



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

## Einfluss der Hämoglobinsynthese auf die Expression von Frataxin

Verfasserin

Laura Neumann

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Wien, 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

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



## **Danksagung**

**An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken die mir bei der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form geholfen haben.**

**Vor allem gilt mein Dank Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mit zu arbeiten. Außerdem wurde mir die Teilnahme am International Bio Iron Meeting 2009 in Porto, sowie am FEDAES-Federation de Ataxia de Espana Meeting 2009 in Valladolid ermöglicht.**

**Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Brigitte Nina Sturm sowie bei Mag Hannes Steinkellner und Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar, die mich während meiner Arbeit sehr gut betreut haben und für alle Fragen ein offenes Ohr und eine passende Antwort hatten.**

**Des Weiteren gilt mein Dank Chantal Kopetzky und Melissa Helminger sowie vielen weiteren Institutsmitarbeitern für die viele fachliche Hilfestellung und gute Zusammenarbeit.**

**Ein besonderer Dank gilt noch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich immer persönlich und finanziell während des Studiums unterstützt haben.**



## **Inhaltsverzeichnis**

- I. Inhaltsverzeichnis**
- II. Abbildungsverzeichnis**
- III. Tabellenverzeichnis**
- IV. Abkürzungsverzeichnis**

<b>1 Einleitung und Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturüberblick.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Friedreichs Ataxie .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Molekulare Genetik .....	3
2.1.2 Epidemiologie.....	5
2.1.3 Genotyp Phänotyp Korrelation .....	5
2.1.4 Pathogenese der Friedreichs Ataxie .....	7
2.1.5 Klinische Merkmale der Friedreichs Ataxie .....	8
2.1.5.1 Friedreichs Ataxie und Kardiomyopathie.....	9
2.1.6 Diagnose der Friedreichs Ataxie .....	10
2.1.6.1 Klinische Diagnose.....	10
2.1.6.2 Neurologische Einteilung und Diagnose.....	10
2.1.6.3 Genetische Diagnose .....	11
<b>2.2 Frataxin .....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Struktur des Proteins Frataxin.....	12
2.2.2 Funktionen des Proteins Frataxin.....	13
2.2.2.1 Frataxin und Eisenmetabolismus .....	13
2.2.2.2 Frataxin und die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern..	14
2.2.2.3 Frataxin als Eisenspeicherprotein .....	15
1.1.1.1 Frataxin und oxidativer Stress .....	16
2.2.3 Häm-Biosynthese .....	17
2.2.3.1 Frataxin und Häm-Biosynthese .....	18
2.2.4 Erythropoese .....	19

2.2.4.1 Wirkung von Erythropoetin und SCF auf die Erythropoese...	20
<b>2.3 Mögliche Therapieformen .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Eisenchelatoren .....	22
2.3.2 Antioxidantien.....	23
2.3.3 RHuEpo.....	23
2.3.4 Histon-Deacetylase Inhibitoren .....	24
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Zellkultur.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Zelllinien .....	25
3.1.1.1 K562-Zellen.....	25
3.1.1.2 ESMS (erythroide Stammzellen Maus) .....	26
3.1.2 Herstellung des Nährmediums .....	26
3.1.2.1 RPMI-Nullmedium für K562-Zellen.....	26
3.1.2.1.1 Komplettieren des RPMI-Nullmediums .....	27
3.1.2.2 StemPro-34™ für ESMS-Zellen .....	27
3.1.2.2.1 StemPro-34™ Kultivierungsmedium .....	27
3.1.2.2.2 StemPro-34™ Differenzierungsmedium.....	28
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	29
3.1.3.1 K562.....	29
3.1.3.2 ESMS .....	29
3.1.4 Kultivierung und Differenzierung .....	30
3.1.4.1 K562 Zellen .....	30
3.1.4.2 ESMS erythroide Progenitorzellen .....	31
3.1.4.2.1 Isolierung aus der Leber .....	31
3.1.4.2.2 Auftauen der ESMS-Zellen .....	31
3.1.4.2.3 Kultivierung .....	32
3.1.4.2.4 Differenzierung.....	32
3.1.5 Zellen ernten .....	34
3.1.6 Zellen lysieren .....	34
<b>3.2 Proteinbestimmung nach Bio-Rad .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Hämoglobinmessung.....</b>	<b>36</b>

3.3.1 Hämoglobinmessung nach Drabkin.....	36
3.3.2 Hämoglobinmessung mittels 2,7-Diaminofluoreszein (DAF) .....	38
<b>3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction).....</b>	<b>39</b>
3.4.1 RNA-Extraktion.....	39
3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	40
3.4.3 Umschreiben der RNA in cDNA .....	41
3.4.4 PCR Prinzip.....	42
3.4.5 Ablauf der PCR .....	42
3.4.6 Praktische Durchführung der PCR .....	43
3.4.7 Gel-Elektrophorese .....	44
3.4.7.1 Herstellung der Gele .....	44
3.4.7.2 Elektrophorese .....	46
3.4.8 Auswertung .....	46
<b>3.5 Real Time qPCR (RT-qPCR).....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Reaktionsbedingungen der Amplifikation .....	48
3.5.2 Auswertung: Bestimmung der relativen Expression .....	48
<b>3.6 ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay) .....</b>	<b>49</b>
3.6.1 Durchführung des ECLIA .....	50
3.6.2 Probenvorbereitung.....	51
3.6.3 Messung der Frataxinkonzentration und Auswertung .....	52
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Einfluss der Hämoglobinproduktion auf die Frataxin-Expression in K562-Zellen .....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Messung der Hämoglobinkonzentration nach Inkubation mit Hämin und Succinyl-Aceton in K562-Zellen.....	54
<b>4.2 Messung der Frataxin-Protein- und mRNA-Expression nach Inkubation der K562-Zellen mit Hämin und Succinyl-Aceton .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Einfluss von Hämin auf die Frataxin Expression .....	57
4.2.2 Einfluss von Succinyl-Aceton auf die Frataxin Expression .....	60

4.2.3 Einfluss von Hämin und Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Expression .....	61
<b>4.3 Erythroide Progenitorzellen .....</b>	<b>63</b>
4.3.1 Kultivierung der erythroiden Progenitorzellen isoliert aus fötalen Mäuselebern .....	64
4.3.2 Zellprofile von erythroiden Progenitorzellen während der Kultivierung .....	65
4.3.3 Proliferationskinetik von erythroiden Progenitorzellen.....	66
4.3.4 Differenzierung der erythroiden Progenitorzellen isoliert aus fötalen Mäuselebern .....	69
4.3.5 Zellprofile erythroider Progenitorzellen während der Differenzierung .....	70
4.3.6 Differenzierungskinetik der erythroiden Progenitorzellen .....	71
4.3.7 Messung der Hämoglobinkonzentration in erythroiden Progenitorzellen während kontrollierter Differenzierung.....	73
4.3.8 Einfluss erhöhter Hämoglobinkonzentration auf die Frataxin-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene .....	74
<b>5 Schlussbetrachtung .....</b>	<b>77</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>82</b>
<b>8 Quellenverzeichnis .....</b>	<b>83</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

- **Abb. 1:** Korrelation zwischen dem Auftreten der Krankheit und der Anzahl an GAA Wiederholungen im kleineren Allel ..... 6
- **Abb. 2:** Schematische Darstellung von Kardiomyopathien ..... 9
- **Abb. 3:** Struktur von Frataxin ..... 12
- **Abb. 4:** Verteilung der Häm-Biosynthese auf zwei Zellkompartimente, Mitochondrium und Cytosol ..... 17
- **Abb. 5:** Erythropoese in der Maus startend im Knochenmark angeregt durch Erythropoetin ..... 19
- **Abb. 6:** Beispiel eines Zellprofils erstellt mit dem elektronischer Zellzähler (CASY) ..... 30
- **Abb. 7:** Mäuseembryo mit durchscheinender Leber ..... 31
- **Abb. 8:** Prinzip der PCR ..... 43
- **Abb. 9:** Einfluss der Hämininkubation (25µM) auf die Hämoglobinproduktion in K562-Zellen ..... 54
- **Abb. 10:** Einfluss der Succinyl-Aceton Inkubation (50µM) auf die Hämoglobinproduktion in K562-Zellen ..... 55
- **Abb. 11:** Einfluss von 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen ..... 56
- **Abb. 12:** Einfluss von 25µM Hämin auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen ..... 57
- **Abb. 13:** mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 25µM Hämin in K562-Zellen ..... 59
- **Abb. 14:** Einfluss von 50µM Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen ..... 60
- **Abb. 15:** mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 50µM Succinyl-Aceton in K562-Zellen ..... 61
- **Abb. 16:** Einfluss von 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen ..... 62
- **Abb. 17:** mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton in K562-Zellen ..... 63
- **Abb. 18:** Kontrollierte Kultivierung von erythroiden Progenitorzellen ..... 65

- **Abb. 19:** Zellzahl der erythroiden Progenitorzellen während der Proliferation ..... 66
- **Abb. 20:** Viabilität der erythroiden Progenitorzellen während der Proliferation ..... 67
- **Abb. 21:** Anstieg des Zelldurchmessers während der Proliferation der erythroiden Progenitorzellen ..... 68
- **Abb. 22:** Kontrollierte Differenzierung von erythroiden Progenitorzellen zu Erythrozyten ..... 70
- **Abb. 23:** Viabilität der erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung zu Erythrozyten ..... 71
- **Abb. 24:** Durchschnittlicher Zelldurchmesser der Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten ..... 72
- **Abb. 25:** Hämoglobinkonzentration von erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten ..... 73
- **Abb. 26:** Frataxin Protein Expression der erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten ..... 74
- **Abb. 27:** Frataxin mRNA-Levels von erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung zu Erythrozyten ..... 75

### III. Tabellenverzeichnis

➤ <b>Tabelle . 1.</b> : Herstellungsanleitung für den PBS (5x).....	<b>28</b>
➤ <b>Tabelle . 2.</b> : Pipetterschema zur Erstellung der Standardreihe Protein Bestimmung nach Bio-Rad.....	<b>35</b>
➤ <b>Tabelle . 3.</b> : Pipetterschema für die Erstellung der Standardreihe Hämoglobinmessung nach Drabkins .....	<b>37</b>
➤ <b>Tabelle . 4.</b> : Pipetterschema zur Erstellung der Standardreihe Hämoglobinmessung mittels DAF .....	<b>39</b>
➤ <b>Tabelle . 5.</b> : Pipetterschema des RT-Mastermix pro Ansatz Umschreiben in cDNA .....	<b>41</b>
➤ <b>Tabelle . 6.</b> : Pipetterschema zur Erstellung des Mastermix für zwei Ansätze RT-PCR .....	<b>43</b>
➤ <b>Tabelle . 7.</b> : Bei der PCR verwendete Primer PCR .....	<b>44</b>
➤ <b>Tabelle . 8.</b> : Pipetterschema zur Erstellung der Probenansätze spezifisch für ein Gen RT-qPCR .....	<b>47</b>
➤ <b>Tabelle . 9.</b> : Pipetterschema zur Erstellung der Negativ Kontrolle spezifisch für ein Gen RT-qPCR .....	<b>47</b>
➤ <b>Tabelle . 10.</b> : Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation RT-qPCR .....	<b>48</b>
➤ <b>Tabelle . 11.</b> : Verwendete Primer RT-qPCR .....	<b>48</b>
➤ <b>Tabelle . 12.</b> : Reagenzien benötigt zur Durchführung des ECLIA .....	<b>50</b>
➤ <b>Tabelle . 13.</b> : Pipetterschema zur Erstellung der Standardreihe .....	<b>51</b>

## IV. Abkürzungsverzeichnis

<b>BFU E</b>	Burst Forming Unit Erythroid
<b>CFU E</b>	Colony Forming Unit Erythroid
<b>DAF</b>	2,7 Diaminofluoreszin
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxid
<b>ECLIA</b>	Electrochemiluminescenc Immunoassay
<b>EPO</b>	Erythropoetin
<b>ESMS</b>	Erythroide Stammzellen Maus
<b>FARS</b>	The Friedreich Ataxia Rating Scale
<b>FRDA</b>	Friedreichs Ataxia
<b>FXN</b>	Frataxin
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
<b>HSC</b>	Hematopoetic Stem Cells
<b>HO 1</b>	Hämoxigenase 1
<b>HPRT 1</b>	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase 1
<b>ICARS</b>	The International Cooperative Ataxia Rating Scale
<b>IGF 1</b>	Insulin-like Growth Factor 1
<b>IRP 1</b>	Iron-Responsive Protein 1
<b>ISC's</b>	Iron-Sulfur Clusters
<b>ISU</b>	Iron-Sulfur Unit protein
<b>MPP</b>	Mitochondrial Processing Peptidase
<b>PBG</b>	Porphobilinogen
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
<b>RT qPCR</b>	Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>TBE</b>	Tris/Borat/EDTA

## 1 Einleitung und Fragestellung

Die Friedreichs Ataxie ist eine autosomal-rezessiv vererbbares, neurodegenerative Krankheit und kommt mit einer Häufigkeit von 1:50.000-1:29.000 vor. Die Krankheit ist die häufigste der früh beginnenden Ataxien in der kaukasischen Bevölkerung.

Die Symptome der Friedreichs Ataxie reichen von progressiven neurologischen Störungen über hypertrophe Kardiomyopathie und ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus bis hin zu Skeletttanomalitäten wie Skoliose und Pes Cavus.

Der Beginn der Krankheit liegt normalerweise in der Pubertät. Im Durchschnitt sind die betroffenen Personen nach 10 bis 15 Jahren Krankheit auf Grund progressiver Gang- und Extremitäten-Ataxie auf einen Rollstuhl angewiesen, um das tägliche Leben zu bestreiten.

Einige Patienten leiden an schwerwiegender Kardiomyopathie, welche durch Herzinsuffizienz oder Arrhythmien den vorzeitigen Tod verursachen kann. Das Auftreten von Diabetes mellitus kann die Lebensqualität der Patienten noch zusätzlich einschränken.

Zum heutigen Zeitpunkt gibt es, wie bei den meisten neurodegenerativen Krankheiten, keine wirksamen und zugelassenen Mittel, welche den Fortschritt der Krankheit stoppen können. Des Weiteren gibt es noch keine effektive symptomatische Behandlungsmethode, welche den Zustand der Patienten verbessert ohne gleichzeitig den Fortschritt des neurodegenerativen Prozesses der Krankheit zu beeinflussen [PANDOLFO M., 2009].

1988 wurde der genetische Grund der Krankheit durch linkage-Analysen von betroffenen Familien gefunden und auf dem Chromosom 9 lokalisiert, und das Gen X25 als Frataxin Gen identifiziert. Erst 1996 konnte eine ausgedehnte GAA Trinukleotid-Wiederholung in dem ersten Intron von Gen X25 als Grund für den mit der Friedreichs Ataxie verbundenen Frataxin Mangel identifiziert werden.

Der Grund für die verminderte Frataxin-Expression liegt bei einer fehlerhaften Transkription, nicht bei der post-transkriptionellen RNA Prozessierung. Die

ununterbrochene ausgedehnte GAA Expansion nimmt eine Konformation an, die „sticky DNA“ genannt wird und zu einer Selbstassoziation der DNA führt. Dies bewirkt eine verminderte Transkription der Gens und somit eine verminderte Frataxin Expression [DELATYCKI M. B. et al., 2000].

Die Ausprägung der Krankheit, und ob die Individuen nur Träger des Defekts oder selbst von der Krankheit betroffen sind, hängt von mehreren Faktoren ab. Bei der Anzahl von Wiederholungen gibt es Unterteilungen, die sich auch in der Schwere der Krankheit widerspiegeln. So korreliert zum Beispiel eine hohe Anzahl an Wiederholungen im kleineren Allel mit dem Alter bei Beginn der Krankheit sowie dem Auftreten der Kardiomyopathie [DÜRR A. et al., 1996].

Die Funktion von Frataxin ist viel diskutiert, aber einige der zahlreichen Effekte sind sicher. Ein Mangel an diesem essentiellen Protein führt zu einer Reihe an metabolischen Störungen, wie oxidativer Stress, Mangel an Eisen-Schwefel-Clusters sowie Fehler in der Häm-Biosynthese, dem Schwefel-Aminosäure- und dem Energie-Stoffwechsel, der Stress-Antwort und der generellen Mitochondrien-Funktion [PANDOLFO M., PASTORE A., 2009].

Ziel dieser Arbeit ist es festzustellen, wie sich eine gesteigerte beziehungsweise gehemmte Hämoglobinsynthese auf die Expression von Frataxin auswirkt. Die Frataxin-Expression wurde auf Proteinebene sowie auf mRNA-Ebene untersucht. Diese Versuche wurden mit einem erythroid-leukämische Zellmodell (K562 Zellen) durchgeführt.

Des Weiteren wurden die gleichen Parameter auch in einem Modell mit primären Zellen untersucht. Dabei handelt es sich um erythroide Progenitorzellen, isoliert aus Leberzellen von Mäuseembryos, in welchen die Erythropoiese sehr gut und kontrolliert nachgestellt werden kann. Dieses Zellsystem wurde von DOLZNIG H. et al., 2001 übernommen.

## 2 Literaturüberblick

### 2.1 Friedreichs Ataxie

Die Friedreichs Ataxie ist eine der häufigsten autosomal rezessiv vererbbarer Krankheiten. Es handelt sich um eine neurodegenerative Krankheit, die mit einer Häufigkeit von 1:50.000-1:29.000 auftritt. Die Krankheit wurde erstmals 1963 vom deutschen Neurologen Nicholaus Friedreich mit ihren essentiellen, klinischen und pathophysiologischen Merkmalen, beschrieben [ALPER G. et al., 2003].

#### 2.1.1 Molekulare Genetik

1988 konnte mit Hilfe der linkage-Analyse von betroffenen Familien das FRDA-Gen auf Chromosom 9 lokalisiert werden. Durch Marker-Analysen konnte eine Region eingegrenzt werden in welcher sich ein Gen (X25, FRDA-Gen) befand, das eine ausgedehnte Trinukleotid-Wiederholung (GAA) im ersten Intron aufwies. Dieses Gen wurde als FRDA-Gen identifiziert [ALPER G., NARAYANAN V., 2003].

Das Gen enthält 7 Exons (1-5a, 5b, 6), wobei das häufigste Transkript von den Exons 1-5a hervorgeht. Es handelt sich um ein 210 Aminosäuren langes Protein, welches Frataxin genannt wird. Durch Mutationsanalysen von 184 FRDA-Patienten konnte in FRDA's erstem Intron eine GAA Expansion festgestellt werden [DELATYCKI M B et al 2000]. Diese Allele können nun nach der Länge der GAA Wiederholungen in drei Klassen unterteilt werden, wobei „kurz normal“ 5-10 GAA Triplets darstellt, „lang normal“ 12-66 GAA Wiederholungen und >66 bis 1800 GAA Triplets krankheits-assoziierte bzw. erweiterte Allele sind [LABUDA M et al., 2000]. Die „normalen“ Allele werden stabil vererbt, während Prämutations-Allele (44-66 GAA-Wiederholungen) innerhalb einer Generation eine Ausweitung auf mehrere 100 Kopien erreichen

können, und die Krankheitsallele mit > 100 Kopien sehr stark zur Ausdehnung neigen [KRASILNIKOVA M. M. et al., 2004].

Ungefähr 96% der Friedreichs Ataxie Patienten sind homozygot für die GAA-Expansion im 1. Intron, während die verbleibenden 4% gemischt heterozygot für die Expansion sind und innerhalb der kodierenden Region eine Punktmutation aufweisen. Tritt diese GAA Wiederholung allerdings nur auf einem Allel auf, sind die betroffenen Personen nur Träger der Krankheit, aber nicht von den Symptomen selbst betroffen. Die Friedreichs Ataxie ist einzigartig unter den Trinukleotid-Wiederholungs Krankheiten, da sie autosomal-rezessiv vererbt wird und die GAA Wiederholung auf einem Intron liegt [ALPER G. et al., 2003].

Das FRDA Gen zeigt gewebesspezifische Expression: Die mRNA Levels sind in Herz und Leber sowie Skelettmuskulatur und Pankreas am höchsten. Auch im Zentralnervensystem, speziell im Rückenmark, wird das Gen stark exprimiert [PANDOLFO M., 1999].

Bei Patienten allerdings sind die mRNA Levels ebenso wie die Frataxin-Proteinlevels sehr gering im Gegensatz zu Gesunden. Diese verminderten mRNA-Levels sind das Ergebnis einer gehemmten Transkription und nicht erst ein Fehler bei der post-transkriptionellen RNA-Prozessierung. Die GAA-Wiederholung bildet eine ungewöhnliche DNA Struktur, welche sehr stabil ist und in die Transkription eingreift. Es ist bewiesen, dass eine ununterbrochene GAA-Expansion eine Konformation darstellt, die „sticky DNA“ genannt wird und in einer Selbstassoziiierung der DNA resultiert, welche zu einer verminderten Frataxin-Expression führt [DELATYCKI M. B. et al., 2000].

## **2.1.2 Epidemiologie**

Die durchschnittliche Träger-Wahrscheinlichkeit beträgt 1:110, wobei in einigen Studien die Trägerrate sogar mit 1:60 angegeben wurde [DELATYCKI M.B. et al., 2000].

Es scheint als wäre das Vorkommen der Friedreichs Ataxie auf Europa, den Mittleren Osten, Nord-Afrika und Indien begrenzt. Die Prävalenz der Friedreichs Ataxie hängt stark mit der Häufigkeit der großen und normalen FXN-Allele (>12 GAA Wiederholungen) in der Population zusammen. Große und normale Allele kommen in Ost-Asien und bei amerikanischen Ureinwohnern fast gar nicht vor, was auch ein vollständiges Fehlen der Krankheit in diesen Populationen erklären kann. Betrachtet man die Häufigkeit von Trägern mit einer heterozygoten Mutation, so ergibt sich eine Abnahme der Fälle von Süden nach Nord-Osten [SCHULZ J. B. et al., 2009].

## **2.1.3 Genotyp Phänotyp Korrelation**

In viele Studien wurde belegt, dass ein früher Anfang der Krankheit, sowie ein rascher Verlauf und eine frühe Krankheitsmanifestation mit der Anzahl an GAA Wiederholungen einhergehen. Besonders wenn die Anzahl der Wiederholungen gering ist, erlaubt dies eine höhere Expression des Frataxin Gens und dadurch einen weniger gravierenden Mangel dieses Proteins als bei Personen mit einer hohen Anzahl an Wiederholungen [PANDOLFO M., 1999].

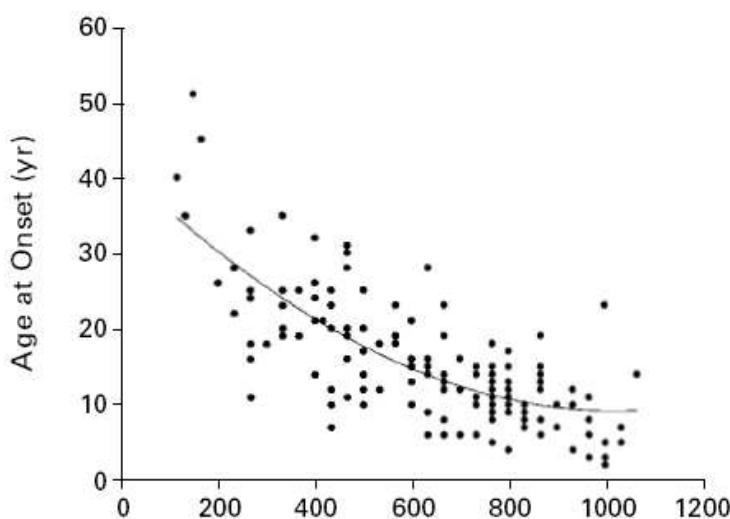


Abb. 1: Korrelation zwischen dem Auftreten der Krankheit und der Anzahl an GAA Wiederholungen im kleineren Allel ( $r = -0.7$ ,  $P < 0,001$ ) [DÜRR A et al. 1996]

In der Studie von DÜRR A. et al., 1996 wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Anzahl der GAA-Wiederholungen in FRDA's erstem Intron und dem Patientenalter zu Beginn der Krankheit besteht. So geht eine höhere Anzahl an Wiederholungen mit einer frühen Manifestation der Krankheit und einem früheren Verlust der Mobilität einher, während eine geringere Anzahl einen Einfluss auf die Häufigkeit von Reflexverlust in den oberen Extremitäten mit sich zieht.

Im Echokardiogramm konnte bei den meisten Patienten mit einer hohen Anzahl an Wiederholungen auf dem kleineren Allel meist eine Kardiomyopathie festgestellt werden, wobei die durchschnittliche Anzahl  $740 \pm 180$  betrug, im Gegensatz zu Patienten ohne Kardiomyopathie ( $57 \pm 210$ ). Das Vorhandensein einer Kardiomyopathie steht in keinem Zusammenhang mit der Dauer der Krankheit.

Auch das Auftreten von Skoliose und Pes Cavus korreliert stark mit steigender Anzahl an GAA-Wiederholungen.

Nicht mit der Anzahl der Wiederholungen, sondern mit der Dauer der Krankheit assoziierte Symptome sind Dysarthrie, verminderter Vibrationssinn, verminderte Sehschärfe, Gehörverlust und Schluckbeschwerden.

Symptome wie Areflexie in den unteren Extremitäten und Diabetes mellitus standen weder mit der Anzahl der Wiederholungen noch mit der Dauer der Krankheit in Verbindung.

Hingegen hängen einige klinischen Merkmale wie die Häufigkeit des Fußsohlenreflexes, Muskelschwäche und Amyotrophie in den unteren Extremitäten sowohl mit der Anzahl der GAA-Wiederholungen sowie mit der Dauer der Krankheit zusammen [DÜRR A. et al., 1996]. In einer Studie von BIT-AVRAGIM N. et al, 2001, konnte weiters gezeigt werden, dass die Anzahl der GAA-Wiederholungen in Zusammenhang mit dem Grad der linksventrikulären Hypertrophie steht, nicht aber mit der Schwere der hypertrophen Kardiomyopathie [BIT-AVRAGIM N. et al., 2001].

Durch Magnetresonanzspektroskopien des Skelettmuskels von Patienten konnte eine verringerte ATP-Synthese nach körperlicher Belastung aufgezeigt werden, wobei diese Verminderung invers mit der GAA-Expansion korreliert [PANDOLFO M., 2002].

#### **2.1.4 Pathogenese der Friedreichs Ataxie**

Im Normalfall beginnt die Friedreichs Ataxie schon sehr früh zwischen dem 8. und 16. Lebensjahr, wobei ein frühes Manifestationsalter auch häufig mit einem raschen Krankheitsverlauf und –fortschritt einhergeht. Ein weniger progressiver Verlauf der Krankheit korreliert daher mit einem höheren Alter bei der Manifestation der Friedreichs Ataxie.

Die Diagnose der Krankheit ist oft sehr schwierig, da ihr Verlauf von Anfang bis Ende sehr schleichend vorangeht. Die ersten Symptome reichen von Gleichgewichtsstörungen über in weiterer Folge Störung der Oberflächen- und Tiefensensibilität (Pinguingang) bis hin zu ataktischen Störungen und Areflexien.

Diese Symptome sind bedingt durch Störungen im Zentralnervensystem. Weiters kann es im Verlauf der Krankheit neben neurologischen Störungen zu Skelettdeformationen und Kardiomyopathie kommen [ALPER G., NARAYANAN V., 2003].

## 2.1.5 Klinische Merkmale der Friedreichs Ataxie

Das Hauptsymptom der Krankheit ist eine unaufhaltsame Ataxie, die mit einem unbeholfenen Gang beginnt. Im Normalfall beginnt die Krankheit in der Pubertät wobei sich die Zeitspanne bis hin zum 25. Lebensjahr rauszögern kann.

Die essentiell klinischen Eigenschaften sind:

- Eine autosomal-rezessive Vererbung
- Ausbruch der Krankheit vor dem 25. Lebensjahr
- Gang- und Extremitäten- Ataxie
- Verlust der Sehnenreflexe in den unteren Extremitäten
- Dysartrie
- Steigende Schwäche der Beine mit kompletter Immobilität nach 7-15 Jahren ab Beginn der Krankheit

Bei den meisten Patienten manifestiert sich früher oder später eine Kardiomyopathie, wobei abhängig vom Schweregrad der Kardiomyopathie der weitere Verlauf der Friedreichs Ataxie stark beeinflusst werden kann. Weitere häufig vorkommende Symptome sind Neuropathien, sensorineurale Taubheit, optische Atrophie und Diabetes mellitus [DONATO DI. S. et al., 2001].

Die häufigste Todesursache ist eine Kardiomyopathie [ALPER G., NARAYANAN V., 2003].

### 2.1.5.1 Friedreichs Ataxie und Kardiomyopathie

In einer Studie von BIT-AVRAGIM N. et al., 2001 wurden im Vergleich zwischen Kontrollgruppen und FRDA-Patienten folgende Unterschiede aufgezeigt: Die FRDA-Patienten waren signifikant jünger und hatten geringeres Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $P<0,001$ ). Die Herzschlagrate war bei den Patienten stark erhöht ( $P<0,5$ ) und systolischer ( $P<0,001$ ) sowie diastolischer ( $P<0,01$ ) Blutdruck waren signifikant erniedrigt. Weiters unterschieden sich die FRDA-Patienten von der Kontrollgruppe durch signifikant dickere interventrikulare Mittelwände und die hintere Wanddicke [BIT-AVRAGIM N. et al., 2001].

In einer weiteren Studie von ALBANO L. M. J. et al., 2002 wurden 25 brasilianische Patienten mit klinisch diagnostizierter FRDA in Hinblick auf kardiale Parameter, verbunden mit Häufigkeit und Größe der GAA-Wiederholung, untersucht. Dabei hatten alle Patienten mit homozygoter GAA-Expansion elektrokardiographische Abweichnungen, hauptsächlich solche, die mit der ventrikularen Repolarisierung verbunden waren [ALBANO L. M. J. et al., 2002].

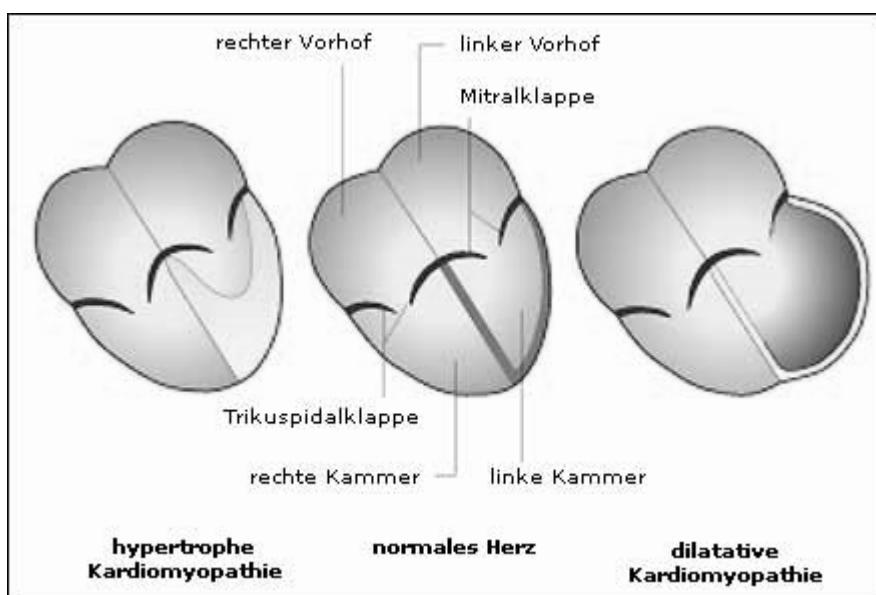


Abb. 2: Schematische Darstellung von Kardiomyopathien

[[www.dak.de/content/files/109532730984126084.jpg](http://www.dak.de/content/files/109532730984126084.jpg); Stand 02.09.2009]

Dies verdeutlicht, welch schwerwiegende Begleiterscheinung die Kardiomyopathie bei der Friedreichs Ataxie ist.

## **2.1.6 Diagnose der Friedreichs Ataxie**

### **2.1.6.1 Klinische Diagnose**

Neben der Ataxie gibt es verschiedene Kernmerkmale, deren Ausprägung mit Dauer der Krankheit ansteigen. Vor allem Skelett- als auch Fußdeformationen wie Pes Cavus, Pes Planus oder auch Pes Aequinovarus treten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf. Wenn zusätzlich noch eine Amyopathie der unteren Beine und seltener auch der Hände vorkommt, verbunden mit einem frühen Krankheitsbeginn (<20 Jahre), sollte eine genetische Untersuchung veranlasst werden, um die Diagnose zu bestätigen. Ein zusätzlicher Hinweis zur Diagnose der Friedreichs Ataxie ist die optische Atropie, welche bei rund 25% der Patienten vorkommt. Das wichtigste nicht-neurologische Merkmal der Friedreichs Ataxie ist, wie schon erwähnt, die Kardiomyopathie. Aus diesem Grund sollte eine Untersuchung immer ein EKG beinhalten, sowie die Bestimmung des Blutzuckergehalts, da Diabetes mellitus und Insulinresistenz im Allgemeinen ebenso häufig bei Friedreichs Ataxie Patienten vorkommen [WOOD N. W., 1998].

### **2.1.6.2 Neurologische Einteilung und Diagnose**

Um den Krankheitsverlauf, im speziellen die neurologischen Symptome und das Feststellen klinischer Parameter zu überprüfen gibt es zwei Skalen – „The International Cooperative Ataxia Rating Scale“ (ICARS) und „The Friedreich Ataxia Rating Scale“ (FARS), wobei der ICARS nicht für die Einteilung von FRDA Patienten mit langer Krankheitsdauer geeignet ist.

FARS beinhaltet Unterpunkte, welche das Krankheitsstadium, das tägliche Leben, die Koordination der oberen und unteren Extremitäten, bulbare und

periphere Nervenfunktionen, Gleichgewichtssinn, orale und motorische Kontrolle, sowie die Ganggeschwindigkeit miteinbeziehen [SCHULZ J. B. et al., 2009].

#### **2.1.6.3 Genetische Diagnose**

Um einen direkten Nachweis der GAA-Repeat-Expansion im ersten Intron von Frataxin zu erbringen, werden herkömmliche Techniken wie Polymerase Kettenreaktion und Southern Blot Analysen angewendet. Die Diagnose kann gestellt werden wenn in beiden Kopien des Frataxin Gens GAA-Wiederholungen ( $\text{GAA} > 66$ ) auftreten. Obwohl eine Korrelation zwischen der Länge der Wiederholungen, dem Alter bei Beginn sowie der Schwere der Krankheit vorliegt, kann die Länge der Expansion nur bedingt für individuelle Prognosen herangezogen werden. Denn Patienten mit derselben Anzahl an Wiederholungen unterscheiden sich oft grundlegend im Alter bei Beginn der Friedreichs Ataxie und dem Schweregrad der Krankheit [SCHULZ J.B. et al., 2009].

## 2.2 Frataxin

### 2.2.1 Struktur des Proteins Frataxin

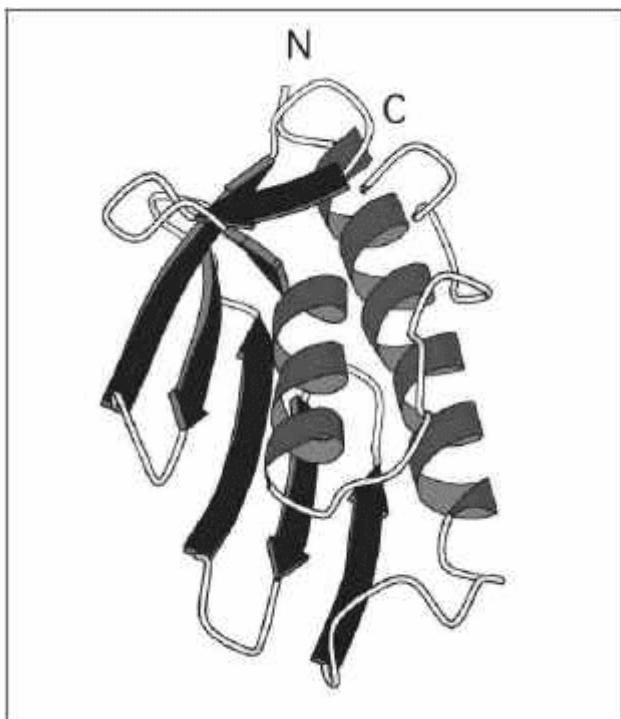


Abb. 3: Struktur von Frataxin

[<http://www.nimr.mrc.ac.uk/molstruct/pastore/frataxin/>; Stand 01.09.2009]

Das humane Frataxin wird als ein aus 210 Aminosäure aufgebautes Vorläuferprotein gebildet, welches in der mitochondrialen Matrix durch die Mitochondrial Processing Peptidase (MPP) proteolytisch gespalten wird und anschließend in seine reife Form übergeführt wird. In älteren Studien wurde gezeigt, dass die reife Form des Frataxins durch die Aminosäuren 56-210 (m(56)-FXN) codiert wird. Daneben gibt es noch andere Studien nach welchen zwei weitere Formen beschrieben werden, nämlich mit 78-210 Aminosäuren (m(78)-FXN) sowie mit 81-210 Aminosäuren (m(81)-FXN).

In einer Studie von SCHMUCKER S. et al., 2008 wurde die reife Frataxinform als m(81)-FXN, Aminosäuren 81-210, dargestellt, welches Fibroblasten, denen Frataxin vollständig fehlte, vor der Apoptose bewahrte. Weiters konnte auch gezeigt werden, dass m(56)-FXN und m(78)-FXN gebildet werden, wenn der

normale Frataxin-Reifungsprozess beeinträchtigt ist, wobei ihre physiologische Relevanz nicht geklärt ist. Auch das d-FXN, welches bis jetzt als Abbauprodukt bezeichnet wurde, stellt m(78)-FXN dar. Generell werden alle Frataxin-Isoformen im Mitochondrium gebildet und wirken vermutlich dort.

Es ist notwendig das N-terminale Ende des Frataxins genau zu identifizieren um einen besseren Ansatz für therapeutische Möglichkeiten zu haben, besonders in Hinblick auf eine mögliche Frataxin-Ersatztherapie [SCHMUCKER S. et al., 2008].

## 2.2.2 Funktionen des Proteins Frataxin

Die Funktion von Frataxin ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ein Mangel an diesem Protein führt auf jeden Fall zu mitochondrialer Eisen-Akkumulation, Verminderung von Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzymen und zu erhöhter oxidativer Zellschädigung, sowohl in Frataxin-verminderten Hefe- als auch Mauszellmodellen, sowie Gewebe- und Zellkulturmodellen von FRDA-Patienten.

### 2.2.2.1 Frataxin und Eisenmetabolismus

Die ersten Untersuchungen bezüglich der Funktion von Frataxin wurden im Hefemodell mit Yfh1p, dem Frataxin Homolog, durchgeführt. An diesem Modell konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Yfh1p den Eisen-Export aus dem Mitochondrium behindert. Dies führt zu cytoplasmatischem Eisen-Verlust, mitochondrialem Eisen-Überschuss und einer vermehrten Eisenaufnahme in die Plasmamembran [PRAGNA I. et al., 2001].

Dies lässt darauf schließen, dass Frataxin beim Export von Eisen aus dem Mitochondrium, der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und/oder Schutz vor oxidativer Schädigung, beteiligt ist [CAVADINI P. et al., 2001].

Es konnte weiters gezeigt werden, dass Holo-Frataxin ein hoch affiner Eisen-bindender Partner für die humane Ferrochelatase ist. Die Ferrochelatase ist ein

mitochondriales membranassoziiertes Protein, welches den letzten Schritt der Häm-Biosynthese katalysiert [YOON T., COWAN A. J., 2004].

Erst kürzlich wurden Vermutungen aufgestellt, dass CyaY, das bakterielle Frataxin, als Eisen-Sensor fungiert, der die Eisen-Schwefel-Cluster Bildung reguliert [ADINOLFI S. et al., 2009].

### **2.2.2.2 Frataxin und die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern**

Iron-Sulfur-Cluster (ISC) sind Komplexe von Eisen- und Schwefelatomen, welche als prosthetische Gruppe für eine Reihe von Enzymen mit unterschiedlichen Funktionen fungieren. Dazu gehören Enzyme des Energie-Metabolismus, wie die Aconitase und die Komplexe I, II und III der Atmungskette, Enzyme des Eisen-Metabolismus wie Iron Responsive Protein 1 (IRP 1) und die Ferrochelatase sowie Enzyme die an der Purin-Synthese und DNA-Reparatur beteiligt sind. Diese ISCs kommen in verschiedenen zellulären Kompartimenten wie Zellkern, Mitochondrium und Cytosol vor und ein Mangel an Frataxin äußert sich in multiplen Enzym Fehlfunktionen [MARTELLI A. et al., 2007].

In Gewebsuntersuchungen von Friedreichs Ataxie Patienten wurde gezeigt, dass ein Mangel an Frataxin in einer Verminderung der Eisen-Schwefel-Cluster resultiert. Daraus konnte schnell eine Verbindung zwischen einem Mangel an Frataxin und der Verminderung von Eisen-Schwefel-Clustern gezogen werden [PANDOLFO M., PASTORE A., 2009].

Des Weiteren konnte eine verminderte Aktivität der Fe-S-Cluster enthaltenden Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskomplexe I, II und III in endomyokardialem Gewebe von FRDA-Patienten gefunden werden. Auch die Aconitase, ein Fe-S-Protein welches in die Eisen-Homöostase involviert ist, war vermindert, sowie verschiedene Fe-S-abhängige Enzyme. Diese verminderte Enzymaktivität im Hefemodell sowie bei FRDA-Patienten hängt mit einer

mitochondrialen Eisenakkumulation zusammen vor allem da Fe-S-Proteine gegenüber freien Radikalen sehr empfindlich sind [RÖTNIG A. et al., 1997].

Der vermindernde Effekt von Frataxin auf die Enzymaktivität von Fe-S-Proteinen konnte zusätzlich bestätigt werden, da gezeigt wurde, dass ein Mangel an Yfh1 nicht automatisch zu einem signifikanten Verlust von Fe-S-Cluster enthaltenden Enzymen führt, wenn der mitochondrialen Eisen-Akkumulation und somit oxidativem Schaden vorgebeugt wird [PRAGNA I. et al., 2001].

Die Iron-Sulfur-Unit-Proteine (ISU Proteine) mit 2Fe-2S Zentren sind eine Möglichkeit diese Eisen und Schwefel Atome zu einem apo-Zielprotein zu transportieren. Das Zwischenprodukt, 2Fe-2S-ISU-gebundene Cluster, wird dadurch gebildet, dass Eisen und Schwefel zu den apo-ISU transportiert werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass humanes Frataxin 6 bis 7 Eisenionen binden kann. Dieses holo-Frataxin kann ganz im Gegensatz zu dem apo-Frataxin einen Komplex mit dem ISU-Protein bilden. Dies lässt vermuten, dass Eisen eine wichtige Rolle in Verbindung der beiden Proteine besitzt oder essentiell für die Strukturstabilität von Frataxin ist [YOON T., COWAN J. A., 2003].

### **2.2.2.3 Frataxin als Eisenspeicherprotein**

Frataxin ist ein Eisen-bindendes Protein. CyaY und Yhf1 zeigen die Fähigkeit, zwei  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit vergleichbaren Dissoziationskonstanten zu binden. Die Situation mit humanem Frataxin (hFXN) ist weit komplexer, da unterschiedliche Konstrukte 6 bis 7 Eisen-Kationen pro Monomer mit stark unterschiedlichen Dissoziationskonstanten binden können, unabhängig ob es sich um  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  handelt. Frataxin ist ein eher ungewöhnliches eisenbindendes Protein, da die meisten eisenbindenden Proteine das Eisen durch Cystein, unterstützt von Histidin und Säure-Gruppen, koordinieren, im Gegensatz zu Frataxin, welches

die Eisenkoordination ausschließlich durch Glutamat und Aspartat an der Proteinoberfläche bewerkstellt [PANDOLFO M. et al., 2009].

### 1.1.1.1 Frataxin und oxidativer Stress

Oxidativer Stress kann in Frataxin-defizienten Zellen vorkommen und hängt mit dem gestörten Eisen-Metabolismus zusammen. Der erste Beweis dafür wurde in Hefe erbracht, in welcher das Frataxin-Homolog nicht exprimiert wurde. In diesem Modell kam es zu einer Eisen Akkumulation im Mitochondrium und erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Reactive Oxygen Species (ROS) [BRADLEY J. L. et al., 2000].

Auch bei in vitro Versuchen mit Zellen von FRDA Patienten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die beiden Modelle sind sehr empfindlich gegenüber Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), da aus  $H_2O_2$  das hoch toxische Radikal  $OH^-$  durch Reaktion mit  $Fe^{2+}$  entsteht.  $OH^-$  beschädigt Proteine, Fette und Nucleinsäuren.

Bei der Friedreichs Ataxie entstehen erhöhte Werte von  $Fe^{2+}$  sowie  $H_2O_2$ , was gemeinsam zu einer stark erhöhten  $OH^-$  Produktion führt. Die erhöhten Eisenmengen entstehen durch verminderte ISC-Synthese und die vermehrte  $H_2O_2$  Bildung ist bedingt durch eine Verminderung der Aktivität der Atmungskette, nämlich durch Verminderung der ISC-enthaltenden Komplexe I, II und III [PANDOLFO M., 2009].

## 2.2.3 Häm-Biosynthese

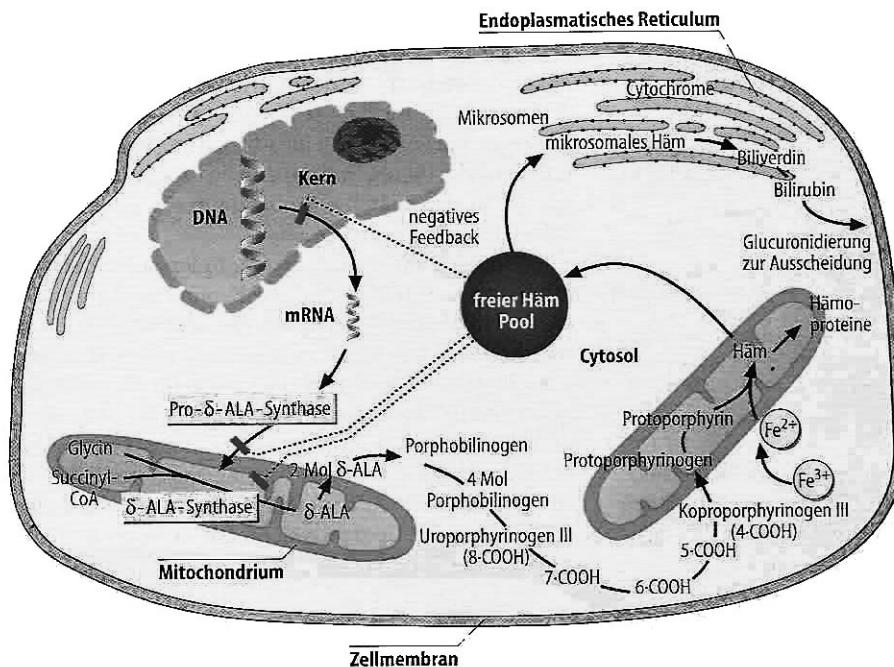


Abb. 4: Verteilung der Häm-Biosynthese auf zwei Zellkompartimente, Mitochondrium und Cytosol [LÖFFLER G, PETRIDES P, 1998]

Die Häm-Biosynthese läuft im wesentlichen im Knochenmark (85%), aber auch in der Leber ab, wobei die einzelnen enzymatischen Schritte, bis auf funktionelle Charakteristika und Vorhandensein von Isoenzymen in den beiden Geweben ident sind.

Startend im Mitochondrium entsteht aus Succinyl-CoA und Glycin  $\delta$ -Aminolävulinat. Zwei Moleküle  $\delta$ -Aminolävulinat kondensieren im Anschluss nach dem Übertritt ins Cytosol zu Porphobilinogen (PBG). Mit drei weiteren PGB-Molekülen und unter 4xNH<sub>3</sub> Abspaltung entsteht, mit Hilfe der PGB-Desaminase, Hydroxymethylbilan und durch die PGB-Isomerase weiter Uroporphyrinogen III. Im nächsten Schritt werden die Acetatgruppen der vier Ringe zu Methylgruppen decarboxyliert und Koproporphyrinogen III entsteht, welches wieder ins Mitochondrium übertritt. Durch diverse Decarboxylierungs- und Dehydrierungsschritte entsteht Protoporphyrinogen IX und daraus entsteht durch die Protoporphyrinogen-Oxidase Protoporphyrin IX, das letzte Zwischenprodukt vor dem Häm [LÖFFLER G., PETRIDES P., 1998].

### 2.2.3.1 Frataxin und Häm-Biosynthese

Der letzte Schritt der Häm-Biosynthese wird durch die Ferrochelatase katalysiert. Dabei wird ein Fe<sup>2+</sup> Atom zentral in das Protoporphyrin IX eingebaut [LÖFFLER G., PETRIDES P., 1998].

Der Einfluss von Frataxin auf die Häm-Synthese stellt sich unter anderem durch Interaktion mit der Ferrochelatase, welche Eisen in Porphyrin einfügt, dar. In modifizierter Yfh1-loser Hefe konnte eine Verminderung der Cytochrom C-Oxidase Aktivität und starke Mängel an Cytochrom b, c und (a+a3) gezeigt werden, welche durch Gabe von Yfh1 wieder rückgängig gemacht werden konnten. Auch im Hefe- sowie Bakterien-Modell konnte eine hoch-affine Interaktion zwischen Frataxin und der Ferrochelatase dargestellt werden, wobei die Reaktion stöchiometrisch mit einem Yfh1 Monomer pro Ferrochelatase Dimer ist [PANDOLFO M et al., 2009].

In Bezug auf die Hämoglobinsynthese wurde in einer Studie von BECKER E. et al., 2002 untersucht, welchen Einfluss eine gesteigerte Hämoglobinsynthese durch Induktion der Differenzierung von Friend-Zellen durch Dimethyl sulfoxid (DMSO) auf die Frataxin Expression hat. Dabei ergab sich eine signifikante Verminderung der Frataxin-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in Hämoglobin produzierenden Zellen [BECKER E. et al., 2002].

## 2.2.4 Erythropoese

Das Blut enthält eine Reihe korpuskulärer Elemente die vorwiegend im Knochenmark gebildet werden. Man unterteilt die Blutzellen in drei Gruppen: weiße Blutzellen (Leukozyten), rote Blutzellen (Erythrozyten) und Thrombozyten. Diese Blutzellen zirkulieren im Körper im Blutplasma, welches viele lösliche Komponenten, wie Albumin und Globulin, Elektrolyte ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2/3+}$ ), Hormone und Nährstoffe, wie Zucker, Salz und Aminosäuren, sowie metabolische Endprodukte enthält [LEBERBAUER C., 2005].

Die Aufgaben der Blutzellen sind vielfältig. Die Hauptfunktion der Leukozyten ist die Infektionsabwehr, Thrombozyten sind für die Blutgerinnung verantwortlich und die Erythrozyten transportieren Sauerstoff mit Hilfe von Hämoglobin zu den Geweben und Kohlendioxid zurück zur Lunge. Erythrozyten bestehen zu beinahe 90% aus Hämoglobin, welches dem Blut auch die Farbe verleiht [LÖFFLER G., PETRIDES P., 1998].

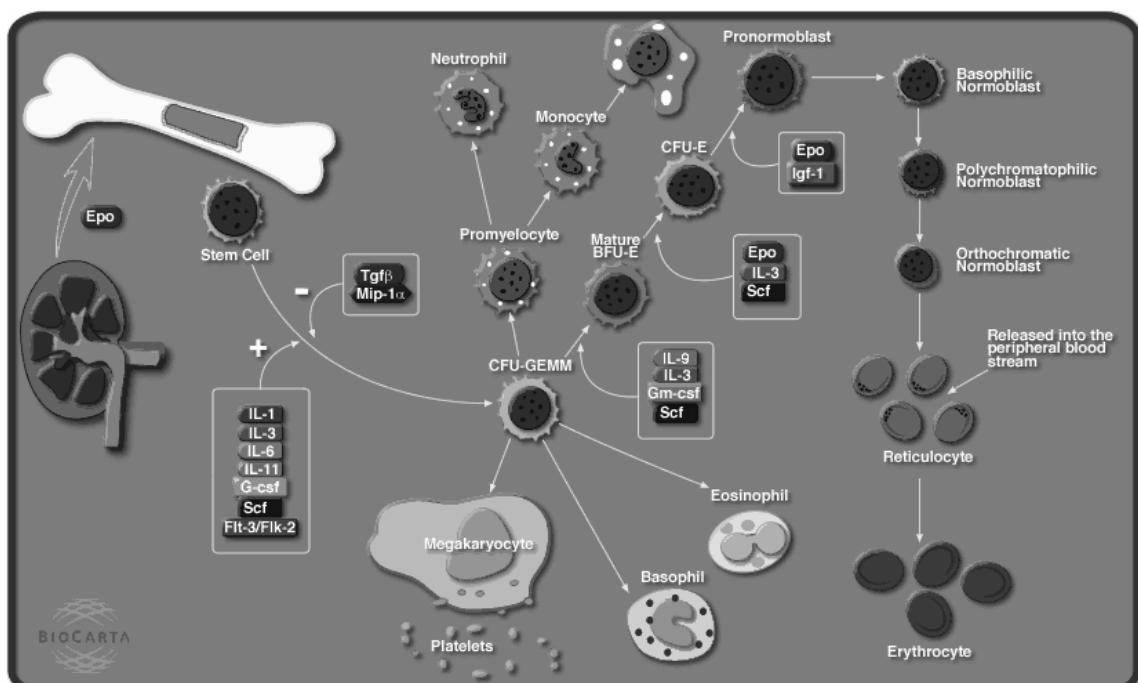


Abb. 5: Erythropoese in der Maus startend im Knochenmark angeregt durch Erythropoetin [HICKEY G, [http://www.biocarta.com/pathfiles/m\\_erythPathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/m_erythPathway.asp), Stand:24.08.2009]

Die Erythropoese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, in welchem hämatopoetische Stammzellen (HSC) zu reifen Erythrozyten differenzieren.

Bei diesen verschiedenen Differenzierungsschritten entstehen zunächst frühe erythroide Progenitorzellen (burst forming unit-erythroid, BFU-E), weiters späte erythroide Progenitorzellen (colony-forming unit-erythroid, CFU-E), schließlich reifen diese zu Erythrozyten. Während dieses Differenzierungsprozesses werden die Zellen sensitiv gegenüber Erythropoetin (Epo) und anderen Zytokinen die die gesamte Hämatopoese und somit auch die Erythropoese regulieren [LEBERBAUER C., 2005].

Die humane Erythropoese kann in drei alters abhängige Phasen eingeteilt werden:

In der Embryonalphase wird die Erythropoese in zwei Phasen unterteilt, die primitive und die definitive erythroide Zelllinie. Bei der primitiven erythroiden Zelllinie, entstehen die ersten erythroiden Progenitorzellen in Blutinseln im „Yolk Sac“ bzw. Dottersack, einer extraembryonalen Membranstruktur. Diese primitiven erythroiden Zellen haben einen sehr großen Durchmessen und besitzen einen Zellkern. Die zweite embryonale Phase der Erythrozytenproduktion findet in der Leber statt. In der dritten und finalen Phase entstehen die Erythrozyten im Knochenmark [MARKS P. A. et al., 1969].

#### **2.2.4.1 Wirkung von Erythropoetin und SCF auf die Erythropoese**

Die Entstehung von roten Blutkörperchen aus hämatopoetischen Stamm- bzw. Progenitorzellen ist durch eine Vielzahl von Zytokinen genau reguliert, welche sowohl für das limitierte Wachstum als auch für die fertige Differenzierung essentiell sind.

Die wichtigsten Faktoren die die Erythropoese regulieren sind Erythropoetin (Epo) und der Stammzellfaktor (Stem cell factor, SCF).

Epo wurde erstmals 1906 als regulierende Substanz für die Hämatopoese von Carnot und De Flandre erkannt. Erst einige Zeit später fand man heraus, dass diese Substanz ausschließlich für das erythrozytäre Wachstum verantwortlich ist [BERIS PH., 1998].

Epo ist ein 34-kD Glycoprotein, welches die Zellviabilität, die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Progenitorzellen *in vivo* und *in vitro* unterstützt. SCF wurde anfänglich als stimulierender Faktor für die Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Progenitorzellen identifiziert und unterstützt synergistisch mit Epo ebenso das Wachstum von erythroiden Progenitorzellen [PANZENBÖCK B. et al., 1998].

Die steady-state Erythropoese wird durch Epo kontrolliert, während die Stress-Erythropoese, induziert durch Hypoxie, von mehreren Faktoren koreguliert wird, wie Epo, SCF und Glucokortikoiden zum Beispiel Cortisol oder dem künstlichen Glucokortikoid Dexamethason (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon)

Die Funktion des Dexamethasons bei der Proliferation von erythroiden Progenitorzellen, liegt hauptsächlich darin, dass es die Differenzierung hemmt und die Proliferation unterstützt [KOLBUS A. et al., 2003].

## 2.3 Mögliche Therapieformen

Viele verschiedene humane Erkrankungen sind mit einer Fehlverteilung von Eisen innerhalb der Zelle assoziiert. Darunter fällt auch die Friedreichs Ataxie, bei der es zu einer mitochondrialen Eisen-Akkumulation kommt.

### 2.3.1 Eisenchelatoren

Eisen-Chelatierung ist ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Therapie der Friedreichs Ataxie, wobei der anfängliche Enthusiasmus über den Chelator Deferrioxamin nachlässt. Er kann zwar Eisen in der Extrazellulärflüssigkeit und im Cytosol chelatisieren, nicht aber das akkumulierte Eisen im Mitochondrium [PANDOLFO M., 2002].

In einer Studie von KAKHLON O. et al., 2008 wurde die Fähigkeit von Deferiprone untersucht, einem Eisen-Chelator, welcher fähig ist, Eisen innerhalb und durch Zellen zu transportieren sowie das Eisen möglichen Akzeptoren zu übergeben. Außerdem kann Deferipron die Blut-Hirn Schranke durchschreiten. In dieser Studie an einem Frataxin-defizienten Zellmodell konnte gezeigt werden, dass Deferiprone mitochondriale schwankende Eisen-Pools vermindern kann, oxidativer Schädigung vorbeugen und die Wiederherstellung verschiedener metabolischer Parameter wie die Aconitase-Aktivität positiv beeinflussen kann [KAKHLON A. et al., 2008].

### 2.3.2 Antioxidantien

#### Coenzym Q10

Da bei der Friedreichs Ataxie die oxidative Phosphorylierung fehlerhaft ist, eine erhöhte oxidative Schädigung auftritt, sowie eine fehlerhafte Funktion der Atmungskette vorliegt, liegt der Ansatz einer Behandlung mit einer antioxidativen und bioenergetischen Therapie nahe. In einer Studie von HART P. E. et al., 2005 konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Gabe von Coenzym Q10 und Vitamin E über einen Zeitraum von drei Monaten signifikant den Energie-Stoffwechsel in Herz- und Skelettmuskel verbessern konnte [HART P. E. et al., 2005].

#### Idebenone

Idebenone ist ein kurzkettiges Benzo-Chinon mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Coenzym Q10. Das Medikament wurde in unterschiedlichen Dosen (5-45mg/kg/Tag) und über verschieden lange Zeiträume (1,5-84 Monate) getestet. In den meisten Studien ergab sich eine signifikante Verbesserung, sowohl bezogen auf die klinischen kardialen Symptome der Krankheit (bewertet durch: linker ventrikularer Massen Index (LVMI), generelle Herzfunktion), als auch hinsichtlich der neurologischen Beeinträchtigungen die durch die Krankheit entstehen (bewertet durch: ICARS Skala und Motorische Fähigkeiten). Nebenbei wurde auch eine dosisabhängige Verbesserung festgestellt [SCHULZ J. B. et al., 2009].

### 2.3.3 RHuEpo

Rekombinantes humanes Erythropoetin (RhuEpo) ist ein körpereigenes Glykoprotein, welches in der Niere produziert wird und im Knochenmark die Erythrozytenbildung anregt. Es hat ein breites neuro- und kardioprotektives

Wirkungsspektrum und wird schon lange zur Behandlung von Patienten mit Niereninsuffizienz eingesetzt.

Im Bezug auf die Friedreichs Ataxie konnte gezeigt werden, dass rHuEpo die Frataxin-Expression signifikant steigern kann. Weiters konnte gezeigt werden, dass die subkutane Gabe von rHuEpo bei FRDA-Patienten auch die Ataxie Rating Scales signifikant verbessert und Indikatoren für den oxidativen Stress verringert werden. Jedoch kam es bei der Hälfte der Patienten auch zu einem Anstieg des Hämatokrits [BOESCH S. et al., 2008, STURM B. et al., 2005]. In einer Studie mit Fibroblasten von FRDA-Patienten wurde auch gezeigt, dass neben der signifikanten Erhöhung der Frataxin Protein-Expression die mRNA-Expression nicht erhöht wurde [ACQUAVIVA F. et al., 2008].

### **2.3.4 Histon-Deacetylase Inhibitoren**

Durch den Einsatz einer Klasse von Histon-Deacetylierungs Inhibitoren kann die verminderte Frataxin-Expression, wie sie in der Friedreichs Ataxie vorkommt, rückgängig gemacht werden. Dies konnte in einer Studie mit primären Lymphozyten von FRDA-Patienten gezeigt werden. Die verminderte Frataxin-Expression in der FRDA geht oft mit einer Hypoacetylierung der Histone H3 und H4 und einer Trimethylierung von Histon H9 an Lysin 9 einher, was zu einer Hemmung der Frataxin-Expression führt [HERMAN D. et al., 2006].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellkultur

Die Arbeit mit der Zellkultur bedingt, dass man in erster Linie auf Sterilität achten muss. Aus diesem Grund werden sämtliche Tätigkeiten in einer Sterilbank (Laminar Air Flow Bio-II-A; Telestar) durchgeführt. Bevor man mit den Zellen zu arbeiten beginnt, werden alle benötigten Materialien, wie Pipetten und Spülzonen sowie die Handschuhe und die Sterilbank selbst mit 70%igem Ethanol gereinigt. Sämtliche Geräte die zur Arbeit in der Zellkultur benötigt werden, wie Glasflaschen und Glaspipetten, müssen zuvor in einem Heißluftsterilisator (WTB Binder) bei 160°C 8 Stunden sterilisiert werden. Kunststoffspitzen für Pipetten, sowie destilliertes Wasser für den Brutschrank werden mit einem Wasserdampfsterilisator (Varioklav®, Vertrieb: Uni Equip) bei 140°C und 2 bar 20 Minuten autoklaviert. Lösungen, wie das Zellkulturmedium oder zu einem späteren Zeitpunkt verwendete Zusätze und Faktoren werden mittels Spritzen-Sterilfiltration durch eine Membran mit 0,22µm Porengröße sterilfiltriert (Fa Roth, Rotilabo®), um Keimfreiheit gewährleisten zu können.

Nach dem Gebrauch wird die Sterilbank über Nacht mit einer UV-Lampe steril gehalten.

#### 3.1.1 Zelllinien

##### 3.1.1.1 K562-Zellen

Für den ersten Teil der Arbeit wurde die Zelllinie K562 verwendet. Dabei handelt es sich um Zellen, die aus der pleuralen Effusion einer 53 jährigen Frau mit chronischer, myeloischer Leukämie etabliert wurden [LOZZIO C. B. et al., 1975]. Diese Zelllinie dient als Modell für humane erythroide Zellen.

### 3.1.1.2 ESMS (erythroide Stammzellen Maus)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um primäre Zellen, welche aus isolierten fötalen Mäuselebern gezüchtet wurden. Dabei handelte es sich um die Lebern von 12,5-14,5 Tage alten Mäuseembryos. Diese Zellen dienen als gutes Modell der Erythropoese, da diese erythroiden Progenitorzellen zu einer großen Zahl herangezüchtet und im Anschluss kontrolliert zu Erythrozyten differenziert werden können [DOLZNIG H. et al., 2001].

## 3.1.2 Herstellung des Nährmediums

### 3.1.2.1 RPMI-Nullmedium für K562-Zellen

Das Standardmedium für die Kultivierung der K562-Zellen ist das RPMI-1640 (Biochrom KG) Medium.

- Das RPMI-Trockenmedium wird in ca. 7 Liter bidestilliertem Wasser mit dem Magnetrührer (IKA® RCT basic) vollständig gelöst.
- 20g Natriumhydrogencarbonat (in bidestilliertem Wasser gelöst) werden hinzugefügt.
- Nach ca. 1 Stunde Rühren wird der pH-Wert mittels 5N HCL auf 7,2 eingestellt und auf das Endvolumen von 10 Litern aufgefüllt.

Da das Medium für die Zellkultur benötigt wird, muss es vor der Anwendung sterilfiltriert werden. Die 10 Liter RPMI-Nullmedium werden in der Sterilbank durch einen 0,2µm Sterilfilter (Sartolab P plus, Satorius) in 500 ml sterile Glasflaschen abgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei +4°C.

Zur Qualitätskontrolle werden in sterilen Petrischalen Proben des Nullmediums angesetzt und bei 37°C bis zu 10 Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop auf Keime untersucht.

### 3.1.2.1.1 Komplettieren des RPMI-Nullmediums

Folgende Zusätze werden dem RPMI Medium steril, für ein optimales Zellwachstum zugefügt:

- 50 ml FCS (Stammlösung: 10x; Fetal calf serum - Heat Inactivated), (GIBCO®)
- 5 ml L-Glutamin, (Stammlösung: 100x; PAA Laboratories GmbH)
- 5 ml Pen/Strep (Stammlösung: 100x; Penicillin/Streptomycin), (Sigma)

### 3.1.2.2 StemPro-34™ für ESMS-Zellen

Das StemPro-34™-Medium ist ein fertiges, serumfreies Stammzellenmedium (Life Technologies, Gibco BRL, Life Technologies, Invitrogen, Austria).

Komplettiert wird das Nullmedium durch die Zugabe von:

- 25µl/ml Nutrimix (Stammlösung: 40x; Nutrient Supplement, Gibco, Austria)
- 10µl/ml L-Glutamin (Stammlösung: 100x)
- 10µl/ml Pen/Strep (Stammlösung: 100x; Penicillin/Streptomycin) Antibiotikum

Dies bewirkt einen Schutz vor bakterieller Infektion und gewährleistet in Kombination mit den folgenden Faktoren ein optimales Wachstum.

### 3.1.2.2.1 StemPro-34™ Kultivierungsmedium

Diese Zytokine und Hormone sind notwendig, um die erythroiden Progenitorzellen in großer Zahl züchten zu können und werden dem StemPro-34™ Medium steril zugefügt:

- |   |          |
|---|----------|
| • EPO humanes rekombinantes Erythropoetin | 2U/ml    |
| • SCF stem cell factor                    | 100ng/ml |
| • Dexamethason                            | 1µM      |
| • IGF-1 insulin-like growth factor        | 40ng/ml  |

### **3.1.2.2.2 StemPro-34™ Differenzierungsmedium**

Diese Zytokine und Hormone sind notwendig um die Zellen kontrolliert zu differenzieren und werden dem StemPro-34™ Medium steril zugefügt:

- EPO humanes rekombinantes Erythropoetin 10U/ml
  - Insulin 10ng/ml
  - Holo transferrin 1mg/ml
  - Mifepriston 3µM

## **Herstellen und Lösen der Substanzen**

## **5x PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,3)**

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

**Tabelle 1.: Herstellungsanleitung für den PBS (5x)**

**1x PBS (pH 7,3)**

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

**0,1% BSA (Bovin serum albumin)**

10mg BSA (Albumin Fraction V, Fa Roth) in 10ml 1xPBS gelöst und in der Sterilbank mittels 0,22µm Membranfilter (Spritzenfilter 0,22µm, Rotilabo®) sterilfiltriert.

## **Stammlösungen der Kultivierungs- und Differenzierungsfaktoren**

**SCF:** 50ng/ $\mu$ l; gelöst in 0,1% BSA

<b>IGF-1:</b>	40ng/ $\mu$ l; gelöst in 0,1% BSA
<b>Insulin:</b>	40ng/ $\mu$ l; gelöst in 0,1% BSA
<b>Dexamethason:</b>	1mM, gelöst in 96% Ethanol
<b>Mifepriston:</b>	3mM; gelöst in 96% Ethanol
<b>Holo-Transferrin:</b>	20mg/ml; gelöst in 1xPBS
<b>Epo:</b>	3000UI/0,3ml fertige Stammlösung der Fa. Roche

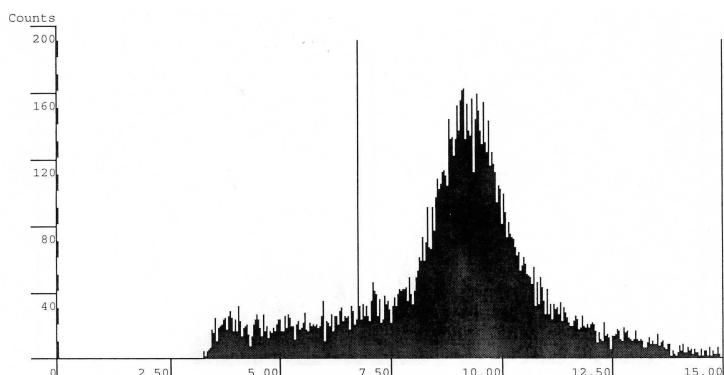
### 3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

#### 3.1.3.1 K562

Da die Zellen 2- bis 3-mal pro Woche gesplittet werden, um eine logarithmische Wachstumsphase zu erreichen, ist es nötig die Zellzahl vor dem Verdünnen mit komplettiertem Medium zu bestimmen. Die Zellzahl wird in einem Zellzähler (Microcellcounter CC-108, Fa. Sysmex) bestimmt. Dazu wird in der Sterilbank 200 $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und in ein Zellzählergefäß pipettiert. Die Suspension wird mit 9,8ml Zählerflüssigkeit (Cellpack PK-30, Fa. Sysmex) aufgefüllt, gut vermischt und im Anschluss kann die Zellzahl gemessen werden.

#### 3.1.3.2 ESMS

Bei dieser Zelllinie wurde zur Zellzahlbestimmung ein elektronischer Zellzähler (CASY) verwendet. Auf Grund der höheren Sensitivität kann mit diesem Gerät eine wesentlich kleinere Zellmenge zur Untersuchung herangezogen werden. Zusätzlich erhält man auch ein genaues Zellprofil welches neben einem Diagramm, das die Zellzahl und die unterschiedlichen Zellgrößen zeigt, auch genaue Informationen über Viabilität, Anzahl der lebenden sowie toten Zellen und den durchschnittlichen Zelldurchmesser erhält.



**Abb. 6 Beispiel eines Zellprofils erstellt mit dem elektronischen Zellzähler (CASY)**

Zur Messung wird das Gerät zuerst dreimal mit einer Reinigungsflüssigkeit (CasyClean) gereinigt. Danach wird die Zellzählerflüssigkeit (Casyton) mit 2 Hüben des Dispensers in das entsprechende Countergefäß gefüllt, 20 $\mu$ l der Zellsuspension hinzu pipettiert und vorsichtig vermischt. Hier ist es besonders wichtig, Luftblasen zu vermeiden, da diese die Messung stören.

### 3.1.4 Kultivierung und Differenzierung

#### 3.1.4.1 K562 Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, welche in komplettiertem RPMI-1640 Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Um eine exponentielle Wachstumsphase zu erhalten, werden die Zellen alle 2-3 Tage gesplittet und auf  $0,4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Vor jedem Versuch mit den K562-Zellen wurde ein kompletter Mediumswechsel durchgeführt.

Dafür transferiert man die Zellen steril in ein 50ml Röhrchen (Becton Dickinson Labware) und zentrifugiert 10 Minuten bei 25°C und 250xg. Der Überstand wird in der Sterilbank, steril abgesaugt, und die Zellen werden in 10ml komplettiertem RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt, und die Zelldichte auf  $0,4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.1.4.2 ESMS erythroide Progenitorzellen

#### 3.1.4.2.1 Isolierung aus der Leber

Die ESMS-Zellen stammen aus den fötalen Lebern von Wildtyp-Mäusen. Die Lebern wurden aus 11-14 Tage alten Embryos isoliert, da zu diesem Zeitpunkt die Produktion von erythroiden Vorläuferzellen hauptsächlich in der Leber stattfindet.

- Entnahme der Leber mittels Pinzette in einem eiskalten PBS Bad.
- Homogenisierung der Leber in StemPro-Nullmedium durch auf und ab pipettieren.
- Einfrieren der Zellsuspension nach Zentrifugation und resuspendieren in 0,5ml eiskaltem FCS (fetal calf serum) und anschließende Zugabe von 0,5ml 20% DMSO (Dimethyl Sulfoxid).

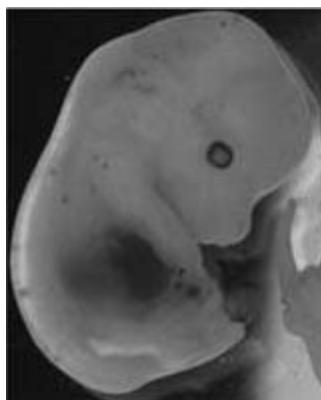


Abb. 7. Mäuseembryo mit durchscheinender Leber [KERENYI M. A. et al., 2008]

#### 3.1.4.2.2 Auftauen der ESMS-Zellen

- ~9ml StemPro Nullmedium werden steril in einem 15ml Falcon vorbereitet und auf Raumtemperatur (RT) gebracht.
- Die eingefrorenen Zellen werden rasch im Wasserbad aufgetaut, vorsichtig in den 9ml StemPro-Nullmedium resuspendiert und 5 Minuten stehen gelassen, damit sich die Zellen absetzen können.
- Anschließend werden die Zellen bei 250xg, 8 min bei RT zentrifugiert.
- Der Überstand wird in der Sterilbank steril abgesaugt und die Zellen werden in 500µl komplettiertem StemPro Medium mit doppelter Konzentration an

Kultivierungsfaktoren (siehe Kapitel 3.1.2.2.1) resuspendiert und in einer 12-Well Platte ausgesetzt.

- Nach 3 Stunden werden die Zellen in ~9ml StemPro Nullmedium gewaschen, abzentrifugiert (250xg, RT, 8min.) und der Überstand wird wieder steril entfernt. Die Zellen werden wieder in 500µl kompletterem StemPro-Medium mit doppelt konzentrierten Kultivierungsfaktoren (3.1.2.2.1) resuspendiert.

### **3.1.4.2.3 Kultivierung**

- Die Zellen werden am ersten Tag nur im Mikroskop betrachtet und die Dichte des Zellwachstums bewertet. Bei dichtem Wachstum wird die Suspension mit 500µl komplettem StemPro-Medium verdünnt, mit anschließender Zugabe der Kultivierungsfaktoren, erneut in doppelter Konzentration.
- Ab dem zweiten Tag wird die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.3) und ab dem dritten Tag werden die zuvor dicht gehaltenen Zellen auf  $3 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt.
- Bis zum 6. Tag der Kultivierung wird diese Proerythroblast-Kultur jeden Tag durch einen teilweisen Mediumswechsel und Zugabe der entsprechenden Menge an Faktoren auf eine Zelldichte von ca. 3mio Zellen/ml eingestellt. Weiter wird täglich die Zellzahl, Zellgröße und Proliferationskinetik mittels eines elektronischen Zellzählers (CASY) untersucht.

### **3.1.4.2.4 Differenzierung**

Bevor die Progenitorzellen zu Erythrozyten-ähnlichen Zellen differenziert werden können, muss ein Aufreinigungsschritt durchgeführt werden, um die Zellsuspension von spontan differenzierten und toten Zellen zu reinigen.

Dieses Aufreinigen geschieht mittels Biocoll (BIOCOLL Separating Solution, BIOCHROM AG) bei Raumtemperatur.

- Die entsprechende Menge an Zellsuspension wird in ein 15ml oder 50ml Falkonröhrchen überführt und im Verhältnis 2:1 mit Biocoll unterschichtet.
- Anschließend wird 7 Minuten bei RT und 720xg zentrifugiert, wobei es wichtig ist, dass die automatische Bremse der Zentrifuge auf 6 eingestellt wird, da sich die Phasen nicht durch zu abruptes Abbremsen vermischen sollen.
- Es entstehen 3 Phasen, wobei die oberste das zu verworfende Medium ist. Darunter befindet sich jene Phase, welche die undifferenzierten Zellen enthält, und am Boden befindet sich ein Pellet, bestehend aus spontan-differenzierten und apoptischen Zellen sowie anderen Zellresten.
- Das Medium wird steril abgesaugt und die Zell-Phase wird vorsichtig in einem neuen Falkon gesammelt.
- Diese Zell-Phase wird mit steriles PBS bei RT (Phosphate Buffered Saline, PBS Dublecco 1x, BIOCHROM AG) einmal gewaschen und bei 250xg und RT für 5 min abzentrifugiert.

Das dabei entstandenen Pellet sollte weiß sein, da die spontan differenzierten Zellen, welche schon Hämoglobin produziert haben zuvor entfernt wurden.

- Der Überstand wird steril abgesaugt. Nach dem Resuspendieren der Zellen in ~ 3ml komplettiertem Medium wird erneut ein Zellprofil mittels des elektronischen Zellzählers (CASY) erstellt, und die Zelldichte wird auf 3mio/ml eingestellt.
- Die Differenzierungsfaktoren (siehe Kapitel 3.1.2.2.2) werden zugesetzt und die Zellen werden wieder im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C für 24h gehalten.

Die Differenzierung erfolgt über einen Zeitraum von 4 Tagen. Jeden Tag werden zur selben Zeit Aliquote entnommen (0h, 24h, 48h und 72h) welche 1x in PBS gewaschen und für spätere Versuche auf -20°C eingefroren werden. Weiter wird jeden Tag ein Zellprofil mit Hilfe des elektronischen Zellzählers (CASY) erstellt und die Zellen werden täglich auf 3mio Zellen/ml Medium, nach Zugabe der entsprechenden Menge an Differenzierungsfaktoren, eingestellt.

### 3.1.5 Zellen ernten

- Dazu wird die Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein entsprechendes Gefäß überführt und bei 4°C und 250x g 8 Minuten zentrifugiert.
- Der Überstand wird (nicht mehr steril) abgesaugt und das Zellpellet wird in einem 1x PBS Puffer (Phosphat Buffered Saline) resuspendiert.
- Es wird erneut bei denselben Zentrifugeneinstellungen zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgesaugt. Danach können die Pellets eingefroren (-20°C oder -80°C) oder im Anschluss sofort lysiert werden.

Wichtig ist, dass sämtliche Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden, um den Zellstoffwechsel zu verlangsamen.

### 3.1.6 Zellen lysieren

#### Lysispuffer

K562, ESMS:      200 µl Promega Cell Culture Lysis Reagent 5x  
                      800 µl H<sub>2</sub>O destilliert  
                      1 µl/ml 1mM PMSF (Stammlösung: 1M)  
                      1 µl/ml NaF (Stammlösung 1M)  
                      1 µl/ml Phosphataseinhibitorcocktail I (PhIC I)  
                      1 µl/ml Phosphataseinhibitorcocktail II (PhIC II)

Das eingefrorene Zellpellet wird auf Eis aufgetaut und anschließend mit Lysispuffert behandelt. Frisch geerntet Zellen können nach einem Wasserschritt mit 1x PBS direkt mit Lysispuffer behandelt werden.

- Das Pellet wird, abhängig von der Zellzahl, mit 20 – 200µl Lysispuffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega) versetzt und durch vortexen gelöst.
- Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wird die Suspension mit Ultraschall behandelt, wodurch die Zellmembranen aufbrechen.

- Es wird 5-7 Minuten bei 4°C und 8000rpm zentrifugiert, um das reine Zelllysat zu erhalten. Der Überstand wird in 1,5 ml Eppis gesammelt und bei -20°C oder -80°C eingefroren.

### 3.2 Proteinbestimmung nach Bio-Rad

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford (1976) mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“ herangezogen.

Bei dieser Methode kommt es zur Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 und freien Aminogruppen von Proteinen. Dieser Komplex bewirkt in saurem Milieu einen Farbumschlag von braun nach blau, was mit Hilfe des Photometers als eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm gemessen werden kann.

Um die Proteinkonzentration der Probe bestimmen zu können, wurde eine BSA-Eichgerade (Bovine serum albumin) erstellt, und die Probenwerte, durch Auswertung mit der GraphPad Prism 5 Software ermittelt.

Zur Erstellung der Eichgerade wurde die BSA-Stammlösung 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt (1mgBSA/ml) und Konzentrationsbereiche von 2µg/ml bis 12µg/ml verwendet. Als Leerwert wird Wasser eingesetzt und der Versuch wird im Doppelansatz durchgeführt.

#### Pipettierschema zu Erstellung der Standards

Standard	H <sub>2</sub> O dest.	BSA (1mg/ml)	Konzentration
LW	800 µl	--	0 µg/ml
Std. 1	780 µl	20 µl	2 µg/ml
Std. 2	760 µl	40 µl	4 µg/ml
Std. 3	740 µl	60 µl	6 µg/ml
Std. 4	720 µl	80 µl	8 µg/ml
Std. 5	700 µl	100 µl	10 µg/ml
Std. 6	680 µl	120 µl	12 µg/ml

Tabelle 2.: Pipetterschema zur Erstellung der Standardreihe

## Probenvorbereitung

Entsprechend der Anzahl der zu bestimmenden Proben werden jeweils 799 $\mu$ l destilliertes Wasser in 4ml Plastikröhren vorgelegt und mit je 1 $\mu$ l Zelllysat (Herstellung siehe Kapitel 3.1.6) versetzt. Im Anschluss werden alle Röhren, Standard sowie Proben, mit je 200 $\mu$ l Bradford – Reagenz auf 1 ml aufgefüllt und gut gemischt.

## Probenauswertung

Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur werden im Doppelansatz je 200  $\mu$ l pro Ansatz und Standard auf eine 96-Well Platte mit flachem Boden pipettiert und die Absorption bei 595 nm mittels Photometer (Anthos Zenyth 3100) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.

## 3.3 Hämoglobinmessung

### 3.3.1 Hämoglobinmessung nach Drabkin

Die Hämoglobinkonzentration wird mit Hilfe des Drabkin Reagens (bestehend aus: Natriumbicarbonat, Kaliumcyanid und Kaliumferricyanid) quantitativ kolorimetrisch gemessen. Hierbei reagiert das Hämoglobin sowie seine Derivate in Gegenwart von basischem Kaliumferricyanid zu Methämoglobin, welches weiter mit Kaliumcyanid zu dem farbigen Cyanmethämoglobin reagiert und bei einem Absorptionsmaximum von 535nm gemessen werden kann.

Dazu werden die Zellen zuerst lysiert (siehe Kapitel 3.1.6) um den Proteinanteil und somit auch das Protein Hämoglobin der Zellen zu erhalten.

Um die Hämoglobinkonzentration der Proben bestimmen zu können, wird eine Standardreihe aus einer Hämoglobinstammlösung (3mg/ml) hergestellt.

### Standard- bzw. Probenvorbereitung

Die Standardreihe wird mit Hilfe einer Hämoglobinstammlösung (3mg/ml) hergestellt.

### Pipettierschema zur Erstellung der Standards

Std	Häm-Stock	H <sub>2</sub> O dest.	Drabkin Reagens	Konzentration
LW	0µl	40µl	200µl	0µg/ml
Std. 1	2,5µl	37,5µl	200µl	31,25µg/ml
Std. 2	5µl	35µl	200µl	62,5µg/ml
Std. 3	10µl	30µl	200µl	125µg/ml
Std. 4	20µl	20µl	200µl	250µg/ml
Std. 5	30µl	10µl	200µl	375µg/ml
Std. 6	40µl	0µl	200µl	500µg/ml

Tabelle 3.: Pipettierschema für die Erstellung der Standardreihe

Ja nach Menge des Zelllysats werden zwischen 0-40µl Probe eingesetzt und die Menge dann auf 40µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Im Anschluss werden allen Standards sowie Proben je 200µl Drabkin Reagens hinzugefügt, gut vermischt und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### Probenauswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden im Doppelansatz je 115µl pro Standard bzw. Probenansatz in eine 96-Well Platte mit flachem Boden pipettiert.

Die Absorptionsmessung erfolgt am Photometer (Anthos Zenyth 3100) bei einer Wellenlänge von 535nm. Die Auswertung erfolgt mittels GraphPad Prism 5, wobei die Hämoglobinkonzentrationen auf den Proteinanteil der Proben bezogen werden müssen.

### 3.3.2 Hämoglobinmessung mittels 2,7-Diaminofluoreszein (DAF)

Diese Methode dient als Nachweis von Hämoglobin in erythroiden Zellen. Dabei katalysiert Hämoglobin als Pseudoperoxidase die Oxidation von 2,7-Diaminofluoreszein durch Wasserstoffperoxid zu Fluorenblau [KAIHO S. et al., 1985].

Diese Farbbildung kann photometrisch bei einer Absorption von 620nm gemessen werden.

#### Probenvorbereitung

Die Zellen werden, wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, lysiert. Das Lysat wird mit destilliertem Wasser auf die 200µl (Doppelansatz) verdünnt.

Um die Menge an Hämoglobin genau bestimmen zu können und auf den Proteingehalt der Zellen beziehen zu können, muss zuvor eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 3.2) durchgeführt werden.

#### DAF-Reagens

- 100µl Tris-HCl (200mM, pH 7,5)
- 10 µl 2,7-Diaminofluoreszein (100mg in 10ml 90%er Eisessig)
- 1µl Wasserstoffperoxid (30%ig)

Die Menge an DAF-Reagens wird entsprechend der Standard- und Probenmenge hergerichtet. Da 2,7-Diaminofluoreszein sehr lichtempfindlich ist, werden die bereitgestellten Substanzen immer mit Alufolien abgedeckt.

#### Versuchsdurchführung

Die Hämoglobin-Stammlösung (3mg/ml) wird 1:10 auf 0,3 mg Hämoglobin/ml verdünnt.

### Pipettierschema zu Erstellung der Standards

Std	Häm-Stammlösung	Aqua Dest	Konzentration
LW	0µl	240µl	0µg/ml
Std. 1	2,5µl	237,5µl	3,125µg/ml
Std. 2	5µl	235µl	6,25µg/ml
Std. 3	10µl	230µl	12,5µg/ml
Std. 4	20µl	220µl	25,0µg/ml
Std. 5	30µl	210µl	37,5µg/ml
Std. 6	40µl	200µl	50,0µg/ml

Tabelle 4.: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe

Nachdem die Standards sowie die Proben in 1,5ml Eppis vorbereitet sind werden je 100µl im Doppelansatz in eine 96 Well Platte mit flachem Boden pipettiert. Im Anschluss wird je 100µl der vorbereiteten DAF-Lösung mit Hilfe einer Mehrkanalpipette und der „reversed pipetting“ - Pipettiermethode den Proben und Standards hinzugefügt.

### Probenauswertung

Die Platte wird 5 – 10 Minuten auf dem Belly Dancer, mit Alufolie abgedeckt, inkubiert und im Anschluss die Absorption bei 620 nm mittels Photometer (Anthos Zenyth 3100) gemessen.

Die Auswertung erfolgt wieder mittels GraphPad Prism 5.

## 3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

### 3.4.1 RNA-Extraktion

- Die gesammelten Zellpellets werden zum lysieren, der Zellzahl entsprechend 1ml TRIzol-Reagens (TRIzol® Reagent, Invitrogen) pro 5-10 x

$10^6$  Zellen, mit TRIzol-Reagens behandelt, gelöst, gut gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert.

Auf Grund der Toxizität des Tri-Reagenz ist es wichtig mit blauen Handschuhen zu arbeiten.

- Besonders bei fetthältigen Zellen kann man anschließend 10 min bei 7500xg und 4°C zentrifugieren.
- Nun werden 200 $\mu$ l Chloroform/ml Tri-Reagenz hinzugegeben und durch schütteln und 15' vortexen gemischt und bei Raumtemperatur für 5-15 Minuten inkubiert.
- Danach zentrifugiert man die Proben 15 min bei 12000xg und 4°C. Es ergeben sich nun 3 Schichten, wobei sich in der obersten klaren und farblosen Phase die RNA befindet, gefolgt von einer dünnen weißen Schicht, welche die DNA darstellt und in zuunterst befindet sich eine rosa Phase, welche das protein enthält.
- ~400 $\mu$ l der obersten Phase werden nun vorsichtig abgehoben und in neue RNase freie Eppendorf Gefäße (Eppis) überführt und mit 500 $\mu$ l Isopropanol/ml Tri-Reagenz versetzt, gut gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Es kommt zur Fällung der RNA.
- Es wird erneut 10 Minuten bei 12000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand wird entfernt. Es folgt ein finaler Waschschritt mit 1ml 75% Ethanol/ml Tri-Reagenz wobei wieder 5 Minuten bei 4°C und 7600xg zentrifugiert wird.
- Nachdem das Ethanol vollständig entfernt wurde, wird das Pellet luftgetrocknet und in 25 $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser (Roth GmbH & Co) gelöst.  
Alle Arbeitsschritte nach dem Entfernen des Ethanol werden in einer RNase Sterilbank (PCR-Workstation) durchgeführt.

### 3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA Konzentration erfolgt spektrophotometrisch (Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer), nach einer UV/Vis

Analysemethode. Hierbei wird die Absorption der Probe bei 260 nm gegen DEPC-behandeltes Wasser als Leerwert gemessen. Es werden 2 $\mu$ l der gelösten Probe zur Konzentrationsbestimmung verwendet.

### 3.4.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Das Umschreiben der RNA in cDNA geschieht im Thermocycler (Primus, MWG-Biotech) unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems GmbH). Es werden 2 $\mu$ g RNA/10 $\mu$ l DEPC-behandeltes Wasser eingesetzt und die Proben werden im Doppelansatz umgeschrieben.

#### Pipettierschema des RT-Mastermix/Probe:

Reverse Transkriptase	0,5 $\mu$ l
25x dNTP-Mix (100mM)	0,8 $\mu$ l
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
10xRT-Buffer	2 $\mu$ l
10xRT Random Primers	2 $\mu$ l
DEPC-behandeltes Wasser	4,2 $\mu$ l
<b>Summe</b>	<b>10<math>\mu</math>l</b>

Tabelle 5.: Pipettierschema des RT-Mastermix pro Ansatz

Es werden in RNase freien Eppis jeweils 10 $\mu$ l des fertig gemischten RT-Mastermix und 10 $\mu$ l der auf 2 $\mu$ g/10 $\mu$ l eingestellten Probe pipettiert, gut gemischt und kurz zentrifugiert. Die Proben werden nun im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm umgeschrieben:

- 8min 21°C
- 15min 99°C
- 5min 42°C

Im Anschluss kann die erhaltene cDNA bei -20°C eingefroren werden und steht für die PCR bereit.

### 3.4.4 PCR Prinzip

Mittels der PCR (Polymerase Chain Reaktion) kann man einen genau definierten cDNA Abschnitt vervielfältigen.

### 3.4.5 Ablauf der PCR

Die PCR besteht meist aus 25-35 Zyklen, wobei jeder Zyklus in vier Phasen unterteilt ist.

1. **Melting:** in diesem Schritt wird die Temperatur für 30 Sekunden auf 96°C erhöht, um die doppelsträngige cDNA zu trennen
2. **Annealing:** Die Einzelstränge liegen vor und die Temperatur wird auf 60°C gesenkt, damit sich die Primer anlagern können
3. **Elongation:** Ein erneuter Temperaturanstieg auf 72°C, der nun der DNA-Polymerase ermöglicht, die fehlenden Stränge mit Nukleotiden aufzufüllen
4. **Ende der Zyklus,** Abkühlen der Probe auf 4°C

#### Temperaturproramm

- Initialer Denaturierungsschritt: 94°C, 5min
- Melting: 94°C, 30sec
- Annealing: 60°C, 40sec
- Elongation: 72°C, 1min

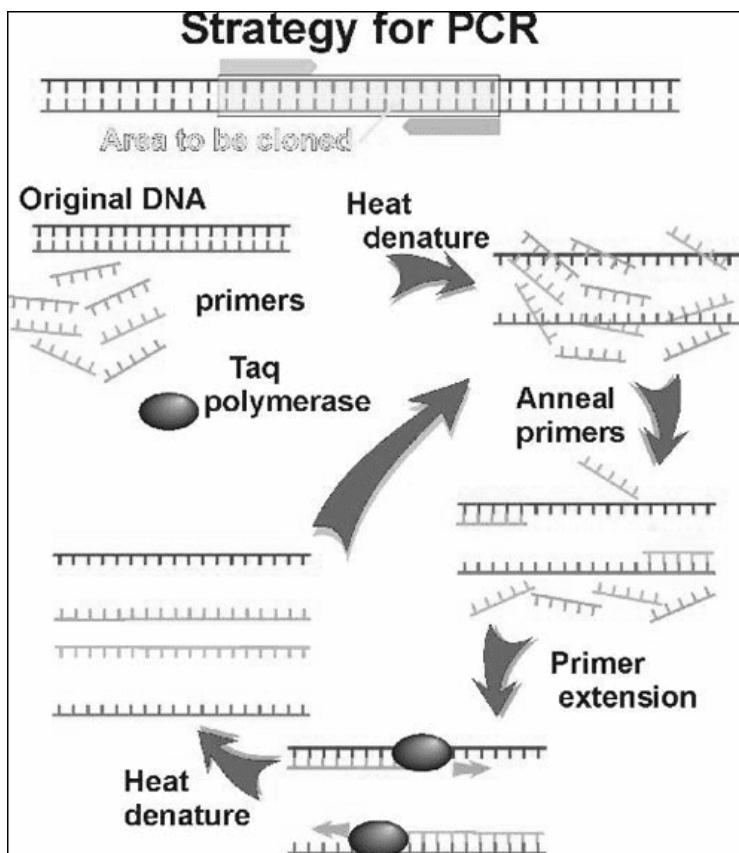


Abb. 8: Prinzip der PCR [<http://krishnaivf.com/wp-content/uploads/2008/05/pcr.gif>]

### 3.4.6 Praktische Durchführung der PCR

#### Herstellung des Mastermix

#### Pipettierschema zur Erstellung des, für ein Gen spezifischen, Mastermix

10x PCR Buffer without MgCl <sub>2</sub>	5µl
dNTPs (10 mM, Bioron)	4µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, MBI Fermentas)	5µl
autoklaviertes Wasser	31µl
Taq-Polymerase (1x)	1µl
Primer a	1,5µl
Primer b	1,5µl
<b>Gesamt:</b>	<b>49µl</b>

Tabelle 6.: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermix für zwei Ansätze

Die dNTP-Mischung wird hergestellt, indem man je 20µl dATP, dGTP, dCTP und dTTP (100 mM, Bioron) (100mM) in ein RNase freies Eppi pipettiert und dann mit autoklaviertem Wasser 1:10 verdünnt. Die Primer werden vor dem Gebrauch 1:10 mit autoklaviertem Wasser verdünnt.

Entsprechend der Anzahl der Proben plus einem Sicherheitszuschlag wird der Mastermix genau vorbereitet. Zu 24,5µl Mastermix wird 1 µl Probe (cDNA) hinzugegeben. Nach gutem Mischen und kurzem Vortexen, um zu verhindern, dass sich Flüssigkeit an der Eppiwand befindet, werden die Proben im Thermocycler Primus (MWG Biotech) vervielfältigt.

#### Folgende Primer wurden verwendet:

Primer	Sequenz	Zyklen
Frataxin (human) a	5'TCT CCT TTA GGA GTG GTG TC-3'	26
Frataxin (human) b	5'-TAA TGA AGC TGG GGT CTT GG-3'	
β-Actin (human) a	5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3'	24
β-Actin (human) b	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'	
GAPDH (human) a	5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3'	24
GAPDH (human) b	5'-GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'	

Tabelle 7.: Bei der PCR verwendete Primer

### 3.4.7 Gel-Elektrophorese

#### 3.4.7.1 Herstellung der Gele

##### 5 x TBE-Puffer (Tris Borat EDTA-Puffer)

- 54,0g Tris-Base
- 27,5g Borsäure (Pharmacia Biotech)
- 20ml 0,5 molar EDTA pH: 8

Es werden 100ml 0,5 molarer EDTA-Stammlösung hergestellt bei welcher der pH-Wert auf 8 eingestellt wird. Die anderen Chemikalien werden eingewogen und in ca. 500ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend gibt man 20ml der EDTA-Stammlösung hinzu und füllt auf 1000ml auf. Der fertige Puffer wird nun in eine Glasflasche abgefüllt.

### **Herstellung der Agarosegele; 1,5%ig**

40ml 1x TBE-Puffer (TBE-Puffer 5x 1:5 verdünnt)

+ 0,6g Agarose (für die analytische Nukleinsäureelektrophorese, Merck)

+ 20 µl Ethidiumbromid 0,025%

Die Arbeitsschritte werden nun an einem speziellen Ethidiumbromid Arbeitsplatz vorgenommen da es sich bei Ethidiumbromid um eine hoch mutagene Substanz handelt. Dabei ist es wichtig, immer blaue Handschuhe zu tragen und sämtliche verwendeten Geräte und Reagenzien auch nur dort zu verwenden und dort zu belassen, denn alles muss gesondert gereinigt und entsorgt werden.

- Zu 600mg Agarose werden 40 ml 1x TBE-Puffer hinzugefügt. Die Suspension wird in der Mikrowelle erhitzt, bis das Gel kocht, einmal geschwenkt und erneut aufgekocht.
- Das flüssige Gel wird nun in einen Harnbecher umgefüllt um das Becherglas nicht zu kontaminieren und nach kurzem Abkühlen werden 20µl Ethidiumbromid 0,025% hinzu pipettiert.
- Das Gel wird kurz geschwenkt und in eine vorbereitet Form gegossen. Man lässt es ca. 20 min. auskühlen

### **Probenvorbereitung**

#### **Pro Ansatz benötigt man:**

- 12,5µl Probe (aus PCR)
- 2,5µl 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas)

### 3.4.7.2 Elektrophorese

Wenn das Gel ausgekühlt ist, nimmt man es aus der Form und legt es in die Elektrophoresekammer von Bio-Rad. Dabei ist es wichtig dass die Taschen auf der Seite des Minus-Pols liegen, da die DNA negativ geladen ist und durch das elektrische Feld zum Plus-Pol gezogen wird. Die Kammern werden mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig mit Puffer bedeckt ist. Nun belädt man die Taschen des Gels mit je 10µl der Probe, wobei die erste Tasche für den Kontrollmarker (5µl) [Gene RulerTM Ladder Plus (100bp DNA, 0,1mg DNA/ml, MBI Fermentas)] freigelassen wird.

Sind alle Taschen gefüllt, startet man die Elektrophorese und lässt sie ca. 20-25 Minuten bei 100 Volt laufen.

### 3.4.8 Auswertung

Anschließend wird das Gel mittels Imager detektiert und mit Hilfe der Software AlphaEase ausgewertet.

## 3.5 Real Time qPCR (RT-qPCR)

Die TaqMan Real Time pPCR ist eine quantitative PCR Methode, welche einen fluoreszierenden Farbstoff verwendet. Dieser Farbstoff ist an ein einsträngiges Oligonukleotid aus 20-26 Nukleotiden am 5' Ende gebunden, welches spezifisch nur an die zwischen den Primern liegende DNA Sequenz bindet. Am 3' Ende befindet sich ein sogenannter Quencher (eine Fluoreszenzlöscheinde Verbindung). Während der Amplifikation wird der Fluoreszenzfarbstoff durch eine Lichtquelle angeregt und gibt dadurch einen Teil seiner Energie an den Quencher. Dadurch verringert sich der Abstand zwischen Quencher und Donator, wodurch das Fluoreszenzsignal des Donators zunimmt, was direkt mit der PCR Produktzunahme korreliert.

Das Pipettierschema für jeden Versuch wird mit der StepOne Software 2.0 (Step One Instrument 48 Well) erstellt.

#### **Benötigte Reagenzien pro Probenansatz und spezifisches Gen**

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

Tabelle 8.: Pipettierschema zur Erstellung der Probenansätze spezifisch für ein Gen

#### **Benötigte Reagenzien für eine Negativ Kontrolle (ohne cDNA)**

Master Mix	7,5 µl
Assay Mix	0,756 µl
DEPC-behandeltem Wasser	6,75 µl
<b>Summe (pro Well)</b>	<b>15 µl</b>

Tabelle 9.: Pipettierschema zur Erstellung der Negativ Kontrolle spezifisch für ein Gen

Nun werden, dem Pipettierschema entsprechend, die benötigten Reagenzien in die 48 Well Platte (Applied Biosystems) pipettiert und zum Schluss jeweils 2,5µl der 1:2 mit autoklaviertem Wasser verdünnten Probe (50ngDNA/µl) hinzugefügt, sodass sich in jedem Well ein Gesamtvolumen von 15µl befindet. Anschließend werden die Wells der Platte mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen, und es wird 1 Minute bei 21°C und 1500 rpm zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen vom Boden der Wells zu lösen.

Die Messung erfolgt automatisch mittels StepOne Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Darmstadt).

### 3.5.1 Reaktionsbedinungen der Amplifikation

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

Tabelle 10.: Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation

\* x 40 Wiederholungen

**Verwendete Primer: fertiger TaqMan RT PCR Assay Kit der Fa. Applied Biosystems - Produktnummer**

HPRT-1 (mouse)	Ma 01324427_a1
HOX-1 (mouse)	Ma 00516607_a1
Frataxin (mouse)	Mm 0078416_s1

Tabelle 11.: Primer, welche bei der RT PCR verwendet wurden

### 3.5.2 Auswertung: Bestimmung der relativen Expression

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

- Unterschied an Thresholdzyklen (Zyklus bei dem die Fluoreszenz erstmal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt) für Zielsequenz und Referenzgen bezogen auf das House-keeping Gene zB. HPRT-1

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ HPRT1}}$$

- Abzug des  $\Delta C_T$  Wert des Kalibrators von den  $\Delta C_T$  Werten aller Proben (Kalibrator = Probe mit niedrigster Expression = höchster  $\Delta C_T$  Wert)

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

3. Berechnung der relativen Gen Expression (RGE = n-fache Überexpression eines Gens verglichen mit dem Kalibrator)

$$\boxed{\text{RGE} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}}$$

### 3.6 ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay)

Um die Frataxinkonzentration zu messen, wurde der MSD – ECLIA (Meso Scale Discovery – Electrochemiluminescence – Immunoassay) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht, ähnlich wie der traditionelle ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay), auf einer Affinitätsmessung einer Antigen–Antikörper Reaktion.

Es handelt sich um ein Sandwich Immunoassay, bei dem zuerst ein Beschichtungsantikörper (capture Antibody) auf eine 96 well Multi-Array Platte aufgetragen wird. Dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen das Protein Frataxin, welches sich in der Probe befindet und eine Antigen-Antikörper Reaktion mit dem Beschichtungsantikörper eingehen. Zur Detektion der Antikörper-Antigen Reaktion wird ein Detektionsantikörper (detecting antibody) von Santa Cruz (Frataxin, polyclonal) zugegeben, welcher mit MSD SULFO-TAG<sup>TM</sup> Reagens, einer elektrochemilumineszenten Markierung, gekennzeichnet ist. Um die Frataxinkonzentration der Probe messen zu können, wird der MSD Read Buffer hinzugefügt, welcher die geeigneten chemischen Bedingungen für die nachfolgende Messung schafft. Das hierfür verwendete Gerät ist der MSD SEKTOR<sup>TM</sup> 2400.

Während der Messung wird eine elektrische Spannung an die Elektroden der Platte angelegt, was zu einer Lichtemission der an der Oberfläche der Elektrode gebundenen Markierung führt. Die Intensität dieser Lichtstrahlen wird gemessen und ermöglicht so mittels Standardgerade eine Quantifizierung des in der Probe enthaltenen Frataxins.

**Verwendete Reagenzien:**

<b>3%iges BSA Blockierlösung  (=3g BSA/100ml)</b>	450mg MSD Blocker A in 15 ml 1x PBS
<b>1%iges BSA</b>	1g MSD Blocker A in 100ml 1x PBS
<b>Waschlösung</b>	500ml 1x PBS + 250µl Tween 20 (Fa. Merck-Schuchardt)
<b>BSA-SDS Puffer</b>	3991µl 1%iges BSA + 8.7µl 10%igen SDS
<b>Lysis Buffer</b>	200µl Lysis Buffer (Promega) in 800µl H2Odest. +1µl PMSF, 1µl NaFl, je 1µl PhIC I und II
<b>Lysis-SDS Puffer</b>	97,5µl Lysis Buffer (Promega mit PMSF, NaFl, PhIC I&II)) + 2,5µl 10%iges SDS (=8% Lysis und 0.02%SDS pro Ansatz)

**Tabelle 12.: Reagenzien benötigt zur Durchführung des ECLIA****3.6.1 Durchführung des ECLIA**

- Am Vortag des Versuchs wird die 96 Well Platte (MSD High Binding-Platte) mit einem monoklonalen anti-frataxin-Antikörper von Chemicon: MS α Fx, 1:50,000 mit 1x PBS verdünnt) gecoatet. Es werden je 30µl/Well mit der Pipettiermethode "reversed pipetting" aufgetragen. Anschließend wird die Multiwell Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert.
- Am nächsten Tag wird die überschüssige Flüssigkeit ausgeleert und die Platte wird mit je 125µl 3%iger BSA-Lösung pro Well blockiert. Die Platte wird erneut mit der Klebefolie abgedeckt und 1,5 Stunden bei RT auf dem Belly Dancer inkubiert.  
Dieser Blockierungsschritt hat zur Folge, dass die übrige Kohlenstoffoberfläche der Wells, welche keinen Beschichtungsantikörper adsorbiert hat, nun das BSA bindet.
- Die Platte wird wieder ausgeleert und 3mal mit je 150µl Waschlösung pro Well gewaschen und zum Schluss gut ausgeklopft.

Nun beginnt man mit dem Auftragen der Frataxin Standardlösung und der Proben. Es werden jeweils 25 $\mu$ l pro Well und im Doppelansatz pipettiert.

### Pipettierschema zur Erstellung der Standards

Std. 1	1000pg/Well	125 $\mu$ l Stammlösung*	105 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 2	500pg/Well	115 $\mu$ l Standard 1	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 3	250pg/Well	115 $\mu$ l Standard 2	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 4	125pg/Well	115 $\mu$ l Standard 3	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 5	62,5pg/Well	115 $\mu$ l Standard 4	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 6	31,25pg/Well	115 $\mu$ l Standard 5	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 7	15,6pg/Well	115 $\mu$ l Standard 6	115 $\mu$ l 1%iges BSA
Std. 8	Leerwert	-	115 $\mu$ l 1%iges BSA

**Tabelle 13.: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe**

\* Frataxin Standard Stammlösung: 0,08ng/ $\mu$ l Frataxin

Jeder Standard wird mit einer Lysispuffer/SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) Mischung versetzt. Dadurch bestehen Proben und Standards aus denselben Substanzen mit gleicher Konzentration.

### 3.6.2 Probenvorbereitung

Die Zellpellets werden zuerst lysiert (siehe Kapitel 3.1.6) und die Proteinmenge wird bestimmt, wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Abhängig von der Zelllinie werden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt.

**K562-Zellen:** 5 $\mu$ gProtein/Ansatz      5 Ansätze werden vorbereitet (125 $\mu$ l)

**ESMS-Zellen:** 7 $\mu$ gProtein/Ansatz      3 Ansätze werden vorbereitet (75 $\mu$ l)

Die Probenlysate werden auf ein Volumen von 10 $\mu$ l (K562-Zellen) bzw. 12 $\mu$ l (ESMS-Zellen) aufgefüllt und mit BSA-SDS Puffer auf ein Endvolumen von 125 $\mu$ l bzw. 75 $\mu$ l ergänzt.

- Je 25µl pro Standard und Probe wird im Doppelansatz und mittels „reversed pipetting“ auf die Platte aufgetragen und im Anschluss wird 1,5h bei RT auf dem Belly Dancer mit Klebefolie abgedeckt inkubiert.
- Anschließend folgt ein weiterer Waschdurchgang (3x je 150µl Waschlösung pro Well), wobei die Platte immer gut trocken geklopft werden muss.
- Um das Sandwich zu vervollständigen, wird nun der 2. Antikörper (Santa Cruz, polyklonal, 1:1.000 mit 1x PBS verdünnt, 30µl pro Well) aufgetragen und wieder eine Stunden inkubiert.
- In Anschluss an den 2. Antikörper wird, nach einem erneuten Waschdurchgang (3x je 150µl/Well), der Sulfo-Tag-gelabelte Detektionsantikörper (MSD Goat α Rabbit, 0,75mg/ml, in 1%igem BSA verdünnt, 30µl pro Well) hinzu gegeben und erneut 1h auf dem Belly Dancer inkubiert.

### 3.6.3 Messung der Frataxin-Konzentration und Auswertung

- Im letzten Schritt des Versuchs wurde, nach einem weiteren Waschdurchgang (3x 150µl pro Well), der MSD Reading Buffer (150µl pro Well) mittels „reversed pipetting“ aufgetragen. Die Chemilumineszenzmessung erfolgt sofort nach Zugabe mit dem MSD SECTOR<sup>TM</sup>2400. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Einfluss der Hämoglobinproduktion auf die Frataxin-Expression in K562-Zellen

Das Ziel der Versuche ist es anhand des Zellmodells der k562-Zellen die Erythropoese nachzustellen. Andersson et al 1979 fanden heraus, dass diese Zellen auf ihrer Oberfläche das Glycoprotein Glycophorin A tragen, welches hauptsächlich in roten Blutkörperchen vorkommt [ANDERSSON L. C. et al., 1979]. Im selben Jahr wurde von RUTHERFORD T. R. et al., 1979 gezeigt, dass eine Inkubation dieser K562 Zellen mit 0,1mM Hämin zur erhöhten Produktion von Hämoglobin führt. Dieses Hämoglobin wurde elektrophoretisch aufgetrennt und das Bandenmuster zeigte große Ähnlichkeit mit dem Muster von aufgereinigten embryonalen Erythroblasten. Dies ließ darauf schließen, dass die Zellen eine gute Möglichkeit bieten um humane embryonale Erythroblasten zu untersuchen [RUTHERFORD T. R. et al., 1979].

Um im Gegenzug auch untersuchen zu können wie sich Frataxin verhält. wenn die Häm-Synthese gehemmt wird, wurden die Zellen mit 50µM Succinyl-Aceton inkubiert. Succinyl-Aceton hemmt die ALA Dehydratase, das zweite Enzym in der Häm-Biosynthese [ZHU Y. et al., 2002 II].

#### 4.1.1 Messung der Hämoglobinkonzentration nach Inkubation mit Hämin und Succinyl-Aceton in K562-Zellen

##### Der Einfluss von Hämin auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen

Um den Einfluss der Hämoglobinproduktion auf die Frataxin Proteinexpression messen zu können, wurden K562-Zellen mit 25 $\mu$ M Hämin 4 Tage lang inkubiert, was, wie schon erwähnt, eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration bewirkt [RUTHERFORD T. R. et al., 1979].

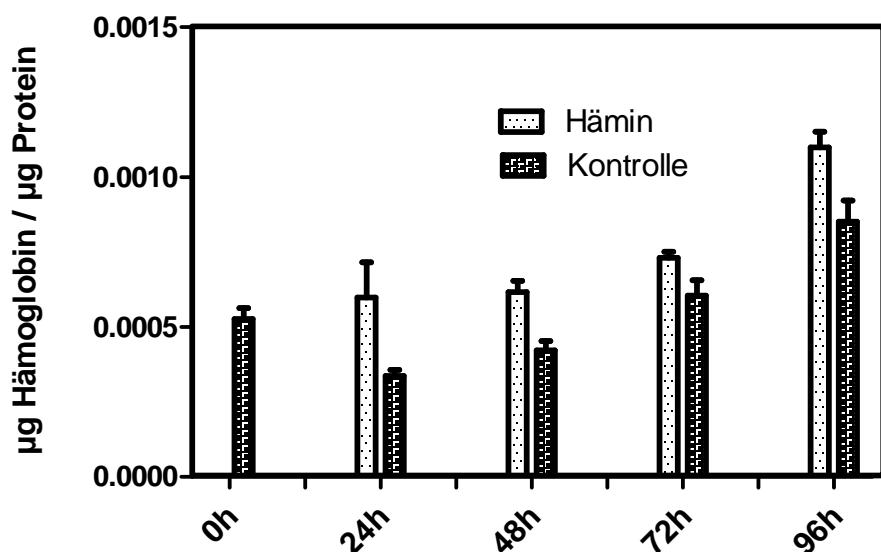


Abb. 9: Einfluss der Hämininkubation (25 $\mu$ M) auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25 $\mu$ M Hämin inkubiert. Täglich, nach 0h, 24h, 48h, 72h und 96h, wurden Aliquote entnommen, einmal mit PBS (1x) gewaschen und mit Lysispuffer (1x) lysiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde photometrisch mittels Drabkin Reagens bei 535nm gemessen (Durchführung Kapitel 3.3.1). Der Hämoglobingehalt der Proben wurde auf den Gesamtproteinengehalt in den Lysaten bezogen. Die Ergebnisse stammen aus zwei Versuchsreihen mit je 2 Messungen.

Die Ergebnisse in Abb.9 stellen die Hämoglobinkonzentration von mit 25 $\mu$ M Hämin inkubierten K562-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen dar. Man erkennt,

dass im Vergleich die mit Hämin inkubierten Zellen mehr Hämoglobin produzieren, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist.

### Der Einfluss von Succinyl-Aceton auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen

Im Gegenzug zur Erhöhung der Hämoglobinkonzentration wurde auch eine Hemmung der Hämoglobinkoncentration durchgeföhrt [ZHU Y. et al., 2002 I].

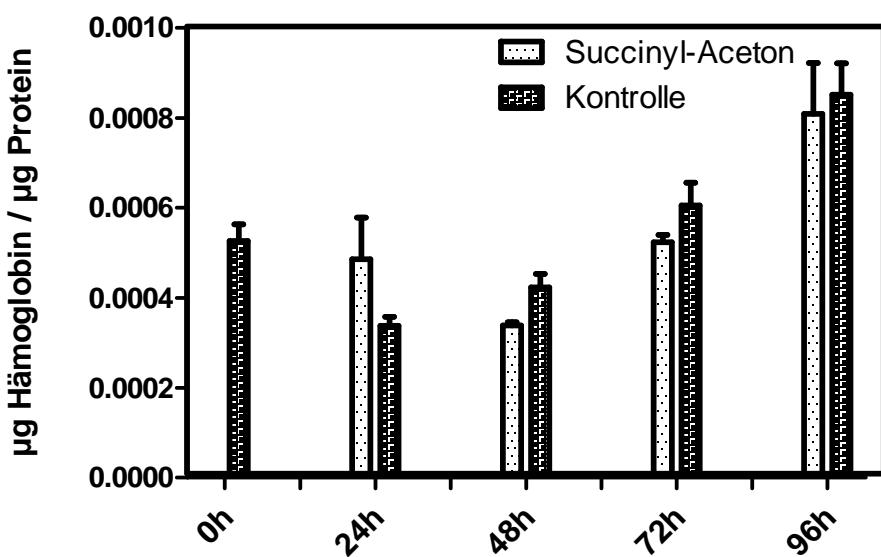


Abb. 10: Einfluss der Succinyl-Aceton Inkubation (50µM) auf die Hämoglobinkoncentration in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 50µM Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb.9.

Die Ergebnisse in Abb.10 stellen die Hämoglobinkoncentration von mit 50µM Succinyl-Aceton inkubierten K562-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, dar. Man erkennt, dass die mit Succinyl-Aceton behandelten Zellen ab 48h Inkubation weniger Hämoglobin produzieren als die Kontrollzellen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist.

## Der Einfluss von Hämin und Succinyl-Aceton auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen

Um auch die Wirkung einer kombinierten Inkubation der K562-Zellen mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton auf die Hämoglobinkonzentration zu untersuchen, wurde die Hämoglobinsynthese zuerst durch die Gabe von Hämin angeregt und durch Succinyl-Aceton wieder gehemmt.

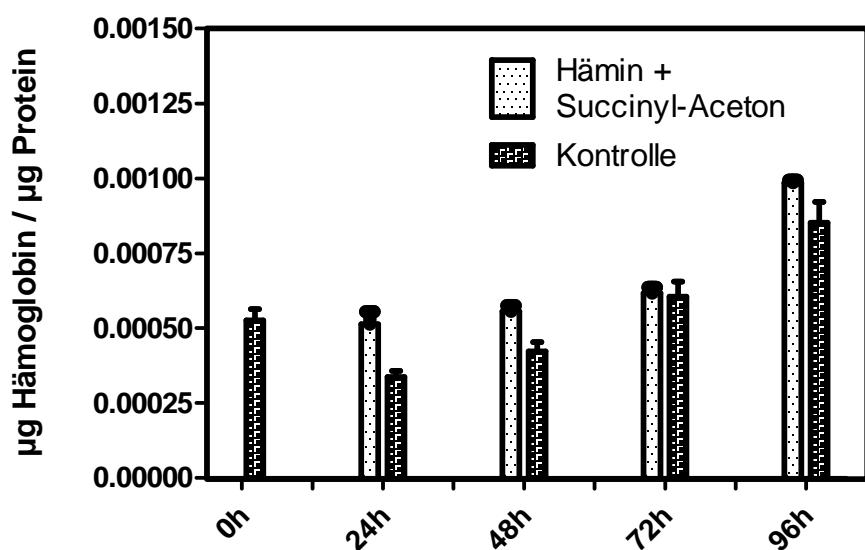


Abb. 11: Einfluss von 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton auf die Hämoglobinkonzentration in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb.9.

In Abb.11 sieht man die Ergebnisse der Hämoglobinkonzentration von K562-Zellen inkubiert mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton im Vergleich zu unbehandelten Kontroll K562-Zellen. Die Hämoglobingehalte sind leicht erhöht, allerdings nicht signifikant und weniger ausgeprägt als bei der alleinigen Inkubation mit Hämin.

## 4.2 Messung der Frataxin-Protein- und mRNA-Expression nach Inkubation der K562-Zellen mit Hämin und Succinyl-Aceton

### 4.2.1 Einfluss von Hämin auf die Frataxin Expression

#### Der Einfluss von Hämin auf die Frataxin-Proteinkonzentration

Ein Frataximangel, wie er bei der Friedreichs Ataxie vorkommt, kann zu einem Verlust der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Cluster Funktionen führen und in weiterer Folge die Häm-Biosynthese beeinflussen [NAPOLI E. et al., 2006]. Aus diesem Grund wurden die Frataxin-Expressionslevels bei erhöhter Hämoglobinsynthese, hervorgerufen durch Inkubation der K562-Zellen mit 25 $\mu$ M Hämin, untersucht.

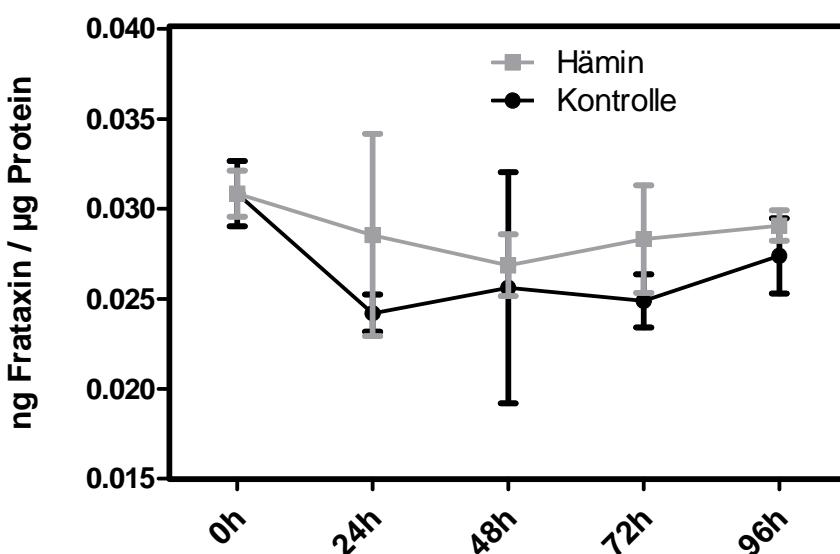


Abb. 12: Einfluss von 25 $\mu$ M Hämin auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen

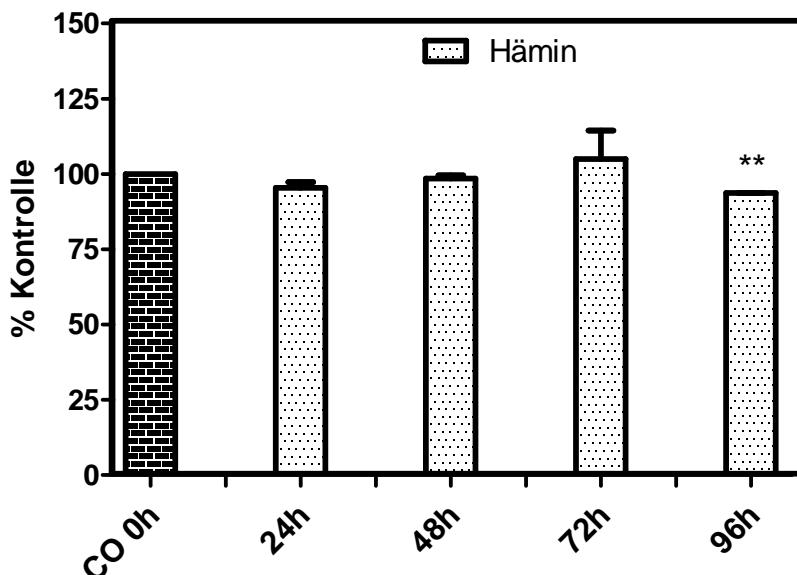
K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25 $\mu$ M Hämin inkubiert. Täglich, nach 0h, 24h, 48h, 72h und 96h, wurden Aliquote entnommen einmal mit PBS (1x) gewaschen und mit Lysispuffer (1x) lysiert. Anschließend wurden die Proben mittels ECLIA (Durchführung siehe Kapitel 3.6) analysiert und die Frataxin-Protein Konzentration bestimmt. Die

Frataxinkonzentration wurde auf den Gesamtproteingehalt der Zelllysate bezogen. Die Ergebnisse stammen aus zwei Versuchsreihen mit je 2 Messungen.

Die Ergebnisse in Abb.12 zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen die Inkubation der K562-Zellen mit 25 $\mu$ M Hämin zu einer Steigerung der Frataxin-Proteinkonzentration führt, vor allem nach 48h und 72h, wobei dieser Anstieg nicht signifikant ist.

### **Der Einfluss von Hämin auf die mRNA-Expression von Frataxin in K562-Zellen**

Bei Patienten mit Friedreichs Ataxie ist die Frataxin-Expression vermindert und dadurch kommt es zuerst zu einer Blockierung der Eisen-Schwefel-Cluster Synthese und in weiterer Folge vermindert es die Häm-, Cytochrom C- und Hämoprotein-Levels. Durch verminderte Eisen-Schwefel-Cluster sind zwei Enzyme der Häm-Biosynthese betroffen, Ferrochelatase und Adrenodoxin. In mit siRNA für Frataxin behandelten Oligodendrogloma Zellen war die Aktivität von Adrenodoxin und Aconitase signifikant vermindert und eine exogene Gabe von Hämin konnte diese Mängel wieder signifikant heben [NAPOLI E. et al., 2007]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Gabe von Hämin auch in einem Modell ohne verminderte Frataxin Levels einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Frataxin hat.



**Abb. 13: mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 25 $\mu$ M Hämin in K562-Zellen**

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25 $\mu$ M Hämin inkubiert. Täglich, nach 0h, 24h, 48h, 72h und 96h, wurden Aliquote entnommen einmal mit PBS (1x) gewaschen und mit Tri-Reagens lysiert. Die gesamte RNA wurde mittels alkoholischer Fällung isoliert und in cDNA umgeschrieben. Danach wurden die Proben mit Hilfe der RT-PCR, unter Verwendung spezifischer Primer für die Frataxin-Sequenz, analysiert. Als endogene Kontrollen wurden  $\beta$ -Actin und GAPDH verwendet. Die Auf trennung erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%igem Agarosegel und die Banden wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mittels AlphaEase. Die Ergebnisse stammen aus zwei Versuchsreihen mit je 2 Messungen (\*\*:p<0,01).

Die Ergebnisse in Abb.13 stellen die mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 25 $\mu$ M Hämin für 5 Tage in K562-Zellen dar. Bezogen auf die Frataxin mRNA-Expression von Kontroll K562-Zellen zeigt sich auf mRNA-Ebene kaum ein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen.

#### 4.2.2 Einfluss von Succinyl-Aceton auf die Frataxin Expression

Da Succinyl-Aceton die Hämoglobinsynthese hemmt, wurde der Einfluss einer gehemmten Hämoglobinproduktion auf die Frataxin-Proteinlevels und die mRNA-Expression von Frataxin untersucht [ZHU Y. et al., 2002 I].

##### Der Einfluss von Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration

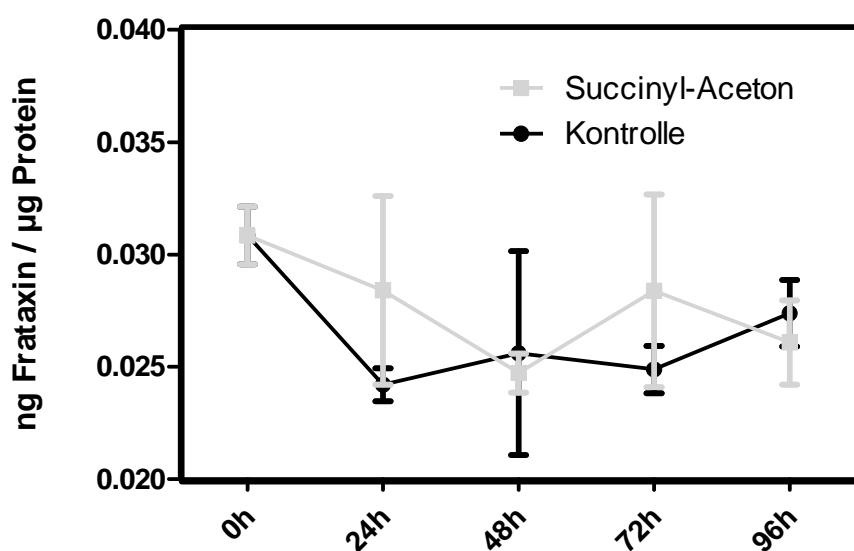


Abb. 14: Einfluss von 50µM Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 50µM Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb. 12.

Die Ergebnisse in Abb.14 zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen die Inkubation der K562-Zellen mit 50µM Succinyl-Aceton nach 24h und 72h zu einer Steigerung der Frataxin-Proteinkonzentration führt, wobei dieser Anstieg nicht signifikant ist.

### Der Einfluss von Succinyl-Aceton auf die mRNA-Expression von Frataxin in K562-Zellen

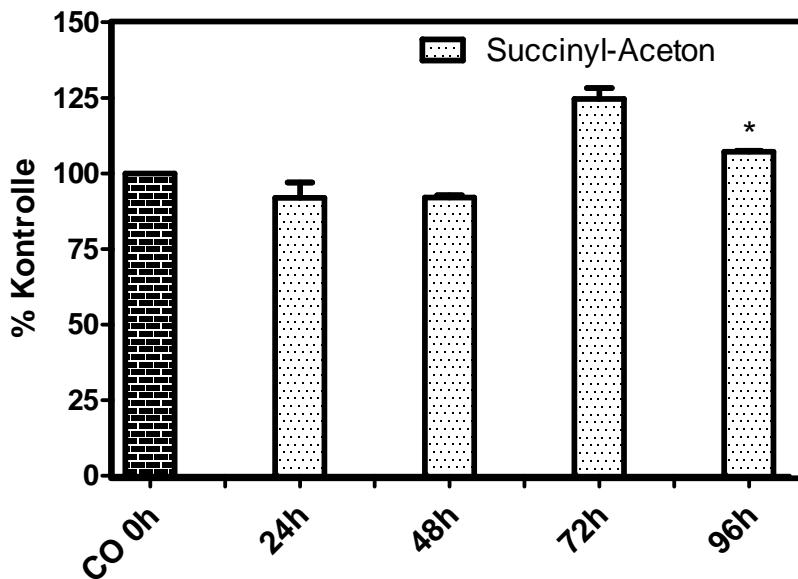


Abb. 15: mRNA Expression von Frataxin nach Inkubation mit 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb. 13.

Die Werte in Abb.15 stellen die mRNA Expression von Frataxin nach Inkubation der K562-Zellen mit 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton für 4 Tage bezogen auf unbehandelte Kontroll-K562-Zellen. Erst nach 72h steigt die mRNA-Expression und nach 96h ist die Erhöhung der Frataxin-Levels signifikant.

#### 4.2.3 Einfluss von Hämin und Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Expression

In einer Studie von BECKER E. et al., 2002 wurde der Einfluss von Succinyl-Aceton auf die mRNA von Frataxin untersucht. Dabei wurden Friend-Zellen verwendet, welche zuerst mit DMSO zu erythroiden Zellen differenziert wurden, wodurch es zu einer gesteigerten Hämoglobinsynthese kam. Im Anschluss

wurden die Zellen mit Succinyl-Aceton behandelt, um die Hämoglobin-Synthese zu hemmen, und die Frataxin-mRNA-Expression wurde ermittelt. Es ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Expression Frataxin-mRNA oder mRNA von Nramp2 [BECKER E. M. et al., 2002].

### Der Einfluss von Hämin und Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration

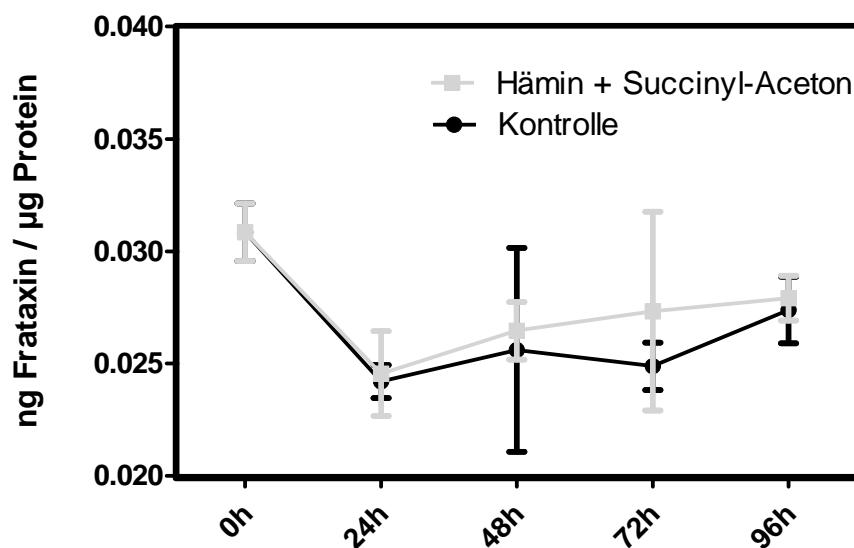


Abb. 16: Einfluss von 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton auf die Frataxin-Proteinkonzentration in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb. 12.

Die Werte aus Abb.16 zeigen, dass eine kombinierte Inkubation der K562-Zellen mit 25µM Hämin und 50µM Succinyl-Aceton zu keiner Veränderung der Frataxin-Expression im Vergleich mit den Kontroll-Zellen führt.

### Der Einfluss von Hämin und Succinyl-Aceton auf die mRNA-Expression von Frataxin in K562-Zellen

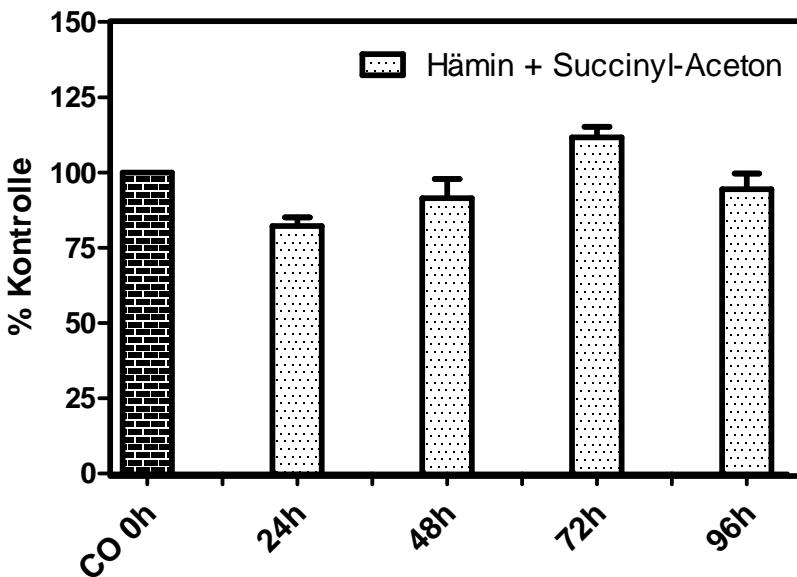


Abb. 17: mRNA-Expression von Frataxin nach Inkubation mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton in K562-Zellen

K562-Zellen wurden in RPMI-Medium vier Tage lang mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton inkubiert. Die Versuchsdurchführung ist analog Abb. 13.

Die Ergebnisse in Abb.17 zeigen dass eine gemeinsame Inkubation von K562-Zellen mit 25 $\mu$ M Hämin und 50 $\mu$ M Succinyl-Aceton im Vergleich zu unbehandelten Kontroll K562-Zellen keine signifikanten Unterschiede ergibt.

### 4.3 Erythroide Progenitorzellen

Da die Versuche mit dem K562 Zellmodell keine signifikanten Unterschiede brachten und keine signifikanten Veränderungen in den Frataxin Expressionen während gesteigerter bzw. gehemmter Hämoglobinproduktion zeigten, wurde nach einem neuen Zellmodell gesucht, in welchem die Hämoglobinsynthese besser simulierbar ist. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche mit einem Mäusezellen - Modell durchgeführt, in welchem erythroide

Progenitorzellen aus fötalen Mäuselebern isoliert wurden. Durch die Zugabe verschiedener essentieller Zytokine und Hormone zu diesen Progenitorzellen proliferierten die Zellen tagelang, und anschließend wurde eine kontrollierte Differenzierung zu Erythrozyten durchgeführt.

#### **4.3.1 Kultivierung der erythroiden Progenitorzellen isoliert aus fötalen Mäuselebern**

Um den Einfluss von Frataxin auf die Hämoglobinsynthese zu untersuchen, wurde ein Zellmodell verwendet mit welchem die Erythropoese und Hämoglobinproduktion kontrolliert dargestellt werden kann. Dabei handelt es sich um Primärzellen, welche aus fötalen Lebern von 12,5 Tage alten Mäuseembryos isoliert wurden, da im fötalen Stadium die Erythropoese vor allem in der Leber stattfindet, im Gegensatz zum erwachsenen Stadium, wo die Erythrozyten hauptsächlich nur mehr im Knochenmark gebildet werden. Die Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert (siehe Material und Methoden Kapitel, 3.1.4), und nach einem Aufreinigungsschritt innerhalb von 72h kontrolliert zu Erythrozyten differenziert.

Die Kultivierung erfolgte durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone. Wie PANZENBÖCK B. et al., 1998 beschrieben haben, können humane erytroide Progenitorzellen, in dem Fall aus dem Nabelschnurblut isoliert, sehr effizient zu großen Zellmengen herangezüchtet werden. Die beiden wichtigsten Zytokine die die Erythropoese regulieren sind Erythropoetin (Epo) und der Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) [PANZENBÖCK B. et al., 1998].

Für eine andauernde Proliferation der Progenitorzellen wird vor allem das Zusammenspiel von Epo und SCF und dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex) benötigt. Der Einfluss von Epo und SCF liegt hauptsächlich bei ihrer positiven Wirkung auf Proliferation und Überleben der Progenitorzellen, während das Stresshormon Dexamethason die Lebensspanne der Zellen stark verlängert und daneben auch die Rate der spontandifferenzierenden Zellen reduziert [LEBERBAUER C. et al., 2005].

### 4.3.2 Zellprofile von erythroiden Progenitorzellen während der Kultivierung

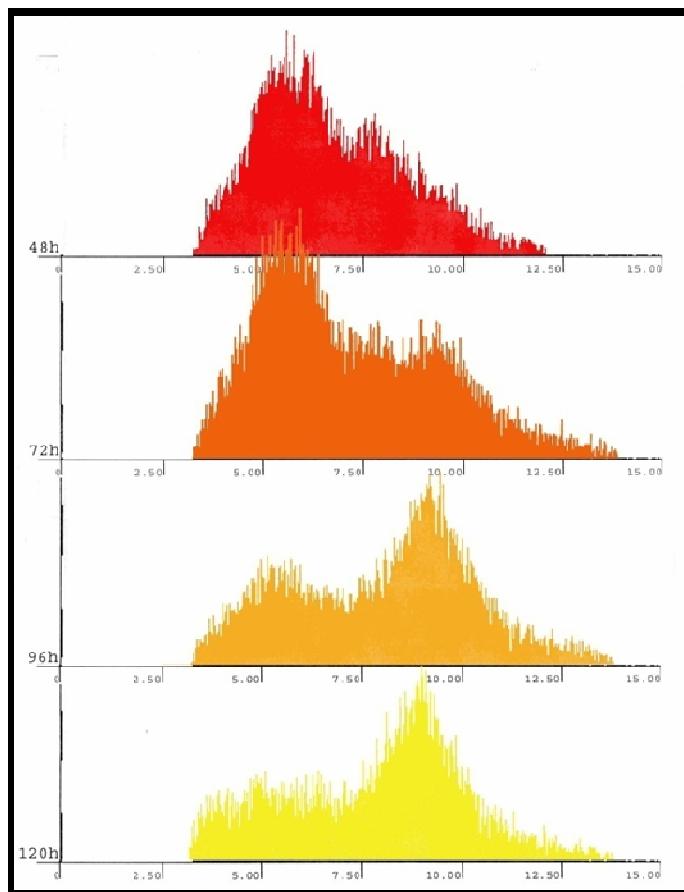


Abb. 18: Kontrollierte Kultivierung von erythroiden Progenitorzellen

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium durch Zugabe von humanem rekombinannten Erythropoetin (Epo 2U/ml), Stammzell Faktor (SCF 100ng/ml), Insulin-like Growth Factor (IGF-1 40ng/ml) und dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason (Dex 1 $\mu$ M) 6 Tage lang kultiviert. Ab dem zweiten Tag der Kultivierung wurden täglich Aliquote entnommen und mittels eines elektronischen Zellzählers (CASY) wurde ein Zellprofil erstellt.

Die erythroiden Progenitorzellen wurden aus fötalen Mäuselebern isoliert und unter Zugabe der oben genannten Faktoren kultiviert. Nach 72h Kultivierung erkennt man den Peak bei ~9 $\mu$ m welcher nach 120h deutlich sichtbar ist. In dem 120h-Profil sieht man neben dem großen Peak bei 9 $\mu$ m auch eine Zellfraktion die bei ~7,5 $\mu$ m liegt. Bei diesen Zellen handelt es sich um spontan

differenzierte oder auch apoptotische Zellen, welche am sechsten Tag der Kultivierung durch einen Aufreinigungsschritt entfernt werden (Durchführung siehe Kapitel 3.1.4.2.4).

### 4.3.3 Proliferationskinetik von erythroiden Progenitorzellen

Die erythroiden Progenitorzellen stammen aus einem Zellgemisch von der Isolierung der fötalen Mäuselebern und müssen für nachfolgende Versuche in großer Anzahl herangezüchtet werden. Um sicher zu gehen, dass die richtigen Zellen proliferieren, wurden die Zelleigenschaften wie Viabilität, durchschnittlicher Zelldurchmesser und Gesamtzellzahl täglich bestimmt.

#### Anstieg der Zellzahl der erythroiden Progenitorzellen während der Kultivierung.

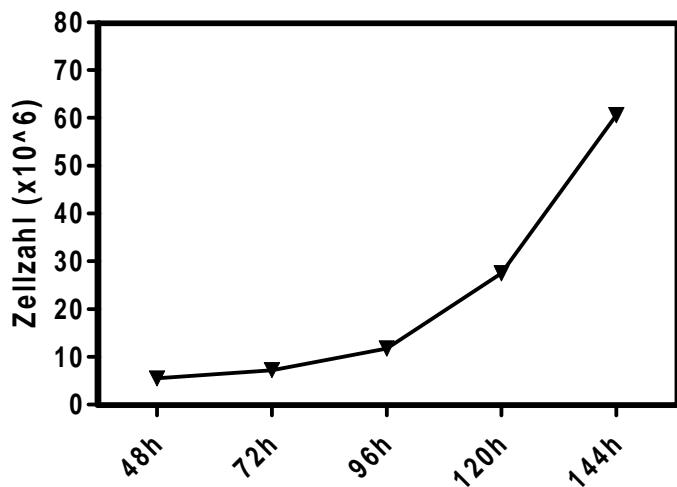


Abb. 19: Zellzahl der erythroiden Progenitorzellen während der Proliferation

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium mit Kultivierungsfaktoren (Epo: 2U/ml, SCF: 100ng/ml, IGF-1: 40ng/ml, Dex: 1 $\mu$ M) sechs Tage lang kultiviert. Ab 48h Kultivierung wurde jeden Tag ein Aliquot entnommen und das Zellprofil wurde mittels elektronischen Zellzähler (CASY) erstellt. Die Wachstumskurve stellt die Mittelwerte aus 8 Versuchsreihen dar.

Wie die Ergebnisse in Abb.19 zeigen, steigt die Zellzahl der erythroiden Progenitorzellen während der Proliferation auf durchschnittlich  $60 \times 10^6$  an.

### Viabilität von erythroiden Progenitorzellen während der Kultivierung

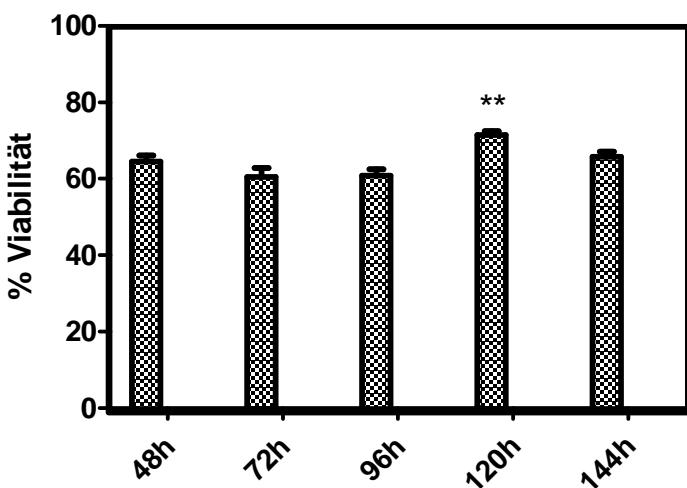
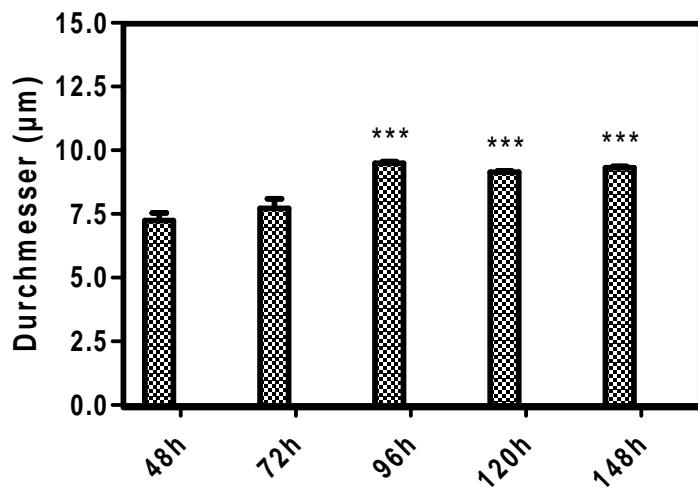


Abb. 20: Viabilität der erythroiden Progenitorzellen während der Proliferation

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium mit Kultivierungsfaktoren (Epo: 2U/ml, SCF: 100ng/ml, IGF-1: 40ng/ml, Dex: 1 $\mu$ M) sechs Tage lang kultiviert. Versuchsdurchführung siehe Abb.20.

Die Viabilität von Progenitorzellen lag während der Kultivierung durchschnittlich zwischen 60% und 70% und ergaben nur geringe Unterschiede.

### Zelldurchmesser während der Kultivierung



**Abb. 21: Anstieg des Zelldurchmessers während der Proliferation der erythroiden Progenitorzellen**

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium mit Kultivierungsfaktoren (Epo: 2U/ml, SCF: 100ng/ml, IGF-1: 40ng/ml, Dex: 1 $\mu\text{M}$ ) sechs Tage lang kultiviert. Ab 48h Kultivierung wurde jeden Tag ein Aliquot entnommen und das Zellprofil wurde mittels elektronischen Zellzähler (CASY) erstellt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus 8 Versuchsreihen dar (\*\*>: p<0,001).

Die Ergebnisse in Abb.21 zeigen den Anstieg des durchschnittlichen Zelldurchmessers während der Proliferation der erythroiden Progenitorzellen. Wie man schon in den Zellprofilen gesehen hat, werden aus dem anfänglichen Zellgemisch, welches einen durchschnittlichen Durchmesser von ~7,5  $\mu\text{m}$  hat, durch die Zugabe der notwendigen Faktoren die Progenitorzellen herangezüchtet. Nach 96h Proliferation besteht der Hauptteil der Zellsuspension aus den Progenitorzellen, deutlich zu erkennen durch den signifikanten Anstieg des Durchmessers auf ~9 $\mu\text{m}$ .

#### **4.3.4 Differenzierung der erythroiden Progenitorzellen isoliert aus fötalen Mäuselebern**

Bevor mit der Differenzierung begonnen werden kann, müssen die Erythroblasten mittels einer Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 3.1.4.2.4) aufgereinigt werden. Dies dient dazu, die Zellsuspension von spontan differenzierten Progenitorzellen und apoptotischen Zellen zu trennen und somit eine homogene Population von proliferierenden erythroiden Progenitorzellen zu erhalten. Weiters soll dadurch vermieden werden, bei späteren Versuchen falsche Ergebnisse bezüglich der Hämoglobinmenge und anderer Untersuchungsparameter zu bekommen. [DOLZNIG H. et al., 2001]

Während der Differenzierung der erythroiden Progenitorzellen zu Erythrozyten stoßen die Zellen den Zellkern aus, wodurch der Zelldurchmesser auf ~6µm Durchmesser sinkt. Die Differenzierung ist in diesem Mausmodell nach 72h abgeschlossen. Während dieser kontrollierten Differenzierung wurden jeden Tag Aliquote genommen und nach einem Waschschritt (PBS 1x) für spätere Versuche auf -20°C eingefroren.

#### 4.3.5 Zellprofile erythroider Progenitorzellen während der Differenzierung

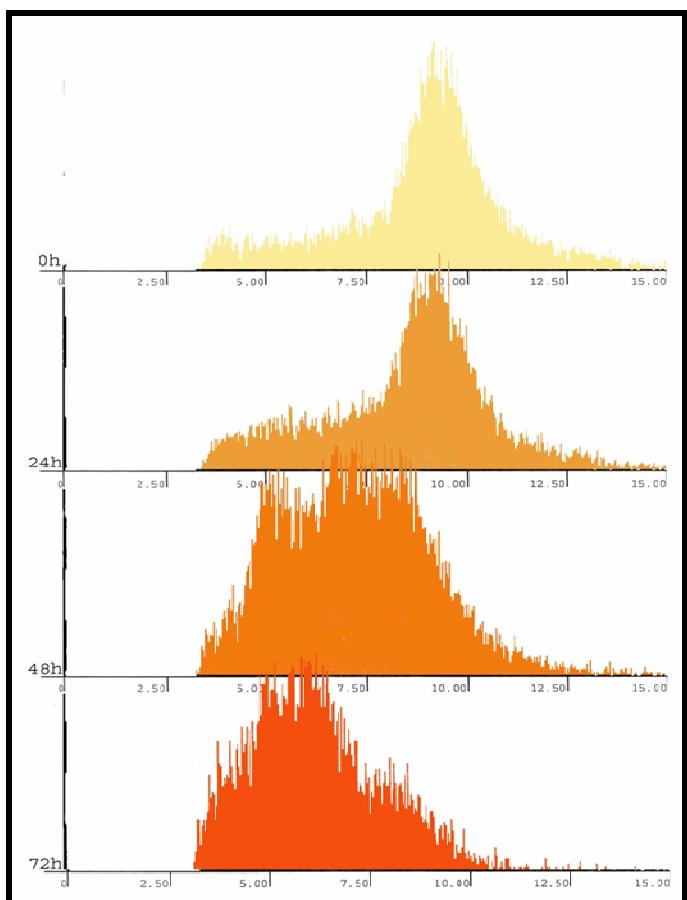


Abb. 22: Kontrollierte Differenzierung von erythroiden Progenitorzellen zu Erythrozyten

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium durch Zugabe von humanem rekombinanen Erythropoetin (Epo 10U/ml), Insulin (Ins 10ng/ml), Dex-Antagonist Mifepriston ( $3\mu\text{M}$ ) und humanem Holo-Transferrin (Holo-Tf 1mg/ml) 3 Tage lang differenziert. Jeden Tag wurden Aliquote entnommen und mittels eines elektronischen Zellzählers (CASY) wurde ein Zellprofil erstellt.

Nach dem Aufreinigungsschritt mittels Biocoll Separating Solution (Biochrom AG) ist auf dem Zellprofil (0h) nur mehr ein Peak zu erkennen, welcher die homogene Population an proliferierenden Progenitorzellen darstellt. Wenn man die Proliferationsfaktoren durch Insulin (10ng/ml), Erythropoetin (Epo: 10U/ml), den Dex-Antagonist Mifepriston ( $3\mu\text{M}$ ) und Holo-Transferrin (1mg/ml) ersetzt,

verschiebt sich nun der Peak immer weiter nach links, bis die Differenzierung am 3. Tag (72h) abgeschlossen ist. Der Peak befindet sich nun bei ~6,5 $\mu$ m Durchmesser und stellt Hämoglobin produzierende kernlose Erythrozyten dar.

#### 4.3.6 Differenzierungskinetik der erythroiden Progenitorzellen

##### Viabilität von erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung

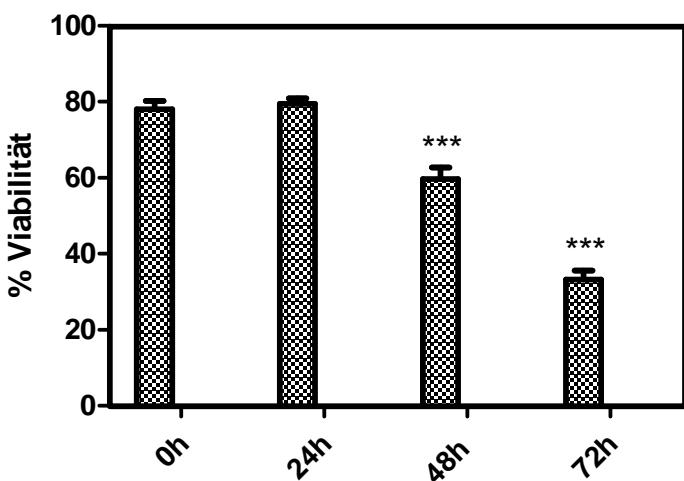


Abb. 23: Viabilität der erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung zu Erythrozyten

Versuchsdurchführung analog Abb. 22. (\*\*\*: p<0,001).

Die in Abb.23 angeführten Ergebnisse zeigen, dass ab 48h Differenzierung die Viabilität der Progenitorzellen signifikant und stark abfällt. Von anfänglichen ~80% Viabilität verbleiben nach 72h Differenzierung nur noch ~35% Viabilität.

### Durchschnittlicher Zelldurchmesser von erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung.

Da erythroide Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten neben vielen anderen morphologischen Veränderungen auch den Zellkern ausstoßen und damit drastisch an Größe verlieren, ist die Überprüfung des Zelldurchmessers ein wichtiges Merkmal zur Überwachung des Differenzierungsfortschritts [SCHRANZHOFER M. et al., 2006].

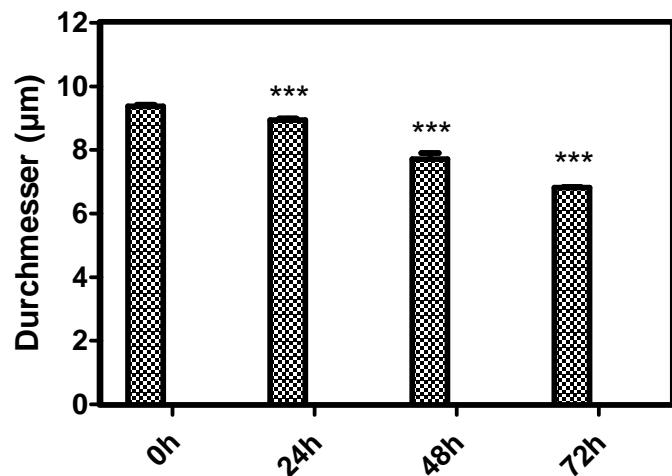


Abb. 24: Durchschnittlicher Zelldurchmesser der Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten

Versuchsdurchführung analog Abb. 22. (\*\*\*: p<0,001).

Die Ergebnisse in Abb.24 stellen die Abnahme des Zelldurchmessers der erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung dar. Nach 24h kommt es zu einer steten signifikanten Abnahme des Zelldurchmessers, wodurch der Ausstoß des Zellkerns gut dokumentiert wird.

#### 4.3.7 Messung der Hämoglobinkonzentration in erythroiden Progenitorzellen während kontrollierter Differenzierung

Da mit diesem Zellmodell erythroide Mäusezellen, direkt isoliert aus fötalen Mäuselebern, verwendet wurden, kann ein sehr naturgetreues Modell der Erythropoese mit den unterschiedlichen Aspekten wie Größenabnahme, volle Hämoglobinisierung und Enukleation dargestellt werden. Der entscheidende Schritt der Hämoglobinproduktion geschieht nach induzierter Differenzierung zwischen 24h und 48h [SCHRANZHOFER M. et al., 2006].

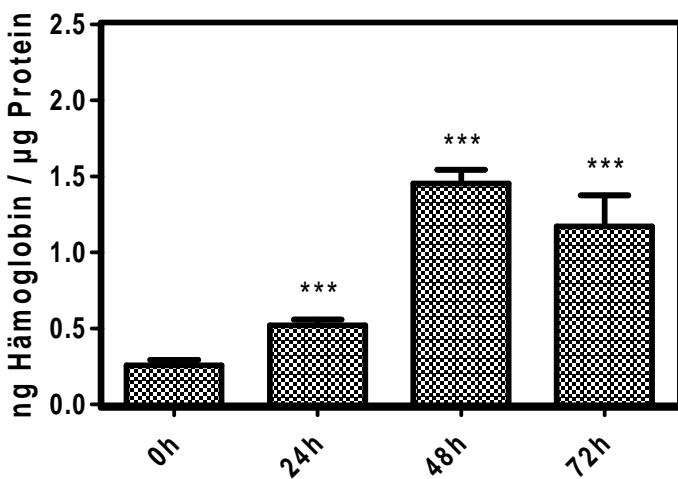


Abb. 25: Hämoglobinkonzentration von erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium mit Differenzierungsfaktoren (Epo: 10U/ml, Insulin: 10ng/ml, Holo-Tf: 1mg/ml, Mifepriston: 3µM) drei Tage lang differenziert. Es wurden jeden Tag Aliquote entnommen und von den Lysaten wurde die Hämoglobinkonzentration mittels DAF-Hämoglobin Assay photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 620nm bestimmt (Durchführung des Versuchs siehe Kapitel: 3.3.2). Die errechneten Hämoglobin-Gehalte wurden auf den Gesamtprotein-Gehalt der Lysate bezogen. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen mit jeweils 2 Messungen dar (\*\*\*=p<0,001).

Die Ergebnisse in Abb.25 zeigen die Hämoglobinkonzentration in erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung zu Erythrozyten.

Nach 24h steigen die Hämoglobin-Levels signifikant auf das Doppelte an, mit einem noch stärker signifikanten Anstieg auf das Fünffache nach 48h. Nach 72h ist die Differenzierung abgeschlossen und es ergeben sich Hämoglobinkonzentrationen, die das Vierfache der Ausgangskonzentration darstellen.

#### 4.3.8 Einfluss erhöhter Hämoglobinkonzentration auf die Frataxin-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene

In einer Studie von BECKER E. et al., 2002, wurde gezeigt, dass in erythroiden Friend Mäusezellen während der kontrollierten Differenzierung zu Hämoglobin produzierenden Zellen durch Inkubation mit 1,5% DMSO während der Differenzierung und den dabei erhöhten Hämoglobin Levels die Frataxin-Expression auf mRNA-Ebene sowie Proteinebene vermindert ist [BECKER E. et al., 2002].

##### Frataxin-Protein Expression in differenzierenden erythroiden Progenitorzellen

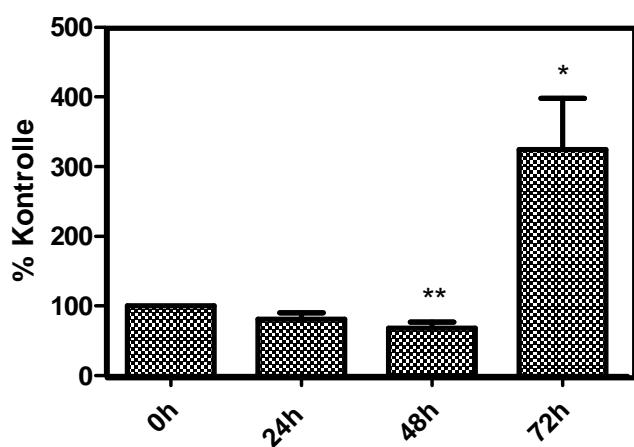
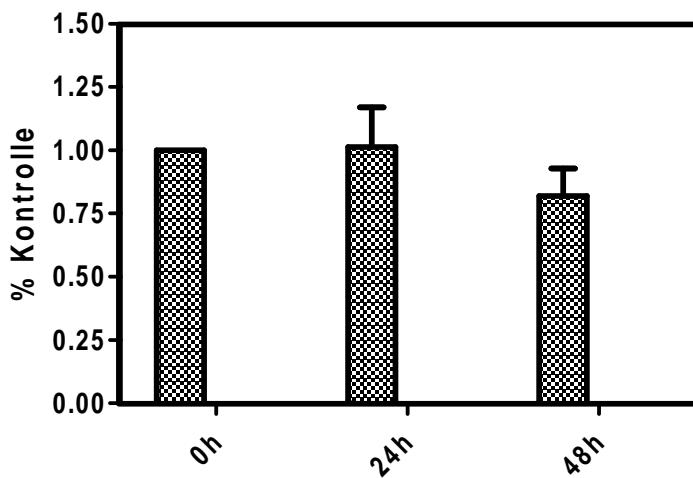


Abb. 26: Frataxin Protein-Expression der erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplementiertem StemPro-Medium mit Differenzierungsfaktoren (Epo: 10U/ml, Insulin: 10ng/ml, Holo-Tf: 1mg/ml, Mifepriston: 3 $\mu$ M) drei Tage lang differenziert. Es wurden jeden Tag Aliquote entnommen und mittels ECLIA (Durchführung siehe Kapitel 3.6) wurde die Frataxin-Protein-Konzentration der Proben ermittelt. Die Ergebnisse wurden auf den Gesamtproteingehalt der Probenlysate bezogen. Die Graphen stellen die Mittelwerte von 4 unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils 2 Messungen dar.

In Abb.26 sieht man die Unterschiede der Frataxin-Proteinexpression bezogen auf 0h als Kontrolle. Ab 24h Differenzierung verringert sich die Frataxin-Proteinmenge, wobei die Konzentration nach 48h signifikant abfällt. Nach beendeter Differenzierung (72h) steigt die Frataxin-Proteinkonzentration wieder signifikant an.

### **Messung der Frataxin-mRNA in erythroiden Progenitorzellen während der Differenzierung zu Erythrozyten**



**Abb. 27: Frataxin mRNA-Levels von erythroiden Progenitorzellen während der kontrollierten Differenzierung zu Erythrozyten**

Die erythroiden Progenitorzellen wurden in komplettiertem StemPro-Medium mit Differenzierungsfaktoren (Epo: 10U/ml, Insulin: 10ng/ml, Holo-Tf: 1mg/ml, Mifepriston: 3 $\mu$ M) drei Tage lang differenziert. Es wurden jeden Tag Aliquote entnommen und mit Tri-Reagent lysiert. Die gesamte RNA wurde mit Hilfe alkoholischer Fällung isoliert und 2 $\mu$ g/20 $\mu$ l wurden in cDNA umgeschrieben. Zur quantitativen Analyse mittels Taqman RT-qPCR wurde ein spezifischer Assay-Mix für die Mausfrataxin-Sequenz verwendet und die relative Gen-Expression, bezogen auf die endogene Kontrolle HPRT-1, wurde mit StepOne Software 2.0 berechnet. Ausgewertet

wurden die Ergebnisse mit GraphPad Prism 5. Die Balken stellen die Mittelwerte von 4 unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils 2 Wiederholungen dar.

Die Ergebnisse in Abb.27 stellen die mRNA-Levels von Frataxin während der Differenzierung zu Erythrozyten dar. Die mRNA Menge ändert sich nach 24h kaum und sinkt leicht nach 48h Differenzierung allerdings nicht statistisch signifikant.

Zum Zeitpunkt 96h, wurde keine mRNA-Messung durchgeführt, da die Zellen keinen Kern mehr enthalten und somit auch keine mRNA.

## 5 Schlussbetrachtung

Die Friedreichs Ataxie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die meist zwischen Kindesalter und Pubertät beginnt und die betroffenen Personen im Normalfall nach 10-15 Jahren Krankheitsverlauf von einem Rollstuhl abhängig macht.

Die Kernsymptome sind progressive Ataxie, sensorischer Verlust und Muskelschwund, oft auch assoziiert mit Skoliose, Fußdeformationen und Herzkrankheiten.

Die Ursache der Friedreichs Ataxie ist ein Mangel an dem Protein Frataxin, welches bei Gesunden in allen Geweben exprimiert wird, besonders hoch in Herz, Leber, Skelettmuskulatur und Pankreas, sowie im Zentralnervensystem, speziell im Rückenmark [PANDOLFO M., 1999].

Die Friedreichs Ataxie wird durch eine Mutation auf Chromosom 9 am Gen X25 verursacht. Dabei kommt es zu einer GAA Trinukleotid-Wiederholung die in schweren Fällen bis zu 1800 Wiederholungen umfassen kann. Diese Struktur nimmt in weiterer Folge die Konformation einer „sticky DNA“ an, welche selbst assoziiert und so die Transkription des 210 Aminosäure großen Proteins Frataxin erschwert [DELATYCKI M. B. et al., 2000].

Frataxin kommt in den Mitochondrien vor und hat dort verschiedene Aufgaben. Der Mangel führt zu mitochondrialer Eisen-Akkumulation, oxidativer Schädigung, verminderter Synthese der Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Untereinheiten der mitochondrialen Elektronentransport-Komplexe I, II und III, sowie des Fe-S Proteins Aconitase [RÖTIG A. et al., 1997].

Zusätzlich wurde ein Einfluss der verminderten Frataxinsynthese auf die Häm-Biosynthese bewiesen. Als Konsequenz der verminderten Fe-S Cluster-Bildung ist die Bildung von Cytochrom C-Häm sowie des Häm-abhängige Komplex IV vermindert [NAPOLI E. et al., 2006].

Aus diesen bisher gewonnenen Erkenntnissen über Funktion und Struktur von Frataxin haben sich mehrere Therapieansätze entwickelt.

Einerseits wird versucht, mit Anioxidantien wie Coenzym Q10 und Vitamin E dem oxidativen Stress entgegen zu wirken. Die gleiche Wirkung geht auch von Idebenon aus, einem Derivat von Conenzym Q [HART P. E. et al., 2005].

Eine andere Therapiemöglichkeit wäre der Einsatz von Eisenchelatoren. Das klinisch gut erprobte Deferrioxamin wurde mittlerweile als unbrauchbar und vielleicht sogar bedenklich betrachtet, da es durch seinen hydrophilen Charakter keine Membranen durchdringen kann und somit auch nicht im Mitochondrium Eisen chelatieren kann. Deferiprone, ein lipophiles Eisen-Chaperon, kann durch Membranen dringen, die Blut-Hirn-Schranke durchschreiten und so auch das akkumulierte mitochondriale Eisen binden [PANDOLFO M., 2002; KAKHLON A. et al., 2008].

Versuche mit rekombinantem humanem Erythropoetin brachten bisher gute Ergebnisse bei der Erhöhung von Frataxin-Proteinlevels in FRDA-Lymphoblasten, jedoch muss es noch genügend erforscht werden [BOESCH S. et al., 2008, STURM B. et al., 2005].

Auf genetischer Ebene wird an Histon-Deacetylase Inhibitoren geforscht, welche durch Acetylierung bestimmter Histonregionen möglicherweise die Frataxin-Expression erhöhen können [HERMAN D. et al., 2006].

Da Frataxin einen Einfluss auf die Häm-Biosynthese hat war es Ziel dieser Studie, die Frataxin-Expression auf Protein und mRNA-Ebene bei erhöhter Hämoglobinsynthese zu untersuchen.

Bei den Untersuchungen an dem K562 Zellmodell (erythroid-leukämische Zellen) wurden mittels ECLIA die Frataxin-Protein-Levels und mittels PCR die Frataxin mRNA-Levels bei gesteigerter (Hämin Inkubation), gehemmter (Succinyl-Aceton Inkubation) und gesteigerter sowie gehemmter (Inkubation mit beiden Substanzen) Hämoglobinsynthese untersucht.

Es waren bei allen unterschiedlichen Inkubationen geringe Anstiege der Frataxin-Proteinkonzentration zu beobachten, wobei die Ergebnisse nicht signifikant waren.

Auf mRNA Ebene ergaben sich hingegen keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

In dem Zellmodell der erythroiden Progenitorzellen wurde ebenfalls die Hämoglobinsynthese nachgestellt. Dabei wurden die Progenitorzellen kontrolliert differenziert durch eine gesteigerte Gabe von Erythropoetin. Die Hämoglobinkonzentration stieg signifikant auf das Fünffache der Ausgangskonzentration an, und im Vergleich dazu sank die Frataxin-Proteinkonzentration signifikant zwischen 24h und 48h Differenzierung, wobei dieses Zeitfenster den Hauptzeitraum der Differenzierung in diesem Zellmodell darstellt. Nach beendeter Differenzierung (72h) stieg die Frataxin-Proteinkonzentration wieder signifikant.

Die gleiche Tendenz war zwischen 24h und 48h der Differenzierung auch auf Frataxin mRNA-Ebene zu beobachten, allerdings ohne Signifikanz.

Diese Ergebnisse sollen in weiteren Studien mit einem Frataxin-Knockout Mäusemodell durchgeführt werden, um die Hypothese zu bestätigen, dass die Hämoglobinsynthese bei Friedreichs Ataxie Patienten verändert ist.

## 6 Zusammenfassung

Die Friedreichs Ataxie ist eine neurodegenerative autosomal rezessiv vererbbares Krankheit mit einer Häufigkeit von 1:50.000 und einer Prävalenz in der europäischstämmigen Bevölkerung. Sie kommt durch einen Mangel an dem mitochondrialen Protein Frataxin zu Stande, welcher durch eine GAA-Expansion im ersten Intron des Frataxin-Gens bedingt ist [DELATYCKI M. B. et al., 2000].

Dadurch kommt es oft zu oxidativer Schädigung und verminderter Synthese der Eisen-Schwefel-Cluster, was vor allem die Untereinheiten der mitochondrialen Elektronentransport Komplexe I, II und III, sowie das Fe-S Protein Aconitase betrifft. Als Konsequenz der verminderten Fe-S-Cluster Bildung ist auch die Bildung von Cytochrom C-Häm sowie die Häm-abhängige Komplex IV Bildung vermindert [RÖTIG A. et al., 1997; NAPOLI E. et al., 2006].

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Hämoglobinsynthese auf die Frataxin-Expression zu ermitteln. Die Hämoglobinsynthese wurde durch Inkubation von erythroid-leukämischen Zellen (K562-Zellen) mit Hämin, Succinyl-Aceton oder beiden Substanzen gleichzeitig gesteigert oder gehemmt. Anschließend wurde mittels ECLIA die Frataxin-Protein-Expression und mit Hilfe der PCR die mRNA-Expression des Proteins ermittelt. Bei diesen Versuchen ergab sich bei allen Inkubationen eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Protein-Konzentrationen. Auf mRNA Ebene wurden keine Veränderungen beobachtet.

In einem Zellmodell mit primären erythroiden Progenitorzellen wurde die Erythropoese durch kontrollierte Proliferation und anschließender Epo-induzierter Differenzierung nachgestellt. Während dieser Differenzierung stieg die Hämoglobinkonzentration signifikant auf das Fünffache an, gleichzeitig fiel die Frataxin-Proteinkonzentration zuerst signifikant ab gefolgt von einem extremen Anstieg nach 72h. Auch auf mRNA-Ebene verminderte sie die Frataxin-Expression, allerdings ohne Signifikanz.

Diese Ergebnisse sollen eine Grundlage für die weitere Arbeit mit Frataxin-Knockout Mäusen bilden, um das Wissen über die Funktion von Frataxin im Hinblick auf die Hämoglobinsynthese zu erweitern.

## 7 Summary

Friedreichs ataxia is an autosomal recessive hereditary disease with an incidence of 1:50.000 and prevalence in the Caucasian population. The disease manifests itself in individuals carrying a GAA-repeat expansion within the first intron of the gene encoding the mitochondrial protein frataxin. This GAA-repeat expansion results in deficiency of this protein [DELATYCKI M. B. et al., 2000]. This deficiency leads to oxidative damage, impaired synthesis of the iron-sulfur-clusters, which results in defects of the subunits of the mitochondrial electron transport complexes I, II and III as well as the Fe-S protein aconitase. Additionally as a consequence of the impaired Fe-S cluster formation, a deficiency of the cytochrome C-heme and the heme-dependant complex IV occurs [RÖTIG A. et al., 1997; NAPOLI E. et al., 2006].

The aim of this work was to investigate the influence of hemoglobin synthesis on frataxin expression by incubating the erythroid-leukemia cell line (K562-cells) with hemin, succinyl-acetone or both substances simultaneously.

Frataxin protein levels were measured by ECLIA and the mRNA-expression was determined by PCR. We found slightly elevated frataxin protein concentrations, but with no statistically significant difference, and there were no changes in frataxin mRNA-levels.

In a murine cell model with primary erythroid progenitor cells we induced erythropoiesis with controlled proliferation and differentiation. During the Epo-induced differentiation hemoglobin-levels increased significantly, wheras the frataxin protein expression decreased, also significantly. Frataxin mRNA-levels decreased, but with no statistical significance.

These findings provide a good basis for future work with a frataxin-knockout murine cell culture model to further investigate the role and function of frataxin during hemoglobin synthesis.

## 8 Quellenverzeichnis

AQUAVIVA F, CASTALDO I, FILLA A, GIACCETTI M, MARMOLINO D, MONTICELLI A, PINELLI M, SACCÀ F, COCOZZA S, Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mRNA expression, Cerebellum, 2008, 7/3;360-365

ADINOLFI S, IANNUZZI C, PRISCHI F, PASTORE C, IAMETTI S, Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS, Nat Struct Mol Biol, 2009;16;390–396.

ANDERSSON L C, JOKINEN M, GAHMBERG C G, Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562, Nature, 1979, Vol 278;364-365

ALBANO L M J, NISHIOKA S A D, MOYSÉS R L, WAGENFÜHR J, BERTOLAA D, SUGAYAMA S M M, KIM C A, Friedreich's Ataxia. Cardiac Evaluation of 25 Patients with Clinical Diagnosis and Literature Review Arq Bras Cardiol, 2002, Vol 78/5;448-51

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

BECKER E M, GREER J M, PONKA P, RICHARDSON D R, Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization, Blood, 2002, 99;3813-3822

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

BIT-AVRAGIM N, PERROT A, SCHÖLS L, HARDT C, KREUZ F R, ZÜHLKE C, BUBEL S, LACCONE F, VOGEL H-P, DIETZ R, OSTERKIEL K J, The GAA repeat expansion in intron 1 of the frataxin gene is related to the severity of

cardiac manifestation in patients with Friedreich's ataxia, J Mol Med, 2001, 78;626–632

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

BRADLEY J L, BLAKE J C, CHAMBERLAIN S, THOMAS P K, COOPER J M, SCHAPIRA A H V, Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia; Human Molecular Genetics, 2000, 9/2;275-282

CAVADINI P, O'NEIL H A, BENADA O, ISAYA G, Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia, Human Molecular Genetics, 2001;11/3;217-227

DELATYCKI M B, WILLIAMSON R, FORRESTER S M, Friedreich ataxia: an overview, J.Med.Genet, 2000, 37;1-8

DOLZNIG H, BLOUMÉ F, STANGL K, Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. FASEB J, 2001, 15;1442-1444

DONATO S. Di, GERELLA C, MARIOTTI C, The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias.II. Autosomal recessive ataxias, Neurol Sci, 2001, 22;219–228

DRABKIN D L, AUSTIN J H, Spectrophotometric Studies. II. Preparations from washed blood cells; Nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin, J. Biol. Chem, 1935, 112; 51–65

DÜRR A, COSSEE M, AGID Y, CAMPUZANO V, MIGNARD C, PENET C, MANDEL J-L, BRICE A, KOENIG M, Clinical and Genetic Abnormalities in

Patients with Friedreich's Ataxia, The New England J. Of Med. 1996, 335;1169-1175

HART P E, LODI R, RAJAGOPALAN B, BRADLEY J L, CRILLEY J G, TURNER C, BLAMIRE A M, MANNERS D, STYLES P, SCHAPIRA A H V, COOPER J M, Antioxidant Treatment of Patients With Friedreich Ataxia, Archives of Neurology, 2005, Vol 62/4;621-626

HERMAN D, JENSSSEN K, BURNETT R, SORAGNI E, PERLMAN S, GOTTESFELD J M, Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's Ataxia, Nature Chemical Biology, 2006, Vol 2/10;551-558

HICKEY G, [http://www.biocarta.com/pathfiles/m\\_erythPathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/m_erythPathway.asp), Stand 24.08.2009

KAKHLON O, MANNING H, BREUER W, MELAMED-BOOK N, LU C, CORTOPASSI G, MUNNICH A, CABANTCHIK Z I, cell functions impaired by frataxin deficiency are restored by drug mediated iron relocation, Blood, 2008, 112/13;5219-27

KAIHO S, MIZUNO K, Sensitive assay systems for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation, Anal Biochem, 1985, 149/1;117-20.

KERENYI M. A., GREBIEN F., GEHART H., SCHIFRER M., ARTAKER M., KOVACIC B., BEUG H., MORIGGL R., MÜLLNER E. W., Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1, Blood, 2008, Vol 112/9;3878-3888

KOLBUS A, BLÁZQUEZ-DOMINGO M, CAROTTA S, BAKKER W, LUEDEMANN S, VON LINDERN M, STEINLEIN P, BEUG H, Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the

expansion of erythroid progenitors:molecular analysis by expression profiling, Blood, 2003, 102;3136-3146

KRASILNIKOVA M M, MIRKIN S M, Replication Stalling at Friedreich's Ataxia (GAA)n Repeats In Vivo, Mol Cell Biol, 2004, 24/6;2286-2295

LABUDA M, LABUDA D, MIRANA C, POIRIER J, SOONG B W, BARUCHA N E, PANDOLFO M, Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion, Neurology, 2000, 54/12;2322-4

LEBERBAUER C, BLOUMÉ F, UNFRIED G, HUBER J, BEUG H, MÜLLNER E W, Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors, Blood, 2005, 105;85-94

LEBERBAUER C, Hormones in human Erythropoiesis, Long-term expansion versus differentiation of human hematopoietic cells, Dissertation, Wien , 2005

VON LINDERN M, DREINER EM, DOLZNIG H, Leukemic transformation of normal murine erythroid progenitors: v- und c-ErbB act through signaling pathways activated by the EpoR and c-Kit in stress erythropoiesis, Incogene, 2001, 20;3651-3664

LÖFFLER G PETRIDES P E, Biochemie und Pathobiochemie, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, 1998

LOZZIO, C B, LOZZIO B B, Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, Blood, 1975, 45;321-34

MARKS P A, FANTONI A, De La CHAPELLE A, Hemoglobin Synthesis and Differentiation of Erythroid Cells, Vitamins and Hormons, Elsevir, 1969, Vol 26;331-352

MARTELLI A, WATTENHOFER-DONCÉ, SCHMUCKER S, BOUVET S, REUTENAUER L, PUCCIO H, Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues, *Hum Mol Genet*, 2007, 16;2651–2658

NAPOLI E, MORIN D, BERNHARDT R, BUCKPITT A, CORTOPASSI G, Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biocshim Biophys Acta*, 2007, 1772/7;773-80

NAPOLI E, TARONI F, CORTOPASSI F A, Frataxin, Iron–Sulfur Clusters, Heme, ROS, and Aging Antioxid Redox Signal, 2006, 8/3-4;506-16

PANDOLFO M, Molecolar Pathogenesis of Friedreich Ataxia, *Arch Neuro.*, 1999, 56;1201-1208

PANDOLFO M, PASTORE A, The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin, *J Neurol*, 2009, 256;9–17

PANDOLFO M, Friedreich's Ataxia: The clinical picture, *J Neurol*, 2009, 256;3–8

PANDOLFO M, Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction, *Mitochondrion*, 2002, 2/1-2;87-93

PANZENBÖCK B, BARTUNEK P, MAPARA M Y, ZENKE M, Growth and Differentiation of Human Stem Cell Factor/Erythropoietin-Dependent Erythroid Progenitor Cells In Vitro, *Blood*, 1998, 92:3658-3668

PRAGNA I, PATEL I, GRAZIA I, Friedreich Ataxia: From GAA Triplet–Repeat Expansion to Frataxin Deficiency, *Am. J. Hum Genet*, 2001, 69;15–24

RÖTIG A, de LONLAY P, CHRETIEN D, FOURY F, KOENIG M, SIDI D, MUNNICH A, RUSTIN P, Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia, *Nat Genet*, 1997, 17:215–217

RUTHERFORD T R, CLEGG J B, WEATHERALL D J, K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin, Nature, 1979, 280:164-5

SCHMUCKER S, ARGENTINI M, CARELLE-CALMELS N, MARTELLI A, PUCCIO H, The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin, Hum Mol Genet, 2008, Vol. 17/22;3521-31

SCHRANZHOFER M, SCHIFRER M, CABRERA J A, KOPP S, CHIBA P, BEUG H, MÜLLNER E W, Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis, blood, 2006 107;4159-4167

SCHULZ J B., BOESCH S, BÜRK K, DÜRR A, GIUNTI P, MARIOTTI C, POUSSET F, SCHÖLS L, VANKAN P, PANDOLFO M, Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective, Nat. Rev. Neurol, 2009, 5:222–234

STURM B, STUPPHAN D, KAUN C, BOESCH S, SCHRANZHOFER M, WOJTA J, GOLDENBERG H, SCHEIBER-MOJDEHKAR B, Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro, European Journal of Clinical Investigation, 2005, Vol 35/11;711-717

WOOD N W, Diagnosing Friedreich's Ataxia, Arch Dis Child, 1998, 78;204-207

ZHU Y, LEE H C, ZHANG L, Examination of Heme Action in Gene Expression: Heme and Heme Deficiency Affect the Expression of Diverse Genes in Erythroid K562 and Neuronal PC12 Cells DNA and Cell Biology, 2002, Vol 21/4;333–346

ZHU Y, HON T, YE W, ZHANG L, Heme Deficiency Interferes with the Ras-Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway and Expression of a Subset of Neuronal Genes, Cell Growth & Differentiation, 2002, 13;431–439

# **Curriculum Vitae**

**Name:** Laura Anna Claire Neumann  
**Geboren:** 29.03.1985 in Gmunden

## **Ausbildung**

**1991 – 1995** Volkschule Ort der Schulvereins der Kreuzschwestern  
**1995 – 2003** Gymnasium Ort des Schulvereins der Kreuzschwestern  
**2003** Matura am Gymnasium Ort des Schulvereins der Kreuzschwestern  
**Seit 2003** Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

## **Bisherige Praktika und Tätigkeiten**

**1999** Ferialpraktikum bei der Firma GEG Elektrobau GmbH  
**2000-2005** jeweils ein Monat Ferialpraktikum bei der Firma Gmundner Fertigteile Ges.m.b.H.&Co.KG

**07/2006** Ferialpraktikum im Labor; Firma Gmundner Molkerei reg.Gen.m.b.H.  
**07/2007** Ferialpraktikum im Labor; Firma Gmundner Molkerei reg.Gen.m.b.H.  
**02/2009** Praktikum im Labor am Institut für medizinische Chemie

**03/2009-07/2009** Projektmitarbeit am Institut für Medizinische Chemie  
**WS2008** Tutortätigkeit am Institut für Medizinische Chemie  
**SS2009** Tutortätigkeit am Institut für Medizinische Chemie