisen auch auf eine mögliche Funktion des Frataxins als Antioxidant bzw. auf eine antioxidative Wirksamkeit des Frataxins hin. Es stellt sich die Frage, ob nach Induktion von oxidativem Stress die Frataxinexpression im Zuge der antioxidativen Abwehr steigt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner und durch Metalle auf die Frataxinexpression in SH-SY5Y Zellen untersucht.

Es konnte bei keinem der Oxidantien (AA, TBH, CuSO₄, FAC) eine signifikante Steigerung des Proteins Frataxin in SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden.

Die Vermutung, dass Frataxin als Antioxidant wirkt, und dass sich folglich die Expression nach induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner und Metalle erhöht, konnte im Zuge dieser Arbeit an der Zelllinie SH-SY5Y nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit weisen darauf hin, dass einige der Antioxidantien und Oxidantien unterschiedliche Einflüsse auf die Frataxinexpression haben. Ob jedoch diese Einflüsse aufgrund einer antioxidativen Wirkung des Frataxins auftreten, konnte nicht beobachtet werden.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es den möglichen Einfluss von Antioxidantien und Oxidantien auf die Frataxinexpression in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y zu untersuchen. Die genaue Funktion des mitochondrialen Proteins Frataxin, dessen verminderte Expression die neurodegenerative Erkrankung Friedreich's Ataxie verursacht, ist noch unklar. Die Erkenntnis, dass oxidativer Stress in der Pathologie von FRDA eine wichtige Rolle spielt und die Vermutung, dass Frataxin eine Wirkung als Antioxidant besitzt, war Anlass für Therapieversuche mit verschiedenen Antioxidantien. Diese zeigen jedoch nur geringe Verbesserungen der Symptome.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei den Antioxidantien NAC, Idebenone, Curcumin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure teilweise eine signifikante Senkung der Frataxingehalte in SH-SY5Y-Zellen. Die neuroprotektiv wirkenden Antioxidantien Resveratrol, Ferulasäure, Ellagsäure und Natrium-Selenit führten hingegen in SH-SY5Y-Zellen zu keiner Beeinflussung der Frataxinexpression. Mg-Chlorophyllin bewirkte bei einer Konzentration von 10 μM nach 24-stündiger Inkubation einen Anstieg der Frataxinproteinexpression und der Frataxin-mRNA-Expression.

Die Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Antioxidantien unterschiedliche Einflüsse auf die Frataxinexpression haben. Die Vermutung, dass Frataxin selbst als Antioxidant wirkt, und dass beim Vorhandensein von anderen Antioxidantien seine Expression vermindert wird, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Auch die Vermutung, dass nach Induktion von oxidativem Stress die Frataxinexpression im Zuge der antioxidativen Abwehr steigt, konnte in SH-SY5Y-Zellen nicht beobachtet werden.

Die Vermutung, dass erstens Frataxin als Antioxidans wirkt, zweitens die Frataxinexpression in Gegenwart von anderen Antioxidantien vermindert wird, und drittens sich die Expression nach induziertem oxidativem Stress durch Radikalbildner und Metalle erhöht, konnte im Zuge dieser Arbeit an der Zelllinie SH-SY5Y nicht beobachtet werden.

6. Summary

The aim of this thesis was to investigate the influence of antioxidants and oxidants on the frataxin expression in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. The exact function of the mitochondrial protein frataxin, whose decreased expression causes the neurodegenerative disorder Friedreich's ataxia, is still unknown. The finding that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of FRDA as well as the often proposed assumption of frataxin's antioxidative function, therapy approaches with antioxidants have been investigated. These show a partial albeit very little improvement of the symptoms.

The results of this study show a decrease of frataxin levels with antioxidants such as NAC, idebenone, curcumin, caffeic acid and ascorbic acid in SH-SY5Y-cells. The neuroprotective antioxidants resveratrol, ferula acid, ellagic acid and sodium selenite did not influence the frataxin expression. Mg-chlorophylline caused an increase of the frataxin expression and the frataxin-mRNA-expression after 24 hours incubation and at a concentration of 10 μ M.

The results of my study show indeed different influences of diverse antioxidants on frataxin expression, but the proposed antioxidative function of the protein frataxin and its decreased expression with the presence of other antioxidants could not be observed in this work. The assumption that frataxin expression increases during anti-oxidative defense after induced oxidative stress could not be confirmed in SH-SY5Y-cells.

The proposed antioxidant function of frataxin, which on the one hand causes a decrease of the frataxin expression by the presence of other antioxidants and on the other hand an increase of the expression after induced oxidative stress by substances that promote oxidative stress could not be observed during this work with the cell line SH-SY5Y.

7. Literaturverzeichnis

[Aitio ML. N-acetylcysteine-passe-partout or much about nothing? Br J Clin Pharmacol. Jänner, 2006; 61(1): 5-15.]

[Alper G, Narayanan MD, Narayanan Vinodh. Friedreich's Ataxia. Pediatr Neurol 28, 2003; 335-341.]

[Banaclocha M. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases . Medical Hypotheses, 56, Issue 4, 2001; 472-477.]

[Baralle M, Pastor T, Bussani E, Pagani F. Influence of Friedreich Ataxia GAA Noncoding Repeat Expansions on Pre-mRNA Processing. The American Journal of Human Genetics 83, July, 2008; 77-88.]

[Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature Reviews Drug Discovery 5, 2006; 493-506]

[Becker EM, Greer JM, Ponka P, Richardson DR. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. Blood 99, 2002; 3813-3822.]

[Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev 78(2), 1998; 547-581.]

[Bencze KZ, Kondapalli KC, Cook JD, McMahon S, Millan-Pacheco C, Pastor N, Stemmler TL. The structure and function of frataxin. Crit Rev Biochem, 41 (5), 2006; 269-291.]

[Berger TM, Polidori MC, Dabhag A, Evans PJ, Halliwell B, Marrow JD, Roberts LJ, Frei B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-over loaded human plasma. *J Biol Chem.* 1992; 272:15656-15660.]

[Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovascular Toxicology*, Volume 5, Number 3, September, 2005.]

[Bhidayasiri R, Perlman SL, Pulst SM, Geschwind DH. Late-onset Friedreich ataxia: phenotypic analysis, magnetic resonance imaging findings, and review of the literature. *Arch Neurol.*, 62, 2005; 1865-9.]

[Bishop GM, Robinson SR, Liu Q, Perry G, Atwood CS, Smith MA. Iron: a pathological mediator of Alzheimer disease? *Dev Neurosci*, 2002; 24: 184-187.]

[Bulteau AL, Dancis A, Gareil M, Montagne JJ, Camadro JM, Lesuisse E. Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic Biol Med.* 42(10), 2007; 1561-70.]

[Bulteau, AL, O'Neill, HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, 305, 2004; 242-245.]

[Butterfield DA, Castegna A, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr Neurosci* 5, 2002; 229-239.]

[Buyse G, Mertens L, Di Salvo G, Matthijs I, Weidemann F, Eyskens B, Goossens W, Goemans N, Sutherland GR, Van Hove JL. Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology*, 60(10), May, 2003; 1679-1681.]

[Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci.*, 233 (1-2), June, 2005; 145-62.]

[Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, Isaya G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, 11, 3, 2002; 217-227.]

[Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rotig A, Rustin P. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2001; 2061-2067.]

[Cheng CY, Su SY, Tang NY, Ho TY, Chiang SY, Hsieh CL. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res*, May, 2008; 1209: 136-50.]

[Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.*, 2007;595:197-212.]

[Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi YI, Ristow M, Shoelson SE. Crystal Structure of Human Frataxin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, Issue 40, 2000; 30753-30756.]

[Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med.*, 1996; 335: 1169-75.]

[Edderkaoui M, Odnokova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, June, 2008;14(23):3672-80.]

[Emond M, Lepage G, Vanasse M, Pandolfo M. Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology*, 2000; 55: 1752-1753.]

[Forceville X, Laviolle B, Annane D, Vitoux D, Bleichner G, Korach JM, Cantais E, Georges H, Soubirou JL, Combes A, Bellissanr E. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Critical Care*, Vol 11, No 4, 2007; July, 1-10]

[Friedman L, Schadt KA, Wilson RB, Lynch DR. Efficacy and safety of idebenone in the treatment of Friedreich ataxia: a review of early results and future prospects, *Future Neurology* Vol. 3, No. 4, July, 2008; 375-384]

[Gakh O, Adamec J, Gacy AM, Twesten RD, Owen WG, Isaya G. Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry*, 2002;41: 6798-6804.]

[Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo-US Cross-National Dementia Study, *Arch Neurol* 57, 2000; 824-830.]

[Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, Mineri R, Seveso V, DiDonato S, Taroni F. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients; *Neurogenetics*, Volume 8, Number 4, November, 2007.]

[Gerber J, Muhlenhoff U, Lill R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* 4, 2003; 906-911.]

[Ghazizadeh M. Cisplatin may induce frataxin expression, *J. Nippon Med. Sch.* 70, 2003, 367-371.]

[Gonzalez-Cabo P, Vazquez-Manrique R.P, Garcia-Gimeno M.A, Sanz P, Palau F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2005; 2091-2098.]

[Harding A. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 1981; 104: 589-620]

[Hart P, Lodi R, Rajagopalan B, Bradley JL, Crilley JG, Turner Ch, Blamire AM, Manners D, Styles P, Schapira AHV, Cooper JM. Antioxidant Treatment of Patients with Friedreich Ataxia. *Arch Neurol.*, 2005; 62:621-626.]

[Helveston W, Cibula JE, Hurd R, Uthman BM, Wilder BJ. Abnormalities of antioxidant metabolism in a case of Friedreich's disease. *Clin Neuropharmacol*, 1996; 19: 271-75.]

[Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 2004; 117:285-297.]

[Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*, 2006; 2: 551-558.]

[Irazusta V, Cabisco E, Reverter-Branchat G, Ros J, Tamarit J. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia, *J. Biol. Chem.* 281, 2006, 12227-12232.]

[Jauslin M, Meier Th, Smith RAJ, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *The FASEB Journal express article*, 2003; 10.1096/03-0240.]

[Jauslin M, Wirth Th, Meier Th, Schoumacher F. A cellular model for Friedreich Ataxia reveals small-molecule glutathione peroxidase mimetics as novel treatment strategy. *Human Molecular Genetics*, Vol. 11, No. 24, 2002; 3055-3063.]

[Jauslin ML, Vertuani S, Durini E, Buzzoni L, Ciliberti N, Verdecchia S, Palozza P, Meier T, Manfredini S. Protective effects of Fe-Aox29, a novel antioxidant derived from a molecular combination of Idebenone and vitamin E, in immortalized fibroblasts and fibroblasts from patients with Friedreich Ataxia. *Mol Cell Biochem*, August, 2007; 302(1-2):79-85.]

[Jennifer R, Zoghbi G & HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanism and common principles. *Nature Review Genetics* 6, October, 2005; 743 -755.]

[Kalinowski D, Richardson R. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Review*, Vol. 57, No. 4, 2005; 547-583.]

[Kaur D, Andersen J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Rex Rev*, 2004; 3: 327-343]

[Koenig, M. Friedreich ataxia and AVED. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 2001; 5845-5855 (MacGraw-Hill, New York).]

[Krasilnikova MM, Mirkin SM. Replication stalling at Friedreich's ataxia (GAA)n repeats in vivo. *Mol. Cell. Biol*, 24, 2004; 2286-2295]

[Kumar S, Khanduja KL, Verma N, Verma SC, Avti PK, Pathak ChM. ATRA promotes alpha tocopherol succinate-induced apoptosis in freshly isolated leukemic cells from chronic myeloid leukemic patients. *Mol Cell Biochem*, 2008; 307:109-119.]

[Kumar SS, Shankar B, Sainis KB. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*, May, 2004; 1672(2):100-111.]

[Lakovleva LV, Ivakhnenko AK, Buniatian ND. The protective action of ellagic acid in experimental myocarditis. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 1998; 61, 32-34.]

[Lee DW, Andersen JK, Kaur D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Mol Interv*, 2006; 6: 89-97.]

[Leonard S. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 2003; 1017-1026.]

[Lill R, Muhlenhoff U. Iron–sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, 30., 2005; 133–141.]

[Lodi R, Tonon C, Calabrese V. Friedreich's Ataxia: From disease mechanisms to therapeutic interventions. *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 8, Numbers 3 & 4, 2006; 438-443.]

[Lu C, Cortopassi G. Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron–sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts, *Arch. Biochem. Biophys.*, 457, 2007; 111-122.]

[Mackenzie E, Kenta I, Yoshiaki T. Intracellular iron transport and storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 10, Number 6, 2008.]

[Mariotti C, Solari A, Torta D, Marano L, Fiorentini C, Di Donato S. Placebo-controlled trial Idebenone treatment in Friedreich patients: One-year-long randomized. *Neurology* 2003; 60;1676-1679]

[Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N., Lill R. Components involved in assembly and dislocation of iron–sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.*, 22, 4815-4825.]

[Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 2002;11:2025-2036.]

[Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. Nutr J. 2003; 2: 7.]

[Napier I, Ponka P, Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. Blood, Vol. 105, No. 5, March, 2005; 1867-1874.]

[Napoli E, Taroni F, Cortopassi GA. Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. Antioxid Redox Signal, 2006; 8(3-4): 506-516.]

[Olthof MR, Hollman PCH, Katan M. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. Journal of Nutrition, 2001;131:66-71]

[Pandolfo M. Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. Nature clinical practice neurology, Vol. 4, No. 2, February, 2008; 86-95.]

[Pandolfo M. Mutations causing Friedreich ataxia. Future Neurology, Vol. 3, No. 1, January, 2008; 73-85.]

[Park S, Gakh O, O'Neill HA. Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. J. Biol. Chem., 2003; 278: 31340-31351.]

[Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Tagliacozzi D, Santorelli FM, Carozzo R, Casali C, Damiano M, Federici G, Bertini E. Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. Eur. J. Clin. Invest., 2006; 31: 1007-1011]

[Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbic acid and iron supplementation: Pro-oxidant effect in vivo ? Biochem Biophys Res Commun. 2000;277:535-540.]

[Pschyrembel. Medizinisches Wörterbuch. Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg; 257 Auflage.1993; 129]

[Puccio H, Koenig M. Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002; 12:272-277.]

[Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Keonig M. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, 2001;27:181-186.]

[Ribai P et al. Neurological, cardiological, and oculomotor progression in 104 patients with friedreich ataxia during long-term follow-up. *Arch Neurol.*, 2007;64 (4):558-564.]

[Richardson R. Novel Chelators for Central Nervous System Disorders That Involve Alterations in the Metabolism of Iron and Other Metal Ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 1012, 2001; 326 – 341.]

[Ringman J, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, April, 2005; 2(2): 131-136.]

[Ristow M, Mulder H, Pomplun D, et al. Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest*, 2003; 112 (4): 527-534.]

[Ristow M, Pfister MF, Yee AJ. Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2000; (22): 12239-12243.]

[Rötig A, De Lonlay P, Chretien D. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, 1997; 17(2): 215-217.]

[Rouault TA, Klausner RD. Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci*, 1996; 21(5): 174-177.]

[Runko A, Griswold AJ, Min Kyung-Tai. Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in drosophila. *Febs Letters* 582, 2008; 715-719.]

[Rustin P, Bonnet D, Rötig A, Munnich A, Sidi D. Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 2004; 62:524-525.]

[Rustin P, Rotig A, Munnich A, Sidi D. Heart hypertrophy and function are improved by idebenone in Friedreich's ataxia. *Free Radic Res* 36, 2002; 467-469.]

[Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rötig A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*, August, 1999; 354(9177):477-9.]

[Santos M et al. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 1935-1944.]

[Sarsero JP, Li L, Wardan H, Sitte K, Williamson R, Ioannou P. Upregulation of expression from the FRDA genomic locus for the therapy of Friedreich ataxia. *The Journal of Gene Medicine*, Volume 5, 2003; 1:72-81.]

[Savaskan E. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology* 49, 2003; 380-383.]

[Schoenfeld RA, Napoli E, Wong A, Zhan S, Reutenauer L, Morin D, Buckpitt AR, Taroni F, Lonnerdal B, Ristow M, Puccio H, Cortopassi GA. Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2006; 3787-3799.]

[Schulz J. Auf dem Weg zu besseren Therapien für erbliche Bewegungsstörungen. *Deutsches Ärzteblatt* Jg.104, Heft 33, August, 2007; 2243-2246.]

[Schulz JB, Dehmer T, Schöls L. Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology*, 2000; 55:1719-1721.]

[Seznec H, Simon D, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Golik P, Procaccio V, Patel M, Drapier JC, Koenig M, Puccio H. Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2005, 463-474.]

[Shan Y, Napoli E, Cortopassi G. Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the Nfs1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2007; 929-941.]

[Sharma D, Kumar SS, Sainis KB. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Mol Immunol.*, January, 2007; 44(4):347-59.]

[Shoichet SA, Baumer AT, Stamenkovic D, Sauer H, Pfeiffer AF, Kahn CR. Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum. Mol. Genet.*, 2002;11:815-21.]

[Sohn Y, Breuer W, Munnich A, Ioav Z, Cabantchik. Redistribution of accumulated cell iron: a modality of chelation with therapeutic implications. *Blood*, Vol. 111, No. 3, February, 2008; 1690-1699.]

[Stehling O, Elsasser HP, Bruckel B, Muhlenhoff U, Lill R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2004; 3007-3015.]

[Sturm B, Bistrich U, Schranzhofer M, Sarsero JP, Rauen U, Scheiber-Mojdehkar B, de Groot H, Ioannou P, Petrat F. Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity?. *J. Biol. Chem.* 280, 2005; 6701-6708.]

[Sturm B, Stupphann D, Kaun C, Boesch S, Schranzhofer M, Wojta J, Goldenberg H, Scheiber-Mojdehkar B. Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 2005, 711-717.]

[Sultana R, Agrippino R, Hafiz MA, Calabrese V, Butterfield DA. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid - peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *Journal of Neurochemistry*, Volume 92, Number 4, February, 2005; 749-758(10).]

[Tan G, Chen LS, Lonnerdal B. Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. *Hum Mol Genet* 10, 2001; (19): 2099-2107.]

[Tozzi G, Nuccetelli M, Lo Bello M, Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Gaeta L M, Casali C, Pastore A., Federici G. Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Arch. Dis. Child.*, 2002; 86, 376-379.]

[Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Brit. J. Pharmacol.* 126, 1999; 673-680.]

[Turano M, Tammaro A, De Biase I, Lo Casale MS, Ruggiero G, Monticelli A, Coccozza S, Pianese L. 3-Nitropropionic acid increases frataxin expression in human lymphoblasts and in transgenic rat PC12 cells. *Neuroscience Letters* Volume 350, Issue 3, October, 2003, 184-186.]

[Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003; 552:335-344.]

[Wells. DNA triplexes and Friedreich ataxia. *The FASEB Journal*, 2008; 22:1625-1634.]

[Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2004; 5: 863-873.]

[Zhang J, Lyver ER, Knight SA, Lesuisse E, Dancis A.. Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J. Biol. Chem.* 280, 2005; 19794-19807.]

[Zhang Y, Guan L, Wang X, Wen T, Xing J, Zhao J. Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2. *Free Radic Res.* , April, 2008; 42(4):362-71.]