



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Der Einfluss von Zellkulturbedingungen und Antioxidantien auf die Expression von Frataxin

Zur Erlangung des akademischen Grades Magistra der
Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.) an der Fakultät für
Lebenswissenschaften der Universität Wien

Verfasserin:	Chantal Kopecky
Matrikel-Nummer:	0106878
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg
Wien, im	Juni 2009

So eine Arbeit ist eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zur Entstehung dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich mich beim Institutsleiter Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Ermöglichung meiner Diplomarbeit sowie für die Möglichkeit, am EIC Kongress 2008 in St. Gallen teilzunehmen, bedanken.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Betreuerin Dr. Brigitte Nina Sturm für die Unterstützung in allen Bereichen meiner Tätigkeit sowie für alle wissenschaftlichen Ratschläge danken.

Weiters bedanke ich mich bei Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar und Mag. Hannes Steinkellner, die ich immer in wissenschaftlichen Fragen um Rat bitten konnte.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem Laura Neumann für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Vor allem möchte ich auch Melissa Helminger danken, sie war stets hilfsbereit, hatte immer ein offenes Ohr und aufbauende Worte für mich. Ich wünsche ihr für ihre Doktorarbeit alles Gute.

DANKESCHÖN!

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Abkürzungsverzeichnis

1.0 Einleitung und Fragestellung	1
2.0 Literaturüberblick	4
2.1 Friedreich's Ataxie (FRDA)	4
2.1.1 Pathophysiologie.....	4
2.1.2 Molekulare Genetik.....	5
2.1.3 Phänotyp.....	8
2.2 Frataxin (Fx)	9
2.2.1 Funktionen von Frataxin.....	10
2.2.2 Frataxin und oxidativer Stress.....	13
2.3 Mögliche Therapieformen für Friedreich's Ataxie	17
2.3.1 Antioxidantien.....	17
2.3.1.1 α -Tocopherol Succinat.....	18
2.3.1.2 Kaffeesäure.....	19
2.3.1.3 Curcumin.....	20
2.3.1.4 Resveratrol.....	21
3.0 Material & Methoden	23
3.1 Zellkultur	23
3.1.1 Zelllinien.....	23
3.1.1.1 P19.....	24

3.1.1.1.1 α -MEM	24
3.1.1.2 K562	25
3.1.1.2.1 RPMI	25
3.1.1.3 HEK 293 (T-Rex 293)	26
3.1.1.3.1 DMEM	27
3.1.2 Mediumwechsel und Passagieren	27
3.1.3 Differenzieren von P19 Zellen	28
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	29
3.2 Inkubation der Zellen	30
3.2.1 Verwendete Substanzen	30
3.2.1.1 Medien	30
3.2.1.1.1 Medien für die Inkubation der P19 Zellen	30
3.2.1.1.2 Medien für die Inkubation der K562 Zellen	30
3.2.1.2 Antioxidantien	31
3.2.1.2.1 α -Tocopherol Succinat (530,78 g/mol)	31
3.2.1.2.2 Kaffeesäure (180,16 g/mol)	31
3.2.1.2.3 Curcumin (368,38 g/mol)	31
3.2.1.2.4 Resveratrol (228,24 g/mol)	31
3.2.2 Inkubation von P19 Zellen	32
3.2.3 Inkubation von K562 Zellen	33
3.2.4 Inkubation von T-Rex 293 Zellen	33
3.2.5 Ernten der Zellen	34
3.2.6 Lysieren der Zellen	35
3.2.7 Proteinbestimmung nach BIORAD	36
3.3 ECLIA (Elektrochemilumineszenz-Immunoassay)	37
3.3.1 Durchführung des ECLIA	38
3.4 LDH Messung	40
3.4.1 Verwendete Reagenzien	41
3.4.2 Durchführung der Messung	41
3.5 MTT Zytotoxizitäts-Test	42
3.5.1 Durchführung des MTT-Tests	42
3.6 Statistik	43

4.0 Ergebnisse & Diskussion	44
4.1 Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Frataxinexpression und Zellschädigung	44
4.1.1 Der Einfluss von α -MEM Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Frataxinexpression von P19 Zellen.....	44
4.1.2 Der Einfluss von RPMI Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	47
4.1.3 Einfluss der Inkubation mit Zellkulturmedien auf die Zellschädigung von P19 und K562 Zellen.....	49
4.1.3.1 Der Einfluss von α -MEM-Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Zellschädigung von P19 Zellen.....	49
4.1.3.2 Der Einfluss von RPMI-Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Zellschädigung von K562 Zellen.....	52
4.2 Der Einfluss von Antioxidantien auf die Frataxin-Expression und Zellschädigung in verschiedenen Zellmodellen	54
4.2.1 α -Tocopherol Succinat.....	55
4.2.1.1 Einfluss der Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	55
4.2.1.2 Zellschädigung nach Inkubation mit α -Tocopherol Succinat.....	56
4.2.2 Kaffeesäure.....	58
4.2.2.1 Einfluss der Inkubation mit Kaffeesäure auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	58
4.2.2.2 Zellschädigung nach Inkubation mit Kaffeesäure.....	60
4.2.3 Curcumin.....	61
4.2.3.1 Einfluss der Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	61
4.2.3.2 Einfluss der Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	63
4.2.3.3 Zellschädigung nach Inkubation mit Curcumin.....	64
4.2.4 Resveratrol.....	65

4.2.4.1 Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	66
4.2.4.2 Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	67
4.2.4.3 Zellschädigung nach Inkubation mit Resveratrol.....	68
4.2.5 Zusammenfassung.....	69
4.3 Einfluss von Antioxidantien auf T-Rex 293 Zellen.....	70
4.3.1 Einfluss von Antioxidantien auf die Zellschädigung nach Auslösung von oxidativem Stress.....	72
4.3.1.1 Einfluss der 24h Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	72
4.3.1.2 Einfluss der 48h Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	74
4.3.1.3 Einfluss der 24h Inkubation mit Kaffeesäure auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	75
4.3.1.4 Einfluss der 48h Inkubation mit Kaffeesäure auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	77
4.3.1.5 Einfluss der 24h Inkubation mit Curcumin auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	78
4.3.1.6 Einfluss der 48h Inkubation mit Curcumin auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	80
4.3.1.7 Einfluss der 24h Inkubation mit Resveratrol auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	82
4.3.1.8 Einfluss der 48h Inkubation mit Resveratrol auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen.....	83
4.3.1.9 Zusammenfassung.....	85
4.3.2 Einfluss von Antioxidantien auf die Zytotoxizität nach Induktion von oxidativem Stress.....	85
4.3.2.1 H ₂ O ₂ -Konzentrationsreihe.....	85
4.3.2.2 Einfluss von Curcumin auf die Zytotoxizität.....	87
4.3.2.3 Einfluss von Resveratrol auf die Zytotoxizität.....	89
4.3.2.4 Zusammenfassung.....	91

5.0 Schlussbetrachtung	93
6.0 Zusammenfassung	96
7.0 Literaturverzeichnis	98

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chromosom 9, auf dem das Frataxin Gen am längeren Teil (q) zwischen den Positionen 13 und 21.1 lokalisiert ist.....	6
Abbildung 2: Modell der non-B DNA Konformationen, die durch GAA-Repeat Sequenzen entstehen.....	7
Abbildung 3: Struktur von humanem Frataxin.....	9
Abbildung 4: Hypothetische Funktion von Frataxin.....	13
Abbildung 5: Frataxinfunktionen und oxidativer Stress in FRDA.....	16
Abbildung 6: Strukturformel von α -Tocopherol Succinat.....	18
Abbildung 7: Strukturformel von Kaffeesäure.....	19
Abbildung 8: Strukturformel von Curcumin.....	20
Abbildung 9: Strukturformel von Resveratrol.....	21
Abbildung 10: Sandwich-Immunoassay mit MSD MULTI-ARRAY Platte....	38
Abbildung 11: Einfluss der Inkubation mit α -MEM Nullmedium auf die Frataxinexpression von neuronalen P19 Zellen.....	44
Abbildung 12: Einfluss von α -MEM-Medium mit 1%igem BSA Zusatz auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	45
Abbildung 13: Einfluss von α -MEM- Kompletmedium mit 5 % Serum auf die Frataxinexpression von P19 Zellen - neuronaler Typ.....	45
Abbildung 14: Einfluss von α -MEM Kompletmedium mit 10% Serum auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	46
Abbildung 15: Einfluss von RPMI- Nullmedium auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	47
Abbildung 16: Einfluss von RPMI-Medium mit 1%igem BSA Zusatz auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	47
Abbildung 17: Einfluss von RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktivierten Serum auf die Frataxinexpression von K562 Zellen.....	48
Abbildung 18: Einfluss von RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktivierten Serum auf die Frataxinexpression in K562 Zellen.....	48

Abbildung 19: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α-MEM-Nullmedium..	49
Abbildung 20: Messung derLDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α-MEM-BSA -Medium.....	50
Abbildung 21: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler typ- nach Inkubation mit 5%igem α-MEM-Medium	50
Abbildung 22: Messung derLDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit 10%igem α-MEM-Medium	51
Abbildung 23: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Nullmedium.....	52
Abbildung 24: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 1%igem BSA-Zusatz.....	52
Abbildung 25: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum.....	53
Abbildung 26: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktiviertem Serum.....	53
Abbildung 27: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit α-Tocopherol Succinat auf die Frataxinexpression von P19 Zellen - neuronaler Typ.....	56
Abbildung 28: Messung der LDH-Konzentration im Medium der P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α-Tocopherol – Succinat.....	57
Abbildung 29: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Kaffeesäure auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ.....	59
Abbildung 30: Messung der LDH - Menge im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Kaffeesäure.....	60

Abbildung 31: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ	62
Abbildung 32: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von K562 Zellen	63
Abbildung 33: Messung der LDH Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Curcumin	64
Abbildung 34: Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinkonzentration von P19 Zellen – neuronaler Typ	66
Abbildung 35: Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von K562 Zellen	67
Abbildung 36: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Resveratrol	69
Abbildung 37: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit α-Tocopherol Succinat auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	73
Abbildung 38: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit α-Tocopherol Succinat auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	74
Abbildung 39: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Kaffeesäure auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	76
Abbildung 40: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Kaffeesäure auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	77
Abbildung 41: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	79
Abbildung 42: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	80

Abbildung 43: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	82
Abbildung 44: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)	84
Abbildung 45: Einfluss einer H₂O₂-Konzentrationsreihe auf die Zytotoxizität von T-Rex 293 Zellen	86
Abbildung 46: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 8 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	87
Abbildung 47: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 14Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	87
Abbildung 48: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 20 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	88
Abbildung 49: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 8 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	89
Abbildung 50: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 14 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	90
Abbildung 51: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 20 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen	90

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationsliste der verwendeten Antioxidantien	32
Tabelle 2: Pipettierschema für die Eichgerade	36
Tabelle 3: Pipettierschema für Standardreihe	39
Tabelle 4: Verwendete T-Rex 293 Zelltypen	71

IV Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	alpha Minimum Essential Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRDA	Friedreich's Ataxie
Fx	Frataxin
GSH	Glutathion
ISC	Eisen-Schwefel-Cluster
kDa	Kilo Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
MSD-ECLIA	Meso Scale Discovery-Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NF κ B	nuklearer Faktor kappa B
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Retinolsäure
Redox	Reduktions-Oxidations- Reaktion
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid Dismutase
Std	Standard
Tc	Tetracyclin
TetR	Tetracyclin Rezeptor
VF	Verdünnungsfaktor

YFH1

Frataxingen der Hefe

1.0 Einleitung & Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Zellkulturbedingungen und Antioxidantien auf die Expression des Proteins Frataxin in verschiedenen Zelltypen untersucht.

Friedreich's Ataxie (FRDA) ist die häufigste vererbare Ataxie mit einer Prävalenz von 1-2 in 40.000. Bei FRDA handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, die durch progressive neurologische Veränderungen charakterisiert ist. Die ersten Symptome treten üblicherweise während der Kindheit auf, aber das Alter, indem sich FRDA manifestiert, kann zwischen Säuglings- und Erwachsenenalter sein. Die Ataxie wird durch Atrophie der sensorischen und zerebralen Nervenbahnen ausgelöst und äußert sich in Schwierigkeiten in der Feinmotorik, Verlust von Empfindungswahrnehmung und Verlust von Sehnenreflexen. Kortikospinale Degeneration führt zu Muskelschwäche und Schwäche des plantaren Streckmuskels. Hypertrophe Kardiomyopathie kann zu den neurologischen Veränderungen beisteuern und verursacht meist den frühzeitigen Tod der Patienten.

Weitere häufige Erscheinungen bei FRDA sind Skoliose, Pes cavus (Hohlfuß) und bei etwa 10% der Patienten Diabetes mellitus [LODI et al., 2006], [PANDOLFO, 2008].

FRDA wird durch eine Expansion eines GAA Repeats am ersten Intron des Frataxins verursacht. Das Frataxin codiert für das mitochondriale Protein Frataxin, welches Homologe in allen Eukaryonten und gram-negativen Bakterien hat. Die Genmutation führt zu einer verringerten Expression von Frataxin.

Studien in vitro und mit Bakterienplasmiden haben gezeigt, dass die Länge des GAA Repeats eine seltene Tripelhelixstruktur annehmen kann, die einen Strangaustausch zwischen zwei Repeat Regionen nach sich zieht. Diese Struktur wird auch als 'sticky DNA' bezeichnet und führt zu einer Verminderung der Frataxinexpression [PANDOLFO, 2008].

Die genaue Funktion des mitochondrialen Proteins Frataxin ist derzeit noch unbekannt, aber es wird vermutet, dass es für die Regulation der zellulären Eisenhomöostase benötigt wird. Als weitere mögliche Funktionen werden folgende diskutiert: Die Funktion als Eisenkomplexbildner während der Hämsynthese und Eisen-Schwefel-Cluster (ISC) Bildung, die Funktion als Eisen speicherndes Protein bei Eisenüberschuss, eine Funktion bei der Reparatur von oxidativ geschädigter Aconitase, antioxidative Funktion durch Radikalfängeraktivität und Aktivität bei der oxidativen Phosphorylierung und im Energiestoffwechsels [BENCZE et al., 2006].

Oxidativer Stress spielt eine große Rolle im Krankheitsmechanismus von FRDA. Zusätzlich zum Risiko allgemeiner oxidativer Schädigung bei FRDA, gibt es auch Anhaltspunkte, dass Frataxinmangel die Zellen anfälliger für oxidativen Stress macht. Im Hefemodell führt Frataxinmangel zu erhöhter Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid [COOPER and SHAPIRA, 2003].

Derzeit gibt es keine Therapie, die den Verlauf von Friedreich's Ataxie verhindern oder heilen kann..

Ziel mehrerer Studien ist es, verschiedene therapeutisch wirksame Substanzen zu untersuchen.

Es wurde mehrfach bewiesen, dass die Pathologie der FRDA mit der Aktivität von freien Radikalen zusammenhängt. Antioxidantien machen freie Radikale unschädlich und haben daher einen möglichen Nutzen bei FRDA [VONCKEN et al., 2004].

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand von verschiedenen Zelltypen den Einfluss von Zellkulturbedingungen und Antioxidantien auf die Frataxinexpression und Zellproliferation zu untersuchen. Hierfür wurden mehrere Zelllinien (P19, K562 und T-Rex 293) mit verschiedenen Kultivierungsmedien und verschiedenen Antioxidantien inkubiert.

Eine mögliche Steigerung der Frataxinexpression bei P19 und K562 Zellen nach Inkubation mit Kultivierungsmedien und Antioxidantien wurde durch MSD-ECLIA, eine mögliche Zellschädigung wurde durch LDH Messung bestimmt. Mittels MTT-Assay wurden Veränderungen bei der Zellproliferation von T-Rex 293 Zellen untersucht.

2.0 Literaturüberblick

2.1 Friedreich's Ataxie (FRDA)

Friedreich's Ataxie (FRDA) ist die häufigste Form einer vererbaren Ataxie mit einer Prävalenz von 1-2 in 40.000. Bei FRDA handelt es sich um eine autosomal rezessive, neurodegenerative Krankheit, die sich meist in der Pubertät oder um das Alter von 20 manifestiert und klinisch charakterisiert ist durch progressive Glieder- und Gangataxie, zerebrale Dysarthrie, Verlust von Gliederreflexen, Positions- und Vibrationssinneswahrnehmung, Spastizität und Funktionsstörungen des plantaren Streckmuskels.

Die Krankheit verläuft bei etwa 20% der Patienten atypisch, d.h. sie manifestiert sich bei diesen erst nach dem Alter von 20 [LODI et al., 2006], [ALPER et al., 2003].

FRDA ist eine spinale Form der Heredoataxie, die auf eine Genmutation am Chromosom 9 zurückzuführen ist. Eine Folge dieser Mutation ist der Mangel am mitochondrialen Protein Frataxin [ALPER et al., 2003].

2.1.1 Pathophysiologie

Neuropathologisch führt FRDA zu einer frühen Degeneration einer Vielzahl von sensorischen Nerven der dorsalen Ganglien, zur Degeneration der hinteren Säulen des Rückenmarks, der spinal-zerebralen Bahnen, der kortikal-spinalen motorischen Bahnen und Atrophie der großen sensorischen Fasern der peripheren Nerven.

Bei den meisten FRDA Patienten kommt es zu einer hypertrophischen Kardiomyopathie, die auch die häufigste Todesursache darstellt.

Histologische Auffälligkeiten am linken Ventrikel bestehen aus myozytärer Hypertrophie, diffuser Fibrose und fokaler myokardischer Nekrose [LODI et al., 2006].

Scoliose und pes cavus (Hohlfuß) kommen bei etwa zwei Drittel der Patienten vor, Diabetes mellitus oder Glucoseintoleranz bei etwa einem Drittel. Gehörverlust und optische Atrophie werden bei ca. 10% der Patienten diagnostiziert [LODI et al., 2006].

Die Krankheit führt zu einer progressiven, physischen Behinderung in jungen Jahren und die meisten Patienten sind mit etwa 20 Jahren an einen Rollstuhl gebunden.

Derzeit gibt es keine Behandlung, die den Verlauf von FRDA verzögern kann und die Lebenserwartung der Patienten liegt bei etwa 15 bis 20 Jahren nach Ausbruch der Krankheit [ALBANO et al., 2002].

Die Symptome der FRDA wurden 1863 erstmals vom deutschen Arzt Nicolaus Friedreich berichtet. Er beschrieb das typisch auftretende Erscheinungsbild der Krankheit: progressive Glieder- und Gangataxie, außerdem sensorische Beeinträchtigung, Muskelschwäche, Deformation des Fußes und Herzerkrankungen [ALPER et al., 2003].

Viele Patienten mit zerebraler Ataxie wurden als FRDA Patienten diagnostiziert, bis die rezessive Vererbbarkeit als wichtigstes Diagnosekriterium eingeführt und spezifische Symptome als essentiell bei der Diagnose von FRDA definiert wurden [DÜRR 2002].

2.1.2 Molekulare Genetik

Verursacht wird FRDA durch die Expansion eines GAA-Triplet-Repeats, die durch Mutation am ersten Intron des Frataxins am Chromosom 9q13 ausgelöst wird. Die Größe des Repeats liegt üblicherweise zwischen 60 und 1200 Triplets, es wurden aber auch schon von Allelen mit zwischen 44 und 1700 Triplets berichtet. Normale Chromosomen haben Allele am Frataxin, die 8 bis 22 Triplets tragen [LODI et al., 2006].

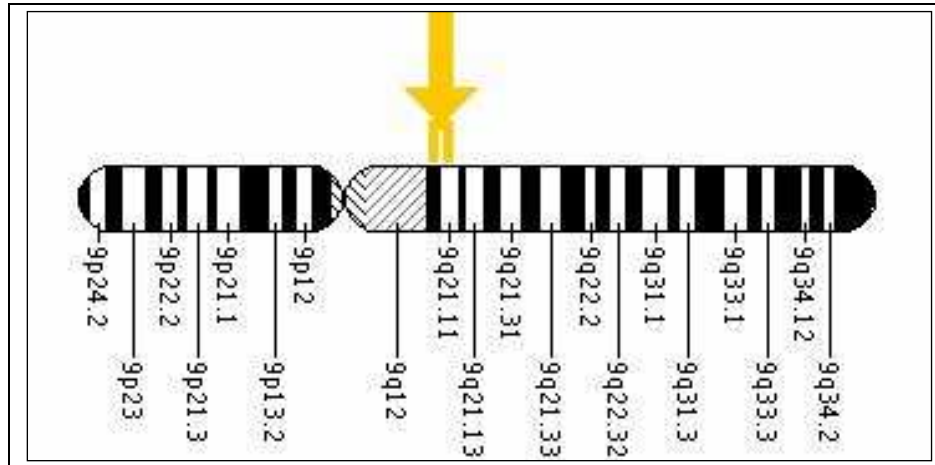


Abbildung 1: Chromosom 9, auf dem das Frataxin Gen am längeren Teil (q) zwischen den Positionen 13 und 21.1 lokalisiert ist [<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=fxn> Stand: 13.März 2009]

Etwa 95% der Patienten haben eine homozygote Repeat Expansion, während die restlichen 5% eine heterozygote Expansion und eine Punktmutation, welche die Codierungssequenz für das Frataxin-Gen betrifft, aufweisen [CAMPUZANO et al., 1997].

Mehrere Studien zeigen, dass die Repeat-Expansion bei FRDA mit einer seltenen DNA-Struktur assoziiert werden kann. Es wird angenommen, dass die Struktur der non-B DNA wahrscheinlich eine intramolekulare Triplex bildet. Diese Triplex Struktur ist vermutlich anfällig für eine verstärkte Mutagenese. Es gibt Anhaltspunkte, dass es vor allem zu Punktmutationen in der Sequenz kommt, die gleich neben den vermehrten GAA-Repeats liegt [PATEL and ISAYA, 2001].

Die Entfaltung des GAA-Abschnitts löst ein transkriptionales Silencing durch die Ausbildung bestimmter DNA Strukturen (Triplex oder ‚sticky DNA‘), bleibender DNA-mRNA Hybride oder Heterochromatin aus. Das DNA-Triplex befindet sich in der längeren Repeat Sequenz und kann schwere mutagene, genetisch instabile und Rekombinationsreaktionen auslösen[WELLS, 2008].

Das DNA-Triplex bildet sich statt der normalen Doppelhelix aus und vermindert so die Transkriptionsfähigkeit des Frataxins, was in weiterer Folge zu einem Frataxinmangel führt [WELLS, 2008].

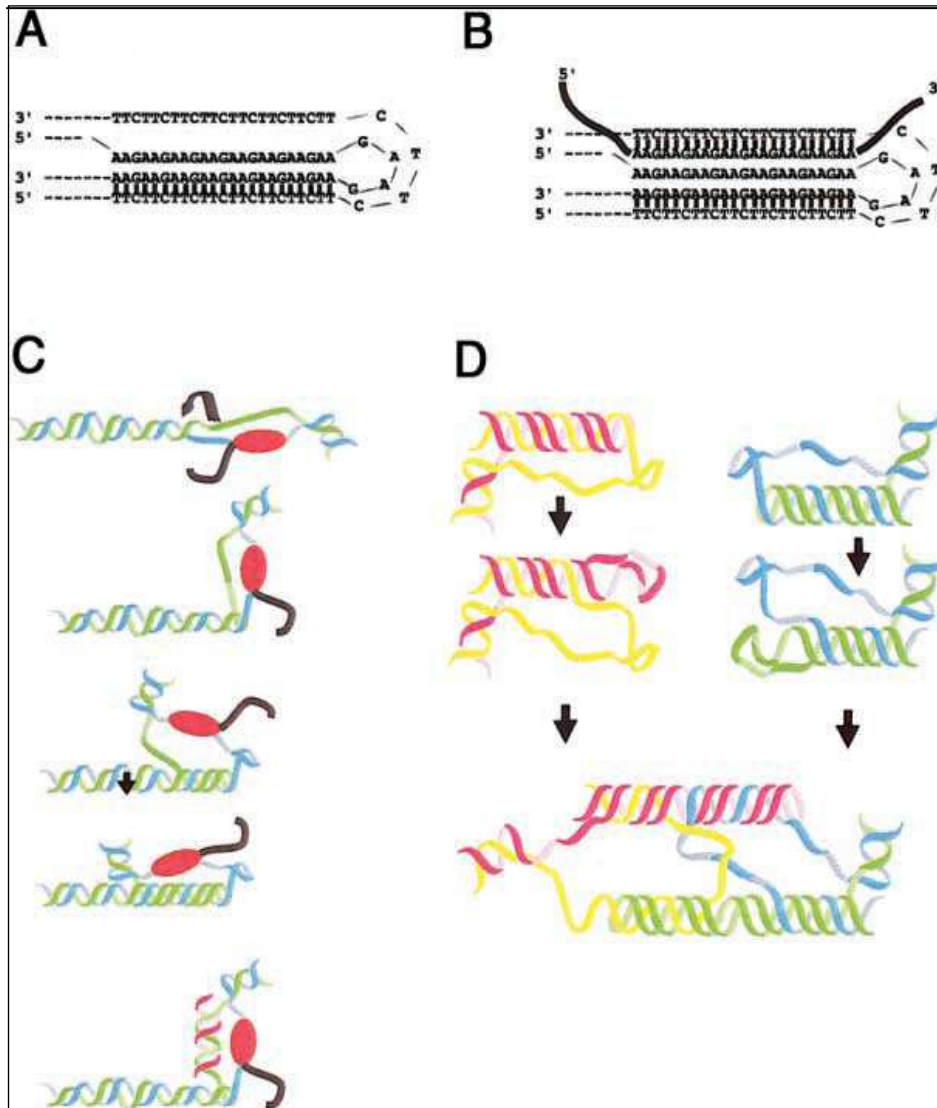


Abbildung 2: Modell der non-B DNA Konformationen, die durch GAA-Repeat

Sequenzen entstehen: A: Intramolekulare RRY Triplex, die entsteht, wenn der purinreiche Strang vom Komplementärstrang abdissoziiert. B: Triplex (gezeigt in A), gepaart mit dem Transkript, das GAA enthält und dadurch die Triplex stabilisiert.

C: Variationen des intramolekularen Triplexmodells. D: Verbindung zweier Triplexen, um die ‚sticky DNA‘ auszubilden [PATEL and ISAYA, 2001]

2.1.3 Phänotyp

Die phänotypische Variabilität unter den Patienten wird von der Größe des GAA-Repeats stark beeinflusst. Besonders das Alter, in dem sich FRDA manifestiert, hat eine Korrelation mit der GAA-Repeat Anzahl.

Die Häufigkeit und der Schweregrad der hypertrophen Kardiomyopathie nehmen mit der Anzahl der Repeats zu [LODI et al., 2006].

FRDA manifestiert sich wie erwähnt meist während der Pubertät oder im frühen Erwachsenenalter, obwohl auch von Fällen berichtet wird, die erst im späteren Alter auftreten.

Die häufigsten Symptome zu Beginn der Krankheit sind Instabilität des Ganges bzw. generelle Schwerfälligkeit. Nach Fortschreiten der Krankheit sind die Patienten nicht nur von der Ataxie, sondern auch von Hypotonie betroffen. Ataxie, in Kombination mit Hypotonie führt zu Schwierigkeiten in der Feinmotorik, sowie generell zu Schwierigkeiten beim selbstständigen Gehen und Stehen. Sensorische Neuropathie führt zu verminderter Gefühlswahrnehmung im Bereich der Knöchel [DÜRR, 2002].

Patienten mit einer heterozygoten Punktmutation zeigen meist den typischen klinischen Phänotyp. Da es aber sehr wenig Patienten mit dieser Krankheitsursache gibt, kann keine korrelierende Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp bewiesen werden [DÜRR 2002].

2.2 Fratxin (Fx)

Frataxin ist ein ~ 17 kDa großes, mitochondriales Protein. Das Frataxigen codiert ein aus 210 Aminosäuren bestehendes Protein, welches das Vorläuferprotein von Frataxin ist.

Das Fratxinvorläuferprotein beinhaltet eine N-terminale Transportsequenz, die seinen Transport in die Mitochondrien leitet. In den Mitochondrien wird die Transportsequenz proteolytisch entfernt, damit das reife Protein hergestellt werden kann. Der mitochondriale Import und die Reifung des eigentlichen Frataxins wurden in mehreren Versuchen mit Hefe-, Mäuse- und Humanfrataxinmodellen belegt [CONDO et al., 2007].

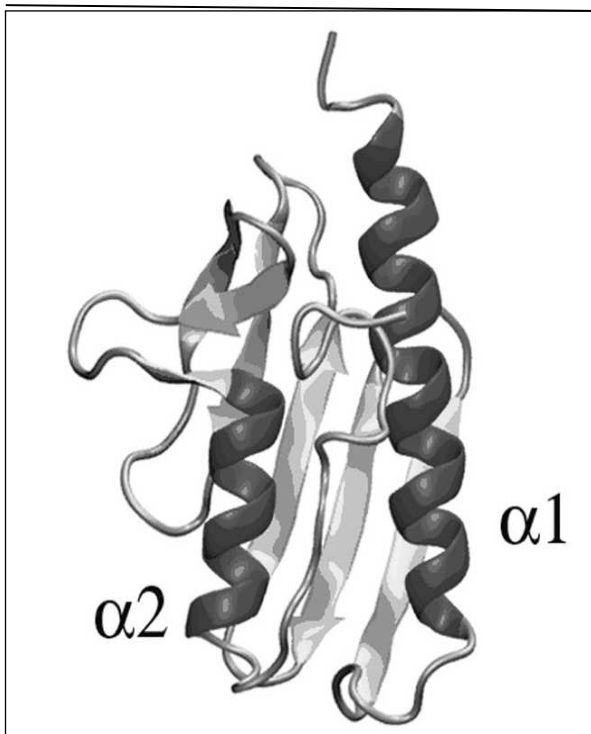


Abbildung 3: Struktur von humanem Frataxin [BENCZE et al., 2006]

Beim Menschen wird Frataxin ubiquitär exprimiert, jedoch am häufigsten vor allem in den motorischen Nervenzellen, im Kleinhirn, im Pankreas, in Muskel-, Leber- und Thymuszellen sowie in Herzmuskelzellen und im braunen Fettgewebe [CONDO et al., 2007].

Frataxin ist an mehreren Mechanismen des intrazellulären Eisenstoffwechsels beteiligt, wie an der Hämsynthese, der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern (Iron-Sulfur-Cluster- ISC) und an der Bindung und Speicherung von Eisen.

Frataxinmangel führt daher zu einer Vielzahl von Stoffwechselstörungen, die durch Eisenakkumulation in den Mitochondrien, verminderter oxidativer Phosphorylierung und veränderten antioxidativen Abwehrmechanismen verursacht werden.

Darüber hinaus spielt Frataxin bei der Kontrolle des Zellfortbestands eine Rolle, da es mehrfach bewiesen wurde, dass Zellen mit Frataxinmangel empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren. Es gibt Anzeichen, dass Frataxinmangel im Tiermodell zu Apoptose und autophagischem Zelltod führen kann [CONDO et al., 2007].

Frataxin ist ein essentielles Protein in höheren Organismen. Hefezellen können zwar ohne Frataxin überleben, aber sie verlieren stufenweise mitochondriale Funktionen und mitochondriale DNA. Ein genetischer Frataxin-Knockout ist bei embryonalen Mäusen letal. Spezifische Knockouts wurden in der Leber, im Muskel oder im Pankreas der Mäuse induziert. In allen Modellen führte dieses gänzliche Fehlen von Frataxin zum Tod der entsprechenden Zellen. Der Grund, warum Frataxin für das Überleben, besonders während der embryonalen Entwicklung, so essentiell ist, bleibt noch unbekannt. [PANDOLFO, 2008]

2.2.1 Funktionen von Frataxin

In Hefe-, Mäuse und Humanzellkulturen sowie in Patientengewebe und im Mausmodell wurde gezeigt, dass Frataxinmangel viele biochemische Wirkungen hat. Aber die grundlegende, primäre physiologische Funktion von Frataxin, und wie sich ein Mangel dieser Funktionen pathophysiologisch auswirkt, ist noch immer unklar [LU und CORTOPASSI, 2007].

Biochemischen Anhaltspunkten zu Folge hat das mitochondriale Protein Frataxin die Eigenschaft, den Eisenstoffwechsel auf mehreren Wegen zu beeinflussen, sowie die Zellen vor oxidativem Stress bzw. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen.

Frataxin kann als Eisen (II)- Donor für Ferrochelatase im Hämstoffwechsel oder als Bauteil beim Eisen-Sulfur-Cluster (ISC) dienen und es kann die inaktive [3Fe-4S] Aconitase in die aktive Form überführen. Außerdem ist Frataxin ein Teil von Homopolymeren, die Eisen (II) in ein stabiles Protein-gebundenes Mineral umbauen und es verringert die durch Eisen katalysierte Produktion von ROS.

Diese Mechanismen weisen darauf hin, dass Frataxin den Eisenmetabolismus begünstigt und gleichzeitig die Toxizität von Eisen herabsetzt.

In vivo Studien haben gezeigt, dass Frataxin die ISC-Biogenese und Hämsynthese unterstützt, was darauf hindeutet, dass Frataxin eine Funktion als Eisen (II) Komplexbildner hat [GAKH et al., 2006].

Die Konsequenzen eines Frataxinmangels wurden zwar schon teilweise detailliert beschrieben und Studien an mehreren Organismen haben bestätigt, dass das Frataxinprotein in den Mitochondrien lokalisiert ist, wahrscheinlich in der Matrix oder nahe der inneren Membran. Trotzdem ist die genaue Funktion von Frataxin noch zu diskutieren.

Die Theorie, dass Frataxin eine Rolle im mitochondrialen Eisentransport spielt, stammt von der Beobachtung, dass sich Eisen in YFH1 (=Frataxingen der Hefe) Hefemutanten in der mitochondrialen Matrix ansammelt, wahrscheinlich auf Kosten von zytosolischem Eisen. Diese Hypothese deutet darauf hin, dass Frataxin den Eisentransport aus den Mitochondrien heraus beeinflusst und stimuliert. Die Folge dieser möglichen Frataxinfunktion ist, dass es bei einem Frataxinmangel zu einer intramitochondrialen Eisenakkumulation kommt [RÖTIG et al., 2002].

Monomere des YFH1 Proteins oder humanes Frataxin sind zwar nicht in der Lage, Eisen zu binden, aber Experimente mit Gelfiltration und Ultrazentrifugation weisen darauf hin, dass sich ein Komplex mit hohem Molekulargewicht formt, wenn Fe (II) zu diesen Proteinen hinzugefügt wird. Western Blot Analysen von Hefeextrakten deuten darauf hin, dass die Komplexe mit großem Molekulargewicht, die das YFH1P

enthalten, in vivo existieren. In ähnlicher Weise gibt es einen Frataxinpool mit hohem molekularem Gewicht in Mäuseherzen [PANDOLFO, 2002].

Laut einer anderen Hypothese spielt Frataxin eine Rolle bei der mitochondrialen Eisenspeicherung. Diese Vermutung resultiert aus der Beobachtung, dass sich nach dem Zusatz von Eisen (II) zu YFH1 Hefezellen ein YFH1 Multimer Aggregat bildet, das bis zu 3000 Eisenatome speichern kann. Frataxin könnte also eine Rolle in der Bioverfügbarkeit von mitochondrialem Eisen haben [RÖTIG et al., 2002].

Darüber hinaus wurde schon gezeigt, dass das humane Frataxin, in *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimiert und in ein Polymer umgebaut wird, das Eisen binden kann. Frataxin könnte also auch als Eisenspeicher Protein wirken [RÖTIG et al., 2002].

Eine weitere Vermutung besagt, dass Frataxin direkt am ISC - Aufbau beteiligt ist, da ein spezifischer ISC Mangel im Herz von FRDA Patienten und Mausmodellen beobachtet wird. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Vorhandensein von Frataxin für den ISC Aufbau in Hefeferredoxin notwendig ist, was darauf hindeutet, dass Frataxin direkt an der ISC Biogenese beteiligt ist [RÖTIG et al., 2002].

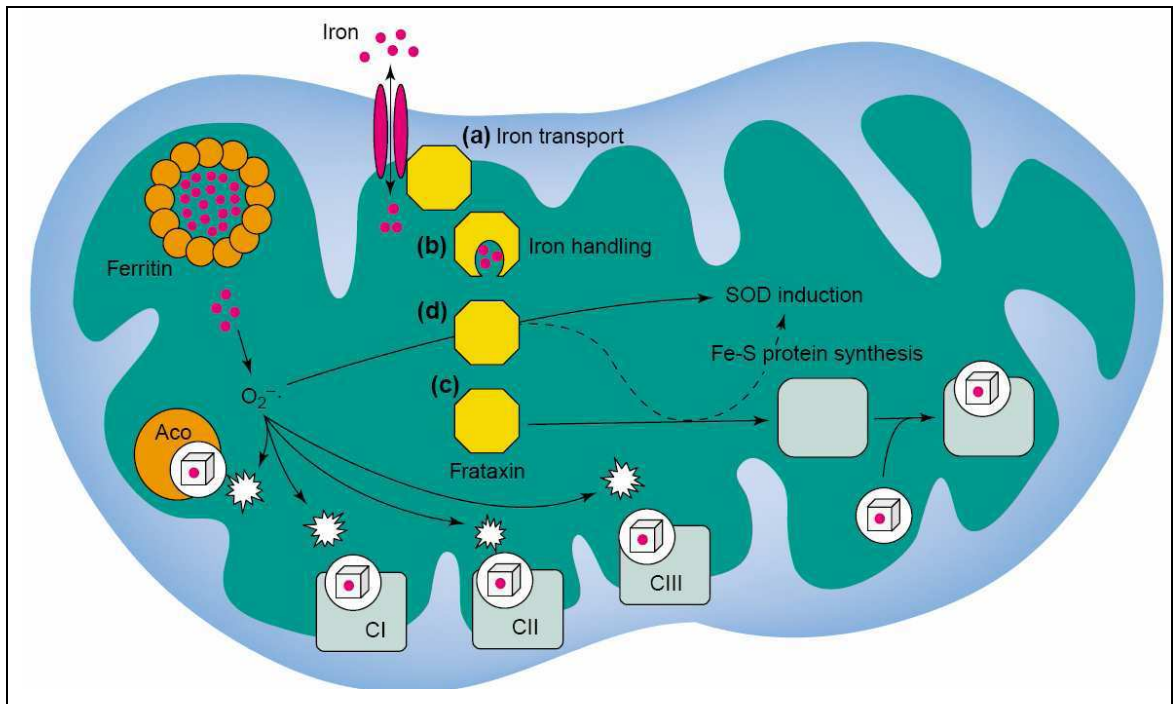


Abbildung 4: Hypothetische Funktion von Frataxin: (a) Frataxin könnte ein Protein sein, das in den mitochondrialen Eisentransport involviert ist. (b) Frataxin könnte eine Rolle im mitochondrialen Eisenstoffwechsel spielen. (c) Möglicherweise ist Frataxin ein Bauteil der Eisen-Sulfur-Cluster. (d) Frataxin könnte am Schutz vor freien Radikalen beteiligt sein. Abkürzungen: Aco: Aconitase, SOD: Superoxiddismutase, C I, C II, C III: Komplexe I, II und III der Atmungskette [RÖTIG et al., 2002]

2.2.2 Frataxin und oxidativer Stress

Mittlerweile gibt es mehrere Anhaltspunkte, die besagen, dass Frataxin Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entgiften kann, möglicherweise durch Förderung des zellulären Abwehrmechanismus gegen ROS [SHOICHET et al., 2002].

Außerdem gibt es Vermutungen, dass Frataxin durch Aktivierung der Glutathionperoxidase und Erhöhung der Thiolspiegel ROS entgegenwirkt [CALABRESE et al., 2005].

Es wurde bei FRDA Patienten festgestellt, dass 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosinspiegel erhöht waren, was darauf hindeutet, dass ihre DNA einer erhöhten oxidativen

Schädigung ausgesetzt war. Außerdem waren Malondialdehydspiegel im Plasma erhöht, was ein Zeichen für erhöhte Lipidperoxidation ist. Diese Daten wurden durch eine Studie von Bradley et al. bestätigt, die zeigte, dass die oxidative Schädigung immer ausgeprägter wird, je weiter die Krankheit fortschreitet [BRADLEY et al., 2000].

Oxidativer Stress spielt eine große Rolle im Krankheitsmechanismus von FRDA. Zusätzlich zum Risiko allgemeiner oxidativer Schädigung bei FRDA gibt es auch Anhaltspunkte, dass Frataxinmangel die Zellen anfälliger für oxidativen Stress macht. Im Hefemodell führt Frataxinmangel zu erhöhter Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid. Fibroblasten von FRDA Patienten zeigen eine erhöhte Anfälligkeit bei Induktion von oxidativem Stress. Der Grund dafür ist noch unbekannt, aber es besteht die Möglichkeit, dass die erhöhten mitochondrialen Eisenspiegel in manchen Zellen von FRDA Patienten zwar den Abbau des Wasserstoffperoxids fördern, aber dadurch die schädlichen Hydroxylradikale freisetzen.

Andere Mechanismen könnten eine verspätete Induktion der Mangan-Superoxiddismutase sein. Der Mechanismus dieser verspäteten Reaktion im Zusammenhang mit der Frataxinfunktion ist noch unbekannt, aber eine mögliche Erklärung wäre, dass verringerte Eisen-Schwefel-Cluster die Zellen anfälliger für Schädigung durch freie Radikale machen [COOPER and SHAPIRA, 2003].

Die meisten Studien über Frataxin wurden mit Hefezellen durchgeführt, in denen das homologe Frataxin (YFH1) entfernt wurde. Die YFH1 Hefestämme zeigten progressiven Funktionsverlust der Atmungskette und der mitochondrialen DNA. Die Folge war, dass sich im Vergleich zu den Wildtypen mehr als die zehnfache Menge an Eisen in den Mitochondrien ansammelte.

Die Zellen reagierten auch auf Wasserstoffperoxid hypersensitiv, was auf das Vorkommen der Fenton Chemie hindeutet. Aufgrund des Funktionsverlustes der Atmungskette wurde Eisen zum Kultivierungsmedium zugesetzt. Der Funktionsverlust findet umso schneller statt, je höher die zugegebene Eisenkonzentration wird. Das deutet darauf hin, dass eine permanente Schädigung der Mitochondrien die Folge der Eisentoxizität ist. Die Beeinträchtigung des Eisenefflux aus den Mitochondrien heraus

wurde mehrfach beobachtet, aber kann nicht einer direkten Pumpaktivität zugehörig gemacht werden, da keine Transmembrandomäne vorhanden ist.

Diesen Daten zufolge könnten YFH1P und Frataxin das Eisen in den Mitochondrien vor dem Kontakt mit freien Radikalen schützen. Diese Proteine könnten also eine Art mitochondrialer Eisenkomplexbildner sein, die bei Fehlen von diesen zu einem Rückgang in verschiedenen Biosynthesen und Transportprozessen und zur toxischen, redox-aktiven Eisenakkumulation führt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Expressionen von YFH1P und humanem Frataxin nicht über die Eisenspiegel reguliert werden und ihre mRNA keine Eisen-responsiven Elemente beinhaltet [PANDOLFO, 2002].

Ein veränderter Eisenstoffwechsel, durch ROS verursachte oxidative Schäden und mitochondriale Funktionsstörungen treten wie schon erwähnt bei FRDA auf. Bei FRDA Patienten tritt die Eisenakkumulation vor allem in Myokardzellen auf. Es gibt einen kleinen, aber signifikanten Anstieg des mitochondrialen Eisens in FRDA Fibroblasten. Ein hoher, zirkulierender Pegel des Transferrin-Rezeptors bei FRDA Patienten deutet darauf hin, dass es zu einem zytosolischem Eisenmangel kommt. Dies konnte auch beim Hefemodell beobachtet werden.

Dieselben Fe-S-Enzymdefekte (Ausfall der Atmungskettenkomplexe I, II und III, und Aconitase) wurden beim YFH1 Hefemodell und in den entsprechenden Geweben von FRDA Patienten gefunden.

Die darauf folgenden Funktionsstörungen der Atmungskette könnten zu einer erhöhten Bildung von ROS Superoxiden führen, welche die Inaktivierung von Fe-S-Proteinen und nochmalige Steigerung der Eisenakkumulation zur Folge haben [PANDOLFO, 2002].

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Frataxin am Schutz gegen oxidative Schädigung, die durch verminderte Funktion der Atmungskette entsteht, beteiligt ist. Dies könnte einerseits durch einen mitochondrialen, antioxidativen Schutzmechanismus geschehen, durch Kontrolle über die Synthese wichtiger SOD- Signalkomponenten, oder über Messung des freien Eisens in der Mitochondrienmatrix [RÖTIG et al., 2002].

Allerdings wurde auch gezeigt, dass kultivierte Hautfibroblasten von FRDA Patienten und Kardiomyozyten von Frataxin Knockout Mäusen (KO) nicht in der Lage sind,

antioxidative Abwehrmechanismen zu induzieren. Vor allem können sie die wichtige SOD Aktivierung nicht einleiten, die als Antwort auf die Überproduktion von Superoxidradikalen aufgrund der Hemmung der Atmungskette stattfinden sollte.

Diese Feststellung wurde durch die spätere Beobachtung, dass oxidative Schädigung durch Eisensupplementation auch zu keiner SOD Aktivierung in Zellen von FRDA Patienten führt, bestätigt [RÖTIG et al., 2002].

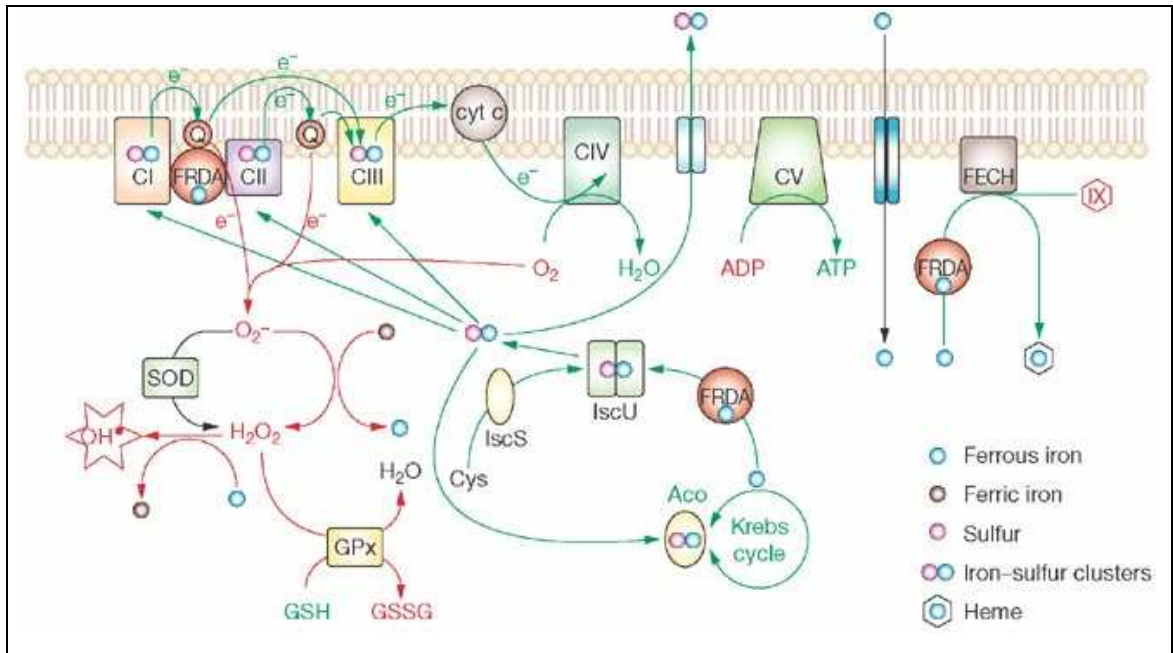


Abbildung 5: Frataxinfunktionen und oxidativer Stress in FRDA:

Hier sind mehrere Funktionen von Frataxin zu sehen, einschließlich der Bereitstellung von Eisen für die ISC und Hämsynthese, sowie die direkte Wechselwirkung mit Komplexen der Atmungskette. Pfeile und Text in Grün zeigen Moleküle und Signalwege, die eine verringerte Aktivität während eines Frataxinmangels haben; Pfeile und Text in Rot zeigen Moleküle und Signalwege an, die während eines Frataxinmangels eine erhöhte Aktivität haben.

Abkürzungen: Aco: Aconitase; CI: Komplex I, CII: Komplex II, CIII Komplex III, CIV: Komplex IV, CV: Komplex V der Atmungskette; Cys: Cystein; cyt c: Cytochrom C; e^- : Elektron; FECH: Ferrochelatase; FRDA: Frataxin; GPx: Glutathionperoxidase; GSH: reduziertes Glutathion; GSSG: oxidiertes Glutathion; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; IscS: Cysteindesulfurase; IscU: Eisen-Schwefel-Cluster Gerüstprotein; IX: Protoporphyrin

IX; OH^\bullet : Hydroxylradikal; Q: Coenzym Q; SOD: Superoxid Dismutase [PANDOLFO, 2008]

2.3 Mögliche Therapieformen für Friedreich's Ataxie

Derzeit gibt es keine Therapie, die den Verlauf von Friedreich's Ataxie verhindern oder heilen kann.

Momentan laufen mehrerer Studien, die verschiedene therapeutisch wirksame Substanzen untersuchen.

Es wurde mehrfach bewiesen, dass die Pathologie der FRDA mit der Aktivität von freien Radikalen zusammenhängt. Antioxidantien machen freie Radikale unschädlich und haben daher einen möglichen Nutzen bei FRDA [VONCKEN et al., 2004].

2.3.1 Antioxidantien

Da die Verringerung der mitochondrialen Atmungskette sowie die Produktion von ROS wichtige Merkmale der FRDA sind, werden vor allem Antioxidantien auf ihre Wirksamkeit bei FRDA Patienten untersucht. Myers et al. haben verschiedene Daten einer großen multizentrischen Studie über FRDA überprüft, um die Prävalenz und Wirksamkeit von Antioxidantiengebrauch auf die Krankheit zu ermitteln, da viele Patienten von sich aus Antioxidantien nehmen, um ihren Krankheitsverlauf zu verlangsamen [MYERS et al., 2008].

Aufgrund der Fenton Reaktion produziert Wasserstoffperoxid in Gegenwart von reduzierenden Metallen wie Eisen extrem schädigende Hydroxylradikale. Um die Verfügbarkeit von H_2O_2 für diese Reaktion zu verringern, sind in den Zellen detoxifizierende Enzyme wie Glutathionperoxidase oder Katalase vorhanden. Zusätzlich können verschiedene Antioxidantien direkt mit ROS reagieren. Ein Ungleichgewicht zwischen der Radikalproduktion und den antioxidativen Abwehrmechanismen führt zu oxidativem Stress. Außerdem kann oxidativer Stress als

Folge der Überproduktion von Oxidantien auftreten. Dies kann endogen durch Funktionsstörung der Mitochondrien oder exogen durch Exposition von zytotoxischen Substanzen oder durch Funktionsstörung der endogenen antioxidativen Abwehrmechanismen entstehen [SEZNEC et al., 2005].

2.3.1.1 α -Tocopherol Succinat

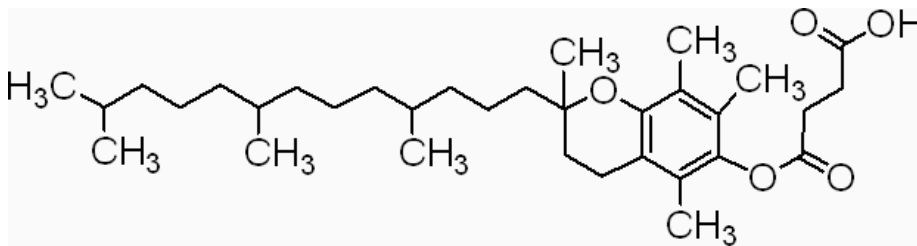


Abbildung 6: Strukturformel von α -Tocopherol Succinat

[<http://www.sigmaaldrich.com> Stand: 16.03.2009]

α -Tocopherol gehört zu einer der acht Verbindungen von Vitamin E (Tocopherol) und unterscheidet sich von den anderen nur durch die Methylgruppensubstitution und den Sättigungsgrad. α -Tocopherol macht 90% des im Körper vorkommenden Vitamin E aus und wurde am meisten auf seine antioxidativen Eigenschaften untersucht [LODGE, 2005].

Außerdem ist α -Tocopherol Succinat die biologisch aktivste Form von Vitamin E [PRASAD et al., 2003].

α -Tocopherol ist ein natürliches Antioxidans, das als Radikalfänger wirkt und so den Schutz von wichtigen biologischen Strukturen vor oxidativer Schädigung herbeiführt. Tocopherol kann durch Interaktion mit andern Antioxidantien wie Ascorbinsäure wieder regeneriert werden. [SHIBATA and TOMITA, 2004], [SUCHANKOVA et al., 2006].

Da der Phänotyp der FRDA dem der Ataxie mit Vitamin E Mangel (AVED) ähnlich ist, gab es Studien zu einem möglichen Therapieerfolg durch Vitamin E Supplementation. AVED wird durch Mutationen am α -Tocopherol Transportproteingen (α TTP) ausgelöst. Supplementation mit Vitamin E führte zu einer Besserung der neurologischen Symptome. Diese Ergebnisse konnten nicht auf FRDA übertragen werden. Derzeit gibt

es keine Resultate bezüglich der Wirksamkeit von Behandlungen mit Vitamin E bei FRDA Patienten [GABSI et al., 2001], [PANDOLFO, 2008].

2.3.1.2 Kaffeesäure

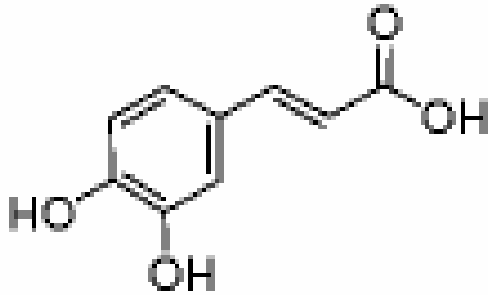


Abbildung 7: Strukturformel von Kaffeesäure [<http://www.sigmaaldrich.com>
Stand: 16.03.2009]

Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) ist ein Polyphenol mit antioxidativen, anti-inflammatorischen, antimutagenen und antikanzerogenen Eigenschaften [CHUNG et al., 2006].

Die Hydroxyzimtsäuren gehören zu einer der größten Klassen von phenolischen Verbindungen. Sie kommen in vielen verschiedenen Obst- und Gemüsesorten vor. Der größte Vertreter der Zimtsäuren in Lebensmitteln ist die Kaffeesäure. Sie kommt meist in Verbindung mit China- und Chlorogensäure (Ester der Kaffeesäure) vor. Kaffee ist eins der meistkonsumierten Getränke weltweit und die größte Nahrungsmittelquelle für Chlorogensäure.

Kaffee- und Chlorogensäure haben beide antioxidative Eigenschaften aufgrund ihrer Fähigkeit, *in vitro* freie Radikale einzufangen. *In vivo* bzw. wenn sie über Nahrungsmittel aufgenommen werden, erhöhen Kaffee- und Chlorogensäure die antioxidative Kapazität im Plasma, die Konzentration an endogenen Antioxidantien wie Vitamin E und die *ex vivo* Beständigkeit von Lipoproteinen gegen Oxidation [LAFAY et al., 2005].

Kaffeensäure kann überdies die Leukotriensynthese hemmen, was sich auf die Immunregulation, Entzündungen und Allergien auswirkt. Weiters kann Kaffeensäure die durch Cu^{2+} induzierte LDL-Oxidation hemmen [OLTHOF et al., 2001].

Es gibt mindestens zwei Mechanismen, die die antioxidativen Eigenschaften von phenolischen Verbindungen beschreiben: Zum einen durch Chelation von redox-aktivem Metallen, zum anderen durch Elektronenaufnahme von ROS. Kaffeensäure ist wie erwähnt besonders effektiv beim Radikalabbau, weil sie dabei Hydroxylgruppen bildet, die weiter oxidiert werden können.

Außerdem könnte Kaffeensäure die Zellen über einen Zink-aktivierten Signalweg schützen [CHUNG et al., 2006].

2.3.1.3 Curcumin

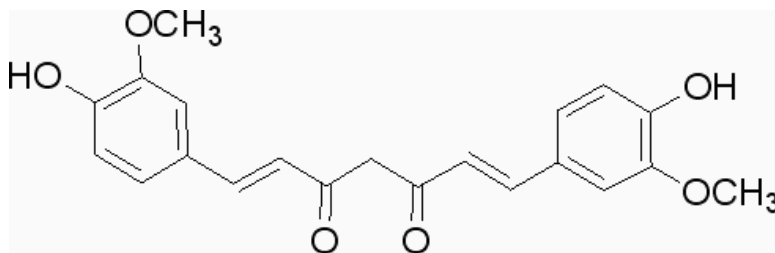


Abbildung 8: Strukturformel von Curcumin [<http://www.sigmaaldrich.com> Stand: 16.03.2009]

Curcumin (1,7-bis (4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-1,6-Heptadien-3,5-Dion) ist die wirksamste Komponente der Gelbwurz, ein gelbes, häufig verwendetes Gewürz, das vom Rhizom der Pflanze *Curcuma longa* gewonnen wird. Es wird oft als Gewürz und Farbstoff in verschiedenen Lebensmitteln verwendet. Ein weiter Bereich von biologischen und pharmakologischen Aktivitäten von Curcumin wurde in mehreren Studien untersucht.

Curcumin besitzt viele therapeutisch wirksame Eigenschaften und hat anti-inflammatorische, antitumor und antioxidative Wirkung. Weiters ist es ein Radikalfänger und schützt das Gehirn vor Lipidperoxidation [DIKSHIT et al., 2006], [IQBAL et al., 2008]

Curcumin kann intrazelluläre Antioxidantien wie GSH (Glutathion) erhöhen und reguliert antioxidative Enzyme. Zusätzlich zeigen sich die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Curcumin durch Inhibition des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B [KOWLURU and KANWA, 2007].

Curcumin wirkt als ein starker Inhibitor der Mutagenese und chemisch induzierter Karzinogenese.

Derzeit findet Curcumin große Beachtung wegen seines antioxidativen Potentials [IQBAL et al., 2008].

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind mit der Akkumulation von Proteinaggregaten, oxidativen Schäden und Entzündung verbunden. Curcumin hat mehrere vielversprechende Charakteristiken, um bei neurodegenerativen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt zu werden. Aufgrund seiner vielfachen Wirkungsweisen, seiner Ungiftigkeit in oralen Dosen, und relativen Kostengünstigkeit hat Curcumin großes therapeutisches Potential für neurodegenerative Erkrankungen, für die es derzeit kaum optimale Heilungsmöglichkeiten gibt [COLE et al. 2007].

2.3.1.4 Resveratrol

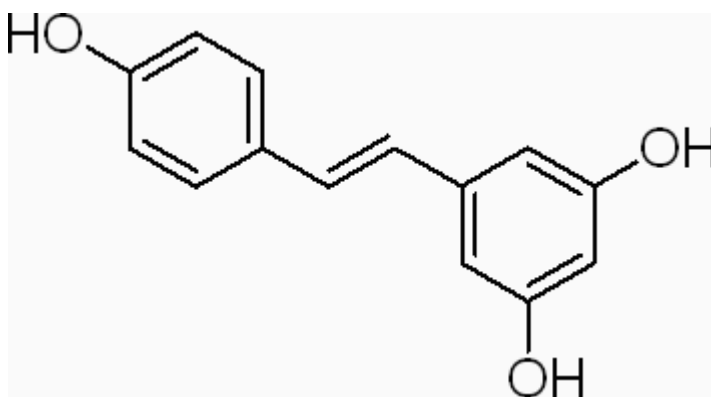


Abbildung 9: Strukturformel von Resveratrol [<http://www.sigmaaldrich.com> Stand: 16.03.2009]

Resveratrol (2,5,4-Trihydroxy-trans-Stilben) ist ein phenolisches Phytoalexin, das in Trauben, Preiselbeeren, Pflaumen und Erdnüssen gefunden wird. Es ist auch in großen Mengen in Rotwein enthalten [ALARCON DE LA LASTRA and VILLEGAS, 2007].

Mehrere *in vitro* Studien haben gezeigt, dass Resveratrol ein Molekül mit antioxidativen, antikanzerogenen, anti-inflammatorischen und östrogenähnlichen Eigenschaften ist.

Resveratrol wird aufgrund seiner bekannten antioxidativen Aktivität bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass Resveratrol Gliomazellen von Ratten vor der Toxizität von β -Amyloiden (Ab) schützt, indem es die Expression der intrinsischen Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und Cyclooxygenase (COX-2) reduziert. Außerdem kann Resveratrol die unkontrollierte Abgabe von NO und Prostaglandin E2 (PGE2) verhindern. Diese Wirkungen beruhen auf der Fähigkeit von Resveratrol, die Translokation von NF κ B in den Zellkern zu unterdrücken [CALABRESE et al., 2008].

Eine der mehrfach beschriebenen biologischen Aktivitäten von Resveratrol ist das antioxidative Potential, das es aufweist. Resveratrol ist zugleich Radikalfänger und wirkt als Antioxidans aufgrund seiner Fähigkeit, mehrere antioxidative Enzyme zu aktivieren. Die Wirksamkeit von phenolischen Verbindungen als Antioxidantien beruht auf den Redox Fähigkeiten ihrer phenolischen Hydroxylgruppen und dem Vermögen, Elektronen zu delokalisieren [ALARCON DE LA LASTRA and VILLEGAS, 2007].

Es wird angenommen, dass die antioxidative Wirkung im Zusammenhang mit den neuroprotektiven Eigenschaften von Resveratrol steht. Han et al. konnten *in vitro* nachweisen, dass Resveratrol über den Proteinkinase C (PKC) Signalweg einen neuroprotektiven Effekt hat [HAN et al., 2004].

3.0 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden alle Versuche mit 3 verschiedenen Zelllinien (P19, K562, HEK 293) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 %iger CO₂ Atmosphäre in sterilen Kulturflaschen (Fa. Iwaki). Um die Zellkulturen vor Kontamination mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen zu bewahren, sind besondere Maßnahmen bei der Tätigkeit mit den Zellen notwendig. Die Versuchsdurchführungen mit den Zelllinien werden in einer sterilen Werkbank (LaminarAir Flow Bio-II-A: Telstar) getätigt. Damit der Arbeitsbereich und alle Arbeitsmaterialien keimfrei bleiben, müssen vor jedem Arbeitsbeginn die Sterilbank, alle verwendeten Geräte (nach Hitze- bzw. Dampfsterilisation) sowie Hände bzw. Handschuhe mittels 70%igen Ethanol gereinigt werden.

3.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden sowohl Suspensionszellen (K562) als auch adhärenente Zellen (P19, HEK 293 bzw. T-Rex 293) verwendet.

P19 Zellen werden nach Differenzierung als Modell für neuronale Zellen herangezogen, K562 Zellen dienen als Modell für humane erythroide Zellen und HEK 293 bzw. T-Rex 293 Zellen werden als induzierbares Frataxin-Knockdown Zellmodell verwendet, da bei ihnen die Frataxinexpression herunterreguliert ist.

3.1.1.1 P19

Die P19 Zelllinie stammt aus embryonalen Karzinomzellen eines C3H/He Mäusestamms. Es handelt sich um adhärenz, pluripotente Zellen, welche mit Retinolsäure zu neuronalen- und Gliazellen differenzieren können [ATCC CRL 1825]. Die Zellen wurden in komplettierten α -MEM Medium kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen gesplittet.

3.1.1.1.1 α -MEM

Zur Kultivierung der P19 Zellen wurde α -MEM Medium (Euroclone) verwendet. Das Trockenmedium in Pulverform wird in 7 Liter bidestillierten Wasser vollständig aufgelöst. Danach erfolgt der Zusatz von 22 g Natriumhydrogencarbonat (2,2 g NaHCO_3 /L). Anschließend wird der pH-Wert auf 7,2 mit 1M HCl eingestellt. Das Volumen wird auf 10 Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, und das Medium rührt mindestens 1h am Magnetrührer (IKA® RCT basic).

Danach wird das α -MEM Nullmedium in der Sterilbank mittels einer Schlauchpumpe (Masterflex, Cole Parmer Instrument Co) durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0,20 μm (Sartolab P plus, Sartorius) in sterile 500 ml Glasflaschen abgefüllt. Das Medium wird anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Zur Kultivierung der Zelltypen und um ein optimales Wachstum der Zellen und Vermeidung von Bakterienwachstum zu garantieren, werden 450 ml des Nullmediums mit folgenden Zusätzen komplementiert:

- 37,5 ml hitzeinaktiviertes CS (7,5%), (calf serum), (GIBCO®)
- 12,5 ml hitzeinaktiviertes FBS (2,5%), (foetal bovine serum), (GIBCO®)
- 5,0 ml L-Glutamin (2mM) (Euroclone)
- 5,0 ml non essential amino acids solution (100x Stock) (Biochrom AG)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml) (Antibiotikum), (GERBU Biotechnik GmbH)

Zum Differenzieren der P19 Zellen braucht man nur 5% Serumzusatz im Nullmedium, die anderen Komponenten werden in gleicher Menge zugefügt:

- 18,75 ml hitzeinaktiviertes CS (3,75%), (calf serum), (GIBCO®)
- 6,25 ml hitzeinaktiviertes FBS (1,25%), (foetal bovine serum), (GIBCO®)

Für die Inkubationsversuche wurde auch ein α -MEM-BSA (bovine serum albumin) Medium benötigt. Zu 50 ml α -MEM-Nullmedium werden folgende Zusätze zugegeben:

- 1 mg/ml BSA (Roth)
- 2 μ g/ml Holotransferin (500 mg) (Provivo)
- 1 ml essential amino acids (100x Stock), (Sigma)
- 0,5 ml non essential amino acids solution (100x Stock) (Biochrom AG)
- 0,5 ml L-Glutamin (2 mM) (Euroclone)

3.1.1.2 K562

Hierbei handelt es sich um Suspensionszellen, die von Lozzio et al. aus der pleuralen Effusion einer 53 jährigen Frau, die an chronischer myelogener Leukämie in terminaler Blastenkrise erkrankt war, etabliert wurden. [ATCC CCL 243]. Alle 2-3 Tage wurde das Kultivierungsmedium gewechselt und die Zellen auf eine Zellzahl von 0,4 Mio/ml eingestellt.

3.1.1.2.1 RPMI

Zur Kultivierung der K562 Zellen wurde RPMI 1640 Medium (Biochrom KG) verwendet. Das Trockenmedium wird ebenfalls in 7 Liter bidestillierten Wasser aufgelöst. Anschließend werden 20 g Natriumhydrogencarbonat (2,0 g NaHCO₃ /L) zugesetzt und der pH Wert auf 7,2 eingestellt. Nachdem das Volumen auf 10 Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und mindestens 1h auf dem Magnetrührer gerührt

wurde, erfolgt die Abfüllung zu je 500 ml in sterile Glasflaschen. Das Medium wird anschließend bei 4°C gelagert.

450 ml des RPMI Nullmediums müssen folgendermaßen komplementiert werden, um ein optimales Zellwachstum und eine Vermeidung von Bakterienwachstum zu garantieren:

- 50 ml FCS (fetal calf serum,), (GIBCO®)
- 5 ml L-Glutamin (2mM) (Euroclone)
- 5 ml Pen-Strep (100x Stock) (Penicillin/Streptomycin), (Sigma)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml)(Antibiotikum), (GERBU Biotechnik GmbH)

Das benötigte FCS sollte hitzeinaktiviert sein, für manche Versuchsansätze wurde jedoch auch ein nicht hitzeinaktiviertes FCS verwendet.

Weiters wurde für manche Inkubationen auch ein RPMI-BSA Medium verwendet. Zu 50 ml RPMI-Nullmedium werden folgende Zusätze zugefügt:

- 1 mg/ml BSA (Roth)
- 2 µg/ml Holotransferin (500 mg) (Provivo)
- 1 ml essential amino acids (100x Stock), (Sigma)
- 0,5 ml non essential amino acids solution (100x Stock) (Biochrom AG)
- 0,5 ml L-Glutamin (2 mM) (Euroclone)

3.1.1.3 HEK 293 (T-Rex 293)

HEK 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ist eine humane, embryonale Nieren-Zelllinie, die bestimmte Proteine konstant exprimieren kann. In dieser Arbeit wurden HEK 293 Zellen verwendet, welche das Tetracyclin Rezeptor Protein (TetR) exprimieren und daher als T-Rex 293 Zellen bezeichnet werden. Diese TetR- Proteinexpression führt zu einem durch Zusatz von Tetracyclin induzierbarem Frataxinknockdown bzw. einer

Verminderung der Frataxinexpression, die auch bei Patienten mit FRDA auftritt [LU and CORTOPASSI, 2006].

Alle 2 Tage wurde das Zellmedium gewechselt, alle 3-4 Tage wurden die Zellen gesplittet. Bei Versuchen mit T-Rex 293 werden stets Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen mitgezüchtet, bei denen das Frataxin nicht durch Tetracyclin (Tc) herunterreguliert ist. Frataxin wurde mit 0,5 µg Tetracyclin/ml/d ausgeknockt. Nach 5 Tagen war etwa 10% Frataxin vorhanden.

3.1.1.3.1 DMEM

Zur Kultivierung der T-Rex 293 Zellen wurde Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) verwendet. Die Herstellung erfolgt genauso wie die Herstellung der anderen beiden Medien, nur werden 37 g Natriumhydrogencarbonat und 1,1 g Natrium-Pyruvat zugesetzt.

450 ml DMEM Nullmedium werden mit folgenden Zusätzen komplementiert:

- 50 ml FCS tetracycline free (10%), (fetal calf serum) (BioSera)
- 5 mM L-Glutamin (2 mM) (Euroclone)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml) (Antibiotikum), (GERBU Biotechnik GmbH)

folgende Antibiotika werden immer frisch hinzugesetzt:

- 1 µl/ml Blastocidin (50 mg/ml) (PAA)
- 0,33 µl/ml Puromycin (50 mg/ml) (PAA)

3.1.2 Mediumwechsel und Passagieren

Die Zelltypen werden in unterschiedlich großen, sterilen Zellkulturflaschen (Fa. Iwaki, Fa. Greiner) kultiviert.

Die Nährstoffe des Kulturmediums werden nach einiger Zeit bei der Bebrütungstemperatur von 37°C abgebaut. Um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten und um eine logarithmische Wachstumsphase zu erhalten, muss das Nährmedium regelmäßig ausgetauscht und erneuert werden.

Nach Erreichen der Maximaldichte der Zellen teilen sich die Zellen nicht mehr. Es kommt zur kontaktinduzierten Wachstumshemmung. Deshalb werden adhärente Zellen durch Passagieren in bestimmter Verdünnung in ein neues Kulturgefäß übergeführt. Dazu müssen die Zellen vorerst vom Gefäßboden gelöst und in Suspension gebracht werden. Zuerst wird das alte Medium abgesaugt und P19 Zellen werden mit 0,05 % Trypsin (Euroclone) abgelöst. Das Trypsin wirkt etwa 2 Minuten ein und wird anschließend abgesaugt. Für T-Rex 293 Zellen verwendet man ebenfalls 0,05% Trypsin (Euroclone) mit einer Einwirkzeit von 2-3 Minuten. Danach werden die Zellen zurück in den Brutschrank gegeben. Nach 2-5 Minuten im Brutschrank lösen sich die Zellen durch die Einwirkung des Trypsins vom Boden der Kulturflasche ab und können in neuem Medium resuspendiert werden. Danach werden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt und durch Verdünnung mit frischem Medium wird die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Zum Subkultivieren der Suspensionszellen wird 3-mal in der Woche das Medium gewechselt und die Zelldichte auf 0,4 Mio/ml eingestellt, indem man ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche pipettiert und mit frischem Medium verdünnt.

Wichtig ist, dass alle Lösungen vor Kontakt mit den Zellen auf 37°C in einem Wasserbad erwärmt werden.

3.1.3 Differenzieren von P19 Zellen

P19 Zellen sind pluripotent und können durch Zusatz von Retinolsäure (RA) zu neuronalen-, Glia- und Fibroblasten- ähnlichen Zellen differenziert werden. Retinolsäure kann eine Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen, vor allem aber bei embryonalen Karzinomzellen induzieren (JONES-VILLENEUVE et al., 1982).

Zur Differenzierung der P19 Zellen werden diese in Petrischalen (Cellstar) mit frischem 5%igen α -MEM Medium auf eine Dichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Durch Zusatz von 0,25 μ l RA (5 mM)/ml wird die Differenzierung induziert. Die weitere Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre. Dabei formen sich die Zellen zu Aggregaten. Am zweiten Tag nach der Induktion wird das Medium gewechselt, indem man die Zellen im alten Medium in 50 ml Röhren (Falcon) sammelt und etwa 10 min absinken lässt. Danach wird 3 min mit 100g bei 4°C zentrifugiert und das alte Medium wird vorsichtig abgesaugt. Dann werden die Zellen in frischem 5%igen Medium resuspendiert, wobei wieder frische RA in derselben Konzentration zugefügt wird; die Aggregatsuspension wird wieder in Petrischalen überführt. Nach 5 Tagen werden die Zellen in Well-Platten ausgesetzt, die mit 0,1% Gelatine gecoatet wurden.

Dies erfolgt folgendermaßen: Der Überstand in den Petrischalen wird in 50 ml Röhren (Falcon) gesammelt und bei 100g für 3min bei 4°C abzentrifugiert. Danach wird das alte Medium vorsichtig abgesaugt, ohne das Zellpellet zu verletzen. Das Pellet wird in 1-2 ml PBS/EDTA (1x PBS, 1mM EDTA pH 7,4) homogenisiert und auf 10 ml mit frischem 10% α -MEM Medium aufgefüllt. Nun wird die Zellzahl gezählt und die entsprechende Verdünnung mit frischem 10% α -MEM Medium wird in die Well Platten pipettiert, wobei in die 6-Well Platten 2 ml Zellsuspension und in die 12-Well Platten 1 ml Zellsuspension pipettiert werden. Die Zellen werden in den 6-Well Platten mit einer Dichte von 5×10^5 /ml oder in den 12-Well Platten mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ /ml ausgesetzt.

Nach weiteren 3 Tagen sind die Zellen vollständig zu Neuronen differenziert und können für Versuche herangezogen werden.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl muss vor jedem Überführen in eine neue Kulturflasche vorgenommen werden, da für das Anlegen von Arbeitskulturen eine genaue Zellzahl erforderlich ist. Die Zählung erfolgt mit einem elektronischen Zellzähler (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex). Hierfür werden in der sterilen Werkbank

(Laminar Air Flow Bio-II-A: Telstar) etwa 0,5 ml der Zellsuspension entnommen. Dann werden daraus 200 µl in ein Countergefäß pipettiert und mit 9,8 ml Counterflüssigkeit (Cellpack PK-30, Fa. Sysmex) verdünnt. Anschließend erfolgt die Messung mit dem Zellzähler, wobei aber nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden wird

3.2 Inkubation der Zellen

3.2.1 Verwendete Substanzen

Für die verschiedenen Inkubationsversuche wurden sowohl Kulturmedien als auch Antioxidantien verwendet.

3.2.1.1 Medien

3.2.1.1.1 Medien für die Inkubation der P19 Zellen

- α -MEM Nullmedium
- α -MEM Komplettmedium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum
- α -MEM Komplettmedium mit 5% hitzeinaktiviertem Serum
- α -MEM-BSA-Medium (1mg BSA/ml)

3.2.1.1.2 Medien für die Inkubation der K562 Zellen

- RPMI Nullmedium
- RPMI Komplettmedium mit hitzeinaktiviertem Serum (HI)
- RPMI Komplettmedium mit nicht hitzeinaktiviertem Serum (not HI)
- RPMI-BSA-Medium (1mg BSA/ml)

3.2.1.2 Antioxidantien

3.2.1.2.1 α -Tocopherol Succinat (530,78 g/mol)

Für 5 ml einer 5 mM Stammlösung werden 13 mg α -Tocopherol Succinat eingewogen und in 5 ml Ethanol vollständig gelöst.

3.2.1.2.2 Kaffeesäure (180,16 g/mol)

Für 10 ml einer 10 mM Stammlösung werden 18 mg Kaffeesäure eingewogen und in 10 ml Ethanol vollständig gelöst.

3.2.1.2.3 Curcumin (368,38 g/mol)

Für 5 ml einer 5 mM Stammlösung werden 9 mg Curcumin eingewogen, in 250 μ l 5 M Natronlauge vorgelöst und dann in 4750 μ l PBS (1x) gelöst.

3.2.1.2.4 Resveratrol (228,24 g/mol)

Für 5 ml einer 5 mM Stammlösung werden 5,75 mg Resveratrol eingewogen und in 5 ml Ethanol gelöst.

α-Tocopherol-Succinat					
5mM Stammlösung					
Konz. (μM)	10	20	30	50	
VF*	500	250	166,667	100	
Keffeesäure					
0,1mM Stammlösung					
Konz. (μM)	0,1	0,5	1	2,5	
VF	1000	200	100	2,5	
Curcumin					
5mM Stammlösung					
Konz. (μM)	0,5	1	2	5	10
VF	10000	5000	2500	1000	500
Resveratrol					
5mM Stammlösung					
Konz. (μM)	5	10	15	25	
VF	770	350	233,333	140	

Tabelle 1: Konzentrationsliste der verwendeten Antioxidantien

* VF= Verdünnungsfaktor

3.2.2 Inkubation von P19 Zellen

Die Zellen werden wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben zu Neuronen differenziert und in Well Platten ausgesetzt, wo sie dann für die Inkubationsversuche herangezogen wurden.

Je nach Ansatz sind die verwendeten Substanzen und die Inkubationszeiten unterschiedlich.

Die Inkubation mit den verschiedenen Medien erfolgte für die Dauer von 2, 4, 6, 24 und 48h im Brutschrank bei 37°C mit 5 %iger CO₂ Atmosphäre, die Inkubation mit den Antioxidantien erfolgte 24 und 48 h, wobei das alte Medium in den Wells abgesaugt wurde und entsprechende Mengen des jeweiligen Inkubationsmediums bzw. die Antioxidantien in 5%igem α -MEM verdünnt in die Wells pipettiert wurde. α -MEM mit 5% Serunzusatz und Antioxidantien wurden so zugegeben, dass man auf ein Endvolumen von 2 ml (6-Well Platte) bzw. 1 ml (12-Well Platte) kam.

3.2.3 Inkubation von K562 Zellen

Für die Inkubationen werden Zellkulturflaschen (Fa. Iwaki) verwendet.

Die Inkubation mit den verschiedenen Medien erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Zellzahl wird gezählt und die Zellen werden mit frischem RPMI 1640 Medium auf eine Dichte von $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Am Tag der Inkubation wurden die K562 Zellen bei 250g für 3min bei 4°C abzentrifugiert. Das alte Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 12 ml des jeweiligen Inkubationsmediums resuspendiert, da pro Inkubationszeitpunkt 2 ml entnommen wurden.

Die Inkubation mit den Antioxidantien erfolgte 24 und 48h im Brutschrank.

Die Zellen wurden gezählt und auf eine Dichte von $0,4 \times 10^6$ /ml eingestellt. Frisches RPMI Medium und Antioxidantien wurden so zugegeben, dass man auf ein Endvolumen von 10 ml kam, da pro Inkubationszeitpunkt je 5 ml gesammelt wurden. Pro Substanz und Konzentration wurde eine Kulturflasche verwendet.

3.2.4 Inkubation von T-Rex 293 Zellen

Die T-Rex 293 Zellen müssen zuerst trypsinisiert werden, um die Zellzahl zu bestimmen (siehe Kapitel 3.1.6). Danach wurden sie für die LDH Messung in 48-Well Platten mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml für die 24h Inkubation bzw. mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml für die 48h Inkubation ausgesetzt, wobei pro Well ein Volumen von 0,5 ml Zellsuspension pipettiert wurde. Für den MTT Assay wurden die Zellen in 96-Well Platten mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml ausgesetzt, wobei pro Well ein Volumen von 100 µl pipettiert wurde. Die Inkubationen erfolgten einen Tag nach dem Aussetzen nur mit Antioxidantien für die Dauer von 24 bzw. 48h im Brutschrank bei 37°C mit 5 %iger CO₂ Atmosphäre.

Für die LDH Messung wurden die Zellen mit allen vier Antioxidantien inkubiert, wobei die Antioxidantien in entsprechender Menge direkt in die Wells pipettiert wurden. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen und gesammelt, dann jeweils 0,5 ml einer 1 mM H₂O₂-Medium-Lösung in jedes Well zugegeben und 4h

im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der H₂O₂-Überstand abgenommen und gesammelt.

Für den MTT-Assay wurden die Zellen mit Curcumin und Resveratrol in den Konzentrationen 2, 4 und 8 µM 24h inkubiert. Danach wurden je 50 µl 0,5 mM H₂O₂-Lösung bzw. PBS (1x) pro Well zugegeben und nochmals 3h inkubiert.

3.2.5 Ernten der Zellen

Die Arbeitsschritte für das Ernten der Zellen sind je nach Zelltyp unterschiedlich.

Bei den P19 Zellen wird nach den jeweiligen Inkubationszeiten sowie am Anfang der Inkubation (Nullzeitpunkt) das Überstandsmedium aus den Wells in Eppis gesammelt und bei – 20°C eingefroren. Die Platten werden 2x mit je 1 ml PBS (1x)/Well gewaschen und dann ebenfalls bei -20°C eingefroren.

Bei den K562 Zellen wird zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten sowie am Beginn der Inkubation (Nullzeitpunkt) jeweils 2 ml bzw. 5 ml (je nach Versuchsansatz) aus den Flaschen entnommen und in 15 ml Röhrchen (Falcon) überführt. Die entnommene Zellmenge wird bei 250g 3 min bei 4°C abzentrifugiert, dann wird der Überstand in Eppis gesammelt und bei – 20°C eingefroren. Zu den Zellpellets werden je 1 ml PBS (1x) pipettiert, resuspendiert und in ein neues Eppi überführt. Die Suspension wird nochmals bei 300g 5 min bei 4°C zentrifugiert. Dann wird das PBS abgesaugt und das Pellet wird bei -20°C eingefroren.

PBS (5x), pH 7,3 (alle Chemikalien von Fa. Merck)

40 g NaCl
1 g KCl
1 g KH₂PO₄
14,5 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

werden mit H₂O dest. auf 1 Liter vollständig verrührt, dann wird der pH Wert auf 7,4 eingestellt. Dieser wird dann 1:5 verdünnt, um einen 1x PBS zu erhalten.

3.2.6 Lysieren der Zellen

Die P19 Zellen müssen vor dem Lysieren aus den Wells der Platten gesammelt werden. Man pipettiert je nach Größe der Wells 40 µl (6-Well Platte) oder 30 µl (12-Well Platte) Lysispuffer (Promega Cell Culture Lysis Reagent + 1µl/ml 1mM PMSF (Stammlösung 1M in DMSO)), der zuvor 1:5 mit H₂O dest. verdünnt wurde, in jedes Well und schabt die Zellen mit einem Cell Scraper (Sigma) vom Boden der Wells. Dann transferiert man das Lysat in Eppis, vortext die Suspension und lässt den Lysispuffer 10 min auf Eis einwirken. Als Nächstes wird das Zelllysat nochmals gevortext, und man bricht die Zellen mittels Ultraschall auf. Danach wird das Lysat bei 7000g 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt, das Pellet verworfen. Die Proben können dann bei -20°C gelagert werden und für Versuche herangezogen werden.

Zum K562 Zellpellet werden 50 µl Lysispuffer zugegeben, gevortext und die Suspension wird 10 min auf Eis inkubiert Die weiteren Schritte sind dieselben wie bei den P19 Zellen.

3.2.7 Proteinbestimmung nach BIORAD

Mit jeder Probe wird eine Proteinbestimmung durchgeführt, da man für die nachfolgenden Versuche immer die gleiche Proteinmenge in den Proben benötigt.

Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-

Blau G-250 an die freien Aminogruppen von Proteinen. Im saurem Milieu erfolgt aufgrund dieser Komplexbildung ein Farbumschlag von braun zu blau und das Absorptionsmaximum wird von 465nm nach 595nm verschoben.

Für jede Probe wird die Proteinkonzentration mittels Standardkonzentrationen (0 µg/ml bis 12 µg/ml) über eine mit BSA erstellten Eichgerade ermittelt. Eine BSA-Stammlösung (1 mg BSA/ml) wird 1:10 mit H₂O dest. verdünnt.

Konzentration (µg/ml)	Verdünnte BSA-Lösung (µl)	H ₂ O dest (µl)
0	/	800
2	20	780
4	40	760
6	60	740
8	80	720
10	100	700
12	120	680

Tabelle 2: Pipettierschema für die Eichgerade

1 µl der Proben wird mit H₂O dest. auf 800 µl aufgefüllt. Danach werden jeweils 200 µl BIORAD Reagens in die Standards und Proben mittels Dispenser zugegeben und gevortext. Nun wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden nochmals je 200 µl (im Doppelansatz) in eine 96-Well ELISA Platte pipettiert und die Absorption wird bei 595nm photometrisch (Anthos Zenyth 3100) bestimmt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgt über eine Standardkurvenkalkulation mit dem GraphPad Prism Programm.

3.3 ECLIA (Elektrochemilumineszenz- Immunoassay)

Ziel dieses Versuchs war es, die Frataxinkonzentration der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen mittels MSD (Meso Scale Discovery) Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) zu messen.

Elektrochemilumineszenz (ECL) Detektion verwendet Label, die Licht abstrahlen wenn sie elektrochemisch stimuliert werden. Mögliche Hintergrundsignale sind minimal, weil der Stimulationsmechanismus (Elektrizität) nicht mit dem Signal (Licht) selbst gekoppelt ist.

Die Label sind stabil, nicht radioaktiv und emittieren Licht bei 620 nm.

Es werden 96- Well Platten (MULTI-ARRAY™ Plates, MA2400 96

High Binding Plate) verwendet, die Kohleelektroden im Boden der Platte integriert haben, durch welche der Detektionsprozess initiiert wird.

Bei diesem Assay handelt es sich um ein Immuno-Sandwich-Assay, der folgendermaßen angelegt wird:

Zuerst wird die MSD-Platte mit einem monoklonalen Beschichtungsantikörper (capture antibody) gecoatet. Danach werden Standard und Proben aufgetragen, anschließend der polyklonale Bindungsantikörper und zum Schluss ein mit MSD SULFO-Tag™ Reagens (Elektrochemilumineszenzmarkierung) markierter Detektionsantikörper (detecting antibody).

Als letzter Schritt wird der MSD Reading Buffer zugefügt, der die am besten geeigneten chemischen Bedingungen für die Messung mit dem MSD SECTOR™ Gerät schafft.

Durch eine elektrische Spannung, die an den Elektroden der Multi-Array Platte angelegt wird, wird Licht durch eine an der Oberfläche der Elektrode gebundene Markierung emittiert. Das SECTOR Gerät misst die Intensität des emittierten Lichts und ermöglicht dadurch eine quantitative Messung der Frataxinmenge in der Probe [HELMINGER 2008]

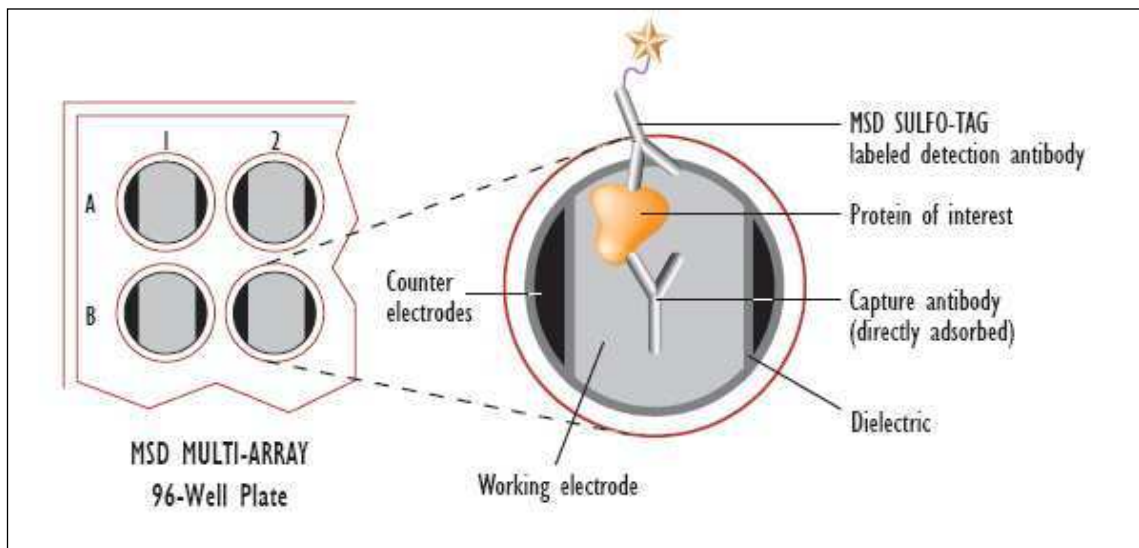


Abbildung 10: Sandwich-Immunoassay mit MSD MULTI-ARRAY Platte. Quelle: www.meso-scale.com 13.01.2009

3.3.1 Durchführung des ECLIA

Am Vortag der eigentlichen Versuchsdurchführung wird die MSD- High Bindplatte mit dem 1. Antikörper von Chemicon (Ms α Fx) gecoatet:

- Der Antikörper wird 1:50.000 in 1x PBS verdünnt, danach werden je 30 μ l/Well der Antikörper-Lösung durch ‚Reverse Pipetting‘ aufgetragen und gut verteilt.
- Zum Schluss wird eine Klebefolie über die Platte geklebt und die Platte wird über Nacht (mindestens 8h) bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Platte mit 3%igem BSA (Bovine Serum Albumin) (MSD) in 1x PBS geblockt.

- Die Platte wird zunächst ausgeleert, vorsichtig abgeklopft und dann werden je 125 μ l 3%iges BSA in die Wells pipettiert.
- Die Platte wird dann 1h 30min bei Raumtemperatur mit der Klebefolie abgedeckt am Belly Dancer inkubiert.

Während der Inkubationszeit wird mit der Vorbereitung des Standards und der Proben begonnen. Es wird eine Standardreihe nach folgendem Schema pipettiert.

Std 1	(1 ng/Well)	125 µl Std-Stammlösung*	105 µl BSA 1%
Std 2	(0,5 ng/Well)	115 µl Std 1	115 µl BSA 1%
Std 3	(0,25 ng/Well)	115 µl Std 2	115 µl BSA 1%
Std 4	(0,0125 ng/Well)	115 µl Std 3	115 µl BSA 1%
Std 5	(0,0625 ng/Well)	115 µl Std 4	115 µl BSA 1%
Std 6	(0,03125 ng/Well)	115 µl Std 5	115 µl BSA 1%
Std 7	(0,0156 ng/Well)	115 µl Std 6	115 µl BSA 1%
Std 8 **	(0,0078 ng/Well)	115 µl Std 7	115 µl BSA 1%
Leerwert		/	115 µl BSA 1%

Tabelle 3: Pipettierschema für Standardreihe

- * Frataxin-Standard Stammlösung: 0,08 ng/µl
- ** Vom Std 8 werden 115 µl verworfen, damit alle Standards dasselbe Volumen haben
- Alle 8 Standards werden noch mit 20 µl Lysispuffer/SDS-Lösung (entspricht 16% Lysispuffer und 0,02% SDS pro Ansatz) versetzt (197,5 µl Lysispuffer + 2,5 µl 10% SDS).

Danach erfolgt die Probenvorbereitung. Je nach Zelltyp wird eine unterschiedliche Proteinmenge benötigt, bei diesen Versuchen wurden für K562 Zellen 2 µg Protein/Ansatz und für die P19 Zellen 5 µg Protein/Ansatz verwendet. Die Proben werden für einen fünffach-Ansatz hergerichtet.

- Jeder Probenansatz wird auf 20 µl mit Lysispuffer (Promega/PMSF) aufgefüllt und danach mit BSA/SDS-Puffer (3990 µl 1% BSA + 9,52 µl 10% SDS) auf das Endvolumen von 125 µl vervollständigt.
- Nach der Inkubationszeit von 1h 30 min wird die Platte wieder ausgeleert und abgeklopft, danach dreimal mit je 150 µl/Well Waschlösung (1x PBS + 0,05% TWEEN 20) gewaschen.
- Nun beginnt man mit dem Auftragen von je 25 µl/Well der Standardreihe und der Proben durch ‚Reverse Pipetting‘ im Dreifachansatz. Der Standard wird

beginnend mit der höchsten Konzentration in den ersten drei Spalten der Platte aufgetragen.

- Nach dem Auftragen der Proben und des Standards wird die Platte mit Klebefolie verschlossen und 1h am Belly Dancer inkubiert.

Nach der Inkubationsperiode folgt nach dreimaligen Waschen der Platte mit je 150 μ l/Well Waschlösung das Auftragen des 2. Antikörpers von Santa Cruz (Fx pc):

- Dieser Bindungsantikörper ist 1:1000 mit 1%igem BSA verdünnt und wird in einem Volumen von 30 μ l/Well aufgetragen.
- Danach folgt nach dem Aufkleben der Folie wieder eine Inkubationszeit von 1h am Belly Dancer.

Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 150 μ l Waschlösung/Well der Platte erfolgt nun das Auftragen des 3. Antikörpers:

- Dieser wird in einer Konzentration von 0,75mg/ml in einem Volumen von 30 μ l/Well aufgetragen.
- Nach Aufkleben der Folie folgt wieder eine 1h Inkubationszeit am Belly Dancer.

Anschließend wird nach erneutem dreimaligen Waschen der Platte je 150 μ l Reading Buffer (1x) (MSD) pro Well aufgetragen und gleichmäßig verteilt.

Nun erfolgt die Messung im MSD SECTOR Gerät. Die Auswertung der Messergebnisse wird mit dem GraphPadPrism Programm ausgeführt.

3.4 LDH Messung

Die Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität gilt als etabliertes Maß für die Zytotoxizität in Zellen. Dabei wird eine mögliche Zellschädigung über LDH-Freisetzung ins Medium untersucht.

LDH ist in intakten Zellen im Zytoplasma lokalisiert und der Austritt des Enzyms wird durch die unbeschädigten Zellmembranen verhindert. Bei einer Schädigung der

Zellmembranen werden cytosolische Bestandteile, u.a. LDH, freigesetzt und reichern sich in der Umgebung, z.B. im Nährmedium der Zellen, an [WEISHAAR et al., 1975]. Durch Messung der LDH-Aktivität erhält man Aufschluss über das Maß der Zellschädigung, da es im Kulturmedium als relativ stabiles Enzym detektierbar ist. Die LDH-Aktivität wird direkt über die Konzentrationsabnahme von reduziertem Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) photometrisch bestimmt [THOMAS, 1998].

3.4.1 Verwendete Reagenzien

- Tris-HCl pH 7,4 (Fa. Merck)
- NADH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced sodium salt hydrate) (SIGMA)
- Natrium-Pyruvat (Pyruvic acid, sodium salt) (SIGMA)

Es wird ein Reaktionsmix hergestellt bestehend aus 60 mM Tris-HCl pH 7,4 und 0,2 mM NADH:

Für 30 ml: 4,26 mg NADH werden eingewogen und in 18,75 ml Tris-HCl (100mM, pH 7,4) gelöst, dann mit H₂O dest. auf 30 ml aufgefüllt.

Na-Pyruvat wird als Substrat für den Start der Reaktion benötigt: Für 20 ml werden 22 mg Na-Pyruvat eingewogen und in 20 ml H₂O dest. gelöst. Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur verwendet.

3.4.2 Durchführung der Messung

Je 200 μ l/Well des Reaktionsmixes werden in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden im Doppelansatz vorgelegt. Dann werden je 50 μ l Probe (Medienüberstände) oder Leerwert (Zellmedium) dazu pipettiert. Nachdem die Reaktion durch zügiges Zufügen von je 30 μ l Na-Pyruvat mit einer Mehrkanalpipette gestartet wurde, kann die Abnahme der Extinktion bei 340nm über 10 min jede Minute im Photometer (Anthos Zenyth

3100) gemessen werden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte über das GraphPadPrism Programm.

3.5 MTT Zytotoxizitäts-Test

Für den MTT-Test wurden nur T-Rex 293 Zellen verwendet.

Der Zytotoxizitäts-Test wird zum Nachweis der Zellvitalität verwendet, es handelt sich dabei um die Messung des Anteils an lebenden Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

Der MTT Test ist ein quantitativer Test und basiert darauf, dass gelbes Tetrazoliumsalz MTT-(3-[4,5-dimethyldiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) von metabolisch aktiven Zellen zu purpurfarbenem Formazan reduziert wird. Lebende Zellen besitzen diese Fähigkeit aufgrund ihrer mitochondrialen und mikrosomalen Dehydrogenasen. Das Formazan kann photometrisch quantifiziert werden, da die resultierende Farbintensität der Vitalität der Zellen direkt proportional ist [BUSHNELL et al., 1999].

3.5.1 Durchführung des MTT-Tests

Die T-Rex 293 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben inkubiert. 3h nach Zugabe der H₂O₂ Lösung bzw. des 1x PBS wird eine MTT-Stammlösung 1:5 verdünnt (20 µl MTT-Stammlösung/100 µl Wellvolumen) direkt in die Wells zugegeben. Die Platten werden 30 min bei Standardbedingungen inkubiert, dann sind die blaugefärbten Zellen unter dem Mikroskop erkennbar.

Die Platten werden ausgeleert und vorsichtig abgeklopft bevor je 150 µl MTT-Solvent-Lösung (4mM HCl, 0,1% Nondet P-40 in Isopropanol gelöst) zu den Wells zugegeben wird, um die Farbreaktion zu stoppen. Durch 20-minütiges Schütteln am Belly Dancer werden die MTT-Formazankristalle gelöst. Die Messung der Farbintensität erfolgt zuerst bei 595nm, dann bei 620 nm im Anthos Zenyth 3100. Die Auswertung der Messdaten wurde mit dem GraphPadPrism Programm ausgeführt.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem GraphPadPrism Programm ausgeführt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der ermittelten Werte wurde ein zweiseitiger t-Test angewendet. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen wurden in den Grafiken mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0.01$) und *** ($p < 0.001$) markiert.

4.0 Ergebnisse & Diskussion

4.1 Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Frataxinexpression und Zellschädigung

Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der Kulturmedien auf die Frataxinexpression und mögliche Zellschädigungen in P19 und K562 Zellen untersucht. Hierbei soll gezeigt werden, welche Wirkung Zellkulturmedien mit verschiedenen Zusätzen auf die Frataxinexpression in neuronalen P19 und K562 Zellen haben.

Dazu wurden beide Zelllinien für unterschiedliche Zeitperioden mit verschiedenen Medien inkubiert. Danach wurde mittels ECLIA die Frataxinexpression gemessen.

4.1.1 Der Einfluss von α -MEM Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Frataxinexpression von P19 Zellen

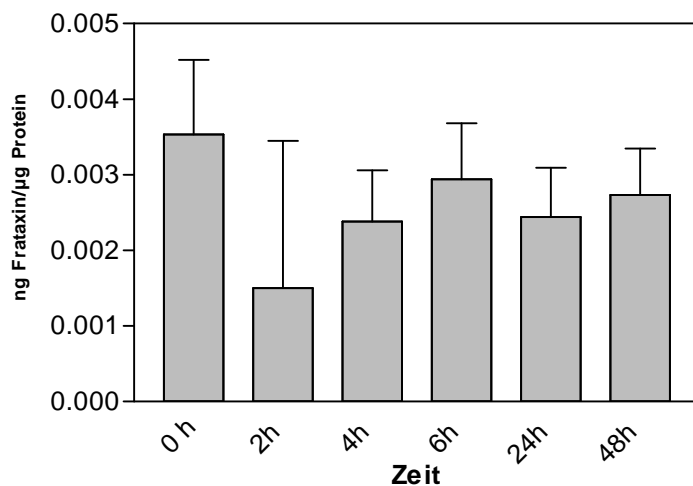


Abbildung 11: Einfluss der Inkubation mit α -MEM Nullmedium auf die Frataxinexpression von neuronalen P19 Zellen

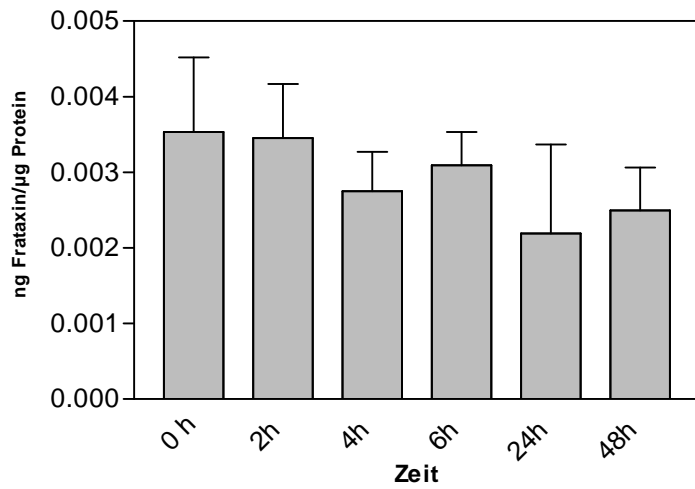


Abbildung 12: Einfluss von α -MEM-Medium mit 1%igem BSA Zusatz auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

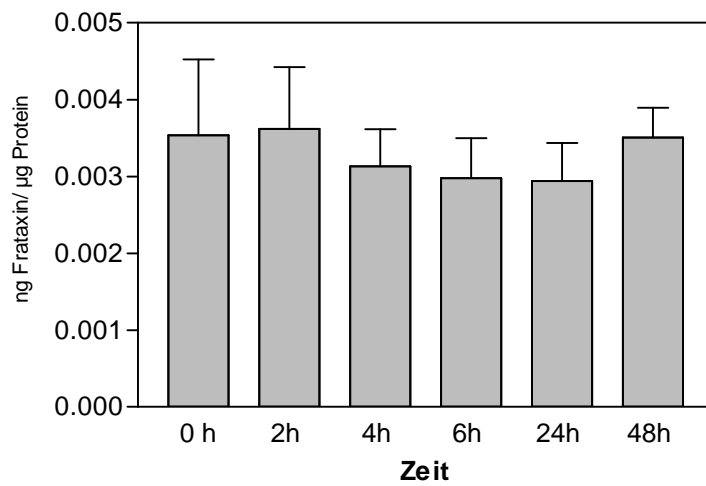


Abbildung 13: Einfluss von α -MEM- Kompletmedium mit 5 % Serum auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

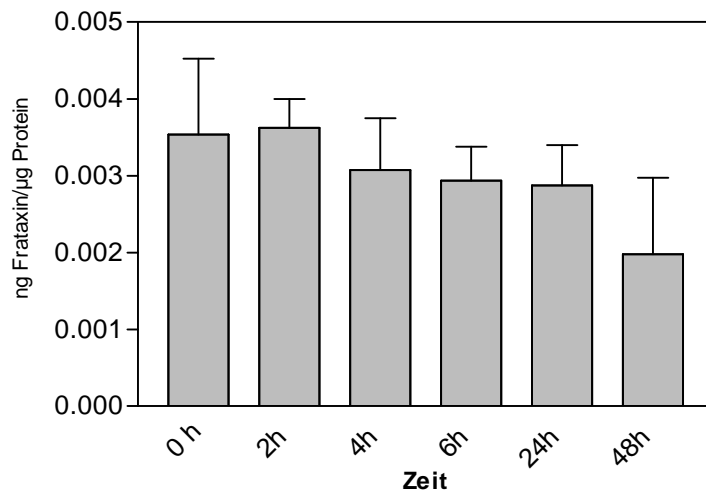


Abbildung 14: Einfluss von α -MEM Komplettmedium mit 10% Serum auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

P19 Zellen -neuronaler Typ- wurden 2, 4, 6, 24 und 48h mit verschiedenen Medien inkubiert. Danach wurde die Frataxinexpression mittels ECLIA (wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben) gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Abbildung 13 zeigt, dass P19 Zellen – neuronaler Typ-, die mit 5%-igem α -MEM Medium inkubiert wurden, eine stabile Frataxinexpression über alle Messzeitpunkte aufweisen, während bei den anderen Medien Schwankungen über die verschiedenen Messzeitpunkte auftreten (Abb. 11, 12, 14). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Inkubationsversuche mit Antioxidantien mit 5% α -MEM Medium durchgeführt.

4.1.2 Der Einfluss von RPMI Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

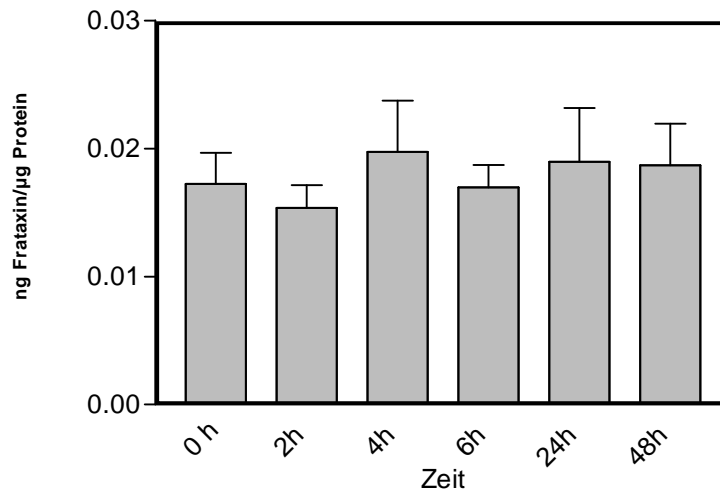


Abbildung 15: Einfluss von RPMI- Nullmedium auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

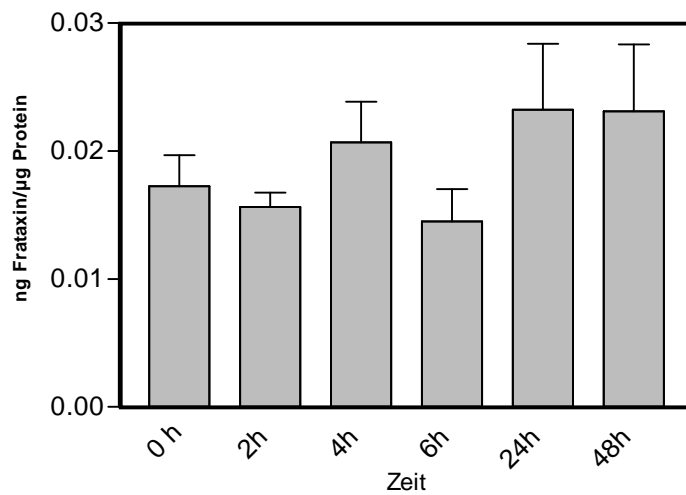


Abbildung 16: Einfluss von RPMI-Medium mit 1%igem BSA Zusatz auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

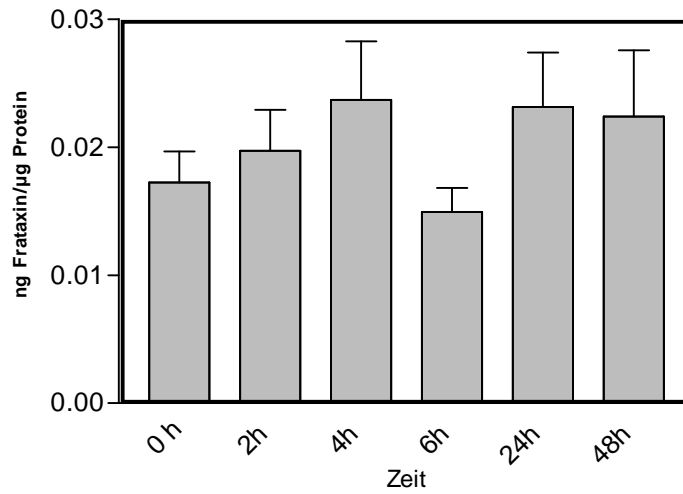


Abbildung 17: Einfluss von RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

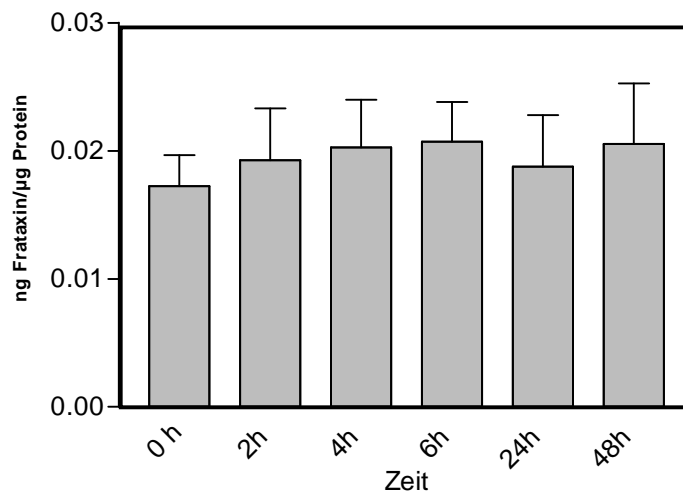


Abbildung 18: Einfluss von RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktiviertem Serum auf die Frataxinexpression in K562 Zellen

K562 Zellen wurden 2, 4, 6, 24 und 48h mit den verschiedenen RPMI Medien inkubiert und die Frataxinexpression wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Die K562 Zellen wurden unter denselben Bedingungen wie P19 Zellen inkubiert, um zu vergleichen, ob Einflüsse der Kultivierungsmedien zelllinienspezifisch sind. Wie bei den P19 Versuchen schwanken die Messwerte bei der Inkubation mit dem RPMI-Nullmedium (Abb. 15) und BSA-Medium (Abb.16), während die Werte bei der Inkubation mit den Komplettmedien (Abb. 16 und 17) stabiler sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Inkubationsversuche mit Antioxidantien mit RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktivierten Serum durchgeführt.

4.1.3 Einfluss der Inkubation mit Zellkulturmedien auf die Zellschädigung von P19 und K562 Zellen

Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob Zellkulturmedien an sich einen Einfluss auf das Zellwachstum und Zellschädigung in verschiedenen Zelltypen haben. Die Überstände der mit verschiedenen Medien inkubierten Zellen wurden gesammelt und eine mögliche Zellschädigung wurde über Messung der LDH (Laktatdehydrogenase) Aktivität im Medium untersucht.

4.1.3.1 Der Einfluss von α -MEM-Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Zellschädigung von P19 Zellen

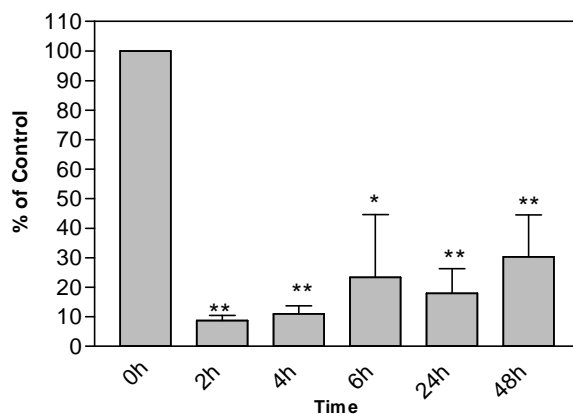


Abbildung 19: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α -MEM-Nullmedium

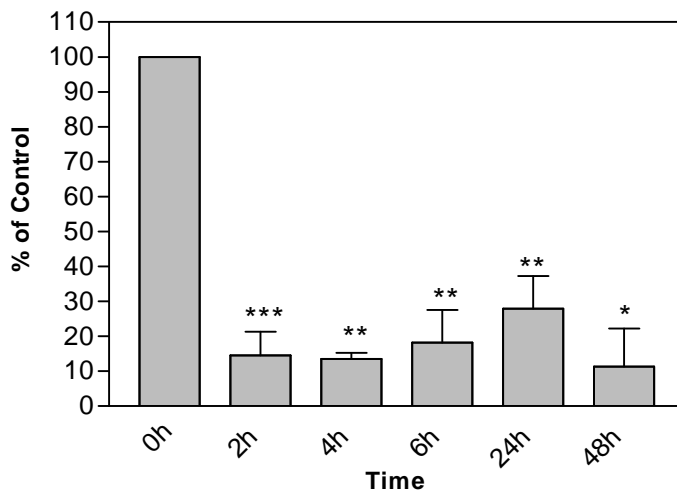


Abbildung 20: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α -MEM-BSA-Medium

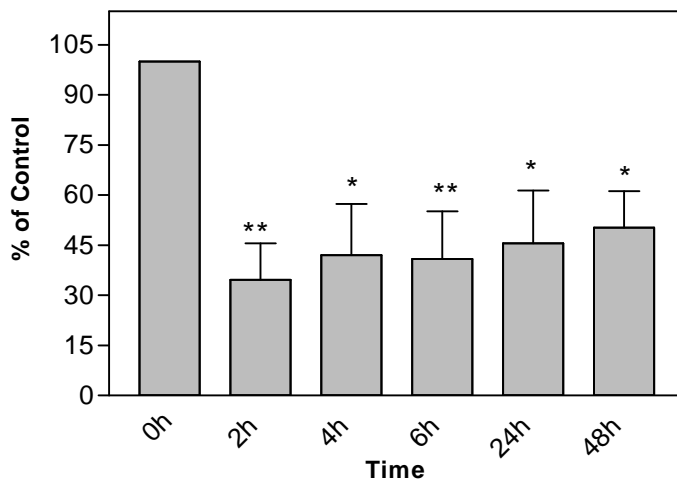


Abbildung 21: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler typ- nach Inkubation mit 5%igem α -MEM-Medium

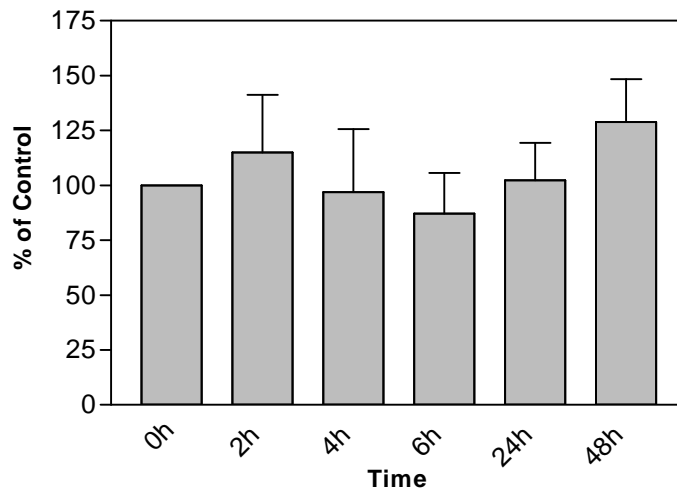


Abbildung 22: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit 10%igem α -MEM-Medium

P19 Zellen –neuronaler typ- wurden 2, 4, 6, 24 und 48h mit den verschiedenen Kulturmedien inkubiert. Die Medienüberstände wurden abgenommen, gesammelt und wie in Kapitel 3.4.2 gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Die Abbildungen 19, 20 und 21 zeigen eine signifikante Abnahme der LDH-Konzentration bei den Inkubationsmedien, die beim α -MEM-BSA-Medium am stärksten ist. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass das 10%ige α -MEM-Medium über die ersten drei Messzeitpunkte eine Abnahme der LDH-Konzentration im Medium bewirkt, wobei die LDH-Konzentration des ersten Inkubationszeitpunktes (2h) noch leicht über dem Wert der Kontrolle (0h) liegt. Nach 24 und 48h Inkubation nimmt auch die LDH-Konzentration im Medium wieder zu, nach 48h liegt sie dann wieder über der Kontrolle (0h).

Beim α -MEM-Nullmedium (Abb. 19), α -MEM-BSA-Medium (Abb. 20) und α -MEM Kompletmedium mit 5% Serum (Abb.21) konnte bei allen Messzeitpunkten ein

signifikanter Abfall der LDH-Konzentration in den entsprechenden Medien beobachtet werden.

4.1.3.2 Der Einfluss von RPMI-Medien mit verschiedenen Zusätzen auf die Zellschädigung von K562 Zellen

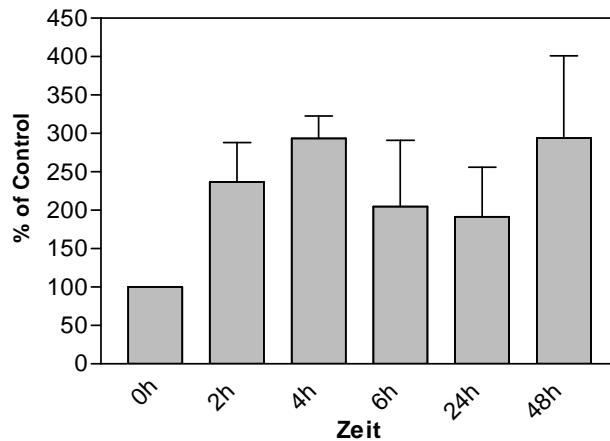


Abbildung 23: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Nullmedium

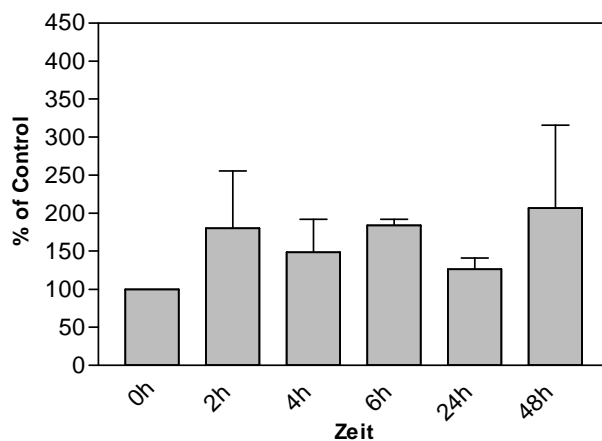


Abbildung 24: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 1%igem BSA Zusatz

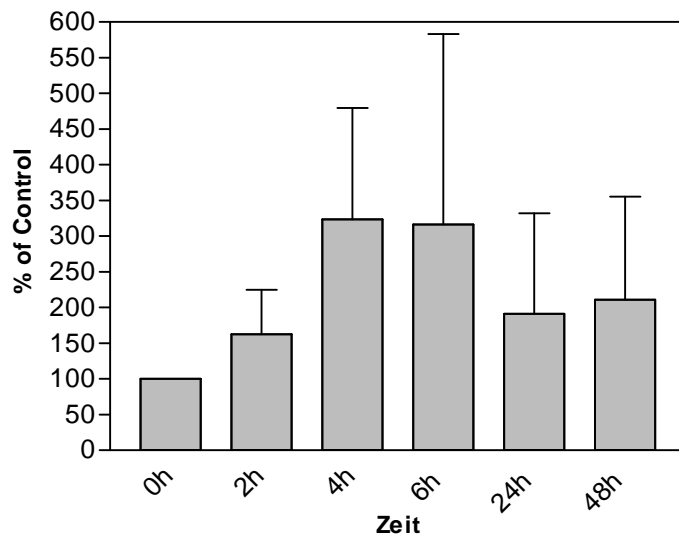


Abbildung 25: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Serum

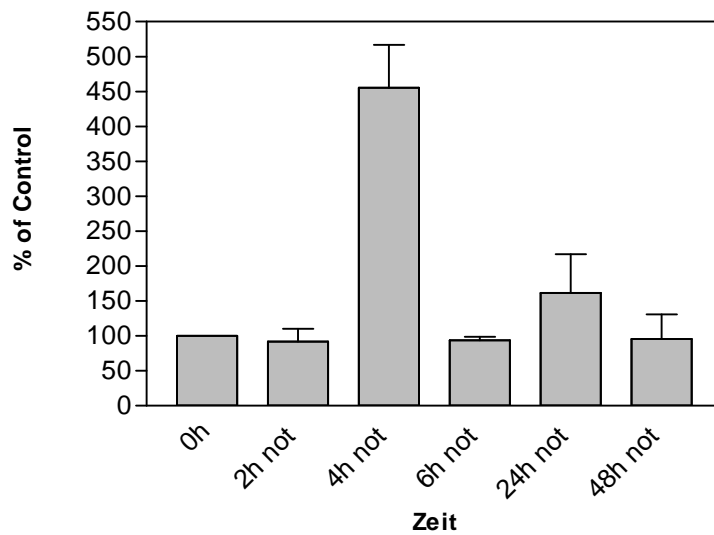


Abbildung 26: Messung der LDH-Konzentration im Medium von K562 Zellen nach Inkubation mit RPMI-Medium mit 10% nicht hitzeinaktiviertem Serum

K562 Zellen wurden 2, 4, 6, 24 und 48h mit den verschiedenen Kulturmedien inkubiert. Die Medienüberstände wurden abgenommen, gesammelt und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Messungen, die im Doppelsatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Die Abbildungen 23 – 26 zeigen, dass in allen Fällen das Inkubationsmedium eine höhere Zellschädigung nach sich zieht als die unbehandelten Kontrollen (0h), wobei die Inkubationen mit dem RPMI-Nullmedium (Abb. 23) und dem RPMI-BSA-Medium (Abb. 24) relativ gleichförmige Werte über die verschiedenen Inkubationszeitpunkte aufweisen. Abbildung 25 hingegen zeigt einen Anstieg über die ersten drei Inkubationszeitpunkte (2, 4 und 6h), danach (24 und 48h) fällt die Zellschädigungsrate wieder ab. Abbildung 26 wiederum zeigt über alle Inkubationszeitpunkte fast gleiche Werte.

4.2 Der Einfluss von Antioxidantien auf die Frataxinexpression und Zellschädigung in verschiedenen Zellmodellen

In dieser Arbeit wurden mögliche Effekte von verschiedenen Antioxidantien als aussichtsvoller Therapiezusatz bei der Behandlung von FRDA untersucht. Eine verbreitete Hypothese besagt, dass FRDA auch auf eiseninduziertem oxidativem Stress beruht [SEZNEC et al., 2004]. Das pathophysiologische Modell von FRDA Patienten, basierend auf Human- und Hefestudien, weist unter anderem auf Antioxidantien-Gabe als möglichen therapeutischen Ansatz hin. Antioxidantien könnten ein viel versprechender Ansatz sein, um das Fortschreiten der Krankheit zu verlangsamen [LODI et al., 2006].

Für meine Versuchsreihen wurden differenzierte P19 Zellen als neuronales Modell, sowie K562 Zellen verwendet. Mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit P19 und K562 Zellen wurden dann die Wirkung der Antioxidantien auf T-Rex 293 Zellen als Modell mit induzierbarem Frataxinmangel untersucht. Dabei wurden die Zellen mit jenen Antioxidantien mit der besten Wirkung in entsprechenden Konzentrationen inkubiert und untersucht, welche Dosis-Wirkungs-Beziehung sie haben.

Die P19 und K562 Zellen wurden mit vier verschiedenen Antioxidantien inkubiert: α -Tocopherol Succinat, Kaffeesäure, Curcumin und Resveratrol, um anschließend die Frataxinexpression und die LDH Freisetzung ins Medium als Marker für Zellschädigung zu untersuchen.

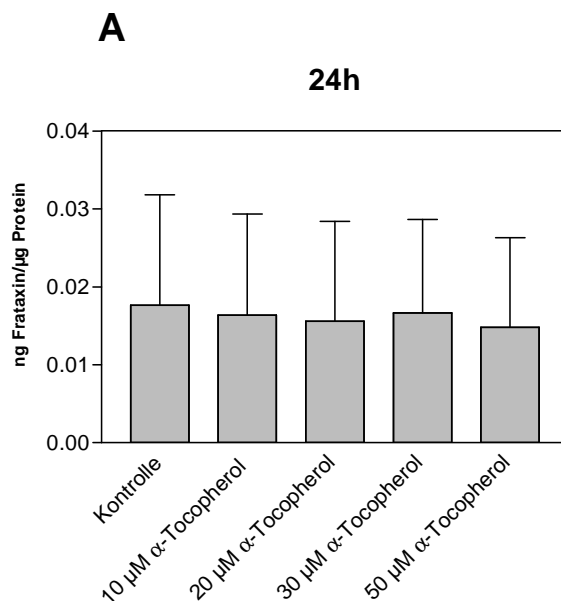
4.2.1 α -Tocopherol Succinat

α -Tocopherol ist eines der acht Isoformen von Vitamin E und ein natürlich vorkommendes Antioxidans, das vor allem als freier Radikalfänger wirkt [SHIBATA and TOMITA, 2004].

α -Tocopherol ist die biologisch aktivste Form von Vitamin E, dass durch seine Radikalfängerfunktion wichtige biologische Strukturen vor oxidativem Stress schützen kann [SUCHANKOVA et al., 2006].

Bei α -Tocopherol Succinat handelt es sich um einen Ester des Vitamin E, der sogar biologisch wirksamer ist als α -Tocopherol [PRASAD et al., 2003]

4.2.1.1 Einfluss der Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ



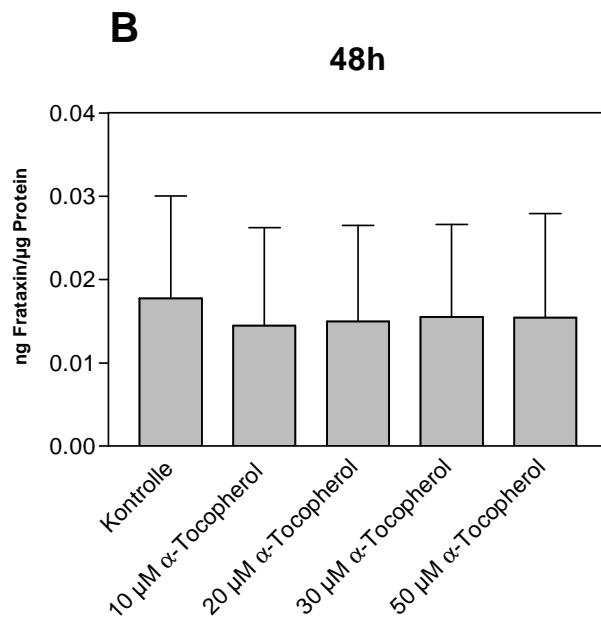


Abbildung 27: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Frataxinexpression von P19 Zellen - neuronaler Typ

P19 Zellen - neuronaler Typ wurden für 24h (A) und 48h (B) mit verschiedenen Konzentrationen von α -Tocopherol Succinat inkubiert (siehe Kapitel 3.3.2). Die Frataxinkonzentration wurde mittels ECLIA wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, hatte α -Tocopherol Succinat keinen Einfluss auf die Frataxinexpression in P19 Zellen - neuronaler Typ.

4.2.1.2 Zellschädigung nach Inkubation mit α -Tocopherol Succinat

Es wurde nicht nur die Frataxinmenge in den Zellen bestimmt, sondern auch die Zellschädigung mittels LDH Messung ermittelt.

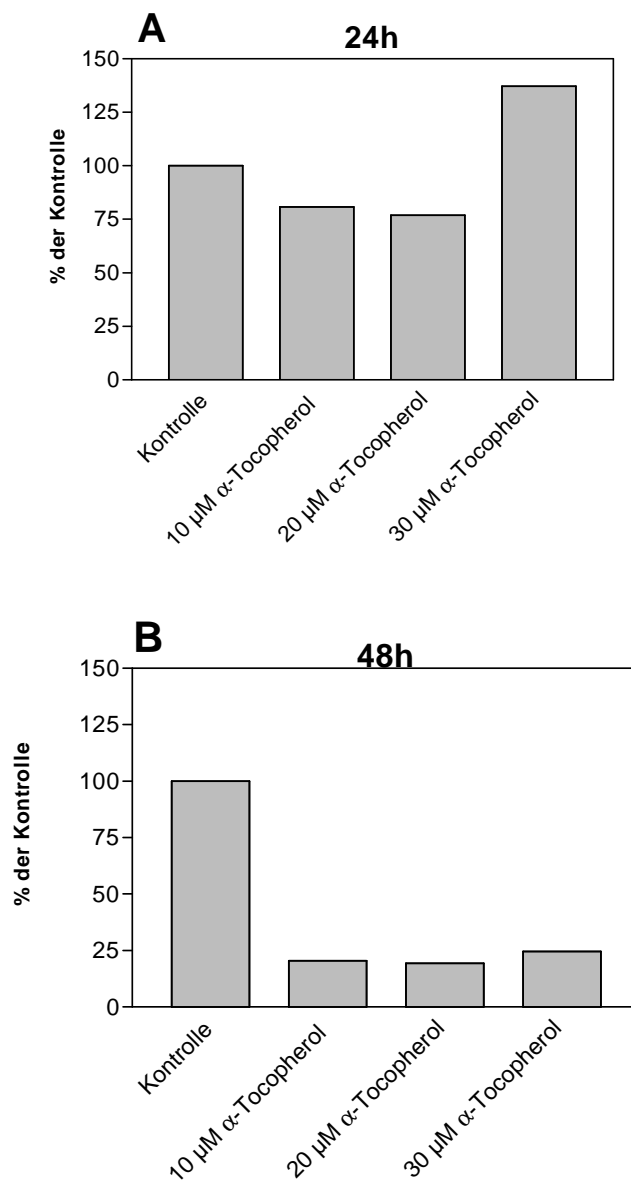


Abbildung 28: Messung der LDH-Konzentration im Medium der P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit α -Tocopherol Succinat

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben mit α -Tocopherol Succinat (10, 20, 30 und 50 μ M) inkubiert und nach 24h (A) und 48h (B) wurde die Menge an LDH im Medium gemessen. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

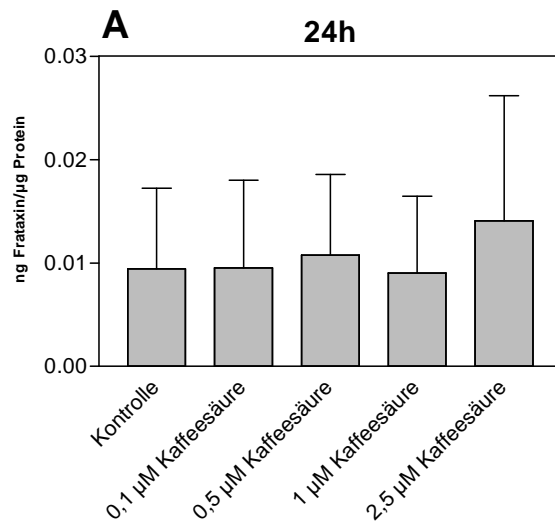
Abbildung 28 A zeigt, dass die Inkubation mit α -Tocopherol Succinat über 24h eine Abnahme der LDH-Konzentration im Medium bewirkt, mit Ausnahme der Konzentration von 30 μ M.

Abbildung 28 B zeigt einen starken Rückgang der LDH-Konzentration im Medium nach 48-stündiger Inkubationszeit.

4.2.2 Kaffeesäure

Kaffeesäure ist eine phenolische Verbindung, die in vielen Früchten und vor allem in Kaffee in hoher Konzentration vorkommt. Sie hat pharmakologische Wirkung in Bezug auf antioxidative, antikanzerogene und antimutagene Eigenschaften [JUNG et al., 2006].

4.2.2.1 Einfluss der Inkubation mit Kaffeesäure auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ



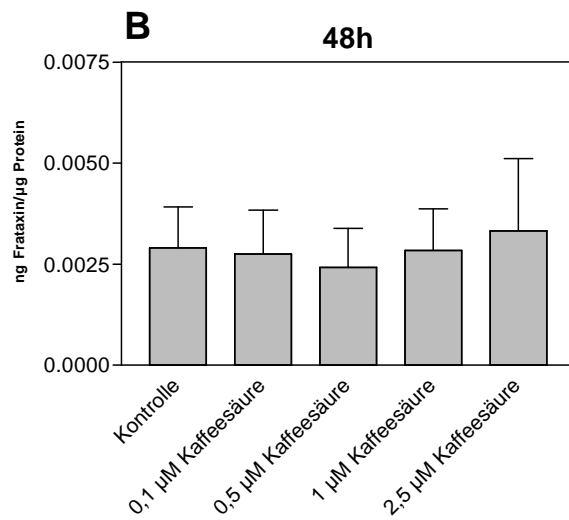


Abbildung 29: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Kaffeesäure auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden 24h (A) und 48h (B) mit Kaffeesäure (0,1; 0,5; 1; 2,5 µM) inkubiert und die Frataxinexpression wurde gemessen (siehe Kapitel 3.3.1). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Wie in Abbildung 29 ersichtlich, hatte weder die 24- noch die 48- stündige Inkubation mit Kaffeesäure eine Wirkung auf die Frataxinexpression.

4.2.2.2 Zellschädigung nach Inkubation mit Kaffeesäure

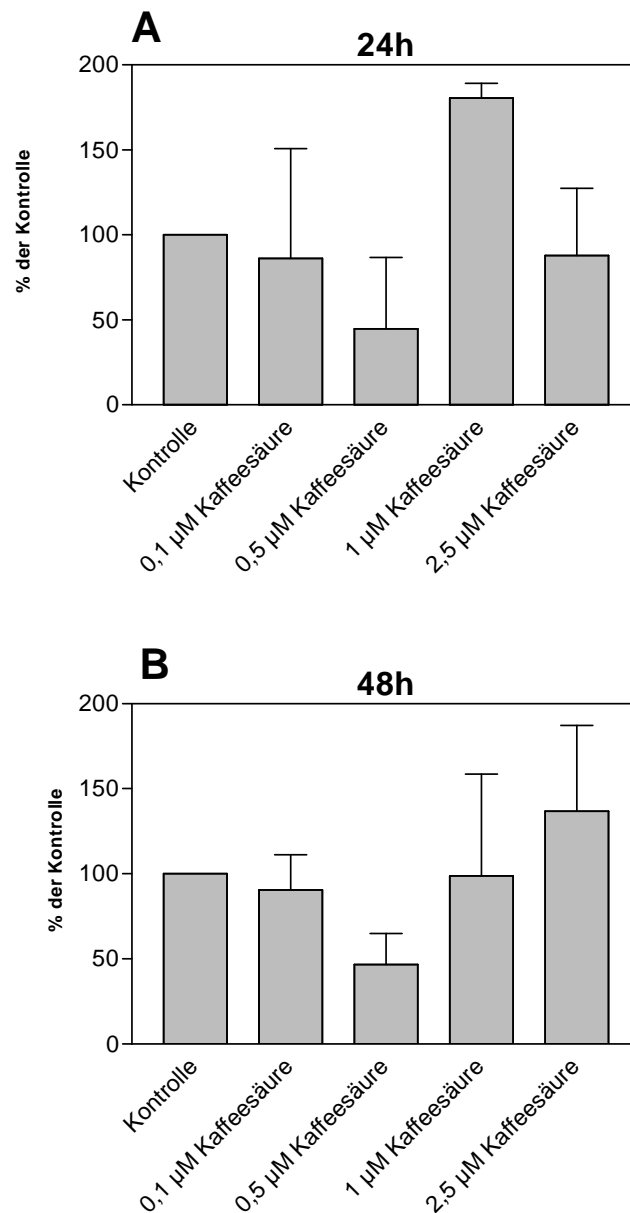


Abbildung 30: Messung der LDH - Menge im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Kaffeesäure

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden 24h (A) und 48h (B) mit Kaffeesäure (0,1; 0,5; 1; 2,5 μM) inkubiert. Anschließend wurde die Zellschädigung durch Messung der LDH Konzentration im Medium ermittelt (siehe Kapitel 3.3.2). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

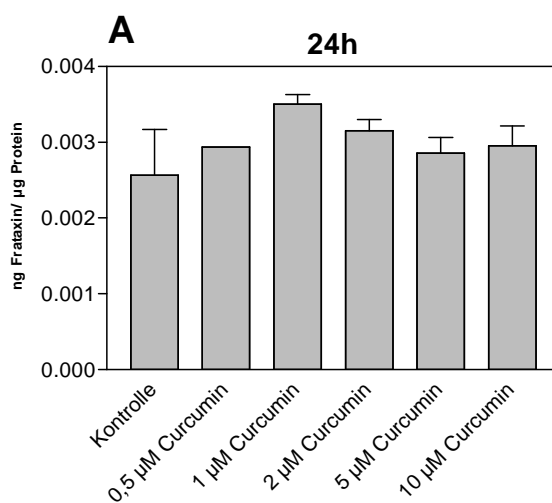
Wie man in Abbildung 30 erkennen kann, schwanken die Messergebnisse über die verschiedenen Messzeitpunkte. Bei beiden Inkubationszeiten führen die niedrigeren Konzentrationen an Kaffeesäure zu einer Abnahme der LDH Konzentration im Medium, während die beiden höheren Konzentrationen wieder eine Zunahme der LDH Konzentration zur Folge haben.

Dies deutet darauf hin, dass höhere Konzentrationen an Kaffeesäure die Zellen schädigen, während niedrigere Konzentrationen die Zellen schützen.

4.2.3 Curcumin

Das Polyphenol Curcumin ist ein gelbes Gewürz, das von der Pflanze *Curcuma longa* stammt. Es wird benutzt, um verschiedene Krankheiten zu behandeln, da es unter anderem bekannt ist für seine antioxidativen, antikanzerogenen und anti-inflammatorischen Eigenschaften. Curcumin hat viele Wirkungen, vor allem seine antioxidativen Funktionen sind zu betonen, da es ein wichtiger freier Radikalfänger ist. [JIAO et al., 2008].

4.2.3.1 Einfluss der Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ



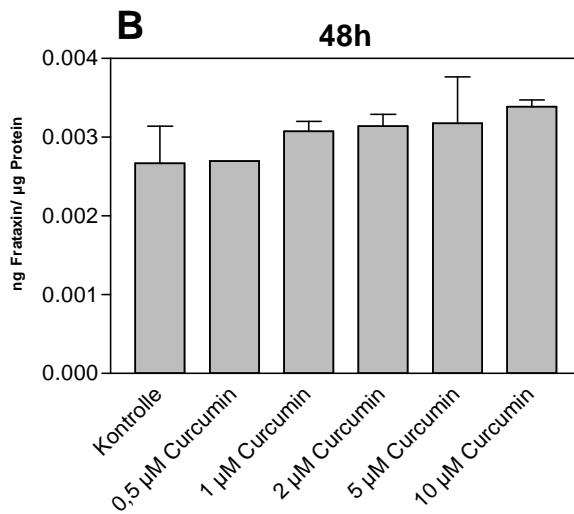


Abbildung 31: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

P19 Zellen - neuronaler Typ- wurden 24 und 48h mit Curcumin (0,5; 1; 2,5 und 10 µM) inkubiert. Anschließend wurde die Frataxinexpression gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Abbildung 31 A zeigt den leichten Anstieg der Frataxinexpression nach einer 24-stündigen Inkubation mit Curcumin. Die Konzentrationen 1 und 2 µM erreichen den höchsten Anstieg an Frataxin.

In Abbildung 31 B ist zu erkennen, dass nach 48h Curcumin-Inkubation auch eine höhere Frataxinexpression gemessen wurde und der Anstieg der Frataxinmenge konzentrationsabhängig zunahm.

Die Zunahme der Frataxinkonzentrationen war bei beidem Messzeitpunkten nicht signifikant.

4.2.3.2 Einfluss der Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

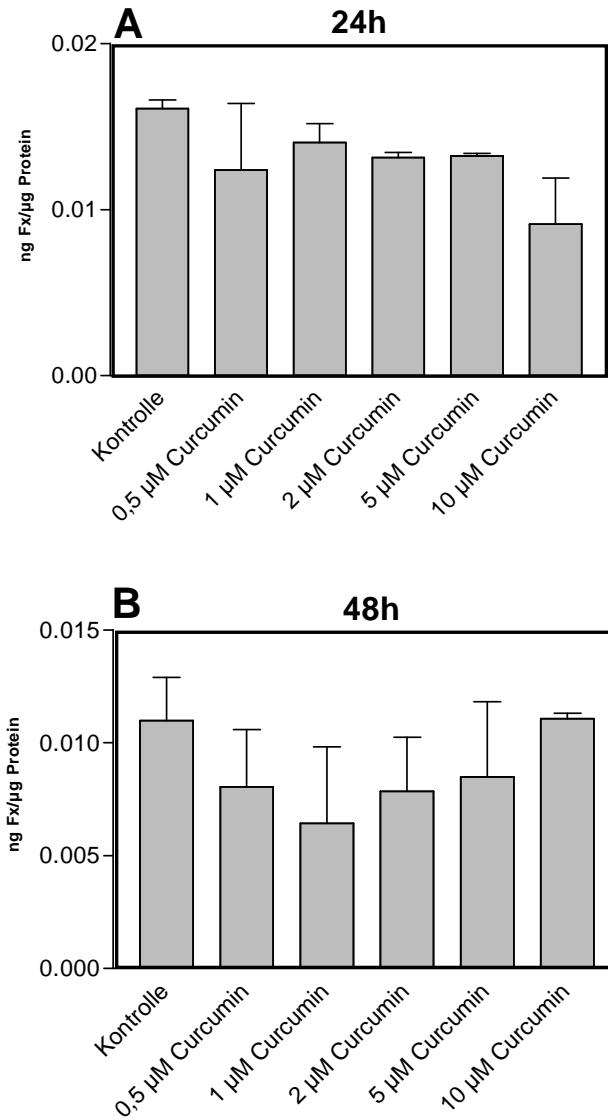


Abbildung 32: Einfluss der 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit Curcumin auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

K562 Zellen wurden 24h (A) und 48h (B) mit Curcumin (0,5; 1; 2,5 und 10 µM) inkubiert. Anschließend wurde die Frataxinexpression gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Abbildung 32 zeigt, dass die Inkubation mit Curcumin zu keiner Erhöhung der Frataxinkonzentration in K562 Zellen führte.

4.2.3.3 Zellschädigung nach Inkubation mit Curcumin

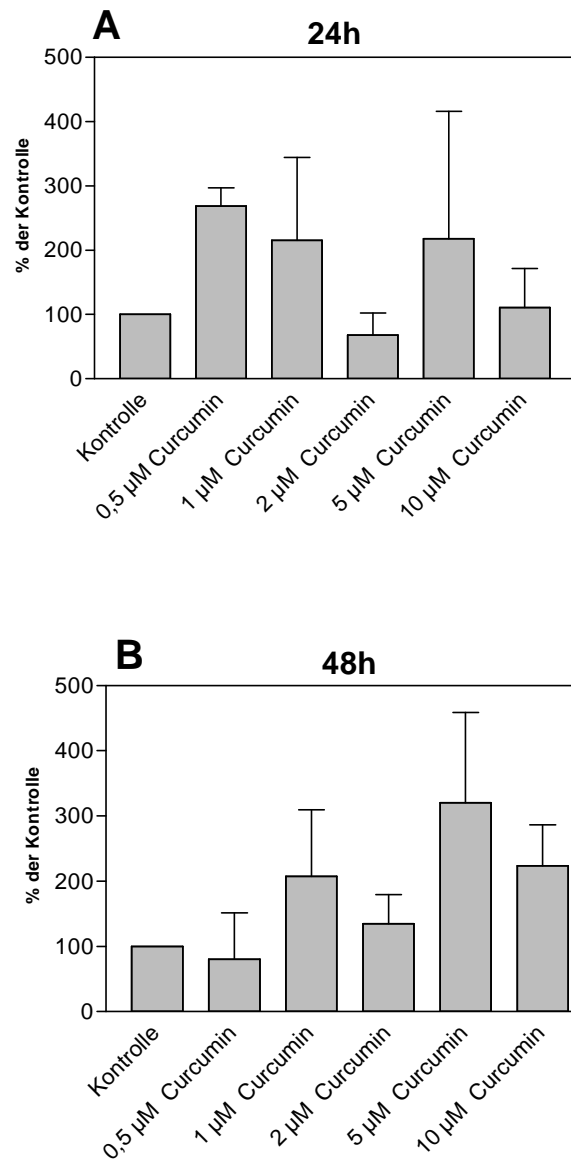


Abbildung 33: Messung der LDH Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Curcumin

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben 24h (A) und 48h (B) mit verschiedenen Konzentrationen von Curcumin inkubiert und die Zellschädigung wurde mittels LDH Messung im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 33 zeigt die Zellschädigung anhand der im Medium gemessenen LDH Konzentration nach der Inkubation mit Curcumin.

In Abbildung 33 A ist zu erkennen, dass die LDH Konzentration im Medium durch verschiedene Konzentrationen von Curcumin sehr schwanken. Trotz dreimaligen Messens ist es schwierig, dieses Ergebnis zu interpretieren.

4.2.4 Resveratrol

Resveratrol ist ein natürlich vorkommendes Phytoalexin und Phytoöstrogen, welches in mehreren Pflanzenfamilien vorkommt und verschiedene biologische und pharmakologische Aktivitäten hat [KIM et al., 2002].

Resveratrol ist ein Polyphenol, das vorwiegend in der Haut von roten Trauben gefunden wird. Es hat vor allem bei kardiovaskulären Erkrankungen und bei Krebs schützende Effekte, die wahrscheinlich auf seinen antioxidativen Eigenschaften beruhen [EYBL et al., 2006].

4.2.4.1 Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von P19 Zellen – neuronaler Typ

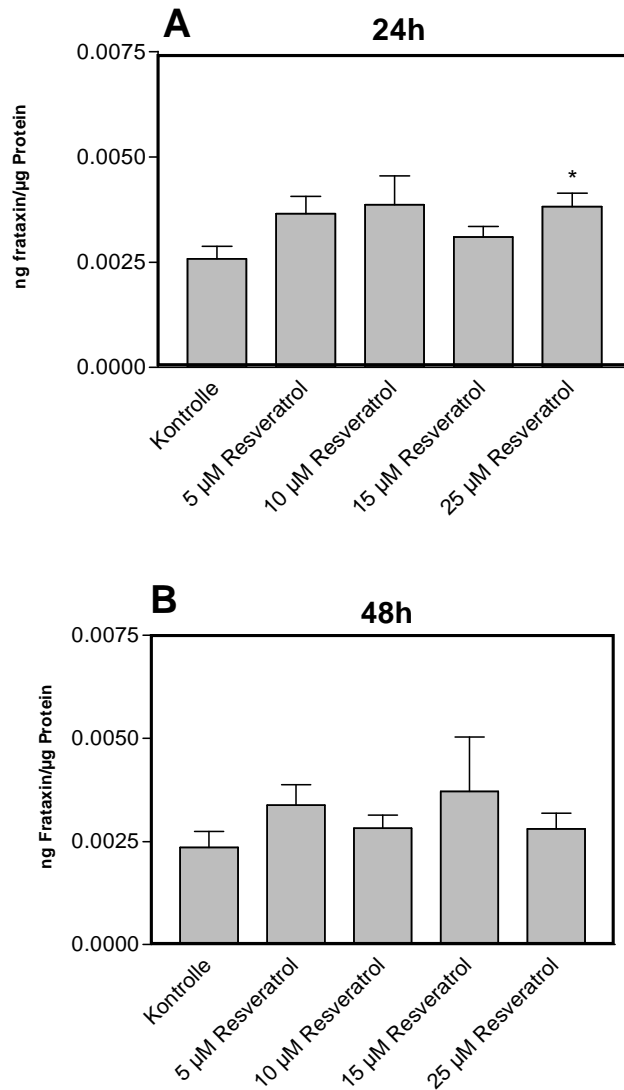


Abbildung 34: Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinkonzentration von P19 Zellen – neuronaler Typ

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden 24h (A) und 48h (B) mit Resveratrol (5, 10, 15 und 25 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die Frataxinexpression mittels ECLIA gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Abbildung 34 A zeigt einen Anstieg der Frataxinexpression nach 24-stündiger Inkubation mit Resveratrol. Bei der Konzentration von 25 μM gibt es einen signifikanten Anstieg der Frataxinexpression.

Aus der Abbildung 34 B geht hervor, dass es nach 48-stündiger Inkubation einen nicht signifikanten Anstieg der Frataxinexpression gab.

4.2.4.2 Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

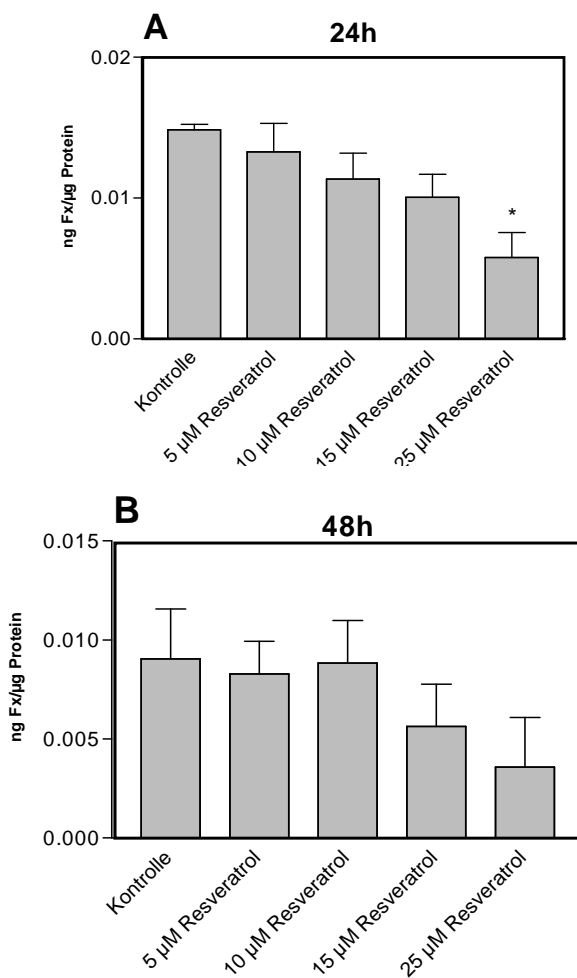
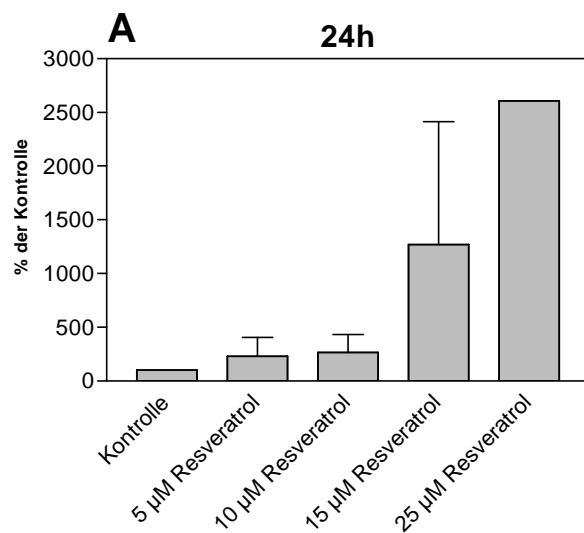


Abbildung 35: Einfluss der Inkubation mit Resveratrol auf die Frataxinexpression von K562 Zellen

K562 Zellen wurden 24h (A) und 48h (B) mit Resveratrol (5, 10, 15 und 25 μM) inkubiert. Anschließend wurde die Frataxinexpression mittels ECLIA gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt.

Wie man in Abbildung 35 sehen kann, gab es bei der Inkubation von K562 Zellen mit Resveratrol eine Abnahme der Frataxinexpression bei beiden Messzeitpunkten. In Abbildung 35 A zeigt die höchste Konzentration an Resveratrol (25 μM) nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Abnahme der Frataxinexpression.

4.2.4.3 Zellschädigung nach Inkubation mit Resveratrol



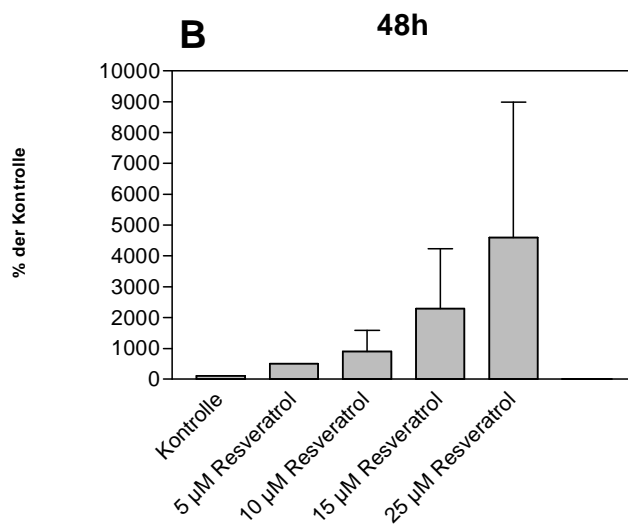


Abbildung 36: Messung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen – neuronaler Typ- nach Inkubation mit Resveratrol

P19 Zellen – neuronaler Typ- wurden 24h (A) und 48h (B) mit Resveratrol (5, 10, 15 und 25 µM) inkubiert und die Zellschädigung wurde über Messung der LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 36 zeigt den Anstieg der LDH-Konzentration ins Medium der inkubierten P19 Zellen – neuronaler Typ-, wobei der LDH Anstieg bei beiden Messzeitpunkten konzentrationsabhängig ansteigt.

4.2.5 Zusammenfassung

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass von den vier Antioxidantien nur zwei Wirkungen gezeigt haben. Nur bei der Inkubation mit Curcumin und Resveratrol gab es einen Anstieg der Frataxinexpression bei den P19 Zellen – neuronaler Typ (Abb. 31 und 33). Während bei Curcumin die niedrigeren Konzentrationen eine höhere Wirkung erzielt haben, waren es bei Resveratrol die höchsten Konzentrationen.

Beide Antioxidantien hatten eine Erhöhung der LDH-Konzentration im Medium von P19 Zellen- neuronaler Typ- zur Folge (Abb. 34 und 36), obwohl diese bei der Inkubation mit Resveratrol viel ausgeprägter und konzentrationsabhängig war. Dies deutet darauf hin, dass sie keinen positiven Einfluss auf die Zellschädigung haben, obwohl sie die Frataxinmenge leicht erhöhen.

Die Inkubation mit den Antioxidantien zeigte bei den K562 Zellen keinen erhöhenden Einfluss auf die Frataxinexpression, bei der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol (25 μ M) kam es sogar zu einem signifikanten Abfall der Frataxinexpression (Abb. 35).

4.3 Einfluss von Antioxidantien auf T-Rex 293 Zellen

Die Versuche mit T-Rex 293 Zellen stellen direkt einen Bezug zwischen der Wirkung der Antioxidantien und ihrem möglichen Einfluss auf das Zellmodell von FRDA dar. T-Rex 293 Zellen wurden so manipuliert, dass sie einen induzierbaren Frataxinmangel aufweisen, der auch bei FRDA Patienten auftritt. Dadurch kann ein direkter Bezug zwischen der Wirkung der Antioxidantien und dem bei FRDA auftretenden Frataxinmangel hergestellt werden. Vor allem ihr Einfluss auf erhöhten oxidativen Stress ist von Bedeutung, da dieser auch bei FRDA Patienten auftritt. Dazu wurde in den T-Rex 293 Zellen oxidativer Stress durch Zusatz von Wasserstoffperoxid induziert.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass sich die Induktion von oxidativem Stress scheinbar günstiger auf die Frataxinmangelzellen auswirkte. Möglicherweise kommt es zu einer verringerten Wirkung des Wasserstoffperoxids, da es mit Tetracyclin einen Komplex bilden kann [KACZMAREK et al., 2008].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Antioxidantien auf die Zellschädigung und Zytotoxizität in T-Rex 293 Zellen, bei denen ein Frataxinmangel induziert wurde, untersucht. Folgende T-Rex 293 Zelltypen wurden verwendet:

+Tc	T-Rex 293 Zellen, die einen durch Behandlung mit Tetracyclin induzierten Frataxinmangel aufweisen
-Tc	Unbehandelte T-Rex 293 Kontrollzellen

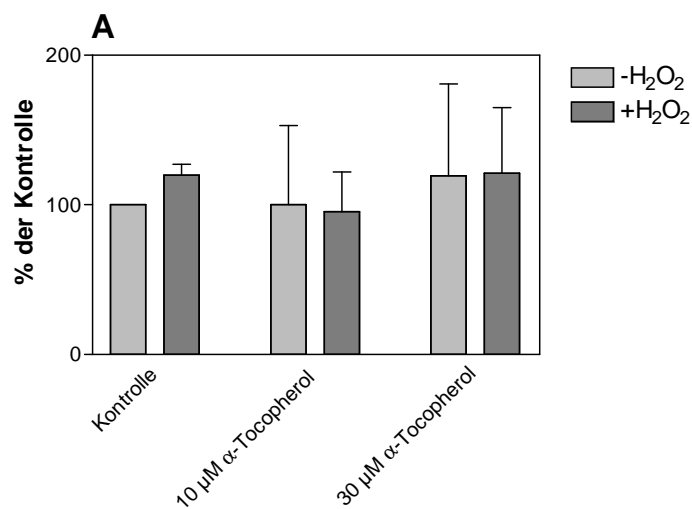
+Tc/+H ₂ O ₂	Mit Tetracyclin behandelte Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
+Tc/-H ₂ O ₂	Mit Tetracyclin behandelte Zellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
-Tc/+H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
-Tc/-H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
8d +Tc/+H ₂ O ₂	8 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
8d +Tc/-H ₂ O ₂	8 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
8d -Tc/+H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
8d -Tc/-H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
14d +Tc /+H ₂ O ₂	14 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
14d +Tc/-H ₂ O ₂	14 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
14d -Tc/+H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
14d -Tc/-H ₂ O ₂ -	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
20d +Tc/+H ₂ O ₂	20 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
20d +Tc/-H ₂ O ₂	20 Tage mit Tetracyclin behandelte Zellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden
20d -Tc/+H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden
20d -Tc/-H ₂ O ₂	Nicht mit Tetracyclin behandelte Kontrollzellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt wurden

Tabelle 4: Verwendete T-Rex 293 Zelltypen

4.3.1 Einfluss von Antioxidantien auf die Zellschädigung nach Auslösung von oxidativem Stress

Zuerst wurden die T-Rex Zellen 24 und 48h mit verschiedenen Konzentrationen aller Antioxidantien inkubiert, dann wurden sie oxidativem Stress durch Zugabe von 0,5 mM Wasserstoffperoxid ausgesetzt, um herauszufinden, ob die Antioxidantien einen möglichen positiven Effekt gegen die oxidative Schädigung bewirken. Zur Kontrolle wurden beide T-Rex 293 Zelltypen (+Tc: mit Tetracyclin behandelt und -Tc: Kontrollzellen) statt mit Wasserstoffperoxid mit normalem DMEM-Medium versetzt, sie wurden also keiner erhöhten oxidativen Schädigung exponiert.

4.3.1.1 Einfluss der 24h Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen



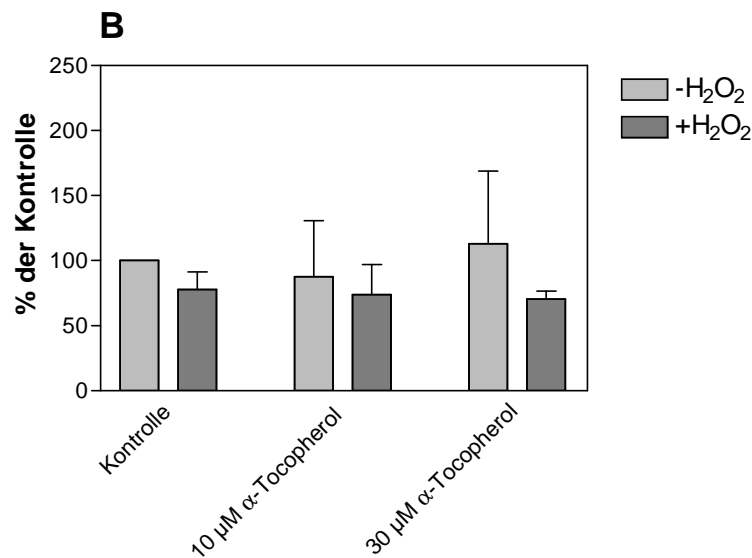


Abbildung 37: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 24h mit 10 und 30 μ M α -Tocopherol Succinat inkubiert, danach 3 Stunden mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder normalem Medium (-H₂O₂) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

In Abbildung 37 A ist die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Zellen zu sehen, die nach der Inkubation mit α -Tocopherol Succinat gemessen wurde. Es gibt kaum einen Unterschied zwischen -Tc/+H₂O₂ und -Tc/-H₂O₂ Zellen.

Dagegen zeigt Abbildung 37 B, dass die +Tc/+H₂O₂ Zellen eine geringere LDH-Konzentration im Medium aufwiesen als die +Tc/-H₂O₂ Zellen.

4.3.1.2 Einfluss der 48h Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen

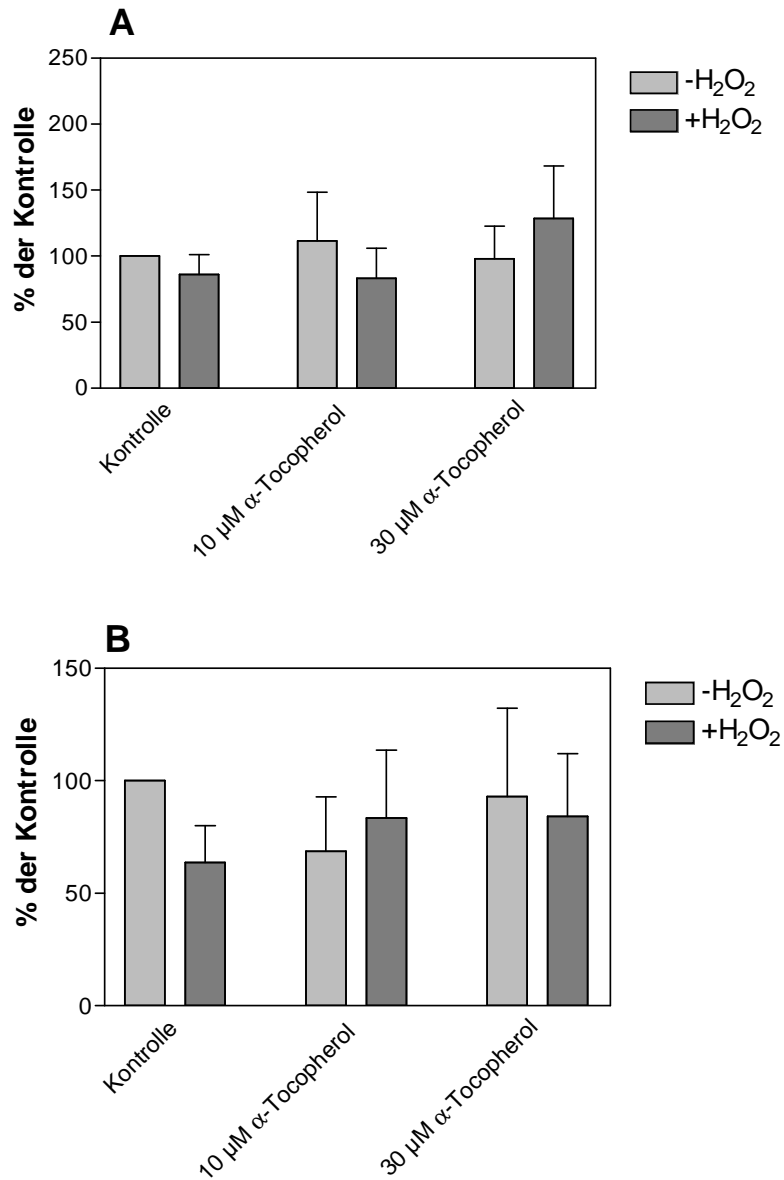


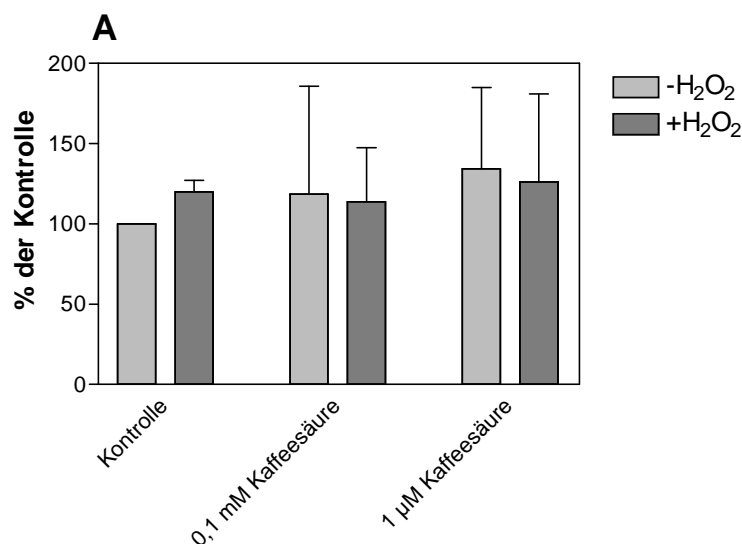
Abbildung 38: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit α -Tocopherol Succinat auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 48h mit 10 und 30 μM α -Tocopherol Succinat inkubiert, danach 3 Stunden mit H_2O_2 (+ H_2O_2) oder normalem Medium (- H_2O_2) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

In Abbildung 38 A ist die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen zu sehen, die nach der Inkubation mit α -Tocopherol Succinat gemessen wurde. Man sieht, dass die -Tc/- H_2O_2 Zellen in etwa gleiche Werte wie die unbehandelte Kontrolle zeigen. Die -Tc/+ H_2O_2 Zellen zeigen eine leicht erniedrigte LDH-Konzentration, ausser bei der Inkubation mit 30 μM α -Tocopherol Succinat.

Abbildung 38 B zeigt, dass die LDH-Konzentration im Medium der mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) ohne und nach Induktion von oxidativem Stress leicht niedrigere Werte zeigt als die unbehandelte Kontrolle.

4.3.1.3 Einfluss der 24h Inkubation mit Kaffeesäure auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen



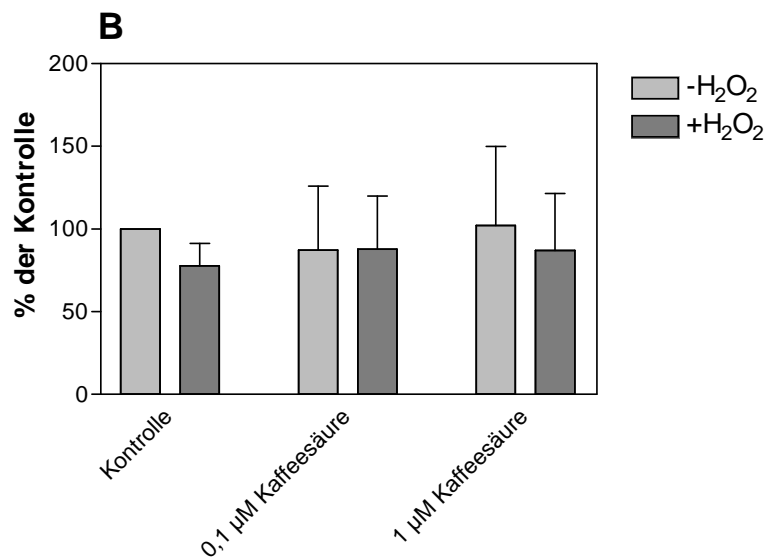


Abbildung 39: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Kaffeesäure auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 24h mit 0,1 und 1 µM Kaffeesäure inkubiert, danach 3 Stunden mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder normalem Medium (-H₂O₂) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 39 A zeigt, dass die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen nach der 24h Inkubation mit Kaffeesäure leicht erhöht war gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

In Abbildung 39 B ist zu sehen, dass die Inkubation mit Kaffeesäure keinen Einfluss auf die LDH-Konzentration im Medium der mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) hat. Es gibt kaum einen Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen der Kaffeesäure. Diejenigen Zellen, die oxidativem Stress (+H₂O₂) ausgesetzt wurden zeigten fast gleiche Werte wie diejenigen, die keinem oxidativem Stress (-H₂O₂) ausgesetzten Zellen.

4.3.1.4 Einfluss der 48h Inkubation mit Kaffeesäure auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen

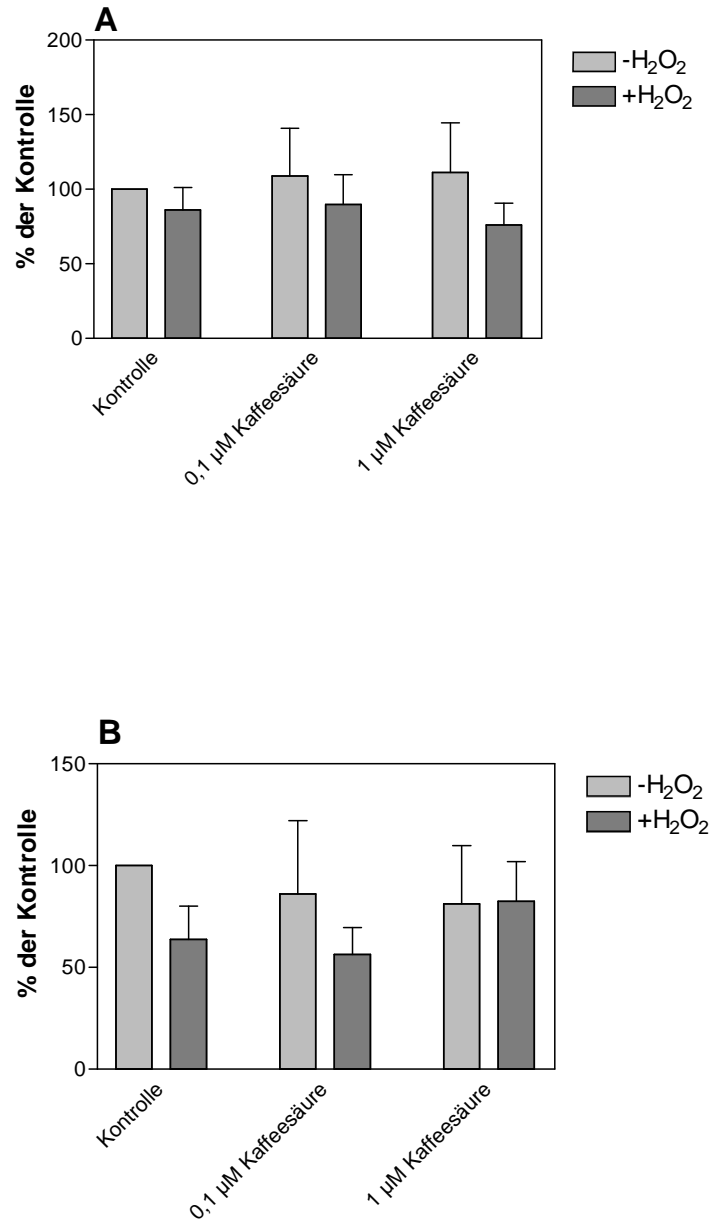


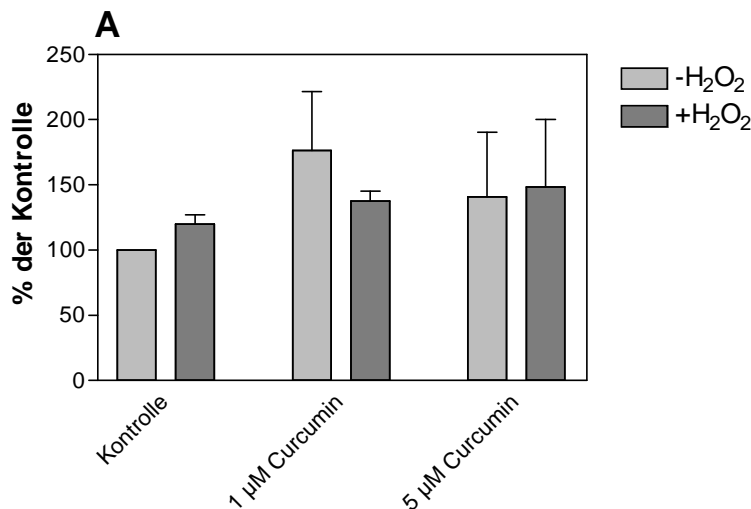
Abbildung 40: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Kaffeesäure auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 48h mit 0,1 und 1 μM Kaffeesäure inkubiert, danach 3 Stunden mit H_2O_2 ($+\text{H}_2\text{O}_2$) oder normalem Medium ($-\text{H}_2\text{O}_2$) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Wie in Abbildung 40 A zu sehen, führt eine 48-stündige Inkubation mit Kaffeesäure bei den $-\text{Tc}/+\text{H}_2\text{O}_2$ Zellen zu geringeren LDH-Konzentrationen im Medium als die Kontrolle. Die $-\text{Tc}/-\text{H}_2\text{O}_2$ Zellen zeigen fast gleiche Werte wie die Kontrolle.

In Abbildung 40 B wird gezeigt, dass die Inkubation mit Kaffeesäure in den mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) nach und ohne zusätzliche Induktion von oxidativem Stress zu geringeren LDH-Konzentrationen im Medium führt als die Kontrolle.

4.3.1.5 Einfluss der 24h Inkubation mit Curcumin auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen



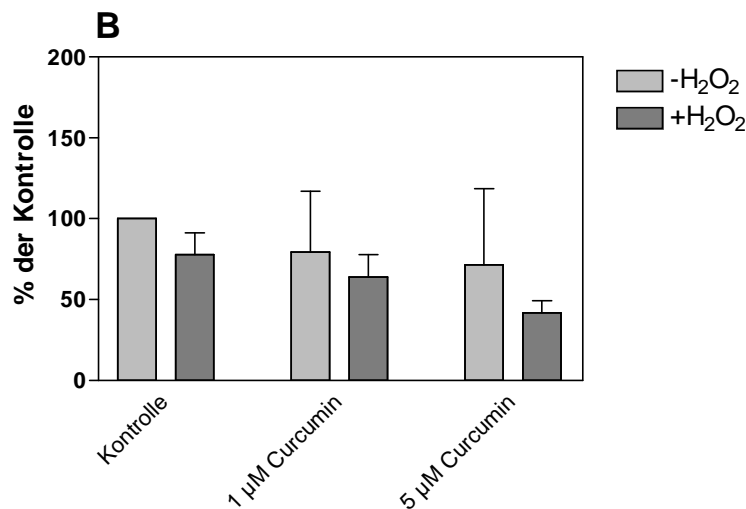


Abbildung 41: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 24h mit 1 und 5 µM Curcumin inkubiert, danach 3 Stunden mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder normalem Medium (-H₂O₂) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

In Abbildung 41 A ist nach der Inkubation mit Curcumin eine Steigerung der LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen zu erkennen, die sowohl nach der Induktion von oxidativem Stress (+H₂O₂), als auch ohne Induktion (-H₂O₂) zu sehen ist. Abbildung 41 B zeigt das Gegenteil: Die Inkubation mit Curcumin führt bei den Zellen mit induziertem Frataxinmangel (+Tc) zu einer Senkung der LDH-Konzentration im Medium. Die Senkung ist bei den +Tc/+H₂O₂ Zellen etwas stärker.

4.3.1.6 Einfluss der 48h Inkubation mit Curcumin auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen

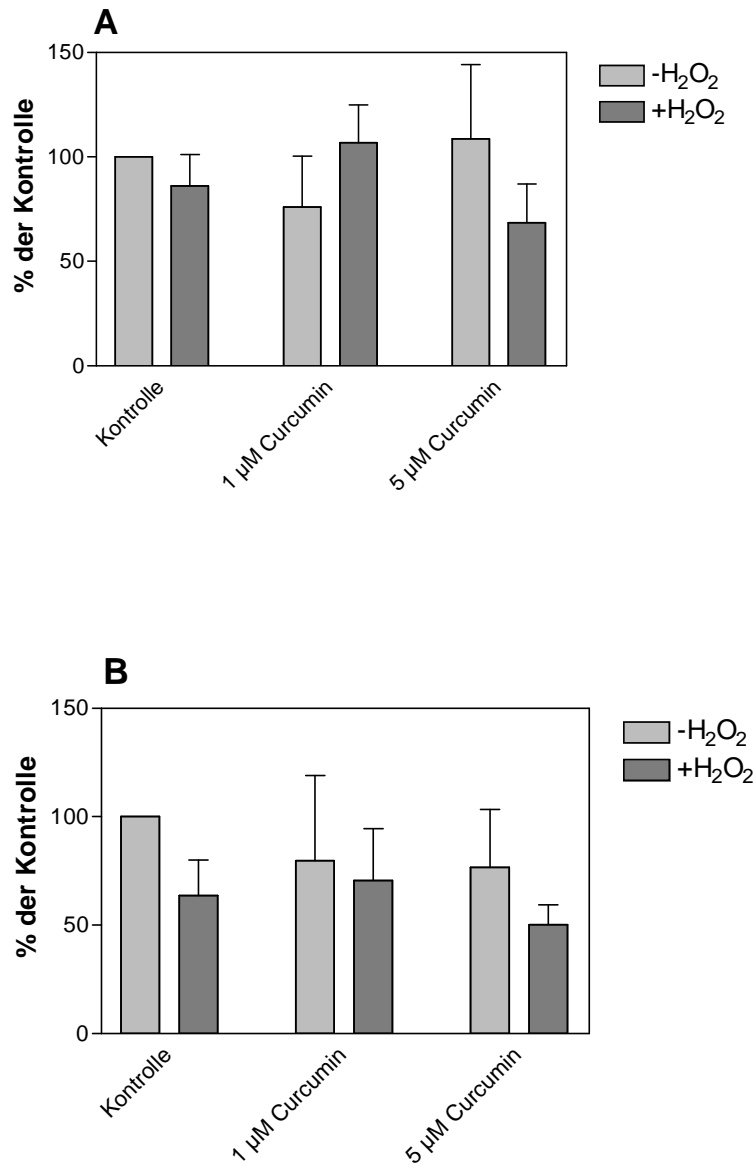


Abbildung 42: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 48h mit 1 und 5 μM Curcumin inkubiert, danach 3 Stunden mit H_2O_2 (+ H_2O_2) oder normalem Medium (- H_2O_2) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 42 A zeigt, dass die LDH-Konzentration im Medium der -Tc/+ H_2O_2 Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation mit Curcumin abnimmt. Die -Tc/- H_2O_2 Zellen zeigen eine Curcumin-konzentrationsabhängige Steigerung der LDH-Konzentration im Medium, die aber nicht über den Wert der unbehandelten Kontrolle hinausgeht. Die niedrigere Konzentration an Curcumin (1 μM) bewirkt anscheinend bei den -Tc/- H_2O_2 Zellen eine Senkung der LDH-Konzentration im Medium, während die höhere Konzentration an Curcumin (5 μM) die Senkung bei den -Tc/+ H_2O_2 Zellen bewirkt.

In Abbildung 42 B ist zu sehen, dass die 48h Inkubation mit Curcumin in beiden Konzentrationen bei den +Tc Frataxinmangelzellen unabhängig davon, ob sie oxidativem Stress ausgesetzt waren, oder nicht, zu einer Senkung der LDH-Konzentration im Medium führte. Die +Tc/+ H_2O_2 Zellen zeigten darüberhinaus eine noch geringere LDH-Konzentration im Medium als die +Tc/- H_2O_2 Zellen. Während die Werte der LDH-Konzentration bei den +Tc/ H_2O_2 Zellen bei beiden Curcumin Konzentrationen etwa gleich sind, zeigen die +Tc/+ H_2O_2 Zellen eine konzentrationsabhängige Senkung der LDH-Konzentration.

4.3.1.7 Einfluss der 24h Inkubation mit Resveratrol auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen

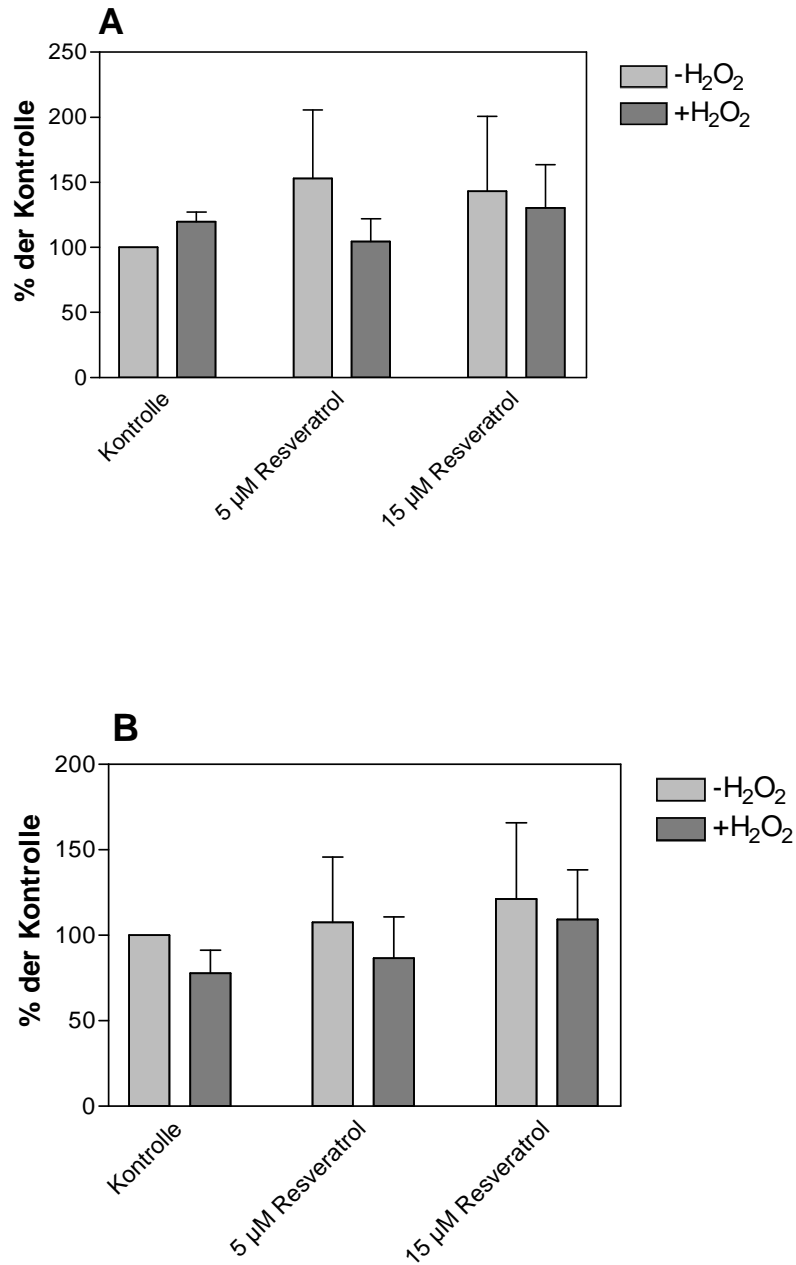
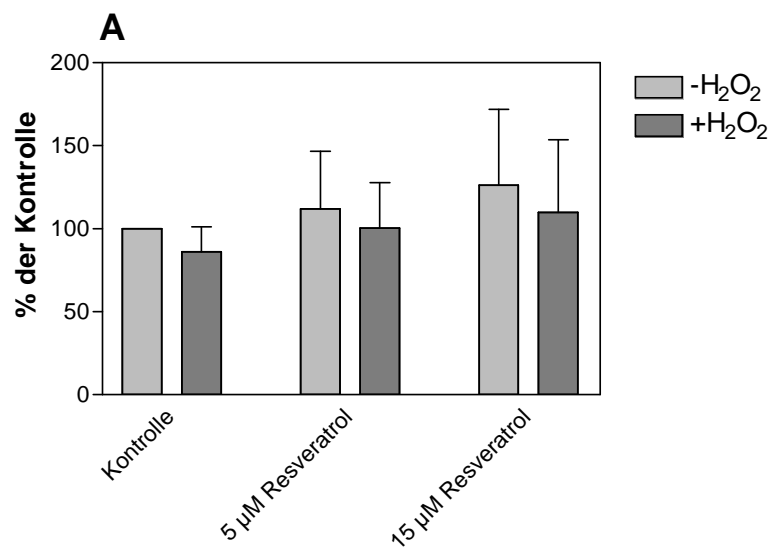


Abbildung 43: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 24h mit 5 und 15 μM Resveratrol inkubiert, danach 3 Stunden mit H_2O_2 ($+\text{H}_2\text{O}_2$) oder normalem Medium ($-\text{H}_2\text{O}_2$) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 43 A und B zeigt, dass die 24h Inkubation mit Resveratrol sowohl bei den -Tc Kontrollzellen, als auch bei den +Tc Frataxinmangelzellen, unabhängig von der Behandlung mit H_2O_2 zu keiner Veränderung der LDH-Konzentrationen im Medium führte wie bei der unbehandelten Kontrolle.

4.3.1.8 Einfluss der 48h Inkubation mit Resveratrol auf die Zellschädigung in T-Rex 293 Zellen



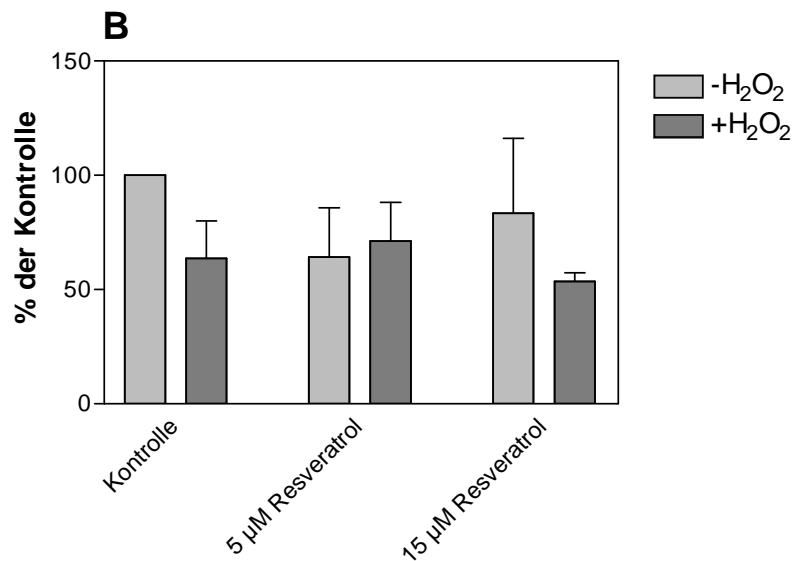


Abbildung 44: Einfluss der 48-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen (A) und in den +Tc Frataxinmangelzellen (B)

T-Rex 293 Zellen (A. -Tc; B: +Tc) wurden 48h mit 5 und 15 µM Resveratrol inkubiert, danach 3 Stunden mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder normalem Medium (-H₂O₂) behandelt. Die Zellschädigung wurde über die LDH-Konzentration im Medium ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus 2 verschiedenen Messungen, die im Doppelansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Abbildung 44 A zeigt, dass die 48h Inkubation mit Resveratrol keinen Einfluss auf die LDH-Konzentration im Medium der -Tc Kontrollzellen hat.

In Abbildung 44 B wird gezeigt, dass die Inkubation mit Resveratrol zu einer Senkung der LDH-Konzentration im Medium der +Tc Frataxinmangelzellen führt. Bei der Konzentration von 15 µM Resveratrol kommt es bei den +Tc/+H₂O₂ Zellen zu einer geringeren LDH-Konzentration als bei den +Tc/-H₂O₂ Zellen.

4.3.1.9 Zusammenfassung

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass alle vier Antioxidantien in beiden Konzentrationen kaum einen Einfluss auf die Zellschädigung bei einem FRDA-Zellmodell haben. Auffallend ist, dass eher die mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) eine verringerte Zellschädigung aufwiesen als die Kontrollzellen (-Tc). Ein möglicher Grund für die höhere Wirksamkeit der Antioxidantien bei +Tc-Zellen und induziertem oxidativem Stress könnte sein, dass Tetracyclin mit H_2O_2 einen Komplex bildet [KACZMAREK et al., 2008]. Möglicherweise ist daher die Wirkung des Wasserstoffperoxids geringer. Die Antioxidantien haben dann einen stärkeren positiven Effekt auf das Ausmaß der Zellschädigung als bei den Kontrollzellen, die nicht mit Tetracyclin behandelt wurden.

4.3.2 Einfluss von Antioxidantien auf die Zytotoxizität nach Induktion von oxidativem Stress

T-Rex 293 Zellen wurden 24h mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen von Curcumin und Resveratrol inkubiert, dann wurden sie mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid behandelt, um herauszufinden, ob die Antioxidantien einen Einfluss auf die Zytotoxizität nach Induktion von oxidativem Stress (+ H_2O_2) haben..

4.3.2.1 H_2O_2 -Konzentrationsreihe

Um die für die Induktion von oxidativem Stress geeignete Konzentration an Wasserstoffperoxid zu ermitteln, wurde eine H_2O_2 Konzentrationsreihe erstellt und mittels MTT-Assay ausgewertet. T-Rex 293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 (2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0,125 mM) versetzt und die Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay gemessen.

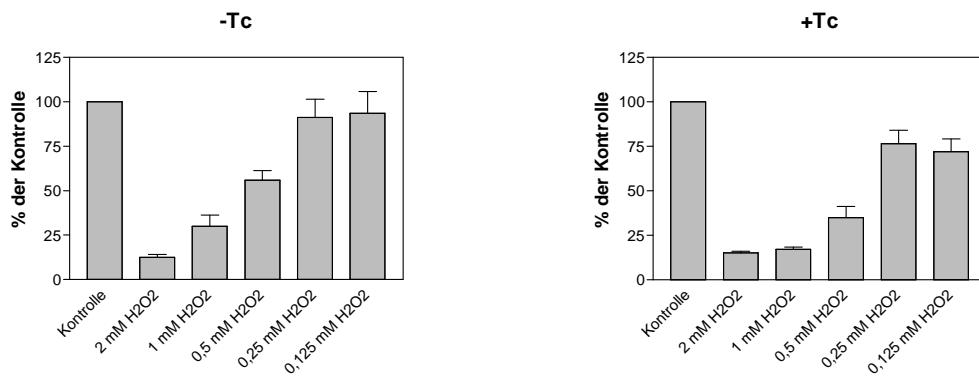


Abbildung 45: Einfluss einer H_2O_2 -Konzentrationsreihe auf die Zytotoxizität von T-Rex 293 Zellen

T-Rex 293 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 (2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0,125 mM) 3h inkubiert, danach wurde die Zellproliferationsrate mittels MTT-Assay gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Messungen, die im 4-fach Ansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Aus Abbildung 45 geht hervor, dass die beiden höchsten Konzentrationen an Wasserstoffperoxid bei beiden T-Rex 293 Zelltypen (-Tc, +Tc) zu toxisch wirken, um sie für Versuche zu verwenden. Bei einer Konzentration von 0,5 mM H_2O_2 hingegen sind die Zellen zwar oxidativem Stress ausgesetzt, aber die Inkubationszeit in Kombination mit dieser Konzentration wirkt nicht toxisch.

Die T-Rex Zellen, die mit Tetracyclin ausgeknockt sind (+Tc), reagieren etwas sensibler auf die Inkubation mit Wasserstoffperoxid als die Kontrollzellen (-Tc).

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs wurde für die Inkubation der T-Rex Zellen mit den Antioxidantien die Konzentration von 0,5 mM H_2O_2 ausgewählt.

4.3.2.2 Einfluss von Curcumin auf die Zytotoxizität

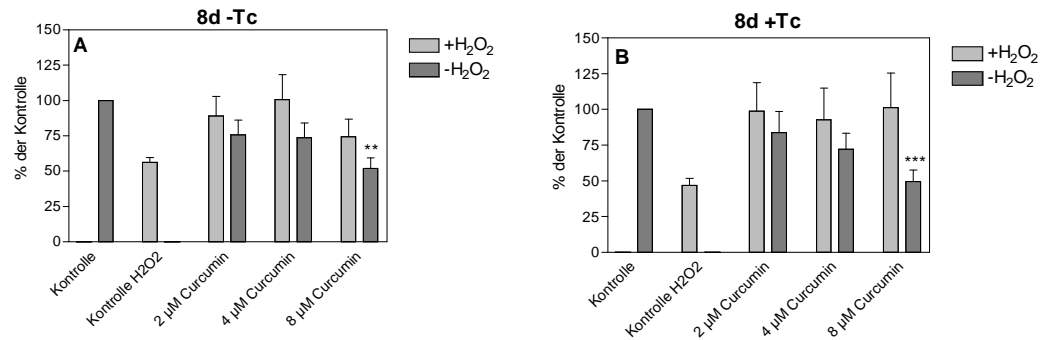


Abbildung 46: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 8 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

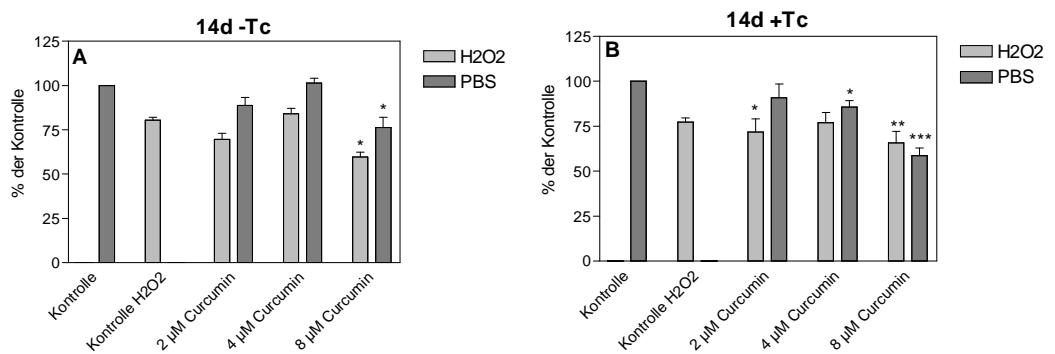


Abbildung 47: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 14Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

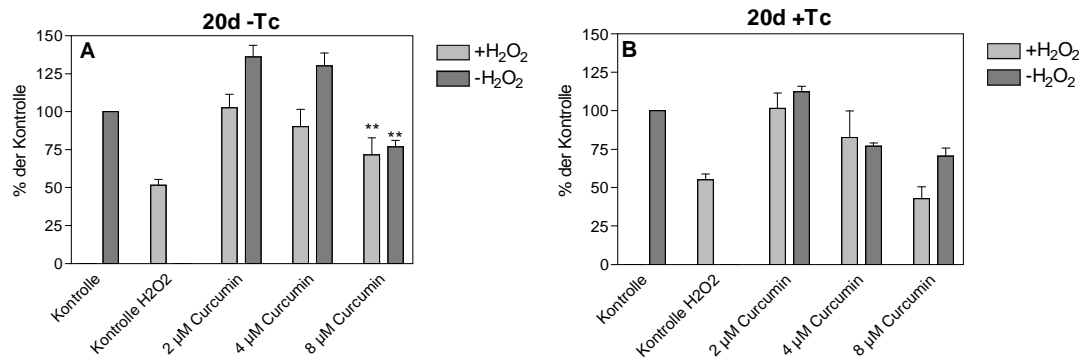


Abbildung 48: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Curcumin auf die Zytotoxizität von 20 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

T-Rex 293 Zellen, unterschiedlich lange mit Tetracyclin behandelt (8, 14 und 20 Tage) wurden 24h mit Curcumin (2, 4 und 8 µM) inkubiert, dann 3h mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder 1x PBS (-H₂O₂) behandelt. Die Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.5.1) ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im 4-fach Ansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Aus den Abbildungen 46, 47 und 48 geht hervor, dass es bezüglich der Dauer der Behandlung der Zellen mit Tetracyclin kein Unterschied besteht, wie lange die Zellen mit Tetracyclin behandelt wurden. Beide Zelltypen (-Tc und +Tc) hatten ungefähr gleiche Zytotoxizitätswerte.

Man kann erkennen, dass die Zytotoxizität konzentrationsabhängig abnahm und die höchste Konzentration an Curcumin immer zu der geringsten Zytotoxizität bezogen auf die unbehandelte Kontrolle führte.

Außer in Abbildung 46 (8d mit Tetracyclin behandelt) führte die Inkubation mit dem Antioxidant alleine zu etwas höheren Zytotoxizitätsraten als bei zusätzlicher Induktion von oxidativem Stress.

Beide 8d Zelltypen (-Tc und +Tc) zeigten nach Inkubation mit 8 µM Curcumin mit und ohne Induktion von oxidativem Stress einen signifikanten Abfall der Zellproliferation (Abb. 46 A und B).

Die 14d -Tc/+ H₂O₂ und die 14d -Tc/- H₂O₂ Zellen zeigten bei einer Konzentration von 8 µM Curcumin einen signifikanten Abfall der Zytotoxizität (Abb. 47 A). Ein signifiaknter Abfall der Zytotoxizität war auch bei den 14d +Tc/+ H₂O₂ Zellen bei einer Konzentration von 2 µM Curcumin, bei den 14d +Tc/- H₂O₂ Zellen bei einer Konzentration von 4 µM Curcumin und bei den 14d +Tc/+ H₂O₂ sowie bei den 14d +Tc/- H₂O₂ Zellen bei einer Konzentration von 8 µM Resveratrol zu sehen.

Die 20d -Tc/+ H₂O₂ und die 20 -Tc/- H₂O₂ Zellen zeigten bei einer Konzentration von 8 µM Curcumin eine signifikante Senkung der Zytotoxizität (Abb. 48 A).

4.3.2.3 Einfluss von Resveratrol auf die Zytotoxizität

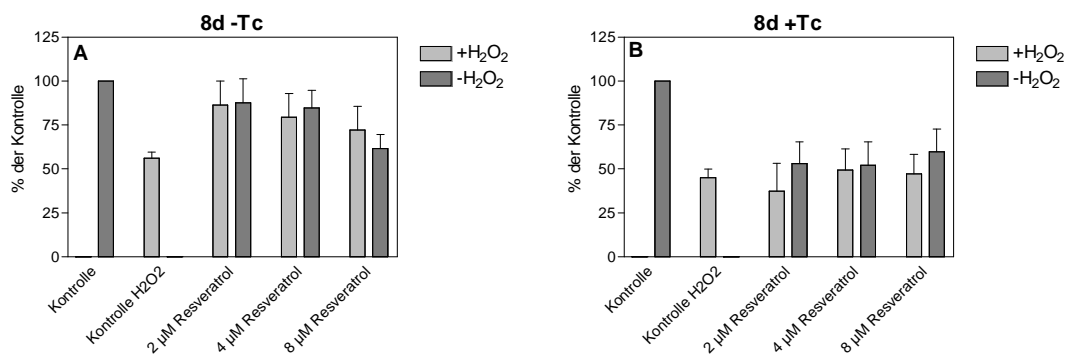


Abbildung 49: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 8 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

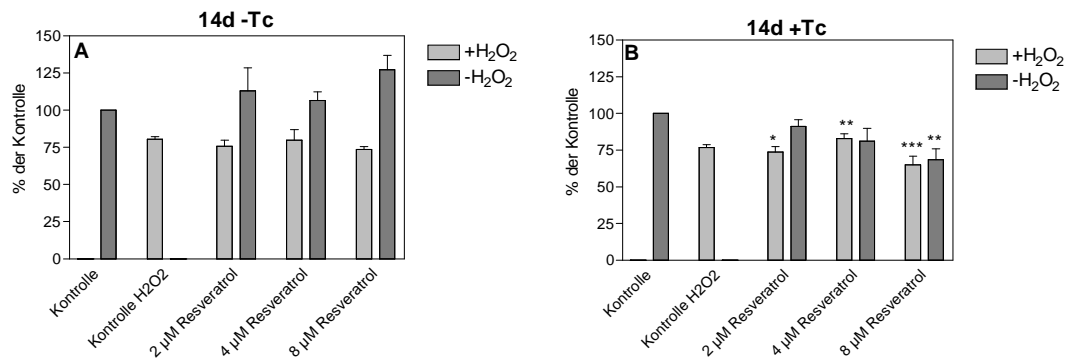


Abbildung 50: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 14 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

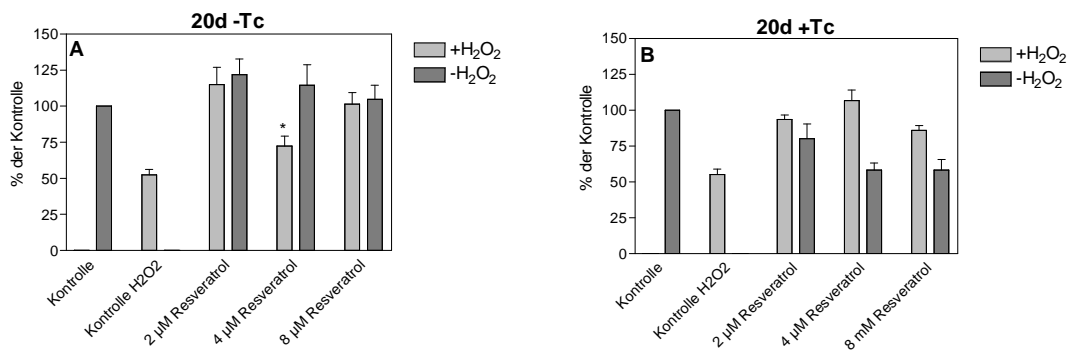


Abbildung 51: Einfluss der 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die Zytotoxizität von 20 Tage mit Tetracyclin behandelten T-Rex 293 Zellen

T-Rex 293 Zellen, unterschiedlich lange mit Tetracyclin behandelt (8, 14 und 20 Tage) wurden 24h mit Resveratrol (2, 4 und 8 µM) inkubiert, dann 3h mit H₂O₂ (+H₂O₂) oder 1x PBS (-H₂O₂) behandelt. Die Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.5.1) ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM aus 2 unabhängigen Messungen, die im 4-fach Ansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Die Werte der Kontrolle wurden als 100% gesetzt.

Aus den Abbildungen 49, 50 und 51 geht hervor, dass auch bei der Inkubation mit Resveratrol die Dauer der Behandlung der Zellen mit Tetracyclin keinen Einfluss hatte. Die Zytotoxizität nahm hier aber nicht konzentrationsabhängig ab, sondern blieb bei allen drei Konzentrationen immer ungefähr gleich.

Außer bei Abbildung 50 A und 51 B gab es auch kaum einen Unterschied zwischen der Induktion von oxidativem Stress und der Wirkung des Antioxidans alleine. Die Proliferation war bei Behandlung mit Wasserstoffperoxid oder mit 1x PBS etwa gleich. Abbildung 49 A zeigte, dass die Kontrollzellen (-Tc) eine deutlich höhere Zytotoxizitätsrate haben als die mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) aus Abbildung 49 B.

In Abbildung 51 B kann man sehen, dass die Inkubation mit Resveratrol bei den 20d +Tc/+ H₂O₂ Zellen zu einer höheren Zytotoxizität geführt hat, als bei den 20d +Tc/-H₂O₂ Zellen.

Die 14d +Tc/+ H₂O₂ zeigten nach 24 h bei allen drei Resveratrolkonzentrationen (Abb. 50 A), die 14d +Tc/-H₂O₂ Zellen bei der höchsten Konzentration (8 µM Resveratrol) einen signifikanten Abfall der Zytotoxizitätsrate (Abb. 50 B).

Die 20d -Tc/+ H₂O₂ Zellen zeigten bei der Konzentration von 4 µM Resveratrol einen signifikanten Abfall der Zytotoxizität (Abb. 51 A).

4.3.2.4 Zusammenfassung

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass mit Tetracyclin behandelte Zellen (+Tc) besser auf oxidativen Stress reagieren als die Kontrollzellen (-Tc), da ihre Zytotoxizität immer niedriger war als die der Kontrollzellen. Tetracyclin kann mit Wasserstoffperoxid einen Komplex bilden [KACZMAREK et al., 2008]. Aufgrund der Komplexbildung könnte die Wirkung des H₂O₂ bei den mit Tetracyclin behandelten Zellen (+Tc) geringer sein als bei den Kontrollzellen, die nicht mit Tetracyclin behandelt wurden. Möglicherweise gibt es noch andere Mechanismen, die sich auf die Zytotoxizität bei den +Tc-Zellen auswirken, wenn diese H₂O₂ ausgesetzt sind.

Es ist ohne Unterschied, wie lange die Zellen mit Tetracyclin behandelt wurden, da alle drei Modelle (8d, 14d und 20d) in etwa gleiche Ergebnisse zeigten.

Interessant ist, dass Curcumin und Resveratrol in der höchsten Konzentration (8 μM) eine bessere Wirkung erzielten als in den niedrigeren Konzentrationen (2 und 4 μM).

5.0 Schlussbetrachtung

Friedreich's Ataxie (FRDA) ist die häufigste Form einer vererbaren Ataxie mit einer Prävalenz von 1-2 in 40.000. FRDA ist eine autosomal rezessive degenerative Erkrankung, die sich meist in der Pubertät manifestiert. Symptome sind progressive Gang- und Gliederataxie, zerebrale Dysarthrie, Spastizität und Funktionsstörungen des plantaren Streckmuskels sowie Verlust von Gliederreflexen, Positions- und Vibrationssinneswahrnehmung [LODI et al., 2006].

FRDA wird durch einen Mangel des mitochondrialen Proteins Frataxin verursacht, hervorgerufen durch eine GAA Repeat Expansion am ersten Intron des Frataxingens. Das verbleibende Frataxin in Patienten macht etwa 5-35% der normalen Menge aus. Der Frataxinmangel führt zu mehreren biochemischen Veränderungen einschließlich verringerter Aktivität von Eisen-Schwefel-Cluster (ISC) Proteinen, Akkumulation von mitochondrialem Eisen, Überempfindlichkeit gegenüber Oxidantien, veränderte Hämsynthese und Aktivierung von oxidativem Stress [LU and CORTOPASSI, 2007].

Da die Verringerung der mitochondrialen Atmungskette sowie die Produktion von ROS wichtige Merkmale der FRDA sind, werden vor allem Antioxidantien auf ihre Wirksamkeit bei FRDA Patienten untersucht [MYERS et al., 2008].

Noch gibt es keine effektive Therapie für FRDA-Patienten und derzeitige therapeutische Ansätze zielen hauptsächlich auf die Verlangsamung der Konsequenzen von Frataxinmangel ab. Daher werden vor allem Substanzen, die möglicherweise in der Lage sind, den Frataxingehalt zu erhöhen, untersucht.

Aufgrund der wiederholten Beobachtung, dass Zellen mit Frataxinmangel vermehrt der Schädigung durch freie Radikale ausgeliefert sind und daher empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren, werden Antioxidantien als möglicher Therapieansatz mehrfach diskutiert [MARMOLINO and ACQUAVIVA, 2009].

Curcumin hat mehrere vielversprechende Charakteristiken, um bei neurodegenerativen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt zu werden. Aufgrund seiner vielfachen

Wirkungsweisen, seiner Ungiftigkeit in oralen Dosen, und relativen Kostengünstigkeit hat Curcumin großes Potential für neurodegenerative Erkrankungen, für die es derzeit kaum optimale Heilungsmöglichkeiten gibt [COLE et al. 2007].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es nach Inkubation von Curcumin und Resveratrol einen Anstieg der Frataxinexpression in neuronalen Zellen gab. Bei α -Tocopherol-Succinat und Kaffeesäure konnte jedoch kein Anstieg beobachtet werden. Interessant war, dass bei Curcumin nach einer 24-stündigen Inkubation eine der niedrigeren Konzentrationen (1 μ M) eine höhere Wirkung erzielte. Resveratrol zeigte nach 24h einen signifikanten Anstieg der Frataxinexpression in der höchsten Konzentration (25 μ M). In K562 Zellen hatten weder Curcumin noch Resveratrol einen erhöhenden Einfluss auf die Frataxinkonzentration.

Trotz der erhöhenden Wirkung auf die Frataxinexpression in neuronalen Zellen hatten Curcumin und Resveratrol auf die Zellschädigung keinen positiven Einfluss.

Im FRDA Zellmodell, den T-Rex 293 Zellen, bei denen ein Frataxinmangel induziert werden kann, wurde der Einfluss der Antioxidantien auf die Zellschädigung und die Zytotoxizität untersucht.

Für die Untersuchung der Zellschädigung wurden T-Rex 293 Zellen mit der niedrigsten und höchsten Konzentration der Antioxidantien inkubiert.

Alle vier Antioxidantien hatten kaum einen Einfluss auf die Zellschädigung. Allerdings gab es geringe Senkungen der LDH-Konzentration bei den Frataxinmangelzellen (+Tc), vor allem wenn die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt waren. Dieser Effekt war vor allem bei den Inkubationen mit Curcumin und bei der 48h Inkubation mit Resveratrol zu beobachten, ist jedoch eventuell auf die H₂O₂-Komplexierung von Tetracyclin zurückzuführen.

Die Konzentration der Substanzen hatte im Gegensatz zur Frataxinexpression keinen Einfluss auf die Zellschädigung. Alle Antioxidantien außer Curcumin hatten bei beiden Konzentrationen fast die gleiche Wirkung auf die LDH-Konzentration.

Für die Zytotoxizitätsmessung wurden T-Rex 293 Zellen, bei denen der Frataxinmangel durch Tetracyclin-Knockdown verschieden lange (8d, 14d, 20d) induziert wurde, mit drei verschiedenen Konzentrationen (2, 4 und 8 μM) von Curcumin und Resveratrol inkubiert. Die Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay ermittelt.

Diesmal reagierten die Frataxinmangelzellen stärker auf oxidativen Stress, da sie fast immer eine geringere Zytotoxizitätsrate aufwiesen als die Kontrollzellen. Diejenigen Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren hatten vor allem bei der Inkubation mit Curcumin eine geringere Zytotoxizitätsrate als die Zellen, die keinem oxidativem Stress ausgesetzt waren.

Es war nicht von Bedeutung, wie lange die Zellen mit Tetracyclin behandelt wurden, da alle drei Modelle (8d, 14d und 20d) etwa gleiche Ergebnisse zeigten.

Interessant war, dass bei beiden Antioxidantien die höchsten Konzentrationen (8 μM) eine bessere Wirkung erzielten als die niedrigeren Konzentrationen. Die Zytotoxizität nahm also sowohl bei Curcumin, als auch bei Resveratrol konzentrationsabhängig ab.

Die vier in dieser Arbeit verwendeten Antioxidantien zeigten nicht den erwarteten Effekt, um in der Therapie für Friedreich's Ataxie eingesetzt zu werden. Nur bei Curcumin und Resveratrol kam es zu einer leichten Steigerung der Frataxinexpression in neuronalen Zellen, diese Antioxidantien hatten aber weder bei anderen Zelltypen einen Einfluss auf die Frataxinexpression, noch zeigten sie eine positive Wirkung auf die Zellschädigung.

6.0 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war, den Einfluss von Zellkulturbedingungen und Antioxidantien auf den Frataxingehalt in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen.

Frataxin ist ein mitochondriales Protein, welches bei Friedreich's Ataxie vermindert exprimiert wird. Die genaue Funktion von Frataxin ist noch unklar, es wird aber vermutet, dass es für die Regulation der mitochondrialen Eisenhomöostase benötigt wird [BENCZE et al., 2006].

Oxidativer Stress spielt eine große Rolle im Krankheitsmechanismus von FRDA. Zusätzlich zum Risiko allgemeiner oxidativer Schädigung bei FRDA gibt es auch Anhaltspunkte, dass Frataxinmangel die Zellen anfälliger für oxidativen Stress macht [COOPER and SHAPIRA, 2003].

Aufgrund der Vermutung, dass eine Frataxinerhöhung durch Zusatz von Antioxidantien zu einer Reduktion von oxidativem Stress führen könnte, wurden verschiedene Antioxidantien in Bezug auf Frataxinexpression und Zellschädigung untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Antioxidantien Curcumin und Resveratrol eine Erhöhung der Frataxinexpression bei neuronalen P19 Zellen bewirken. Die Konzentration von 25 μ M Resveratrol führte sogar zu einem signifikanten Anstieg der Frataxinexpression. Curcumin und Resveratrol führten hingegen bei den erythroleukämischen K562 Zellen zu einer nicht signifikanten Verminderung der Frataxinexpression. Die Antioxidantien α -Tocopherol Succinat und Kaffeesäure führten weder bei neuronalen P19, noch bei K562 Zellen zu einer Änderung der Frataxinexpression.

Alle vier Antioxidantien führten bei T-Rex 293 Zellen zu kaum einer Veränderung bzw. zu einer leichten Verminderung der Zellschädigung. Diese war umso stärker, wenn die Zellen zusätzlich oxidativem Stress ausgesetzt waren, ist aber vermutlich darauf zurückzuführen, dass Tetracyclin und H_2O_2 einen Komplex bilden, der die Wirksamkeit des H_2O_2 verringert.

Curcumin und Resveratrol zeigten bei T-Rex 293 Zellen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zytotoxizität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die verwendeten Antioxidantien nicht den erwarteten therapeutischen Effekt auf FRDA haben

6.0 Summary

The aim of this thesis was to determine the influence of cell culture conditions and antioxidants on the expression of frataxin in various cell lines.

Frataxin is a mitochondrial protein, whose expression is decreased in Friedreich's ataxia (FRDA).

The exact function of frataxin remains unclear, but it is proposed that frataxin is required for the cellular regulation of mitochondrial iron homeostasis [BENCZE et al., 2006].

Oxidative stress plays a major role in the disease mechanism of FRDA. In addition to the increased risk of general oxidative damage in FRDA, there is evidence that frataxin deficiency makes cells more susceptible to oxidative damage [COOPER and SHAPIRA, 2003].

The experiments in this thesis were performed on the presumption that an increase in frataxin levels by supplementation of antioxidants could lead to a reduction of oxidative stress. Four antioxidants were analyzed with respect to frataxin expression and cell damage.

The results show that the antioxidants curcumin and resveratrol induce an increase in the expression of frataxin in neuronal P19 cells. The concentration of 25 μM resveratrol lead to a significant increase in the frataxin expression. Curcumin and resveratrol had no significant increasing effect on the expression of frataxin in erythroleucemic K562 cells. The antioxidants α -tocopherol succinate and caffeic acid had no effect on frataxin expression in P19 or K562 cells.

All four antioxidants induced either a decreasing effect or none at all on cell damage in T-Rex 293 cells. The decrease was higher when the cells were exposed to oxidative damage which is presumably a result of a complex formed between tetracycline and H_2O_2 which reduces the effect of H_2O_2 .

Curcumin and resveratrol showed a concentration-dependant decrease in cell cytotoxicity.

It is shown in this thesis that the chosen antioxidants don't have the expected therapeutic effect in FRDA.

7.0 Literaturverzeichnis

ALARCON DE LA LASTRA C, VILLEGAS I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 2007, Volume 35, part 5.

ALBANO LMJ, NISHIOKA SAD, MOYSES RL, WAGENFÜHR J, BERTOLA D, SUGAYAMA SMM, KIM CA. Friedreich's Ataxia. Cardiac Evaluation of 25 Patients with Clinical Diagnosis and Literature Review. *Arq Bras Cardiol*, 2002, volume 78 (n° 5), 448-51.

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

BENCZE KZ, KONDAPALLI KC, COOK JD, MCMAHON S. The Structure and Function of Frataxin. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 41:269–291.

BRADLEY JL, BLAKE JC, CHAMBERLAIN S, THOMAS PK, COOPER JM; SHAPIRA AHV. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 2000, Vol 9, No 2, 275-282.

BUSHNELL GR, CAHILL C, CLARKE FM, GIBSON CT, MYHRA S, WATSON GS. Imaging and Force-Distance Analysis of Human Fibroblasts In Vitro by Atomic Force Microscopy. *Cytometry*, 1999, 36:254–264.

CALABRESE V, LODI R, TONON C, D'AGATA V, SAPIENZA M, SCAPAGNINI G, MANGIAMELI A, PENNISI G, STELLA AMG, BUTTERFIELD DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 2005, 233:145 – 162.

CALABRESE V, CORNELIUS C, MANCUSO C, PENNISI G, CALAFATO S, BELLIA F, BATES TE, STELLA AMG, SCHAPIRA T, KOSTOVA ATD, RIZZARELLI E. Cellular Stress Response: A Novel Target for Chemoprevention and Nutritional Neuroprotection in Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochem Res*, 2008, 33:2444–2471.

CAMPUZANO V, MONTERMINI L, LUTZ Y, COVAL L, HINDELANG C, JIRALERSPONG S, TROTTIER Y, KISH SJ, FAUCHEUX B, TROUILLAS P, AUTHIER FJ, DÜRR A, MANDEL JL, VESCOVI A, PANDOLFO M, KOENIG M. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human Molecular Genetics*, 1997, Vol. 6, No. 11 1771–1780.

CHUNG MJ, WALKER PA, HOGSTRAND C. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquatic Toxicology*, 2006, 80:321–328.

COLE GM, TETER B, FRAUTSCHY SA. Neuroprotective Effects of Curcumin. *Adv Exp Med Biol.*, 2007 ; 595: 197–212.

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

COOPER JM, SHAPIRA AHV. Friedreich's Ataxia: Disease mechanisms, antioxidant and Coenzyme Q10 therapy. *BioFactors*, 2003, 18:163–171.

DIKSHIT P, GOSWAMI A, MISHRA A, NUKINA N, JANA NR. Curcumin enhances the polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin-induced cell death by promoting proteasomal malfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342:1323–1328.

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

EYBL V, KOTYZOVA D, KOUTNSKY J. Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin – in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*, 2006, 225:150–156.

GABSI S, GOUIDER-KHOUSA N, BELAL S, FKI M, KEFIA M, TURKI I, HAMIDA MB, KAYDEN H, MEBAZAA R, HENTATI F. Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *European Journal of Neurology*, 2001, 8: 477±481.

GAKH O, PARK S, LIU G, MACOMBER L, IMLAY JA, FERREIRA GC, ISAYA G. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 3 467–479.

HAN YS, ZHENG WH, BASTIANETTO S, CHABOT JG, QUIRION R. Neuroprotective effects of resveratrol against b-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology*, 2004, 141:997–1005.

HELMINGER M. (2008): Untersuchung zur Rolle des klassischen Erythropoietin-Rezeptors bei der Frataxin erhöhenden Wirkung von rekombinantem humanem Erythropoietin. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften.

IQBAL M, OKAZAKI Y, OKADA S. Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): implications for cancer prevention . *Mol Cell Biochem*, published online 23 january 2009

JIAO Y, WILKINSON J, DI X, WANG W, HATCHER H, KOCK ND, D'AGOSTINO R, KNOVICH MA, TORTI F, TORIT SV. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*, 2009, Jan 8, 113(2):270-1.

JONES-VILLENEUVE EMV, MCBURNEY MW, ROGERS KA, KALNINS VI. Retinoic Acid Induces Embryonal Carcinoma Cells to Differentiate into Neurons and Glial Cells. *The Journal Of Cell Biology*, 1982, Volume 94: 253-262.

JUNG UJ, LEE MK, PARK YB, JEON SM, CHOI MS. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in *db/db* Mice. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 2006, Vol. 318, No. 2 476-483.

KACZMAREK M, IDZIKOWSKA A, LIS S. Europium-sensitized Chemiluminescence of System Tetracycline–H₂O₂–Fe(II)/(III) and Its Application to the Determination of Tetracycline. *J Fluoresc*, 2008, 18:1193–1197.

KIM H; CHANG E; CHO S; CHUNG S; PARK H; CHOI S. Antioxidative activity of Resveratrol and Its Derivates Isolated from Seeds of *Paeonia lactiflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66 (9):1990-1993.

KOWLURU RA, KANWA M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutrition & Metabolism*, 2007, 4:8.

LAFAY S, MORAND C, MANACH C, BESSON C, SCALBERT A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 2006, 96:39–46.

LODGE JK. Vitamin E bioavailability in humans. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162:790—796.

LODI R, TONON C, CALBRESE V, SHAPIRA AHV. Friedreich's Ataxia: From Disease Mechanisms to Therapeutic Interventions. *Antioxidants & REDOX Signaling*, 2006, Volume 8, Numbers 3 & 4.

LU C, CORTOPASSI G. Frataxin Knockdown causes loss of cytoplasmic iron sulphur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 457:111-122.

MARMOLINO D, ACQUAVIVA F. Friedreich's Ataxia: From the (GAA)_n Repeat Mediated Silencing to New Promising Molecules for Therapy. *Cerebellum*. published online:23 january 2009

MYERS L, FARMER JM, WILSON RB, FRIEDMAN L, TSOU A, PERLMAN S, SUBRAMONY SH, GOMEZ CM, ASHIZAWA T, WILMOT GR, MATHEWS KD, BALCER LJ, LYNCH DR. Antioxidant use in Friedreich ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 2009, 267:174–176.

OLTHOF MR, HOLLMAN PCH, KATAN MB. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *J Nutr.*, 2001, 131(1):66-71.

PANDOLFO M. Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*, 2002, 2: 87–93.

PANDOLFO M. Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2008, 4:86-96.

PATEL PI, ISAYA G. Friedreich Ataxia: From GAA Triplet–Repeat Expansion to Frataxin Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 69:15-24.

PRASAD KN, KUMAR B, YAN XD, HANSON AJ, COLE WC. Tocopheryl Succinate, the Most Effective Form of Vitamin E for Adjuvant Cancer Treatment: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 2003, Vol. 22, No. 2, 108–117.

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, 221-224.

SARAVANAN BC, SREEKUMAR C, BANSAL GC, RAY D, ROA JR, MISHRA AK. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology*, 2003, 113:211–216.

SEZNEC H, SIMON D, BOUTON C, REUTENAUER L, HERTZOG A, GOLIK P, PROCACCIO V, PATEL M, DRAPIER JC, KOENIG M, PUCCIO H. Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol. 14, No. 4 463–474.

SHIBATA N, TOMITA N. The anti-oxidative properties of α -tocopherol in g-irradiated UHMWPE with respect to fatigue and oxidation resistance. *Biomaterials*, 2005, 26:5755–5762.

SUCHANKOVA J, VOPRSALOVA M, KOTTOVA M, SEMECK V, VISNOVSKY P. Effects of oral α -tocopherol on lung response in rat model of allergic asthma. *Respirology*, 2006, 11:414–421.

THOMAS L. Lactat-Dehydrogenase (LDH). *Labor und Diagnose 5.Auflage* (Lothar Thomas), TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 1998, Kapitel 1.10, Seiten 91-97.

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

WEISHAAR D, GOSSAU E, FADERL B. Normbereiche von α -HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substratoptimierten Testansätzen. *Med. Welt*, 1975, 26:87–390.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Chantal Kopecky
Geburtsdatum	07.07.1982
Geburtsort	Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

1988 - 1992	Volksschule, 2103 Langenzersdorf
1992 - 1998	Bundesrealgymnasium, Franklinstr.21, 1210 Wien
1998 – 2001	GRgORg 20 Karajangasse 14, 1200 Wien
Juni 2001	AHS – Matura
WS 01/02	Universität Wien, Studienrichtungen Meteorologie
Ab SS 02	Ernährungswissenschaften

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

Juli 2006	Praktikum beim Bundesministerium für Gesundheit und Frauen, Abteilung ‚Lebensmittelsicherung und Verbraucherschutz, rechtliche Angelegenheiten, Koordination der Kontrolle‘
Juli 2007	Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien
Okt 2007-März 2008	Auslandssemester an der Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland
Okt 2007-Feb 2008	Laborpraktikum am Institut für Biologische Chemie und Ernährung der Universität Hohenheim, Stuttgart

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Chantal Kopecky, dass die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt wurde und dass keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Wörtlich oder inhaltlich übernommene Zitate habe ich als solche unter Bekanntgabe der entsprechenden Quelle gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift