



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Friedreich's Ataxie:
Einfluss von rekombinantem humanem
Erythropoietin auf den oxidativen Stress und die
metabolische Aktivität in Fibroblasten**

Verfasser

Matej Sack

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, Juli 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: o. Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei o. Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg für die Möglichkeit bedanken, dass mir diese Diplomarbeit am Institut für Medizinische Chemie ermöglicht wurde. Des Weiteren konnte ich am jährlichen European Iron Club 2011 in Louvain-la-Neuve teilnehmen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar für ihre Geduld und ihr Fachwissen, das sie mir während meiner Tätigkeit am Institut vermittelte, sowie die genaue Korrektur meiner Diplomarbeit, bedanken.

Ein weiterer Dank gebührt Marlies Moshhammer BSc und Carolin Cornelius BSc, die mich durch ihre Art motivierten und einen frischen Wind in das Labor brachten.

Letztendlich möchte ich mich bei meinen Eltern, ganz besonders bei meiner Mutter dafür bedanken, dass sie mir mein Studium ermöglichten und mich während dieser Zeit nicht nur finanziell unterstützt haben. Bei meiner Freundin, Kerstin, möchte ich mich ebenfalls herzlichst für ihre aufopfernde Art, sowie ihren Humor, der mir in schwierigen Zeiten immer ein Lächeln abgewinnen konnte, bedanken.

Vielen Dank!

I. INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

III TABELLENVERZEICHNIS

IV SCHEMATAVERZEICHNIS

V ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Fragestellung.....	1
2 Literaturüberblick	4
2.1 Friedreich's Ataxie	4
2.1.1 Molekulare Genetik	5
2.1.2 Pathogenese	6
2.1.3 Therapieansätze für Friedreich's Ataxie	6
2.1.3.1 Antioxidantien.....	7
2.1.3.1.1 Ubichinon-10.....	7
2.1.3.1.2 Idebenon	8
2.1.3.2 Eisenchelatoren	9
2.1.3.3 Genetische Therapie	10
2.1.3.4 Hitzeschockproteine	10
2.1.3.5 Zusammenfassung.....	11
2.2 Oxidativer Stress	11
2.2.1 Superoxid-Anionenradikal	13
2.2.2 Wasserstoffperoxid.....	13
2.2.3 Hydroxylradikal.....	14
2.3 Erythropoietin (EPO)	15

2.3.1 Struktur von Erythropoietin	15
2.3.2 Die Erythropoese	16
2.3.3 Erythropoietin-Rezeptor	17
2.3.4 EPO-induzierte intrazelluläre Signalkaskade	18
2.3.5 Weitere Wirkungen von rhuEPO	19
2.4 Frataxin	21
2.4.1 Eisen	21
2.4.1.1 Intrazellulärer Eisentransport	21
2.4.1.2 Mitochondrialer Eisenimport	22
2.4.2 Funktionen von Frataxin	22
3 Material und Methoden	25
3.1. Verwendete Zelllinien	25
3.1.1 Charakterisierung der untersuchten Fibroblasten-Zelllinien:	25
3.1.2 Handhabung der Zellkultur	27
3.1.3 DMEM-Medium	27
3.1.3.1 DMEM-Medium ohne Phenolrot	28
3.1.4 Komplementieren des DMEM-Nullmediums	28
3.1.4.1 Komplementieren des DMEM-Medium, 20mM HEPES, pH 7,4 .	29
3.1.5 Kultivieren von Fibroblasten	29
3.1.5.1 Splitten von Fibroblasten	30
3.1.5.2 Bestimmung der Zellzahl	31
3.1.5.3 Einstellen der Zellzahl	32
3.1.6 Einfrieren von Zellen	32
3.1.7 Auftauen von Zellen	32
3.2 Messung von oxidativem Stress mittels Dichlorfluorescein (DCF)	33
3.2.1 Verwendete Inkubationslösungen	34

3.2.2 Inkubationslösung für die Beladung der Zellen mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein	36
3.2.3 Durchführung der DCF-Messung.....	36
3.2.4.1 Verwendete Lösungen	38
3.2.4.2 Chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat	39
3.3 Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin	40
3.3.1 Herstellung der Resazurin Lösung	41
3.3.2 Durchführung der Resazurinmessung	41
3.4 MTT – Test	42
3.4.1 Durchführung des MTT –Tests.....	42
3.6.1.2 Ernten der Zellen und Gewinnung der Zellysate für die Eisen- u. Proteinbestimmung	44
3.6.2 Proteinbestimmung mit Bio-Rad (Bradford)	45
3.6.3 Eisenbestimmung mit der Ferrozin-Methode	46
3.6.3.1 Verwendete Reagenzien	47
3.6.3.2 Durchführung der Messung	47
4. Ergebnisse und Diskussion	50
4.1 Einfluss von Oxidantien und rhuEPO auf den oxidativen Stress in humanen Fibroblasten.....	50
4.1.1 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den oxidativen Stress in Gegenwart von Radikalbildnern; DCF - Methode	50
4.1.1.1 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den basalen, oxidativen Stress in Fibroblasten	51
4.1.1.2 Einfluss von FAS auf den basalen, oxidativen Stress	52
4.1.1.3 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf die durch Oxidantien induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten ..	53

4.1.1.3.1 Tert-butylhydroperoxid (TBH).....	53
4.1.1.3.2 Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	55
4.1.2 Direkter Einfluss von rhuEPO auf die durch TBH bedingte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies	57
4.1.2.1 6,6U/ml rhuEPO	57
4.1.2.2 3,3U/ml rhuEPO	58
4.1.2.3 1,1U/ml rhuEPO	59
4.1.3 Beeinflussung des basalen, oxidativen Stress durch die Vorinkubation mit rhuEPO; Resazurin - Methode	61
4.1.3.2 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von TBH	63
4.1.3.3 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Wasserstoffperoxid	64
4.1.3.4 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Eisenammoniumsulfat	65
4.1.3.5 Direkter Einfluss von rhuEPO auf die durch TBH verursachte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies	66
4.1.4 Einfluss einer Präinkubation mit rhuEPO auf die Auswirkungen von Radikalbildnern in Fibroblasten	68
4.1.4.1 Tert-Butylhydroperoxid (TBH).....	69
4.1.4.2 H ₂ O ₂	70
4.1.5 Einfluss einer Präinkubation mit rhuEPO auf die mittels MTT-Test gemessene Stoffwechselaktivität in Gegenwart von Oxidantien.....	72
4.1.5.1 Einfluss von TBH und rhuEPO auf den oxidativen Stress	72
4.1.5.2 Einfluss von H ₂ O ₂ und rhuEPO auf die Stoffwechselaktivität (MTT-Test).....	74
4.2 Lichtabhängige Bildung von ROS in DMEM	76

4.2.1 Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung (Detektion mit H ₂ DCFDA)	76
4.2.2 Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung (Detektion mit H ₂ DCF)	77
4.3 Kontrollversuche mit DCF im zellfreien System	78
4.4 Zellulärer Eisengehalt	81
5. Schlussbetrachtung	85
6. Zusammenfassung	89
7. Abstract	90
8. Literaturverzeichnis	91

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Pathologische Mechanismen bei Friedreich's Ataxie und die damit assoziierten therapeutischen Strategien	11
Abbildung 2:	Primärstruktur von Erythropoietin	16
Abbildung 3:	Mögliche Funktionen von Frataxin	24
Abbildung 4:	Humane Fibroblasten	26
Abbildung 5:	Humane Fibroblasten	26
Abbildung 6:	Eichgerade des Eisenstandards	49
Abbildung 7:	Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den basalen, oxidativen Stress in Fibroblasten; DCF-Methode.....	51
Abbildung 8:	Einfluss von Eisenammoniumsulfat (FAS) auf den basalen oxidativen Stress in Fibroblasten; DCF-Methode.....	52
Abbildung 9:	Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; Messung mittels DCF-Methode.....	54
Abbildung 10:	Einfluss der Vorinkubation von rhuEPO auf die durch H ₂ O ₂ verursachte ROS–Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode .	56
Abbildung 11:	Einfluss von 6,6U/ml rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode	57
Abbildung 12:	Einfluss von 3,3U/ml rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode	58
Abbildung 13:	Einfluss von rhuEPO 1,1U/ml auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode	59
Abbildung 14:	Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf basale metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin – Methode	61

Abbildung 15: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von TBH	62
Abbildung 16: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von H ₂ O ₂	63
Abbildung 17: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Eisenammoniumsulfat	65
Abbildung 18: Direkter Einfluss von rhuEPO 6,6U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin – Methode.....	66
Abbildung 19: Direkter Einfluss von rhuEPO 3,3U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin – Methode.....	67
Abbildung 20: Direkter Einfluss von rhuEPO 1,1U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin – Methode.....	67
Abbildung 21: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die Auswirkungen von TBH auf die metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin – Methode.....	69
Abbildung 22: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die Wirkung von H ₂ O ₂ auf die metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin – Methode.....	70
Abbildung 23: Einfluss von rhuEPO und TBH auf die Stoffwechselaktivität in Fibroblasten; MTT – Test.....	72
Abbildung 24: Einfluss von rhuEPO H ₂ O ₂ auf die Stoffwechselaktivität von Fibroblasten; MTT – Test.....	74
Abbildung 25: Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung in DMEM (Detektion mit H ₂ DCFDA)	76

Abbildung 26: Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung in DMEM (Detektion mit H ₂ -DCF).....	77
Abbildung 27: Lichtabhängige ROS-Produktion mit H ₂ DCFDA und H ₂ DCF...	78
Abbildung 28: Oxidation von DCF mittels Oxidantien im zellfreien System ...	79
Abbildung 29: Oxidation von DCF mittels rhuEPO im zellfreien System.....	80
Abbildung 30: Zellulärer Eisengehalt in µg Fe/mg Protein	82
Abbildung 31: Relative Eisenaufnahme von FAC in Fibroblasten.....	83

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Pipettierschema des Proteinstandards 45

Tabelle 2: Pipettierschema der Eisenstandards und des Leerwertes 48

IV. SCHEMATAVERZEICHNIS

Schema 1:	Intrazelluläre Abläufe bei der Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies	12
Schema 2:	Feedbackregulation der Erythropoese	17
Schema 3 :	Aktivierung des Erythropoietin-Rezeptors und die intrazelluläre Signalkaskade	19
Schema 4:	Bildung des fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) aus Dichlorofluorescein-diazetat (DCFH-DA) unter Einwirkung von ROS in Zellen	34
Schema 5:	Intrazelluläre Reduktion des Resazurin zum Resorufin.....	40
Schema 6:	Reduktion des MTT zum Formazan durch mitochondriale Reduktasen in den Zellen	42

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-OHdG	8-Hydroxy-2-desoxyguanosin
BSA	Bovine Serum Albumin
CyaY	Escherichia coli - Frataxin
DCF	Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
EPO-R	EPO-Rezeptor
FAS	Eisen(II)-Ammoniumsulfat
FCS	Foetal Calf Serum
FRDA	Friedreich's Ataxie (Morbus Friedreich)
FXN	Frataxigen
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
H ₂ -DCF-DA	2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein-diacetate
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
ISC	Eisen-Schwefel-Cluster

LIP	Labile Iron Pool
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SOD	Superoxid-Dismutase
TBH	Tert-butylhydroperoxid
UQ	Ubichinon-10
Yhf1	Hefen-Frataxin

1 Einleitung und Fragestellung

Friedreich's Ataxie wurde erstmals von Dr. Nikolaus Friedreich im Jahr 1863 beschrieben und ist eine autosomal-rezessiv vererbte und neurodegenerative Erkrankung. Zu den wichtigsten klinischen und pathologischen Eigenschaften dieser häufigsten Form der vererbten Ataxien gehören die degenerative Atrophie der Hinterstränge des Rückenmarks, welche zur progressiven Ataxie beiträgt, sensorischer Verlust und Muskelschwäche. Zusätzliche Merkmale äußern sich in Kardialsymptomen, Skoliose, sowie Deformation der Extremitäten [MARMOLINO, 2011].

Friedreich's Ataxie liegt mit einer geschätzten Prävalenz von 1:50 000 in der europäisch-stämmigen Bevölkerung vor. Dabei treten die Symptome in der Regel während der Pubertät auf, typisch jedoch vor dem 25. Lebensjahr. Die Lebenserwartung beträgt zwischen 40 und 50 Jahren [SCHMUCKER und PUCCIO, 2010].

Der mit dieser Krankheit in Verbindung gebrachte genetische Defekt umfasst eine verminderte Expression eines mitochondrialen Eisen-Chaperon-Proteins namens Frataxin. Studien mit Hefe-, Drosophila-, Mäuse- und Zellkulturmodellen haben dabei wichtige Funktionen von Frataxin und dessen homologe Proteine in der mitochondrialen Eisenhomöostase offenbart [ANDERSON et al., 2008].

Friedreich's Ataxie wird durch transkriptionelles Silencing des Frataxin-Gens hervorgerufen, welches Frataxin kodiert. Dieses Silencing wird durch eine Expansion der GAA-TTC-Trinukleotidwiederholungen im ersten Intron mit bis zu 1700 Wiederholungen ausgelöst, was in weiterer Folge zur Bildung einer non-B DNA Struktur führt und somit einer verminderten Expression von Frataxin [WELLS, 2008].

Der mit einem Frataxinmangel einhergehende oxidative Stress und gestörte Eisenmetabolismus konnte erstmals in Hefezellen und kultivierten Zellen von

Friedreich's Ataxie-Patienten mit verminderter Frataxin-Expression gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass diese Zellen besonders empfindlich auf Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagieren. H_2O_2 reagiert dabei vermehrt mit Fe^{2+} bei der Fenton-Reaktion und bildet hochschädliche Hydroxylradikale [PANDOLFO und PASTORE, 2009].

Der aktuelle Stand der Forschung bietet keine Heilungsmöglichkeiten für die Friedreich's Ataxie. Derzeit existieren jedoch verschiedene Therapieansätze, die sich mit der Behandlung auseinandersetzen.

Zu den Behandlungsmöglichkeiten gehört die Verabreichung von Antioxidantien, wie Coenzym Q10 und Idebenon, sowie Eisenchelatoren und Erythropoietin. Auch genetische Strategien, die die Erhöhung der Frataxin-Gen-Expression anstreben, werden erforscht [MANCUSO et al., 2010].

Die wichtigsten Syntheseorte von Erythropoietin sind die fötale Leber und die adulten Nieren. Dieses hormonelle Protein übernimmt eine wichtige Rolle bei der Bildung von roten Blutkörperchen. Außerdem besitzt Erythropoietin neuroprotektive, sowie kardioprotektive Eigenschaften, die für eine mögliche Therapie von Interesse sind.

Aber auch die nachteiligen Effekte, wie z.B. die sich entwickelnde bzw. verschlechternde Hypertonie, die bei 20-30% der mit rekombinantem humanem Erythropoietin (rhuEPO) behandelten Nieren-Patienten auftrat, darf nicht außer Acht gelassen werden [ARCOSAY, 2008].

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Wirkung von rhuEPO (Epoietin- β) auf den basalen oxidativen Stress in Friedreich's Ataxie-Fibroblasten, sowie die Auswirkung des durch künstliche Oxidantien hervorgerufenen oxidativen Stress zu erforschen. Dabei wurden sowohl Fibroblasten von gesunden Probanden als auch Fibroblasten, die von Friedreich's Ataxie-Patienten stammten, untersucht. Ebenfalls wurde untersucht, ob eine Präinkubation der Zellen mit rhuEPO vor der Inkubation mit den Oxidantien bzw. Ko-Inkubation von rhuEPO mit den Oxidantien unterschiedlichen Einfluss auf die Bildung von oxidativem Stress in

Fibroblasten zeigt. Weiters wurden verschiedene Messmethoden verwendet, um die Auswirkungen von rhuEPO und den verwendeten Oxidantien auf die metabolische Aktivität und Proliferation der Zellen zu untersuchen.

Bei *in vitro* Untersuchungen wurde auch der direkte Einfluss von rhuEPO und den verwendeten Oxidantien/Radikalbildern auf die Hydrolyse und Oxidation von Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat untersucht.

Da bei der Friedreich's Ataxie von einer pathologischen Eisenakkumulation in manchen Zellarten berichtet wurde, wurde in einer Pilotstudie der Eisengehalt in Fibroblasten von Friedreich's Ataxie-Patienten, sowie von gesunden Probanden vor und nach Inkubation mit niedermolekularem Eisen untersucht.

2 Literaturüberblick

2.1 Friedreich's Ataxie

Friedreich's Ataxie (Morbus Friedreich) gehört zu den am häufigsten erblich bedingten Ataxien in Europa und Nordamerika. Dabei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz von 1:50 000 – 1:29 000. Klinische Symptome äußern sich durch progressive Gang- und Gliederataxie, Areflexie aller vier Extremitäten, Dysarthrie, Verlust der Positions- und Sinneswahrnehmung, Spastizität und Fehlverhalten des plantaren Extensors [ALPER und NARAYANAN, 2003]. Weitere Eigenschaften sind hypertrophe Kardiomyopathie, Skoliose und Diabetes mellitus [DI PROSPERO et al., 2007].

Der Beginn der Friedreich's Ataxie tritt zumeist im Kindheitsalter, zwischen dem 8. und 16. Lebensjahr auf, wobei ein frühes Auftreten der Erkrankung ein Zeichen für schnelles Fortschreiten dieser spinalen Form der Heredoataxie ist. Es sind aber auch Fälle mit einem Manifestationsalter der Friedreich's Ataxie von über 30 Jahren bekannt [www.fataxie.net; Stand: 6.4.2011].

Von den typischen Symptomen der Friedreich's Ataxie wurde erstmals 1863 vom Neurologen Nicolaus Friedreich in Heidelberg, Deutschland, berichtet [ALPER und NARAYANAN, 2003].

2.1.1 Molekulare Genetik

Das mit Friedreich's Ataxie assoziierte Gen trägt den Namen Frataxin und ist am Chromosom 9q13-q21.1 lokalisiert. Dabei handelt es sich um ein kleines mitochondriales Protein, welches aus 210 Aminosäuren besteht. Die am häufigste vorkommende Mutation des Frataxin-Gens, welche in weiterer Folge zur Friedreich's Ataxie führt, wird im ersten Intron durch eine Expansion von GAA-Triplet-Repeats, verursacht [SCHMUCKER und PUCCIO, 2010], [GASSER et al., 2010].

Das Frataxin-Gen (FXN), anfänglich als X25 bezeichnet, wurde 1988 entdeckt [ALPER und NARAYANAN, 2003]. Es enthält 7 Exons, 1-5a, 5b und 6. Die Transkription findet dabei am häufigsten in den Exons 1-5a statt [DELATYCKI et al., 2000].

Die Schwere der Erkrankung korreliert dabei mit der Anzahl der GAA-Triplet Wiederholungen. Die Zahl der Wiederholungen kann dabei von 70 bis 1700 schwanken, wobei Wiederholungen zwischen 600 bis 900 bei der Friedreich's Ataxie am häufigsten sind. Bei gesunden Menschen beträgt die Anzahl der Wiederholungen zwischen 6 und 36 Repeats [SCHMUCKER und PUCCIO, 2010].

Dabei sind mehr als 95% der Patienten homozygot für die Expansion der Wiederholungen auf beiden Allelen. Die restlichen Patienten sind heterozygot für die Expansion der GAA-Triplet-Repeats auf einem Allel und weist auf dem anderen Allel eine Mikromutation auf. Des Weiteren ist die Verminderung der Frataxin-mRNA und des Proteins proportional der Größe des Allels mit der geringeren Anzahl an GAA-Repeats [GELLERA et al., 2007].

Friedreich's Ataxie wird durch ein transkriptionales Silencing des Frataxins hervorgerufen. Diese Abnahme der Transkriptionsaktivität führt zu erniedrigten Levels von funktionierendem Frataxin. Diese Unterdrückung stammt von der Repeat-Expansion und der Fähigkeit der erweiterten GAA-TTC-Repeats, non B-DNA Strukturen auszubilden. Dazu gehören Triplex oder „sticky“-DNA.

Zusätzlich kann es zu einer Ausbildung permanenter DNA-RNA Hybride oder Heterochromatin kommen [WELLS, 2008].

2.1.2 Pathogenese

Friedreich's Ataxie gehört neben anderen Krankheiten zu den neurodegenerativen Erkrankungen und ist mit der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und in weiterer Folge mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert.

Der beeinträchtigte intramitochondriale Metabolismus mit erhöhtem „freiem“ Eisen und verminderter mitochondrialer Atmungskette-Aktivität, assoziiert mit der erhöhten Erzeugung von freien Radikalen und damit verbundenen oxidativen Schäden, beeinträchtigen die Zellviabilität [CALABRESE et al., 2005].

Der mit dieser Erkrankung in Verbindung stehende Mangel an Frataxin wurde anhand von Studien mit Frataxin-homologen Hefepilz-YHF1-Mutanten gezeigt. Bei vorherrschendem Mangel dieses Gens kommt es zu intramitochondrialer Eisenakkumulation, Defekten der mitochondrialen Atmungskette, Verlust mitochondrialer DNA und erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress [LODI et al., 2006].

2.1.3 Therapieansätze für Friedreich's Ataxie

Zurzeit existiert keine Möglichkeit Friedreich's Ataxie zu heilen. Die verschiedenen Therapieansätze zielen auf die Behandlung der Symptome dieser Erkrankung ab.

Der oxidative Schaden innerhalb des Mitochondriums scheint dabei eine tragende Rolle im Phänotyp dieser Erkrankung zu haben. Therapieansätze sollen dabei hauptsächlich den antioxidativen Schutz im Mitochondrium gewährleisten. Alternativ existieren Therapieansätze, die auf dem genetischen

Level operieren. Des Weiteren gehören zu den Therapiemöglichkeiten auch die Behandlung mit Eisenchelatoren oder Erythropoietin [MANCUSO et al., 2010].

2.1.3.1 Antioxidantien

2.1.3.1.1 Ubichinon-10

Coenzym Q10, 6-all-*trans*-Decaprenyl-2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon, auch unter dem Namen Ubichinon-10 (UQ) bekannt, ist ein lipidlösliches Chinon, bestehend aus einem Redox-aktiven Chinonring und einem hydrophoben Schwanzteil.

In vitro Studien bezüglich neuronaler Toxizität und Anwendung in neurodegenerativen Erkrankungen in Tiermodellen haben potentielle neuroprotektive Wirkungen von UQ gezeigt. UQ ist ein essentieller Cofactor bei der mitochondriellen oxidativen Phosphorylierung, sowie ein leistungsfähiges Antioxidans [SPINDLER et al., 2009].

In der Studie von Schmelzer et al. konnte nachgewiesen werden, dass Coenzym Q10, durch NF- κ B1-abhängige Genexpression, antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [SCHMELZER et al., 2008].

Zur Beurteilung des oxidativen Stress in Friedreich's Ataxie dienten Marker wie erhöhte Level von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG) im Urin, Malondialdehyd im Plasma und eine verringerte Aconitase-Aktivität im Herz- und Skelettmuskel.

Es wurden in diversen unabhängigen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen positive Ergebnisse durch die Verabreichung von Ubichinon-10 erzielt [LODI et al., 2001], [SPINDLER et al., 2009].

In der Studie von Lodi et al. benutzten die Autoren Coenzym Q10 (400mg/d) in Kombination mit Vitamin E (2100IU/d), um die antioxidativen Effekte dieser Substanzen als Behandlungsmaßnahme bei 10 Friedreich's Ataxie-Patienten zu

untersuchen. Dabei verzeichneten die Autoren positive Ergebnisse in Hinsicht auf die Maximalrate der mitochondrialen ATP-Produktion im Skelettmuskel und eine Steigerung des Verhältnisses von Kreatinphosphat zu ATP im Herz [LODI et al., 2001].

2.1.3.1.2 Idebenon

Das Antioxidant Idebenon, 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone, ist ein kurzkettiges Benzochinonderivat, strukturell dem Coenzym Q10 ähnlich. Jedoch besitzt Idebenon ein günstigeres pharmokinetisches Profil als Coenzym Q10.

Hohe Dosen von Idebenon sind sicher und werden von Patienten mit Friedreich's Ataxie gut vertragen [DI PROSPERO et al., 2007].

In vitro Studien haben gezeigt, dass Idebenon einerseits als Antioxidans wirkt, indem es Schädigungen an der mitochondrialen Membran verhindert, andererseits indem es die mitochondriale Funktion und die ATP-Produktion unterstützt [MEIER und BUYSE, 2009].

Schulz et al. haben dabei die Konzentration von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG) im Urin, einem Marker für oxidative DNA-Schädigung, sowie Dihydroxybenzoesäure (DHBA), einem Marker für Hydroxyl-Radikale im Plasma von 33 Friedreich's Ataxie-Patienten gemessen. Dabei zeigte sich in Friedreich's Ataxie-Patienten eine 2,6-fache Erhöhung von 8-OHdG, jedoch kein Unterschied von DHBA im Vergleich zu Kontrollpersonen. Weiters konnte gezeigt werden, dass eine orale Behandlung der Patienten mit Idebenon (5 mg/kg/d) für 8 Wochen eine signifikante Abnahme der 8-OHdG-Konzentration im Urin bewirkt hat [SCHULZ et al., 2000].

Bereits geringe Dosen von Idebenon (5 mg/kg/d) haben eine Reduktion der Herzhypertrophie bei der Mehrheit der an Friedreich's Ataxie erkrankten Patienten gezeigt [MANCUSO et al., 2010].

In der Studie von Velasco-Sánchez wurden 20 Friedreich's Ataxie-Patienten mit einer kombinierten Gabe von Idebenon (20 mg/kg/d) und dem Eisenchelator Deferiprone (20 mg/kg/d) elf Monate behandelt. Diese Kombinationstherapie wurde gut vertragen und zeigte, dass Herzyhypertrophieparameter und Eisenablagerungen signifikant verbessert wurden [VELASCO-SANCHEZ et al., 2010].

2.1.3.2 Eisenchelatoren

Campanella et al. konnten zeigen, dass mitochondriales Ferritin (FtMt), ein nukleär-kodiertes und Eisen-speicherndes Protein, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FtMt die Aktivität von mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S) Enzymen und die Level von ATP erhöht, sowie einen positiven Effekt auf die Zellviabilität hat. FtMt hat auch den zytosolischen und mitochondrialen labilen Eisenpool (LIP) reduziert.

Es wurden dabei in der Studie der Autoren Hautfibroblasten von zwei Friedreich's Ataxie (FRDA)–Patienten erforscht. FtMt-transfizierte FRDA-Fibroblasten zeigten dabei nach Inkubation mit H_2O_2 eine 20%-ige höhere Zellviabilität verglichen zu nicht FtMt-transfizierten FRDA-Fibroblasten [CAMPANELLA et al., 2009].

In der Studie von Lim et al. wird vorgeschlagen, dass Eisenchelatoren bei der Therapie von Friedreich's Ataxie sinnvoll wären. Die lipophilen Eisenchelatoren 2-Pyridylcarboxaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon (PCIH) und 2-Pyridylcarboxaldehyd-2-thiophenecarboxyl Hydrazon (PCTH) zeigen dabei einen positiven Effekt auf den mitochondrialen oxidativen Stress [LIM et al., 2008].

2.1.3.3 Genetische Therapie

Eine weitere therapeutische Strategie liegt in der angepassten Genregulation auf dem epigenetischen Level. In der Studie von Herman et al. haben die Autoren die Chromatinstruktur des Frataxins in gesunden und in Friedreich's Ataxie-Zelllinien untersucht. Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren das Frataxin-Gen zum Teil wieder aktivieren können [HERMAN et al., 2006].

2.1.3.4 Hitzeschockproteine

Eingriffe in den Hitzeschockproteinstatus könnten einen neuartigen Therapiansatz darstellen. Hitzeschockproteine (HSPs) sind Proteine, die als molekulare Chaperone zum Schutz von Zellen bei diversen Stressformen involviert sind. HSPs werden im zentralen Nervensystem nicht nur nach Hyperthermie, sondern auch bei intrazellulärer Veränderung des Redoxstatus synthetisiert. Unter den unterschiedlichen HSPs ist HSP32, auch als Hämoxygenase 1 (HMOX1) von besonderem Interesse, da es schützend gegen oxidative Schäden im Gehirn wirkt [CALABRESE et al., 2005].

2.1.3.5 Zusammenfassung

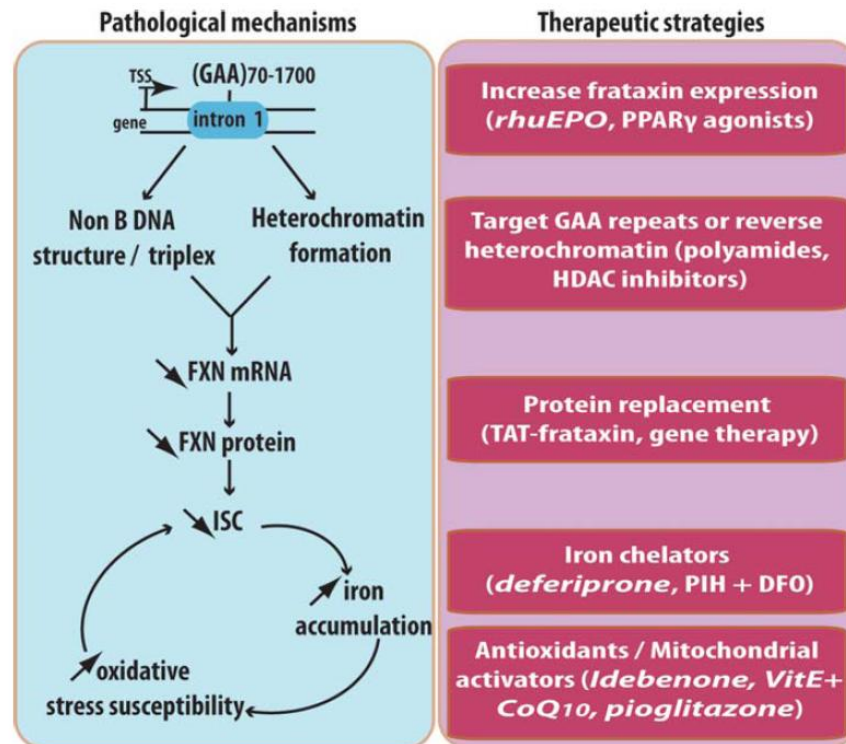


Abbildung 1: Pathologische Mechanismen bei Friedreich's Ataxie und die damit assoziierten therapeutischen Strategien
[SCHMUCKER et al., 2010]

2.2 Oxidativer Stress

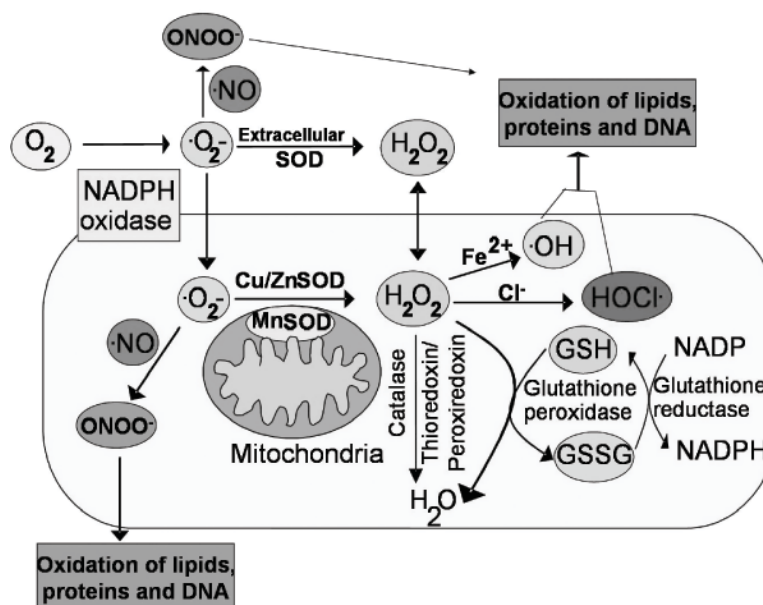
Reaktive Sauerstoffspezies, häufig als ROS (reactive oxygen species) bezeichnet, entstehen unter normalen physiologischen Bedingungen in Verbindung mit Stoffwechselaktivitäten von Cytochrom P₄₅₀, Oxidasen und der mitochondrialen Elektronentransportkette. Zu den ROS zählen das Superoxid-Anionenradikal (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Hydroxylradikal (OH[•]). Erst wenn die ROS-Konzentration die Reparatur- und Entgiftungsregulationsmechanismen der Zelle übersteigt und folglich in einer

Schädigung der zellulären und extrazellulären Makromoleküle resultiert, ist von oxidativem Stress die Rede [SCHMIDT et al., 2007].

Dieser erhöhte Grad an ROS beeinflusst die Intaktheit zahlreicher Enzyme und spielt eine Rolle bei der Lipidperoxidation, Proteinoxidation und der oxidativen Zerstörung der DNA. Besonders die mitochondriale Elektronentransportkette, ist eine bedeutende intrazelluläre Quelle von ROS. Das Superoxid wird intrazellulär zum Wasserstoffperoxid durch die Superoxid-Dismutase (SOD), zytosolische Cu,ZnSOD (SOD1) und die mitochondriale MnSOD (SOD2) umgewandelt [SEZNEC et al., 2005].

In Gegenwart von Metallen, wie Eisen (Fe^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}), produziert Wasserstoffperoxid im Zuge der Fenton-Reaktion das Hydroxylradikal [RHEE et al., 2010].

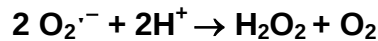
Die Verfügbarkeit des Wasserstoffperoxids wird durch detoxifizierende Enzyme wie Glutathionperoxidase und Katalase verringert. Des Weiteren können α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Glutathion direkt mit den ROS reagieren und sie dadurch unschädlich machen [SEZNEC et al., 2005].



Schema 1: Intrazelluläre Abläufe bei der Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies [AZAD et al., 2008]

2.2.1 Superoxid-Anionenradikal

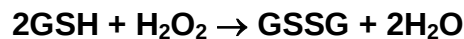
Die physiologische Produktion des Superoxid-Anionenradikals ($\text{O}_2^{\cdot-}$) erfolgt in der mitochondrialen Matrix der Komplexe I und III, wo es schnell durch die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD; SOD 2) in H_2O_2 umgewandelt wird.



Jeder signifikante Anstieg von $\text{O}_2^{\cdot-}$ führt zur Reduktion und Inaktivierung von Fe-S-clusterhaltigen Enzymen [ARMSTRONG et al., 2010].

2.2.2 Wasserstoffperoxid

Das mitochondrial gebildete H_2O_2 wird mittels Glutathion (GSH) und GSH-abhängigen antioxidativen Enzyme, wie Glutathion-abhängigen Peroxidasen (GPx) zu H_2O reduziert. Die nachfolgende Reaktion zeigt, dass GSH oxidiert wird und dabei von seiner monomeren Form in ein Dimer, das Glutathion-Disulfid (GSSG), übergeht [LÖFFLER und PETRIDES, 1998].



Glutathion ist der wichtigste Redox-Puffer der Zelle und vor allem zur Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Milieus verantwortlich. Die Zelle besitzt zytoplasmatische und mitochondriale GSH-Pools. Die GSH-Synthese findet im Zytoplasma statt und der mitochondriale GSH-Pool wird durch ATP-abhängige Transporter mit einer hohen Affinität aufrechterhalten. Dieses Transportsystem hält den mitochondrialen GSH-Pool auf normalem Level, auch wenn der zytoplasmatische GSH-Level signifikant erniedrigt wurden [ARMSTRONG et al., 2010].

Hohe Konzentrationen von H_2O_2 in der mitochondrialen Matrix in Kombination mit der schnellen Membrandiffusionskinetik von H_2O_2 können den erhöhten Austritt von H_2O_2 aus dem Mitochondrium erleichtern [BOVERIS und CADENAS, 2000]. Dieses Konzept wird von der Studie von Han et al.

unterstützt, in der gezeigt wurde, dass eine 40%-ige Depletion des mitochondrialen GSH keinen Effekt auf die H_2O_2 -Diffusion aus dem Mitochondrium hat. Erst als dieser Schwellenwert unterschritten wurde, zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen erhöhtem GSH-Verlust und erhöhter mitochondrialer H_2O_2 -Produktion [HAN et al., 2003].

2.2.3 Hydroxylradikal

Im Zuge der Fenton-Reaktion wird aus H_2O_2 das Hydroxylradikal generiert. Dabei unterzieht das redoxaktive Fe^{2+} die schwache Bindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen einer homolytischen Spaltung.



Das dabei entstehende Hydroxylradikal kann dabei unter anderem mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren [CRICHTON et al., 2002].

Bei der Reaktion des Hydroxylradikals mit DNA entsteht die modifizierte DNA Base 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG), die bei den Patienten der Friedreich's Ataxie im Urin erhöht ist. Somit trägt das Hydroxylradikal zur Pathophysiologie der Friedreich's Ataxie bei [SCHULZ et al., 2000].

In den Experimenten von Bou-Abdallah et al. konnte Mithilfe der Elektronenspinresonanz (EPR) gezeigt werden, dass die eisenkatalysierte Produktion des Hydroxylradikals durch das dem Frataxinanaloge Protein von *E. coli* (CyaY) reduziert wird [BOU-ABDALLAH et al., 2004].

2.3 Erythropoietin (EPO)

In einer Arbeit von Miyake et al. wurde erstmals das humane EPO isoliert und charakterisiert. Dazu sammelten Miyake et al. Urin von Patienten mit aplastischer Anämie, welcher in weiterer Folge dazu diente, das Hormon zu reinigen und dessen Aminosäuresequenz teilweise zu identifizieren [MIYAKE et al., 1977].

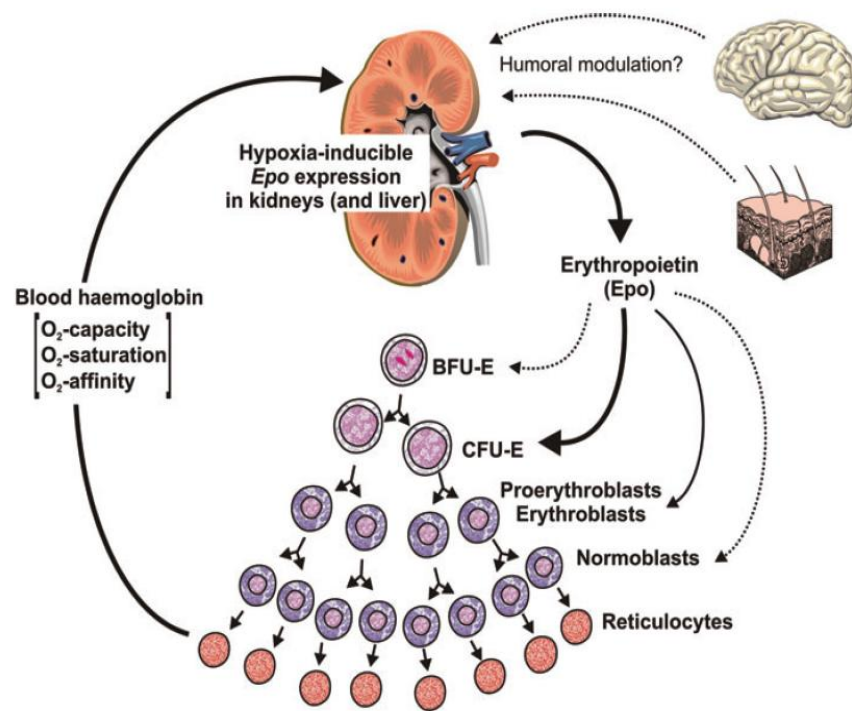
2.3.1 Struktur von Erythropoietin

Erythropoietin, auch unter den Synonymen Erythropoetin, Epoetin oder kurzum EPO ist ein zur Familie der Zytokine gehörendes, aus 165 Aminosäuren und einer Molekülmasse von etwa 30 kDa bestehendes saures, unverzweigtes Glykoprotein.

Der darin vorkommende Kohlenhydratanteil beläuft sich auf 40% der Molekülmasse und ist durch die Monosaccharide Mannose, Galaktose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure gegeben. [SCHÖFFEL et al., 2008]

Dabei ist über eine O-glykosidische Bindung Serin in der Aminosäuresequenz an der Stelle 126 und über eine N-glykosidische Bindung Asparagin an den Stellen 24, 38 und 83 mit den Kohlenhydratseitenketten verbunden (Abb. 2). N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäure) bilden in den meisten Fällen das Endglied der Kohlenhydratgruppen. [AGORAM et al., 2008].

Die Aminosäuren Cystein sind jeweils an der Stelle 6 und 161, sowie an der Stelle 29 und 33 jeweils durch eine Disulfidbrücke (Abb. 2) miteinander verbunden. Diese Verbindungen bilden ein wichtiges strukturelles Merkmal, wobei die erste Disulfidbindung funktionell für die biologisch-aktive Form und die Bindung an den Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) ausschlaggebend ist [LAPPIN, 2003].



Schema 2: Feedbackregulation der Erythropoese [JELKMANN, 2011]

Bei Erwachsenen findet auch ein geringer Teil der EPO-mRNA Expression im Leberparenchym, in Milz, Lungen, Testes und im Gehirn statt [JELKMANN, 2004].

2.3.3 Erythropoietin-Rezeptor

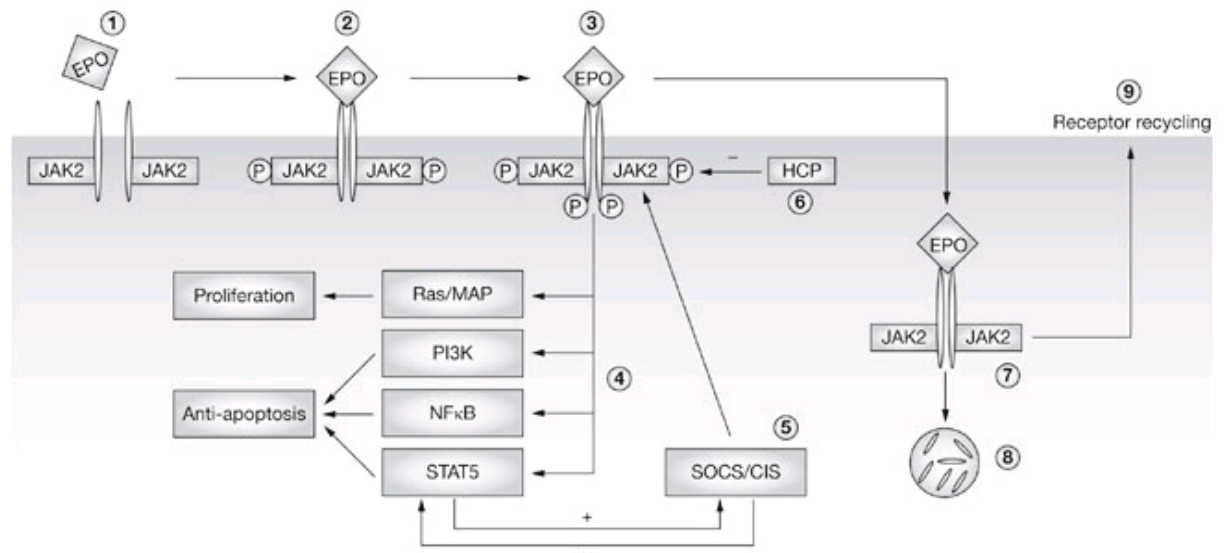
Der Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) ist ein membrangebundener Rezeptor und gehört zu der Zytokin-Superfamilie der Typ-1-Transmembranproteine. Bei Bindung von EPO kommt es durch die Phosphorylierung von Botenstoffen zu intrazellulären Signalkaskaden, die zur Transkription von antiapoptotischen Faktoren führen [KHANKIN et al., 2010].

EPO-R-Isoformen vermitteln die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von EPO und es zeigt sich auch ein Gewebe schützender Rezeptorkomplex, der aus EPO-R und der β -common Rezeptor (CD131) Untereinheit besteht. Diese

Untereinheit findet sich auch beim Rezeptor für granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interleukin-3 und Interleukin-5 [BRINES und CERAMI, 2006].

2.3.4 EPO-induzierte intrazelluläre Signalkaskade

Die Bindung eines EPO-Moleküls führt zur Dimerisierung des Rezeptors und damit verbundener Aktivierung der Janus Tyrosin Kinase (JAK 2) durch Transphosphorylierung. Im Zuge dieser Aktivierung werden ebenfalls spezifische Tyrosylreste des EPO-Rezeptors phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zur Initiation der intrazellulären Signalkaskade mit der Aktivierung von STAT 5, Ras/MAPK, PI3K und NF- κ B über SH₂-Domänen. STAT 5 induziert SOCS/CIS, welches die Signalwirkung von EPO abschwächt indem es an JAK 2 bindet und dadurch die Phosphorylierung von STAT 5 inhibiert. Die Signalwirkung von EPO wird durch HCP beendet, welches JAK 2 dephosphoryliert. Danach findet eine Translokation des EPO/EPO-R-Komplexes statt, wo jener dephosphoryliert und entweder im Proteasom abgebaut, oder auf die Zelloberfläche wieder rezykliert wird [LÖFFLER, 2005], [PUTTEN et al., 2008].



Schema 3 : Aktivierung des Erythropoietin-Rezeptors und die intrazelluläre Signalkaskade

Abkürzungen: CIS, cytokine-inducible SH₂-containing Protein; EP, erythropoietin; HCP, hematopoietic cell phosphatase; JAK 2, Janus kinase 2; MAP, mitogen activated protein; NFκB, nuclear factor kappa B; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; SOCS suppressor of cytokine signaling; STAT 5, signal transducer and activator of transcription 5

[PUTTEN et al., 2008]

2.3.5 Weitere Wirkungen von rhuEPO

RhuEPO erhöht bei gesunden Erwachsenen den arteriellen Sauerstoffgehalt nicht nur durch den Anstieg von Erythrozyten, sondern ebenfalls durch eine gleichermaßen wichtige Senkung des Plasmavolumens, sowie eine Abnahme von Renin und Aldosteron im Plasma. RhuEPO verursacht bei Gesunden auch eine Erhöhung des arteriellen Blutdruckes. Des Weiteren erniedrigt rhuEPO die proximale, renal-tubuläre Rückresorptionrate, aktiviert den tubuloglomerulären Feedback (TGF) Mechanismus und führt zur Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) [LUNDBY und OLSEN, 2011].

Rekombinante EPO-Formen, wie Epoetin-α, Epoetin-β oder Darbepoetin-α finden weite Verbreitung bei der Behandlung von Anämien bei chronischem

Nierenversagen (CNV) oder bei Krebspatienten mit Chemotherapie-induzierter Anämie [ARCASOY, 2008].

In der autokrinen und parakrinen Funktionsweise vermittelt EPO Präkonditionierung (ischämische Toleranz) und limitiert im Speziellen die schädigende Wirkung von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und anderen proinflammatorischen Zytokinen in Gehirn, Herz, Nieren und anderen Geweben [BRINES und CERAMI, 2006].

Bodo et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass menschliche Haut *in situ* EPO und funktionelle EPO-Rs exprimieren kann. Haarfollikel des menschlichen Skalps sind wichtige extrarenale Quellen und extrahämatopoetische Ziele von EPO-induzierten Signalisierungen. Obwohl es die genaue Funktion von intrafollikulärem EPO für menschliche Haarfollikel weiter zu erforschen gilt, verdient intrafollikuläres EPO Aufmerksamkeit, da es klinisch gegen Haarverlust, wie z.B. bei Chemotherapie-induzierter Alopezie, dienen könnte [BODO et al., 2007].

In der Studie von Iwai et al. konnte bewiesen werden, dass EPO, über eine Woche verabreicht, nach Hypoxie/Ischämieschädigung, zu einem Rückgang des Infarkt Volumens, signifikanter Verbesserung der funktionellen Revaskularisation, neuronalem Ersatz in der ischämischen Hemisphäre und verbesserten neurologischen Ergebnissen bei neugeborenen Ratten geführt hat. Diese Ergebnisse liefern den ersten Beweis, dass eine EPO-Behandlung den Prozess der neurovaskulären unit-deforming nach neonatalem Hypoxie/Ischämie-Hirntrauma fördert [IWAI et al., 2007].

2.4 Frataxin

Frataxin ist ein mitochondriales Protein, welches in den Eisenmetabolismus involviert ist. Diese Erkenntnis stammt aus Versuchen mit Hefen, bei denen es im Fall der Inaktivierung des homologen Frataxingens (Yhf1) zu einer Eisenakkumulation in den Mitochondrien gekommen ist.

Frataxin ist an der Bildung von Eisen-Schwefel Clustern (ISC) beteiligt, spielt eine Rolle bei der Bindung von Eisen und bei der Hämsynthese [PANDOLFO und PASTORE, 2009].

Obwohl Frataxin eine essentielle Rolle bei der intrazellulären Eisenhomöostase übernimmt, bleibt dessen genaue Funktion bezüglich der Eisenchemie und Metallverfügbarkeit sehr kontrovers [BENCZE et al., 2006].

2.4.1 Eisen

Das Mitochondrium übernimmt einerseits eine Schlüsselrolle bei der Energieübertragung, andererseits steht es ebenfalls im Mittelpunkt des Eisenmetabolismus. Eisen wird nicht nur für Häm- und Eisen-Schwefel-Cluster (ISC)-haltige Proteine, die beim Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung involviert sind, sondern auch für eine Vielzahl von zytoplasmatischen und nuklearen Funktionen, einschließlich DNA-Synthese, benötigt [RICHARDSON et al., 2010].

2.4.1.1 Intrazellulärer Eisentransport

Sobald Eisen aus dem Endosom durch den divalenten Metall-Transporter 1 (DMT1) transportiert wurde, tritt es in den chelatierbaren oder labilen Eisen-Pool (LIP), der wahrscheinlich aus niedermolekularen Komplexen besteht (z.B. Eisen-Citrat), ein. Das hocheffiziente Eisen-Targeting im Mitochondrium ist in erythroiden Zellen gegeben, wo Ferrochelatase Fe^{2+} in Protoporphyrin IX (PPIX) einfügt. Da Transferrin-gebundenes Eisen (TBI) effizient zur Hämsynthese genutzt wird und keine niedermolekularen, zytoplasmatischen

Eisentransportzwischenprodukte in Retikulozyten gefunden wurden, wird ein direkter Transfer des Eisens von Transferrin (TF) zum Mitochondrium vorgeschlagen [RICHARDSON et al., 2010].

2.4.1.2 Mitochondrialer Eisenimport

Obwohl bekannt ist, dass die innere Mitochondrienmembran Proteine enthält, die den Transport von Eisen in die mitochondriale Matrix ermöglichen, ist die Route von Fe^{2+} aus dem Endosom zur inneren Mitochondrienmembran nicht ganz verstanden. Foury und Roganti schlagen eine Rolle der eukaryotischen, mitochondrialen Transporter Mrs3 und Mrs4 beim mitochondrialen Eisenmetabolismus in Hefen vor [FOURY und ROGANTI, 2002].

2.4.2 Funktionen von Frataxin

Eine mögliche Funktion von Frataxin ist die eines mitochondrialen Eisenspeicherprotein (Schema 4, A).

In der Studie von Adinolfi et al. wurde berichtet, dass das Frataxin-Ortholog Yfh1 fähig ist, sich selbst in Oligomere und weiters in höher geordnete Multimere in Gegenwart von steigendem Fe^{2+} in Verbindung mit Ferroxidaseaktivität zu organisieren [ADINOLFI et al., 2002].

Da jedoch die Eisen-abhängige Oligomerisierung von Yhf1 nur in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen auftritt, welche in der Regel reichlich in den Mitochondrien vorhanden sind, ist diese Hypothese nicht sehr aussagekräftig [RICHARDSON et al., 2010].

Des Weiteren zeigen rekombinante humane Frataxin-Monomere, im Gegensatz zu denen von Yhf1, in vitro keine Oligomerisierung durch Eisen [CAVADINI et al., 2002].

Die wahrscheinlichste Rolle von Frataxin ist die eines Eisen-Chaperons für Eisen-Schwefel-Cluster (ISC)- und Häm-Biosynthese (Schema 4, B).

Yhf1 ist dabei fähig, mit dem zentralen ISC-assembly-complex, welcher das Gerüstprotein ISU und die Cystein Desulfurase (Nfs1) enthält, zu interagieren. Diese Interaktion wird durch Fe^{2+} verstärkt [RICHARDSON et al., 2010].

Eine aktuelle Studie legt nahe, dass *Escherichia coli*-Frataxin (CyaY) als „Eisen-Sensor“ wirkt (Schema 4, C).

Dieses Protein zeigt eine verminderte ISC-Biosyntheserate bei hohem Eisengehalt und geringer ISC Apo-Akzeptor-Verfügbarkeit. Falls dieses Modell auf ein eukaryotisches System übertragbar wäre, wäre ein Mangel an Frataxin vermutlich schädlich, da die ISC-Biosyntheserate die Verfügbarkeit von ISC Apo-Akzeptoren übersteigen könnte. Dies könnte wiederum zu einer Überproduktion von ISCs, die instabil in ungebundener Form sind, führen [ADINOLFI et al., 2009].

Eine weitere Funktion von Frataxin könnte die eines Expression-regulierten „metabolischen Schalters“ (Schema 4, D) sein.

Laut einem Modell, welches hauptsächlich auf Untersuchungen an mit DMSO differenzierter Friend-Zellen basiert, könnte der Frataxin-Gehalt der Mitochondrien einen Einfluss darauf haben, ob vermehrt Fe-S-Cluster oder Häm gebildet wird. Die Frataxin-Expression ist während der Hämoglobinisierung der Friendzelle deutlich herabgesetzt. Es wurde daraus geschlossen, dass Frataxin während der erythroiden Differenzierung herunterreguliert ist, um höhere Raten der Häm-Synthese zu ermöglichen, möglicherweise auf Kosten erniedrigter ISC-Syntheseraten. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die unmittelbare Vorstufe der Häm-Synthese, nämlich Protoporphyrin IX (PPIX), die Frataxin-Expression herunterreguliert [BECKER et al., 2002].

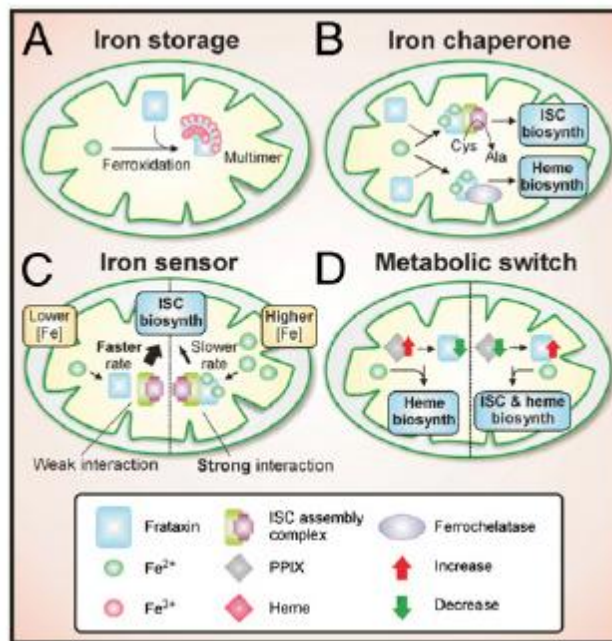


Abbildung 3: Mögliche Funktionen von Frataxin

[RICHARDSON et al., 2010]

3 Material und Methoden

3.1. Verwendete Zelllinien

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um primäre humane Fibroblasten. Es wurden einerseits Kontrollfibroblasten, isoliert von gesunden Probanden, als auch Fibroblasten, welche von Patienten mit Friedreich's Ataxie stammen, verwendet.

Untersucht werden zwei Kontrollfibroblasten-Zelllinien, welche mit Kontrollfibroblasten 1 und 2 (CoFib1, CoFib2) bezeichnet wurden und zwei Patienten-Zelllinien, die mit Friedreich's Ataxie-Fibroblasten 2 und 5 (FAFib2, FAFib5) bezeichnet wurden.

CoFib1-, CoFib2- und FAFib2-Zellen wurden vom Coriell Institute for Medical Research (Coriell Cell Repositories, USA) bezogen, wohingegen für die Bereitstellung der FAFib5-Zellen, besonderer Dank Fr. Dr. Sylvia Bösch, Medizinische Universität Innsbruck, gebührt.

3.1.1 Charakterisierung der untersuchten Fibroblasten-Zelllinien:

Kontroll-Fibroblasten:

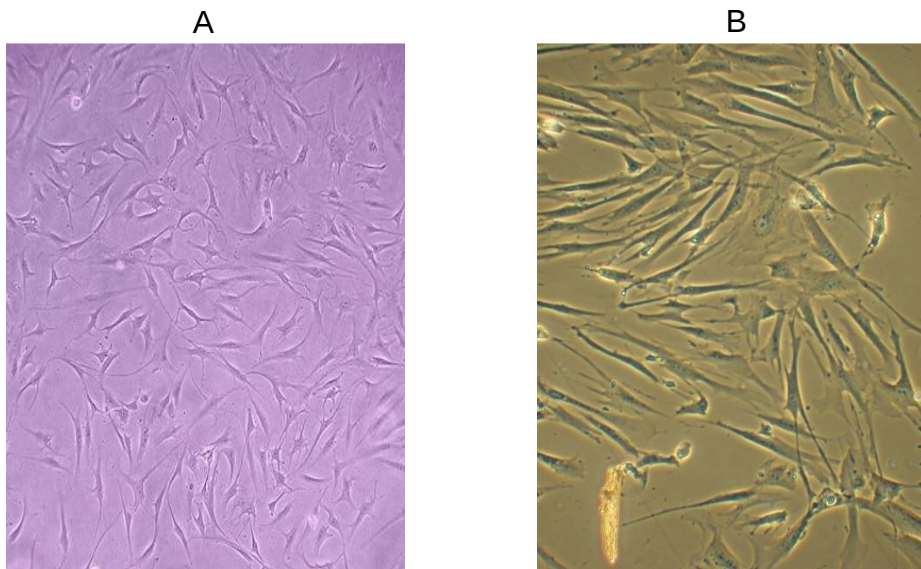
CoFib1 (GM08399): Bei dieser Zelllinie handelt es sich um gesundes, nicht fötales Gewebe einer 19-jährigen Frau (46 XX). Des Weiteren zeigt sich eine zufällige 2%-ige Verminderung/Steigerung der Chromosomen.

CoFib2 (AG09429): Diese Zelllinie entstammt ebenfalls einem gesunden, nicht fötalem Gewebe einer 25-jährigen Frau (46 XX). Die Zellkultur wurde von einem entfernten, fein zerkleinertem Gingivagewebe, initiiert.

Friedreich's Ataxie-Fibroblasten:

FAFib2 (GM03816): Diese Zelllinie entstammt einer 36-jährigen Friedreich's Ataxie-Patientin. Klinische Symptome bei der Patientin äußerten sich in zerebraler Degeneration und Myokardiopathie. Die sich im Frataxingen befindlichen Allele für die Expansion der GAA-Repeats liegen homozygot vor. Dabei wird die Anzahl der GAA-Repeats auf dem längeren Allel mit etwa 380 Wiederholungen und auf dem kürzeren Allel mit 330 Wiederholungen angegeben.

FAFib5: Diese Zelllinie stammt von einem 28-jährigen Friedreich's Ataxie-Patienten. Der Krankheitsbeginn wurde im Alter von 10 Jahren diagnostiziert. Die Anzahl der GAA-Repeats (kürzeres Allel) beläuft sich auf 850. Der SARA-score, eine Rating-Skala für den Fortschritt der Erkrankung, belief sich bei der Isolierung der Zellen auf 33,0 Punkte.

**Abbildungen 4 (A) und 5 (B): Humane Fibroblasten****Quelle:**

A: [http://www.cellapplications.com/products_display.php?id=72; Stand: 3.5. 2011]

B: [http://www.odec.ca/projects/2003/saade3s/public_html/index3.html; Stand: 3.5.2011]

3.1.2 Handhabung der Zellkultur

Der Umgang mit der Zellkultur erfordert steriles Arbeiten, um keine Bakterien, Keime, Pilze, sowie Sporen einzubringen. Alle Tätigkeiten, die die Zellkultur betreffen, werden in einer Sterilwerkbank (Laminar Air Flow Bio-II-A, Telestar) durchgeführt. Dazu wird jene im abgeschalteten Zustand mittels einer UV-Lampe ca. eine halbe Stunde lang mit UV-Licht bestrahlt, um Luft und Oberflächen von etwaigen Keimen zu befreien. Nach Einschalten der Belüftung sollte der Luftstrom erst eine Viertelstunde zirkulieren, bevor mit der Arbeit begonnen wird. Die Oberflächen werden mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Vor der Verwendung in der Sterilbank werden alle Gegenstände, wie Glaspipetten, Pasteurpipetten und Glasgefäße in einem Heißluftsterilisator (Binder) bei 160°C 8 Stunden lang sterilisiert. Kunststoffpipettenspitzen und destilliertes Wasser für den Brutschrank werden in einem Dampfsterilisator (Varioklav[®], Uni Equip) bei 121°C und 2 bar 30 Minuten lang autoklaviert. Für beide Sterilisationsarten gibt es passende Klebebänder mit Indikator, die eine erfolgreiche Sterilisation durch Schwärzung der Indikatorstreifen anzeigen. Lösungen, die in der Zellkultur verwendet werden, werden mittels eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm steril filtriert. Die verwendeten Handschuhe werden ebenfalls mit 70%-igem Alkohol desinfiziert.

3.1.3 DMEM-Medium

Für die Kultivierung der Fibroblasten wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium verwendet (DMEM). Für die Herstellung von 10 Liter Medium wird DMEM-Pulvermedium (Biochrom KG) zuerst in 9 Liter bidestilliertem Wasser unter ständigem Rühren am Magnetrührer (IKA[®] RCT basic) vollständig gelöst. Für ein optimales Lösen des Pulvers wird eine Stunde lang gerührt. Danach erfolgt die Zugabe von 37 g Natriumhydrogencarbonat. Der pH-Wert wird im Anschluss mit 5M bzw. 1M HCL auf 7,2 eingestellt. Das Medium wird mit bidestilliertem Wasser auf 10 Liter Endvolumen aufgefüllt. Da dieses Medium zur Kultivierung von Fibroblasten verwendet wird, muss es vorher sterilfiltriert werden. Dazu

wird das DMEM-Medium in der Sterilwerkbank unter Verwendung einer Schlauchpumpe (Masterflex, Cole Parmer Instrument Co) und eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm (Sartolab P plus, Sartorius) in sterile Glasflaschen zu je 500 ml abgefüllt. Die Aufbewahrung, dieses in der Folge als DMEM-Nullmedium bezeichneten Mediums, erfolgt bei 4°C.

3.1.3.1 DMEM-Medium ohne Phenolrot

Analog zur Herstellung des DMEM-Mediums, findet auch die des DMEM-Mediums ohne Phenolrot statt. Phenolrot, ein Triphenylmethanfarbstoff, wird als pH-Indikator eingesetzt und besitzt dabei zwei Umschlagbereiche. Der Farbumschlag von rot auf gelb findet bei einem pH-Wert von ungefähr 1 statt, der Farbumschlag von gelb auf rotviolett bei einem pH-Wert zwischen 6,4 und 8,2. DMEM ohne Phenolrot wurde verwendet, wenn Phenolrot mit der Messmethode interferieren würde.

3.1.4 Komplementieren des DMEM-Nullmediums

Das DMEM-Nullmedium wird mit fötalem Kälberserum und L-Glutamin komplementiert, um ein optimales Zellwachstum zu ermöglichen. Zusätzlich wird durch den Zusatz des Antibiotikums Gentamycin, bakterielles Wachstum verhindert. Dabei werden die nachfolgenden sterilen Zusätze zu 450 ml Nullmedium zugegeben.

- 50 ml FCS (fetal calf serum – heat inactivated), (GIBCO™)
- 5 ml L-Glutamin (2 mM), (PAA Laboratories GmbH)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml), (GERBU Biotechnik GmbH),
(Antibiotikum)

3.1.4.1 Komplementieren des DMEM-Medium, 20mM HEPES, pH 7,4

Das DMEM-Nullmedium wird wie oben beschrieben mit fötalem Kälberserum, L-Glutamin und Gentamycin komplementiert.

400mM HEPES, pH 7,4: 95,32 g HEPES (Biochrom AG) werden am Magnetrührer (IKA® RCT basic) in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1M NaOH auf 7,4 eingestellt und abschließend auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

20 mM HEPES → 1 µl 400 mM HEPES pro ml Medium

HEPES ist ein sehr stabiler organischer Puffer und besitzt im physiologischen Bereich eine sehr gute Pufferkapazität im pH-Bereich von 7,2-7,6. Bei HEPES gepufferten Zellkulturmedien ist die Inkubation im CO₂-begasteten Brutschrank nicht mehr erforderlich, womit der pH-Wert für die Dauer der Messungen konstant gehalten werden kann und die Zellen nicht zusätzlichem Stress ausgesetzt sind.

3.1.5 Kultivieren von Fibroblasten

Die Kultivierung von adhärenenten Fibroblasten erfolgt in sterilen Zellkulturflaschen (IWAKI), (75cm²). Die Inkubation der Zellen findet in einem Brutschrank (Binder bzw. Tabai) bei einer 5%-iger CO₂-Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C statt. Um einer Verdunstung des Nährmediums entgegenzuwirken, befindet sich am Boden des Inkubators eine Wanne mit Wasser, um eine hohe Luftfeuchtigkeit im Inkubator zu erhalten. Für die Befüllung der Wanne verwendet man autoklaviertes Wasser in dem 2 – 3 Löffel Kupfer-II-Sulfat gelöst sind, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.

Während der Inkubation im Inkubator wird der Verschluss der Zellkulturflasche nicht ganz zuge dreht, um einen CO₂-Gasaustausch, und damit die Pufferung des Mediums zu sichern.

PH-Wert-Änderungen durch die Stoffwechselaktivität der Zellen werden mit Phenolrot als optischem pH-Indikator kontrolliert. Um ein logarithmisches Wachstum zu gewährleisten, wird das Medium 2 - 3-mal in der Woche gewechselt. Die Zellen werden bei 90%-iger Bewachung des Bodens der Zellkulturflaschen (75 cm²), (IWAKI) im Verhältnis von 1:7 gesplittet, was zur Erhöhung der Passagenzahl um eins führt.

3.1.5.1 Splitten von Fibroblasten

Alle verwendeten Lösungen müssen im Vorhinein im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Das DMEM-Nährmedium wird mittels Pasteurpipette und Absaugpumpe über dem Zellrasen abgesaugt. Dabei ist zu beachten, dass die mit den Zellen bewachsene Wand nicht berührt wird. Anschließend werden die Zellen 1x mit 10 ml sterilem PBS (PAA Laboratories GmbH) gewaschen. Zum Herablösen der adhären Zellen wird eine Trypsin/EDTA-Lösung (1x), (PAA Laboratories GmbH) in PBS verwendet. Die Zellen werden dabei mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank bei 37°C trypsinisiert. Sobald sich die Zellen abgerundet haben, wird, um ein schnelleres Lösen zu induzieren, sanft mit der Hand gegen die Zellkulturflaschenwand geschlagen. Anschließend werden zur Inaktivierung des Trypsins 8 ml komplementiertes Medium in die Flasche pipettiert und die Zellsuspension 10-mal mit einer 10 ml Glaspipette durch Auf- und Absaugen resuspendiert. Die Fibroblasten werden bei 90% bewachsener Fläche im Verhältnis von 1:7 gesplittet. Abschließend werden die Zellen in neue sterile Zellkulturflaschen (75 cm²), (IWAKI) überführt, man füllt mit komplementiertem Medium auf maximal 20 ml auf und resuspendiert die Zellen erneut.

Herstellung von PBS:**5x PBS, pH 7,3**

Für 2 Liter 5x PBS, pH 7,3 benötigte Reagentien:

Fa. Merck	{	NaCl	80 g
		KCl	2 g
		KH ₂ PO ₄	2 g
		Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	30 g

Nachdem alle Substanzen eingewogen wurden, wird mit H₂O bidest. auf < 2 Liter aufgefüllt und am Magnetrührer (IKA® RCT basic) gut gemischt. Nachdem sich alle Ingredienzen gelöst haben, wird der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und auf 2 Liter Endvolumen mit H₂O bidest. aufgefüllt. Damit man 1x PBS erhält muss man 5x PBS 1:5 mit H₂O bidest. verdünnen.

3.1.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Versuche muss eine genau definierte Zellzahl eingestellt werden. Dafür müssen die Zellen zuerst gezählt werden. Dabei überführt man nach dem Trypsinisieren 500 µl der Fibroblasten-Suspension unter sterilen Bedingungen in ein Eppendorfgefäß. Daraus pipettiert man 200 µl in ein spezielles Countergefäß und diese nunmehr unsterile Zellsuspension wird mit 9,8 ml einer isotonen Zähl-Flüssigkeit (Counterflüssigkeit), (Cellpack PK-30, Fa. Sysmex) ergänzt. Die Messung erfolgt in einem elektronischen Zellzähler (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex). Der Mittelwert aus zwei Messungen entspricht der Zellzahl in Millionen pro ml in der ursprünglichen Zellsuspension.

3.1.5.3 Einstellen der Zellzahl

Der aus dem obigen Verfahren erhaltene Wert für die Zellzahl dient nun weiters zur Einstellung der gewünschten Zellzahl. Für die in dieser Diplomarbeit durchgeführten Experimente, wird die Anzahl der Fibroblasten in 96-Well-Platten auf 15 000 Zellen pro Well eingestellt. Dafür werden je Well 200µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 75 000 Zellen/ml verwendet.

3.1.6 Einfrieren von Zellen

Fibroblasten können über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei -167°C gelagert werden. Um die Fibroblasten in einer niederen Passage zu konservieren, wird ein Teil der neu ausgesetzten Zellen beim erstmaligen Passagieren wieder unter sterilen Bedingungen eingefroren. Die Zelldichte wird auf etwa 10×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Nach dem Trypsinisieren wird die Zellsuspension dabei in ein 50 ml Plastikröhrchen (Fa. Greiner) überführt und bei 650xg und 4°C 10 min lang zentrifugiert (Eppendorf 5403 Zentrifuge). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet auf Eis gekühlt. Zum Pellet wird eiskaltes Einfriermedium, welches aus komplementiertem DMEM Medium und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid), (Sigma Aldrich) besteht, hinzugefügt. Aufgrund der durch das Einfrieren bedingten Ausdehnung werden maximal 1,8 ml der Zellsuspension in sterile 2 ml Kryoröhrchen (Fa. Nunc.) überführt. Die Kryoröhrchen werden in einen Gefrierbehälter (Cryo freezing container, Nalgene) gegeben und 3 Tage auf -80°C gestellt. In dem verwendeten Gefrierbehälter beträgt die Abkühlrate ca. 1°C pro Stunde. Erst danach werden die Zellen in den flüssigen Stickstofftank zur Lagerung überführt.

3.1.7 Auftauen von Zellen

Die aus dem flüssigen Stickstofftank entnommenen, in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen, werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach werden die Zellen unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Plastikröhrchen

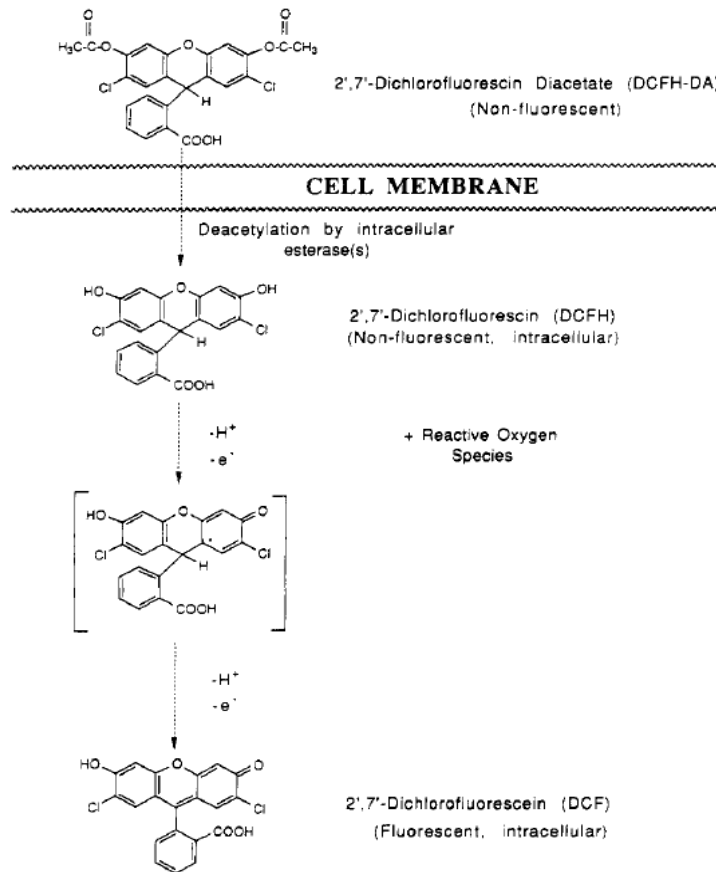
transferiert, mit 10 ml Nährmedium versetzt und bei 650xg 5 Minuten lang bei 37°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet nochmals in komplementiertem DMEM mit Phenolrot resuspendiert. Dieser Vorgang dient dazu, das beim Einfrieren hinzugefügte und beim Auftauen als Gefrierschutz dienende DMSO wieder zu entfernen. Abschließend werden die Zellen zur Kultivierung in Zellkulturflaschen (75 cm²), (IWAKI) pipettiert. Die Zellen wurden erst nach zweimaligen Passagieren zu Versuchszwecken verwendet.

3.2 Messung von oxidativem Stress mittels Dichlorfluorescein (DCF)

2',7'-Dichlordihydrofluorescein (H₂-DCF), als Dichlorfluorescein (DCF) bekannt, und Dihydrorhodamin 123 (DHR) werden oft für die Bestimmung der Produktion von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies in den Zellen benutzt. Dabei werden die beiden Verbindungen zu den jeweiligen fluoreszierenden Produkten oxidiert [CROW, 1997].

Zum Beladen der Zellen mit 2',7'-Dichlordihydrofluorescein wird dessen Diazetatester verwendet. Sobald 2',7'-Dichlorfluorescein-diazetat (H₂-DCF-DA) die Zellwand passiert hat, werden beide Azetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Dabei entsteht das nicht fluoreszierende H₂-DCF. In Gegenwart von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species), (ROS) kann eine Oxidation zum fluoreszierenden, jedoch instabilen, Dichlorfluorescein (DCF) erfolgen [LeBEL et al. 1992].

Die gesamte praktische Durchführung erfolgt möglichst lichtgeschützt und der Beginn der Messung erfolgt unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen. Die Detektion der Fluoreszenz von DCF erfolgt im Fluorimeter.



Schema 4: Bildung des fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) aus Dichlorfluorescein-diazetat (DCFH-DA) unter Einwirkung von ROS in Zellen [LeBEL et al., 1992]

3.2.1 Verwendete Inkubationslösungen

100 μM Eisen-II-Ammoniumsulfat (FAS):

10 mM FAS Stammlösung $\rightarrow$ 39,21 mg FAS (Sigma[®]) werden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

100 μM FAS $\rightarrow$ 10 μl 10mM FAS Stammlösung pro 1000 μl komplettiertes DMEM ohne Phenolrot

50 μ M Wasserstoffperoxid (H_2O_2):

50mM H_2O_2 Stammlösung $\rightarrow$ 43,1 μ l 35% H_2O_2 (Fa. Merck) werden auf 10 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt; und anschließend 50mM H_2O_2 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt, ergibt 5mM H_2O_2

50 μ M $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ 10 μ l 5mM H_2O_2 pro 1000 μ l komplettiertes DMEM, 20mM Hepes ohne Phenolrot

Recombinant human Erythropoietin (rhuEPO), (Roche): 6,6 U/ml, 3,3 U/ml, 1,1 U/ml

rhuEPO (Roche): 1000 units/0,3 ml

6,6 U rhuEPO/ml $\rightarrow$ 2 μ l rhuEpo pro 1000 μ l komplettiertes DMEM ohne Phenolrot

3,3 U rhuEPO/ml $\rightarrow$ 1 μ l rhuEpo pro 1000 μ l komplettiertes DMEM ohne Phenolrot

1,1 U rhuEPO/ml $\rightarrow$ 0,33 μ l rhuEpo pro 1000 μ l komplettiertes DMEM ohne Phenolrot

100 μ M Tert-butylhydroperoxid (TBH), (Aldrich):

Stammlösung: 10 mM $\rightarrow$ 13 μ l werden in 10 ml PBS pH 7,3 verdünnt.

100 μ M $\rightarrow$ 10 μ l 10mM TBH (in PBS) pro 1000 μ l komplettiertes DMEM ohne Phenolrot

3.2.2 Inkubationslösung für die Beladung der Zellen mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein

10 μ M 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat (H₂-DCF-DA):

103 mM H₂-DCF-DA $\rightarrow$ 50 mg H₂-DCF-DA (Fa. Molecular Probes) werden in 1 ml DMSO (Aldrich) gelöst und zu 50 μ l in kleine Eppendorfgefäße (0,7 ml) portioniert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

10 μ M H₂-DCF-DA $\rightarrow$ 103mM H₂-DCF-DA Stammlösung 1:10300 mit komplettiertem DMEM ohne Phenolrot verdünnen $\rightarrow$ **9,7 μ l 103mM H₂-DCF-DA pro 10 ml komplettierten DMEM ohne Phenolrot**

20 mM HEPES

400mM HEPES-Stocklösung:

95,32 g HEPES (Biochrom AG) werden am Magnetrührer (IKA® RCT basic) in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1M NaOH auf 7,4 eingestellt und abschließend auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

20 mM HEPES $\rightarrow$ 50 μ l 400 mM HEPES pro ml Medium

3.2.3 Durchführung der DCF-Messung

Für die Versuche werden die Fibroblasten in 96-Well-Platten (schwarze Wände und durchsichtiger Boden, Greiner) mit 15 000 Zellen pro Well ausgesetzt und die Randwells dabei freigelassen. Bei der Durchführung der Versuche ergaben die fluorimetrischen Messungen unterschiedliche Ergebnisse, wenn derselbe Messansatz in einem innen gelegenen Well bzw. in einem Randwell durchgeführt wurde.

Durch das Freilassen der Randwells konnte die Streuung der Ergebnisse bei der Messung minimiert werden. In die Randwells wird jeweils 200 μ l Medium oder bidestilliertes Wasser pipettiert, um die Verdunstung innerhalb der Platte

möglichst gering zu halten. Die Platte wird 24 h im Brutschrank (37°C, 5%-ige CO₂ Atmosphäre) inkubiert, damit sich die Zellen am Wellboden festsetzen können. Erst danach wird ein Teil der Wells der 96-Well-Platte abgesaugt und mit 100 µl rhuEPO (Roche) in der Konzentration von 6,6 U/ml in komplettierte DMEM-Medien versetzt und 24 h im Brutschrank vorinkubiert bzw. präkonditioniert. Dabei erfolgte die zeitliche Koordination so, dass 22 h nach der Zugabe ein anderer Teil der Wells in der Platte abgesaugt wird und für weitere 2 h mit 100 µl rhuEPO (6,6 U/ml) vorinkubiert wird. Anschließend wurde unter unsterilen Bedingungen weitergearbeitet. Das Medium wird abgesaugt und die Wells werden 2x mit warmen DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Danach werden 100 µl 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diazetat (H₂-DCF-DA), (10 µM) in die mit Zellen besetzten Wells pipettiert und die Zellen 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Wells abgesaugt und wieder 2x mit DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Anschließend werden 100 µl einer Inkubationslösung, die FAS, H₂O₂ oder TBH enthält, direkt vor der Messung in die Wells pipettiert. Die Messung erfolgt alle 15 Minuten in einem Plattenfluoreszenzmessgerät (Anthos Zenyth 3100) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm. Da die Messung über einen Zeitraum von 90 Minuten erfolgt, wird auch die Temperatur im Fluorimeter auf 37°C eingestellt. Die erhaltenen Messwerte für die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität werden anschließend mittels „GraphPad Prism 5“-Programm ausgewertet.

3.2.4 H₂-DCF-DA/H₂-DCF

In dieser Diplomarbeit wurden auch Kontrollversuche im zellfreien System durchgeführt, um den direkten Einfluss der getesteten Substanzen auf die Hydrolyse und/bzw. Oxidation von H₂-DCF-DA bzw. DCF näher zu untersuchen. Die Versuche wurden sowohl mit dem Diazetat von 2',7'-Dichlordihydrofluorescein als auch mit freiem 2',7'-Dichlordihydrofluorescein durchgeführt.

Um aus H₂-DCF-DA freies 2',7'-Dichlordihydrofluorescein zu erhalten wurden die beiden Azetatgruppen chemisch hydrolysiert.

3.2.4.1 Verwendete Lösungen

- **25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,2**

Dabei werden 3,5 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in 900 ml H₂O bidest. aufgelöst. Die Lösung wird am Magnetrührer (IKA® RCT basic) gerührt und der pH-Wert wird mittels 1 N NaOH auf 7,2 eingestellt. Abschließend wird auf 1000 ml mit H₂O bidest. aufgefüllt und der Puffer bei 4°C gelagert.

- **0,01 N NaOH**

1 N NaOH wird mit H₂O bidest. im Verhältnis 1:100 verdünnt

- **103mM H₂-DCF-DA**

Dabei werden 50 mg H₂-DCF-DA in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, portioniert und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

- **DMEM**

Verwendung findet das komplementierte Medium (siehe **3.1.3.1 DMEM**), Nullmedium mit Phenolrot und Nullmedium ohne Phenolrot.

- **PBS, pH 7,4**

- **Rekombinantes Erythropoietin, Epoetin beta (Roche)**

rhuEPO (Roche) 500U/300µl:	13,2 U/ml (8 µl EPO/ml DMEM)
	6,6 U/ml (4 µl EPO/ml DMEM)
	3,3 U/ml (2 µl EPO/ml DMEM)
	1,1 U/ml (0,66 µl EPO/ml DMEM)
	0,1 U/ml (0,06 µl EPO/ml DMEM)

Dabei wird jeweils das Doppelte der Endkonzentration hergestellt, da sich das Endvolumen von 200 µl im Endeffekt aus 100 µl der jeweiligen rhuEPO-Konzentration und aus 100 µl des DCF zusammensetzt.

- Hitzeinaktivierung:

Inaktivierung der Proteine erfolgt 30 min lang bei 60°C.

rhuEPO (Roche) 5000U/300µl: Es erfolgt zuerst eine Verdünnung von 1:10 mit sterilem PBS. Anschließend werden die Konzentrationen von 6,6; 3,3 und 1,1 U/ml wie oben hergestellt.

3.2.4.2 Chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat

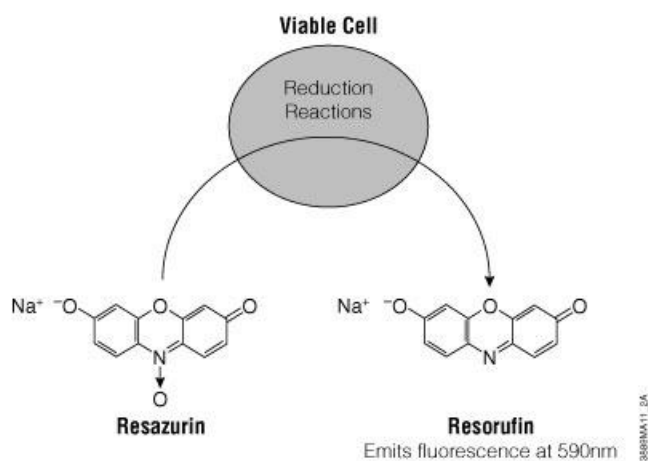
- In einem Eppendorfgefäß werden zu 1000 µl H₂O bidest. langsam 10 µl 103 mM H₂-DCF-DA zugesetzt und am Vortex gut durchgemischt. Anschließend überführt man 500 µl dieser Lösung in ein 15 ml Röhrchen und pipettiert 2 ml 0,01 N NaOH dazu und inkubiert im Dunkeln 30 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Lösung mit 10 ml 25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 neutralisiert. Die nun erhaltene Lösung besitzt eine Konzentration von 40 µM/l DCF.

In den zellfreien Versuchen wurde DCF bzw. H₂-DCF-DA immer in einer Konzentration von 10 µmol/l eingesetzt.

3.3 Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin

7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid, üblicherweise unter dem Namen Resazurin bekannt, wird zur Messung der Zytotoxizität von Substanzen in lebenden Zellen verwendet. Dabei wird Resazurin, ein blauer Farbstoff, zum pinkfarbenen und fluoreszierenden Resorufin umgesetzt.

Vitale, metabolisch aktive Zellen behalten die Fähigkeit bei, Resazurin irreversibel in Resorufin umzuwandeln, welches fluoresziert.



Schema 5: Intrazelluläre Reduktion des Resazurin zum Resorufin

Quelle:[<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>; Stand: 11.5.2011]

3.3.1 Herstellung der Resazurin Lösung

4 mM Resazurin – Natriumsalz, (Sigma):

Zur Herstellung der werden 10,05 mg Natrium-Resazurin in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird in 1,5 ml Eppendorfgefäßen portioniert und bei 20°C gelagert.

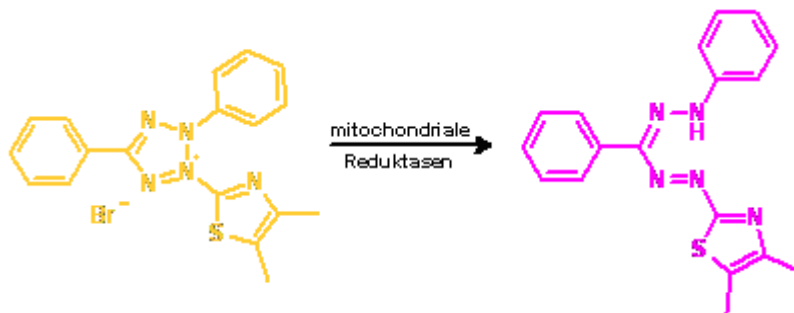
3.3.2 Durchführung der Resazurinmessung

Fibroblasten wurden in 96-Wellplatten (15000 Zellen pro Well) ausgesetzt und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5%-ige CO₂ Atmosphäre) inkubiert. Am darauffolgendem Tag wird das Medium in den für eine Präinkubation vorgesehenen Wells abgesaugt und durch Medium, welches 6,6 U/ml Erythropoietin (Epoietin Beta) (Roche) enthält, ersetzt und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. 2 Stunden vor Ablauf der 24-stündigen Inkubation wird das Medium aus den Wells, welche für eine 2-stündige Präinkubation vorgesehen sind abgesaugt, und durch komplettiertes DMEM, welches 6,6U/ml EPO enthält, ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden alle Wells abgesaugt und durch neues Medium und Substanzen ersetzt. Die Zellen wurden weitere 22 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Inkubationslösungen aus den Wells entfernt, die Platten verkehrt auf Papierhandtücher gestellt und dadurch noch letzte Reste des Inkubationsmediums entfernt. Anschließend wurden in jedes Well 200 µl 3 µM Resazurin in DMEM, 20mM HEPES ohne Phenolrot zugesetzt und die Fluoreszenz im Fluoreszenzplattenmessgerät (Anthos Zenyth 3100) 2,75 h, alle 15 min bei einer Temperatur von 37°C gemessen.

Die Auswertung erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

3.4 MTT – Test

Beim MTT-Test handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Messung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. Das zugrunde liegende Prinzip beruht darauf, dass lebende Zellen, bedingt durch ihre mitochondrialen Dehydrogenasen, das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT–(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum blau-violetten und nun wasserunlöslichen Formazan reduzieren. Diese intrazelluläre Reduktion wird durch die Anwesenheit zytotoxischer Substanzen erniedrigt oder völlig inhibiert. Dabei wird die prozentuelle Verringerung der Formazanbildung durch zytotoxische Substanzen in Relation zur Formazanbildung in den unbehandelten Zellen gesetzt. Das resultierende Formazan kann photometrisch quantifiziert werden, da Farbintensität und Vitalität der Zellen zueinander direkt proportional sind. [SARAVANAN et al., 2003]



Schema 6: Reduktion des MTT zum Formazan durch mitochondriale Reduktasen in den Zellen

Quelle: [<http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=39>; Stand: 11.5.2011]

3.4.1 Durchführung des MTT –Tests

Siehe hierfür Durchführung der Resazurinmessung (Kapitel 3.3.2).

Anschließend wird direkt in die Wells jeweils 40 µl MTT-Stammlösung (bestehend aus 5 mg MTT/ml in PBS gelöst) pro 200 µl vorhandene

Inkubationslösung in den Wells zugesetzt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sie unter dem Mikroskop blaugefärbt erscheinen (bei den verwendeten Fibroblasten betrug die Inkubationsdauer 30min). Nachdem die Platten ausgeleert und vorsichtig auf Tüchern abgeklopft wurden gibt man 150 µl der MTT-Solvent-Lösung pro Well hinzu und stellt die Platte 20 min auf den Belly Dancer, um die MTT-Formazankristalle zu lösen. Die MTT Solventlösung besteht aus Isopropanol, 4mM HCl, 0,1% Nonidet P-40. Abschließend wird die Farbintensität bei 595 nm und 620 nm im Anthos Zenyth 3100 gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt mit Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

1. Beladung von Fibroblasten und HepG2-Zellen mit Eisenammoniumcitrat

Eisenammoniumcitrat zur Beladung der Zellen mit Eisen: FAC: 75 µM

- **Eisen(III)-Ammoniumcitrat (FAC)**, (Merck) wird dazu in der Konzentration von 75µmol/l hergestellt.

Dabei wird 71,4 mg FAC pro ml H₂O bidest. eingewogen, gelöst und anschließend mit einem 0,22 µm Sterilfilter (Sartolab P plus, Sartorius) filtriert.

→Die hergestellte Lösung besitzt einen Gehalt von 20 mg Fe/ml

Damit das komplementierte DMEM die gewünschte Eisenkonzentration erreicht, müssen 1,62 µl der Stammlösung pro Milliliter Mediums gegeben werden.

Fibroblasten: Zellen wurden in Kulturflaschen (IWAKI), (75 cm²) unterschiedlich lange mit 75µM FAC inkubiert. Dabei ist eine Inkubation von einem, zwei und drei Tagen im Vergleich zu Zellen ohne FAC gegeben.

HepG2: Zellen wurden einen Tag mit DMEM-Medium mit 75µM FAC bzw ohne FAC im Brutschrank inkubiert.

3.6.1.2 Ernten der Zellen und Gewinnung der Zellysate für die Eisen- u. Proteinbestimmung

Verwendete Lösungen:

- **20 mM DTPA** herstellen: 19,7 mg werden eingewogen und mit H₂O bidest. und NaOH gelöst. Anschließend stellt man den pH-Wert mittels 1M HCL auf 7 ein und füllt auf einen Liter Endvolumen mit H₂O bidest. auf.
- **50µM DTPA in PBS**
- **1mM PMSF in PBS**

Ernte der Zellen und Gewinnung der Zellpellets:

Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

- Inkubationsmedium wird abgesaugt
- 10 ml 50µM DTPA in PBS werden vorsichtig an den Rand der Flasche pipettiert und 5 Minuten inkubiert
- Zellrasen wird 2x mit jeweils 10 ml PBS gewaschen
- Zugabe von 5 ml PBS, 1mM PMSF
- Zellrasen wird mit dem Zellschaber abgeschabt und Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen transferiert
- Flasche wird mit 2 ml PBS, 1mM PMSF nachgespült und mit der Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen vereinigt
- Zentrifugation 10 Minuten lang bei 650xg und 4°C
- Zellpellets werden bei -18°C bis zur Protein und Eisenbestimmung gelagert

Herstellung der Zellysate:

Zellysispuffer: 1x PBS (10 ml) mit 0,1% Triton X-100 (TX-100), (10 µl) und 1mM PMSF (in DMSO), (10 µl)

Die bei -18°C gelagerten Zellpellets, CoFib und FAFib werden dabei jeweils mit 200 µl, HepG2 mit 450 µl Zellysispuffer versetzt und gevortext. Nach 20-

minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellmembranen mittels Ultraschall aufgebrochen. Abschließend wird die Suspension bei 4°C 5 Minuten und 2850xg zentrifugiert, um das reine Zelllysate zu erhalten. Der Überstand wird in 1,5 ml Eppendorfgefäße transferiert und bei Nichtverwendung bei -18°C eingefroren.

3.6.2 Proteinbestimmung mit Bio-Rad (Bradford)

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurden mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“ bestimmt (Bradford, 1976). Das zugrunde liegende Prinzip besteht darin, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 (CBBG) mit freien Aminogruppen der Proteine komplexiert. Diese in saurer Lösung stattfindende Komplexbildung resultiert in einem Farbumschlag von grünlichem braun hin zu blau. Dabei wird photometrisch die Bildung des Komplexes bei 595 nm gemessen.

Unter Verwendung einer BSA-Standardgeraden (Bovine Serum Albumin, Amresco) (Tabelle 1), erfolgt die Bestimmungen der unbekannten Proteinkonzentrationen. Dabei wurde die 1mg/ml BSA-Stammlösung zuerst 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt. Die Eichgerade deckt dabei das Konzentrationsspektrum von 2 µg/ml bis 10 µg/ml ab.

	Konzentration	BSA (0.1mg/ml)	H ₂ O
Leerwert	-	-	800 µl
Standard 1	2 µg/ml	20 µl	780 µl
Standard 2	4 µg/ml	40 µl	760 µl
Standard 3	6 µg/ml	60 µl	740 µl
Standard 4	8 µg/ml	80 µl	720 µl
Standard 5	10 µg/ml	100 µl	700 µl

Tabelle 1: Pipettierschema des Proteinstandards

Durchführung mit dem Probenmaterial

Für die Messung wurden jeweils 2 µl des Zellysats mit unbekanntem Proteingehalt entnommen und auf 800 µl mit H₂O bidest. aufgefüllt. Im anschließenden Schritt werden alle Proben, Standards und Leerwerte, mit 200 µl Biorad Reagenz auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt und gut gevortext. Innerhalb der nächsten 20 Minuten pipettiert man 200 µl der jeweiligen Proben, Standards und Leerwerte im Doppelansatz in eine 96-Wellplatte mit flachem Boden. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wird die Absorption bei 600 nm im Photometer Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac) gemessen.

Die Auswertung der Messung erfolgt mit der Software GraphPad Prism 5 mittels Standardkurvenkalkulation.

3.6.3 Eisenbestimmung mit der Ferrozin-Methode

Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat, unter dem gebräuchlicheren Namen Ferrozin bekannt, ist ein Eisenchelator für zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}), und wird für die Bestimmung der Eisenkonzentration im Zuge der Ferrozin-Methode verwendet (Fish, 1988). Ferrozin bildet in Kombination mit Fe^{2+} den violett gefärbten Eisen(II)-Ferozin-Komplex, der bei 540nm photometrisch gemessen wird. Das in Proteinen und sehr stabilen Eisenkomplexen enthaltene Eisen wird durch die Zugabe von saurem Permanganat (Reagenz A, Iron-Releasing Reagent) und Inkubation bei 60°C freigesetzt. Reagenz B (Iron-Reducing and – Chelating Reagent) dient als Reduktans. Die in Reagens B enthaltene Ascorbinsäure reduziert dabei Eisen (Fe^{3+}) vollständig zu Fe^{2+} , das mit Ferrozin quantitativ komplexiert wird. Zum anderen enthält Reagenz B einen Chelator für Kupfer (Neocuproin). Dieser dient dazu Kupferionen, die ebenfalls mit Ferrozin reagieren können, abzufangen. Cu-Neocuproin, welches bei 540nm kein Licht absorbiert, beeinflusst dadurch nicht die Bestimmung der Eisenkonzentration.

3.6.3.1 Verwendete Reagenzien

Reagenz A (Iron-Releasing Reagent):

4,5% (w/v) KMnO_4 : 0,45g Kaliumpermanganat (KMnO_4 , Merck) werden in 10ml H_2O bidest. gelöst.

Anschließend werden 10ml 1,2M HCl (Merck) mit 10ml 4,5% (w/v) KMnO_4 gemischt

→Die Lösung wurde immer frisch zubereitet und vor Licht geschützt

Reagenz B (Iron-Reducing and – Chelating Reagent)

Für 20ml Reagens werden

64 mg Ferrozin (Sigma)

64 mg Neocuproin (Sigma)

7,04 g Ascorbinsäure (Sigma)

7,76 g Ammoniumacetat (Merck)

eingewogen. Beim Lösen ist zu beachten, dass, um Präzipitate zu verhindern, zuerst Ascorbinsäure und Ammoniumacetat in ein wenig H_2O bidest. aufgelöst werden. Erst danach gibt man die vorher eingewogene Menge an Ferrozin und Neocuproin dazu und füllt auf 20 ml mit H_2O bidest. auf.

Eisenstandard: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Stammlösung (Sigma-Aldrich)

3.6.3.2 Durchführung der Messung

In 2ml Eppendorfgefäßen werden eine Eisen-Standardreihe, sowie die Leerwerte nach Tabelle 2 pipettiert (Abb. 6). Die Zellysate mit unbekanntem Eisengehalt werden alle auf ein Gesamtvolumen von 500 μl mit H_2O bidest. ergänzt. Danach werden zu allen Standardlösungen, Leerwerten und Proben jeweils

250 μl Reagenz A (Iron-Releasing Reagent) zugesetzt. Anschließend werden

alle Eppendorfgefäße gut gevortext, und mit einer Kanüle wird ein kleines Loch in den Deckel des Eppendorfgefäßes gestochen, um Überdruck bei der nachfolgenden Inkubation von 2 Stunden bei 60°C zu verhindern. Danach lässt man die Lösungen auf Zimmertemperatur abkühlen und im Anschluss gibt man 50 µl Reagenz B (Iron-Reducing and–Chelating Reagent) mit dem Handdispenser hinzu. Die Eppendorfgefäße werden gevortext und 5 Minuten bei 3560xg zentrifugiert, um etwa vorhandene Präzipitate zu entfernen. Aus jedem Reaktionsansatz werden 200 µl in eine 96-Well-Plate (Greiner) pipettiert und 30 Minuten nach Zugabe von Reagenz B im Photometer gemessen. Die Absorptionsmessung der Bildung des Eisen-Ferrozin Komplexes erfolgt im Photometer Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac) bei 540 nm.

Zur Auswertung benutzt man das Softwareprogramm GraphPad Prism 5 und berechnet mittels linearer Regression und Standardkurvenkalkulation die Eisenkonzentration der jeweiligen Probe.

	Fe µg	Fe STD (20µg/ml)	H ₂ O bidest.
Leerwert	-	-	500 µl
Standard 1	0,02	1 µl	499 µl
Standard 2	0,04	2 µl	498 µl
Standard 3	0,1	5 µl	495 µl
Standard 4	0,4	20 µl	480 µl
Standard 5	0,8	40 µl	460 µl
Standard 6	1,2	60 µl	440 µl
Standard 7	1,6	80 µl	420 µl
Standard 8	2,0	100 µl	400 µl

Tabelle 2: Pipettierschema der Eisenstandards und des Leerwertes

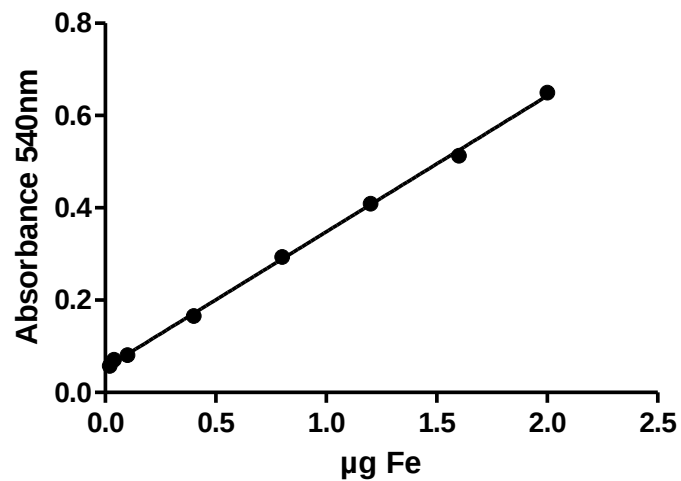


Abbildung 6: Eichgerade des Eisenstandards

3.7 Statistik

Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt und die Anzahl der Einzelexperimente (n) ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Für die Auswertung der Messdaten wurde MS Excel verwendet und die statistische Auswertung erfolgte dann mit dem Programm „GraphPad Prism 5“. Signifikante Unterschiede wurden mit dem gepaarten t-Test geprüft. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss von Oxidantien und rhuEPO auf den oxidativen Stress in humanen Fibroblasten

In einer Studie von Boesch et al. wurde gezeigt, dass durch die Gabe von rhuEPO die Frataxinlevel erhöht wurden. Weiters konnte gezeigt werden, dass sich Bewertungsskalen der Friedreich's Ataxie, wie Friedreich Ataxia Rating Scale (FARS) und Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA), bei den Patienten während der Behandlung mit rhuEPO signifikant verbesserten. Auch Indikatoren für oxidativen Stress, wie der Uringehalt an 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG), sowie Serum-Peroxide wurden durch rhuEPO signifikant gesenkt [BOESCH et al., 2008].

4.1.1 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den oxidativen Stress in Gegenwart von Radikalbildnern; DCF - Methode

Die nachfolgenden Experimente sollen den Einfluss einer Vorinkubation der Zellen mit rhuEPO sowohl auf den basalen, oxidativen Stress als auch auf den durch zugesetzte Oxidantien zusätzlich induzierten oxidativen Stress in humanen Fibroblasten zeigen. Die Produktion von freien Radikalen wird dabei durch

Tert-butylhydroperoxid (TBH), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Eisenammoniumsulfat (FAS) induziert und in dieser Versuchsanordnung mittels der DCF-Methode detektiert, wobei die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz gemessen wird.

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen den durch diverse Oxidantien induzierten oxidativen Stress in Fibroblasten, welcher mittels der DCF-Methode detektiert wurde. Untersucht wurde auch der Einfluss einer Langzeit- bzw.

Kurzzeitvorinkubation bzw. Präkonditionierung der Fibroblasten mit rhuEPO vor der nachfolgenden Inkubation mit den Oxidantien, sowie der direkte Effekt von rhuEPO bei gleichzeitiger Inkubation mit den Oxidantien. RhuEPO wurde dabei in einem Konzentrationsbereich von 1,1 - 6,6U/ml eingesetzt. Alle Versuche wurden mit verschiedenen Fibroblasten-Zelllinien, die von gesunden Probanden und von Patienten mit Friedreich's Ataxia stammen, durchgeführt. Dabei wurden die Versuche jeweils in Parallelansätzen mit Kontroll- und Patienten Zelllinien durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien waren CoFib1 und zweimal CoFib2, sowie FAFib1, FAFib2 und FAFib5. Die Gesamtauswertung gibt jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM der mit allen Kontroll- und Patienten-Fibroblasten durchgeführten Experimente wieder, die jeweils in drei unabhängigen Experimenten im Dreifachansatz, gemessen wurden.

4.1.1.1 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den basalen, oxidativen Stress in Fibroblasten

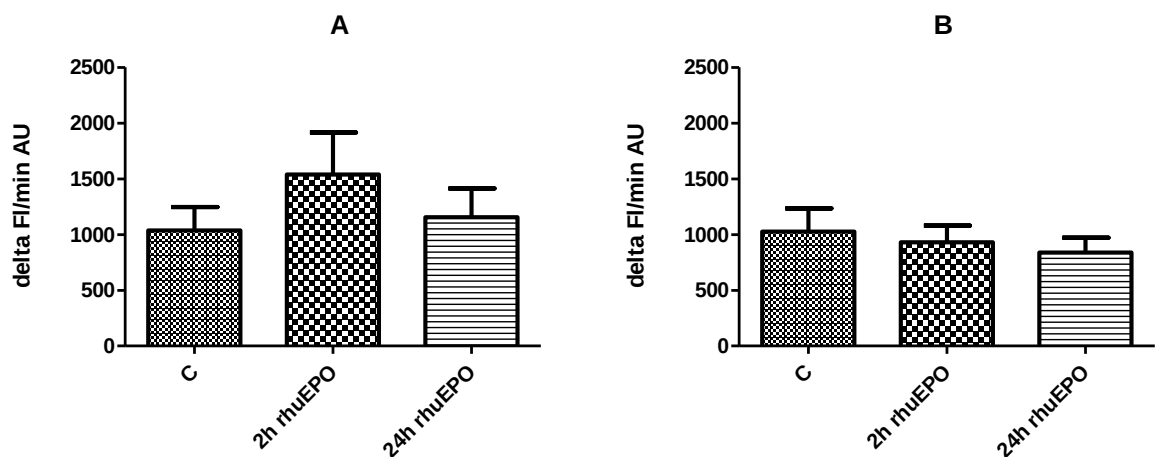


Abbildung 7: Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf den basalen, oxidativen Stress in Fibroblasten; DCF-Methode

CoFib (A) und FAFib (B) wurden zwei und 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO in komplettiertem DMEM, bzw. mit komplettiertem Medium alleine (C, Kontrolle) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein beladen. Anschließend wurden die Zellen mit nicht komplementiertem DMEM ohne Phenolrot + 20 mmol/L HEPES inkubiert und die Intensität der Fluoreszenz des gebildeten DCF bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 90 Minuten bei konstanter Temperatur von 37°C in 15-Minuten-Intervallen gemessen. Gezeigt ist der mittlere Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (Mittelwert $\pm$ SEM, n=9).

Wie aus Abbildung 6, Graphik A, zu sehen ist, führt die zweistündige Vorinkubation mit rhuEPO zu einer Steigerung im basalen, oxidativen Stress in Kontroll-Fibroblasten. Eine Signifikanz ist jedoch nicht gegeben. Auch bei den FA-Fibroblasten führt die Vorinkubation mit rhuEPO zu keiner signifikanten Veränderung im oxidativen Stress (Abbildung 6B).

4.1.1.2 Einfluss von FAS auf den basalen, oxidativen Stress

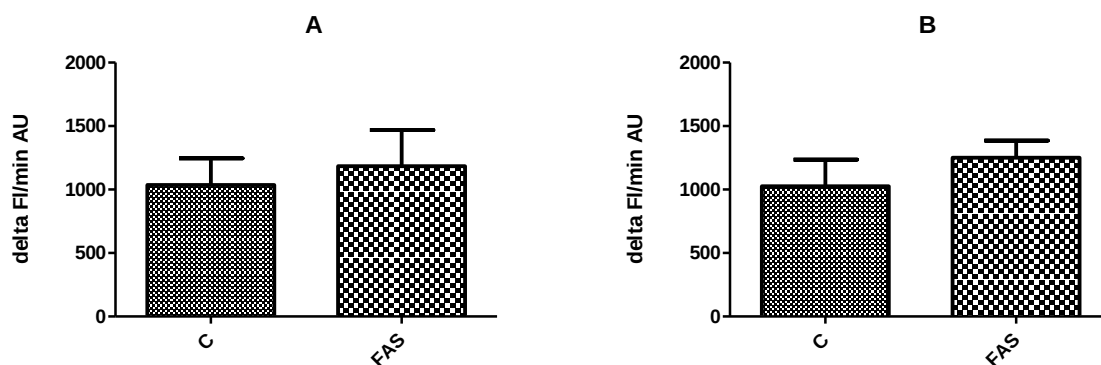


Abbildung 8: Einfluss von Eisenammoniumsulfat (FAS) auf den basalen oxidativen Stress in Fibroblasten; DCF-Methode

Kontroll-Fibroblasten und FA-Fibroblasten wurden mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein beladen. Danach wurden die Zellen mit 100 μ M Eisenammoniumsulfat (FAS) in nicht komplementiertem DMEM ohne Phenolrot, 20 mmol/L HEPES bzw. mit dem Medium alleine (Kontrolle) inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz von DCF erfolgte bei einer

Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 90 Minuten bei konstanter Temperatur von 37°C in 15-Minuten-Intervallen. Gezeigt ist der mittlere Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (Mittelwert $\pm$ SEM, n=9).

Durch Gabe von FAS, wie aus der Abbildung 7 ersichtlich ist, wird die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, die sich zusätzlich auf den basalen oxidativen Stress ausüben, gefördert. Diese Unterschiede sind jedoch weder in Kontroll- noch in FA-Fibroblasten signifikant.

4.1.1.3 Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf die durch Oxidantien induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten

4.1.1.3.1 Tert-butylhydroperoxid (TBH)

TBH ist membrangängiges Oxidans, welches in diversen Zelllinien zur Erzeugung von oxidativem Stress Verwendung findet. In U937-Zellen, HepG2-Zellen, Kardiomyozyten und Hepatozyten wurde nachgewiesen, dass TBH den Zelltod induziert [SARDAO et al., 2007].

Erst einmal in den Zellen, generiert TBH tert-butoxyl-Radikale, welche die Zellviabilität durch Apoptose oder Nekrose herabsetzen [PANASENKO et al., 2005].

Zu den häufigsten physiologischen Änderungen gehören Lipidperoxidation, Depletion von intrazellulärem reduziertem Glutathion, Modifizierung von Protein-Thiolen und zytosolische Kalziumderegulation.

In der Studie von Sardao et al. konnte gezeigt werden, dass nach einer einstündigen Inkubation mit 50 μ M TBH die Oxidation der DCF-Sonde, die auf intrazellulären oxidativen Stress hinweist, in der Myoblastenzelllinie H9c2, induziert wurde. Weiters wurde berichtet, dass nach einer sechsständigen Inkubation mit 50 μ M und 100 μ M TBH Zelltod und Zellablösung aufgetreten sind [SARDAO et al., 2007].

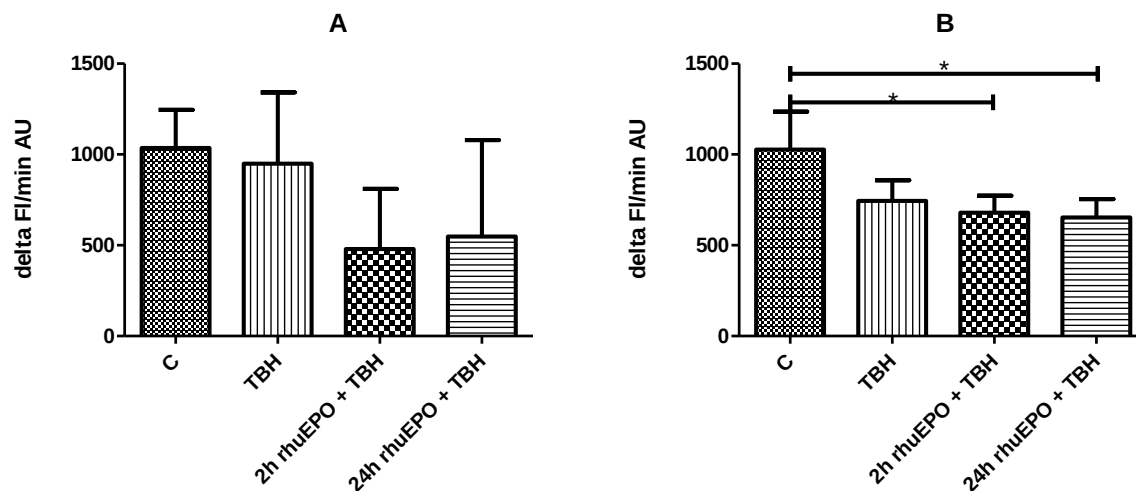


Abbildung 9: Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; Messung mittels DCF-Methode

CoFib (A) und FAFib (B) wurden zwei und 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit nicht fluoreszierendem Dichlorofluorescein beladen. Danach wurden die gewaschenen Zellen mit 100 μ M TBH in nicht komplettiertem DMEM ohne Phenolrot, 20mM HEPES inkubiert. Als Kontrolle (C) diente nicht komplementiertes DMEM ohne Phenolrot + 20 mmol/L HEPES. Die Messung der Fluoreszenz von DCF erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 90 Minuten bei konstanter Temperatur von 37°C in 15-Minuten-Intervallen. Gezeigt ist der mittlere Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (Mittelwert $\pm$ SEM, n=9). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,5$) angegeben.

Wie aus der Abbildung 8 zu entnehmen ist, verändert der Zusatz von 100 μ M TBH den Mittelwert des basalen oxidativen Stress nicht signifikant. Die zwei- und 24-stündige Inkubation mit 6,6U/ml rhuEPO zeigt in beiden Zelllinien eine Verringerung der ROS – Bildung in Gegenwart von TBH. Jedoch untersteht das Ergebnis in den Kontrollfibroblasten keinem Signifikanzniveau. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch in Graphik B (FA-Fibroblasten) bei der zwei- und 24-stündigen Vorinkubation mit rhuEPO + TBH im Vergleich zum basalen oxidativen Stress der Kontrolle gegeben.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass TBH zu keiner signifikanten Veränderung im oxidativen Stress führt könnte daran liegen, dass die Zellen in der Zellkultur bereits erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind [HALLIWELL, 2003].

4.1.1.3.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wasserstoffperoxid wird in Zellkultur-Experimenten häufig verwendet, um oxidativen Stress auszulösen. Die Größe des dadurch intrazellulär induzierten oxidativen Stress hängt dabei wesentlich von der antioxidativen Kapazität der untersuchten Zellen ab. Für Messungen von intrazellulärem H_2O_2 werden Methoden auf der Grundlage von Dihydrokomponenten, wie 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein, das nach Oxidation fluoresziert, wegen ihrer Empfindlichkeit und Einfachheit, verwendet. Allerdings reagieren diese Sonden neben H_2O_2 auch mit einer Vielzahl von anderen zellulären Oxidantien, wie Stickoxid, Peroxynitrit und Hypochlorit. Sonden, wie Peroxy Green 1 (PG1) und Peroxy Crimson 1 (PC1), die bei H_2O_2 -spezifischer Entfernung einer Boronatgruppe, anstatt eher bei unspezifischer Oxidation, fluoreszieren, wurden erst kürzlich für eine selektive Messung von H_2O_2 in den Zellen entwickelt [MILLER et al., 2007], [RHEE et al., 2010].

H_2 -DCF kann entweder mittels H_2O_2 in Reaktionen, die durch Fe^{2+} und Fe^{3+} katalysiert werden, oder durch die in den Zellen vorhandenen Peroxidasen oxidiert werden. Die Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD) ist ein wichtiger intrazellulärer Katalysator der H_2 -DCF Oxidation [KIM et al., 2006].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Langzeit- bzw. Kurzzeitinkubation (24- bzw. 2-stündige Präinkubation) mit rhuEPO die Empfindlichkeit von Kontroll- bzw. FA-Fibroblasten gegenüber Wasserstoffperoxid beeinflusst. Die Bildung von intrazellulärem oxidativem Stress wurde dabei mittels DCF-Methode detektiert.

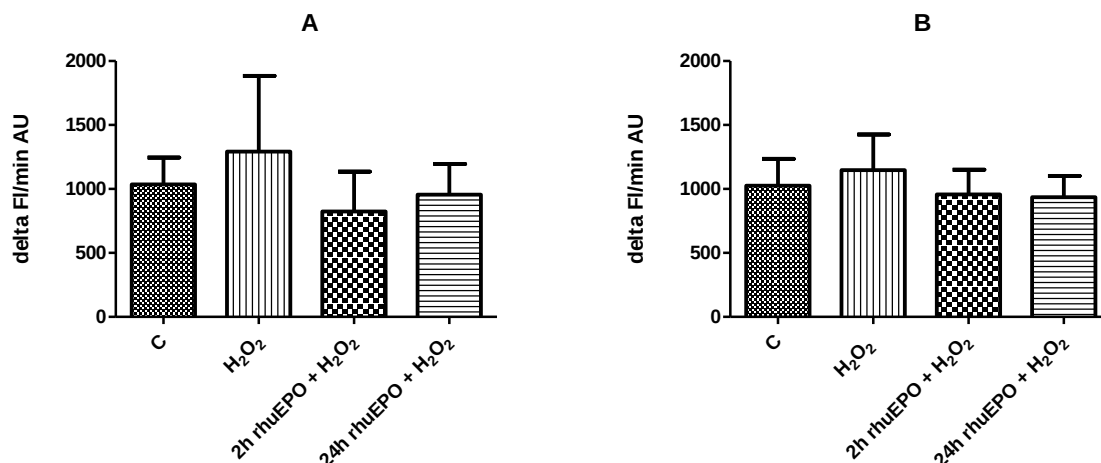


Abbildung 10: Einfluss der Vorinkubation von rhuEPO auf die durch H₂O₂ verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode

CoFib (A) und FAFib (B) wurden zwei bzw. 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO in komplementiertem DMEM vorinkubiert. Die Kontrollen wurden parallel mit Medium alleine inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein beladen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM H₂O₂ in nicht komplementiertem DMEM ohne Phenolrot, 20 mmol/L HEPES inkubiert. Die Kontrollen wurden mit Medium alleine inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz von DCF erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 90 Minuten bei konstanter Temperatur von 37°C in 15-Minuten-Intervallen. Gezeigt ist der mittlere Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (Mittelwert ±SEM, n=9).

Aus Abbildung 9 ist zu erkennen, dass, im Gegensatz zu TBH, H₂O₂ den basalen oxidativen Stress in den CoFib (A), sowie geringfügig weniger in FAFib (B) nicht signifikant erhöht. Sowohl eine zwei- als auch eine 24-stündige Vorinkubation mit rhuEPO zeigt eine nicht signifikante Verringerung der durch H₂O₂ bedingten Radikalbildung.

Auch hier ist eine mögliche Erklärung, dass H₂O₂ zu keiner signifikanten Veränderung im oxidativen Stress führt, dass die Zellen in der Zellkultur bereits erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind [HALLIWELL, 2003].

4.1.2 Direkter Einfluss von rhuEPO auf die durch TBH bedingte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Im Gegensatz zur Vorinkubation bzw. Präkonditionierung mit rhuEPO sollen diese Versuchsreihen zeigen, ob rhuEPO einen direkten Einfluss auf die Entstehung von oxidativem Stress durch Oxidantien hat. Dazu wurden Kontroll- und FA-Fibroblasten zuerst mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein beladen. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit 100µM TBH koinkubiert, während die Bildung von DCF gemessen wurde. Diese Versuchsreihe sollte einerseits den direkten Einfluss von rhuEPO auf den basalen oxidativen Stress und andererseits eine mögliche direkte Wechselwirkung von rhuEPO auf die Wirkung von TBH und die damit assoziierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zeigen.

4.1.2.1 6,6U/ml rhuEPO

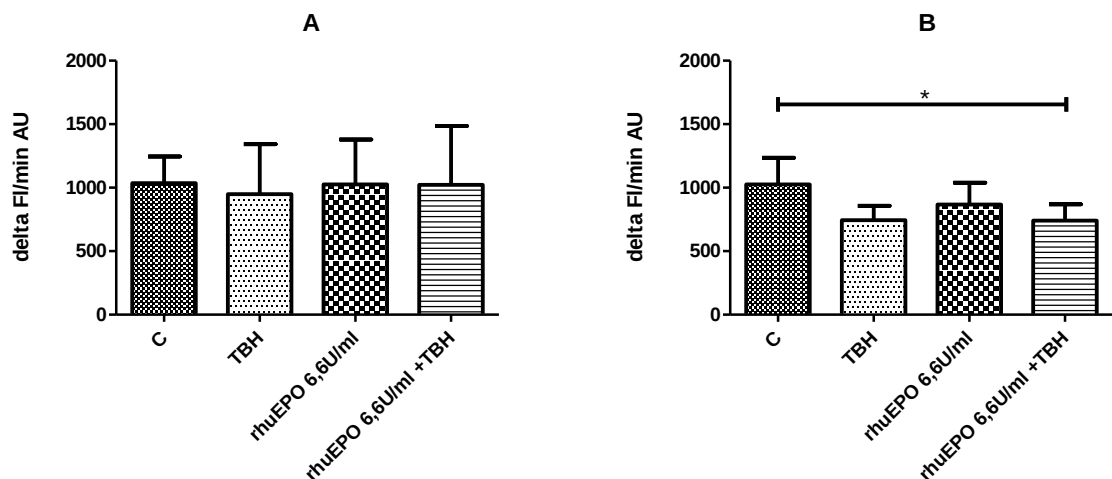


Abbildung 11: Einfluss von 6,6U/ml rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode

4.1.2.2 3,3U/ml rhuEPO

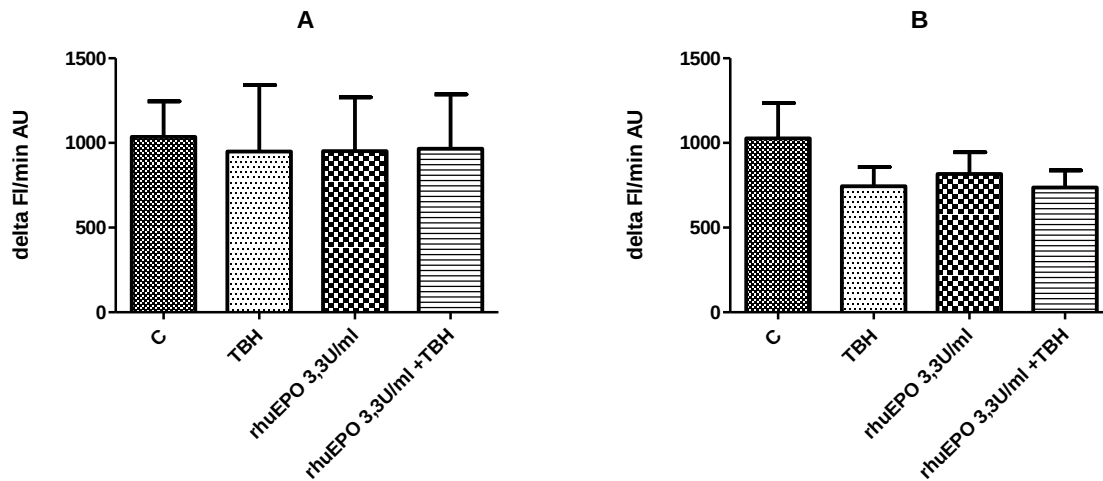


Abbildung 12: Einfluss von 3,3U/ml rhuEPO auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode

4.1.2.3 1,1U/ml rhuEPO

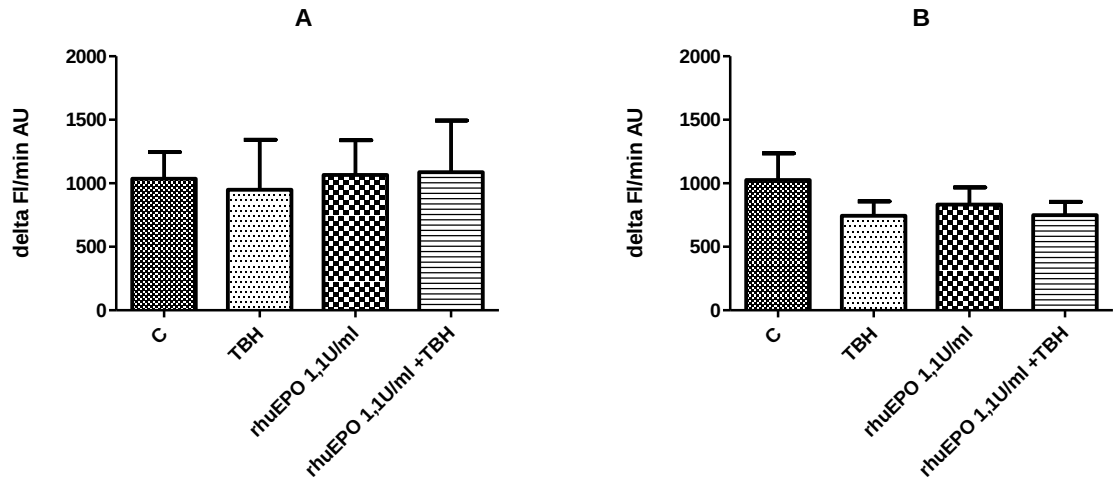


Abbildung 13: Einfluss von rhuEPO 1,1U/ml auf die durch TBH verursachte ROS – Produktion in Fibroblasten; DCF-Methode

In 4.2.1.1 bis 4.2.1.3 sind jeweils in Graphik A die Ergebnisse mit CoFib und in Graphik B die Ergebnisse mit FAFib gezeigt. RhuEPO wurde in den jeweiligen Konzentrationen direkt vor Beginn der DCF-Messung auf die vorher mit Dichlorofluorescein beladenen Zellen gegeben. Bei einem Teil der Zellen wurde noch zusätzlich mit 100 μ M TBH ebenfalls unmittelbar vor der Messung ko-inkubiert. Alle Inkubationen erfolgten in nicht komplementiertem DMEM ohne Phenolrot, 20 mmol/L HEPES. Die Messung der Intensität der Fluoreszenz von DCF erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 90 Minuten bei konstanter Temperatur von 37°C in 15-Minuten-Intervallen. Die einzige Signifikanz wurde mit * ($p=0,0496$) gekennzeichnet. Gezeigt ist der mittlere Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (Mittelwert $\pm$ SEM, $n=9$).

In den Abbildungen 10 bis 12 zeigen die Graphiken A keine signifikanten Unterschiede. Weder TBH, rhuEPO noch rhuEPO in den unterschiedlichen Konzentrationen in Kombination mit TBH zeigen bei der DCF-Methode einen Effekt auf den zellulären oxidativen Stress. Die Friedreich's Ataxie-Zellen

(Graphik B, Abbildung 10) zeigt hingegen einen schwach signifikanten Unterschied ($p=0,0496$) bei rhuEPO mit Koinkubation mit TBH im Vergleich zur Kontrolle. Aus den Abbildungen 11 und 12, Graphik B ist keine Signifikanz gegeben.

Wie aus den oben durchgeführten Versuchen ersichtlich ist, zeigt die Bewertung des oxidativen Stress in Zellen mit der DCF-Methode eine hohe Streuung. Nicht nur, dass die erhaltenen Resultate bei Messungen innerhalb derselben Zelllinie Abweichungen zeigen, es divergieren auch die Fluoreszenzmessungen stark bei den verschiedenen Zelllinien. Wegen der großen Streuung der Messergebnisse mit der DCF-Methode kann davon ausgegangen werden, dass Dichlorodihydrofluorescein empfindlich auf verschiedene Störfaktoren reagiert.

So konnte in der Studie von Balcerczyk et al. gezeigt werden, dass *in vitro* der membrangängige, lipophile Eisenchelator Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon (SIH) abhängig von der Gegenwart von Fe^{2+} die Oxidation bedingt durch H_2O_2 in den Proben verringert. Dabei zielten die Autoren auf die Frage, ob der labile Eisen-Pool eine Rolle bei der Oxidation von H_2 -DCF in zellulären Systemen spielt. Balcerczyk et. al konnten nachweisen, dass in chinesischen Hamsterfibroblasten V79 und in den Lymphomzellen von Mäusen L5178Y (LY) die Oxidation von H_2 -DCF bei der Gabe von SIH verringert wurde. Eine Unterteilung der Lymphomzellen in Unterlinien (LY-R und LY-S), zeigte ebenfalls, dass LY-R, die Zelllinie mit dem höheren Gehalt an labilem Eisen, durch SIH eine höhere Inhibierung der Oxidation erfahren hat [BALCERCZYK et al., 2007].

Weiters können mit der DCF-Methode, da die Zellen vor der Inkubation mit Radikalbildnern zuerst mit H_2 -DCF-DA beladen werden müssen, wegen der Instabilität des Fluorophors keine Langzeitinkubationen durchgeführt werden.

Daher wurde in weiterer Folge nach Methoden, wie z.B. der Resazurin-Methode und dem MTT-Test gesucht, die Langzeitinkubationen ermöglichen.

4.1.3 Beeinflussung des basalen, oxidativen Stress durch die Vorinkubation mit rhuEPO; Resazurin - Methode

Die nachfolgenden Experimente behandeln dieselbe Thematik und Fragestellung wie die oben diskutierten. Der einzige Unterschied liegt in der Methode der Detektion der Auswirkung von oxidativem Stress. Wurde in den vorher beschriebenen Versuchen mit der DCF-Methode gearbeitet, wurde hier die Resazurin-Methode verwendet, bei der der Einfluss von oxidativem Stress auf die metabolische Aktivität der Zellen untersucht wird. Bei den Versuchen bei denen die DCF-Methode verwendet wurde, wurde ersichtlich, dass die Messwerte eine hohe inter- und intra-Assay Streuung aufgewiesen haben, wodurch diese Methode als nicht sehr zuverlässig und reproduzierbar einzustufen ist. Wie die folgenden Versuche zeigen, liegt die inter- und intra-Assay Streuung bei der Resazurin-Methode deutlich niedriger. Aus den nachfolgenden Versuche ist auch ersichtlich, dass die metabolische Aktivität in den Friedreich's Ataxie-Zellen niedriger ist, als in den Kontrollzellen, was auf einen erhöhten basalen oxidativen Stress hinweisen könnte.

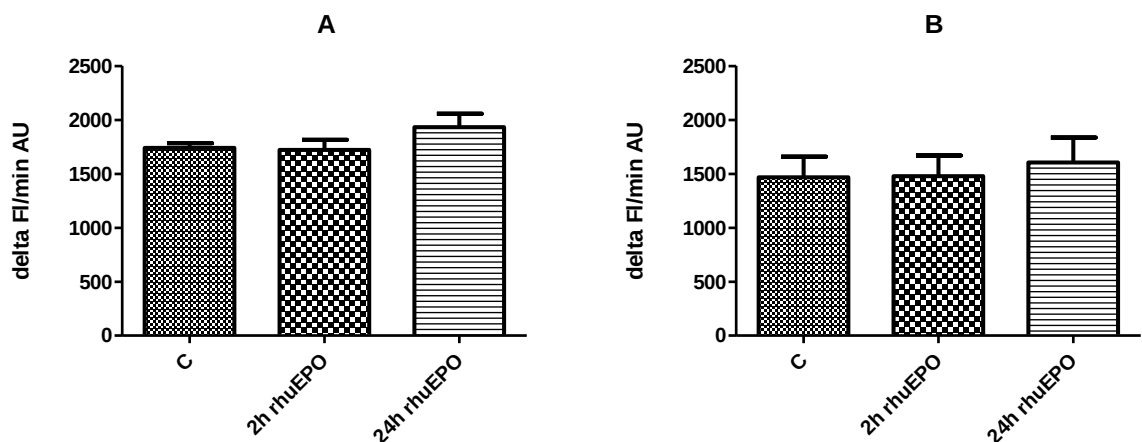


Abbildung 14: Einfluss der Vorinkubation mit rhuEPO auf basale metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin – Methode

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils mit 6,6U/ml rhuEPO zwei und 24 Stunden vorinkubiert und die metabolische Aktivität mittels der Resazurin-Methode bestimmt. Als Kontrolle (C) diente komplementiertes DMEM mit Phenolrot + 20mmol/L HEPES. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM (n=3).

Wie aus der Abbildung 13 zu sehen ist, bewirkt weder die zweistündige noch die 24-stündige Vorinkubation mit rhuEPO eine signifikante Beeinflussung der basalen metabolischen Aktivität in den Fibroblasten, verglichen mit der Kontrolle (ohne rhuEPO). Aus Abbildung 13 ist ebenfalls zu entnehmen, dass die basale metabolische Aktivität in den Friedreich-Ataxie Zellen (B) geringfügig gegenüber der Kontrolle (A) erniedrigt ist.

4.1.3.2 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von TBH

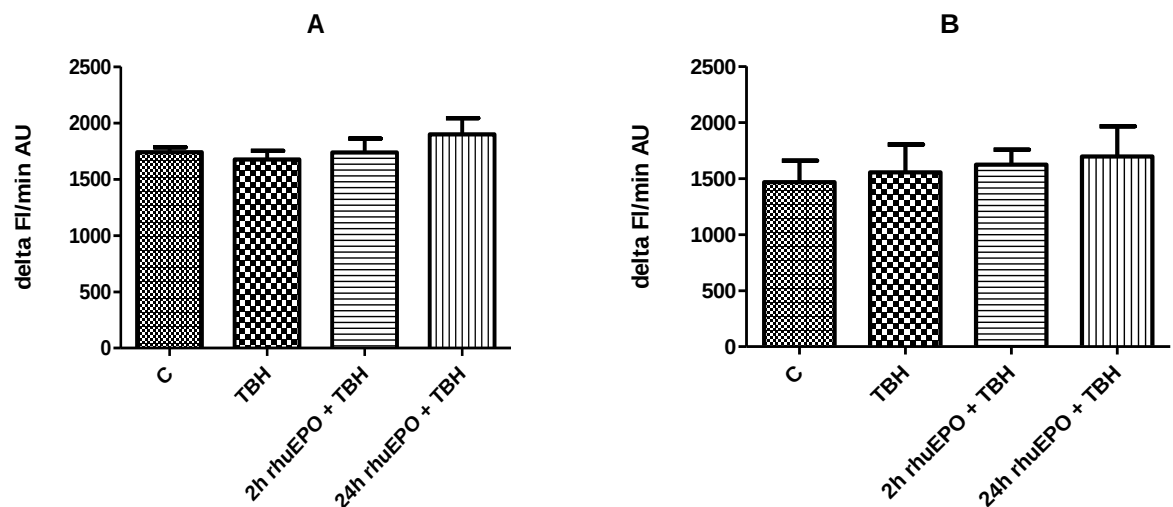


Abbildung 15: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von TBH

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils mit 6,6U/ml rhuEPO zwei bzw. 24 Stunden vorinkubiert. Das in diesem Versuch verwendete Tert-butylhydroperoxid (TBH) hatte eine Konzentration von 100 μ M und wurde unmittelbar vor der Messung hinzugefügt. Dabei wurde TBH ebenfalls allein in komplementiertem DMEM mit Phenolrot gemessen, um als Referenzwert zu dienen. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Werte entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM (n=3).

Aus Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass weder TBH alleine, noch eine zwei- bzw. 24-stündige Vorinkubation mit rhuEPO eine signifikante Änderung der metabolischen Aktivität bewirkt. Die Resazurin-Methode zeigt ein

unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zur DCF-Messung (siehe 4.1.1.3.1, Abbildung 8B).

4.1.3.3 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Wasserstoffperoxid

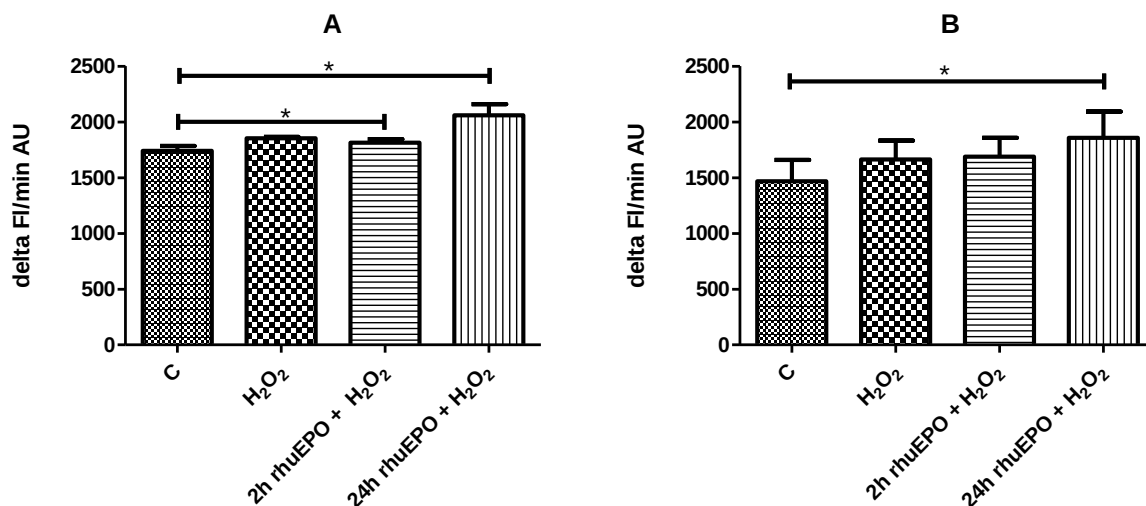


Abbildung 16: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von H₂O₂

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils zwei und 24 Stunden mit rhuEPO in der Konzentration von 6,6U/ml vorinkubiert bzw. präkonditioniert. Bei der Kontrolle handelt es sich um komplementiertes DMEM mit Phenolrot. H₂O₂ wurde in der Konzentration von 50 µM verwendet und direkt vor Beginn der Messung hinzugefügt. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Werte entsprechen den Mittelwerten ± SEM (n=3). Die in diesem Versuch erhaltenen Signifikanzen sind mit * (p<0,5) angegeben.

Graphik A der Abbildung 15 zeigt einen signifikanten Unterschied der zwei- und 24-stündig vorinkubierten Fibroblasten mit 6,6U/ml rhuEPO und der Gabe von

H₂O₂ in Bezug auf die Kontrolle, jedoch nicht in Bezug auf H₂O₂. Graphik B zeigt hingegen lediglich einen signifikanten Unterschied der 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO vorinkubierten Fibroblasten und der Gabe von H₂O₂ in Bezug zur Kontrolle. Im Vergleich zur Messung mittels DCF stellt dieses Ergebnis einen Unterschied dar (siehe 4.1.1.3.2, Abbildung 9).

4.1.3.4 Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Eisenammoniumsulfat

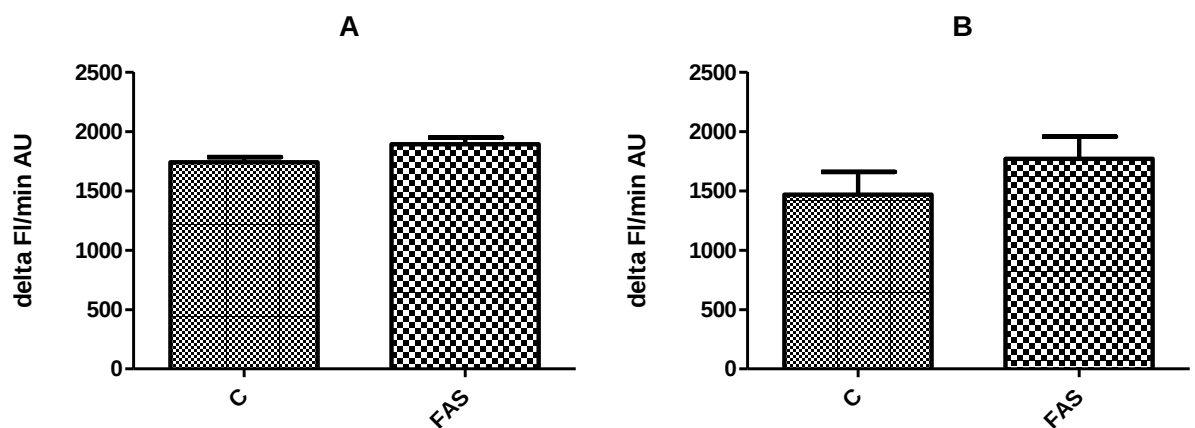


Abbildung 17: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die metabolische Aktivität in Gegenwart von Eisenammoniumsulfat

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils mit zwei und 24 Stunden rhuEPO in der Konzentration von 6,6U/ml vorinkubiert bzw. präkonditioniert. Die Kontrolle wurde mit komplementiertem DMEM mit Phenolrot inkubiert. FAS, in der Konzentration von 100 µM, wurde direkt vor der Messung hinzugegeben. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten ± SEM (n=3).

Wie aus beiden Graphiken A und B der Abbildung 16 ersichtlich ist, stellt sich in Bezug auf die metabolische Aktivität kein signifikanter Unterschied dar.

4.1.3.5 Direkter Einfluss von rhuEPO auf die durch TBH verursachte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die nachfolgenden drei Versuche sollen den direkten Einfluss von rhuEPO auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, durch 100 μ M Tert-Butylhydroperoxid (TBH), in Fibroblasten zeigen. Dabei alterniert lediglich die Konzentration des verwendeten rhuEPO. Die verwendeten Konzentrationen an rhuEPO betragen in diesen Versuchen 6,6U/ml, 3,3U/ml und 1,1U/ml.

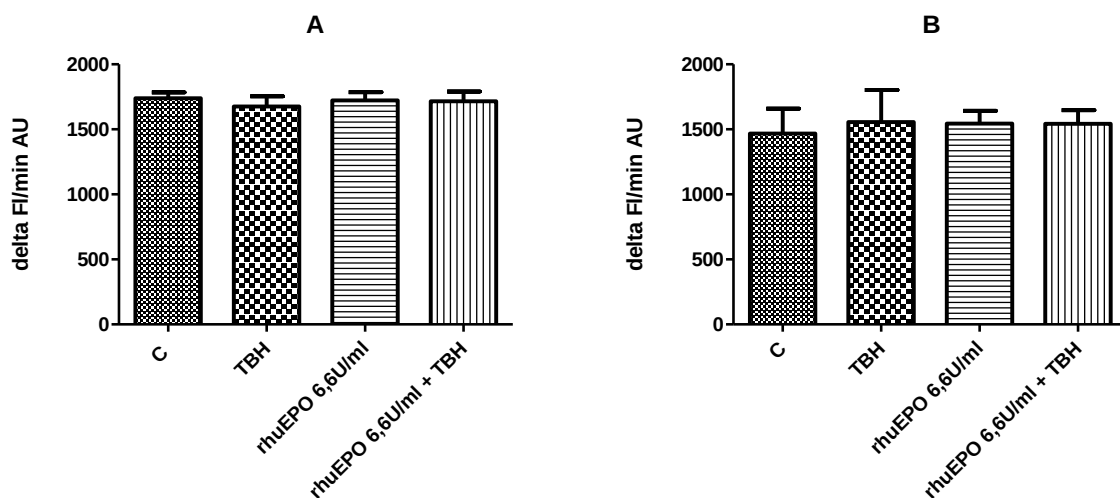


Abbildung 18: Direkter Einfluss von rhuEPO 6,6U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin - Methode

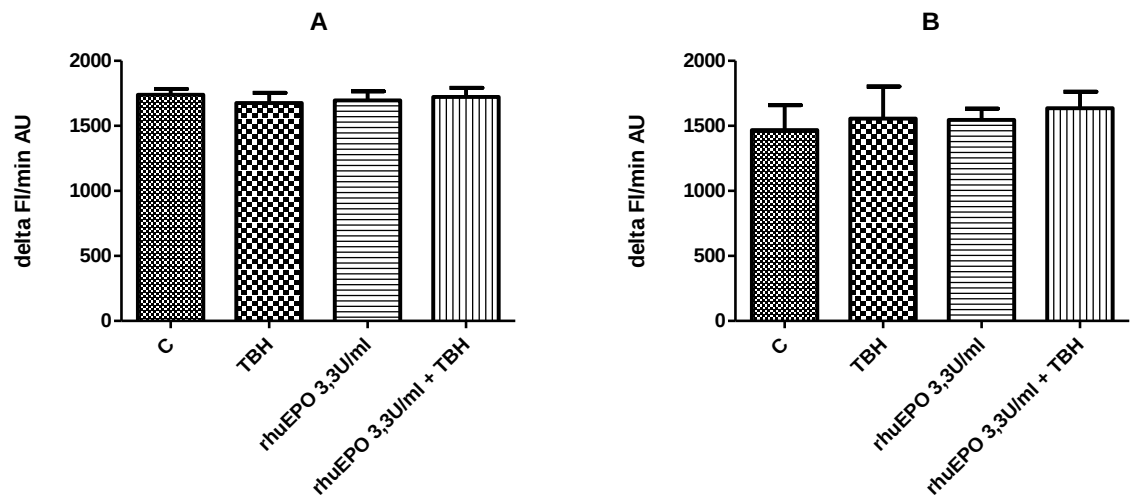


Abbildung 19: Direkter Einfluss von rhuEPO 3,3U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin - Methode

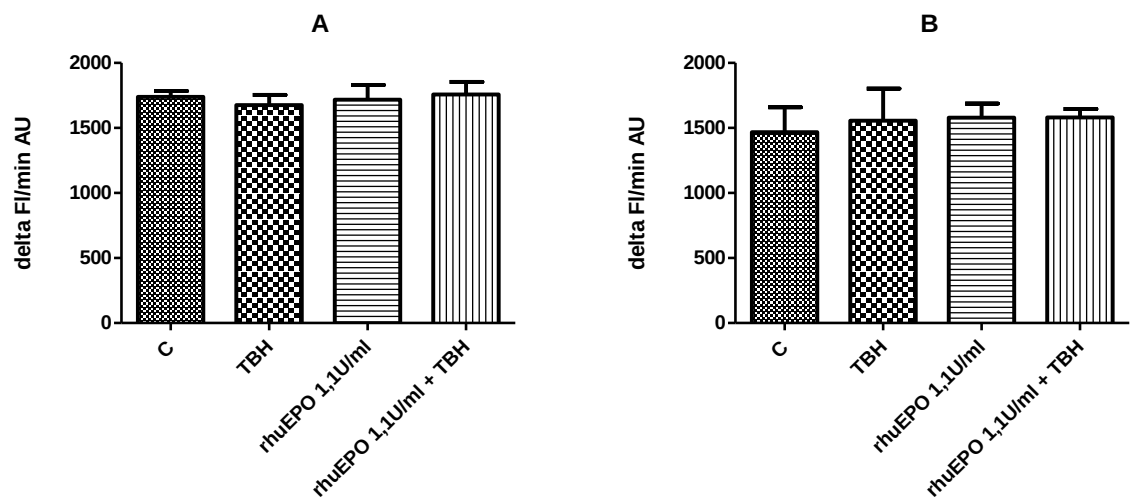


Abbildung 20: Direkter Einfluss von rhuEPO 1,1U/ml auf die durch TBH induzierten reaktiven Sauerstoffspezies in Fibroblasten; Resazurin - Methode

Zu CoFib1 (A) und FAFib 2 (B) wurde unmittelbar vor Beginn der Messung rhuEPO in den unterschiedlichen Konzentrationen, sowie 100 μ M TBH hinzugefügt. Als Kontrolle wurde nicht komplementiertes DMEM ohne Phenolrot + 20 mmol/L HEPES verwendet. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten $\pm$ SEM (n=3).

In den Abbildungen 17 bis 19 zeigt sich in keiner der untersuchten rhuEPO-Konzentrationen, weder bei den CoFib1, noch bei den FAFib2, sowie mit TBH ein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zu den Ergebnissen die mit der DCF-Methode (siehe dazu 4.1.2.1, Abbildung 10 B) erhalten wurden, zeigt sich in Abbildung 10 ein schwach signifikanter Unterschied, mit einem $p=0,0496$.

Zusammenfassend ergibt sich daher aus den bisher gezeigten Ergebnissen mit Resazurin, dass weder die Radikalbildner, noch rhuEPO einen Einfluss auf die metabolische Aktivität zeigen. In weiterer Folge wurden daher die Inkubationszeiten mit den Radikalbildnern erhöht.

4.1.4 Einfluss einer Präinkubation mit rhuEPO auf die Auswirkungen von Radikalbildnern in Fibroblasten

Die folgenden Versuche sollen den Effekt einer Präinkubation mit rhuEPO auf die Auswirkungen einer Langzeitinkubation mit Radikalbildner, wie Tert-butylhydroperoxid (TBH), sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die metabolische Aktivität der Fibroblasten, und damit einen Hinweis auf Schädigung durch oxidativen Stress zeigen.

4.1.4.1 Tert-Butylhydroperoxid (TBH)

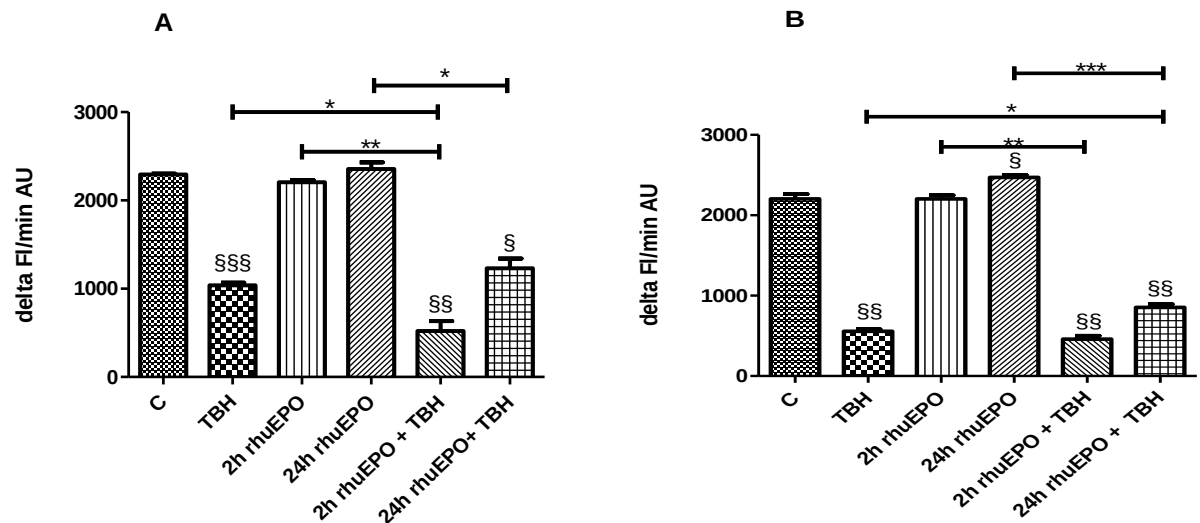


Abbildung 21: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die Auswirkungen von TBH auf die metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin - Methode

CoFib (A) und FAFib (B) wurden zuerst entweder zwei oder 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO vorinkubiert und anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 μ M TBH für 20 Stunden. Anschließend wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3). Die Signifikanzen in diesen Graphiken sind mit § (p<0,5), §§ (p<0,01) und §§§ (p<0,001) als Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet. Mit * (p<0,5), ** (p<0,01) und *** (p<0,001) werden die Signifikanzen zwischen den miteinander verbundenen Balken angegeben.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich ist, zeigen Kontrollfibroblasten als auch FAFib-Fibroblasten nach einer 20-stündigen Inkubation mit TBH eine verminderte metabolische Aktivität. Eine 2-stündige Präinkubation mit rhuEPO vor der Inkubation mit TBH zeigt auch keine Verbesserung der metabolischen Aktivität, verglichen mit, nicht mit rhuEPO vorinkubierten Fibroblasten. Es zeigt sich

sogar noch eine weitere signifikante Verringerung der metabolischen Aktivität, verglichen mit Zellen die nur mit TBH behandelt wurden. Ebenfalls ersichtlich ist, dass hingegen eine Präinkubation für 24 Stunden mit rhuEPO bei FA-Fibroblasten eine signifikante Verbesserung der metabolischen Aktivität bei TBH-Behandlung zeigen konnte.

Wurde der Effekt von TBH auf CoFib und FAFib auf die metabolische Aktivität in Abbildung 20 verglichen, zeigte sich eine signifikant reduzierte metabolische Aktivität in FAFib. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen überein, bei denen gezeigt wurde, dass FA-Patientenzellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress haben, verglichen mit Zellen von gesunden Probanden [STURM et al., 2005].

4.1.4.2 H₂O₂

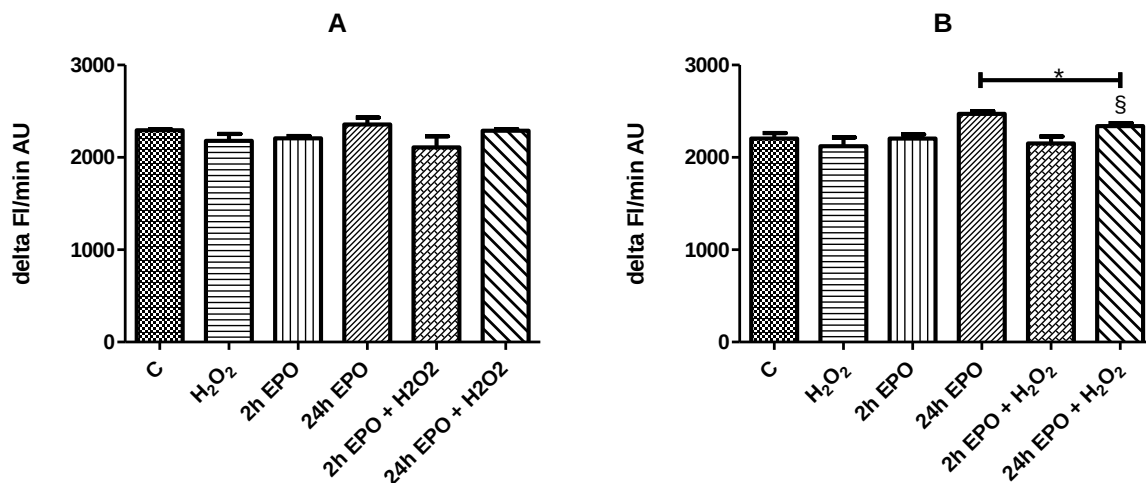


Abbildung 22: Einfluss einer Vorinkubation mit rhuEPO auf die Wirkung von H₂O₂ auf die metabolische Aktivität in Fibroblasten; Resazurin - Methode

CoFib 1 (A) und FAFib 2 (B) wurden zuerst entweder zwei oder 24 Stunden mit 6,6U/ml rhuEPO vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µM H₂O₂ für 20 Stunden. Danach wurde die metabolische Aktivität mittels Resazurin-Methode gemessen. Die

Fluoreszenzmessung erfolgte dabei bei einer Anregungswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm in 15-Minuten-Intervallen über einen Zeitraum von 165 Minuten bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3). Die Signifikanz in Graphik B ist mit § ($p < 0,5$) als Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet. Mit * ($p < 0,5$) werden die Signifikanzen zwischen den miteinander verbundenen Balken angegeben.

Abbildung 21 zeigt, dass durch Inkubation mit 50 μ M H₂O₂ kein signifikanter Unterschied zur basalen metabolischen Aktivität in den Fibroblasten zu beobachten ist. Ein signifikanter Unterschied ist lediglich in Graphik B bei 24 Stunden Vorinkubation mit rhuEPO mit und ohne anschließender Inkubation mit 50 μ M H₂O₂ gegeben.

Eine Erklärung für das Fehlen eines Effektes nach 20-stündiger Inkubation der Zellen mit H₂O₂, könnte in der geringen Stabilität von H₂O₂ im Inkubationsmedium liegen.

4.1.5 Einfluss einer Präinkubation mit rhuEPO auf die mittels MTT-Test gemessene Stoffwechselaktivität in Gegenwart von Oxidantien

Die nachfolgenden Versuche zeigen wieder den Einfluss von zwei- bzw. 24-stündiger Vorinkubation mit rhuEPO und anschließender Langzeitinkubation mit verschiedenen Oxidantien auf die Stoffwechselaktivität in Fibroblasten. Um die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten zu beurteilen wurde in den nachfolgenden Versuchen der MTT-Test verwendet.

4.1.5.1 Einfluss von TBH und rhuEPO auf den oxidativen Stress

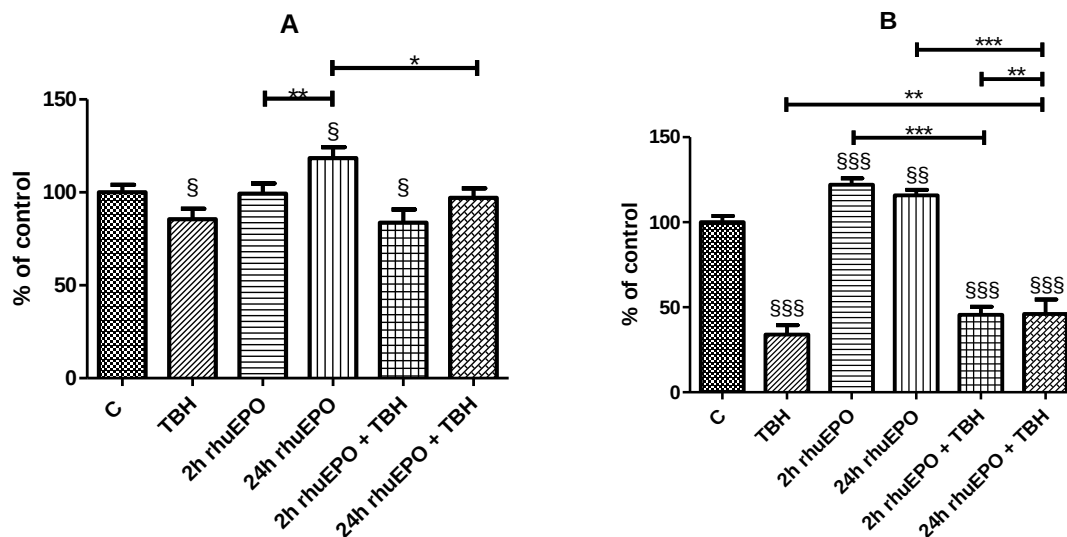


Abbildung 23: Einfluss von rhuEPO und TBH auf die Stoffwechselaktivität in Fibroblasten; MTT - Test

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils entweder für zwei oder 24 Stunden mit rhuEPO in der Konzentration von 6,6U/ml vorinkubiert. Die Kontrolle (C) wurde nur mit komplementiertem DMEM mit Phenolrot inkubiert. Anschließend wurden die Zellen noch $\pm 100 \mu\text{M}$ TBH für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Stoffwechselaktivität mittels MTT-Test gemessen. Die Signifikanzen in diesen Graphiken sind mit § ($p<0,5$), §§ ($p<0,01$) und §§§ ($p<0,001$) als Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet. Mit * ($p<0,5$), ** ($p<0,01$) und ***

($p < 0,001$) werden signifikante Unterschiede zwischen den verbundenen Balken angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM in Prozent der Kontrolle ($=100\%$), ($n=3$).

In Abbildung 22 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen CoFib1 und FAFib2 im Hinblick auf die Wirkung von TBH auf die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten. Bei den Friedreich's Ataxie-Zellen ist durch TBH die Stoffwechselaktivität, hoch signifikant, stärker erniedrigt, als bei den Kontrollzellen in Graphik A. In Graphik B zeigt eine Vorinkubation für zwei bzw. für 24 Stunden mit rhuEPO eine signifikante Verbesserung der Stoffwechselaktivität der FA-Fibroblasten. Hingegen ist dieser Effekt in Graphik A nur nach 24 Stunden Präinkubation mit rhuEPO in den Kontrollfibroblasten zu beobachten. Im Vergleich zu nur mit TBH behandelten Fibroblasten, zeigen FA-Fibroblasten die mit rhuEPO für 24 Stunden vorinkubiert wurden eine signifikante Verbesserung der Stoffwechselaktivität im MTT-Test.

Das Ergebnis vom MTT-Test stimmt mit dem Ergebnis von der Resazurin-Methode überein: auch hier zeigen die FAFib nach TBH Behandlung eine signifikant geringere metabolische Aktivität, verglichen mit CoFib. Dies ist auch in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [STURM et al., 2005].

4.1.5.2 Einfluss von H_2O_2 und rhuEPO auf die Stoffwechselaktivität (MTT-Test)

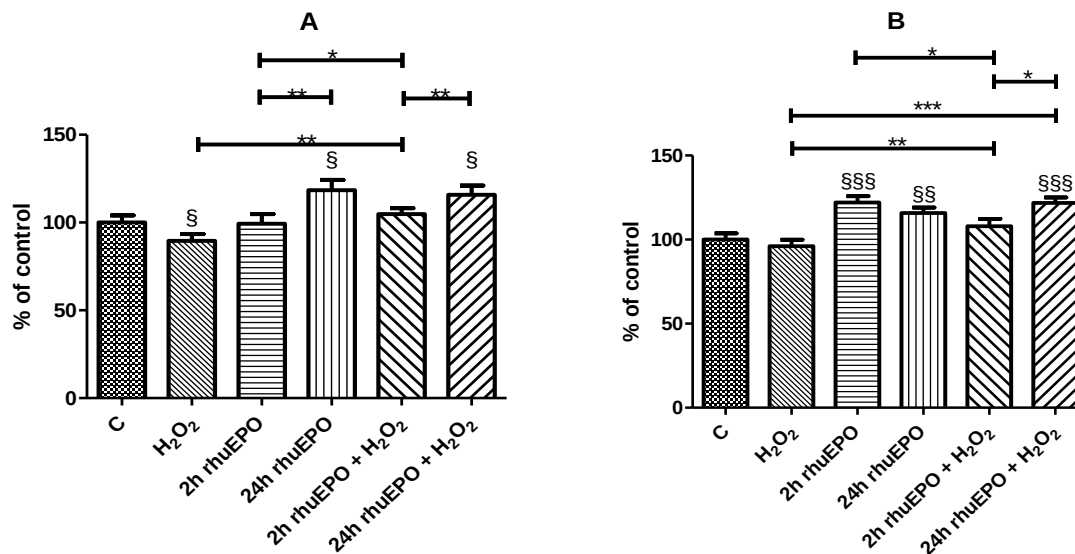


Abbildung 24: Einfluss von rhuEPO H_2O_2 auf die Stoffwechselaktivität von Fibroblasten; MTT - Test

CoFib1 (A) und FAFib2 (B) wurden jeweils entweder für zwei oder 24 Stunden mit rhuEPO in der Konzentration von 6,6U/ml vorinkubiert. Die Kontrolle (C) wurde mit komplementiertem DMEM mit Phenolrot alleine inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit $\pm 50 \mu\text{M}$ H_2O_2 für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Stoffwechselaktivität mittels MTT-Test gemessen. Die Signifikanzen in diesen Graphiken sind mit § ($p < 0,5$), §§ ($p < 0,01$) und §§§ ($p < 0,001$) als Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet. Mit * ($p < 0,5$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) werden die Signifikanzen der miteinander verbundenen Balken angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM in Prozent der Kontrolle ($=100\%$), ($n=3$).

In Abbildung 23, Graphik A, zeigt sich eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität nach 24-stündiger Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Die Vorinkubation mit rhuEPO (für 2 Stunden) verbessert signifikant die Stoffwechselaktivität der Kontroll-Fibroblasten nach H_2O_2 -Inkubation, verglichen mit Zellen die nur mit H_2O_2 inkubiert wurden. Graphik B zeigt noch zusätzlich einen signifikanten Unterschied zwischen H_2O_2 und 24 Stunden

Vorinkubation mit rhuEPO und H_2O_2 Inkubation. Bei den Kontrollfibroblasten verbessert nur eine 2-stündige Präinkubation der Zellen mit rhuEPO die Stoffwechselaktivität nach H_2O_2 Inkubation verglichen mit einer H_2O_2 Inkubation alleine.

Durch Inkubation mit H_2O_2 für 24 Stunden konnte nur bei den Kontrollfibroblasten eine schwache aber signifikante Verringerung der metabolischen Aktivität beobachtet werden, bei FAFib zeigte sich hingegen keine Veränderung der metabolischen Aktivität durch H_2O_2 . Auch hier ist anzunehmen, dass durch die lange Inkubationszeit H_2O_2 im Inkubationsmedium bereits abgebaut wurde.

4.2 Lichtabhängige Bildung von ROS in DMEM

In der Studie von Grzelak et al. konnte nachgewiesen werden, dass, neben anderen Zellkulturmedien, auch DMEM die Oxidation von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat (H_2 -DCF-DA) vermitteln kann. Die Produktion von ROS war dabei lichtabhängig. Die Hauptkomponente des Mediums, die in der Studie für die Bildung von ROS verantwortlich war, war Riboflavin [GRZELAK et al., 2001].

Die nachfolgenden Versuche sollen nicht nur die lichtabhängige ROS-Bildung untersuchen, sondern auch zeigen, ob ein Unterschied bei deren Detektion mittels H_2 -DCF-DA und H_2 -DCF herrscht.

4.2.1 Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung (Detektion mit H_2 DCFDA)

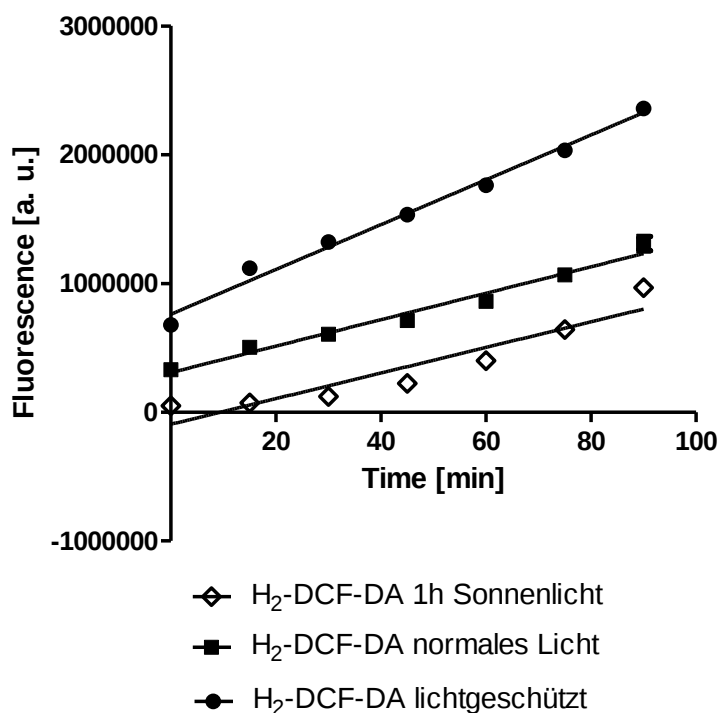


Abbildung 25: Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung in DMEM (Detektion mit H_2 DCFDA)

Bei den Zellkulturmedien handelte es sich um sterilfiltriertes, nicht komplementiertes DMEM ohne Phenolrot. Lichtgeschütztes DMEM: Das Medium wurde unter möglichst lichtarmen Bedingungen hergestellt. 1 h Sonnenlicht DMEM: Das Medium wurde vor der Messung eine Stunde direktem Sonnenlicht ausgesetzt. Normales Licht DMEM: Das Medium wurde bei normaler Laborbeleuchtung hergestellt (Leuchtstoffröhre + Tageslicht). Anschließend wurden Aliquots der Medien in 96-well-Platten pipettiert und $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ wurde in der Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ verwendet. Die Messung der Bildung von oxidiertem fluoreszierendem DCF erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm bei 37°C über einen Zeitraum von 90 Minuten in 15-Minuten-Intervallen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM ($n=1$). Manche Symbole sind größer als die Standardabweichungen.

4.2.2 Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung (Detektion mit H_2DCF)

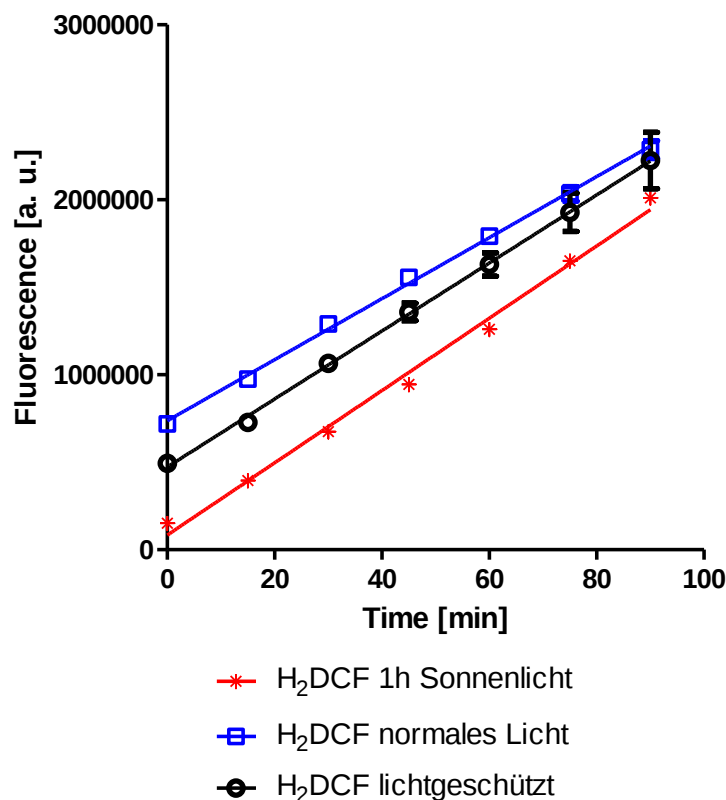


Abbildung 26: Messung der lichtabhängigen ROS-Bildung in DMEM (Detektion mit $\text{H}_2\text{-DCF}$)

Diazetatgruppen wurden zuerst abgespalten. H_2DCF wurde in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ verwendet. Ansonsten siehe Durchführung obige Legende.

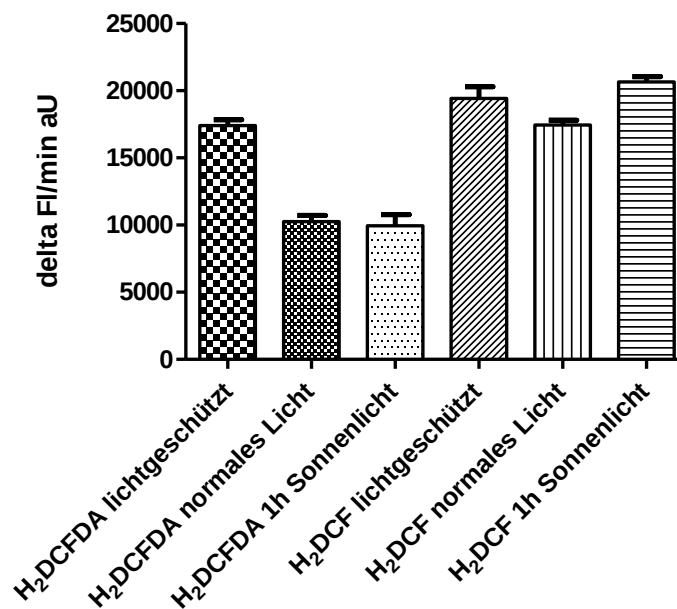


Abbildung 27: Lichtabhängige ROS-Produktion mit H₂DCFDA und H₂DCF

Wie aus den Abbildungen 24 bis 26 ersichtlich ist, ist bei hydrolysiertem DCF (H₂DCF) und nicht hydrolysiertem DCF (H₂DCFDA) kein lichtabhängiger Effekt auf die Bildung von fluoreszierendem DCF zu beobachten.

Diese Ergebnisse sind im Gegensatz zu der Studie von Grzelak et al., die einen lichtabhängigen Effekt gefunden haben [GRZELAK et al., 2001].

4.3 Kontrollversuche mit DCF im zellfreien System

Bei diesen Versuchen sollte gezeigt werden, ob die Radikalbildner selbst H₂-DCF oxidieren können in Abwesenheit von Zellen und ob rhuEPO selbst einen Einfluss auf die Hydrolyse und Oxidation von H₂-DCF-DA bzw. H₂-DCF hat. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Unterschied bei hitzeinaktiviertem und nativem rhuEPO gegeben ist.

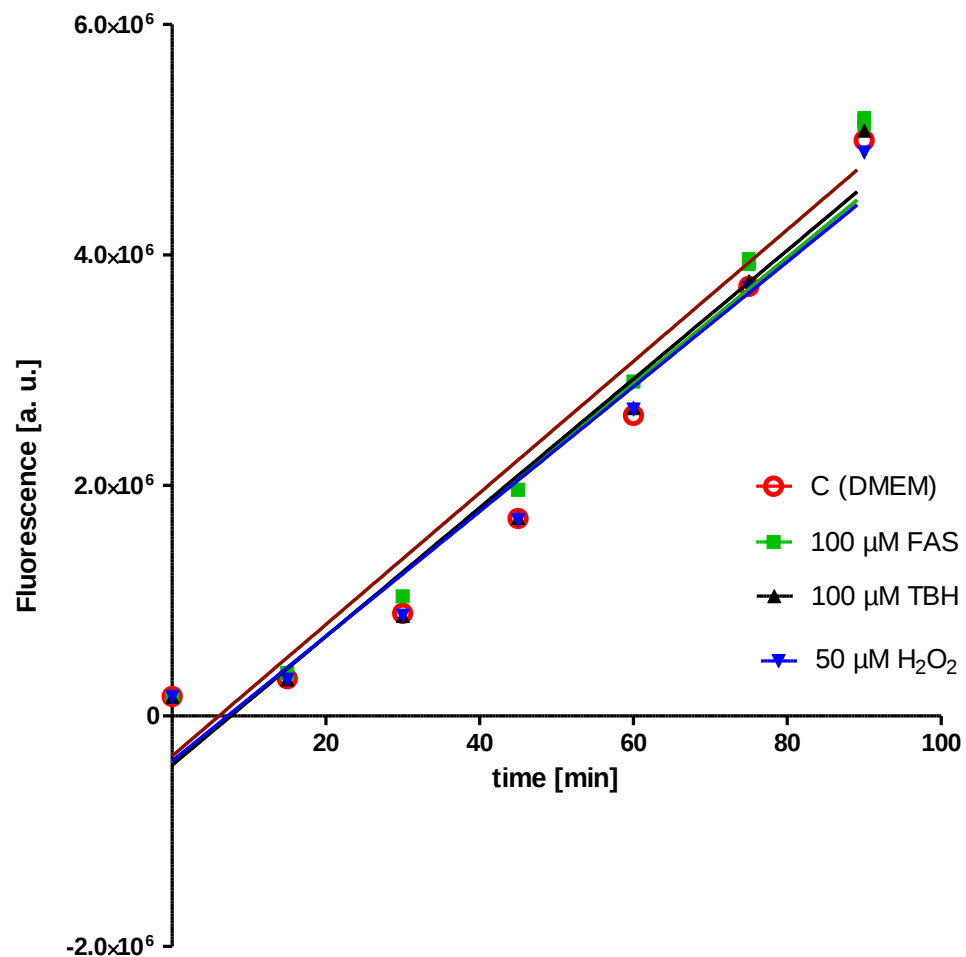


Abbildung 28: Oxidation von DCF mittels Oxidantien im zellfreien System

Der Versuch fand in einem zellfreien System in DMEM ohne Phenolrot + 20 mmol/l HEPES statt. H₂-DCF-DA wurde vorher chemisch hydrolysiert. Die Oxidantien wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: 100 μM FAS, 100 μM TBH und 50 μM H₂O₂. Nach Zugabe der Oxidantien wurde die Bildung von DCF im Fluorimeter über einen Zeitraum von 90 Minuten bei 37°C in 15-minütigen Intervallen gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (n=1). Die Standardabweichungen sind kleiner als die Symbole.

Wie aus der Abbildung 27 ersichtlich wird, können die Oxidantien TBH, FAS und H₂O₂ H₂-DCF im zellfreien System nicht oxidieren.

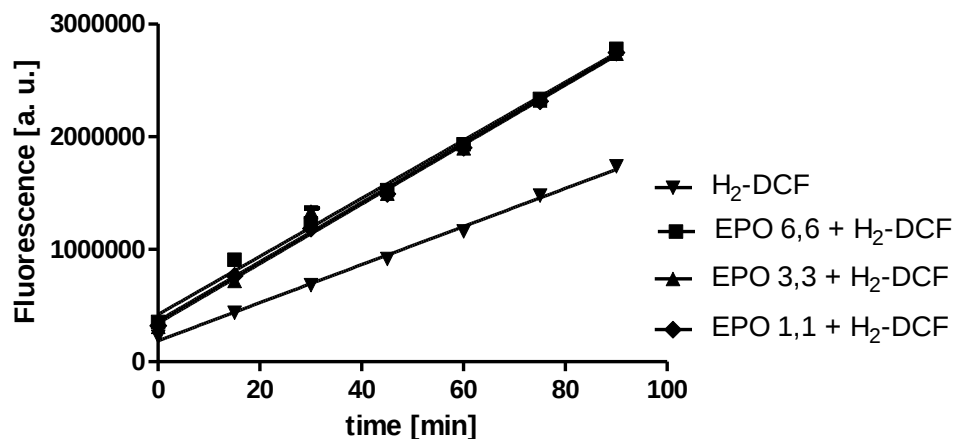


Abbildung 29: Oxidation von DCF mittels rhuEPO im zellfreien System

Der Versuch fand in einem zellfreien System in DMEM ohne Phenolrot + 20 mmol/l HEPES statt. H₂-DCF-DA wurde vor Beginn des Experimentes chemisch hydrolisiert. RhuEPO wurde in den Konzentrationen 1,1 – 6,6U/ml verwendet. Nach Zugabe von rhuEPO wurde die Bildung von DCF im Fluorimeter über einen Zeitraum von 90 Minuten bei 37°C in 15-minütigen Intervallen gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (n=1). Die Standardabweichungen sind kleiner als die Symbole.

Wie aus Abbildung 28 zu sehen ist kann rhuEPO im Gegensatz zu den in Abbildung 27 verwendeten Oxidantien im zellfreien System DCF oxidieren. Jedoch ist diese Oxidation nicht von der Konzentration des rhuEPO abhängig.

Wurde hingegen hitzeinaktiviertes anstatt nativem rhuEPO verwendet, konnte keine Oxidation von DCF im zellfreien System beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls war keine Oxidation bei nicht hydrolisiertem DCF (H₂-DCF-DA) im zellfreien System zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Brzyska et al. fanden in einer Studie bei der die gleiche Methode verwendet wurde, dass β-Amyloid H₂-DCF-DA sowohl hydrolysieren als auch oxidieren kann [BRZYSKA et al., 2001].

Bei den zellfreien Versuchen, die hier durchgeführt wurden, musste H₂-DCF-DA vorher chemisch hydrolysiert werden, um von rhuEPO zum fluoreszierenden DCF oxidiert zu werden. RhuEPO zeigte keine hydrolytische Aktivität.

Ob die hier gezeigten oxidativen Eigenschaften von rhuEPO möglicherweise an der Schutzwirkung von rhuEPO, z.B. durch Induktion von antioxidativen Enzymen eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.4 Zellulärer Eisengehalt

Überschüssiges Eisen ist aufgrund der Bildung von freien Radikalen, welche zur Oxidation von Biomolekülen und Gewebeschädigung führen können, toxisch. Lal et al. benutzten in ihrer Studie primäre humane Fibroblasten (IMR-90), welche auch mit Eisenammoniumcitrat (FAC) inkubiert wurden und bei denen die Entstehung von oxidativem Stress mittels der H₂-DCF-DA-Methode gemessen wurde. Die Autoren untersuchten den Einfluss von α -Liponsäure auf den oxidativen Stress. Dabei konnte gezeigt werden, dass α -Liponsäure den zellulären Redoxstatus verbesserte und den Eisen-vermittelten Anstieg von Oxidantien verminderte [LAL et al., 2008].

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war weder mit der DCF- noch bei der Resazurin-Methode ein Unterschied im basalen oxidativen Stress bzw. in der basalen metabolischen Aktivität zu beobachten. Da nicht bekannt ist, ob möglicherweise Fibroblasten von Friedreich's Ataxie-Patienten Veränderungen im zellulären Eisengehalt haben wurde abschließend in einer Pilotstudie der basale, sowie der Eisengehalt nach Beladung mit niedermolekularem Eisen, in Form von Eisenammoniumcitrat (FAC), in CoFib und FAFib, und im Vergleich in HepG2-Zellen, bestimmt.

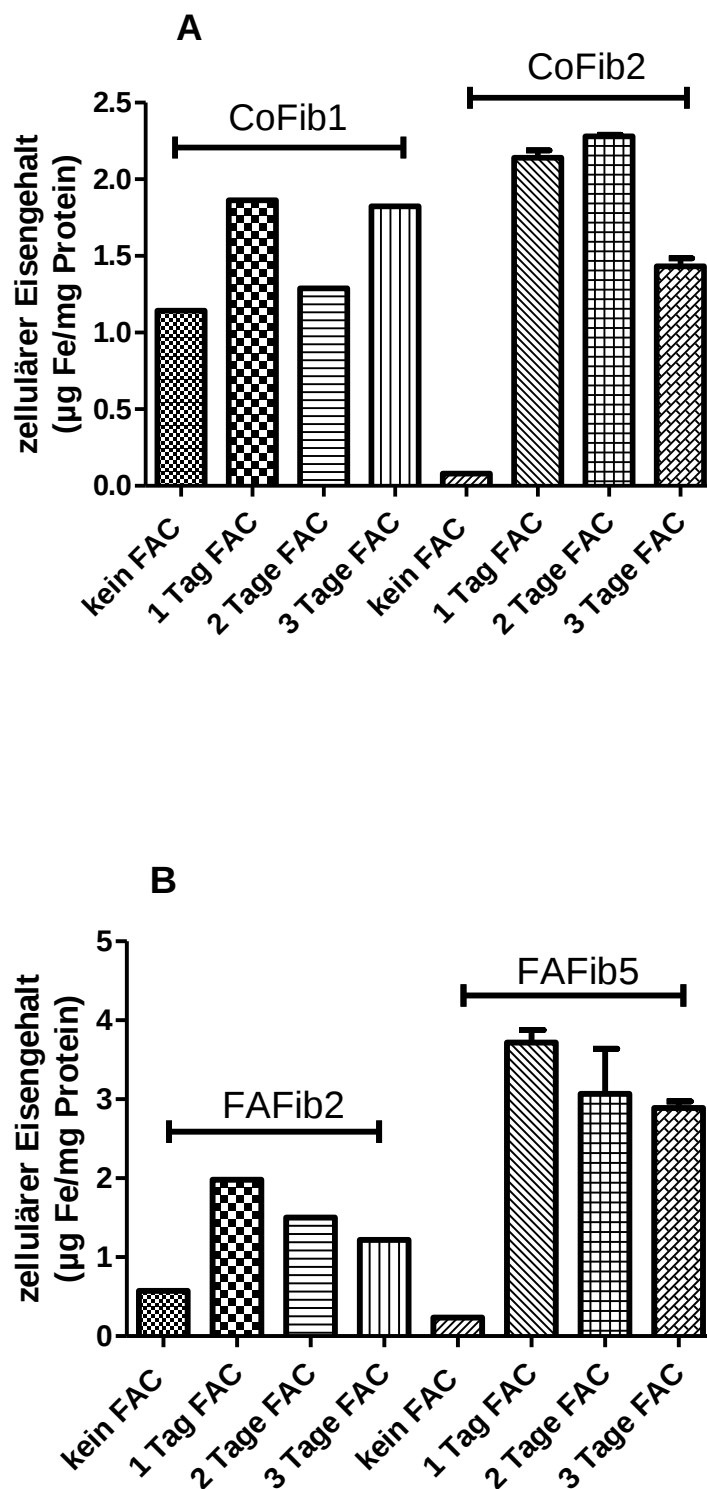


Abbildung 30: Zellulärer Eisengehalt in µg Fe/mg Protein

CoFib2 und FAFib5 wurden mit 75 µM Fe^{3+} als Eisenammoniumcitrat (FAC) beladen. Man verglich bei allen Zellarten den normalen Eisengehalt und nach Beladung mit Fe^{3+} . CoFib2 und FAFib5 wurden jeweils für einen, zwei und drei Tage mit FAC inkubiert. Zellulärer Eisengehalt in

CoFib und FAFib wurde mittels der Ferrozin-Methode bestimmt. Der Eisengehalt wurde auf den Proteingehalt der Proben normalisiert.

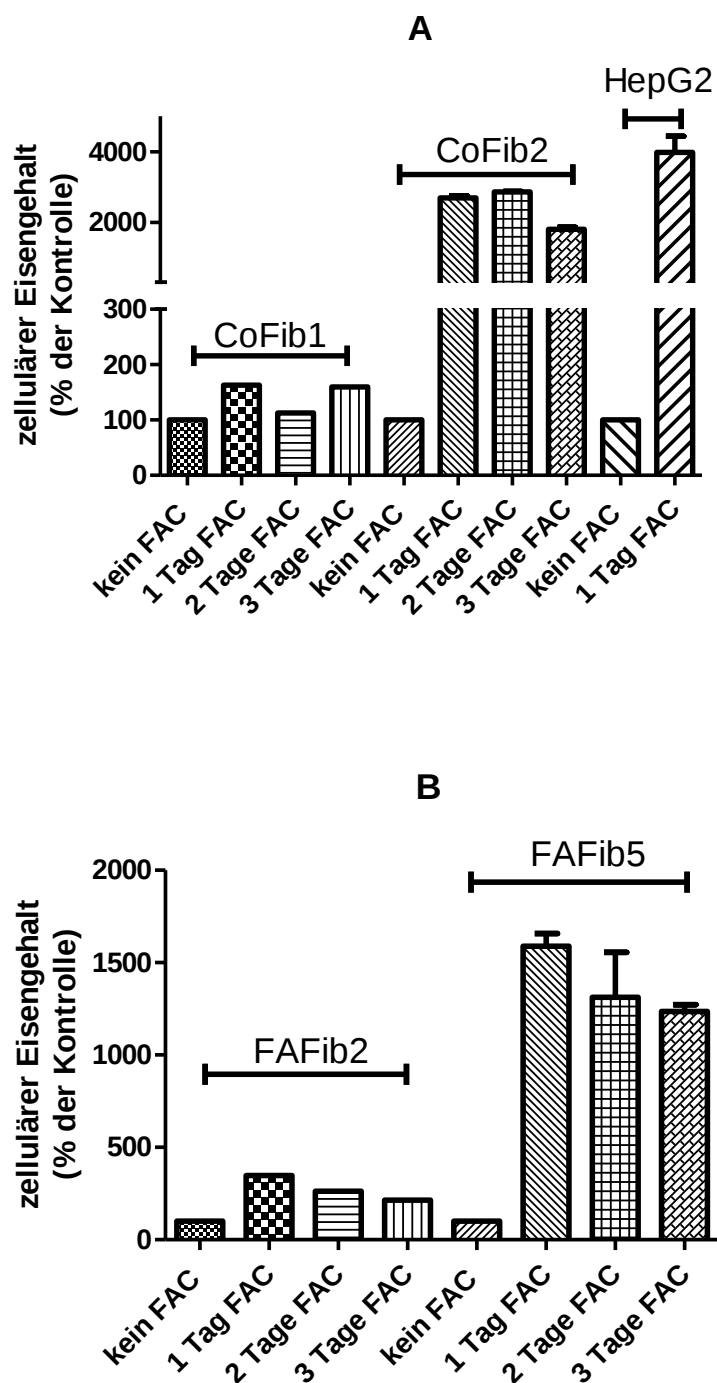


Abbildung 31: Relative Eisenaufnahme von FAC in Fibroblasten

CoFib2, FAFib5 und HepG2 wurden mit 75 μM Fe^{3+} als Eisenammoniumcitrat (FAC) beladen. Man verglich bei allen Zellarten den normalen Eisengehalt und nach Beladung mit Fe^{3+} . HepG2 wurden nur für einen Tag mit FAC, CoFib2 und FAFib5 wurden jeweils für einen, zwei und drei Tage mit FAC inkubiert. Zellulärer Eisengehalt in CoFib, FAFib und HepG2 wurde mittels der Ferrozin-Methode bestimmt. Der Eisengehalt wurde auf den Proteingehalt der Proben normalisiert.

Aus den Abbildungen 29 ist ersichtlich, dass der zelluläre Eisengehalt in den Fibroblasten des FAFib5-Patienten im Vergleich zu CoFib2 und HepG2 nach den Inkubationen mit FAC deutlich höher ist. Dabei zeigt sich, dass der zelluläre Eisengehalt mit der Dauer der Inkubation aber nicht weiter ansteigt. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen proliferieren und daher das aufgenommene Eisen sich auf mehrere Zellen aufteilt.

Aus Abbildung 30 ist zu entnehmen, dass jedoch die relative Eisenaufnahme bezogen auf den basalen Eisengehalt der jeweiligen Zelllinie (=100% gesetzt) je nach Zelllinie stark variiert.

Da es zu so großen Unterschieden bei Fibroblasten, die von unterschiedlichen Patienten stammten, kam, ist es nötig weitere Untersuchungen mit verschiedenen Fibroblasten, die von einer größeren Patientenzahl stammen, durchzuführen.

5. Schlussbetrachtung

Bei Friedreich's Ataxie (Morbus Friedreich) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv neurodegenerative Erkrankung, die mit einer Prävalenz von 1:50 000 – 1:29 000 die häufigste in Europa und Nordamerika auftretende Ataxie darstellt. Kennzeichnend sind klinische Symptome, wie z.B. Gang- und Gliederataxie, Verlust der Positions- und Sinneswahrnehmung, Spastizität, Skoliose, hypertrophe Kardiomyopathie und Diabetes mellitus [ALPER und NARAYANAN, 2003], [DI PROSPERO et al., 2007].

Friedreich's Ataxie ist auf einen Gendefekt zurückzuführen, wobei das mitochondriale Protein Frataxin unzureichend exprimiert wird. Ausschlaggebend dafür sind die Anzahl der GAA-Triplet Wiederholungen, die bei Patienten zumeist zwischen 600 und 900 liegen, wodurch sich andere Strukturen, wie eine non B-DNA, „sticky“-DNA oder permanente DNA-RNA-Hybride ausbilden können. [SCHMUCKER und PUCCIO, 2010], [WELLS, 2008].

Die durch die verminderte Frataxinexpression assoziierte Eisenakkumulation im Mitochondrium resultiert in weiterer Folge in oxidativem Stress. Dabei bilden sich reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxid-Anionenradikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal, die zur zellulären Schädigung beitragen [ARMSTRONG et al., 2010]

Zurzeit existiert keine Heilungsmöglichkeit der Friedreich's Ataxie. Therapieansätze zielen auf die Behandlung der Symptome.

Unter Therapieansätze fallen Möglichkeiten, wie die Behandlung mit Antioxidantien, zu denen Ubichinon Q-10, Idebenon und Vitamin E gehören [SPINDLER et al., 2009], [DI PROSPERO et al., 2007]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Behandlung mit Eisenchelatoren, wie 2-Pyridylcarboxaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon (PCIH) und 2-Pyridylcarboxaldehyd-2-thiophenecarboxyl Hydrazon (PCTH) und Deferiprone [LIM et al., 2008], [VELASCO-SANCHEZ et al., 2010]. Dabei existieren auch genetische Behandlungsoptionen, sowie Therapieansätze mit Hitzeschockproteinen [HERMAN et al., 2006], [CALABRESE et al., 2005].

Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhuEPO) stellt ebenfalls eine Therapiemöglichkeit dar. Boesch et al. konnten zeigen, dass rhuEPO die Frataxinlevel erhöht. Weiters konnte gezeigt werden, dass sich Bewertungsskalen der Friedreich's Ataxie, wie Friedreich Ataxia Rating Scale (FARS) und Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA), signifikant verbesserten. Auch Indikatoren für oxidativen Stress, wie der Uringehalt an 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG), sowie Serum-Peroxide wurden durch rhuEPO signifikant gesenkt [BOESCH et al., 2008].

Mögliche Funktionsweisen von Frataxin sind die eines mitochondrialen Eisenspeicherproteins, eines „Eisen-Sensors“ und die eines „metabolischen Schalters“. Die wahrscheinlichste Aufgabe von Frataxin besteht in der Rolle eines Eisen-Chaperons für Eisen-Schwefel-Cluster (ISC)- und Häm-Biosynthese [RICHARDSON et al., 2010].

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der durch Oxidantien induzierte oxidative Stress in Fibroblasten, sowie der Einfluss einer Langzeit- bzw. Kurzzeitvorinkubation bzw. Präkonditionierung der Fibroblasten mit rhuEPO und der direkte Effekt von rhuEPO bei gleichzeitiger Inkubation mit den Oxidantien mittels der DCF- und Resazurin-Methode untersucht.

Dabei zeigte sich mit der DCF- und Resazurinmethode, dass weder durch Tert-butylhydroperoxid (TBH), noch H_2O_2 der oxidative Stress erhöht bzw. die metabolische Aktivität reduziert wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass TBH zu keiner signifikanten Veränderung im oxidativen Stress führt, könnte daran liegen, dass die Zellen in der Zellkultur bereits erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind [HALLIWELL, 2003].

Auch eine zu geringe Inkubationsdauer, sowie Konzentration der Oxidantien könnte dafür verantwortlich sein, dass es zu keiner signifikanten Veränderung kam.

Ein Signifikanzmaß zeigte sich bei der DCF-Methode lediglich bei der zwei- und 24-stündigen Vorinkubation mit 6,6U/ml rhuEPO und anschließender Inkubation

mit TBH, sowie bei einer Koinkubation mit rhuEPO und TBH, jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Weiters ist zu bemerken, dass die Streuung der Messwerte (Replikate) bei der DCF-Methode, als auch die Unterschiede der Messwerte bei verschiedenen Experimenten sehr hoch war und daher diese Methode unzuverlässige Ergebnisse lieferte.

Die Resazurinmethode lieferte zum Teil konträre Aussagen, war jedoch reproduzierbarer. Ein Signifikanzmaß war bei zwei- und 24-stündiger Vorinkubation der Zellen mit rhuEPO im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beobachten.

Bei der Langzeitinkubation mit Oxidantien zeigte sich mit Resazurin, sowie beim MTT-Test, dass zwar TBH die metabolische Aktivität stark herabsetzte, nicht jedoch H_2O_2 . In diesen Versuchen zeigte eine Vorinkubation mit rhuEPO einen günstigen Effekt auf die metabolische Aktivität der Fibroblasten.

Des Weiteren wurden auch Versuche im zellfreien System durchgeführt, um den Einfluss von rhuEPO auf die Oxidation von H_2 -DCF zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass rhuEPO selbst H_2 -DCF oxidieren kann, doch zeigten die Ergebnisse keine Konzentrationsabhängigkeit. Dieser Effekt war jedoch nur mit nativem rhuEPO zu beobachten, wurde hitzeinaktiviertes rhuEPO verwendet, konnte keine Oxidation von H_2 -DCF beobachtet werden. Wurde hingegen Dichlorodihydrofluorescein-diazetat verwendet, konnte keine Oxidation gezeigt werden.

Ob diese oxidativen Eigenschaften von rhuEPO möglicherweise an der Schutzwirkung von rhuEPO, z.B. durch Induktion von antioxidativen Enzymen eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Bei Untersuchungen im zellfreien System konnte kein direkter Einfluss von den verwendeten Oxidantien/Radikalbildern auf die Hydrolyse und Oxidation von Dichlorodihydrofluorescein gefunden werden.

Da nicht bekannt ist, ob möglicherweise Fibroblasten von Friedreich's Ataxie-Patienten Veränderungen im zellulären Eisengehalt haben, wurde abschließend in einer Pilotstudie der basale, sowie der Eisengehalt nach Beladung mit

niedermolekularem Eisen in CoFib und FAFib bestimmt. Es zeigten sich jedoch große Unterschiede in Fibroblasten, die von unterschiedlichen Patienten stammen, sodass weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenanzahl nötig wären.

Diese Arbeit zeigte, dass, solange die genaue Funktion von Frataxin nicht hinreichend bekannt ist, es schwierig ist, ein Zellmodell mit Friedreich's Ataxie-Fibroblasten zur Identifizierung von therapeutisch wirksamen Substanzen zu verwenden. Die verwendeten Testmethoden müssten wesentlich spezifischer für die Funktion von Frataxin sein.

6. Zusammenfassung

Zelluläre Modelle stellen ein wichtiges Instrument zur Identifizierung und Charakterisierung pharmakologisch aktiver Verbindungen dar. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir kultivierte Fibroblasten von Friedreich's Ataxie-Patienten und gesunden Kontrollpersonen, um die Wirkung von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Sensivität von Fibroblasten gegenüber Radikale bildenden Oxidantien zu untersuchen. Unser Ziel mit diesem zellbasierten Ansatz für Friedreich's Ataxie lag darin, aussagekräftige und reproduzierbare Tests für Friedreich's Ataxie zu finden. Die untersuchten Parameter waren: Beurteilung der Bildung von oxidativem Stress mittels Dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (H_2 -DCF-DA), sowie zwei Methoden zur Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin und MTT-Test. Dabei wies das DCF-Verfahren eine höhere inter- und intra-Assay Streuung auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Resazurin-Methode, sowie der MTT-Test eine geringere inter- und intra-Assay Streuung und stellen daher geeignetere Methoden dar. Des Weiteren wurden die Effekte von Tert-butylhydroperoxid (TBH) und H_2O_2 untersucht und gezeigt, dass TBH im Gegensatz zu H_2O_2 die metabolische Aktivität in FAFib stärker herabsetzte, als in Kontrollzellen. Mit DCF konnte weder durch TBH, noch H_2O_2 eine Erhöhung im oxidativen Stress detektiert werden. RhuEPO Präinkubation der Zellen hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf den basalen oxidativen Stress und die metabolische Aktivität im DCF-Assay und mit Resazurin, verbesserte aber die metabolische Aktivität im MTT-Test. Bei zellfreien Untersuchungen wurde auch der direkte Einfluss von rhuEPO und den verwendeten Oxidantien/Radikalbildern auf die Hydrolyse und Oxidation von H_2 -DCF-DA untersucht. Es zeigte sich, dass rhuEPO keine hydrolysierende, aber eine oxidierende Wirkung gegenüber H_2 -DCF-DA hatte, die zellprotektive Mechanismen induzieren könnte. Abschließend wurde in einer Pilotstudie der Eisengehalt von zwei Zelllinien von Friedreich's Ataxie-Patienten, sowie von Kontrollfibroblasten untersucht und gezeigt, dass der zellulärer Eisengehalt wahrscheinlich aufgrund des unterschiedlichen genetischen Backgrounds extrem unterschiedlich ist.

7. Abstract

Cellular models are an important tool to identify and characterize pharmacologically active compounds. In the present work we used cultivated fibroblasts from Friedreich's ataxia patients and healthy controls to investigate the effect of recombinant human erythropoietin on the sensitivity of fibroblasts to radical-forming oxidants. Using this cell-based approach for Friedreich's ataxia we aimed to find a robust reproducible readout for the effects of a possible treatment for Friedreich's ataxia. The investigated readouts were: assessment of oxidative stress generation using the probe dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H_2 -DCF-DA) as well as two methods to assess metabolic activity using resazurin and MTT as probes. We found that the DCF-method had a high inter- and intra-assay variation and seemed to be less useful as a readout. In contrast the resazurin-assay as well as the MTT-test were reproducible and showed low inter- and intra-assay variation. Furthermore the effects of tert-butylhydroperoxide (TBH) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were investigated and showed that TBH decreased, in contrast to H_2O_2 , the metabolic activity of FAFib to a higher extent than in control cells. With the DCF-assay no oxidative stress was detectable resulting from incubation with TBH or H_2O_2 . RhuEPO preincubation of the cells had no statistically significant effect on the basal oxidative stress and metabolic activity in the DCF assay and with resazurin, but improved the metabolic activity in the MTT-test. In addition we investigated the direct influence of rhuEPO on hydrolysis and oxidation of H_2 -DCF-DA in cell-free studies. RhuEPO showed oxidative, but no hydrolytic properties in the DCF-assay, a property which may be responsible for induction of cytoprotection by rhuEPO. Finally, in a pilot study, the iron content in two cell lines from Friedreich's ataxia patients as well as control fibroblasts was investigated and showed that it is very different probably due to the different genetic background.

8. Literaturverzeichnis

ADINOLFI S, TRIFUOGGI M, POLITOU AS, MARTIN S, PASTORE A. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet*, 2002; 11: 1865-1877.

ADINOLFI S, IANNUZZI C, PRISCHI F, PASTORE C, IAMETTI S, MARTIN SR, BONOMI F, PASTORE A. Bacterial frataxin CyaY ist the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat Struct Mol Biol*, 2009; 16: 390-396.

ALPER G, NARAYANAN V. Friedreich's Ataxia. *Pediatr Neurol.*, 2003; 28: 335-341.

ANDERSON PR, KIRBY K, ORR WC, HILLIKER AJ, PHILLIPS P. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *PNAS*, 2008; 105(2): 611-616.

ARCASOY MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Hematol*, 2008; 141: 14-31.

ARMSTRONG JS, KHDOUR O, HECHT SM. Does oxidative stress contribute of the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *FASEB J*, 2010; 24: 1-12.

AZAD N, ROJANASAKUL Y, VALLYATHAN V. Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2008, 11(1): 1-15.

BALCERCZYK A, KRUSZEWSKI M, BARTOSZ G. Does the cellular labile iron pool participate in the oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein? *Free Radical Research*, 2007; 41(5): 563-570.

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*, 2002; 99: 3813-3822.

BENZCE KZ, KONDAPALLI KC, COOK JD, MCMAHON S. The Structure and Function of Frataxin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2006; 41: 269-291.

BERIS PH, Erythropoietin and erythropoiesis, *The Journal of the Hellenic Society of Haematologie (HAEMA)*, 1998; 1(3): 126-131.

BODO E, KROMMINGA A, FUNK W, LAUGSCH M, DUSKE U, JELKMANN W, PAUS R. Human hair follicles are an external source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB J*, 2007; 21: 3346-3354.

BOESCH S, STURM B, HERING S, SCHEIBER-MOJDEHKAR B, STEINKELLNER H, GOLDENBERG H, POEWE W. Neurological effects of recombinant erythropoietin in Friedreich's ataxia: A clinical pilot trial. *Movement Disorders*, 2008; 23(13): 1940-1944.

BOU-ABDALLAH F, ADINOLFI S, PASTORE A, LAUE TM, CHASTEEN ND. Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 341, 2004; 605-611.

BOVERIS A, CADENAS EJ. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life*, 2000; 50: 245-250.

BRINES M, CERAMI A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney Int*, 2006; 70: 246-250.

BRZYSKA M, BACIA A, ELBAUM D. Oxidative and hydrolytic properties of β -amyloid, *Eur J Biochem*, 2001; 268(12): 3443-3454.

CALABRESE V, LODI R, TONON C, D'AGATA V, SAPIENZA M, SCAPAGNINI G, MANGIAMELI A, PENNISI G, STELLA AMG, BUTTERFIELD DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci*, 2005; 233(1): 145-162.

CAMPANELLA A, ROVELLI E, SANTAMBROGIO P, COZZI A, TARONI F, LEVI S. Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability: hypothesis for protective role in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 2009; 8(1): 1-11.

CAVADINI P, O'NEILL HA, BENADA O, ISAYA G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 2002; 11: 217-227.

CRICHTON RR, WILMET S, LEGSSYER R, WARD RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 9(1): 9-18.

CROW PJ. Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1997; 1(2): 145-157.

DELATYCKI MB, WILLIAMSON R, FORREST SM. Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*, 2000; 37: 1-8.

DI PROSPERO NA, BAKER A, JEFFRIES N, FISCHBECK KH. Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2007; 6: 878-886.

DI PROSPERO NA, SUMNER CJ, PENZAK SR, RAVINA B, FISCHBECK KH, TAYLOR JP. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose idebenone in patients with Friedreich ataxia. *Arch Neurol*, 2007; 64(6): 803-808.

FOURY F, ROGANTI T. Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem*, 2002; 277: 24475-24483.

GASSER T, FINSTERER J, BAETS J, VAN BROECKHOVEN C, DI DONATO S, FONTAINE B, DE JONGHE P, LOSSOS A, LYNCH T, MARIOTTI C, SCHÖLS L, SPINAZZOLA A, SZOLNOKI Z, TABRIZI SJ, TALLAKSEN C, ZEVIANI M, BURGUNDER J-M, HARBO HF. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of ataxias and spastic paraplegias. *Europ J Neurol*, 2010; 17: 179–188.

GELLERA C, CASTELLOTTI B, MARIOTTI C, MINERI R, SEVESO V, DIDONATO S, TARONI F. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*, 2007; 8(4): 289-99.

GRZELAK A, RYCHLIK B, BARTOSZ G. LIGHT-DEPENDENT GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CELL CULTURE MEDIA. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 30: 1418-1425.

HALLIWELL B. Oxidative stress in cell culture an under-appreciated problem? *FEBS Letters*, 2003; 540: 3-6.

HAN D, CANALI R, RETTORI D, KAPLOWITZ N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol*. 64, 2003; 1136-1144.

HERMAN D, JENSSEN K, BURNETT R, SORAGNI E, PERLMAN SL, GOTTFELD JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol.*, 2006; 2(10): 551-8.

<http://www.fataxie.net/cms/upload/pdf/FA.pdf>; Stand: 6.4.2011

JELKMANN W. Molecular Biology of Erythropoietin. *Internal Medicine*, 2004; 43(8): 649-659.

JELKMANN W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*, 2011; 589(6): 1251-1258.

KHANKIN EV, MUTTER WP, TAMEZ H, YUAN HT, KARUMANCHI SA, THADHANI R. Soluble Erythropoietin Receptor Contributes to Erythropoietin Resistance in End-Stage Renal Disease. *PLoS ONE*, 2010; 5(2): e9246.

KIM YM, LIM JM, KIM BC, HAN S. Cu,Zn-superoxide dismutase is an intracellular catalyst for the H₂O₂-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein. *Mol Cells*, 2006; 21: 161-165.

KRÄMER I, JELKMANN W. Rekombinante Arzneimittel – Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, 1. Auflage, Springer Verlag Gmbh, 2008; S. 38-42.

IWAI M, CAO G, YIN W, STETLER RA, LIU J, CHEN J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke*, 2007; 38: 2795-2803.

LAL A, ATAMNA W, KILLILEA DW, SUH JH, AMES BN. Lipoic acid and acetyl-carnitine reverse iron-induced oxidative stress in human fibroblasts. *Redox Report*, 2008; 13(1): 2-10.

LAPPIN T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *The Oncologist*, 2003; 8(1): 15-18.

LEBEL CP, ISCHIROPOULOS H, BONDY SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol*, 1992; 5(2): 227-231.

LIM CK, KALINOWSKI DS, RICHARDSON DR. Protection against Hydrogen Peroxide-Mediated Cytotoxicity in Friedreich's Ataxia Fibroblasts Using Novel Iron Chelators of the 2-Pyridylcarboxaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone Class. *Mol Pharmacol*, 2008; 74(1), 225-235.

LODI R, HART PE, RAJAGOPALAN B, TAYLOR DJ, CRILLEY JG, BRADLEY JL, BLAMIRE AM, MANNERS D, STYLES P, SCHAPIRA AHV, COOPER JM. Antioxidant Treatment Improves In Vivo Cardiac and Skeletal Muscle Bioenergetics in Patients with Friedreich's Ataxia. *Ann Neurol*, 2001; 49: 590-596.

LODI R, TONTON C, CALABRESE V, SCHAPIRA AVH. Friedreich's Ataxia: From Disease Mechanisms to Therapeutic Intervention. *Antioxidant & Redox Signaling*, 2006; 8: 3-4.

LÖFFLER G. *Signaltransduktion von Membranrezeptoren*. In: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; S. 471-481.

LÖFFLER G, PETRIDES PE. *Oxidativer Stress*. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1998, S. 512-515.

LUNDBY C, OLSEN NV. Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. *J Physiol*, 2011; 589(6): 1265-1271.

MARCUSO M, ORSUCCI D, CHOUB A, SICILIANO G. Current and emerging treatment options in the management of Friedreich ataxia. *Neuropsychiat Dis Treat*, 2010; 6: 491-499.

MARMOLINO D. Friedreich's ataxia: Past, present and future. *Brain Res Rev*, 2011; 67(1-2): 311-330.

MAXWELL PH, PUGH CW, (Editors: BEAUMONT C, BERIS P, BEUZARD Y, BRUGNARA C). *The Iron Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism – Chapter 1: Regulation of oxygen sensing and erythropoietin production*, 2009; 16-30.

MEIER T, BUYSE G. Idebenone: an emerging therapy for Friedreich ataxia. *J Neurol*, 2009; 256(1): 25-30.

MILLER EW, TULYATHAN O, ISACOFF EY, CHANG CJ. Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nat Chem Biol*, 2007; 3: 263-267.

MIYAKE T, KUNG CKH, GOLDWASSER E. Purification of Human Erythropoietin. *J Biol Chem*, 1977, 252(15): 5558-5564.

NG T, MARX G, LITTLEWOOD T, MACDOUGALL I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med J*, 2003; 79: 367-376.

PANASENKO OM, CHEKANOV AV, ARNHOLD J, SERGIENKO VI, OSIPOV AN, VLADIMIROV YA. Generation of free radicals during decomposition of hydroperoxide in the presence of myeloperoxidase or activated neutrophils. *Biochemistry (Mosc)*, 2005; 70(9): 998-1004.

PANDOLFO M, PASTORE A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J Neurol*, 2009, 256(1): 9-17.

PUTTEN K, BRAAM B, JIE KE, GAILLARD CAJM. Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2008; 4(1): 47-57.

RHEE GS, CHANG TS, JEONG W, KANG D. Methods for Detection and Measurement of Hydrogen Peroxide Inside and Outside of Cells. *Mol Cells*, 2010; 539-549.

RICHARDSON DR, LANE DJR, BECKER EM, HUANG MLH, WHITNALL M, RAHMANTO YS, SHEFTEL AD, PONKA P. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *PNAS*, 2010; 107(24): 10775-10782.

SARDAO VA, OLIVEIRA PJ, HOLY J, OLIVEIRA CR, WALLACE KB. Vital imaging of H₂c₉ myoblasts expodes to tert-butylhydroperoxide – characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology*, 2007; 8:11.

SCHÖLS L, SPINAZZOLA A, SZOLNOKI Z, TABRIZI SJ, TALLAKSEN CME, ZEVIANI M, BURGUNDER JM, HARBO HF. *Eur J Neurol*, 2010; 17(2): 179-188.

SCHMIDT RF, LANG F, HECKMANN M. *Oxidativer Stress*. In: Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie, 30. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2007; S. 957.

SCHMELZER C, LINDNER I, RIMBACH G, NIKLOWITZ P, MENKE T, DÖRING F. Functions of oenzym Q10 in inflammation and gene expression. *Biofactors*, 2008; 32(1-4): 179-183.

SCHMUCKER S, PUCCIO H. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet*, 2010; 19(1): 103-110.

SCHULZ JB, DEHMER T, SCHÖLS L, MENDE H, HARDT C, VORGERD M, BÜRK K, MATSON W, DICHGANS J, BEAL MF, BOGDANOV MB. Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology*, 2000; 55(11): 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*, 2005; 14(4): 463-474.

SPINDLER M, BEAL MF, HENCHCLIFFE C. Coenzyme Q10effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiat Dis Treat*, 2009; 5: 597-610.

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, 2005; 280: 6701-6708.

VELASCO-SANCHEZ D, ARACIL A, MONTERO R, MAS A, JIMENEZ L, O'CALLAGHAN, TONDO M, CAPDEVILA A, BLANCH J, ARTUCH R, MERCEDES P. Combined Therapy with Idebenone and Deferiprone in Patients with Friedreich's Ataxia. Cerebellum, 2010; 10(1): 1-8.

WELLS RD. DNA triplexes and Friedreich ataxia. FASEB J, 2008; 22: 1625-1634.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Matej Sack
Geburtsdatum:	7. November 1985
Geburtsort:	Bratislava
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1992-1996:	Volksschule Taden
1996-2004:	Bundesgymnasium Neusiedl am See
2005-2011:	Ernährungswissenschaften, Universität Wien
Seit 2008:	Elektrotechnik, Technische Universität Wien

Studienbegleitende Tätigkeit

2005-2009	Ferialpraktika bei Pioneer Hi-Bred International, Inc.
März 2009	Laborpraktikum am Institut für Medizinische Chemie
Dez. 2009 – Jän 2010	Laborpraktikum am Institut für Medizinische Chemie
Juli 2010	Praktikum bei der Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung (AKE)
SS 2010 und WS 2010/11	Tätigkeit als Tutor bei dem Biochemischen Praktikum für Ernährungswissenschaften am Institut für Medizinische Chemie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Matej Sack, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche unter Angabe der entsprechenden Quelle gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift