

**UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DES KLASSISCHEN
ERYTHROPOIETIN-REZEPTORS BEI DER FRATAXIN
ERHÖHENDEN WIRKUNG VON REKOMBINANTEM
HUMANEM ERYTHROPOIETIN**

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Magistra der Naturwissenschaften

an der Fakultät für Lebenswissenschaften der

Universität Wien

eingereicht von

Melissa Helming

betreut von Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

ausgeführt am Institut für Medizinische Chemie der Universität Wien

Wien, Oktober 2008

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die direkt oder indirekt zur Entstehung dieser Diplomarbeit in Form fachlicher oder anderweitiger Unterstützung beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Institutsleiter Univ. Prof. Hans Goldenberg für die Ermöglichung meiner Diplomarbeit sowie für die Möglichkeit am EIC Kongress 2008 in St. Gallen teilzunehmen.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar nicht nur für die Unterstützung in arbeitstechnischer Hinsicht und für die Beantwortung wissenschaftlicher Fragen, sondern auch dafür bedanken dass sie mir darüber hinaus immer zur Seite stand und mich immer wieder motivierte.

Weiters bedanke ich mich bei Dr. Brigitte Nina Sturm und Mag. Hannes Steinkellner für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, welche für mich sehr wertvoll waren und stets zur Verbesserung dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft meiner Kolleginnen hat dazu beigetragen, dass mir die Arbeit letztlich immer Freude bereitete. Deshalb gilt mein spezieller Dank auch Chantal Kopecky und Corinna Aichinger.

Bei meinem Freund Michael möchte ich mich für die unzähligen Kopien und vor allem für die moralische Unterstützung bedanken. Danke, dass du immer für mich da bist!

An dieser Stelle möchte ich mich auch noch einmal, ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die maßgeblich am Erfolg meines gesamten Studiums beteiligt waren und ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Was ich ihnen zu verdanken habe, kann ich nicht in Worte fassen.

Vielen Dank!

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

III SCHEMATAVERZEICHNIS

V ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.0 Einleitung & Fragestellung	14
2 Literaturüberblick	18
2.1 Friedreich`s Ataxie	18
2.1.1 Genotyp- und Phänotyp Zusammenhang	18
2.1.2 Inzidenz und Prävalenz	19
2.1.3 Molekulare Genetik	19
2.1.4 Pathogenese	20
2.1.5 Klinische Symptome	23
2.2 Frataxin	24
2.2.1 Lokalisation von Frataxin	24
2.2.2 Funktionen von Frataxin	24
2.2.2.1 Frataxin im mitochondrialen Eisenstoffwechsel	24
2.2.2.2 Frataxin und Oxidativer Stress	25
2.2.2.3 Frataxin und die Synthese von Eisen-Schwefel Clustern	26
2.3 Mögliche Therapieansätze für die Friedreich´s Ataxie	27
2.3.1 Antioxidantien	27
2.3.2 Eisenchelatoren	28
2.3.3 Steigerung der Frataxin Expression	29
2.4 Mortalin	30
2.5 Erythropoietin (EPO)	32
2.5.1 Rolle von EPO in der Erythropoiese	33
2.5.2 Strukturelle Eigenschaften	34
2.6 Erythropoietin Rezeptor	35
2.7 Carbamyliertes Erythropoietin (CEPO)	37
3.0 Material und Methoden	38

3.1 Zellbiologische Methoden	38
3.1.1 Zelllinien	38
3.1.1.1 K562.....	38
3.1.1.2 THP1	39
3.1.1.3.1 Ethik.....	40
3.1.2 Zellkulturmedium	41
3.1.2.1 RPMI	41
3.1.2.2 Komplementieren des RPMI Nullmedium	41
3.1.2.2.1 RPMI Medium mit nicht-hitzeinaktiviertem FCS.....	41
3.1.2.2.2 RPMI Medium mit hitzeinaktiviertem FCS.....	41
3.1.3 Medium wechseln	42
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	42
3.1.5 Zellproliferationsassay & Trypanblau-Methode	43
3.1.5.1 Trypanblau-Methode.....	43
3.1.5.2 Durchführung der Trypanblau Methode.....	43
3.1.5 Zellen ernten	44
3.1.6 Zellen lysieren	45
3.1.7 Lymphozyten isolieren und kultivieren	46
3.1.7.1 Vorbereitungen für die Lymphozytenisolierung.....	46
3.1.7.2 Durchführung der Lymphozytenisolierung.....	46
3.1.8 Inkubation der Zellen	47
3.1.9 Verwendete Substanzen	48
3.1.9.1 RhuEPO.....	48
3.1.9.2 CEPO	48
3.1.9.3 Eisen (Fe(III)-Natrium-Gluconat „Ferrlecit“, Aventis).....	49
3.1.9.4 Chlorophyllin	49
3.1.9.5 Cycloheximid (Sigma).....	49
3.1.9.6 Hygromycin B (Calbiochem)	49
3.2 Proteinchemische Methoden	50
3.2.1 Proteinbestimmung nach BioRad	50
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.2.2.1 Gel gießen (Apparatur von BioRad).....	51
3.2.2.2 Vorbereitungen der Proben.....	52
3.2.2.3 Elektrophorese	54
3.3 Immunologische Methoden	55

4.1.3. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen nach 48h	79
4.1.4. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen nach 72h	80
4.2 Der Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen	81
4.2.2 Der Einfluss von CEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 12h.....	82
4.2.3 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h.....	83
4.2.4 Der Einfluss von verschiedener Chargen eines kommerziell erhältlichem rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h	84
4.2.5 Der Einfluss von carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h	86
4.2.6 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 48h.....	88
4.2.7 Der Einfluss von carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 48h	90
4.2.8 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 72h.....	91
4.2.9 Der Einfluss von carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 72h.....	92
4.3 Signifikante Erhöhung der Frataxin Protein-Expression durch rhuEPO in primären Lymphozyten von Patienten mit FRDA.....	93
4.3.1. Der Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins in Lymphozyten isoliert von einem FRDA Patienten.....	94

4.3.2. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in Lymphozyten isoliert von einem gesunden Probanden.	96
4.4 Die Bedeutung des klassischen Erythropoietin-Rezeptors bei der Frataxin-erhöhenden Wirkung von rekombinantem humanen Erythropoietin und carbamylisiertem Erythropoietin	98
4.4.1 Der Effekt von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Frataxin-Expression in K562 und THP-1 Zellen	100
4.4.2 Der Effekt von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Frataxin-Expression in primären Lymphozyten von einer Kontrolle und von Friedreich´s Ataxie Patienten	103
4.5 Der Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Expression der Frataxin mRNA	106
4.5.1 Der Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression der Frataxin mRNA, in K562 und THP-1 Zellen	107
4.5.2 Der Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression der Frataxin mRNA, in Lymphozyten von Friedreich´s Ataxie Patienten und einer Kontrolle.....	111
4.6 Inhibierung der Proteinsynthese und deren Einfluss auf die Expression des Frataxin Protein.....	115
4.6.1 Inhibierung der eukaryotischen und prokaryotischen Proteinsynthese in K562- und THP-1 Zellen	115
4.6.1 Inhibierung der eukaryotischen Proteinsynthese in K562- und THP-1 Zellen.....	118
4.7 Der Einfluss von rhuEPO, CEPO, Eisen, und Chlorophyllin auf die Zellproliferation von K562 Zellen.....	121
5.0 Schlussbetrachtung	125
6.0 Zusammenfassung	128
7.0 Summary	129
8.0 Literaturverzeichnis.....	130

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothetische Funktionen von Frataxin

Abbildung 2: Struktur von Mortalin

Abbildung 3: Primärstruktur von humanem Erythropoietin [Lappin, 2003]

Abbildung 4: Signalkaskade des EPO Rezeptors

Abbildung 5: K562 Zellen (24h)

Abbildung 6: THP-1 Zellen

Abbildung 7: Schichtung nach der Zentrifugation

Abbildung 8: Elektrophoresekammer

Abbildung 9: Gel mit aufgetrennten Proteinen

Abbildung 10: Schichtung eines Blotsandwich

Abbildung 11: Nitrozellulose-Membran

Abbildung 12: BioRad, Precisions Plus Protein Standard

Abbildung 13: Sandwich Immunoassay auf MSD MULTI-ARRAY Platte

Abbildung 14: TaqMan-Prinzip

Abbildung 15: Die Schichtung während der RNA Isolierung

Abbildung 16: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

Abbildung 17: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 24h Inkubation. (C) β -Actin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 50 kDa

Abbildung 18: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 48h Inkubation

Abbildung 19: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 72h Inkubation

Abbildung 20: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 12h Inkubation

Abbildung 21: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 12h Inkubation

Abbildung 22: Einfluss von rhuEPO (Charge A) auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

- Abbildung 23: Einfluss von rhuEPO (Charge B) auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 24: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 48h Inkubation. (C) Calnexin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 70 kDa**
- Abbildung 25: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation. (C) Calnexin Banden bei ca.70 kDa**
- Abbildung 26: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 48h Inkubation**
- Abbildung 27: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 72h Inkubation. (C) Calnexin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 70 kDa**
- Abbildung 28: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 72h Inkubation. (C) Kontrollprotein für Frataxin: Calnexin bei ca. 70 kDa**
- Abbildung 29: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Frataxin in Lymphozyten eines FRDA Patient, nach 48h Inkubation**
- Abbildung 30: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Mortalin in Lymphozyten eines FRDA Patient, nach 48h Inkubation**
- Abbildung 31: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin in Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 32: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Mortalin in Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 33: Einfluss von rhuEPO und carbamylertem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in K562 Zellen, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 34: Einfluss von rhuEPO und carbamylertem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 35: Einfluss von rhuEPO und carbamylertem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in primären Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation**
- Abbildung 36: Einfluss von rhuEPO und carbamylerten EPO (CEPO) auf die**

Expression von Frataxin in primärem Lymphozyten eines FRDA Patienten, nach 24h Inkubation

Abbildung 37: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in K562 Zellen, nach 3h Inkubation

Abbildung 38: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in K562 Zellen, nach 3h Inkubation

Abbildung 39: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in THP-1 Zellen, nach 3h Inkubation

Abbildung 40: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in THP-1 Zellen, nach 3h Inkubation

Abbildung 41: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten der Kontrolle, nach 3h Inkubation

Abbildung 42: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten der Kontrolle, nach 3h Inkubation

Abbildung 43: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von Friedreich's Ataxie Patienten, nach 3h Inkubation

Abbildung 44: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von Friedreich's Ataxie Patienten, nach 3h Inkubation

Abbildung 45: Inhibition der eukaryotischen und prokaryontischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

Abbildung 46: Inhibition der eukaryotischen und prokaryontischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

Abbildung 47: Inhibition der eukaryotischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

Abbildung 48: Inhibition der eukaryotischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

Abbildung 49: Einfluss von rhuEPO, CEPO, Eisen und/oder Chlorophyllin (2 Tage Inkubation) auf die Zellproliferation von K562 Zellen

Abbildung 50: Einfluss von rhuEPO, CEPO, Eisen und/oder Chlophyllin (4 Tage Inkubation) auf die Zellproliferation von K562 Zellen

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellungsanleitung für den 5x PBS Puffer

Tabelle 2: Verwendeter Lysis-Puffer (Promega) zum Lysieren der THP-1, K562 Zellen und von Lymphozyten.

Tabelle 3: Verwendete Konzentrationen rhuEPO

Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen CEPO

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen Eisen

Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen Chlorophyllin

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen Cycloheximid

Tabelle 8: Verwendete Konzentrationen Hygromycin B

Tabelle 9: Pipetierschema für die Standardgerade

Tabelle 10: Pipetierschema für 2 Polyacrylamidgelen

Tabelle 11: Verwendeter 2x Denaturing Sample Puffer

Tabelle 12: Verwendeter Elektrophoresepuffer

Tabelle 13: Anleitung zur Herstellung des Blot Puffer

Tabelle 14: Verwendete Blockierlösung

Tabelle 15: Im Western Blot verwendete 1. Antikörper

Tabelle 16: Im Western Blot verwendeten 2. Antikörper

Tabelle 17: Western Blot Chemiluminescent Reagenz

Tabelle 18: Belichtungszeiten im Chemilumineszent-Detektor

Tabelle 19: Anleitung für die Herstellung des Stripping Puffer

Tabelle 20: Für den ECLIA benötigte Reagenzien

Tabelle 21: Pipetierschema für die Standardreihe

Tabelle 22: Pipetierschema für den RT-Mastermix

Tabelle 23: Benötigte Reagentien

Tabelle 24: Benötigte Mengen an Reagenzien für die Negativ Kontrollen

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation

Tabelle 26: Primer, welche bei der RT PCR verwendet wurden

IV Schemataverzeichnis

Schema 1: Pathophysiologisches Modell.

Schema 2: Molekulare Pathologie der Friedreich`s Ataxie

1.0 Einleitung & Fragestellung

Die Friedreich's Ataxie (FRDA) ist eine autosomal-rezessive, neurodegenerative Erbkrankheit, deren Funktionsstörung durch eine verminderte Expression des mitochondrialen Proteins Frataxin verursacht wird. [PIANESE et al., 2004]

Friedreich's Ataxie ist die häufigste Form unter den vererbaren Ataxien, mit einer Prävalenz von 1:50.000. Verantwortlich für die Erkrankung ist zu ca. 95% ein Gendefekt welcher zu einer Expansion der GAA-Triplett-Repeats im ersten Intron des Frataxin-Gens führt, wodurch der Gehalt an Frataxin stark vermindert wird.

In etwa 5% der Fälle kommt es bei Patienten die heterozygot für die GAA-Expansion sind, aufgrund von Punktmutationen in anderen Allelen des Frataxin Gens zum Ausbruch dieser Krankheit [CAMPUZANO, 1996].

Bei der FRDA handelt es sich primär um eine neurologische Erkrankung. Es kommt zu einer Beeinträchtigung des Kleinhirn-Rückenmark-Bereichs und somit zu einer starken Einschränkung der Koordinationsfähigkeit und zu Muskelschwund.

Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer zunehmenden körperlichen Behinderung und somit zu einer dramatischen Verminderung der Lebensqualität. Die Lebenserwartung der Patient/innen reduziert sich auf nur 40-50 Jahre, hauptsächlich aufgrund der Folgeerkrankungen welche vor allem das Herz betreffen. [DÜRR, 2002]

Die Haupttodesursache ist eine hypertrophe Kardiomyopathie.

Frataxin ist ein Protein, welches vermutlich an der mitochondrialen Eisenhomöostase mitwirkt und für den Einbau von Eisen-Schwefel-Clustern in die Mitochondrien verantwortlich ist. [ROUAULT, 2005]

Es wird vermutet, dass es aufgrund der gesteigerten Expression von Frataxin zu einer Eisenakkumulation in den Mitochondrien und in Folge dessen zu oxidativem Stress und Zellschädigung kommt.

Die genaue physiologische Funktion des Frataxin ist jedoch noch nicht bekannt.

Derzeit gibt es noch keine Heilungsmöglichkeit für die Friedreich's Ataxie. Im Vordergrund steht somit die Behandlung der Symptome und auftretenden Phänomene dieser Krankheit.

Hierfür werden physikalische Maßnahmen wie aktive Krankengymnastik und orthopädische Behandlungsmethoden verwendet, um einzelne Muskelpartien zu trainieren und um fehlende Koordination zu kompensieren.

Derzeit werden auch spezielle Medikamente, wie das Antioxidans Idebenon, getestet, um die Kardiomyopathie zu behandeln.

Zunehmendes Interesse bekommen neuerdings Medikamente, die den Frataxin-Gehalt anheben können. [VONCKEN et al., 2004]

Erythropoietin ist ein in den Nieren gebildetes hormonelles Protein, welches eine Schlüsselrolle bei der Bildung von roten Blutkörperchen (Erythropoese) und auch bei der Hämoglobinsynthese hat. Des Weiteren wurden neuro- und kardioprotektive Eigenschaften von EPO entdeckt. [SIREN, 2001]

EPO wird gentechnisch hergestellt und wird seit mehreren Jahren zur Behandlung von Anämie, Niereninsuffizienz, Krebs, HIV-Infektion und illegal im Dopingbereich verwendet. [BRINES & CERAMI, 2005]

Darüber hinaus konnte in mehreren Studien ein Anstieg des Frataxin-Levels um das zwei- bis fünffache durch rhuEPO gezeigt werden. [STURM et al. 2005] In einer klinischen Pilotstudie mit Friedreich's Ataxie Patienten konnte ein signifikanter Anstieg der Frataxin Expression durch die Verabreichung von rhuEPO gezeigt werden. [BOESCH, 2007] Der genaue Mechanismus hierfür ist noch unbekannt.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war neben der Untersuchung der Frataxin-erhöhenden Wirkung des rekombinanten humanen Erythropoietin (rhuEPO), auf unterschiedliche Zelltypen die Erforschung der Rolle des klassischen EPO Rezeptors für diesen Mechanismus.

Hierfür wurden sowohl K562 Zellen, welche bekannter Weise den klassischen EPO Rezeptor exprimieren, als auch THP-1 Zellen, welche diesen Rezeptor nicht exprimieren, verwendet. [WEISS et al., 1997]

EPO wird nicht nur in den Nieren exprimiert, wie ursprünglich angenommen wurde, sondern auch in anderen Geweben inkl. dem Nervengewebe. [UDUPA, 2006]

Des Weiteren wurde untersucht ob das nicht-erythropoetische EPO-Derivat carbamyliertes EPO (CEPO), welches nicht an den klassischen EPO Rezeptor binden kann, ebenfalls die Expression von Frataxin erhöhen kann.

Es wurde sowohl die Effekte von rhuEPO auf die mRNA von Frataxin als auch auf das Protein selbst in den Zellen untersucht, um zu erforschen, ob die regulatorischen Effekte des rhuEPO auf Frataxin prä- oder post-translationell sind.

Ziel war es herauszufinden ob die Verabreichung von rhuEPO einen Effekt auf die transkriptionale oder post-transkriptionale Frataxin-Expression hat. Es wurden sowohl die Effekte von verschiedenen Dosen als auch von verschiedenen Inkubationszeiten mit rhuEPO auf die mRNA- und Proteinlevels, untersucht.

2.0 Literaturüberblick

2.1 Friedreich`s Ataxie

Friedreich`s Ataxie ist eine autosomal rezessiv vererbare, neurodegenerative Erkrankung welche in 98% aller Fälle durch eine Expansion von GAA-Triplett-Repeats in dem Gen STM7/X25 auf Chromosom 9q, verursacht wird. [SCHÖLS et al, 1997]

Benannt wurde die Friedreich`s Ataxie nach dem deutschen Neurologen Nicolas Friedreich, der diese Krankheit 1863 zum ersten Mal beschrieben hat. [ALPER et al., 2003]

2.1.1 Genotyp- und Phänotyp Zusammenhang

Das phänotypische Spektrum der Friedreich`s Ataxie ist sehr breit und wird signifikant durch die Länge der GAA-Triplett-Repeats beeinflusst, mit einer engen Beziehung zwischen Geno- und Phänotyp. [SCHÖLS et al, 1997]

Die Länge der GAA-Repeats korreliert invers mit dem Alter des Krankheitsausbruchs, Ausbruch einer Dysarthie und der Verlaufsgeschwindigkeit. [SCHÖLS et al, 1997]

Ristow et al demonstrierten in einer Studie, dass der X25/frataxin GAA Polymorphismus mit nicht insulinabhängigem Diabetes Mellitus in Verbindung steht, und zwar mit einer höheren Häufigkeit als andere Mutationen die hierfür beschrieben wurden. [RISTOW et al., 1998]

Die klinischen Kriterien, welche von Harding eingeführt wurden (autosomal rezessive Vererbung, Ausbruch vor dem 25igsten Lebensjahr, Fehlen von Fußreflexen und die Beteiligung des pyramidalen Traktes) haben sich als sehr spezifisch erwiesen.

Nur wenige Patienten mit diesem typischen Phänotyp tragen keine GAA Expansion im Frataxin-Gen. Viele Patienten erfüllen jedoch diese Kriterien von Harding nicht.

Damit verbundene Studien haben gezeigt, dass bei Patienten mit Ausbruch der Krankheit nach dem 25igsten Lebensjahr derselbe Locus beteiligt ist. Zum Ausbruch der Krankheit kommt es in den meisten Fällen in der Pubertät.

Die üblichen Symptome bei Ausbruch sind progressive Ganginstabilität oder generelle Schwerfälligkeit. Bei frühem Ausbruch können Skoliose oder Kardiomyopathie der Gang-Ataxie vorangehen. Es sind auch atypische Verlaufsformen, spastische Ataxie bei spätem Ausbruch der FA oder eine rein sensorische Ataxie möglich. In einigen Fällen kommt es auch zu unüblichen Erscheinungen wie Ophthalmoplegia, Schüttelkrämpfen oder Chorea. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

Wegen der limitierten Patientenzahl mit derselben Punktmutation konnte keine enge Beziehung zwischen Genotyp und Phenotyp bewiesen werden. Die einzige Ausnahme hierfür ist die G130V Mutation, welche aus einer einzigen Stammmutation hervorgeht. Die meisten Patienten mit dieser G130V Mutation zeigen einen frühen Ausbruch der Friedreich`s Ataxie mit Beteiligung des Pyramidaltraktes, was zu spastischen Lähmungen führt. [BIDICHANDANI et al., 1997]

2.1.2 Inzidenz und Prävalenz

Mit einer Prävalenz von 1:30 000 - 1:50 000 und einer Trägerrate von ungefähr 1:85 in der weißen Bevölkerung ist die Friedreich`s Ataxie die häufigste unter den erblichen Ataxien. [FOGL & PERLMANN, 2007]

In afrikanischen und asiatischen Ländern ist ihr Auftreten hingegen nur sehr selten.

Eine Studie welche das FRDA Gen in 178 gesunden Probanden prüfte, zeigte eine Trägerrate von 1:60 – 1:90. [DELATYCKI et al., 2000]

2.1.3 Molekulare Genetik

Das humane FRDA Gen, X25 ist am Chromosom 9p13 lokalisiert und besteht aus sieben Exons, welche sich auf 80 kb genomischer DNA erstrecken. [PUCCIO et al., 2000]

Dieses Gen kodiert für das Protein Frataxin. Aufgrund der erhöhten Anzahl von GAA-Repeats kommt es zu einer so genannten „sticky“-Triplex Formation der DNA Struktur, welche die Transkription dieses Gens verhindert und somit die Proteinproduktion limitiert. [FOGL & PERLMANN, 2007]

Auch Punktmutationen des Frataxin Gens können in seltenen Fällen (2 – 4% der FRDA Patienten) diese Krankheit verursachen. [FOGL & PERLMANN, 2007]

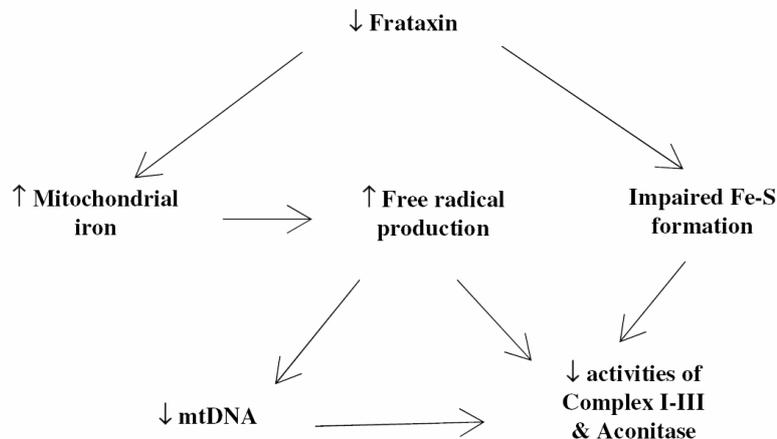
Auf Chromosomen von Gesunden finden sich nur 7 bis 29 GAA-Triplett-Repeats, bei Patienten der Friedreich's Ataxie hingegen erfolgt eine Expansion auf 66 bis 1360 GAA-Triplett-Repeats.

Aktuellen Studien zufolge beeinträchtigt ein Mangel an Frataxin den mitochondrialen Eisentransport und die Funktion der Atmungskette und trägt zu erhöhtem oxidativem Stress und Zellschädigung bei.

Studien mit dem Frataxin-homologen Gen YFH1p aus Hefepilzen zeigen eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und eine Akkumulation von Eisen ebenso wie eine Unfähigkeit der Entgiftung von Eisen, was sich in einer Hypersensitivität gegenüber oxidativem Stress äußert. [FOGL & PERLMANN, 2007]

2.1.4 Pathogenese

Der Mangel an Frataxin steht in Verbindung mit der mitochondrialen Dysfunktion und intramitochondrialen Eisenakkumulation. Anhand von Studien mit Frataxin-homologen Hefepilz-YFH1-Mutanten wurde gezeigt, dass ein Mangel dieses Gens zu mehreren Defekten der mitochondrialen Atmung, einem Verlust von mitochondrialer DNA, sowie zu intramitochondrialer Eisenakkumulation und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führt. [LODI et al., 2006]



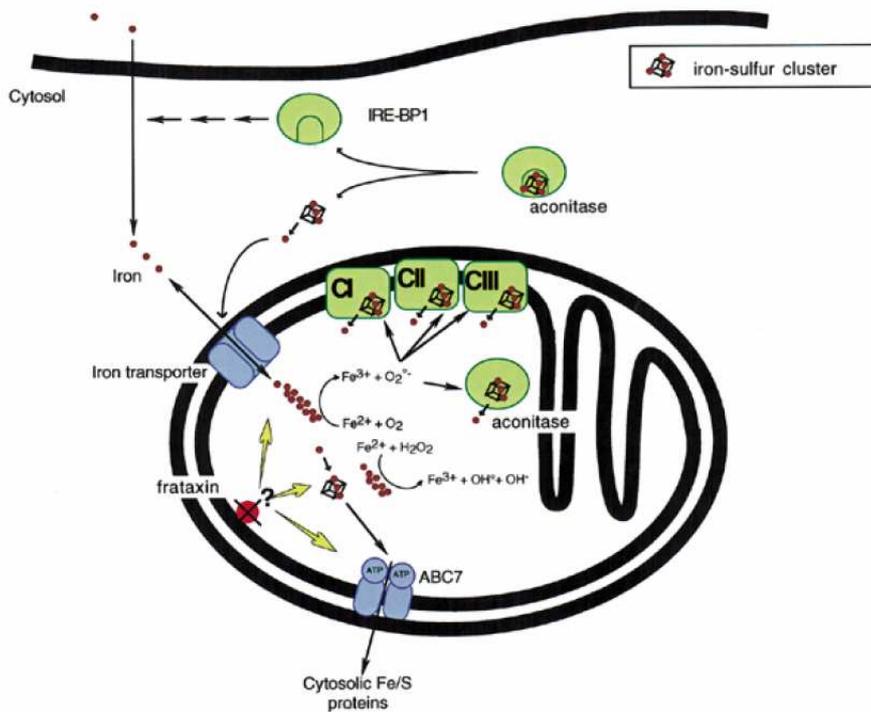
Schema 1: Pathophysiologisches Modell

Schematische Darstellung der Mechanismen im Zusammenhang mit einem Frataxin Mangel und einhergehendem Zelltod in der Friedreich's Ataxie. [VONCKEN et al., 2004]

Anhand von Kollokalisationsstudien mit mitochondrialen Markern fand man heraus, dass es sich bei Frataxin um ein mitochondriales Protein handelt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen die Lokalisation von Frataxin an der mitochondrialen Membran. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

Rötig et al. fand in Herzbiopsien zweier Patienten selektive Mängel der Atmungskettenkomplexe I, II und III und der mitochondrialen sowie der cytosolischen Aconitaseaktivität (eine Reduktion ca. um das 10fache). [RÖTIG et al., 1997]

Alle mangelhaften Enzyme und Komplexe enthalten Eisen-Schwefel (Fe-S) Cluster in ihrem aktiven Zentrum. Fe-S Proteine sind außergewöhnlich sensibel gegenüber freien Radikalen, und ihre Inaktivierung führt zu oxidativem Stress in FRDA-betroffenem Gewebe. [PUCCIO & KOENIG, 2000]



Schema 2: Molekulare Pathologie der Friedreich's Ataxie

Frataxin reguliert zusammen mit mitochondrialen Membranen die Eisen Homeostase in dieser Organelle. [PUCCIO & KOENIG, 2000]

Ob der Mangel an Fe-S Proteinen eine Folge von mitochondrialer Eisenakkumulation ist, ist derzeit noch nicht geklärt. Jüngste Studien mit Hefen weisen jedoch darauf hin, dass Frataxin zu mitochondrialem Eisenabfluss führt. [RADISKY et al., 1999]

Mitochondrialer Aconitasemangel scheint nicht nur eine Konsequenz der mitochondrialen Dysfunktion zu sein. Darüber hinaus weist die Inaktivierung der cytosolischen Aconitase in FRDA Patienten darauf hin, dass ein genereller Eisen-Schwefel-Defekt der verantwortliche Mechanismus ist. [KAPTAIN et al., 1991]

Der Verlust der cytosolischen Aconitase-Aktivität in FRDA zeigt auch einen Abfall des cytosolischen Eisengehaltes, da cytosolische Aconitase als Antwort auf eine niedrige Eisenkonzentration, in aktives IRP (iron-responsive element-binding protein) umgebaut wird. [RAUOULT et al, 2006]

2.1.5 Klinische Symptome

Ein klinisches Charakteristikum der Friedreich's Ataxie ist der Ausbruch vor dem Erreichen des zwanzigsten Lebensjahres. Es kommt zu einer progressiven Ataxie, Reflexverlust der Sehnen, Gliederschwäche und erheblichen sensorischen Verlusten. Ein signifikanter Anteil der Patienten entwickelt eine Kardiomyopathie, Diabetes Mellitus und Skelettabnormalitäten wie etwa Cifusculiosis. [FOGL & PERLMAN, 2007]

Weitere Symptome sind Nystagmus und Spastizität.

2.2 Frataxin

Aufgrund von Untersuchungen der letzten 6-7 Jahre hat sich die die Friedreich´s Ataxie als eine Störung der GAA-Triplets-Repeat Wiederholungen des Frataxin Gens etabliert, was dazu führt, dass das Protein Frataxin nicht in normalen Mengen produziert wird. Friedreich´s Ataxie Patienten haben also zu wenig Frataxin. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

2.2.1 Lokalisation von Frataxin

Frataxin ist ein 17 kDa kleines Protein der mitochondriale Matrix, das aus 210 Aminosäuren besteht. Das Vorläuferprotein enthält eine N-terminale Transport-Sequenz welche den Transport des Frataxin in die Mitochondrien dirigiert. [CONDO et al., 2007]

Beim Menschen wird es hauptsächlich im Kleinhirn und in motorischen Nervenzellen, im Pankreas, in Zellen des Herzmuskels, Leber-, Muskel- und Thymuszellen und im braunen Fettgewebe exprimiert. Mitochondrialer Import und Reifung von Frataxin sind evolutionär hoch konserviert, was durch experimentelle Versuche mit Hefepilzen, Mäusen und humanen Frataxin-Homologen dokumentiert wurde. [CONDO et al., 2007]

2.2.2 Funktionen von Frataxin

Trotz zahlreicher Untersuchungen mit unterschiedlichen Modellen (Bakterien, Hefepilzen, Mäusen, humane Zellen) ist bis heute die exakte Funktion von Frataxin nicht geklärt.

Eine der häufigsten Hypothesen beschäftigt sich mit der Rolle des Frataxin Proteins in der mitochondrialen Eisenhomöostase. [STURM et al. 2005]

2.2.2.1 Frataxin im mitochondrialen Eisenstoffwechsel

In Eukaryoten ist Frataxin notwendig für die normale Funktion der Mitochondrien. Anhand des Frataxin homologen YFH1 Gen aus dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*, welches für das mitochondriale Protein YFH1p kodiert, konnte gezeigt werden, dass die Entfernung dieses Gens zu einer signifikanten Eisenakkumulation in

den Mitochondrien führt was einem Verlust an mitochondrialer DNA und -Atmung führt. In Folge dessen kommt es zur Produktion von freien Radikalen, welche bekannt dafür sind, Fette, Proteine und das mitochondriale Genom zu schädigen. [BECKER et al 2000]

Anhand mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass das Ausmaß des Mangels an Frataxin mRNA von der Länge und Orientierung der Expansion abhängt und mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine Störung der Transkription verursacht wird. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

2.2.2.2 Frataxin und Oxidativer Stress

Es wird angenommen, dass Frataxin mit dem mitochondrialen Oxidationsprozess interferiert und zu einer erhöhten Eisenanreicherung in den Mitochondrien führt. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

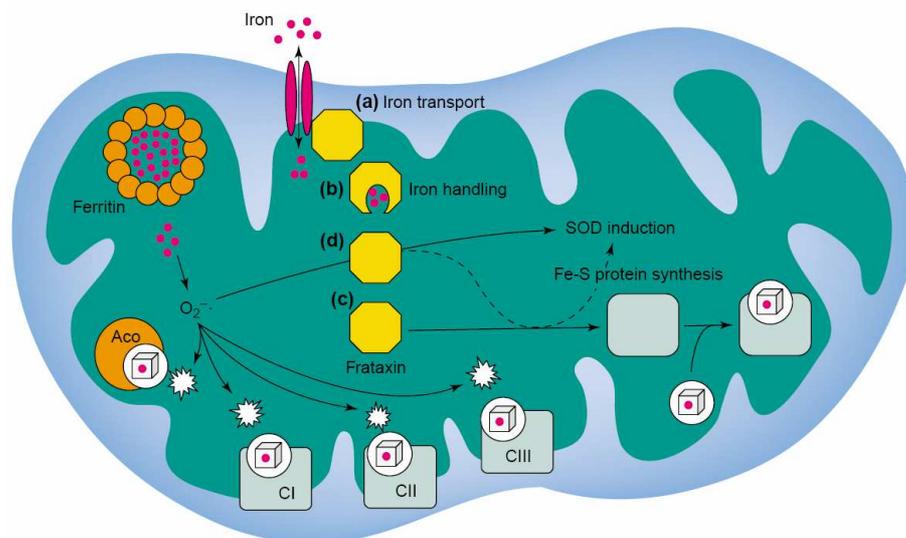


Abbildung 1: Hypothesische Funktionen von Frataxin

(a) Frataxin, ein Protein welches im mitochondrialen Eisentransport involviert ist. (b) Frataxin, spielt eine Rolle beim mitochondrialen Eisentransport. (c) Frataxin ist am Aufbau der Eisen-Schwefel Cluster beteiligt. (d) Frataxin schützt vor freien Radikalen. Abkürzungen: aco: Aconitase; CI, CII, CIII: Komplex I, II und III der Atmungskette; SOD: Superoxid Dismutase [RÖTIG et al., 2002]

2.2.2.3 Frataxin und die Synthese von Eisen-Schwefel Clustern

Frataxin wird für die Hämsynthese benötigt und spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Eisen-Schwefel Clustern. Eine Mutation des Frataxin Gens wirkt sich folglich spezifisch auf diese Eisen-Schwefel Enzyme wie die mitochondriale Aconitase und die Ferrochelatase aus, da Frataxin mit der ISCU interagiert. ISCU stellt das Grundgerüst für die Bildung der Eisen-Schwefel Clusters dar. [SHAN et al., 2007]

Eisen-Schwefel Cluster wirken auch als essentielle Cofaktoren zahlreicher Proteine, welche für Enzymkatalyse, Elektronentransport und für die Regulation der Genexpression benötigt werden. [STEHLING et al., 2004]

Derzeit ist jedoch noch nicht geklärt ob diese Eisenakkumulation die primär verantwortliche Ursache für die Symptome der Krankheit Friedreich's Ataxie ist. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

Die humane Ferrochelatase ist ein Enzym, welches Eisen-Schwefel Cluster enthält. Aufgrund von Mutationen in der Eisen-Schwefel Protein Synthese kommt es laut Stehling et al zu einer substanziellen, reversiblen Inhibition der Ferrochelatase. [STEHLING et al., 2004]

2.3 Mögliche Therapieansätze für die Friedreich's Ataxie

Derzeit gibt es noch keine Heilungsmöglichkeit für die Friedreich's Ataxie. Im Vordergrund steht somit die Behandlung der Symptome und auftretenden Phänomene dieser Krankheit.

Der Verlust der mitochondrialen Atmungsfunktion und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sind typische Merkmale der Friedreich's Ataxie. In klinischen Studien wurde vor allem die Wirkung von Antioxidantien und Eisenchelatoren auf den Fortschritt der Krankheit untersucht. [MYERS et al., 2008]

2.3.1 Antioxidantien

Die Pathologie der Friedreich's Ataxie steht bekannter Weise in Zusammenhang mit der Aktivität von freien Radikalen. Diese freien Radikale können durch Antioxidantien entgiftet werden und stellen somit eine potentielle Therapieform für FRDA Patienten dar. [VONCKEN et al., 2004]

Idebenon, ein kurzkettiges, synthetisches Analoges von Coenzym Q10, wird eingesetzt um das häufige Auftreten von Symptomen der Kardiomyopathie zu behandeln. Es wirkt hemmend auf die Lipidperoxidation, stimuliert die Funktion von Mitochondrien und verbessert den Energiestatus des Herzmuskels bei Hypertrophie. [ALPER et al., 2003]

Ein anderes potentielles Antioxidans ist Coenzym Q, welches über neuroprotektive Eigenschaften verfügt. Coenzym Q wird zusammen mit Vitamin E eingesetzt. In einer Studie konnte jedoch nach 6 Monaten Therapie kein positiver Effekt mehr festgestellt werden. [VONCKEN et al., 2004]

Um die Effizienz von Coenzym Q plus Vitamin E in der FRDA Therapie zu bewerten, sind jedoch größere kontrollierte Studien notwendig. [ALPER et al., 2003]

2.3.2 Eisenchelatoren

Oxidativer Stress scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Friedrich`s Ataxie bei primärer oder sekundärer mitochondrialer Eisenakkumulation zu spielen. [ALPER et al., 2003]

Eine Strategie zur Behandlung der Friedrich`s Ataxie ist der Einsatz von Eisenchelatoren, welche die Mitochondrienmembranen durchdringen können.

Desferrioxamin (DFO) kann jedoch die mitochondriale Membran nicht effizient passieren und bisherige Studien haben gezeigt, dass dieser Chelator das Eisen von eisenüberladenen Mitochondrien nicht effektiv mobilisieren kann. [BECKER et al., 2000]

Ponka zeigte, dass der Chelator Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazon (PIH) über eine hohe Aktivität beim Mobilisieren von mitochondrialem Eisen aufweist. [PONKA, 2004]

In vitro und *in vivo* Studien zeigten, dass PIH und sein Analoges ein hohes Potential für die Behandlung von Krankheiten aufweisen, welche durch eine Eisenakkumulation entstehen. [BECKER et al., 2000]

Eine weitere, mit dem PIH verwandte Gruppe von Chelatoren, die 2-Pyridylcarboxyaldehyd-Isonicotinyl-Hydrazon Analogen (PCIH) stellen eine effektivere Alternative zu PIH dar. Und auch der orale Chelator Deferiprone (L1) stellt eine mögliche Behandlungsoption für die Patienten dar und wurde bereits in einer nicht-Placebo kontrollierten Pilotstudie getestet [BODDAERT et al, 2007].

Es wurde gezeigt, dass FRDA Patienten über normale Serum-Eisen und Ferritin Konzentrationen verfügen.

Der Einsatz von Eisenchelatoren in der FRDA Behandlung wird kontrovers diskutiert. [ALPER et al., 2003]

2.3.3 Steigerung der Frataxin Expression

Friedreich's Ataxie beruht auf einer Reduktion der Frataxin Expression auf einen kleinen Prozentsatz des normalen Levels. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Krankheit und der Frataxin Expression.

Deshalb gilt das zunehmende Interesse neuerdings Medikamenten, die den Frataxin-Level um das 5- bis 10-fache anheben können. [VONCKEN et al., 2004]

2.4 Mortalin

Mortalin wurde anfangs als ein Mortalitätsfaktor geklont, welcher in der cytoplasmatischen Fraktion von normalen, nicht jedoch in unsterblichen Maus-Fibroblasten vorhanden ist. Seine Rolle als house-keeping Protein des mitochondrialen Imports, in der Energiegewinnung und bei der Proteinfaltung wurde bereits mehrmals belegt. Neuere Befunde zeigen weiters, dass Mortalin durch multiple Bindungspartner vor Stress schützt und als Killerprotein fungiert welches einerseits zu Karzinogenese und andererseits zu Funktionsstörungen im hohen Alter beiträgt. [KAUL et al., 2006]

Mortalin/GRP75 Chaperon ist ein durch Stress induziertes mitochondriales Peptid welches an der Faltung und Insertion von Eisen-Schwefel-Cluster in importierte mitochondriale Proteine mitwirkt. [SHAN et al., 2007]

Lokalisiert ist dieses 679 Aminosäuren lange und 74 kDa schwere Protein in den Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum, in der Plasmamembran und in cytoplasmatischen Vesikeln. Mortalin ist ein essentielles Protein mit vielfältigen Funktionen in Bezug auf Proliferation, Funktionserhaltung und Stressantwort. Anhand von humanen erythroiden Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass Mortalin durch EPO induziert wird.

In einer Studie von Ohtsuka et al. wurde gezeigt, dass das Wachstum der ECF Zellen durch EPO beeinflusst wird, indem Suppression oder Überexpression von Mortalin induziert wird. [OHTSUKA et al., 2007]

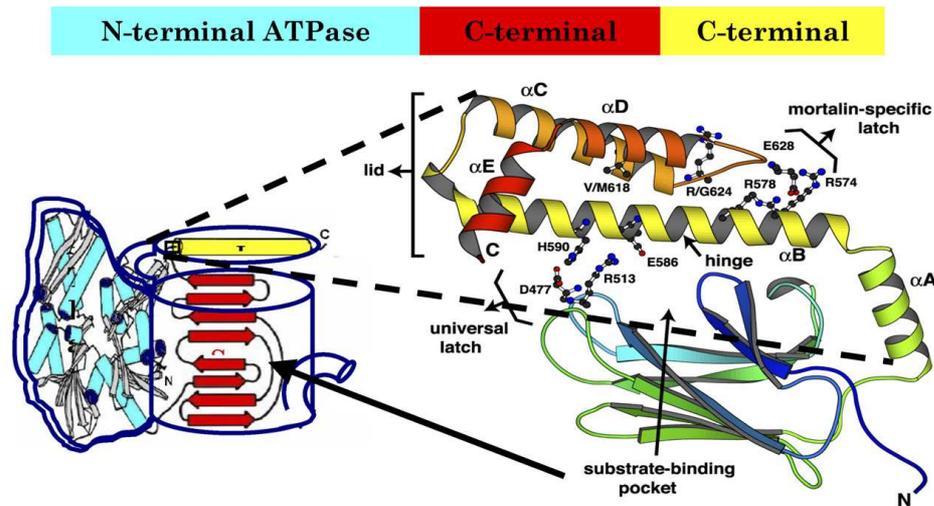


Abbildung 2: Struktur von Mortalin (basierend auf Homologie-Modellen)

Kessel-Modell: Die N-terminale ATP Bindungsdomäne als Henkel, Substratbindung Domäne (SBD) als Kessel und der C-Terminus auf der linken Seite. [KAUL et al., 2006]

Durch Koimmunopräzipitation und Massenspektrometrie konnten Shan et al Mortalin als einen multiplen Interaktor des mitochondrialen Frataxin in Säugetierzellen identifizieren. Diese Interaktion zwischen flag-tagged Frataxin und myc-tagged GRP75 konnte mit unterschiedlichen Epitopen der Koimmunopräzipitation bestätigt werden. Mortalin/GRP75 ist dem ssq1 Chaperon von Hefepilzen homolog, welches Eisen-Schwefel-Cluster in importierte mitochondriale Proteine integriert. [SHAN et al., 2007]

Mortalin gehört zur Familie der Hitzeschock-Proteine 70 (hsp70) der Chaperone. Der Anteil an Mortalin mRNA in erythroiden kolonie-formenden Zellen (ECFCs) ist abhängig von der EPO Dosis, und das Wachstum der ECF Zellen ist abhängig von der Menge an Mortalin. [OHTSUKA et al., 2007]

2.5 Erythropoietin (EPO)

Erythropoietin ist ein 30 kDa schweres, körpereigenes Glykoprotein, das primär in der Niere, von den interstitiellen Fibroblasten und in geringerem Ausmaß auch in den Leberzellen als Antwort auf erniedrigte Sauerstoffsättigung (Hypoxie) des arteriellen Blutes gebildet wird.

EPO erhöht die Masse an roten Blutzellen durch die Stimulierung der Proliferation und Differenzierung von reifen Vorläufern der roten Blutzellen, sowie der kolonie-bildenden Einheiten. Diese Effekte von EPO auf die Zellen werden durch einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche, den EPO-Rezeptor vermittelt. [WEISS et al., 1997]

1906 wurde von Carnot und De Flandre erstmals gezeigt, dass diese humorale Substanz die Produktion von roten Blutzellen reguliert [MARTI, 2004].

Im Jahre 1989 wurde gentechnisch hergestelltes EPO eingeführt, womit ein signifikanter Fortschritt in der Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz zu verzeichnen war. [SMITH et al., 2003]

Erythropoietin ist ein Schlüssel-Cytokin, welches die Proliferation und die Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen reguliert. EPO induziert durch Bindung an seinen Rezeptor die Aktivierung der Rezeptor-Assoziierten JAK2 Tyrosinkinase und stimuliert die Phosphorylierung des Rezeptors selbst und von anderen Proteinen. Darauf hin werden mehrere intrazelluläre Signalwege inklusive der Mitogen-aktivierten Proteinkinase, STAT5, p70^{S6k}, Proteinkinase B/Akt, und Phosphatidylinositol 3-Kinase aktiviert. [NERI et al., 2001]

Die Eigenschaft von EPO bei der Aktivierung der IRE-Bindung durch IRP (Iron Responsive Protein) mitzuwirken, konnte in den humanen monocytischen THP1 Zellen nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu erythroleukämischen und erythroiden Vorläuferzellen wie Mel oder K562 Zellen, exprimieren humane Makrophagen und Makrophagen-ähnliche Zelllinien keinen EPO-Rezeptor. [WEISS et al., 1997]

Da das Vorhandensein von ausreichendem Eisenangebot eine Grundvoraussetzung für die erythroide Proliferation und Hämoglobinsynthese ist, wirkt EPO regulierend auf den zellulären Eisenmetabolismus. [YOUSSOUFIAN et al., 1993]

2.5.1 Rolle von EPO in der Erythropoiese

Anhand von Kulturen von blutbildenden Stammzellen im halbfesten Medium wurde gezeigt, dass das Hauptziel von EPO die späten erythroiden Stammzellen, vor allem die kolonie-bildenden Einheiten – erythroid (CFU-E) sind. Die EPO Stimulierung ist essentiell für das Überleben und die Proliferation von CFU-E. [LACOMBE et al., 1999]

Hypoxie führt zur Translokation der α -Untereinheit des HIF (Hypoxie-induzierten Faktors) vom Zytoplasma in den Zellkern von Zellen, welche EPO exprimieren. HIF- α bindet an HIF- β . [BRINES et al., 2005]

Es entsteht das Heterodimer HIF-1, welches an das CREB (cAMP response element-binding protein) und an p300 (ein weiterer Transkriptionsfaktor) bindet. Der entstandene Proteinkomplex leitet durch Bindung an das EPO-Gen die Transkription ein. [JELKMANN, 2004]

Bei der Erythropoiese bindet EPO im Knochenmark an den transmembranen Erythropoietin-Rezeptor der Vorläuferzellen des Typs BFU-E (Erythroid Burst Forming Units), die zunächst zu den reifen Vorläuferzellen des Typs CFU-E (Erythroid Conlony Forming Units) ausdifferenzieren. Diese wiederum proliferieren zu Erythroblasten und anschließend zu Retikulozyten, die in den peripheren Kreislauf übertreten und dort zu Erythrozyten heranreifen. [LACOMBE et al., 1998]

2.5.2 Strukturelle Eigenschaften

Das unverzweigte Polypeptid EPO besteht aus 165 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von etwa 30 kDa. Die Tertiärstruktur besteht aus vier antiparallelen α -Helices mit benachbarten Schleifen. Der Kohlenhydratanteil (etwa 40% der Molekülmasse) besteht aus einer O-glykosidisch (Serin auf Position 126) und drei N-glykosidisch (Asparagin auf Position 24, 38 und 83) gebundenen Zuckerseitenketten, welche für die Stabilität von EPO während der Zirkulation wichtig sind. [JELKMANN et al., 2004]

Mit Hilfe einer von zwei Disulfidbrückenbindungen, welche die Aminosäure Cystein an Position 6 und 161 (und an Position 29 und 33) verbindet, erhält EPO jene biologisch-aktive Form, die an den EPO-Rezeptor bindet. [LAPPIN, 2003]

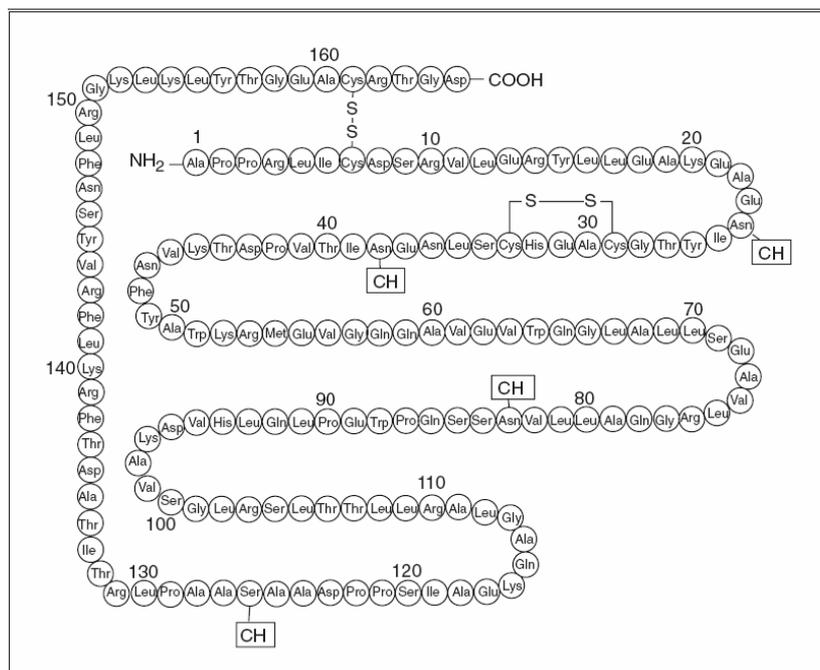


Abbildung 3: Primärstruktur von humanem Erythropoietin [LAPPIN, 2003]

2.6 Erythropoietin Rezeptor

Der Effekt von EPO auf erythroide Zellen wird durch den EPO-Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor gehört zur Superfamilie der Zytokin-Rezeptoren. [YOUSSOUFIAN et al., 1993] und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. Ein einzelnes EPO Molekül bindet auf der Zelloberfläche an zwei Rezeptoren. Darauf hin werden Tyrosine in der intrazellulären Domäne phosphoryliert und initiieren eine intrazelluläre Signalkaskade welche die Genexpression im Nukleus reguliert und somit das Überleben, Proliferation und Differenzierung kontrolliert. [LAPPIN, 2003]

Es handelt sich um einen transmembranen (Typ 1) Rezeptor mit einem Molekulargewicht von ca. 100.000 Dalton. Erythroide Zellen besitzen zwischen 1000 und 3000 EPO-Rezeptoren pro Zelle. Die Auslösung der Zellteilung durch EPO ist größtenteils Ca^{2+} abhängig. Der EPO-Rezeptor wird nicht nur von erythroiden Zellen, sondern auch von normalen Zellen anderer Gewebe exprimiert. [UDUPA, 2006]

In den erythropoetischen Vorläuferzellen wird der EPO Rezeptor in verschiedenen Formen wie in voller Länge (F-EpoR), in verkürzter Form (T-EpoR) und in einer löslichen Form (S-EpoR) exprimiert, [SINCLAIR et al., 2007] und besteht aus 8 Exons (Exon 1-5: extrazellulär, Exon 6: im inneren Membranbereich, und Exon 7 und 8: intrazellulär). [SMITH et al., 2003]

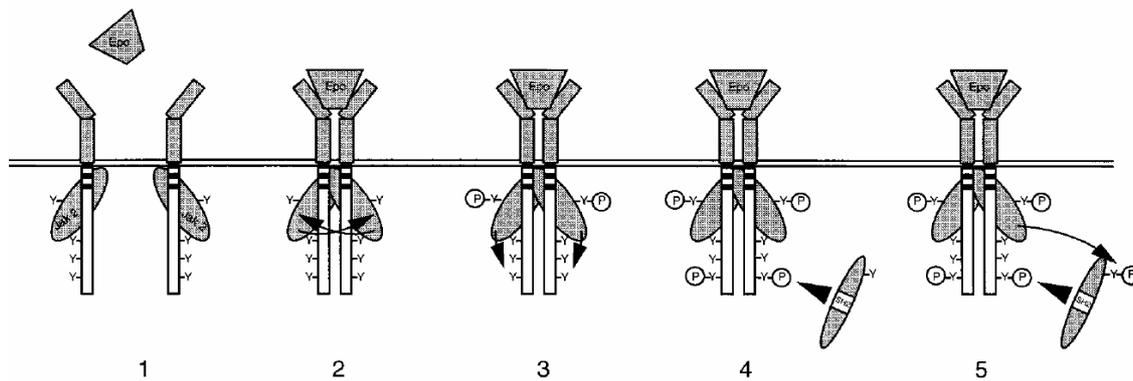


Abbildung 4: Signalkaskade des EPO Rezeptors

EPO Aktivierung führt zur Dimerisierung des EPO-Rezeptors (1); die prä-assoziierte JAK Kinasen sind in engem Kontakt und werden durch die Transphosphorylierung aktiviert (2). Die Tyrosinreste des EPO-Rezeptors sind phosphoryliert (3,4), und stellen Andockstellen für intrazelluläre Signalproteine mit Src Homologen (SH2) Domänen zur Verfügung. (5). [LACOMBE, 1999]

Durch EPO kommt es zur Homodimerisierung des EPO-Rezeptors, und in Folge dessen zur Aktivierung von JAK2 (Janus Tyrosine Kinase 2). Das führt zur Phosphorylierung von Tyrosylresten des EPO-Rezeptors, von Signalgebern und von Aktivatoren des Transkriptionsfaktors 5 (Stat5). Einige Proteine mit SH2 Domäne wie die PI3 Kinase werden ebenfalls aktiviert. Des Weiteren führt die Interaktion zwischen EPO und EPO-Rezeptor zur Aktivierung des Ras/MAPK Signalweges und der nuklearen Faktor-kB abhängigen Transkription, und zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Levels. [SMITH et al., 2003]

2.7 Carbamyliertes Erythropoietin (CEPO)

Ein bedeutender Nachteil von EPO besteht bei einer langzeitigen Anwendung bei nicht anämischen Patienten in der potentielle Gefahr, dass durch die im Übermaß gebildeten Blutkörperchen die Bildung von Blutgerinnsel begünstigt und somit das Risiko für die Entstehung von Thrombosen und Embolien verstärkt wird.

Aus diesem Grund wurde von Warren Pharmaceuticals (USA) und H. Lundbeck A/S (Dänemark) CEPO entwickelt. CEPO ist ein synthetisches EPO-Derivat, welches nicht an den klassischen EPO Rezeptor bindet. [ERBAYRAKTAR et al., 2006]

Durch die Kopplung sämtlicher Lysinmonomere des EPO Moleküls mit Carbamylresten wurde die Affinität von CEPO zu spezifischen neuronalen Rezeptoren erhöht. Diese EPO Variante besitzt ausschließlich zytoprotektive Wirkung ohne einen Einfluss auf die Erythropoese zu haben. Carbamyliertes EPO führt somit zu keiner Steigerung des Hämatokrits mit konsekutivem Hypertonus oder potentieller Thrombemboliegefahr. [LEIST et al., 2004]

Die Wirkung von CEPO beruht somit vielmehr auf den antiapoptotischen Effekten, wodurch das Absterben von myokardialem und neuronalem Gewebe unterbunden wird. Es konnten bereits erste Erfolge in Tierstudien bei der Behandlung von Schlaganfall, Enzephalitis und Herzinfarkt nachgewiesen werden. [FIORDALISO et al., 2004]

Erst kürzlich wurde ein zweiter Rezeptor für EPO, welcher die Gewebe-schützende Wirkung des EPO's vermittelt, identifiziert. Dieser besteht aus dem EPO Rezeptor und dem β -common (CD131) Rezeptor, welcher im Myocardium zu finden ist. [BIRNES et al., 2005]

Laut Leist et al wird die neuroprotektive Wirkung von CEPO durch diesen Rezeptor vermittelt und nicht durch den klassischen homodimeren EPO Rezeptor. [LEIST et al., 2004]

3.0 Material & Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (THP1, K562, und isolierte Lymphozyten) erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre in sterilen Zellkulturflaschen (Fa. Iwaki). Die Zelldichte wurde an drei Tagen der Woche auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt um eine logarithmische Wachstumsphase zu gewährleisten. Jeder Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen, nach Desinfektion bzw. Sterilisation (Heißluftsterilisator, WTB Binder) aller verwendeten Materialien, in einer Sterilbank (Laminar Air Flow Bio-II-A: Telstar) durchgeführt.

3.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Suspensionszellen verwendet:

Als Modell für erythroide Zellen wurde die Zelllinie K562 herangezogen. K562 Zellen exprimieren den klassischen EPO-Rezeptor. Bei den THP-1 Zellen handelt es sich um humane Monocyten, welche den klassischen EPO-Rezeptor nicht exprimieren.

Des Weiteren wurden humane Lymphozyten von gesunden Probanden und von Friedreich's Ataxie Patienten, eingesetzt.

3.1.1.1 K562

Die K562 Zellen wurden von Lozzio et al aus der pleuralen Effusion einer 53 jährigen Frau mit chronischer myelogener Leukämie in terminaler Blastenkrise, etabliert [LOZZIO et al., 1975].

Aufgrund der Expression des wichtigsten Signalglykoproteins von roten Blutzellen, dem Glycophorin, auf der Zelloberfläche, welche mittels Immunofluoreszenz und Immunoprecipitation von markierten Membranpräparaten gezeigt werden konnte, wird diese Zelllinie als eine erythroleukämische Zelllinie beschrieben. [ANDERSON et al., 1979]

Kultiviert wurden diese Zellen in komplettiertem RPMI 1640 Medium, bei 37°C und 5% CO₂.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

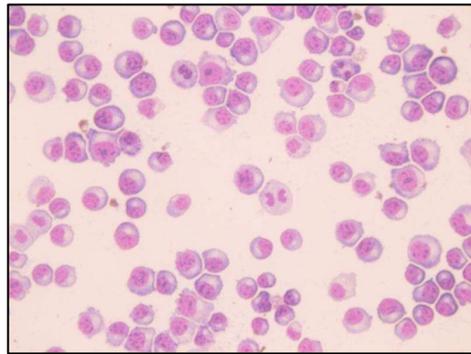


Abbildung 5: K562 Zellen (24h). Quelle: www.pbase.com/bigheadgirl/image/48101293

3.1.1.2 THP1

THP-1 Zellen wurden aus dem Blut eines einjährigen Knaben mit akuter monozytären Leukämie gewonnen. Diese Zelllinie hat Fc und C3b Rezeptoren, es fehlen ihr jedoch die oberflächen- oder zytoplasmatischen Immunoglobine. Für die Kultivierung können die monozytären Eigenschaften der THP-1 Zellen für mehr als 14 Monate aufrechterhalten werden. [TSUCHIYA et al., 1980]

Die Kultivierung von THP-1 Zellen erfolgt wie bei den K562 Zellen in komplettiertem RPMI 1640 Medium, bei 37°C und 5% CO₂.

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

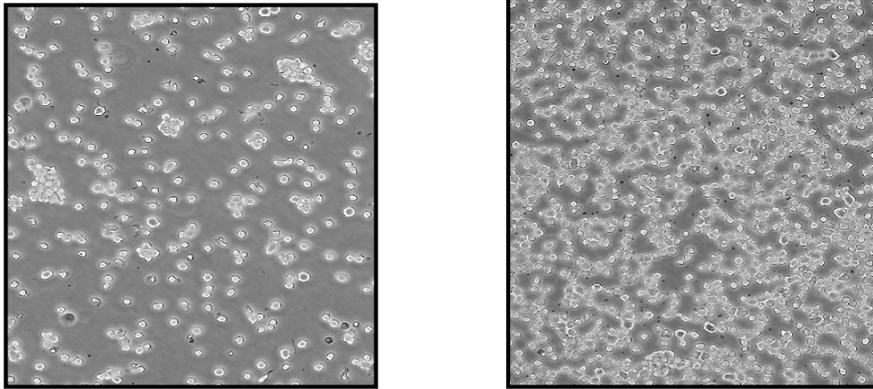


Abbildung 6: THP-1 Zellen. Quelle: www.atcc.org/Attachments/2001.jpg

1.1.3 Lymphozyten

Humane Lymphozyten wurden von gesunden Probanden und von Friedreich´s Ataxie Patienten aus frischen Heparin-Blutproben mittels Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

Die isolierten Zellen wurden auf eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und ebenfalls in komplettiertem RPMI 1640 Medium, bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂, kultiviert.

3.1.1.3 Ethik

Alle menschlichen Proben wurden gemäß den Empfehlungen der Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien entnommen und behandelt. Eine Einverständniserklärung wurde von den Patienten eingeholt. Die Empfehlungen der Ethikkommission stimmen mit der Deklaration von Helsinki über ethische Prinzipien für medizinische Forschung mit Einbindung von menschlichen Individuen überein.

3.1.2 Zellkulturmedium

3.1.2.1 RPMI

Als Standardkulturmedium für die Kultivierung der K562 und THP1 Zellen sowie auch für die isolierten Lymphozyten wurde RPMI 1640 (Biochrom KG), verwendet. Das RPMI-Trockenmedium wird in ca. 7 Liter bidestilliertem Wasser vollständig gelöst, und anschließend werden 20g Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Nach ca. 1 Stunden rühren am Magnetrührer (IKA® RCT basic) wird der pH Wert auf 7,2 eingestellt und auf ein Endvolumen von 10 Liter aufgefüllt. Anschließend wird dieses RPMI Nullmedium in der Sterilbank durch einen 0.2µm Sterilfilter (Sartolab P plus, Sartorius) zu je 500 ml in sterile Glasflaschen abgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei +4°C.

3.1.2.2 Komplimentieren des RPMI Nullmediums

Vor der Verwendung wird das Medium komplimentiert, um ein optimales Wachstum der Zellen zu garantieren und ein eventuelles Wachstum von Bakterien zu hemmen.

Zu 450ml Medium werden folgende Zusätze zugegeben:

50 ml FCS (fetal calf serum,), (GIBCO®)

5 ml L-Glutamin (PAA Laboratoriers GmbH)

5 ml Pen-Strep (Penicillin/Streptomycin), (Sigma)

500 µl Gentamycin (Antibiotikum), (GERBU Biotechnik GmbH)

3.1.2.2.1 RPMI Medium mit nicht-hitzeinaktiviertem FCS

Für Zellen, welche für den Proliferationsassay und den Western Blot inkubiert wurden, wurde nicht hitzeinaktiviertes FCS (fetal calf serum, Gibco) zur Komplimentierung des RPMI Mediums verwendet.

3.1.2.2.2 RPMI Medium mit hitzeinaktiviertem FCS

Für die Methoden ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay) und Real-time PCR wurde ausschließlich mit hitzeinaktiviertem FCS komplimentiertes RPMI Medium verwendet.

3.1.3 Medium wechseln

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Suspensionszellen verwendet. Bevor die Zellsuspensionen mit den jeweiligen Substanzen inkubiert wurden, wurde das Medium gewechselt.

Hierfür transferiert man die doppelte Menge der benötigten Zellen in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson Labware) und zentrifugiert 10 Minuten bei 25°C und 250g. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und 10 ml frisch komplettiertes RPMI-Medium hinzugegeben. Anschließend wird die Zelldichte auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Um eine logarithmische Wachstumsphase zu gewährleisten, werden die Zellen 2 - 3 mal wöchentlich gesplittet und auf die Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Es ist also notwendig, die Zellen sowohl vor der Verdünnung mit neuem Medium (RPMI), als auch nach der Verdünnung zu zählen.

Hierfür werden in der Sterilbank (Laminar Air Flow Bio-II-A: Telstar) 200µl der zu zählenden Zellsuspension entnommen, in ein Zellcountergefäß pipetiert und mit 9,8ml Counterflüssigkeit (Cellpack PK-30, Fa. Sysmex) vermengt. Anschließend erfolgt die Messung der Zellzahl in der Zellsuspension in einem elektronischen Zellcounter (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex).

3.1.5 Zellproliferationsassay & Trypanblau-Methode

Unter Zellproliferation versteht man die Vermehrung von Zellen in Geweben oder in einer Zellkultur aufgrund von Zellwachstum und –teilung.

In diesem Versuch war es das Ziel, die Teilungsgeschwindigkeit von K562 Zellen unter dem Einfluss diverser Substanzen zu testen. Zusätzlich wurde die Viabilität mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau (Fluka Chemie AG) bestimmt.

3.1.5.1 Trypanblau-Methode

Man verwendet diesen Vitalitätstest, um den Anteil vitaler Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Substanzen zu bestimmen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anionen an Zellproteine binden. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nicht auf, während tote Zellen aufgrund ihrer defekten Zellmembran diesen Farbstoff in das Cytosol aufnehmen und somit im Mikroskop als blau gefärbte Zellen gezählt werden können.

3.1.5.2 Durchführung der Trypanblau Methode

K562 Zellen wurden am Beginn des Experiments auf eine Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Es wurden je 500µl Zellsuspension pro Well in eine 6-Well-Platte (Greiner) ausgesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen von rhuEPO (Roche), CEPO (Lundbeck A/S, Dänemark), Eisen (Fe-Gluconat „Ferrlecit“) und/oder Chlorophyllin (Mg-Chlorophyllin), für 2 und 4 Tage, inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Die Zellzahl pro Milliliter wurde mittels Zellcounter (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex) bestimmt. Zur Bestimmung der Viabilität wurde 0,4%iges Trypanblau in isotoner NaCl Lösung verwendet.

Nachdem man die Zellsuspension im Mischungsverhältnis 1:1 mit der Trypanblau-Lösung vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert hat, werden die Zellen unter dem Mikroskop mit 10-40fach vergrößerndem Objektiv und in einer Bürker Zählkammer, ausgezählt. Es wird sowohl die Gesamtanzahl der Zellen sowie die Anzahl an blau gefärbten (toten) Zellen bestimmt.

Der Prozentsatz der nicht blau-gefärbten Zellen entspricht dem Anteil an vitalen Zellen.

3.1.5 Zellen ernten

Nach Ablauf der jeweils vorgesehenen Inkubationszeit (je nach Versuch mehrere Stunden bis Tage) wird die Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen in ein 15 ml Plastikröhrchen (Becton Dickinson Labware) überführt und die Zellkulturflasche mit 1x PBS Puffer nachgespült, um die restlichen Zellen zu gewinnen. Anschließend zentrifugiert man 8 Minuten bei 4°C und 250g. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit je 1ml 1x PBS Puffer gewaschen, wobei das Pellet in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß transferiert wird. Die 15 ml Plastikröhrchen (Becton Dickinson Labware) werden wiederum mit 1x PBS nachgespült, um die restlichen Zellen auch noch zu gewinnen. Nachdem 8 Minuten bei 4°C und 0,3 g zentrifugiert wurde, saugt man erneut den Überstand ab.

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, um den Zellstoffwechsel zu verlangsamen.

Abhängig von der folgenden Methode wird das Pellet eingefroren (-20°C oder -80°C) oder gleich im Anschluss lysiert.

5x PBS (pH 7,3)

NaCl (Fa. Merk)	80g
KCl (Fa. Merk)	2g
KH ₂ PO ₄ (Fa. Merk)	2g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	30g
H ₂ O destilliert	Ergänzung auf 2 Liter
pH Wert einstellen	7,3

**Tabelle 1: Herstellungsanleitung
für den 5x PBS Puffer**

1x PBS (pH 7,3)

1:5 Verdünnung des 5x PBS (pH 7,3) mit destilliertem Wasser.

3.1.6 Zellen lysieren

Abhängig von der jeweils benötigten Zellzahl/ml gibt man direkt nach dem Ernten der Zellen oder zu dem gefrorenen Pellet, 50 – 200 µl Cell Culture Lysis Reagent (Promega) zu dem Zellpellet. Nachdem sich das Pellet durch vortexen vom Boden des Eppis gelöst hat, wird das Zelllysate noch 5 sek. mit Ultraschall behandelt. Es folgt eine Zentrifugation von 5-7 Minuten bei 4°C und 8000 rpm. Anschließend transferiert man den Überstand in ein neues 1,5 ml Eppi und friert es bei -20°C oder -80°C ein.

Lysis Puffer	
K562, THP1	200 µl Promega Cell Culture Lysis Reagent 5x 800 µl H ₂ O destilliert 1 µl/ml 1mM PMSF (Stammlösung: 1M in DMSO)
Lymphozyten	200 µl Promega Cell Culture Lysis Reagent 5x 800 µl H ₂ O destilliert 1 µl/ml 1mM PMSF (Stammlösung: 1M in DMSO) 10 µl/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 10 µl/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 10 µl/ml NaF (Stammlösung: 1M)

Tabelle 2: Verwendeter Lysis-Puffer (Promega) zum Lysieren der THP-1, K562-Zellen und von Lymphozyten.

3.1.7 Lymphozyten isolieren und kultivieren

Die Separation von Lymphozyten aus humanen Vollblut erfolgt mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Dadurch werden die Lymphozyten aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten getrennt und in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert.

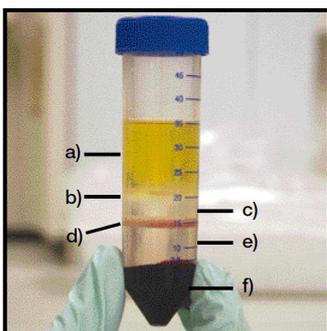
3.1.7.1 Vorbereitungen für die Lymphozytenisolierung

- Separationsmedium (Biocoll Separation Solution; lichtempfindlich) und PBS Dulbecco 1x wird auf Raumtemperatur erwärmt
- Man befüllt 50ml Leucosep®-Röhrchen (mit integrierter Trennscheibe von Greiner, BioOne) mit 15 ml Biocoll und zentrifugiert 1 Minute bei 25°C und 1000g. Biocoll sollte sich jetzt unterhalb der Trennscheibe befinden.

3.1.7.2 Durchführung der Lymphozytenisolierung

EDTA-Blut wird in 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson Labware) überführt und 1:2 mit PBS verdünnt. 25 ml dieses Gemisches werden in ein Leucosep®-Röhrchen überführt. Anschließend wird das Blut 15 Minuten bei 25°C und 800g ohne Bremse abzentrifugiert.

Folgende Schichtung ergibt sich nach der Zentrifugation (von unten nach oben):



- a. Plasma
- b. Angereicherte Zellfraktion
(Interphase aus Lymphozyten / PBMC`s)
- c. Separationsmedium
- d. Trennscheibe
- e. Separationsmedium
- f. Pellet (Erythrozyten und Granulozyten).

Abbildung 7: Schichtung nach der Zentrifugation. Quelle: Leucosep®

Die Plasmafraktion wird bis auf eine Schichtdicke von 5 bis 10 mm mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen, um eine Kontamination der Lymphozyten /

PBMC's mit Thrombozyten zu verhindern. Die angereicherte Zellfraktion (Lymphozyten / PBMC's) wird durch Ausgießen aus dem Leucosep®-Röhrchen in ein frisches Falcon Röhrchen geerntet. Eine Rekontamination mit den abgereicherten Erythrozyten und Granulozyten wird durch die Trennscheibe verhindert. Anschließend wäscht man mit PBS (ca. im Verhältnis 1:2) den Rest der angereicherten Zellfraktion in das Falcon Röhrchen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 25°C und 250g, wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml PBS 1x resuspendiert und in ein 15ml Röhrchen transferiert. Anschließend füllt man dieses mit PBS auf und zentrifugiert 10 Minuten bei 25°C und 250g. Das Zellpellet kann in komplettiertem RPMI-Medium resuspendiert und weiter kultiviert werden.

3.1.8 Inkubation der Zellen

Nachdem man die Zellen mittels Zellcounter gezählt und mit komplettiertem Medium (RPMI 1640) auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml (beim Proliferationsassay auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) eingestellt hat, werden je 10 ml in sterile 15 ml Röhrchen (Becton Dickinson Labware) pipettiert, welche für die Inkubation verwendet wurden. (Ausnahme: Beim Proliferationsassay wurden jeweils nur 500µl Zellsuspension/Well in einer 6-Well-Platte (Fa. Iwaki) inkubiert). Je nach Versuch wurden anschließend verschiedene Zusätze zugegeben. Nach Ablauf der jeweils vorgesehen Inkubationszeit werden die Zellen wie in Kap. 1.5 beschrieben wird geerntet.

Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5%igen CO₂ Atmosphäre. Alle notwendigen Arbeitsschritte werden in der Sterilbank (Laminar Air Flow Bio-II-A: Telstar) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.1.9 Verwendete Substanzen

3.1.9.1 RhuEPO (Recombinant human Erythropoietin, NeoRecormon 1000 IE, Roche, Basel, Schweiz) Konzentration der Stammlösung: 3,3 U/ μ l

Verwendete Endkonzentrationen: 0,5 U/ml, 1,1 U/ml, 3,3 U/ml, 6,6 U/ml, 9,9 U/ml, 18,6 U/ml

0,5 U/ml	0,75 μ l / 5ml Zellsuspension
1,1 U/ml	1,5 μ l / 5ml Zellsuspension
3,3 U/ml	5 μ l / 5ml Zellsuspension
6,6 U/ml	10 μ l / 5ml Zellsuspension
9,9 U/ml	15 μ l / 5ml Zellsuspension
18,6 U/ml	30 μ l / 5ml Zellsuspension

Tabelle 3: Verwendete Konzentrationen rhuEPO

3.1.9.2 CEPO (Carbamoylated Erythropoietin, Lundbeck A/S, Dänemark)

Konzentration der Stammlösung: 27 μ g/ml (verdünnt in PBS, 0.1% BSA)

Verwendete Endkonzentrationen: 1,1 U/ml, 3,3 U/ml, 6,6 U/ml, 9,9 U/ml, 18,6 U/ml

0,5 U/ml	0,75 μ l / 5ml Zellsuspension
1,1 U/ml	1,5 μ l / 5ml Zellsuspension
3,3 U/ml	5 μ l / 5ml Zellsuspension
6,6 U/ml	10 μ l / 5ml Zellsuspension
9,9 U/ml	15 μ l / 5ml Zellsuspension
18,6 U/ml	30 μ l / 5ml Zellsuspension

Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen CEPO

3.1.9.3 Eisen (Fe(III)-Natrium-Gluconat „Ferrlecit“, Aventis)

Konzentration der Stammlösung: 62,5mg/5ml

Verwendete Stammlösung: 12,5mg/ml

Verwendete Konzentration: 100 nmol/l

100 nmol/l	0,224µl / 0,5ml Zellsuspension
------------	--------------------------------

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen Eisen**3.1.9.4 Chlorophyllin (Mg-Chlorophyllin): (M = 724,1)**

Konzentration der Stammlösung: 1mmol/l

Verwendete Konzentrationen: 5 mol/l, 25 mol/l

5 µmol/l	2,5µl / 0,5ml Zellsuspension
25 µmol/l	12,5µl / 0,5ml Zellsuspension

Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen Chlorophyllin**3.1.9.5 Cycloheximid (Sigma)**

Stammlösung: 30mg Cycloheximid + 1ml H₂O dest.

Verwendete Konzentration: 15 µg/ml

15µg/ml	5µl / 10ml Zellsuspension
---------	---------------------------

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen Cycloheximid**3.1.9.6 Hygromycin B (Calbiochem)**

Stammlösung: 20mg/100µl

Verwendete Konzentration: 1 mg/ml

1mg/ml	50µl / 10ml Zellsuspension
--------	----------------------------

Tabelle 8: Verwendete Konzentrationen Hygromycin B

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung nach BioRad

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgte mit dem „BioRad Bradford-Reagens“ nach der Methode von Bradford (1976).

Diese Methode basiert auf der Bildung eines aus dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 und freien Aminogruppen von Proteinen bestehenden Komplexes. In saurem Milieu kommt es als Folge der Komplexbildung zu einem Farbumschlag von braun nach blau, bzw. zu einer messbaren Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm.

Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve (Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis 12 µg/ml) ermittelt. Hierzu verdünnt man die BSA Stammlösung 1:10 mit H₂O (1mg BSA/ml). Als Leerwert wird H₂O verwendet. Die Durchführung erfolgt im Doppelansatz.

BSA Lösung (verdünnt)	H₂O dest.	Konzentration
20 µl	780 µl	2 µg/ml
40 µl	760 µl	4 µg/ml
60 µl	740 µl	6 µg/ml
80 µl	720 µl	8 µg/ml
100 µl	700 µl	10 µg/ml
120 µl	680 µl	12 µg/ml

Tabelle 9: Pipetierschema für die Standardgerade

1 µl der Proteinlösung (Probe) wird mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und mit H₂O auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt.

Nach mindestens 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 200 µl der Ansätze in eine 96-Well Platte transferiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration der unbekanntes Probe wird anhand der Standardkurve mittels GraphPadPrism, Version 3.0 berechnet.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese diskontinuierliche Gelelektrophorese wird durchgeführt zur Auftrennung der Proteingemische.

3.2.2.1 Gel gießen (Apparatur von BioRad)

Zu Beginn säubert man die Glasplatten (10,1cm x 7,3 cm & 10,1 cm x 8,2 cm), den 1,5mm Spacer und die (10-well-)Kämme mit 70%igem Ethanol und trocknet diese anschließend. Nachdem man die Apparatur aufgebaut hat, pipettiert man das Gel zwischen die Glasplatten.

Folgendes Polyacrylamidgel wurde für die Proteinauftrennung verwendet:

	12% iges Trenngel (für 2 Gele)	4% iges Sammelgel (für 2 Gele)
H ₂ O dest.	9,8ml	3,75ml
ProSieve 50 gel solution (Cambrex)	4,8ml	500µl
1,5M Tris HCl, pH 8,8	5,0ml	-
1M Tris HCl, pH 6,8	-	650µl
10% SDS-Solution (Fa. Roth)	200µl	50µl
10% APS ¹ (Fa. Pharmacia Biotech)	200µl	50µl
TEMED ² (Fa. Pharmacia Biotech)	8,0µl	5,0µl

Tabelle 10: Pipettierschema für 2 Polyacrylamidgele

Mischung in einem 50ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson Labware)

¹ Ammonium Persulfat

² N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin

APS als Radikalbildner und TEMED als Katalysator sind für den Start der Polymerisation verantwortlich und werden erst direkt vor dem Pipettieren des Trenngels zwischen die Glasplatten zugegeben.

Während der 30 bis 60-minütigen Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Trenngel mit Iso-Propanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten.

Nach Entfernung der Iso-Propanolschicht wird ein 10-Well-Kamm zwischen die Platten gesteckt und ein 5%iges Sammelgel gegossen, und mindestens 60 Minuten polymerisiert. Anschließend wird der Kamm herausgezogen und die entstandenen Taschen werden mit Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) gespült.

Das Gel kann bei regelmäßigem wiederauffüllen der Taschen mit Laufpuffer und umwickelt mit einem feuchten Tuch in einem Plastikbeutel bis zu einer Woche bei +4°C gelagert werden

3.2.2.2 Vorbereitung der Proben

Nachdem man die Proben lysiert und eine Proteinbestimmung (BioRad) durchgeführt hat, stellt man einen einheitlichen Proteingehalt im Zelllysate ein (je nach verwendeter Zellart zwischen 20 und 50µg/µl) und ergänzt mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10µl.

Die Proben werden folgend 1:1 mit Denaturing Sample Puffer (2x) versetzt, welcher das anionische Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) enthält. Dadurch werden die Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen, mit einem konstanten Verhältnis zwischen Ladung und Masse. Die denaturierten Proteine bekommen somit eine negative Ladung, und wandern im elektrischen Feld zur Anode wodurch eine Auftrennung der Proteine nach der Proteingröße stattfindet, da die Menge an gebundenen SDS proportional dem Molekulargewicht ist.

2x Denaturing Sample Puffer	
1M Tris ¹ -HCl, pH 6,8	2,5ml
Glycerol (Fa. Merck)	4,0ml
10% SDS	1,0g
0,1% (w/v) Bromphenolblau (Fa. Pharmacia Biotech)	1,0ml
H ₂ O dest. ad 20ml	

Tabelle 11: Verwendeter 2x Denaturing Sample Puffer

¹ Tris(hydromethyl)-aminomethan

20µl (maximal jedoch 40µl pro Geltasche) der so vorbereiteten Proben werden nun nach 1 Minute Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2000rpm (Zentrifuge 5414C, Eppendorf) mit speziellen Pipettenspitzen für die Gelelektrophorese (Biozym) in die einzelnen Taschen aufgetragen.

Zusätzlich wird in eine der äußere Geltaschen 4 – 8µl vorgefärbter Proteinmarker (von BioRad oder Fermentas) aufgetragen.



Abbildung 8: Elektrophoresekammer

3.2.2.3 Elektrophorese

Folgender Elektrophoresepuffer wird vorzubereitet:

Elektrophoresepuffer	
Tris/Tricin Puffer (10x)*	100ml
10% SDS-Lösung	10ml
H ₂ O dest. ad 1 Liter	

*Tris/Tricin Puffer (10x)	
Tris (Fa. Merck)	121g
Tricin (Fa. Amresco)	179g
H ₂ O dest. ad 1 Liter	

Tabelle 12: Verwendeter Elektrophoresepuffer

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit dem Elektrophoresenpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (180 Volt, 4°C, 35 Minuten).

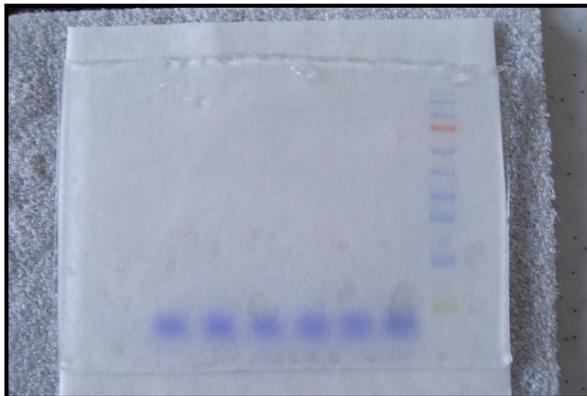
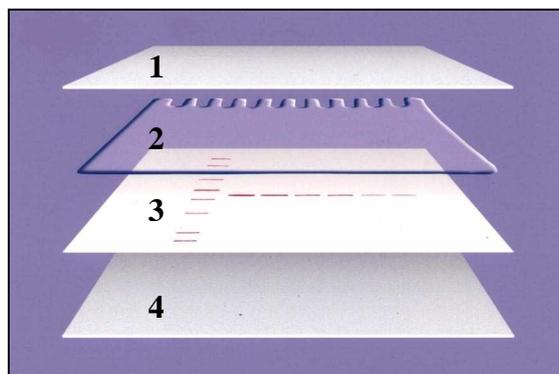


Abbildung 9: Gel mit aufgetrennten Proteinen

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße 0,2 μm (BioRad) transferiert, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Des Weiteren wird dadurch das an die Proteine angelagerte SDS ausgewaschen, wodurch die Proteine renaturieren und teilweise wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen. Diese immobilisierten Proteine werden anschließend durch Immunodetektion mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Der Proteintransfer erfolgte in einem so genannten „Blotsandwich“ in einer mit Blotpuffer gefüllten Apparatur von BioRad.



- 1 Filterpapier
- 2 Gel
- 3 Nitrocellulose
- 4 Filterpapier

Abbildung 10: Schichtung eines Blotsandwich. Quelle: [news.thomasnet.com](https://news.thomasnet.com/images/large/013/13151.jpg)

Die im Sandwich verwendeten Schwämme und das Filterpapier müssen vor dem Schichten in Blotpuffer getränkt werden. Für eine saubere Durchführung trennt man vor dem Blotten das Sammelgel vom Trenngel ab. Die einzelnen Schichten sind fest anzudrücken, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Eventuell zwischen den Lagen befindliche Luftblasen entfernt man durch ausstreichen mittels einer Rolle. Zur Kühlung wird zusätzlich neben das Sandwich ein Behälter mit Eis in die Apparatur gegeben. Das Blotten erfolgt bei konstanten 0,5 Ampere bei 4°C während 35 Minuten.

Blot Puffer	
Tris/Glycin (10x)*	100ml
Methanol	200ml
10% SDS-Lösung	200µl
H ₂ O dest. ad 1 Liter	

*Tris/Glycin Puffer (10x)	
Tris (Fa. Merck)	30g
Tricin (Fa. Amresco)	144g
H ₂ O dest. ad 1 Liter	

Tabelle 13: Anleitung zur Herstellung des Blot Puffer

Die Proteine auf der Membran werden mit 0,5%iger Ponceau-Lösung (Merck) gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt, um den Transfer der Proteine auf die Blotmembran sichtbar zu machen.

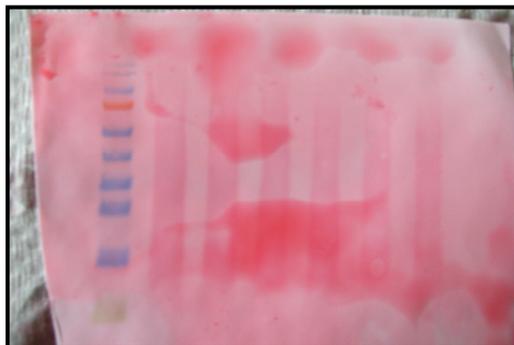


Abbildung 11: Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2µm, BioRad).

Protein-Banden gefärbt mit 0,5%iger Ponceau-Lösung (Merck).

Frataxin hat eine Größe von 17 kD. Außerdem wurden als Kontrolle die Proteine Mortalin (72 kD), und beta-Actin (50 kD) oder Calnexin (ca 70 kD), je nach verwendeter Zellart, detektiert. Um die Proteine nachweisen zu können inkubiert man den Blot mit spezifischen Antikörpern nachdem man vorher die unspezifischen Bindungen mit Milchpulver blockiert hat.

Da die untersuchten Proteine unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen kann der Blot nach dem Molekulargewichtsmarker (siehe Abbildung unten) in 3 Teile geschnitten werden, danach können einzelne Teile mit den unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden.

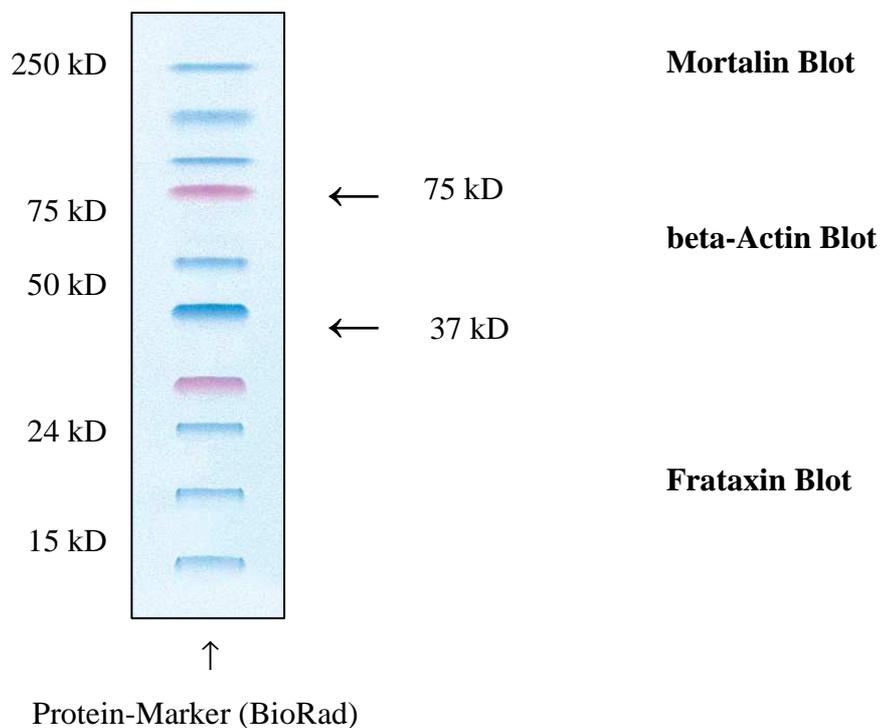


Abbildung 12: BioRad, Precisions Plus Protein Standard (Dual Color)

3.3.1.1 Blockieren

In einem 50ml Plastikröhrchen (Becton Dickinson Labware) blockiert man unter ständigem Rollen auf einer Walze 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Blockierlösung (für 2 Blots)	
PBS/Tween*	40ml
5% Milchpulver	2g

*PBS/Tween (Waschpuffer)	
PBS (1x)	1 l
0,05% Tween 20 (Pharmacia Bio Tech)	500µl

Tabelle 14: Verwendete Blockierlösung. Mengenangaben Ausreichend für die Blockierung von 2 Blots.

Nach dem Blockieren wäscht man die Blots 3 mal mit 10-15ml Waschpuffer für je 2 Minuten.

3.3.1.2 Inkubation mit dem 1. Antikörper

Die 3 Teile der Nitrocellulosemembran (Mortalin, beta-Actin, Frataxin) werden über Nacht bei 4°C (Kühlschrank) mit dem je spezifischen Antikörper in einem 50ml Falcon unter ständigem Rollen inkubiert. Hierbei binden die Antikörper spezifisch an das Epitop des gesuchten Proteins.

1. Antikörper (je 2ml pro Falcon) Angaben für Stocklösung:	
Mortalin (1:1000)	10ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 10µl Mortalin AK (Abcam)
beta-Actin (1:20.000)	10ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 0,5µl beta-Actin AK (Abcam)
Frataxin (1:2000)	10ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 5µl AK (Rabbit) (SantaCruz Biotechn.)

Tabelle 15: Im Western Blot verwendete 1. Antikörper

1. AK kann man mehrere Wochen lang verwenden!

2. AK muss immer frisch herstellen werden!

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper und vor Zugabe des zweiten Antikörpers müssen drei Waschschrte mit je 10-15 ml Waschpuffer durchgeführt werden, um überschüssigen, nicht gebundenen ersten Antikörper zu entfernen:

- 2 x 5min
- 1 x 15min
- 2 x 5min

3.3.1.3 Inkubation mit dem 2. Antikörper

Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgt für 1h am Bellydancer oder in 50ml Falcons unter ständigem Rollen im Kühlschrank. Der 2. Antikörper richtet sich spezifisch gegen die Klasse des ersten Antikörpers, indem er an diese bindet.

2. Antikörper (je 10ml pro Falcon)	
Mortalin (1:30.000)	10ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 0,333µl AntiRabbit
beta-Actin (1:15.000)	10 ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 0,666µl AntiMouse
Frataxin (1:30.000)	10ml PBS/Tween + 1% Milchpulver + 0,333µl AntiRabbit

Tabelle 16: Im Western Blot verwendete 2. Antikörper

Anschließend sind wiederum drei Waschschrte mit je 10-15ml Waschpuffer notwendig, um überschüssigen Antikörper zu entfernen:

- 2 x 5min
- 1 x 15min
- 2 x 5min

3.3.1.4 Detektion – Chemilumineszenz

Mit Hilfe der Enzym-Antikörper-Konjugate wird durch das Enzym eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Das verwendete Enzym HRP (horseradish peroxidase, eine Peroxidase aus dem Meerrettich) spaltet das Substrat Luminol in eine

metastabile Verbindung, welche unter Lichtemission weiter zerfällt und mittels Chemilumineszenz-Detektion gemessen werden kann.

Kurz vor der Belichtung der Blots werden die beiden Lösungen von Biozym Chemiglow, im Verhältnis 1:1 gemischt.

Biozym Chemiglow	
Luminol/Enhancer Solution	500µl
Stable Peroxide Solution	500µl

Tabelle 17: Western Blot Chemilumineszenz Reagenz

Anschließend schwenkt man die Nitrocellulosemembran für 5 min in dieser Lösung und detektiert unmittelbar danach die Lichtemission im Chemilumineszenz-Detektor (Chemilmager 4400 von Alpha Innotech). Die Belichtungszeit richtet sich nach den verwendeten Antikörpern.

	Belichtungszeit	Intervall
Mortalin	15-30 sec	ca. 5 min
beta-Actin	1 min	ca. 10 min
Frataxin	1 min	ca. 30 min

Tabelle 18: Belichtungszeiten im Chemilumineszenz -Detektor

3.3.1.5 Auswertung

Nach der Detektion des Gels mittels Imager erfolgt die Auswertung mittels der Auswertesoftware AlphaEaseFC Software von Alpha Innotech.

3.3.2 Verwendete Antikörper

3.3.2.1 Mortalin (GRP75, abcam)

Der monoklonale Antikörper Mortalin (Rabbit) wurde als Positivkontrolle im Western Blot eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes Hitzeschock- oder Stressprotein der Familie Hsp 70. Grp75 ist in der Mitochondrien-Matrix lokalisiert, wo es an der Auffaltung von Proteinen und an der Translokation in diese Organelle, beteiligt ist. [HAAS, 1995]

Laut Shan et al interagiert GRP75/Mortalin mit mitochondrialem Frataxin. Mortalin ist dem Protein ssq1 von Hefen, welches Eisen-Schwefel Cluster in importierte mitochondriale Proteine einbaut, homolog. [SHAN, 2007]

Ohtsuka et al zeigten dass das Protein GRP75/Mortalin durch die Zugabe von rhuEPO stimuliert wird. [OHTSUKA, 2007]

3.3.2.2 beta-Actin (abcam)

Der primäre, polyklonale Antikörper Beta-Actin (Mouse) wurde als Ladekontrolle bei K562 Zellen verwendet. Beta-Actin ist eine von sechs verschiedenen identifizierten Isoformen des Actins. Actin Proteine sind hochkonservierte Proteine, welche in die Zellbeweglichkeit, -struktur, und –integrität involviert sind. Bei den Versuchen mit THP-1-Zellen und Lymphozyten konnten keine identifizierbaren Banden beim Western Blot erhalten werden. Deswegen wurde für diese Proben Calnexin als Kontrollgen verwendet.

3.3.2.3 Calnexin (abcam)

Der primäre, polyklonale Antikörper Calnexin (Rabbit) wurde als Kontrollgen bei THP-1 Zellen und Lymphozyten verwendet. Es handelt sich hierbei um einen ER- (Endoplasmatische Retikulum) Membran-Marker.

Calnexin ist ein ~90 kDa schweres, integrales Membranprotein des ER. Es wurde in einigen Studien gezeigt, dass sich Calnexin mit den schweren Ketten des Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I), mit den Teilkomplexen der T-Zell Rezeptoren und B-Zell Membran Immunoglobulin, aber nicht mit kompletten Rezeptorkomplexen, assoziiert.

Weiters wurde gezeigt dass Calnexin ein Protein ist, welches unvollständig oder unsachgemäß gefaltete Proteine im ER fixiert. Calnexin enthält eine große luminaire ER Domäne (461 AS), ein Transmembransegment (22 AS) und einen zytoplasmatischen Ausläufer (89 AS). [www.abcam.com]

Durch diese Eigenschaften unterscheidet sich Calnexin von löslichen Proteinen des ER, welche nicht mit der Transmembran und den zytoplasmatischen Domänen der integralen Membranproteine interagieren können. [www.abcam.com]

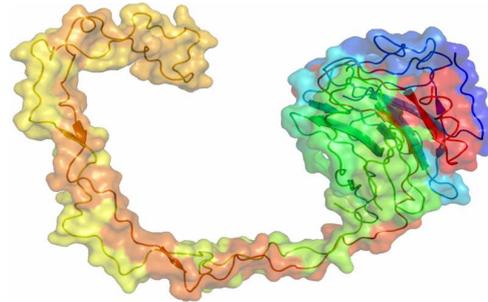


Abb.: Calnexin. Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Calnexin_1JHN.png

3.3.3 Strippen der Nitrocellulose-Membran

Durch diese Methode können die im Western Blot eingesetzten Antikörper nahezu vollständig von der Nitrocellulose-Membran entfernt werden.

Hierfür wird die Nitrocellulose-Membran über Nacht mit 10 ml Stripping-Buffer in einem Gefäß mit Deckel bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag folgen zwei Waschschritte von je 30 Minuten mit PBS/Tween. Nach erneutem Blockieren mit Blockierlösung und dreimaligem Waschen (2 x 5 min, 1 x 15 min, 2 x 5 min) kann erneut mit dem ersten und folgend mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden.

Stripping Puffer	
Glycin (2 M, pH 2,2)	15 g
SDS 10%	10 ml
Tween 20	10 ml
mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und pH Wert von 2,2 mit 5 N HCl eingestellt	

Tabelle 19: Anleitung für die Herstellung des Stripping Puffers

3.3.4 ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay)

Der MSD-ECLIA (Meso Scale Discovery – Electrochemiluminescence Immunoassay) wurde für die Frataxinbestimmung verwendet. Diese Methode beruht auf der Messung der Affinität von Protein-Protein Wechselbeziehungen und ist weniger zeit- und arbeitsintensiv als der traditionelle ELISA.

Es wurde eine nicht-kodierte 96-Well Platte (MULTI-ARRAY™ Plates, MA2400 96 High Binding Plate), mit einer Kohlelektrode am Boden, für den Sandwich-Immunoassay verwendet.

Des Weiteren wird ein Beschichtungsantikörper („capture antibody“), welcher auf der Kohlenstoff Oberfläche der Multi-Array Platte nicht spezifisch adsorbiert wird und ein Detektionsantikörper („detecting antibody“), welcher mit MSD SULFO-Tag™ Reagenz (eine Elektrochemilumineszenzmakierung) markiert ist, benötigt. Diese beiden Antikörper sollten nicht die gleichen Epitope des Antigens erkennen.

Als erster Schritt wurde die nicht-kodierte MSD-Platte mit dem Beschichtungsantikörper von Chemicon (Ms α Fx), welcher sich gegen das Protein Frataxin richtet, beschichtet. Anschließend gibt man die Probe und eine Lösung des markierten Detektionsantikörpers von Santa Cruz (Frataxin, pc) zu.

Nachdem das Frataxin in den Proben sich an den Beschichtungsantikörper gebunden hat, vervollständigt der markierte Detektionsantikörper durch seine Bindung an Frataxin das Sandwich. Als nächsten Schritt fügt man den MSD Read Buffer in die einzelnen Wells hinzu, welcher die für die Messung mittels MSD SECTOR™ Gerät am besten geeigneten chemischen Bedingungen schafft. Eine elektrische Spannung wird im SECTOR Gerät an die Elektroden der Platte angelegt, was dazu führt, dass die an die Oberfläche der Elektrode gebundene Markierung Licht emittiert. Die durch das Gerät gemessene Intensität des emittierten Lichtstrahls ermöglicht eine quantitative Messung der in der Probe enthaltenen Frataxinmenge.

Die Durchführung des ECLIA erfolgte nach Anleitung und unter Verwendung des **Meso Sacle Discovery MULTI-ARRAY**.

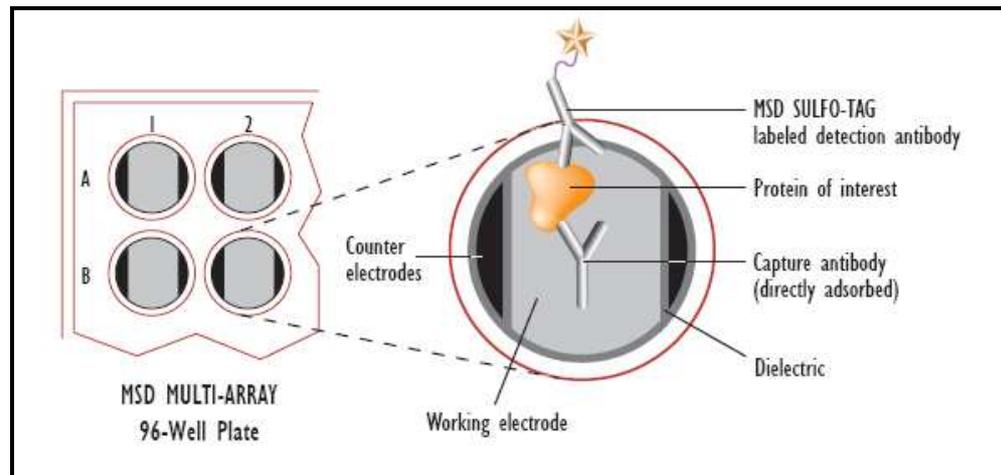


Abbildung 13: Sandwich Immunoassay mittels MSD MULTI-ARRAY Platte.
Quelle: www.mesoscale.com

3.3.4.1 Verwendet Reagenzien

1%iges BSA	1g MSD Blocker A in 100ml 1x PBS
Lysis Buffer	200µl Lysis Buffer Promega in 800µl H ₂ Odest. und 1µl PMSF
3%iges BSA Blockierlösung	450mg MSD Blocker A in 15 ml 1x PBS (=3g BSA/100ml)
Waschlösung	500ml 1x PBS + 250µl Tween
Lysis-SDS Puffer	97,5µl Lysis Buffer (Promega mit PMSF) + 2,5µl 10%iges SDS (=8% Lysis und 0.02% SDS pro Ansatz)
BSA-SDS Puffer	3991µl 1%iges BSA + 8.7µl 10%igen SDS

Tabelle 20: Für den ECLIA benötigte Reagenzien

3.3.4.2 Durchführung ECLIA

Am ersten Tag wird eine Beschichtungsantikörper- („capture antibody“) Lösung hergestellt und mit dieser eine 96-Well-Platte (MSD HighBinding-Platte), mit je 30µl pro Well durch „Reverse Pipetting“, beschichtet. Anschließend erfolgt eine Inkubation dieser mit einer Klebefolie abgedeckten Multiwell-Platte bei 4°C über Nacht.

Als Beschichtungsantikörper wurde ein anti-frataxin Antikörper von Chemicon (MS α Fx), 1:50.000 mit 1x PBS verdünnt, verwendet.

Am zweiten Tag erfolgt anschließend an die Inkubation mit dem Beschichtungsantikörper die Blockierung der Platte mit je 125µl 3%igem BSA pro Well. Eine gute Verteilung der Reagenzien in den Wells ist essentiell für das Erhalten von aussagekräftigen Daten. Es folgt eine Inkubation von 1 Stunde und 30 Minuten bei Raumtemperatur am Belly Dancer. Nachdem dreimal mit je 150µl Waschlösung pro Well gewaschen wurde, beginnt man mit der Auftragung von je 25µl/Well der Frataxin Standardlösung in die ersten beiden Spalten der 96-well Platte im Doppelansatz und trägt anschließend je 25µl Probe pro Well, ebenfalls im Doppelansatz, auf.

3.3.4.2.1 Standardreihe

Standard 1	(1ng/Well)	125µl Stamm*	105µl 1%iges BSA
Standard 2	(0,5ng/Well)	115µl Standard 1	115µl 1%iges BSA
Standard 3	(0,25ng/Well)	115µl Standard 2	115µl 1%iges BSA
Standard 4	(0,125ng/Well)	115µl Standard 3	115µl 1%iges BSA
Standard 5	(0,0625ng/Well)	115µl Standard 4	115µl 1%iges BSA
Standard 6	(0,03125ng/Well)	115µl Standard 5	115µl 1%iges BSA
Standard 7	(0,0156ng/Well)	115µl Standard 6	115µl 1%iges BSA
Standard 8	Leerwert	-	115µl 1%iges BSA

Tabelle 21: Pipettierschema für die Standardreihe

* Frataxin Standard Stammlösung: 0,08ng/µl Frataxin

Zu jedem Standard und Leewert werden folgend noch je 10µl Lysis-SDS Puffer (8% Lysis Reagent und 0,02% SDS) zugesetzt.

3.3.4.2.2 Probenvorbereitungen.

Abhängig von der jeweiligen Zelllinie und in der Probe enthaltenen Proteinmenge werden unterschiedliche Mengen an Zelllysate benötigt. In dieser Versuchsreihe wurden für alle 4 verschiedene Zelllinien je 3,5µg Protein/Ansatz verwendet. Jeder Ansatz wird anschließend auf 10µl mit Lysis Buffer (Promega/PMSF) ergänzt und auf das gewünschte Endvolumen von 125µl mit BSA-SDS Puffer aufgefüllt. Die Versuche wurden im 3-fach Ansatz durchgeführt.

Nachdem die Proben und der Standard auf die Platte mittels Reverse Pipetting aufgetragen wurden und die Platte mit einer Klebefolie verschlossen wurde, folgt eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur am Belly Dancer. Anschließend nach drei Waschschritten mit je 150µl Waschlösung pro Well wird der 2. Antikörper (je 30µl pro Well) aufgetragen.

3.3.4.2.3 2. Antikörper (Santa Cruz, polyclonal, 1:1.000 mit 1x PBS verdünnt)

Nun wird die Platte wiederum mit Klebefolie verschlossen und 1 Stunde am Belly Dancer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Detektionsantikörper (30µl pro Well) aufgetragen und erneut 1 Stunde am Belly Dancer inkubiert.

Als zweite Beschichtungsantikörper wurde der Antikörper MSD Goat α Rabbit, 0,75mg/ml, verdünnt mit 1%igen BSA, verwendet.

Anschließend kann, nach erneutem dreimaligem Waschen der Platte mit je 150µl Waschlösung, der Reading Buffer aufgetragen werden. Pro Well werden 150µl des 1x MSD Reading Buffer aufgetragen und durch leichtes Klopfen an die Ränder der Platte gleichmäßig verteilt. Die Messung erfolgt unmittelbar danach im SECTOR Gerät von MSD.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Real-time PCR (TaqMan)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Weiterentwicklung der PCR. Sie wurde eingesetzt um das Expressionsniveau der RNA in den Proben zu bestimmen.

Vor der eigentlichen PCR muss die mRNA in ein geeignetes Template (cDNA) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben werden.

Die relative quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der Expression von Frataxin erfolgte mittels der TaqMan Sonde.

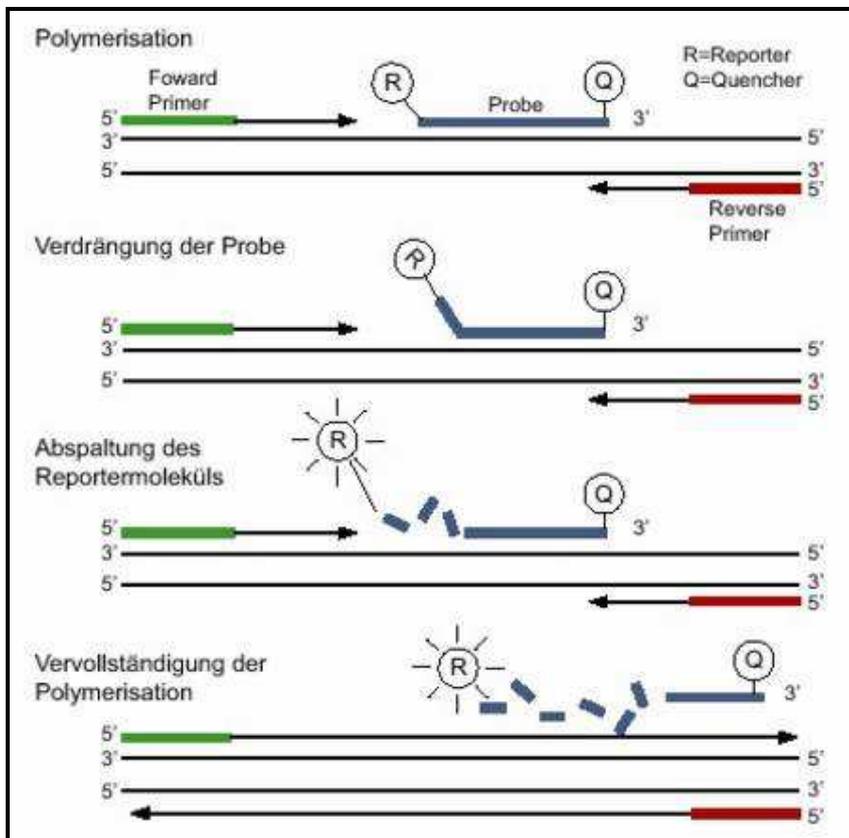
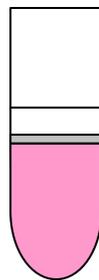


Abbildung 14: TaqMan-Prinzip

Erst nach Abspaltung vom Quencher-Molekül (Q) wird die Frequenz des Reporter (R) messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an. Quelle: www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001

3.4.1.1 RNA Isolierung

Die Isolierung der gesamten RNA erfolgte in dieser Arbeit nach Anleitung des Protokolls für TRI Reagent® Solution (Applied Biosystems). Für 5-10 Millionen Zellen wurde 1ml TRI Reagenz eingesetzt. Zu den dadurch lysierten und homogenierten Proben wurde 200µl Chloroform (Merck) zugegeben. Die Proben wurden für 15 Sekunden am Vortex geschüttelt und anschließend für 5 – 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben bei 12000g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Hierbei kommt es zur Auftrennung der einzelnen Phasen und es ergibt sich folgende Schichtung.



1. Phase (farblos)
2. Phase (weiß)
3. Phase (rosa)

Abbildung 15: Die Schichtung während der RNA Isolierung

In Phase 1 (farblos) befindet sich die RNA.

Anschließend wird die obere Phase, in welcher sich die RNA befindet, in ein neues Eppi transferiert und 500µl Isopropanol zugegeben. Durch Isopropanol kommt es nach kurzem vortexen und Inkubation für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur zur Fällung der RNA. Es folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 12000g. Im Anschluss pipettiert man den Überstand ab und wäscht das RNA-Pellet mit 1ml 75% Ethanol und zentrifugiert erneut 5 Minuten bei 4°C und 7600g. Nach Entfernung des Ethanols wird das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 25µl DEPC-behandeltem Wasser (Roth GmbH & Co) resuspendiert.

Alle Schritte nach der Zugabe von 75%igem Ethanol werden in einer RNase-freien Lamina (PCR-Workstation) durchgeführt, und es werden ausschließlich RNase-freie Eppis und speziellen PCR Pipetten und Pipettenspitzen (Roth GmbH & Co) verwendet.

3.4.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Die Messung erfolgt mithilfe eines UV-Spektrophotometers (Ultrospec®2100, UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences) bei 260 nm in einer 10mm-Glas Küvette, mit DEPC-behandeltem Wasser als Leerwert. Hierfür ist eine Verdünnung der RNA-Probe von 1:100 mit DEPC-behandeltem Wasser notwendig. In Anschluss an die Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.4.1.3 Reverse Transkription (RT)

Für die Umschreibung der RNA auf cDNA wurde jeweils $1\mu\text{g}$ RNA eingesetzt und der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems GmbH verwendet. Als Startprimer wurden unspezifisch bindende Primer verwendet.

Pipetierschema des RT-Mastermixes / Probe:	
Reverse Transkriptase	0,5 μl
25xdNTP-Mix ¹⁾ (100mM)	0,8 μl
Multi Scribe Reverse Transc.	1 μl
10xRT Puffer	2 μl
10xRT Random Primers	2 μl
DEPC-behandeltem Wasser	4,2 μl
Summe	10 μl

Tabelle 22: Pipettierschema für dem RT-Mastermix (Mengen für je eine Probe)

¹⁾ Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix

In RNase freien Eppis werden jeweils $10\mu\text{l}$ des fertig gemischten RT Master Mix und $10\mu\text{l}$ der RNA-Probe pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation werden die Ansätze während ca. 2,5 Stunden im Thermocycler (Primus, MWG-Biotechn) umgeschrieben.

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler sind dabei wie folgt: 8 Minuten 21°C , 15 Minuten 42°C , 5 Minuten 99°C , 5 Minuten 42°C .

Anschließend wird die erhaltene cDNA bei -20°C gelagert.

3.4.1.4 TaqMan PCR (Quantitation – Comparative CT)

Für die Ampifikation wird ein Primerpaar und ein Oligonukleotid (TaqMan-Sonde) welches am 5'Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und am 3'Ende über einen sogenannten Quencher (Fluoreszenz löschende Verbindung) verfügt, verwendet. Gibt der Rezeptor (Fluoreszenzfarbstoff) aufgrund der Anregung durch eine Lichtquelle einen Teil seiner Energie an den Quencher ab, so verringert sich der Abstand zwischen Akzeptor (Quencher) und Donator, wodurch das Fluoreszenzsignal des Quenchers ab- und das des Donators zunimmt. Dieses Fluoreszenzsignal korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme.

Die TaqMan PCR wurde mit Hilfe eines mit der StepOne Software 2:0 (Step One Instrument 48 Well) jeweils für die spezifischen Versuchsbedingungen erstellten Pipettierschemas durchgeführt.

3.4.1.4.1 Benötigte Reagenzien (TaqMan)

Master Mix	7,5 µl
Assay Mix	0,756 µl
DEPC-behandeltes Wasser	4,25 µl
Summe/Well (ohne Probe)	12,5 µl

Tabelle 23: Benötigte Reagenzien (TaqMan) (Mengen pro Probe und Primer Paar)

Master Mix	7,5 µl
Assay Mix	0,756 µl
DEPC-behandeltes Wasser	6,75 µl
Summe (pro Well)	15 µl

Tabelle 24: Benötigte Mengen an Reagenzien für die Negativkontrollen (ohne Probe)

Nachdem die benötigten Reagenzien im Doppelansatz in die Wells der 48 Well Platte pipettiert wurden, gibt man jeweils, mit Ausnahme der Negativkontrollen, 2,5µl Probe hinzu. Mit einer Klebefolie wird die Platte verschlossen, und durch kurze Zentrifugation für 1 Minute bei 21°C und 1500 rpm löst man eventuell beim Pipettieren entstandene Luftblasen vom Boden der Wells.

Anschließend erfolgt die Messung in einem automatischen Fluorometer ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) direkt in den 48-well Platten (Applied Biosystems).

3.4.1.4.2 Reaktionsbedingungen der Amplifikation

Programm	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten
Denaturierung*	95°C	15 Sekunden
Annealing*	60°C	1 Minute

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation

* x 40 Wiederholungen

3.4.1.5 Verwendete Primer

GAPDH (human) a	5'GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC'3
GAPDH (human) b	5'GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC'3
Frataxin (human) a	5'TCT CCT TTG GGA GTG GTG TC'3
Frataxin (human) b	5'TAA TGA AGC TGG GGT CTT GG'3
beta Actin (ACTB) (human) a	5'AGC CTC GCC TTT GCC GA'3
beta Actin (ACTP) (human) b	5'CTG GTG CCT GGG GCG'3

Tabelle 26: Primer, welche bei der RT PCR verwendet wurden

3.4.1.6 Auswertung: Bestimmung der relativen Expression

Die relative Expression wird mit Hilfe des sogenannten delta-delta-Ct-Wertes berechnet. Hierfür werden die drei folgenden Formeln verwendet:

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH}}$$

Mit dieser Formel wird der Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen berechnet. Es wird auf die endogene Kontrolle (House-keeping Gene) zB. GAPDH, normalisiert.

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$$

Als nächsten Schritt wird der ΔC_T Wert des Kalibrators von den ΔC_T Werten aller Proben abgezogen. Unter „Kalibrator“ versteht man jene Probe, bei der die Expression am niedrigsten war, das heisst jene Probe mit dem höchsten ΔC_T Wert.

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

Nachdem man den $\Delta \Delta C_T$ Wert berechnet hat, kann man nun die relative Gen Expression (RGE) mit dieser Formel berechnen.

RGE = Die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zum Kalibrator.

4.0 Ergebnisse & Diskussion

4.1 Der Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Frataxin-Expression in K562 Zellen

Es wurde schon mehrmals gezeigt, dass verschiedene Substanzen, welche die Zellen unter oxidativen Stress setzen, zu einer Erhöhung der Frataxin-Expression führen. [MYERS et al., 2007]. Radikalbildner können jedoch nicht zur Behandlung der FRDA eingesetzt werden [VONCKEN et al., 2004].

RhuEPO ist wichtig für die Signaltransduktion bei der Proliferation von Erythrozyten im Knochenmark.

Es ist bereits aus einigen Studien bekannt, dass rhuEPO sowohl neuro- als auch kardioprotektiv wirkt [SMITH et al., 2003]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studien zieht man rhuEPO als Therapie für verschiedene Krankheiten heran.

Folgende Versuche sollen nun den Einfluss von rhuEPO auf die Frataxin-Expression in den Lymphozyten von FRDA Patienten zeigen.

Des Weiteren wurden die Experimente auch an Lymphozyten von gesunden Probanden und zur Kontrolle auch mit den Zelllinien K562, welche EPO-Rezeptoren besitzen und THP-1, welche keine EPO-Rezeptoren besitzen, durchgeführt.

Diese 4 unterschiedlichen Zelltypen wurden verschiedene Konzentrationen an rhuEPO jeweils für 24 und 48 Stunden inkubiert und Veränderungen in der Proteinexpression anschließend mittels Western Blot untersucht.

4.1.1 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen nach 24h

K562 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO für 24h inkubiert.

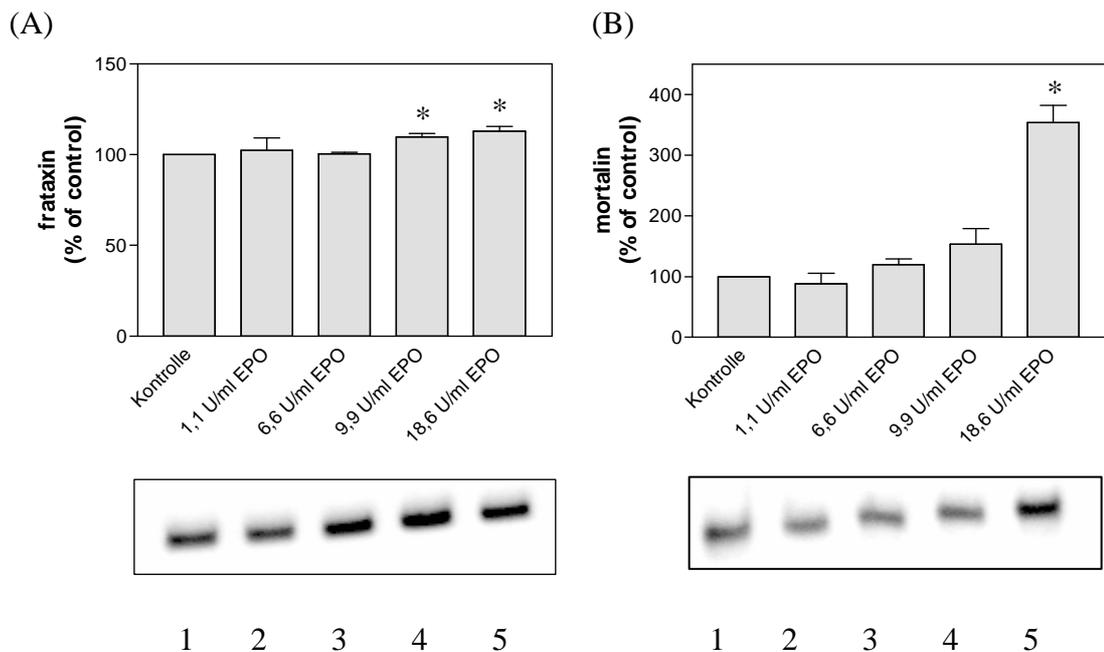


Abbildung 16: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

K562 Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit fötalem Kälberserum (nicht-hitzeinaktiviert) für 24h mit rhuEPO inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mortalin und Frataxin-Protein wurde mit polyklonalen Rabbit Antimortalin- bzw. Antifrataxin-Antikörpern sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Dabei wurden die Kontrollen 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden. 1: Kontrolle; 2: 1,1 U/ml EPO; 3: 6,6 U/ml EPO; 4: 9,9 U/ml EPO; 5: 18,6 U/ml EPO.

Wie aus der Abbildung 16 (A) und (B) sichtbar wird, führt die Inkubation der K562 Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO zu einem leichten Anstieg der Expression des Frataxin-Proteins und bei der höchsten Konzentration an rhuEPO zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Mortalin.

Aus der Literatur ist bekannt dass fötales Kälberserum anstelle von Erythropoietin-Zusatz zur Zelldifferenzierung von K562 Zellen eingesetzt werden kann, dh. fötales Kälberserum noch biologisch aktives Erythropoietin enthält. In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Zellen in Zellkultur-Medium kultiviert, welches mit fötalem Kälberserum supplementiert war. Zusatz von rhuEPO führte in diesen Experimenten nur zu einer geringen Erhöhung der Frataxin-Expression. Aus diesem Grund wurden daher die Experimente später in RPMI Medium, dessen fötales Kälberserum vorher hitzeinaktiviert war, wiederholt. [SAKATA et al, 1985]

4.1.2. Der Einfluss von rhuEPO und carbamyliertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen

K562 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und CEPO für 24h inkubiert.

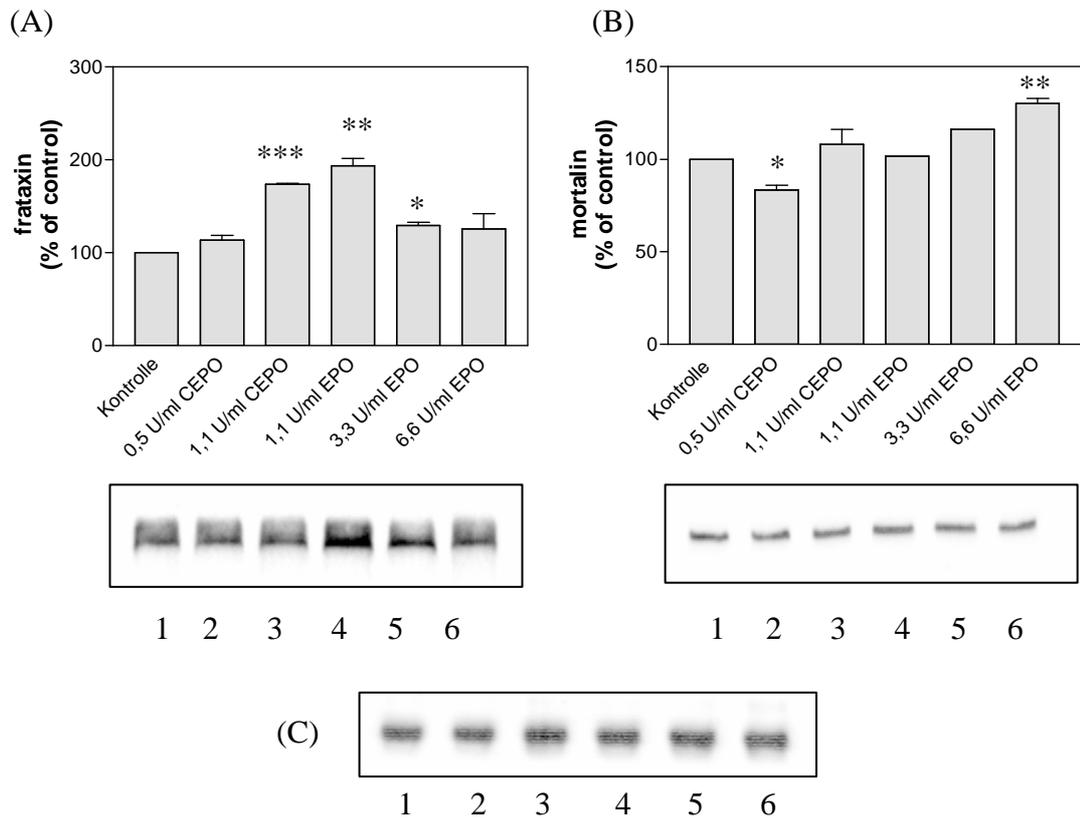


Abbildung 17: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 24h Inkubation. (C) β -Actin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 50 kDa

Sieht Legende Abbildung 16.

Aus den erhaltenen Werten nach einer Inkubation der K562 Zellen mit dem EPO-Derivat, CEPO für 24h, kann eine konzentrationsabhängige Steigerung der Frataxin Expression durch CEPO abgelesen werden.

Die Mortalin-Expression stieg ebenfalls nach 24stündiger Inkubation mit CEPO signifikant an.

Wie auch in den vorhergegangenen Versuchen wurde in diesen Experimenten RPMI Medium mit nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.1.1. diskutiert, wurden die Experimente daher später in RPMI-Medium, supplementiert mit hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum wiederholt.

4.1.3. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen nach 48h

In folgenden Experimenten wurden die K562 Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen an rhuEPO für 48h inkubiert.

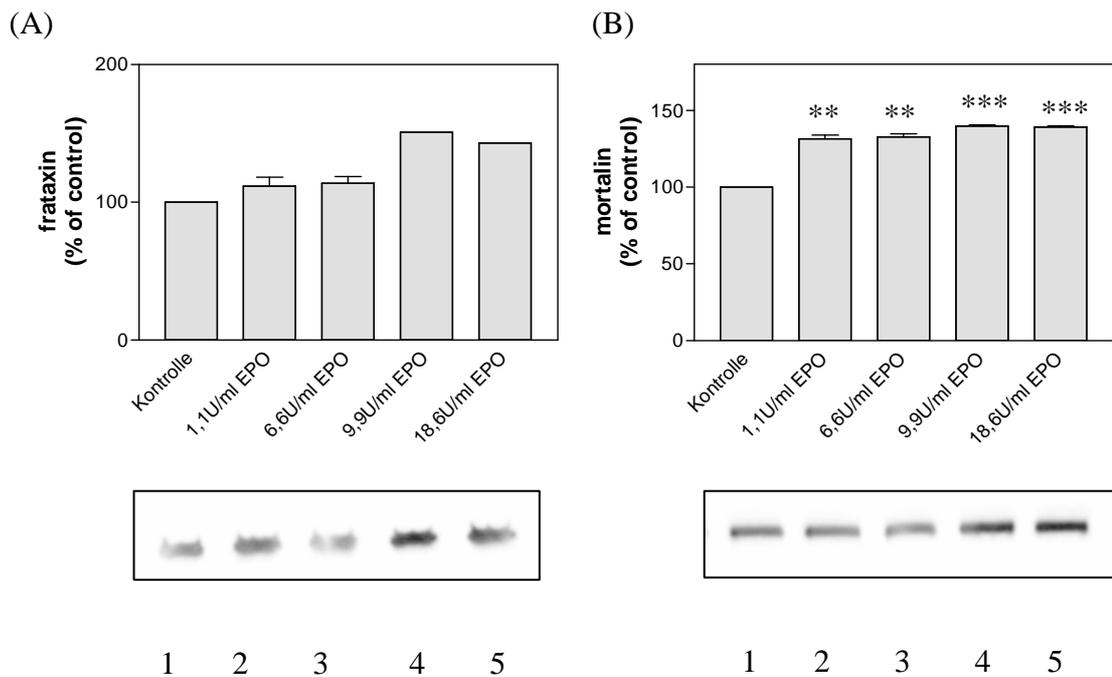


Abbildung 18: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 48h Inkubation

Sieht Legende Abbildung 16.

Im Gegensatz zur 24 stündigen Inkubation von K562 Zellen mit rhuEPO (Abb. 16) konnte nach 48h keine signifikante Erhöhung der Frataxin-Expression beobachtet werden. Mortalin wurde durch Inkubation mit rhuEPO vermehrt exprimiert.

Auch diese Experimente wurden unter Verwendung von RPMI-Medium supplementiert mit nicht hitzeinaktiviertem FCS durchgeführt. In späteren Untersuchungen wurden wie in 1.4.1.1 diskutiert diese Experimente unter Verwendung von mit hitzeinaktiviertem FCS supplementiertem RPMI Medium wiederholt.

4.1.4. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in K562 Zellen nach 72h

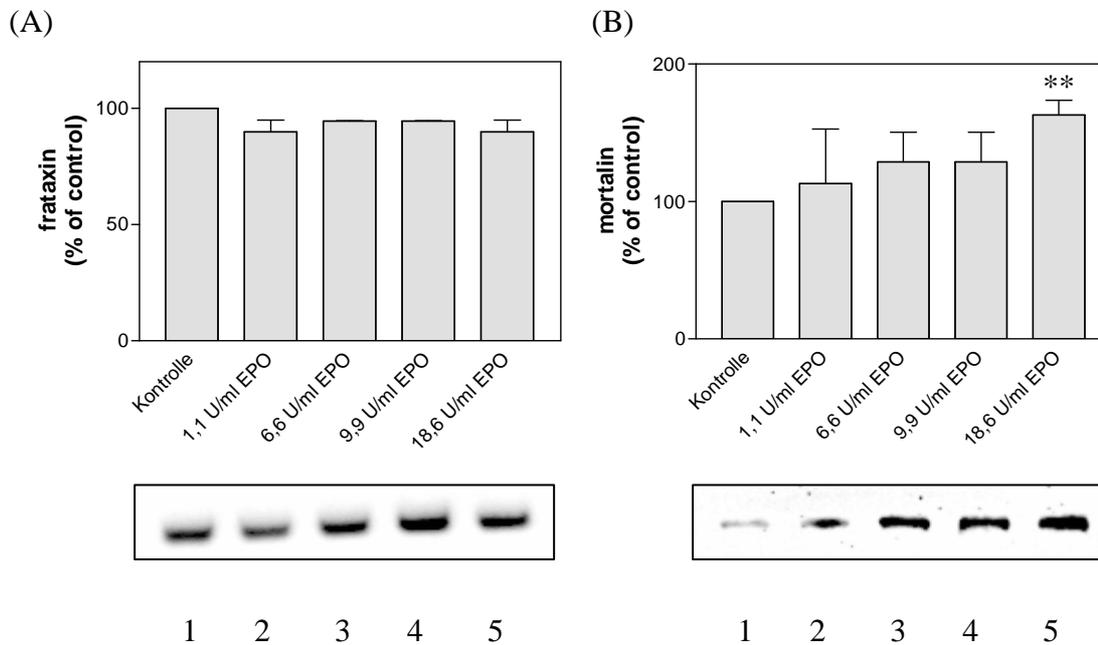


Abbildung 19: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in K562 Zellen, nach 72h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 16.

Wie in Abbildung 19 gezeigt wird, nimmt mit längerer Inkubationszeit von 72h das Ausmaß der Stimulierung der Expression des Frataxins ab. In Folge dessen kann man von einer zeitabhängigen Wirkung von rhuEPO in den K562 Zellen ausgehen.

Die konzentrationsabhängige Steigerung des Mortalin nach 72h ist vergleichbar mit jener nach 24h (Abb. 17) und 48h (Abb. 18), es konnte keine Zeitabhängigkeit der Stimulierung gezeigt werden.

4.2 Der Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen

4.2.1 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 12h

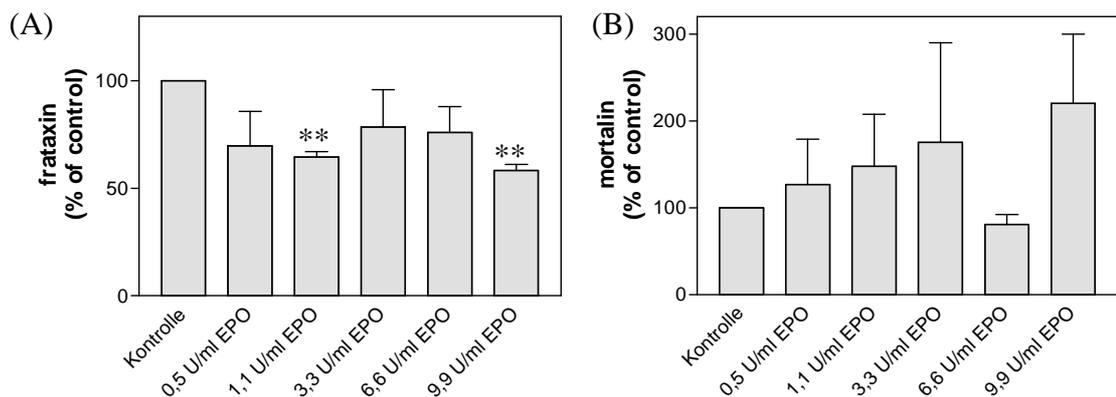


Abbildung 20: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 12h Inkubation

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10% nicht-hitzeinaktiviertem FCS für 12h mit rhuEPO inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das Mortalin- und Frataxin-Protein wurde mit polyklonalen Rabbit Antifrataxin- bzw. Antimortalin-Antikörpern sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Die Werte der Kontrollbanden werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden

Bei THP-1 Zellen, welche den klassischen EPO Rezeptor nicht exprimieren, konnte nach 12 h Inkubation mit rhuEPO keine Stimulierung der Expression des Frataxin Proteins gezeigt werden. Die Untersuchung auf eine Stimulierung von Mortalin führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Mortalin Expression. Auch hier wurde (wie in 1.4.1.1 diskutiert) in den weiteren Versuchen die Inkubation der Zellen mit rhuEPO in RPMI-Medium supplementiert mit hitzeinaktiviertem FCS wiederholt.

4.2.2 Der Einfluss von CEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 12h

In diesem Experiment wurden THP-1 Zellen mit einem Derivat des EPO, dem carbamyltierten EPO (CEPO) für 12h inkubiert. THP-1 Zellen exprimieren den klassischen EPO-Rezeptor nicht. Es wurden dieselben Konzentrationen verwendet wie bei den Versuchen mit rhuEPO.

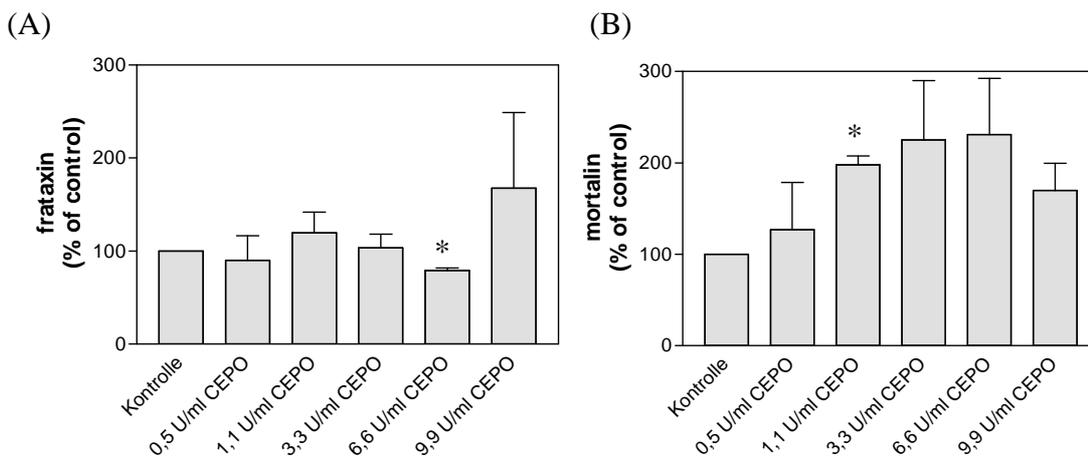


Abbildung 21: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 12h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 20.

Bis zur Konzentration von 6,6 U/ml CEPO wird ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Mortalin Expression sichtbar. Aus den erhaltenen Daten in Bezug auf die Frataxin-Expression kann keine repräsentative Information entnommen werden, auch hier ist eine erneute Durchführung des Versuchs mit hitzeinaktiviertem FCS notwendig.

4.2.3 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h

In den folgenden Versuchen wurden die THP-1 Zellen mit rhuEPO 24h inkubiert.

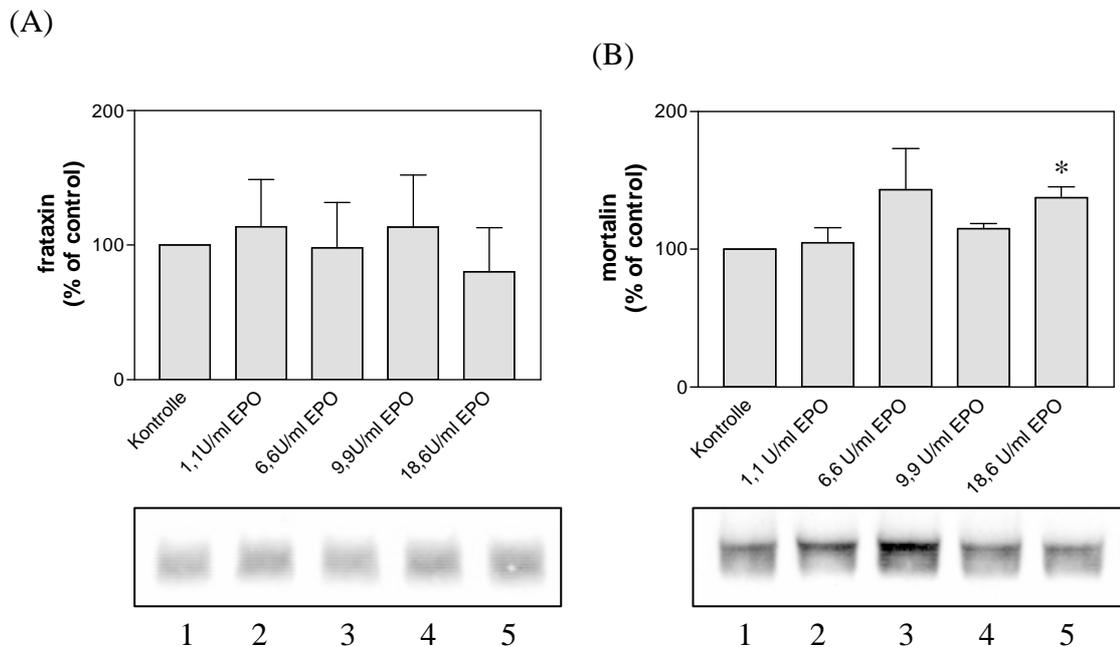


Abbildung 22: Einfluss von rhuEPO (Charge A) auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10% nicht-hitzeinaktiviertem FCS für 24h mit rhuEPO (Charge A) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mortalin- und Frataxin wurden mit polyklonalen Rabbit Antifrataxin- bzw. Antimortalin-Antikörpern sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Die Werte der Kontrollen wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden

Eine 24stündige Inkubation mit den unterschiedlichen Konzentrationen an rhuEPO führt unter den hier gewählten Versuchsbedingungen aufgrund der Verwendung von nicht-hitzeinaktiviertem FCS zu keinen interpretierfähigen Daten. Weitere Versuchswiederholungen in Medium mit hitzeinaktiviertem FCS wurden daher zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

4.2.4 Der Einfluss von verschiedener Chargen eines kommerziell erhältlichem rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h

In dem folgenden Versuch sollen mögliche Unterschiede der Frataxin- und Mortalin stimulierenden Wirkung vom rekombinatem EPO bei Einsatz der gleichen Anzahl an Units EPO/ml in den Versuchsansätzen unter Verwendung verschiedener Chargen des gleichen kommerziell erhältlichem Produktes untersucht werden.

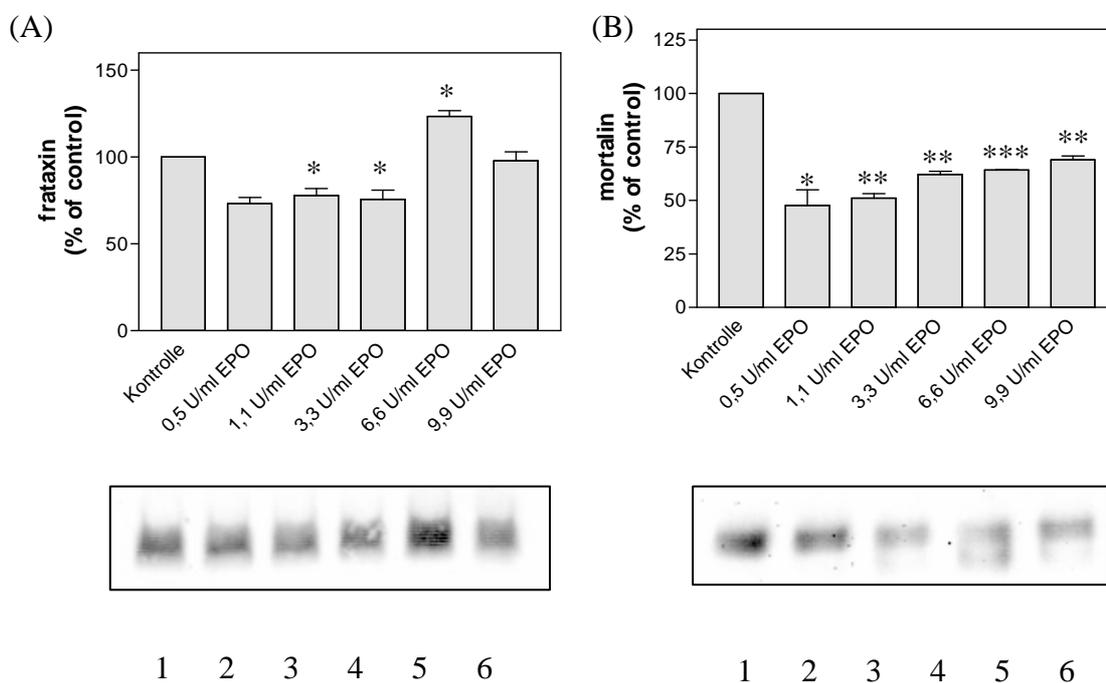


Abbildung 23: Einfluss von rhuEPO (Charge B) auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10% nicht-hitzeinaktiviertem FCS für 24h mit rhuEPO (Charge B) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mortalin- und Frataxin wurden mit polyklonalen Rabbit Antifrataxin- bzw. Antimortalin-Antikörpern sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Die Werte der Kontrollen wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden. 1: Kontrolle. 2: 0,5 U/ml EPO; 3: 1,1 U/ml EPO; 4: 3,3 U/ml EPO; 5: 6,6 U/ml EPO; 6: 9,9 U/ml EPO

In dieser Abbildung (Nr. 23) wird durch Vergleich mit der vorhergegangenen Abbildung (Nr. 22) deutlich, dass es zwischen den einzelnen Chargen an rhuEPO von Roche (Charge A und B) erhebliche Unterschiede auf die Frataxin Expression gibt.

Eine zusätzliche Beeinflussung der erhaltenen Werte durch den Einsatz von nicht-hitzeinaktiviertem Serum kann jedoch auch in diesen Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

4.2.5 Der Einfluss von carbamyltem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 24h

THP-1 Zellen wurden ebenso wie mit EPO (Abb. 22 und 23) auch mit carbamyltem EPO (Abb. 24) für 24h inkubiert.

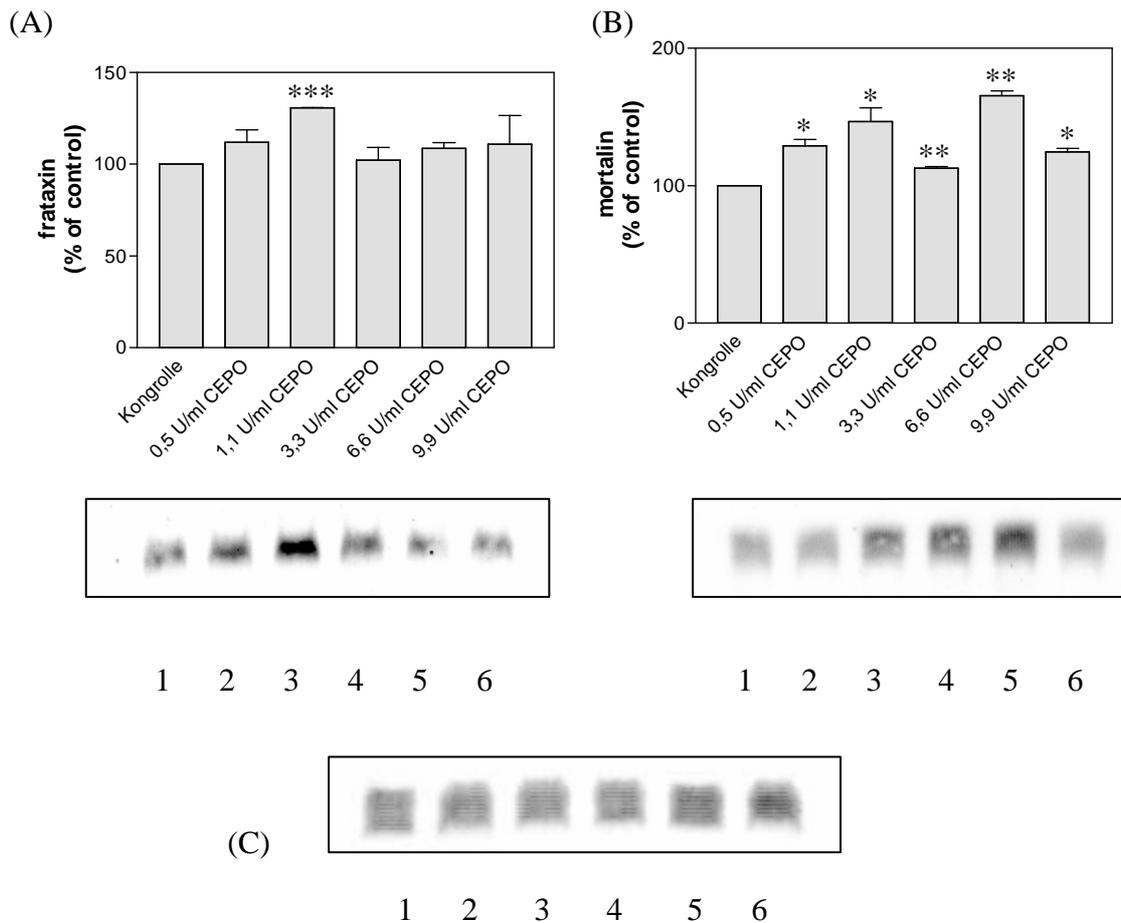


Abbildung 24: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 48h Inkubation. (C) Calnexin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 70 kDa

Siehe Legende Abbildung 23.

In Folge der Inkubation von THP-1 Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen an CEPO kann nach 24 Stunden nur eine geringe Beeinflussung der Expression des Frataxin und Mortalin Proteins beobachtet werden.

Zu anderen Ergebnissen kann es jedoch durch Verwendung von hitzeinaktiviertem FCS im Medium kommen, deshalb ist eine Versuchswiederholung unter diesen Bedingungen notwendig.

4.2.6 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 48h

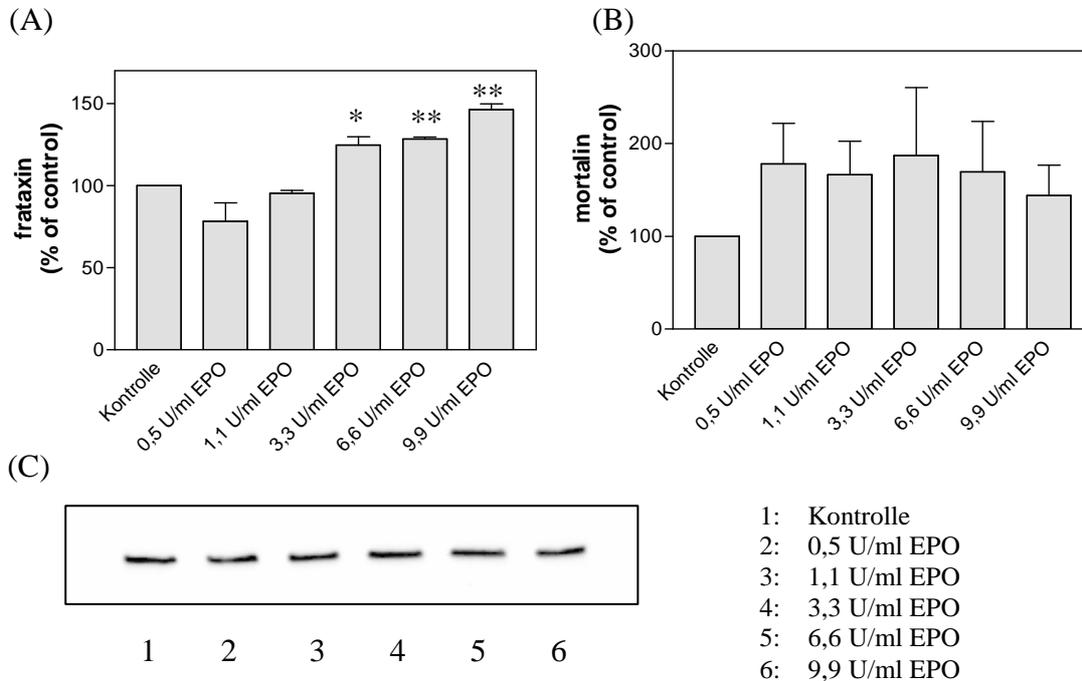


Abbildung 25: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation. (C) Calnexin Banden bei ca.70 kDa

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10% nicht-hitzeinaktiviertem FCS für 24h mit rhuEPO inkubiert. Die Zellysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mortalin- und Frataxin wurden mit polyklonalen Rabbit Antifrataxin- bzw. Antimortalin-Antikörpern sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Die Werte der Kontrollen wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden. 1: Kontrolle. 2: 0,5 U/ml EPO; 3: 1,1 U/ml EPO; 4: 3,3 U/ml EPO; 5: 6,6 U/ml EPO; 6: 9,9 U/ml EPO. Calnexin wurde als Kontrollprotein eingesetzt. Das Calnexin-Protein wurde mit dem polyklonalen Rabbit Anticalnexin Antikörper sichtbar gemacht.

In Abbildung 25 (A) wird, wie auch in späteren Versuchen (Kapitel 4.4) ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Frataxin Expression durch Inkubation mit rhuEPO deutlich.

4.2.7 Der Einfluss von carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 48h

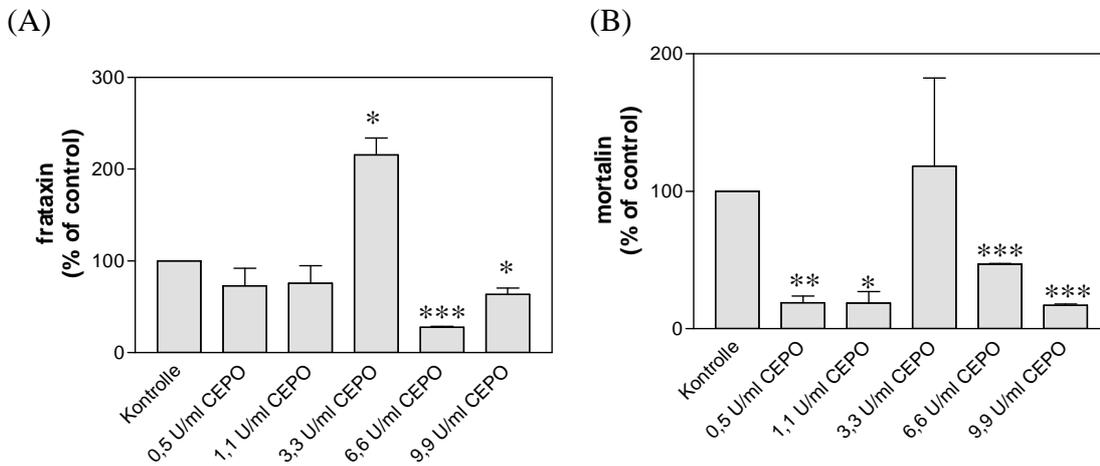


Abbildung 26: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 48h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 25.

Eine 48stündige Inkubation mit 3,3 U/ml carbamylisiertem EPO führt, wie in Abb. 26 zu sehen ist, zu einer Verdoppelung der Frataxin-Expression, nicht jedoch die anderen Konzentrationen. Auch die Expression von Mortalin wurde bei dieser Konzentration nach 48 stündiger Inkubation stimuliert.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Verwendung von nicht-hitzeinaktiviertem FCS im Medium kann nicht ausgeschlossen werden und in späteren Versuchen wurde daher wie in 1.4.1.1. diskutiert für die Experimente hitzeinaktiviertes FCS als Mediumzusatz verwendet.

4.2.8 Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 72h

Der nachfolgende Versuch in Abbildung 27 zeigt, dass es nach einer 72stündigen Inkubation mit rhuEPO bereits bei einer Zugabe von 1,1 U/ml zu mehr als einer Verdoppelung der Frataxin-Expression kommt. Es kann eine konzentrationsabhängige Steigerung der Frataxin-Expression bis hin zu einer Verachtfachung bei der Zugabe von 18,6 U EPO /ml, beobachtet werden.

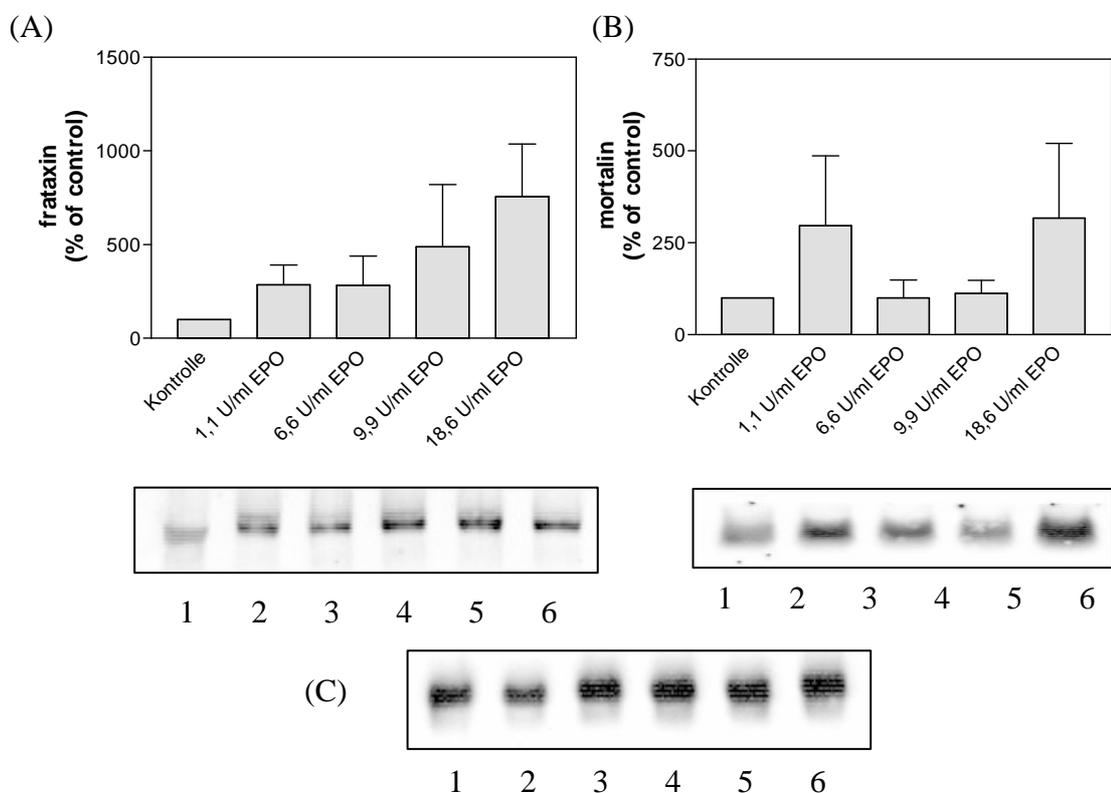


Abbildung 27: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 72h Inkubation. (C) Calnexin Bande (Kontrollprotein) bei ca. 70 kDa

Siehe Legende Abbildung 25.

Für aussagekräftige Daten ist jedoch eine spätere Versuchswiederholung unter Verwendung von hitzeinaktiviertem FCS als Medien-Zusatz notwendig gewesen.

4.2.9 Der Einfluss von carbamyliertem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins und Mortalin in THP-1 Zellen nach 72h

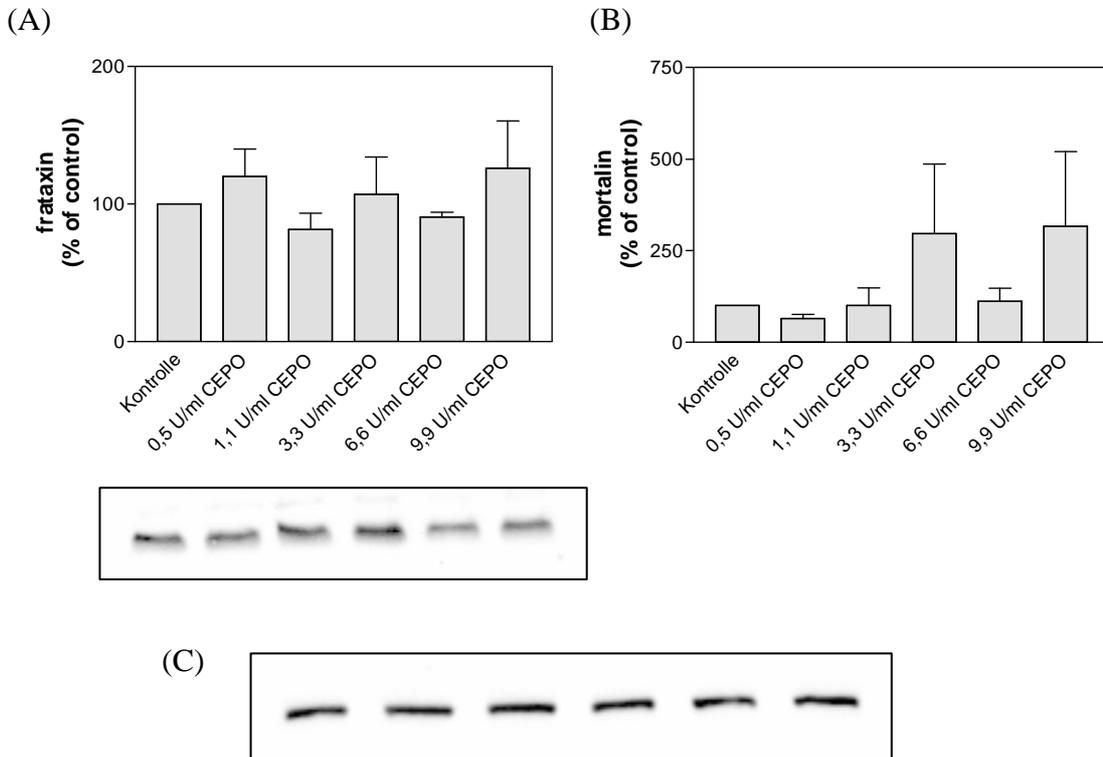


Abbildung 28: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin (A) und Mortalin (B) in THP-1 Zellen, nach 72h Inkubation. (C) Kontrollprotein für Frataxin: Calnexin bei ca. 70 kDa

Siehe Legende Abbildung 25.

Im Gegensatz zur 72stündigen Inkubation der THP-1 Zellen mit rhuEPO (Abb. 28), konnte durch die Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen an CEPO nur eine geringe Beeinflussung der Frataxin-Expression gezeigt werden.

Es konnte keine eindeutige Tendenz in der Beeinflussung der Mortalin-Expression durch CEPO nach dieser langen Inkubationszeit gezeigt werden.

Dass die erhaltenen Werte durch das verwendete nicht-hitzeinaktivierte FCS als Medien-Zusatz beeinflusst wurden ist jedoch anzunehmen.

4.3 Signifikante Erhöhung der Frataxin Protein-Expression durch rhuEPO in primären Lymphozyten von Patienten mit FRDA

Wie bereits Sturm et al. zeigte, kam es auch in den hier gezeigten Versuchen zu einer Erhöhung der Expression des Frataxin Proteins durch die Inkubation mit rhuEPO. Des Weiteren wird auch eine Abhängigkeit der erhöhten Frataxin Expression von der zugegebenen Menge an rhuEPO deutlich. [STURM et al., 2005]

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus mit welchem rhuEPO und CEPO auf die Frataxin mRNA und Protein Levels einwirken, zu erforschen.

In einem späteren Abschnitt dieser Studie (siehe Abschnitt 4.5.) konnte gezeigt werden dass rhuEPO den Anteil an Frataxin Protein, nicht jedoch an frataxin m-RNA erhöht, was somit auf einen post-translationellen Mechanismus schließen lässt.

Man kann daher annehmen das Frataxin einem Stabilisierungsprozess ausgesetzt ist, welcher sich in einem Anstieg der intrazellulären Halbwertszeit äußert. Der hierfür verantwortliche Signalweg ist noch unbekannt.

Die EPO/EPOR Signalwirkung ist gut erforscht. Der Haupteffektor der EPO Aktivität ist der Jak/STAT5 Signalweg, aber auch einige andere Signalwege werden nach der Bindung von EPO an den Rezeptor, darunter der PI3K/Akt, MAPK, und cAMP/pkA, aktiviert. [ACQUAVIVA et al., 2008]

Weitere Studien sind notwendig um die Mechanismen durch welche rhuEPO auf die Stabilisierung und Erhöhung des Frataxin Proteins wirkt, zu erforschen

4.3.1. Der Einfluss von rhuEPO und carbamyltem EPO (CEPO) auf die Expression des Frataxin Proteins in Lymphozyten isoliert, von einem FRDA Patienten

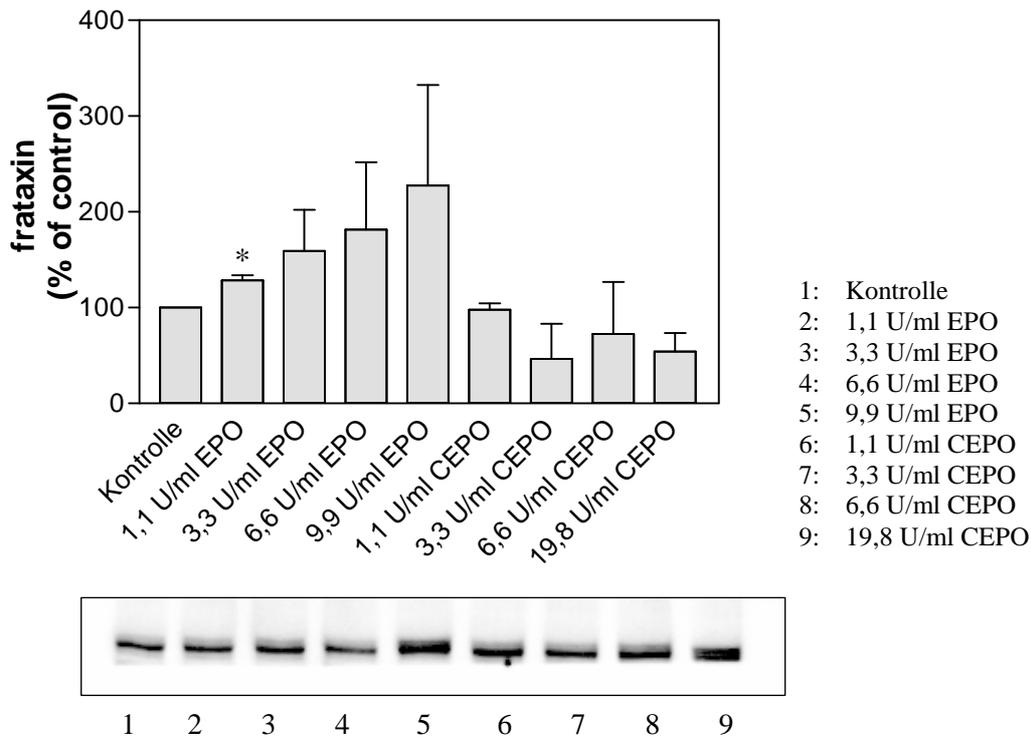


Abbildung 29: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Frataxin in Lymphozyten eines FRDA Patient, nach 48h Inkubation

Die Lymphozyten des Patienten wurden in RPMI Medium mit 10% nicht-hitzeinaktiviertes Serum für 48h mit rhuEPO und CEPO inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels 12% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das Frataxin-Protein wurde mit dem polyklonalen Antikörper Rabbit Antifrataxin sichtbar gemacht und die entstandenen Banden semiquantitativ ausgewertet. Als Kontrollgen wurde Calnexin (Rabbit) verwendet. Die Werte der Kontrollbanden werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen, welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

Wie in der Abb. 29 deutlich wird, steigt die Frataxin-Expression konzentrationsabhängig durch die Inkubation mit rhuEPO auf mehr als das Doppelte bei einer Konzentration von 9,9 U EPO/ml an.

Durch Inkubation der Patienten Lymphozyten mit CEPO konnte kein Anstieg der Frataxin-Expression sichtbar gemacht werden.

Aufgrund später durchgeführten Versuche unter Verwendung von RPMI-Medium mit hitzeinaktiviertem FCS (siehe Kapitel 4.4.2) muß jedoch eine Beeinflussung der erhaltenen Werte hier im Western Blot, durch die Verwendung von nicht-hitzeinaktiviertem FCS als RPMI Medium Zusatz angenommen werden.

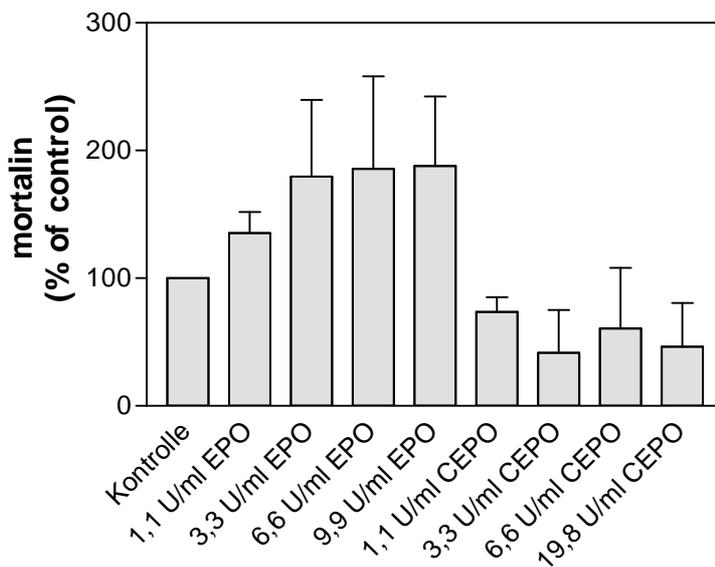


Abbildung 30: Einfluss von rhuEPO und CEPO auf die Expression von Mortalin in Lymphozyten eines FRDA Patient, nach 48h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 29.

Die Abb. 30 zeigt ähnliche Ergebnisse wie Abb. 29. Es wird verdeutlicht, dass die Expression des Protein Mortalin ebenso wie Frataxin konzentrationsabhängig durch rhuEPO stimuliert wird. Ein Einfluss des EPO Derivat, carbamylisiertem EPO (CEPO) kann hingegen nicht erkannt werden.

Auch hier möchte ich auf die Ergebnisse mit der Methode ECLIA zur Inkubation von Patienten-Lymphozyten mit EPO und CEPO (siehe Kapitel 4.4) und auf eine mögliche Beeinflussung durch das verwendete Medium, verweisen.

4.3.2. Der Einfluss von rhuEPO auf die Expression des Frataxin Proteins in Lymphozyten von einem gesunden Probanden.

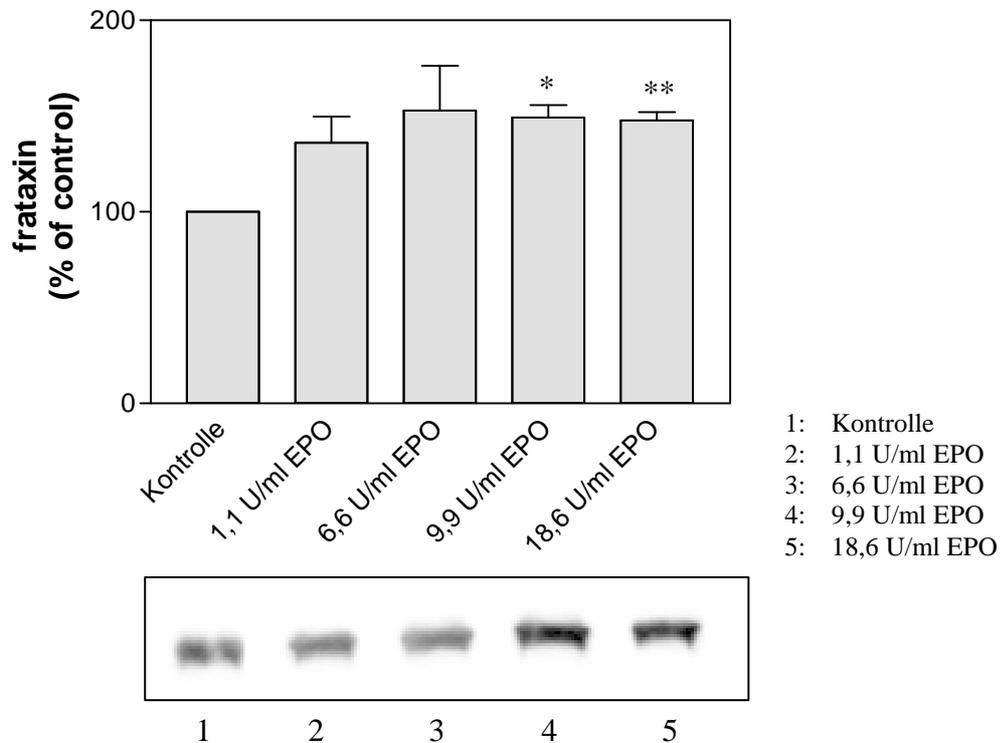


Abbildung 31: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin in Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 29.

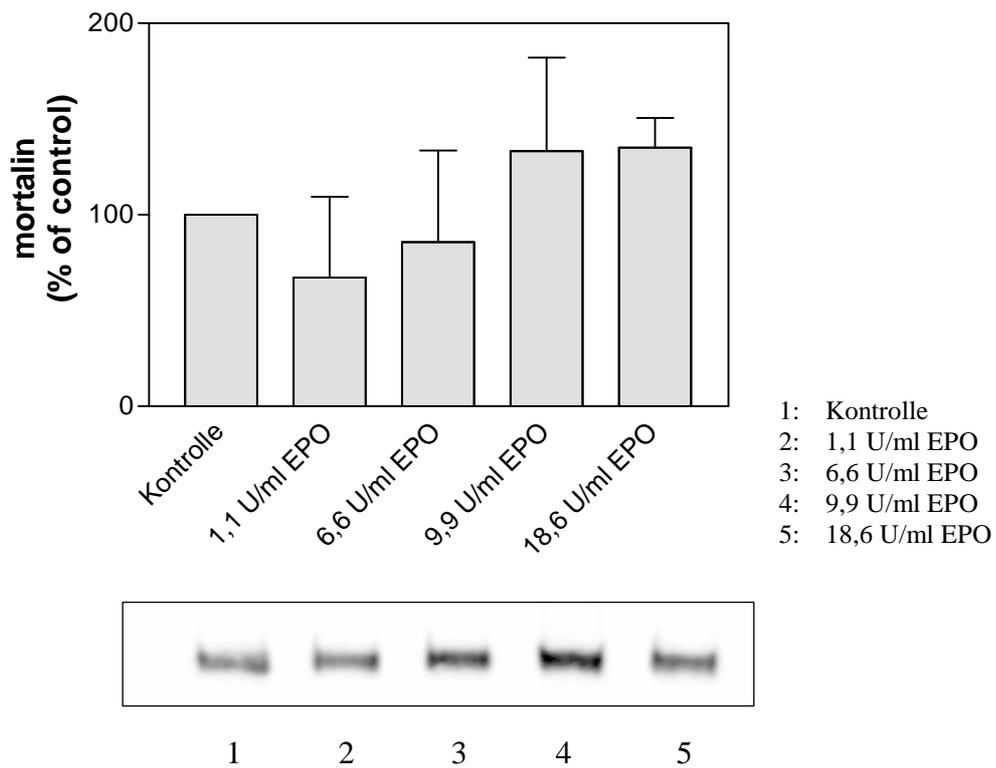


Abbildung 32: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Mortalin in Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 29.

Wie in Abbildung 31 und 32 veranschaulicht wird, konnte auch bei aus Frischblutproben eines gesunden Probanden isolierten Lymphozyten eine konzentrationsabhängige Stimulierung der Frataxin-Expression durch rhuEPO gezeigt werden.

Für eine Verifizierung dieser Daten sind jedoch Versuchswiederholungen unter Verwendung eines RPMI Mediums mit hitzeinaktiviertem Serum notwendig.

4.4 Die Bedeutung des klassischen Erythropoietin-Rezeptors bei der Frataxin-erhöhenden Wirkung von rekombinantem humanem Erythropoietin und carbamylisiertem Erythropoietin

Sturm et al. und Boesch et al. konnten bereits in mehreren Studien eine Erhöhung der Expression des Frataxin Proteins in primären Lymphozyten von FRDA Patienten, durch rhuEPO zeigen. Es wurde in diesen Studien eine Abhängigkeit der erhöhten Frataxin Expression von der zugegebenen Menge an rhuEPO deutlich. [STURM et al., 2005; BOESCH et al, 2007]

Der verantwortliche Mechanismus für die Frataxin erhöhende Eigenschaft von rhuEPO ist derzeit noch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde deshalb die Essentialität des klassischen EPO-Rezeptors für die Vermittlung des Frataxin erhöhenden Effektes von rhuEPO untersucht.

Des Weiteren wurde das nicht-erythropoetische Derivat des EPO (CEPO) als eine Alternative für die Behandlung von Friedreich´s Ataxie getestet.

Es wurden zwei Zelllinien als Modelle in den Versuchen eingesetzt, die erythroleukämischen K562 Zellen, welche den klassischen EPO-Rezeptor exprimieren und die humanen monozytären THP1 Zellen, welche diesen Rezeptor nicht exprimieren.

In diesem Teil der Arbeit wurde die Frataxinbestimmung mittels einer Messmethode durchgeführt, die auf dem Prinzip der Elektrochemilumineszenz basiert (ECLIA, electrochemical luminescence assay, siehe Material und Methoden Abschnitt 3.3.4). Durch ein SULFO-TagTM Reagenz wird nach elektrochemischer Stimulation Licht emittiert und im MSD Sektor Imager 6000 (von Meso Scale Discovery, Maryland, USA) ein Signal in Abhängigkeit von der Frataxinkonzentration in der Probe gemessen. In diesem System wurde ein monoklonaler Mouse Antifrataxin Antikörper (von Chemicon, USA) zur Fixierung auf der Multi-Array Platte und ein polyklonaler Rabbit Antikörper gegen humanes Frataxin als zweiter Antikörper, verwendet.

Als Detektionsantikörper wurde ein SULFO-TagTM markierter Antikörper, gerichtet gegen den zweiten Antikörper, eingesetzt. Der Frataxingehalt der Proben wurde auf

den Proteingehalt der Proben normalisiert (Biorad Proteinbestimmung, BIORAD, Austria)

Die Statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Software. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz der erhaltenen Werte wurde der t-Test angewendet. Signifikante Unterschiede vs. Kontrollen wurden in den Graphiken mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

4.4.1 Der Effekt von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Frataxin-Expression in K562 und THP-1 Zellen

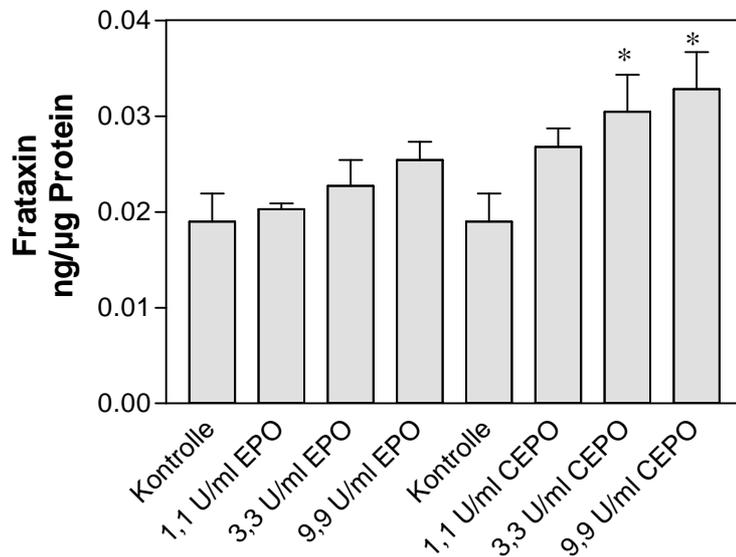


Abbildung 33: Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

K562 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und CEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) bestimmt. Die Werte der Kontrolle werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

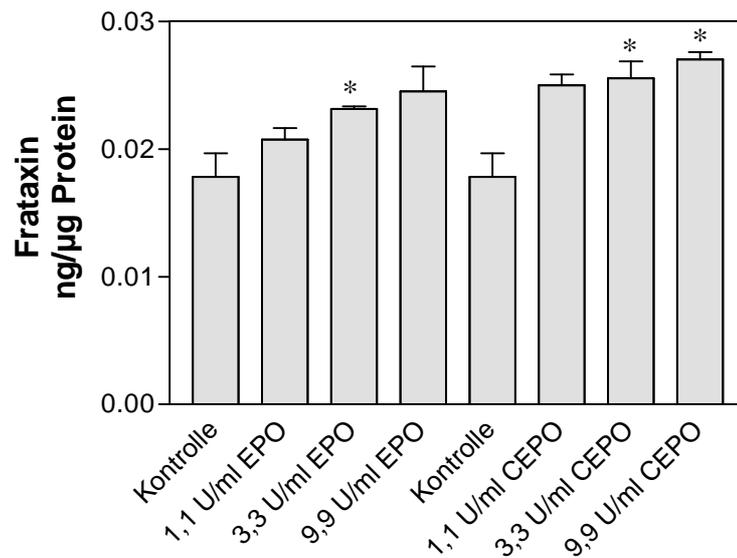


Abbildung 34: Einfluss von rhuEPO und carbamyltem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und CEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) bestimmt. Die Werte der Kontrollen werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

In diesen Experimenten erfolgte eine Inkubation von humanen erythroleukämischen Zellen K562, welche den klassischen EPO-Rezeptor exprimieren, mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und dem carbamyltem Derivat CEPO. CEPO hat als carbamyltes Derivat des rhuEPO die klassische Funktion des EPO, die Steuerung der Erythropoese verloren und wäre somit eine attraktive Alternative für rhuEPO für die Behandlung von neurodegenerativen und kardiovaskulären Krankheiten, besonders bei nicht-anämischen Patienten.

Als Zelllinie, welche den klassischen EPO-Rezeptor nicht exprimiert, wurden THP-1 Zellen mit denselben Konzentrationen rhuEPO und CEPO sowie die K562 Zellen inkubiert. In beiden Fällen erfolgte die Inkubation für 24 Stunden. Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (basierend auf dem Prinzip eines ELISA) bestimmt.

Es konnte gezeigt werden dass rhuEPO die Frataxin Expression in beiden Zelllinien erhöht, was darauf hindeutet, dass der Effekt von rhuEPO auf die Frataxin Expression nicht auf Zellen, welche den klassischen EPO-Rezeptor besitzen, limitiert ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es nun von Interesse herauszufinden ob es auch durch das nicht-erythropoetische EPO-Derivat carbamyliertes EPO (CEPO), welches nicht an den klassischen EPO Rezeptor binden kann, die Expression von Frataxin in den beiden Zelllinien (K562, THP-1) erhöhen kann.

Wie in Abbildungen 33 und 34 deutlich wird, kam es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung, welche vergleichbar ist mit jener Steigerung der Frataxin-Expression durch rhuEPO.

Wie die Abbildungen zeigen, kam es durch Inkubation mit CEPO, welches nicht an den klassischen EPO-Rezeptor bindet, zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Frataxin-Expression, vergleichbar mit jener Stimulierung durch das klassische rhuEPO. Zu diesen Ergebnissen kam man sowohl in Versuchen mit K562 Zellen als auch mit THP-1 Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Bindung an den klassischen EPO-Rezeptor für die Frataxin-erhöhende Wirkung durch rhuEPO nicht notwendig ist.

Folglich war es von Interesse herauszufinden ob CEPO auch in Lymphozyten von FRDA-Patienten zu einem effektiven Anstieg der Frataxin Expression führt, siehe folgende Abbildungen (Abb. 35 und 36).

4.4.2 Der Effekt von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Frataxin-Expression in primären Lymphozyten von gesunden Probanden und von Friedreich's Ataxie Patienten

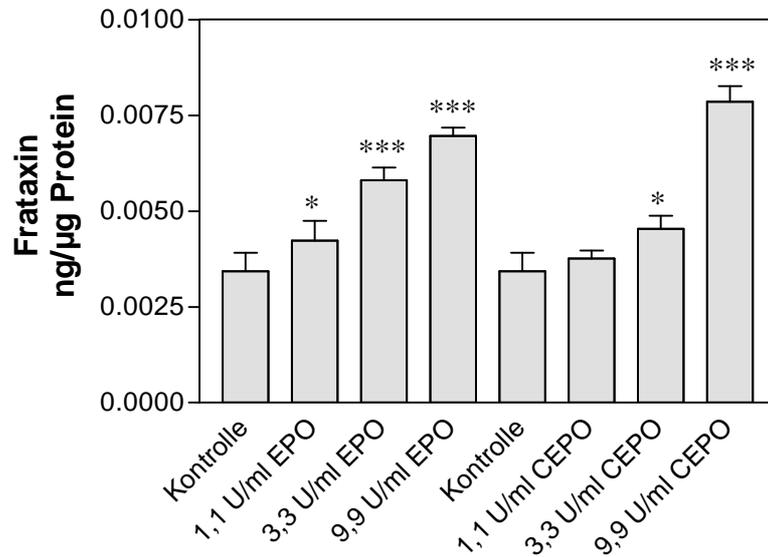


Abbildung 35: Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in primären Lymphozyten eines gesunden Probanden, nach 24h Inkubation

Primäre Lymphozyten eines gesunden Probanden wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und CEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) bestimmt. Die Werte der Kontrollen (ohne Zusatz von rhuEPO) werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

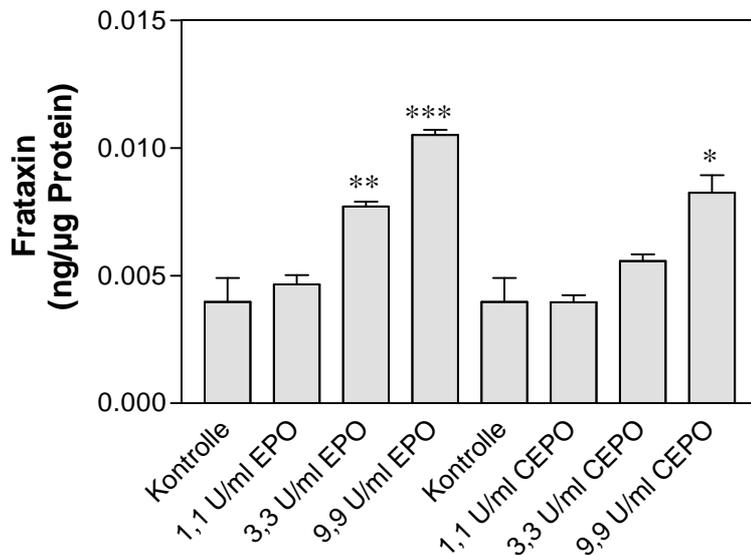


Abbildung 36: Einfluss von rhuEPO und carbamyltem EPO (CEPO) auf die Expression von Frataxin in primärem Lymphozyten eines FRDA Patienten, nach 24h Inkubation

Primäre Lymphozyten eines FRDA Patienten wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO und CEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) bestimmt. Die Werte der Kontrollen (ohne Zugabe von rhuEPO bzw CEPO) werden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

Um das Potential von CEPO für eine Behandlung der Friedreich's Ataxie Patienten zu bewerten, wurden primäre Lymphozyten von einem gesunden Probanden und einem Friedreich's Ataxie Patienten mit unterschiedlichen Konzentrationen CEPO und rhuEPO für 24 Stunden inkubiert.

Wie die Abbildungen 35 und 36 zeigen, konnte in den primären Lymphozyten von FRDA-Patient und gesundem Probanden eine ähnliche konzentrationsabhängige Erhöhung der Frataxin-Expression mit rhuEPO und seinem carbamyltem Derivat CEPO, wie in den Zelllinien K562 und THP-1, nachgewiesen werden.

Somit weisen auch diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Behandlung mit dem nicht-erythropoetischen EPO Derivat (CEPO) eine mögliche Alternative zum klassischen EPO für eine Erhöhung der Frataxin-Expression in Friedreich`s Ataxie Patienten darstellen könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass rhuEPO die Frataxin Expression durch einen Mechanismus stimuliert, welcher nicht vom klassischen EPO-Rezeptor abhängig ist. Auch anhand des nicht-erythropoetischen EPO Derivats CEPO, welches nicht an diesen Rezeptor bindet, konnte der gleiche Frataxin erhöhende Effekt in vitro veranschaulicht werden.

Mit diesen Daten wurde somit eine neue wissenschaftliche Basis für weitere Untersuchungen zur Prüfung der Effektivität dieses neuen Wirkstoffs für die Behandlung der Friedreich`s Ataxie geschaffen.

Boesch et al. konnten in einer klinischen Pilotstudie mit FRDA-Patienten enorme Veränderungen im Eisenstoffwechsel während einer rhuEPO Behandlung feststellen. [BOESCH et al, 2007]

Bezüglich des nicht-erythropoetischen CEPO liegen derzeit noch keine Informationen über mögliche Effekte auf den Eisenstoffwechsel vor. Es sind deshalb weitere Studien notwendig, welche sich mit dem Vergleich von konventionellen zu nicht-hematopoetischen EPO Verbindungen bezüglich pathophysiologischer Mechanismen der Friedreich`s Ataxie befassen.

4.5 Der Einfluss von rekombinantem humanem Erythropoietin auf die Expression der Frataxin mRNA

Wie in dem Kapitel 4.4 veranschaulicht wird, führt die Inkubation, von Zelllinien mit und ohne EPO-Rezeptor und auch primären Lymphozyten von FRDA-Patienten, mit rhuEPO und CEPO zu einer Erhöhung der Frataxin Protein-Expression.

In den folgenden Versuchen werden nun die Effekte von rhuEPO auf die Expression von Frataxin mRNA, in denselben Zelltypen untersucht um weitere Einsicht in die regulatorischen Effekte des rhuEPO auf die Frataxin Genexpression erhalten. Diese Ergebnisse können bei der Beurteilung von rhuEPO als potentiell [Therapeutikum](#) für FRDA Patienten hilfreich sein. [ACQUAVIVA et al., 2008]

Folgende Versuche wurden sowohl mit den den klassischen rhuEPO Rezeptor exprimierenden K562 als auch mit THP-1 Zellen, welche diesen Rezeptor nicht exprimieren, durchgeführt. Weiters wurden primäre Lymphozyten von gesunden Probanden und von FRDA Patienten eingesetzt.

Die Inkubationszeit betrug unabhängig von dem jeweiligen Zelltyp 3 Stunden. Nachdem die Zellsuspensionen auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurden, startete die Inkubation durch Zugabe von rhuEPO bzw. CEPO mit den Konzentrationen: 1,1; 3,3 und 9,9 U/ml. Für die Detektion der Frataxin Expression auf mRNA Ebene wurde eine Real time PCR durchgeführt. Es wurde die gesamte mRNA von den Lymphozyten mittels TRI Reagent® Solution (Applied Biosystems) extrahiert und je $1\mu\text{g}$ RNA in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels Real-time PCR amplifiziert wurde. Es wurden Primer für das Frataxin Gen und für weitere zwei Kontrollgene (GAPDH und humanes β -Actin) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$ Methode.

4.5.1 Der Einfluss von rhuEPO und carbamylisiertem EPO (CEPO) auf die Expression der Frataxin mRNA, in K562 und THP-1 Zellen

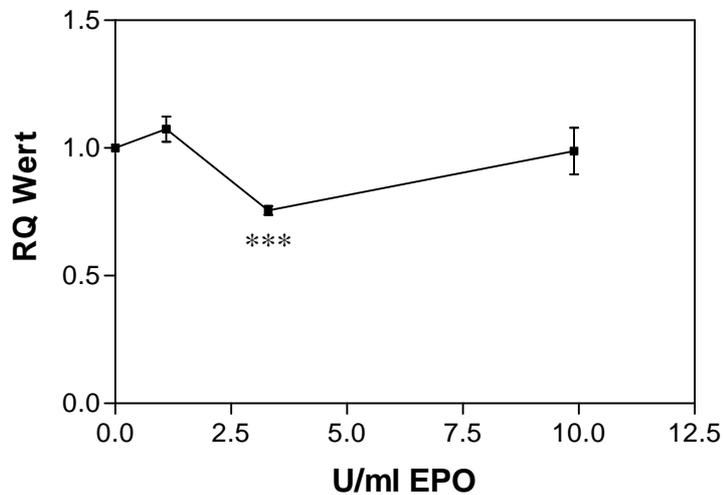


Abbildung 37: Einfluss von rhuEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in K562 Zellen, nach 3h Inkubation

K562 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 3h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Es wurde die gesamte mRNA von den Lymphozyten mittels TRI Reagent® Solution (Applied Biosystems) extrahiert und je 1µg RNA in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels Real-time PCR amplifiziert wurde. Es wurden Primer für das Frataxin Gen und als Kontrollgen humanes β -Actin verwendet. Für jede Reaktion wurden pro Probe 15µl Reaktionsgemisch eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ Methode. Die berechneten RQ Werte zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

K562 Zellen wurden als Modell für humane erythroid-leukämische Zellen welche den klassischen EPO Rezeptor exprimieren, verwendet.

Wie in der Abb. 37 deutlich wird, hat eine Inkubation mit rhuEPO in den K562-Zellen zu keiner Erhöhung der Expression von Frataxin mRNA geführt.

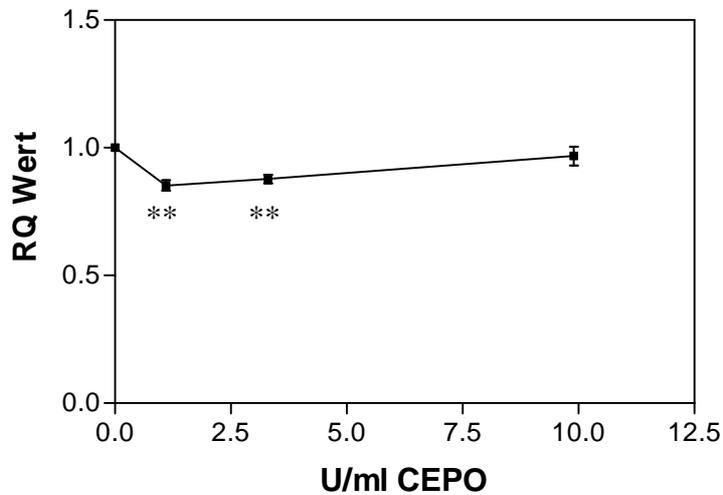


Abbildung 38: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in K562 Zellen, nach 3h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 37.

Auch durch Inkubation der K562 Zellen mit der carbamylierten Form des rhuEPO kam es nach 3-stündiger Inkubation zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression der Frataxin mRNA.

In den beiden folgenden Abbildungen (Nr. 39 und 40) wird gezeigt, dass es auch bei den THP-1 Zellen zu keiner Erhöhung der mRNA-Expression durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an EPO und carbamylertem EPO (CEPO) kam.

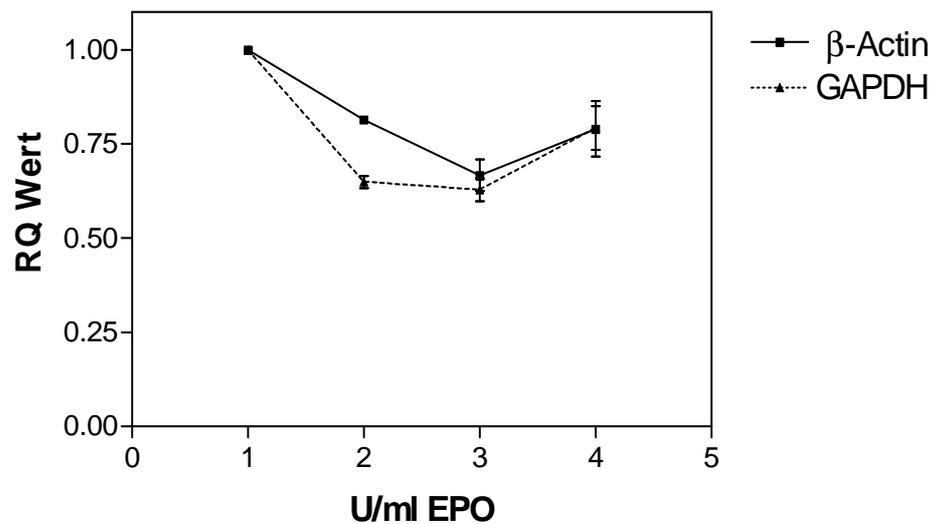


Abbildung 39: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in THP-1 Zellen, nach 3h Inkubation

THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 3h mit unterschiedlichen Konzentrationen CEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Es wurde die gesamte mRNA von den Lymphozyten mittels TRI Reagent® Solution (Applied Biosystems) extrahiert und je 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels Real-time PCR amplifiziert wurde. Es wurden Primer für das Frataxin Gen und für weitere zwei Kontrollgene (GAPDH und humanes β -Actin) verwendet. Für jede Reaktion wurden pro Probe 15 μ l Reaktionsgemisch eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode. Die berechneten RQ Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

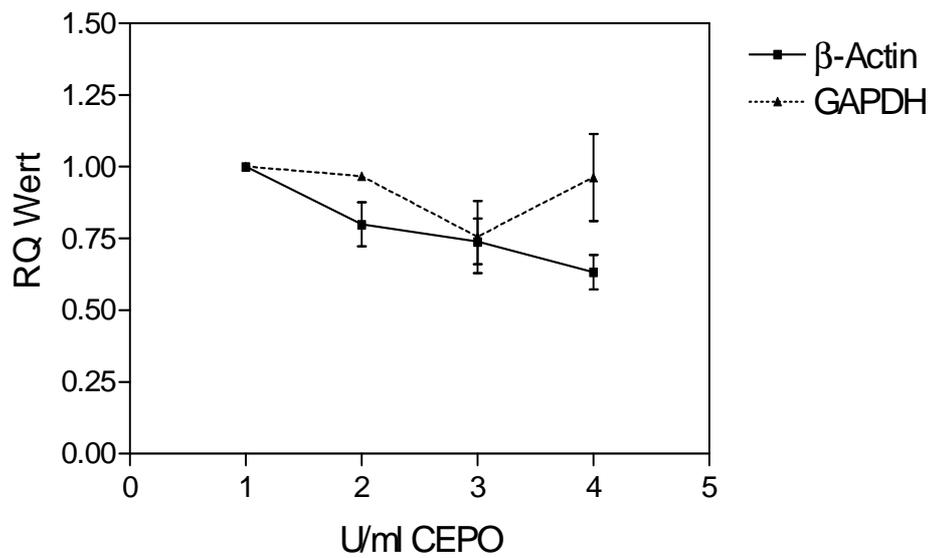


Abbildung 40: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in THP-1 Zellen, nach 3h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 39.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die regulatorischen Effekte von rhuEPO und CEPO auf das Frataxin Protein post-translationell stattfinden.

4.5.2 Der Einfluss von rhuEPO und carbamyltem EPO (CEPO) auf die Expression der Frataxin mRNA, in Lymphozyten von Friedreich's Ataxie Patienten und gesunden Probanden

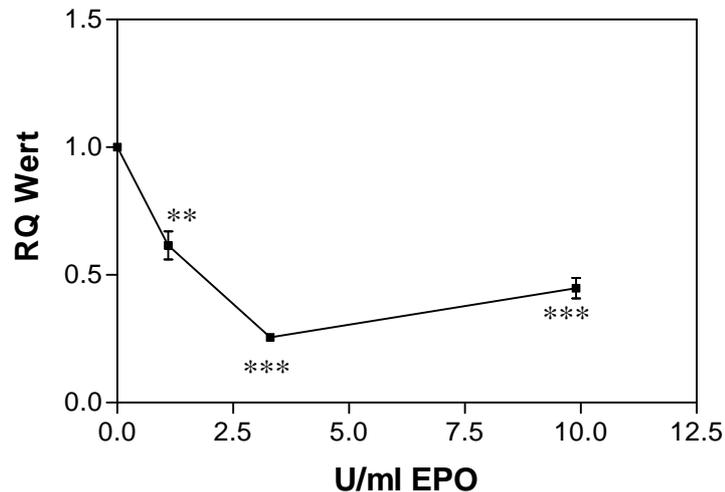


Abbildung 41: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von gesunden Probanden, nach 3h Inkubation

Die Lymphozyten von gesunden Probanden wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum für 3h mit unterschiedlichen Konzentrationen rhuEPO inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO). Es wurde die gesamte mRNA von den Lymphozyten mittels TRI Reagent® Solution (Applied Biosystems) extrahiert und je 1µg RNA in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels Real-time PCR amplifiziert wurde. Es wurden Primer für das Frataxin Gen und für die Endogene Kontrolle humanes β -Actin verwendet. Für jede Reaktion wurden pro Probe 15µl Reaktionsgemisch eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ Methode. Die berechneten RQ Werte zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

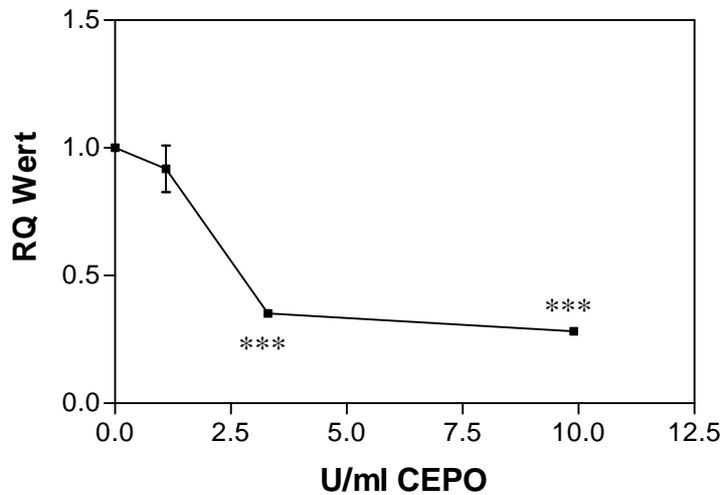


Abbildung 42: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von gesunden Probanden, nach 3h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 41.

Es konnte auf der mRNA Ebene keine signifikante Stimulierung der Expression von Frataxin in den Lymphozyten von gesunden Probanden gezeigt werden.

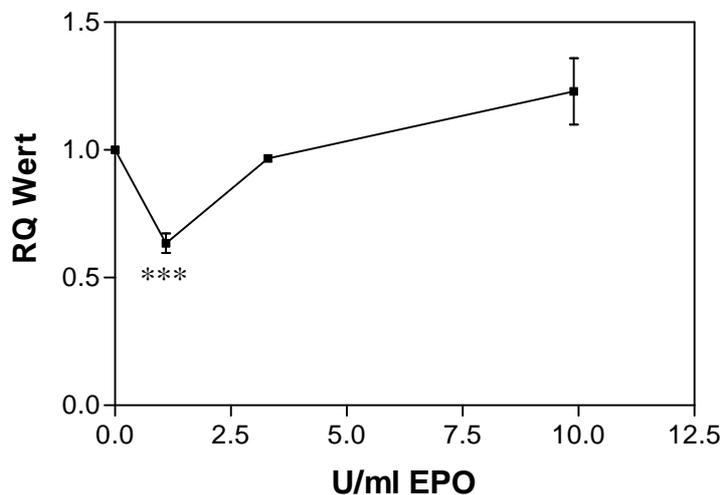


Abbildung 43: Einfluss von EPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von Friedreich's Ataxie Patienten, nach 3h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 41.

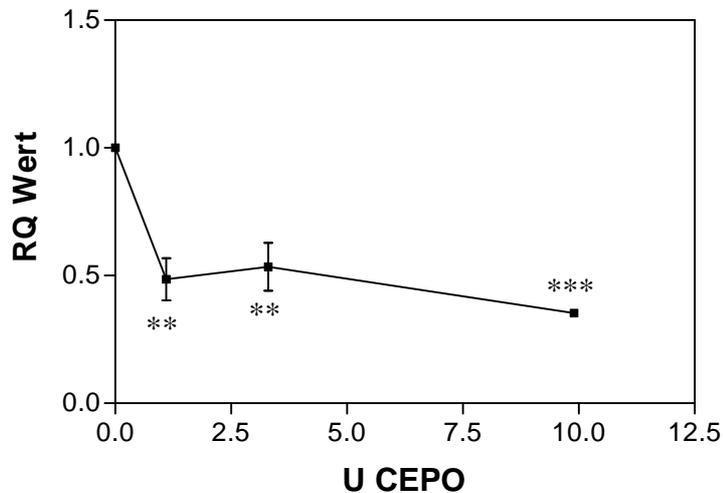


Abbildung 44: Einfluss von CEPO auf die Expression von Frataxin mRNA in Lymphozyten von Friedreich's Ataxie Patienten, nach 3h Inkubation

Siehe Legende Abbildung 41.

Während sich die Expression des Frataxin Protein durch Inkubation der Zellen (THP-1, K562-Zellen und Lymphozyten von Patienten und gesunden Probanden) mit EPO und CEPO deutlich stimulieren lässt (siehe Kapitel 4.4), zeigt sich keine Variation der Expression der Frataxin mRNA.

Bezogen auf die endogene Kontrolle humanes β -Actin konnte nach Inkubation von 3 Stunden mit 1,1; 3,3; oder 9,9 U/ml rhuEPO oder CEPO keine Erhöhung des Frataxin mRNA Levels bei den unterschiedlichen Zelltypen festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit schließen, dass rhuEPO ausschließlich auf der Ebene der Translation auf die Frataxin Expression einwirkt.

Aufgrund der unterschiedlichen Komplimentierung des RPMI Medium (mit hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum in den Versuchswiederholungen und mit nicht hitzeinaktiviertem FCS bei den anfänglich durchgeführten Experimenten) unter Verwendung verschiedenen Methoden um Änderungen der Frataxin-Expression zu

messen, können die daraus erhaltenen Daten nicht direkt miteinander verglichen werden.

Den Ergebnissen mit den Methoden in welchen mit hitzeaktiviertem Serum gearbeitet wurde, wird jedoch mehr Gewichtung gegeben.

Die Ergebnisse von Zellversuchen mit nicht-hitzeinaktiviertem Serum bedürfen einer erneuten Durchführung mit hitzeinaktiviertem Serum, um interpretierbare Daten auch über die Mortalin-Expression zu erhalten.

4.6 Inhibierung der cytosolischen und mitochondrialen Proteinsynthese und deren Einfluss auf die Expression des Frataxin Proteins

4.6.1 Inhibierung der cytosolischen und mitochondrialen Proteinsynthese in K562- und THP-1 Zellen

Um herauszufinden ob die Stimulierung der Expression des Frataxin Proteins durch rhuEPO und CEPO im Cytosol (eukaryotische Proteinsynthese) oder mitochondrial (prokaryotische Proteinsynthese) stattfindet, wurden K562- und THP-1 Zellen mit Hygromycin B inkubiert.

Hygromycin B (Calbiochem) inhibiert die Proteinsynthese auf der Stufe der Translokation an der großen Untereinheit der Ribosomen und verursacht Translationsfehler der mRNA Vorlage. [DEAN, 1994]

Den K562- und THP-1 Zellen wurden je 1 mg/ml Hygromycin B (Calbiochem) zugesetzt. Um den Einfluss von rhuEPO zu verdeutlichen wurden die Zellen auch mit rhuEPO und mit rhuEPO in Kombination mit Hygromycin B inkubiert.

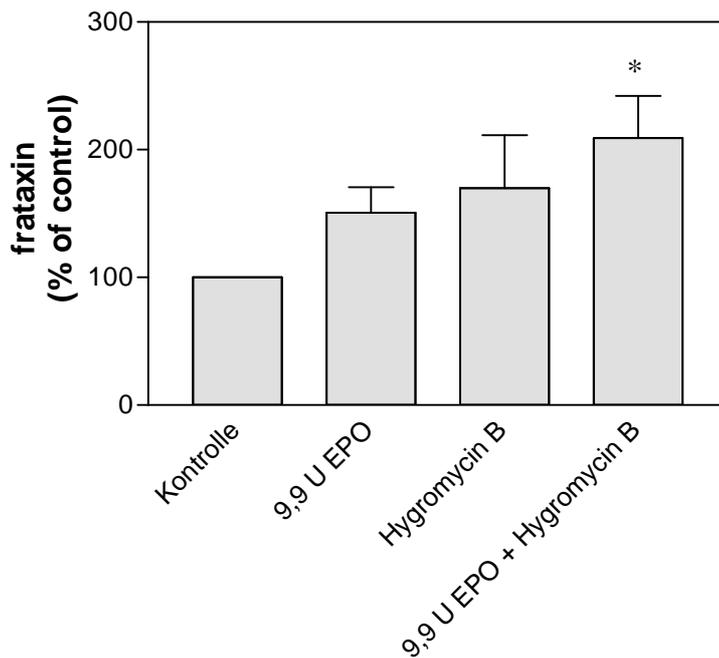


Abbildung 45: Inhibition der cytosolischen und mitochondrialen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum 24h mit rhuEPO und/oder Hygromycin B (1mg/ml) inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO und Hygromycin B). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) gemessen. Die Werte der Kontrolle wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

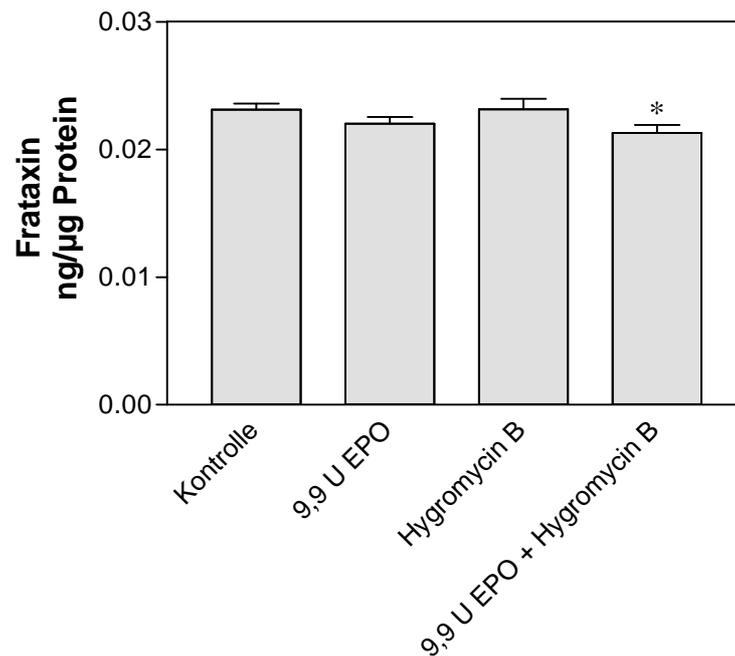


Abbildung 46: Inhibition der cytosolischen und mitochondrialen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

K562 Zellen wurden in RPMI Medium mit hitzeinaktiviertem Serum 24h mit rhuEPO und/oder Hygromycin B (1mg/ml) inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO und Hygromycin B). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) gemessen. Die Werte der Kontrolle wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse mit den THP-1 Zellen, wie sie in Abbildung 45 dargestellt werden, zeigen dass es trotz der Inhibierung der mitochondrialen und cytosolischen Proteinsynthese zu einer Stimulierung der Frataxin Expression kommt.

Bei den K562 Zellen (Abbildung 46) hingegen, kam es aufgrund der Inhibierung der Proteinsynthese auf cytosolischer und mitochondrialer Ebene durch Hygromycin B zu keiner Erhöhung der Frataxin Expression. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Proteinsynthese auf mitochondrialer und/oder cytosolischer Ebene für den

Mechanismus des rhuEPO notwendig ist. Zur genaueren Analyse wurden die Zellen auch mit Cycloheximid, mit und ohne rhuEPO inkubiert (siehe Kapitel 4.6.1).

4.6.1 Inhibierung der cytosolischen Proteinsynthese in K562- und THP-1 Zellen

In diesem Versuch wurden die Zelllinien K562 und THP-1 mit 15µg/ml Cycloheximid für 24h inkubiert. Cycloheximid inhibiert die eukaryotischen Proteinsynthese und somit die cytosolischen Proteinsynthese in den verwendeten Zelllinien.

Cycloheximid (Sigma) ist ein fungizides Antibiotikum, welches von dem Bakterium *Streptomyces griseus* gebildet wird und bei eukaryotischen Lebewesen als Translationshemmer fungiert indem es die Aktivität der Peptidyltransferase an der 60S Untereinheit der Ribosomen hemmt. Aufgrund seiner toxischen Nebenwirkungen (Schädigung der DNA) und seiner teratogenen Wirkung wird Cycloheximid jedoch nicht beim Menschen eingesetzt, sondern nur *in vitro*.

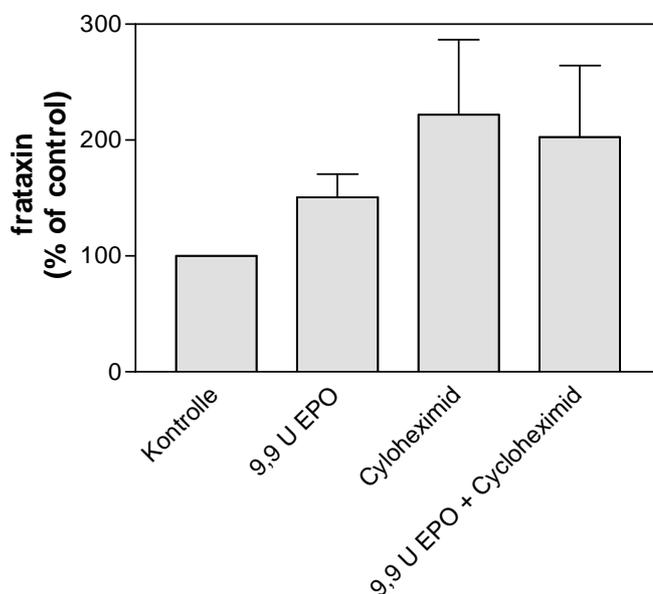


Abbildung 47: Inhibition der eukaryotischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in THP-1 Zellen, nach 24h Inkubation

THP-1 Zellen wurden in RPMI Medium mit hitzeinaktiviertem Serum 24h mit rhuEPO und/oder Cycloheximid (15µg/ml) inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO und Cycloheximid). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) gemessen. Die Werte der Kontrolle wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

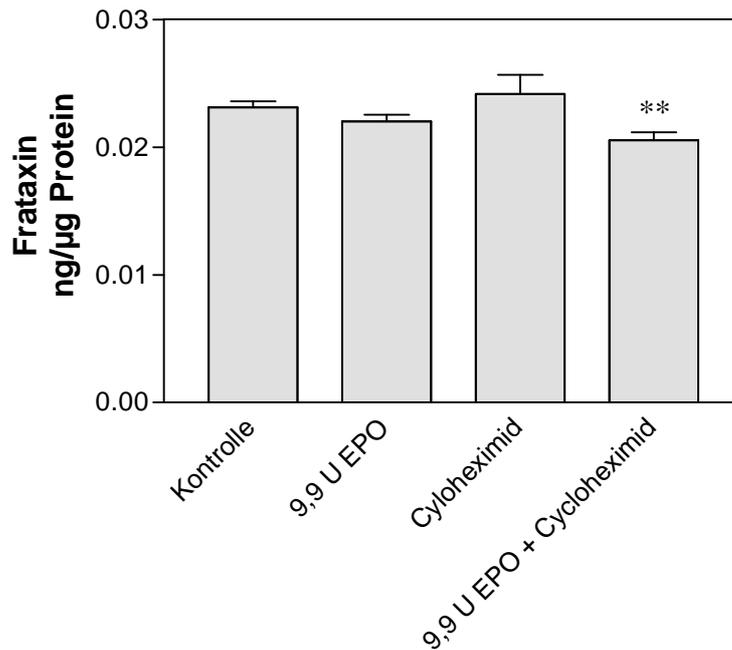


Abbildung 48: Inhibition der eukaryotischen Proteinsynthese und deren Auswirkung auf die Frataxin-Expression in K562 Zellen, nach 24h Inkubation

K562 Zellen wurden in RPMI Medium mit hitzeinaktiviertem Serum 24h mit rhuEPO und/oder Cycloheximid (15µg/ml) inkubiert (Kontrolle = ohne rhuEPO und Cycloheximid). Die Frataxin-Expression wurde durch einen ECLIA (electrochemical luminescence assay) (siehe Material und Methoden) gemessen. Die Werte der Kontrolle wurden mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte +/- SEM aus 2 unabhängigen Versuchen welche im Dreifach-Ansatz durchgeführt wurden.

Ähnlich wie beim Einsatz von Hygromycin B, kommt es auch durch Cycloheximid bei den THP-1 Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Frataxin-Expression, trotz der Inhibierung der eukaryotischen Proteinsynthese.

Bei den K562 Zellen hingegen kommt es durch die Inhibierung der eukaryotischen Proteinsynthese zu keiner Stimulierung der Frataxin Expression. Daraus lässt sich schließen, dass für die Frataxin Expression in den K562 Zellen die cytosolische Proteinsynthese notwendig ist. Allerdings zeigte in dieser Versuchsreihe rhuEPO alleine auch nicht den erwarteten Effekt auf die Frataxin-Erhöhung.

Da es bei den THP-1 Zellen trotz der Inhibierung der eukaryotischen (durch Cycloheximid und Hygromycin B) und prokaryotischen Proteinsynthese (durch Hygromycin B) zu einem Anstieg der Expression des Frataxin Proteins kommt, ist keine eindeutige Interpretation möglich.

4.7 Der Einfluss von rhuEPO, CEPO und Eisen auf die Zellproliferation von K562 Zellen

Anhand eines Zellproliferationsassay und anschließender Trypanblau-Methode wurde die Viabilität von K562 Zellen nach Inkubation mit rhuEPO (Roche), CEPO und Eisen (Fe-Gluconat „Ferrlecit“) nach 2 und 4 Tagen, bestimmt.

Ziel dieser Untersuchung war es zu überprüfen, ob diese Substanzen einen Einfluss auf die Zellproliferation haben und es dadurch zu einer Erhöhung der Frataxin-Expression kommt und es zu einer Steigerung des Wachstums von Krebszellen kommt.

Die Inkubation der K562 Zellen mit den unterschiedlichen Substanzen erfolgte in einer 6-Well-Platte mit jeweils 500µl einer Zellsuspension mit jeweils 0,2 Millionen Zellen/ml in RPMI-Medium, supplementiert mit 10% nicht hitzeinaktiviertem FCS.

Die Inkubationszeit startete nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von rhuEPO (1,1; 3,3; 6,6; und 9,9 U/ml). Es wurde jeweils für 2 und 4 Tage, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mittels Zellcounter gezählt und die Viabilität der Zellen anhand des Prozentsatzes an nicht-Trypanblau-gefärbten Zellen, mittels 0,4%igem Trypanblau in isotoner NaCl Lösung in der Zählkammer des Mikroskops, bestimmt.

Die Auswertung der erhaltenen Werte erfolgte mittels „GraphPad Prism“ Software.

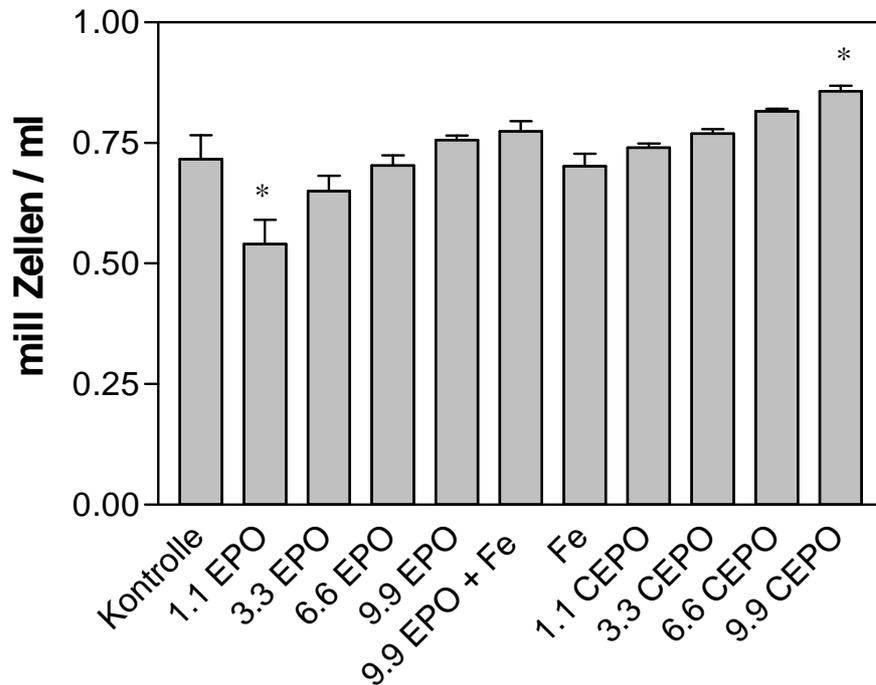


Abbildung 49: Einfluss von rhuEPO, CEPO, Eisen und/oder Chlorophyllin (2 Tage Inkubation) auf die Zellproliferation von K562 Zellen

Pro Well wurden 0,1 mill Zellen ausgesetzt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhuEPO, CEPO und Fe für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl (Zellcounter) und die Viabilität der Zellen (Trypanblau-Methode) bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte +/- SEM. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle wurden in der Abbildung mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$) gekennzeichnet.

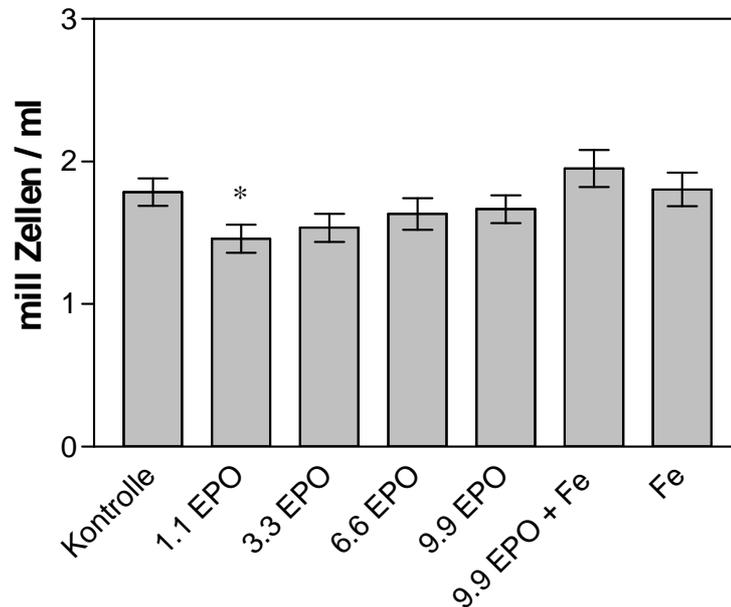


Abbildung 50: Einfluss von rhuEPO, CEPO, Eisen und/oder Chlorophyllin (4 Tage Inkubation) auf die Zellproliferation von K562 Zellen

Pro Well wurden 0,1 mill Zellen ausgesetzt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhuEPO, CEPO, Fe und/oder Chlorophyllin für 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl (Zellcounter) und die Viabilität der Zellen (Trypanblau-Methode) bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte +/- SEM. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle wurden in der Abbildung mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$) gekennzeichnet.

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen dass die Inkubation mit rhuEPO zu keiner signifikanten Erhöhung der Zellproliferation führen, weder nach 2 noch nach 4 Tagen Inkubation. Eine Abhängigkeit der gesteigerten Frataxin-Expression durch rhuEPO von der Zellproliferation bzw der Erhöhung der zellproliferation durch die erhöhte Frataxin-Expression konnte daher nicht gezeigt werden.

Lediglich die Inkubation mit 9,9 U/ml CEPO führte nach 2 Tagen zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate der K562 Zellen.

Ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Frataxin-Expression durch die Zugabe von CEPO und einer erhöhten Zellproliferation kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Für konkrete Aussagen sind hierfür jedoch noch weitere Untersuchungen mit hitzeinaktiviertem Medium notwendig.

Durch die Inkubation mit Eisen und Chlorophyllin kam es bei beiden Inkubationszeiten zu keiner Erhöhung der Proliferation der K562 Zellen.

Hinsichtlich der Viabilität konnten keine signifikanten Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen, unabhängig von der Inkubationszeit und der zugesetzten Substanzen, festgestellt werden.

In allen Zellsuspensionen waren einheitlich $97 \pm 2\%$ vitale Zellen enthalten.

5.0 Schlussbetrachtung

Friedreich's Ataxie (FA) ist eine progressive, degenerative Krankheit für welche es derzeit noch keine effektive Heilbehandlung gibt. [MYERS et al., 2008]

Verursacht wird diese Krankheit durch eine verminderte Synthese des mitochondrialen Proteins Frataxin. Das Frataxin Protein beträgt in betroffenen Individuen nur ca. 4 – 29% vom normalen Level, wohingegen asymptotische Krankheitsträger über 50% des normalen Levels verfügen. Die genaue Funktion von Frataxin ist derzeit noch nicht bekannt. [CHAKRAVARTY et al., 2003]

Eine der häufigsten Hypothesen beschäftigt sich mit der Rolle des Frataxin Proteins in der mitochondrialen Eisenhomöostase. [STURM et al. 2005]

Aktuelle Behandlungsmethoden zielen lediglich auf die Unterdrückung der Symptome in Folge des Frataxin-Mangels. Ein neuer therapeutischer Ansatz liegt in der Verabreichung von Medikamenten, welche den Frataxin Protein Level erhöhen. [VONCKEN et al., 2004]

In einer Studie von Sturm et al wurde gezeigt, dass rhuEPO in primären Lymphozyten von FRDA Patienten sowie auch in Herz- und neuronalen Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Frataxin-Expression führt. [STURM et al., 2005]

Erythropoietin, ein körpereigenes Glykoprotein, wird primär in der Niere, von den interstitiellen Fibroblasten und in geringerem Ausmaß auch in den Leberzellen als Antwort auf Hypoxie des Gewebes gebildet. [WEISS et al., 1997]

EPO wirkt regulierend auf den zellulären Eisenmetabolismus und als Regulator der Proliferation und Differenzierung der erythropoetischen Stammzellen des Knochenmarks. [YOUSSEOUFIAN et al., 1993]

EPO ist ein kommerziell erhältliches Medikament, welches als sicher bewertet wurde und sich bereits bei Patienten mit nephrologischen und hematologischen Krankheiten bewährt hat. [ACQUAVIVA et al., 2008]

Bisher ist der verantwortliche Mechanismus für die Frataxin erhöhende Eigenschaft von rhuEPO nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht ob der Frataxin erhöhende Effekt von rhuEPO durch den klassischen EPO Rezeptor vermittelt wird.

Um zu testen ob die Bindung von EPO an den klassischen EPO Rezeptor einen essentiellen Schritt für die Vermittlung des Effektes von EPO auf die Frataxin-Expression darstellt, wurden zwei verschiedene Zellkultur-Modelle verwendet: Eine Zelllinie, welche den klassischen EPO Rezeptor exprimiert, die erythroleukämischen K562 Zellen und eine Zelllinie welche diesen Rezeptor nicht exprimiert, humane monozytär THP1-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass rhuEPO die Expression von Frataxin in humanen erythroleukämischen K562 Zellen, welche den EPO Rezeptor exprimieren, ebenso wie in den humanen monozytären THP1 Zellen, welche diesen Rezeptor nicht exprimieren, steigert.

Aufgrund dieser Ergebnisse, welche zeigen, dass der Effekt von rhuEPO auf die Frataxin Expression nicht auf Zellen die den klassischen EPO Rezeptor exprimieren, limitiert ist, war es interessant herauszufinden ob das nicht-erythropoetische wirksame EPO Derivat carbamyliertes EPO (CEPO), welches nicht an diesen Rezeptor bindet, die Frataxin Expression in den beiden Zelllinien auch erhöhen kann.

Und auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Frataxin Expression, vergleichbar mit jener durch das klassische rhuEPO.

Somit bestätigen diese Ergebnisse, dass der Effekt von EPO auf die Frataxin-Expression nicht durch den klassischen EPO Rezeptor vermittelt wird.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass CEPO genauso wie rhuEPO die Frataxin Expression in primären Lymphozyten von gesunden Personen und von Friedreich's Ataxie Patienten signifikant erhöht. Es besteht somit ein starker Hinweis darauf, dass das nicht-erythropoetische Derivat von Erythropoietin (CEPO) ein neues Frataxin erhöhendes Medikament für Patienten der Friedreich's Ataxie in vivo darstellen könnte.

Während das Protein Frataxin durch rhuEPO anstieg, zeigten die mRNA Levels von Frataxin keine signifikanten Änderungen. Es kann somit darauf geschlossen werden, dass der Effekt von rhuEPO auf die Frataxin Expression post-translationell reguliert wird.

Diese Ergebnisse stellen eine wissenschaftliche Basis für weitere Studien zur Prüfung der Effektivität von nicht-erythropoetischen Derivaten des Erythropoietins für die Behandlung von FRDA Patienten, dar.

6.0 Zusammenfassung

Friedreich's Ataxie (FRDA) ist eine neuro-degenerative Erkrankung, welche durch verminderte Expression des mitochondrialen Proteins Frataxin hervorgerufen wird. Frataxin wird als ein Eisen-Chaperon für die Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese in den Mitochondrien benötigt, ein Mangel verursacht Eisen Akkumulation in den Mitochondrien, oxidativen Stress und Zellschäden. [CAMPUZANO et al., 1997] Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhuEPO), ein Cytokin, erhöht signifikant die Frataxin-Expression durch einen derzeit noch unbekanntem Mechanismus. [STURM et al., 2005]

Das Ziel dieser Arbeit war es die Rolle des klassischen Erythropoietin Rezeptors (EPO-R) bei der Frataxin erhöhendem Wirkung von rhuEPO herauszufinden.

Die Experimente wurden mit den EPO-R exprimierenden humanen erythroleukämischen K562 Zellen, humanen Monozyten THP1 Zellen, einer Zelllinie welche den klassischen EPO-R nicht exprimiert und mit primären Lymphozyten von Gesunden und von Patienten der Friedreich's Ataxie durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhuEPO und dem erythropoetisch nicht wirksamen EPO Derivat carbamyliertes EPO (CEPO), welches nicht an den klassischen EPO-R bindet, inkubiert. Die Frataxin Expression wurde mit den Methoden Western Blot und ECLIA (electrochemical luminescence assay) basierend auf dem Prinzip eines ELISA, bestimmt, und für die Messung der Frataxin mRNA wurde die Real time PCR verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass rhuEPO die Frataxin-Expression in den K562 Zellen, welche den EPO-R exprimieren genau so wie in den THP1 Zellen, welche diesen Rezeptor nicht exprimieren und in primären Lymphozyten von Gesunden und FRDA Patienten, erhöht. Carbamyliertes Erythropoietin (CEPO), welches nicht an den klassischen EPO-R bindet erhöht ebenfalls die Frataxin-Expression in allen verwendeten Zellmodellen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Wirkung von EPO auf die Frataxin-Expression nicht durch den klassischen EPO Rezeptor vermittelt wird, und stellen eine wissenschaftliche Basis für weitere Studien zur Bewertung der Effektivität von EPO Derivaten, welche nicht an den klassischen EPO Rezeptor binden, in der Behandlung der Friedreich's Ataxie dar.

7.0 Summary

Friedreich's ataxia (FRDA) is a neurodegenerative disorder caused by decreased expression of the mitochondrial protein frataxin, described to be an iron chaperone for the assembly of iron-sulphur clusters in the mitochondria, causing iron accumulation in mitochondria, oxidative stress and cell damage. [CAMPUZANO et al., 1997] The cytokine recombinant human erythropoietin (rhuEPO) significantly increases frataxin-expression by a still unknown mechanism. [STURM et al., 2005]

The aim of this *in vitro* study was to investigate the role of the classical erythropoietin receptor (EPO-R) in the frataxin increasing effect of rhuEPO.

In the experiments EPO-R expressing human erythroleukaemic K562 cells, human monocytes THP-1 cells, a cell line which does not express EPO-R and primary lymphocytes from control and Friedreich's ataxie patients were incubated with different concentrations of rhuEPO and the non-erythropoietic EPO-derivative carbamoylated erythropoietin (CEPO), which cannot bind to the EPO-R. Frataxin-expression was detected by western blot and an electrochemical luminescence assay (based on the principle of an ELISA) and real time RT-PCR for frataxin-mRNA.

We show that rhuEPO increases frataxin-expression in K562 cells expressing EPO-R as well as in the cell line THP1, which does not express EPO-R and in the primary lymphocytes from control and FRDA patients. Carbamoylated Erythropoietin (CEPO) which cannot bind to this receptor increases frataxin-expression in all cell models used in this study.

These findings confirm that the effect of EPO on frataxin-expression is not mediated by the classical EPO-R.

Our results provide a scientific basis for further studies examining the effectiveness of erythropoietin derivatives which do not bind to the classical EPO-R for the treatment of FRDA patients.

8.0 Literaturverzeichnis

ACQUAVIVA F, CASTALDO I, FILLA A, GIACCHETTI M, MARMOLINO D, et al. Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mRNA expression. *Cerebellum*, 2008, Jun 26.

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

ANDERSSON LC, NILSSON K, GAHMBERG CG. K562 - a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*, 1979, Feb;23(2):143-7.

BECKER E, RICHARDSON DR. Frataxin: its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 33:1-10.

BOESCH S, STURM B, HERING S, POEWE W, GOLDENBERG H, SCHEIBER-MOJDEHKAR B. Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Ann Neurol.*, 2007.

BODDAERT N, HANH LE QUAN SANG K, RÖTIG A, LEROY-WILLIG A, GALLET S, BRUNELLE F, SIDI D, THALABARD JC, MUNNICH A, CABANTCHIK ZI. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood*, 2007,110: 401-408.

BRINES M, CERAMI A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.*, 2005, Jun;6(6):484-94.

BIDICHANDANI SI, ASHIZAWA T, PATEL PI. Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet*, 1997, 60:1251-56.

CAMPUZANO V, MONTERMINI L, MOLTÒ MD, PIANESE L, COSSÉE M, CAVALCANTI F, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* Mar., 1996, 8;271(5254):1423-7.

CAMPUZANO, V., et al.. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, 6: 1771-1780.

CHAKRAVARTY A. Friedreich's ataxia – yesterday, today and tomorrow . *Neurol India*, 2003, 51:176-82.

CONDO I, VENTURA N, MALISAN F, RUFINIL A, TOMASSINIL B, TESTIL R. In vivo maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 2007, Vol.16, No.13, 1534–1540.

DEAN N. Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994, 92:1287.

DÜRR A. Friedreich's ataxia: treatment within reach. *Lancet Neurology*, 2002, 1: 370–74.

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

ERBAYRAKTAR S., LANEROLLE N., LOTBINIERE A., KNISELY J. PS., et al. Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. *Mol Med*, 2006, 12(4-6)74-80.

FIORDALISO F, CIMENTI S, STASZEWSKY L, BAI A, CARLO E, CUCCOVILLO I, DONI M, MENGOZZI M, TONELLI R, GREZZI R, COLEMAN T, BRINES M, CERAMI A, LATINI R. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia–reperfusion injury. *PNAS*, 2005, Feb.8, Vol.102, No.6:2046-2051.

FOGL BL, PERLMAN S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 245–57.

FOURY F, CAZZALINI O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, 1997, 411:373–7.

HAAS I.G. Protein-mediated protein maturation in eukaryotes. *FEBS Lett.*, 1995, 369: 72-75.

JELKMANN W. Molecular Biology of Erythropoietin. *Internal Medicine*, 2004, Vol. 43, No. 8:649-659.

KAPTAIN S, DOWNEY WE, TANG C, PHILPOTT C, HAILE D, ORLOFF DG, HARFORD JB et al. A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 10109-10113.

KAUL SC, DEOCARIS CC, WADHWA R. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. *Experimental Gerontology*, 2006, 42:263–274.

LACOMBE C, MAYEUX P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14 (Suppl 2):22-28.

LACOMBE C, MAYEUX P. Biology of erythropoietin. *Haematologica*, 1998, 83:724-732.

LAPPIN T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist*, Suppl, 2003, 1:15-8.

LEIST M, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 2004, 305, 239.

LOZZIO CB, LOZZIO BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975, 45: 321-334.

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

MYERS L, FARMER JM, WILSON RB, FRIEDMAN L, TSOU A, PERLMAN SL, SUBRAMONY SH, GOMEZ CM, ASHIZAWA T, WILMOT GR, MATHEWS KD, BALCER LJ, LYNCH DR. Antioxidant use in Friedreich ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 2008, 267:174–176.

MARTI HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207:3233-3242.

NERI ML, BORTUL R, TABELLINI G, BORGATTI P, BALDINI G, CELEGHINI C, CAPITANI S, MARTELLI AM. Erythropoietin-induced erythroid differentiation of K562 cells is accompanied by the nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase and intranuclear generation of phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate. *Cellular Signalling*, 2001, 14:21-29.

OHTSUKA R, ABE Y, FUJII T, YAMAMOTO M, NISHIMURA J, et al. Mortalin is a novel mediator of erythropoietin signalling. *Eur J Haematol.*, 2007, Aug. 79 (2):114-25.

PIANESE L, TURANO M, LO CASALE MS, DE BIASE I, GIACCHETTI M, PONTICELLI A, CRISCUOLO C, FILLA A, COCOZZA S. Real time PCR quantification of frataxin mRNA in the peripheral blood leucocytes of Friedreich ataxia patients and carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75:1061–1063.

PUCCIO H, KÖNIG M. Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, 2000, Vol. 9, No. 6: 887-892.

PONKA P. Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.*, 2004, Mar;1012:267-81.

RADISKY DC, BABCOCK MC, KAPLAN J. The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 4497-4499.

ROUAULT TA, TONG WH. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(4): 345-351.

ROUAULT TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.*, 2006 Aug;2(8):406-14.

RISTOW M, GIONNAKIDON E, HEBINCK J, BUSCH K, VORGERD M, KOTZKA J, et al. An association between NIDDM and a GAA trinucleotide repeat polymorphism in the X25/Frataxin (Friedreich's ataxia) gene. *Diabetes*, 1998, 47:851-4.

RISTOW, M., et al.. Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, USA 97: 12239-12243.

RÖTIG A, SIDI D, MUNNICH A, RUSTIN P. Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, Vol.8 No.5 May:221-224.

SAKATA S, ENOKI Y, TOMITA S, KOHZUKI H, NAKATANI A. Enhancement of erythroid differentiation in clones of human leukemic cell line K562 by fetal calf serum. *Exp. Hematol.*, 1985, 13(8):745-9.

SCHÖLS L, AMOIRIDIS G, PRZUNTEK H, FRANK G, EPPLEN JT, EPPLEN C. Friedreich's ataxia Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain*, 1997, 120, 2131-2140.

SIREN AL, FRATELLI M, BRINES M, GOEMANS C, CASAGRANDE S, LEWCZUK P, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98:4044-4049.

SINCLAIR AM, TODD MD, FORSYTHE K, KNOX SJ, ELLIOTT S, BEGLEY CG. Expression and Function of Erythropoietin Receptors in Tumors. *Cancer*. Aug, 2007, 1;110(3):477-88.

SMITH KJ, BLEYER AJ, LITTLE WC, SANE DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res.*, 2003, Sep 1;59(3):538-48.

SHAN Y, NAPOLI E, CORTOPASSI G. Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperons. *Hum. Mol. Genet.*, 2007, 8: 929-941.

STURM B, STUPPHANN D, KAUN C, BOESCH S, SCHRANZHOFER M, WOJTA J, GOLDENBERG H, SCHEIBER-MOJDEHKAR B. Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vivo. *Eur J Clin Invest.*, 2005, Nov;35(11):711-7.

STEHLING O, ELSÄSSER HP, BRÜCKEL B, MÜHLENHOFF U, LILL R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, 13:3007-3015.

TSUCHIYA S, YAMABE M, YAMAGUCHI Y, KOBAYASHI Y, KONNO T, TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980, 26: 171-176.

UDUPA KB. Functional significance of erythropoietin receptor on tumor cells. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(46):7460-7462.

VONCKEN M, IOANNOU P, DELATYCKI MB. Friedreich ataxia - update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics*, 2004, 5:1-8.

WEISS G, HOUSTON T, KASTNER S, JÖHRER K, GRÜNEWALD K, BROCK JH.
Regulation of Cellular Iron Metabolism by Erythropoietin: Activation of Iron-Regulatory Protein and Upregulation of Transferrin Receptor Expression in Erythroid Cells. *Blood*, 1997, Vol 89, No 2 (January 15):680-687.

YOUSSOUFIAN H, LONGMORE G, NEUMANN D, YOSHIMURA A, LODISH HF.
Structure, Function, and Activation of the Erythropoietin Receptor. *Blood*, 1993, Vol.81, No.9 (May 1):2223-2236.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Melissa Helming
Geburtsdatum	24. April 1984
Geburtsort	Salzburg
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig

SCHULBILDUNG

1990 – 1994	Volksschule Pöndorf
1994 – 1998	Hauptschule Frankenmarkt
1998 – 2001	Handelschule Neumarkt am Wallersee
2001 – 2003	Handelsakademie Salzburg
2003 – 2008	Studium für Ernährungswissenschaften Wien

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

2001 – 2007	Ferialpraktika Fa Billa AG
August 2007	Laborpraktikum Fa Starzinger GmbH & Co KG
November 2007	Laborpraktikum Institut für Med.Chemie
SS 2008	Tätigkeit als Tutorin bei dem Biochemischen Praktikum für Ernährungswissenschaften am Institut für Medizinische Chemie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Melissa Helminger, 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