

**Institut für Ernährungswissenschaft
Ernährungstoxikologie**

**Identifikation des mitochondrialen Proteins Frataxin
als stoffwechselmodulierenden Tumorsuppressor**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Ernährungswissenschaft/Toxikologie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
René Thierbach**

Potsdam, September 2004

Inhalt

Inhalt.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	5
2 Material und Methoden	10
2.1 Versuchstiere	10
2.1.1 Mausmodell: leberspezifischer Frataxin-Knock-out.....	10
2.1.2 Haltungsbedingungen.....	11
2.2 Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere	12
2.2.2 RT-PCR	15
2.2.3 Nachweis der amplifizierten DNA	17
2.2.4 Plasmide	18
2.3 Zellkultur.....	19
2.3.1 Zelllinien.....	19
2.3.2 Standardmethoden der Zellkultur	19
2.3.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit	20
2.3.4 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien.....	22
2.4 Biochemische Methoden.....	24
2.4.1 Proteingewinnung aus Gewebe.....	24
2.4.2 Proteingewinnung aus Kulturzellen	25
2.4.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....	25
2.4.4 Proteinseparation und Immunoblot.....	26
2.4.5 Aconitaseaktivitäts-Bestimmung.....	29
2.4.6 ATP-Quantifizierung	30
2.5 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des mitochondrialen Membranpotenzials.....	32
2.6 Bestimmung der Respirationsrate mittels Clark-Elektrode	35
2.7 Methoden zur Bestimmung der Tumorigenität von Zellen.....	35
2.7.1 Soft-Agar-Assay.....	36
2.7.2 Nacktmaus-Assay.....	37
2.8 Histologie	38
2.8.1 Vorbereitung der Gewebeproben	38
2.8.2 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	38
2.8.3 Immunhistologie.....	38
2.9 Statistische Analyse	39
2.9.1 Kolmogorov-Smirnov-Test.....	39
2.9.2 Deskriptive Statistik	39
2.9.3 Students t-Test	39
2.9.4 U-Test von Mann und Whitney	40

2.9.5	Wilcoxon-Test	40
2.10	Geräte	41
2.11	Antikörper	41
2.12	Verbrauchsmaterial und Reagenzien	42
2.13	Puffer und Lösungen.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Beschreibung der leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Maus	44
3.1.1	Verteilung der Genotypen in einer Versuchspopulation	44
3.1.2	Nachweis veränderter Transkription und Translation des Frataxin-Gens	45
3.1.3	Überlebensrate der Tiere mit leberspezifischem Frataxin-Knock-out	46
3.1.4	Veränderungen der Leber in Knock-out-Tieren	47
3.2	Immunhistologischer Nachweis erhöhter Proliferation.....	48
3.3	Energiestoffwechsel in Frataxin-Knock-out-Hepatozyten	49
3.3.1	Bestimmung der Aconitaseaktivität	49
3.3.2	Bestimmung der Respirationsrate	50
3.3.3	Bestimmung des ATP-Gehaltes	51
3.4	Mechanistische Untersuchungen.....	52
3.4.1	Apoptose-Signalweg.....	52
3.4.2	Veränderte Aktivität stressassoziierter Proteine.....	53
3.5	Charakterisierung frataxinüberexprimierender Zellen.....	54
3.5.1	Nachweis der erhöhten Frataxinexpression	54
3.5.2	Wachstum der Zellen.....	55
3.6	Energiestoffwechsel in den frataxinüberexprimierenden Zellen	56
3.7	Aktivierung der p38-MAPK.....	58
3.8	Methoden zur Bestimmung der Tumorigenität von Zellen	59
3.8.1	Wachstum im Soft-Agar	59
3.8.2	Nacktmaus-Assay.....	61
4	Diskussion	63
5	Zusammenfassung.....	78
6	Summary	79
7	Literaturverzeichnis	80
	Erklärung	87
	Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BP	Bandpassfilter
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
<i>cre</i>	Genotyp heterozygot Cre-Rekombinase-positiv
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FBS	fötales Rinderserum
FRDA	Friedreich-Ataxie
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin G 418 Antibiotikum
<i>het-ko</i>	Genotyp heterozygoter Knock-out des Frataxin-Gens
<i>het-lox</i>	Genotyp heterozygot loxP-flankiertes Frataxin-Gen
HMC	Hoffman-Modulations-Kontrast
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSP	Hitzeschockprotein
i.d.R.	in der Regel
kD	Kilodalton
<i>ko</i>	Genotyp homozygoter Knock-out des Frataxin-Gens
<i>lox</i>	Genotyp homozygot loxP-flankiertes Frataxin-Gen
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mio.	Million
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADP ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Phasenkontrast
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkriptase (im entsprechenden Kontext)
RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von einer Polymerase-Kettenreaktion
SAPK/JNK	Stress-aktivierte Proteinkinase / c-Jun-N-terminale Kinase
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylenediamine
u.a.	unter anderem
v/v	<i>volume per volume</i>
<i>wt</i>	Genotyp Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
<i>YFH1</i>	<i>yeast frataxin homolog 1</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Friedreich-Ataxie (FRDA) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die auf eine erbliche Veränderung im Gen *X25*, welches das Frataxin-Protein kodiert, zurückgeführt wird (Campuzano, 1996). Primäre Krankheitssymptome sind Ataxie, hypertrophe Kardiomyopathie, Muskelatrophie mit Skelettverformungen, Kohlenhydratintoleranz und Diabetes (Finocchiaro, 1988; Dürr, 1996; Hebinck, 2000; Ristow, 2004; OMIM:229300, 2004).

Aus bisher ungeklärter Ursache entwickeln sich im jungen Erwachsenenalter maligne Tumoren wie Magenkarzinome (Ackroyd, 1996), Neuroblastome (Barr, 1986), Lymphome (de Pas, 1999) oder Mammakarzinome (Kidd, 2001).

Ursache der FRDA ist eine Vermehrung von GAA-Trinukleotiden im ersten Intron des Frataxin-Gens (Dürr, 1996) und eine damit verbundene Verminderung der Expression des mitochondrial lokalisierten Frataxin-Proteins (Campuzano, 1997).

In den vergangenen Jahren ließen sich durch Beobachtungen an Friedreich-Ataxie-Patienten, Studien an Gewebebiopsien und Arbeiten mit primären Fibroblasten mechanistische Zusammenhänge zwischen dem Frataxinmangel und der FRDA erkennen. Obwohl seine Kristallstruktur im Jahr 2000 aufgeklärt (Dhe-Paganon, 2000; Musco, 2000) und durch den Einsatz von Mausmodellen und Knock-out-Mutanten des Frataxin-homologen Gens *YFH1* in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) umfangreiches Wissen über die Folgen veränderter Frataxin-Expression erlangt wurde, ist die genaue Funktion dieses phylogenetisch hochkonservierten Proteins noch immer umstritten.

Variationen der Frataxinexpression verursachen Veränderungen des zellulären Eisenhaushaltes. Frataxin wurde unter anderem eine Rolle als Eisenspeicherprotein (Gakh, 2002) oder im Eisentransport (Babcock, 1997) zugeschrieben. Die kontroverse Datenlage lässt jedoch momentan keine klare Interpretation für die Bedeutung des veränderten Eisenhaushaltes in der Friedreich-Ataxie zu.

Eine Beteiligung des Frataxins bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Proteinen (Eisen-Schwefel-Proteinen) gilt hingegen als gesichert (Rötig, 1997; Foury, 1999; Mühlenhoff, 2003). Eisen-Schwefel-Proteine sind in biologischen

Systemen weit verbreitet. Die Eisen-Schwefel-Cluster spielen bei Elektronentransferprozessen (z.B. bei Komplexen der Atmungskette) eine wichtige Rolle oder wirken direkt an der Bindung und Aktivierung von Enzymsubstraten (z.B. bei der Isomerisierung von Zitrat zu Isozitrat durch die Aconitase) mit. Die Biogenese der Eisen-Schwefel-Proteine wird am Hefemodell eingehend untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass Frataxin Eisen auf die Isu-Proteine überträgt, welche unter Nutzung einer Elektronentransportkette die Eisen-Schwefel-Cluster synthetisieren. Die Übertragung der Cluster auf die Zielproteine erfolgt durch weitere Proteine (Lill, 1999; Mühlhoff, 2002; Mühlhoff, 2003).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schädigen eine Vielzahl zellulärer Verbindungen. Sie entstehen z.B. durch äußere Einflüsse (Strahlung, Xenobiotika, usw.) oder im Zuge der oxidativen Phosphorylierung (Kowaltowski, 2001). Aus diesem Grund besitzen die Zellen diverse Schutzmechanismen. Durch verschiedene Enzyme (z.B. Superoxid-Dismutase) wird die übermäßige Bildung von ROS vermieden und reduzierende Verbindungen (z.B. Glutathion) können gebildete ROS abfangen und unschädlich machen. Normalerweise besteht zwischen oxidativen und reduktiven Prozessen ein Gleichgewicht. Überwiegen jedoch die oxidativen Reaktionen, spricht man vom „oxidativen Stress“. In diesem Fall reichern sich oxidierte Verbindungen an und schädigen auf verschiedene Weise die Zellen. Die Entstehung einer Reihe akuter und chronischer Erkrankungen (z.B. Entzündungen, Arteriosklerose, Krebs) wird auf erhöhten oxidativen Stress zurückgeführt (Übersichtsartikel: Beckman, 1998).

Schon 1997 wurde am Hefemodell gezeigt, dass eine Defizienz des Frataxin-Homologen *Yfh1* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führt (Babcock, 1997; Koutnikova, 1997; Foury, 1997). Diese wird auch an Gewebeproben von FRDA-Patienten (Rötig, 1997; Bradley, 2000), FRDA-Fibroblasten und FRDA-Lymphoblasten (Wong, 1999; Tan, 2001) sowie verschiedenen Frataxin-Knock-out-Mausmodellen (Puccio, 2001; Ristow, 2003) festgestellt. Erhöhter oxidativer Stress kann weiterhin durch entsprechende Marker bei FRDA-Patienten nachgewiesen werden (Schulz, 2000; Emond, 2000). Als Folge möglicher oxidativer Schädigung nach Frataxindepletion im Hefemodell gilt auch die Schädigung bzw. der Verlust der mitochondrialen DNA (Babcock, 1997; Koutnikova, 1997; Wilson, 1997; Karthikeyan, 2003). Eine Überexpression von Frataxin in Fibroblasten schützt diese bis zu einem gewissen Grad vor Beeinträchtigungen durch oxidativen Stress (Shoichet, 2002).

Das Zusammenspiel von Frataxinmangel, verändertem Eisenhaushalt, verminderter Eisen-Schwefel-Protein-Aktivität und oxidativem Stress ist sehr komplex und noch nicht endgültig aufgeklärt. Einerseits wird als Ursache des oxidativen Stresses eine durch Frataxinmangel bedingte mitochondriale Eisenakkumulation angenommen, welche zur erhöhten Bildung von ROS durch die Fenton-Reaktion führt (Tan, 2001); andererseits gilt es zu beachten, dass mitochondriale Eisenakkumulation als sekundärer Effekt des oxidativen Stresses auftreten kann (Rouault, 1996). Die Komplexität dieser Wechselwirkungen wird auch an Befunden wie dem frataxinbedingt veränderten Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren (Tan, 2003) deutlich.

Ohne die Ursache bisher zweifelsfrei aufzuklären, kann gezeigt werden, dass als Folge von Frataxinmangel eine verminderte Aktivität von Eisen-Schwefel-Proteinen in Hefen (Rötig, 1997), im Mausmodell (Puccio, 2001) und im Herzmuskelgewebe von FRDA-Patienten (Rötig, 1997) vorliegt.

Durch Frataxinmangel verminderte Aktivitäten von Eisen-Schwefel-Proteinen, wie der Aconitase oder einigen Atmungskettenkomplexen, führen direkt oder indirekt zu verminderter oxidativer Phosphorylierung. Dieser an der inneren Mitochondrienmembran ablaufende Prozess nutzt Reduktionsäquivalente (aus Zitratzyklus, Fettsäureoxidation und Glykolyse), um durch eine Reihe von Redoxvorgängen ATP zu erzeugen.

So ist erklärbar, dass eine der ersten Beobachtungen an frataxindefizienten Hefen war, dass diese ein Defizit in der Respiration zeigten (Koutnikova, 1997; Babcock, 1997; Wilson, 1997). Derartige Beobachtungen – assoziiert mit einem verminderten ATP-Gehalt – lassen sich *in vivo* an Muskeln von FRDA-Patienten wiederholen (Lodi, 1999; Vorgerd, 2000; Lodi, 2001). Im inversen Ansatz führt Frataxinüberexpression *in vitro* zu einer vermehrten oxidativen Phosphorylierung (Ristow, 2000).

Vermehrter oxidativer Stress und verminderter zellulärer Energiestoffwechsel sind mögliche Ursachen für das Auftreten von Krebserkrankungen. Oxidativer Stress gilt als Verursacher zahlreicher divergenter Zellveränderungen, welche ihrerseits nachweislich an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Klaunig, 2004). Schon sehr früh wurde der Zusammenhang zwischen verminderter Energiegewinnung und Krebsentstehung (Warburg, 1924; Warburg, 1956) beschrieben. Ausgehend von seinen bioenergetischen Untersuchungen an Tumoren entwickelte Otto

Warburg eine Theorie über die Krebsentstehung: die so genannte „Warburg-Hypothese“. Er sah in der Verminderung der Atmung der Krebszellen und der Energiegewinnung durch Gärung einen phylogenetischen Rückschritt, der zwangsläufig zu einer Stagnation in der Differenzierung der Gewebe führen müsse.

Warburgs Aussage, dass „die Ursache des Krebses der Ersatz der Sauerstoffatmung durch eine Gärung ist“, eignet sich aus heutiger Sicht nicht mehr zur allgemein gültigen Erklärung der Entstehung von Krebserkrankungen. Krebsentstehung wird, stark verallgemeinert, als mehrphasiger Prozess (Initiation, Promotion, Progression) verstanden, welcher unter anderem auf mehrere Mutationsereignisse zurückzuführen ist (Übersichtsartikel: Fearon, 1990). Die Theorie von Warburg ist aber heute noch Ansatzpunkt für eine Reihe von Untersuchungen. So konnten einige Aspekte konkretisiert oder teilweise widerlegt werden (Zu, 2004). Ungeklärt ist bislang jedoch die Frage, welche Rolle die Mitochondrien und damit der zelluläre Energiehaushalt in der Krebsentstehung spielen (Cuezva, 2002; Rossignol, 2004).

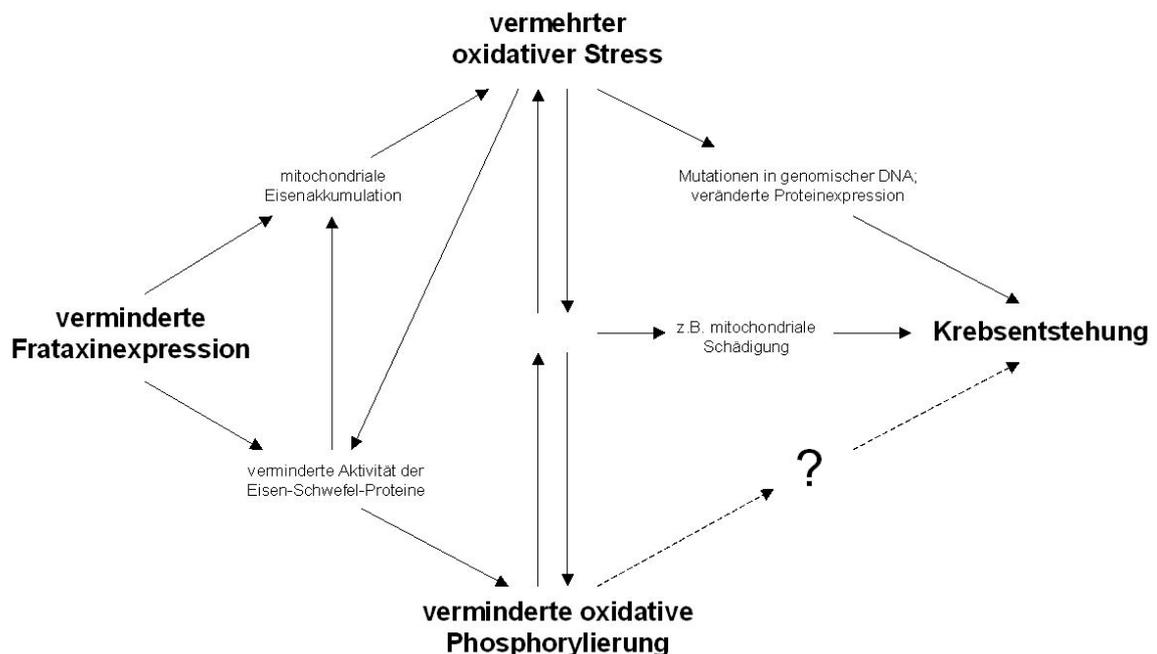


Abbildung 1: Modelldarstellung Frataxinmangel-bedingter Krebsentstehung

Die Abbildung 1 fasst wichtige Ereignisse zusammen, die bei einer möglichen frataxinabhängigen Krebsentstehung wichtig erscheinen. Aus ihr geht insbesondere hervor, dass sich vermehrter oxidativer Stress und verminderte oxidative Phosphorylierung gegenseitig beeinflussen können (Wei, 2002; Kowaltowski, 2001) und dass es eine Reihe gemeinsamer Auswirkungen von oxidativem Stress und oxidativer Phosphorylierung gibt, welche für eine Krebsentstehung verantwortlich gemacht werden. Während ein direkter Einfluss von oxidativem Stress auf die Krebsentstehung als bewiesen gilt, ist es bisher unklar, ob verminderte oxidative Phosphorylierung eine mögliche Ursache maligner Erkrankungen ist.

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Mausmodell etabliert. Ein hepatozytenspezifischer Knock-out des Frataxins versprach die Möglichkeit, in einem gut zugänglichen, stoffwechselaktiven Organ die Folgen der verminderten oxidativen Phosphorylierung genauer zu studieren. Als vorteilhaft wurde dabei die Tatsache erachtet, dass die Leber ein effektives Schutzsystem gegen erhöhten oxidativen Stress besitzt. Die ersten Versuche zeigten eine deutlich verringerte Lebenserwartung der Tiere, makroskopisch und mikroskopisch stark veränderte Lebern und gehäuftes, frühes Auftreten von Lebertumoren.

Ziel der Arbeit war es nun, einen möglichen Zusammenhang zwischen verminderter oxidativer Phosphorylierung und dem Auftreten der Lebertumoren darzustellen. Dementsprechend wurde zunächst der Nachweis einer frataxinbedingt verminderten oxidativen Phosphorylierung geführt und anschließend nach möglichen biochemischen Ursachen für die vorliegende Krebsentstehung gesucht. Ausgangspunkt dafür war eine Publikation, welche eine vermehrte Aktivierung der c-jun-N-terminalen-Kinase (SAPK/JNK)-Stresskaskade in stimulierten FRDA-Fibroblasten zeigte (Pianese, 2002). Angestrebt war der Beweis der Hypothese, dass verminderte oxidative Phosphorylierung einen direkten Einfluss auf die Krebsentstehung hat.

Parallel dazu wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz gezeigt, dass eine erhöhte Frataxinexpression *in vitro* ursächlich sowohl an erhöhtem Energiestoffwechsel, als auch an einer veränderten Tumorigenität beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Mausmodell: leberspezifischer Frataxin-Knock-out

Die Erzeugung des organspezifischen Frataxin-Knock-outs in der Maus erfolgte unter Zuhilfenahme des Cre-/loxP-Rekombinasesystems (Lottspeich, 1998). Dabei werden Cre-heterozygote Tiere mit so genannten geflochten Tieren gekreuzt. Die dafür verwendeten Mauslinien wurden in unterschiedlichen Arbeitsgruppen hergestellt.

Für die gewebspezifische Expression der Cre-Rekombinase wird das Gen unter die Kontrolle von Promotoren gestellt, die nur in den jeweiligen Zielgeweben aktiv sind. So wird ein hepatozytenspezifischer Knock-out durch Verwendung des Albumin-Promotors (*Alb-Cre*) erreicht, da Albumin ausschließlich in den Hepatozyten synthetisiert wird. Die hier verwendete *Alb-Cre*-Maus wurde 1999 von Postic et al. generiert (Postic, 1999).

Puccio et al. stellten 2001 eine Frataxin-loxP-Maus vor, bei der das hochkonservierte Exon 4 des Frataxin-Gens durch loxP-Elemente in den angrenzenden Introns flankiert ist (Puccio, 2001). Durch die mit der Rekombination einhergehende Verschiebung des Leserahmens entsteht ein frühzeitiges Stopp-Codon; das translatierte Polypeptid besitzt keine Aktivität.

Durch die Verpaarung beider Mauslinien ergeben sich die folgenden sechs Genotypen, die nach Mendelschen Regeln zu folgenden Anteilen in einer Population vorliegen:

<i>Alb-Cre</i> -Genotyp	Frataxin- <i>loxP</i> -Genotyp	Bezeichnung Genotyp gesamt	Prozentsatz nach Mendel
+ / -	+ / +	<i>ko</i>	12,5 %
+ / -	+ / -	<i>het-ko</i>	25 %
+ / -	- / -	<i>cre</i>	12,5 %
- / -	+ / +	<i>lox</i>	12,5 %
- / -	+ / -	<i>het-lox</i>	25 %
- / -	- / -	<i>wt</i>	12,5 %

Tabelle 1: Theoretische Genotypenverteilung nach Mendel

Für die Zucht der Versuchsgruppe wurde geschlechtsunabhängig stets der Genotyp *het-ko* mit dem Genotyp *het-lox* verpaart. Auf diese Weise konnten alle Genotypen in einer Zucht gleichzeitig vorkommen, während die Prozentsätze für jeden Genotyp nach den Mendelschen Regeln über die gesamte Population verteilt sein sollten. Beide Mauslinien wurden vor Beginn des Versuchs mehrfach unabhängig voneinander mit C57BL/6J-Mäusen gekreuzt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund von über 90 % zu erhalten. Für die Experimente wurden die Mäuse mit den Genotypen *cre*, *lox*, *het-lox* und *wt* als Kontrolltiere verwendet.

2.1.2 Haltungsbedingungen

Die Haltungsbedingungen entsprachen den von der *Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)* vorgegebenen Vorschriften. Sämtliche Versuche waren angemeldet und von der zuständigen Behörde genehmigt. Die Versuchstiere wurden in isolierten Räumen gehalten (Temperatur 22 ± 1 °C, relative Luftfeuchtigkeit 40-60 %, Luftaustausch $15 \text{ m}^3 / \text{h}$, 12 h Tag-Nacht-Rhythmus). Als Nahrung stand den Tieren die Pellet-Diät *Altromin 1342 fortified* (Firma Altromin, Lage, Deutschland) zur Verfügung, autoklaviertes Trinkwasser wurde *ad libitum* in Tropfflaschen bereitgestellt. Die Tiere wurden im Alter von 3 Wochen durch Ohrlochung nummeriert; gleichzeitig wurde eine Schwanzbiopsie der Tiere für die Genotypisierung abgenommen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

DNA-Extraktion

Die Schwanzbiopsie jeder Maus wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bis zur Extraktion bei -20 °C aufbewahrt. Für die Genotypisierung erfolgte ein enzymatischer Verdau der Proteine der Probe in einfach konzentriertem Gitschier-Puffer (Grompe, 1994) unter Zugabe von Proteinase K und β -Mercaptoethanol (50 μ l je Biopsie). Die Probe wurde 2,5 Stunden im Thermoschüttler bei 50 °C und 1000 U / min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz etwa zehn Sekunden gevortext und abzentrifugiert. Es folgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K für zehn Minuten bei 95 °C. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurde der Extrakt bei 4 °C gelagert. Die Probe sollte nun nicht mehr eingefroren werden, um eine weitere Degradation der DNA durch Scherkräfte bei der Bildung von Eiskristallen zu vermeiden.

Cre-Genotypisierung

Mittels PCR wurde die Anwesenheit des Transgens für die Cre-Rekombinase im Genom der Maus bestimmt. Da nur der für Cre-Rekombinase heterozygote Genotyp mit dem Cre-negativen Genotyp verpaart wurde, war es nicht möglich, dass Cre-homozygote Tiere entstehen konnten. Auf diese Weise wurde verhindert, dass bei der Insertion des Cre-Gens möglicherweise zerstörte Gene homozygot auf beiden Allelen vorliegen und etwaige rezessive Effekte maskiert würden. Bei jeder PCR wurden neben den zu bestimmenden Proben Kontrollen mit bekanntem Genotyp mitgeführt. Dies sollte der Reproduzierbarkeit der Methode dienen und ermöglichte einen sicheren Größenvergleich. Zugleich wurde eine weitere Kontrolle eingesetzt, in der die DNA durch Wasser ersetzt wird.

Cre-PCR	
<u>Primersequenzen</u>	
cre3se:	5'-ATCTC ACGTA CTGAC GGTGG-3'
cre6as:	5'-ACCAG CTTGC ATGAT CTCC-3'
<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Reaktionsverlauf</u>
Primer cre3se (10 µM)	1 µl
Primer cre6as (10 µM)	1 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl
PCR-Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U / µl)	0,5 µl
dH ₂ O	11,5 µl
DNA-Extrakt	1 µl
	94 °C 90 s
	94 °C 45 s }
	70 °C 45 s } 35 Zyklen
	72 °C 90 s }
	72 °C 15 min
	4 °C Programmende
<u>Gelelektrophorese</u>	<u>mögliche PCR-Produkte</u>
1 % Agarosegel	Cre +/- 1 Produkt 387 bp
80 – 150 V (je nach Größe des Gels)	Cre -/- kein Produkt

LoxP-Genotypisierung

Die Anwesenheit der loxP-Elemente wird auf beiden Allelen bestimmt; es können drei Genotypen vorliegen: loxP-homozygot-positiv oder -negativ und loxP-heterozygot. Die Lage der Primer ist so gewählt, dass sich ein loxP-Element im Amplifikat befindet. Der Größenunterschied zwischen den Amplifikaten des Wildtyp- und des mutierten Gens beträgt 46 Basenpaare. Für den heterozygoten Fall ergeben sich zwei Fragmente von unterschiedlicher Länge, für loxP-homozygot-positive Tiere nur das längere Fragment und für loxP-homozygot-negative Tiere nur das kürzere Fragment. Die Unterschiede werden im Agarosegel nachgewiesen.

2.2.2 RT-PCR

RNA-Extraktion

Die Extraktion von RNA erfolgte mit Trizol nach dem Protokoll der Herstellerfirma Invitrogen. Dazu wurden die Gewebe entweder frisch verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später verarbeitet. Für die Entnahme der Gewebe wurden die Tiere durch Überstrecken des Genicks getötet. Unmittelbar nach Eintreten des Todes wurden die Gewebe entnommen. Zumeist wurden neben der Leber sieben weitere Kontrollgewebe verwendet. Dazu gehörten Pankreas, Milz, Skelettmuskel, Herz, Lunge, Hirn und Fett. Alle Gewebe wurden in Stücken mit einem Gewicht von etwa 100 mg zerteilt und die RNA direkt extrahiert, oder zunächst in Mikro-Schraubgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Degradation der RNA zu vermeiden. Direkt nach der Extraktion wurde die Konzentration in Dreifachbestimmungen festgestellt. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1:1.000 in DMPC-Wasser verdünnt und mit dem Fotometer (GeneQuant pro - RNA/DNA Calculator) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. In DMPC-Wasser gelöste RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Frataxin-RT-PCR

Zur Darstellung der gewebsspezifischen Transkription des Frataxin-Gens wurde die RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde in einem ersten Schritt die RNA mittels reverser Transkriptase (RT) durch cDNA (komplementäre DNA) ergänzt. Im zweiten Schritt erfolgte die Amplifikation der erhaltenen cDNA mittels PCR. Die erhaltenen Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

- Reverse Transkription

dN6-Primer lagern sich basenkomplementär an den RNA-Strang und ermöglichen es der RT, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, von einer RNA-Matrize einzelsträngige cDNA herzustellen. Die dN6-Primer sind zufällig synthetisierte Nucleotid-Hexamere. Auf diese Weise wird eine statistisch gleichverteilte Vervielfältigung aller RNA in der Probe ermöglicht. Die im Versuch benutzte RT stammt aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV-RT). Sie zeichnet sich vor allem durch ihre hohe Prozessivität aus. Die erhaltene cDNA wird sofort in einer PCR eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

- *cDNA-PCR*

Die Anlagerung des Vorwärts-Primers (P6) erfolgt im dritten Exon des Frataxin-Gens bzw. der gespleißten mRNA. Der Rückwärts-Primer (P7) lagert sich im fünften Exon an. Auf diese Weise wird ein DNA-Stück von 310 bp im Wildtyp-Frataxin-Gen amplifiziert. Im Knock-out-Allel fehlt das komplette Exon 4, daher ist die Sequenz nur 210 bp lang. Eine Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Eventuell aufgetretene Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA lassen sich ebenfalls im Agarosegel nachweisen. Die PCR-Produkte genomischer DNA sind wesentlich größer, da die noch enthaltenen Introne mit amplifiziert wurden. Um solche Artefakte zu minimieren, wird die Elongationszeit in der PCR so kurz eingestellt, dass vorzugsweise kurze Fragmente fertig polymerisiert werden können.

Frataxin-RT-PCR													
<u>RT-Reaktion</u>													
1 µl RNA (1µg / µl) in 8,5 µl DMPC-Wasser 5 min, 85 °C (RNA-Denaturierung)													
<u>Reaktionsansatz:</u>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 20px;">denaturierte RNA</td> <td style="text-align: right;">4 µl</td> </tr> <tr> <td>RT-Puffer (5x)</td> <td style="text-align: right;">4 µl</td> </tr> <tr> <td>RNAsin (27 U / µl)</td> <td style="text-align: right;">0,5 µl</td> </tr> <tr> <td>dNTP (je 10 mM)</td> <td style="text-align: right;">2 µl</td> </tr> <tr> <td>dN6-Primer (10 µM)</td> <td style="text-align: right;">2 µl</td> </tr> <tr> <td>MMLV-RT (20 U / µl)</td> <td style="text-align: right;">2 µl</td> </tr> </table>	denaturierte RNA	4 µl	RT-Puffer (5x)	4 µl	RNAsin (27 U / µl)	0,5 µl	dNTP (je 10 mM)	2 µl	dN6-Primer (10 µM)	2 µl	MMLV-RT (20 U / µl)	2 µl
denaturierte RNA	4 µl												
RT-Puffer (5x)	4 µl												
RNAsin (27 U / µl)	0,5 µl												
dNTP (je 10 mM)	2 µl												
dN6-Primer (10 µM)	2 µl												
MMLV-RT (20 U / µl)	2 µl												
60 min, 37 °C (RT-Reaktion) 10 min, 65 °C (Enzyminaktivierung)													
<u>cDNA-PCR</u>													
<u>Primersequenzen (aus: Puccio, 2001):</u>													
P6-Primer:	5'-CACTT GGATC CTCTA GACGA CACAG CG-3'												
P7-Primer:	5'-TTTAG TCAGC TCCCT GGCC-3'												
<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Reaktionsverlauf</u>												
Primer P6 (10 µM)	1 µl	94 °C	6 min	} 35 Zyklen									
Primer P7 (10 µM)	1 µl	94 °C	30s										
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	64 °C	30s										
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl	72 °C	30s										
PCR-Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2 µl	72 °C	15 min										
Taq-DNA-Polymerase (5 U / µl)	0,5 µl	4 °C	Programmende										
dH ₂ O	11,5 µl												
cDNA	2 µl												
<u>Gelelektrophorese</u>	<u>mögliche PCR-Produkte</u>												
120 V	Frataxin-Wildtyp	310 bp											
	Frataxin-Knock-out	210 bp											

HPRT-RT-PCR

Einen Nachweis für die Intaktheit und den Einsatz gleicher Mengen cDNA in der Frataxin-RT-PCR erhält man durch gleichzeitige Amplifikation der RNA eines Haushaltsgens, wie das der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), da dieses im Idealfall in allen Entwicklungsstufen und allen Geweben auf gleich hohem Niveau exprimiert wird.

HPRT-RT-PCR	
Alle Bedingungen und Arbeitsschritte entsprechen denen der Frataxin-RT-PCR. Unterschiedlich sind nur die zu verwendenden Primer.	
<u>Primersequenzen</u>	
Primer-1:	5'-AGAGG TCCTT TTCAC CAGCA AG-3'
Primer-2:	5'-ATAAT GGACA GACT GAAAG AC-3'

2.2.3 Nachweis der amplifizierten DNA*Agarose-Gelelektrophorese*

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hier wandern die PCR-Produkte im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße in Richtung Anode. Zur Probenvorbereitung wurde der PCR-Ansatz mit DNA-Laufpuffer versetzt. Pulverförmige Agarose wurde in der entsprechenden Menge eingewogen und durch Aufkochen in einfach konzentriertem TAE-Puffer gelöst. Es wurden jeweils 17 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen. Für die Auftrennung der DNA-Stücke wurde eine Laufkammer mit TAE-Puffer gefüllt, bevor das ausgehärtete Gel hineingelegt und mit den Proben sowie einem Größenstandard beladen wurde. Nach dem Probenauftrag wurde ein elektrisches Feld angelegt.

Nachweis der DNA im Agarosegel

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel 10 bis 15 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Färbelösung enthält 0,5 µg Ethidiumbromid / ml TAE-Puffer. Ethidiumbromid bindet an die DNA und kann durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Geldokumentation erfolgte in einer FujiFilm Intelligent Dark Box mittels einer FujiFilm LAS-1000 CH Kamera.

2.2.4 Plasmide

Die cDNA des humanen Frataxin-Gens wurde mittels des Säugerzell-Expressions-Plasmids pCI-neo in die Zellen transfiziert.

Der verwendete Vektor pCI-neo-hFX (Abbildung 3) enthält neben der mit einem HA-tag versehenen Frataxin-cDNA innerhalb der *multiple cloning site* ein Neomycin-Resistenzgen, welches das Zellwachstum unter Selektionsdruck ermöglicht (Kapitel 2.3.4). Die Kontrollzellen wurden mit dem Plasmid pCI-neo ohne Frataxin-cDNA transfiziert (Leervektor, keine Abbildung).

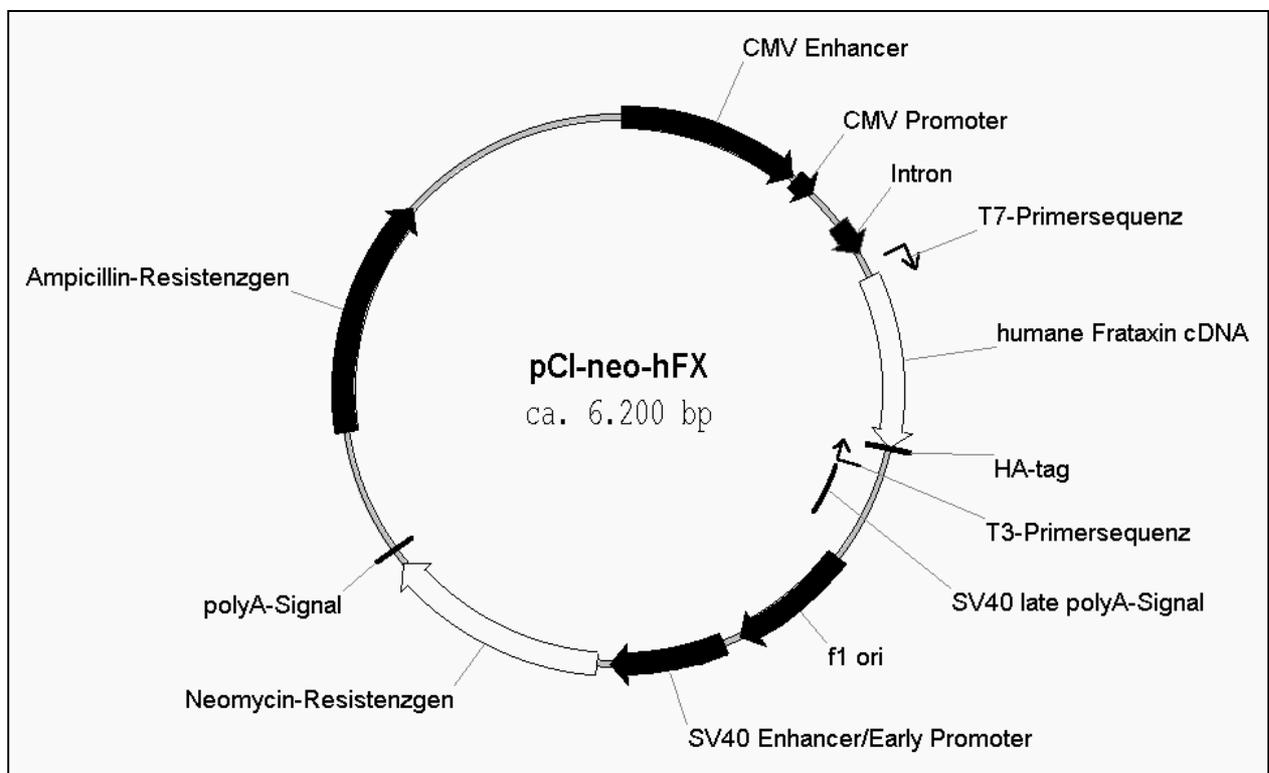


Abbildung 3: Plasmidkarte des pCI-neo-Mammalian Expression Vector (Promega) mit kodierender Sequenz für das Frataxinprotein und HA-tag (pCI-Neo-hFX)

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Für die Frataxinüberexpression wurden zwei Kolonkarzinomzelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades eingesetzt. Die Zelllinie DLD-2 entstammt einem primären Adenokarzinom des Kolons. Die Zellen sind gut differenziert und bilden Tumoren im Nacktmausmodell (Dexter, 1979; Dexter, 1982). MIP-101-Zellen wurden aus einer Lebermetastase isoliert und als undifferenzierte humane Kolonkarzinomzelllinie publiziert (Niles, 1987). Die Zellen wachsen im Softagar und bilden Tumoren in der Nacktmaus.

2.3.2 Standardmethoden der Zellkultur

Kultivierung

Alle Zellen wurden in geeignetem Kulturmedium (0,9 x DMEM, 10 % FBS, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte in der Regel montags und donnerstags.

Auftauen

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurden diese angetaut und in Kulturschalen (Durchmesser 10 cm) überführt. Nach 3 h erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums, um tote Zellen und enthaltenes DMSO zu entfernen.

Subkultivierung

Alle Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Dann wurde Trypsin / EDTA (500 µl / 25 cm²) auf die Zellen gegeben und diese kurz im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopisch sichtbarer Ablösung der Zellen vom Kulturgefäß wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Kulturmedium unterbunden. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen resuspendiert und verdünnt in ein neues Kulturgefäß eingesät.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton-Lösung verdünnt und die Zellzahl im Zellzählgerät Casy 1 TT entsprechend der Herstellervorschrift bestimmt. Für die Injektion der Zellen in Nacktmäuse wurden die Zellen zuvor in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Kryokonservierung der Zellen

Nach Ablösung und Resuspension der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension 10 min bei 4 °C und 200 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in einem Einfriermedium (70 % Standardmedium, 20 % FBS, 10 % DMSO) mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml resuspendiert und je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden langsam auf -80 °C temperiert und nach ca. 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden auf Kulturschalen (Durchmesser 6 cm) jeweils 25.000 Zellen eingesät. Zur Feststellung der Zahl der angehefteten Zellen erfolgte die erste Zählung nach 3 h. Weitere Zellzählungen erfolgten jede weitere 24 h nach der ersten Zählung (Abbildung 4). Besonderer Wert wurde auf die gleiche Prozedur an den verschiedenen Tagen gelegt. Nach drei Tagen erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

Zur grafischen Auswertung dieser Daten wurde für jede ermittelte Zellzahl die Verdopplungszahl festgestellt ($\log_2 x$). Die Darstellung dieser Verdopplungszahl gegen die Zeit (in Stunden) ergibt die Wachstumskurve, welche durch eine *lag*-Phase am Beginn, eine lineare Wachstumsphase und eine Sättigungsphase charakterisiert ist. Zur Ermittlung der Populationsverdopplungszeit wurde der Anstieg der Wachstumskurve in der linearen Phase ermittelt und der reziproke Wert errechnet. Die Populationsverdopplungszeit ist das Maß, welches die Zeit angibt, innerhalb derer sich die Zellzahl verdoppelt und ist daher geeignet, die Wachstumsgeschwindigkeiten verschiedener Zelllinien miteinander zu vergleichen.

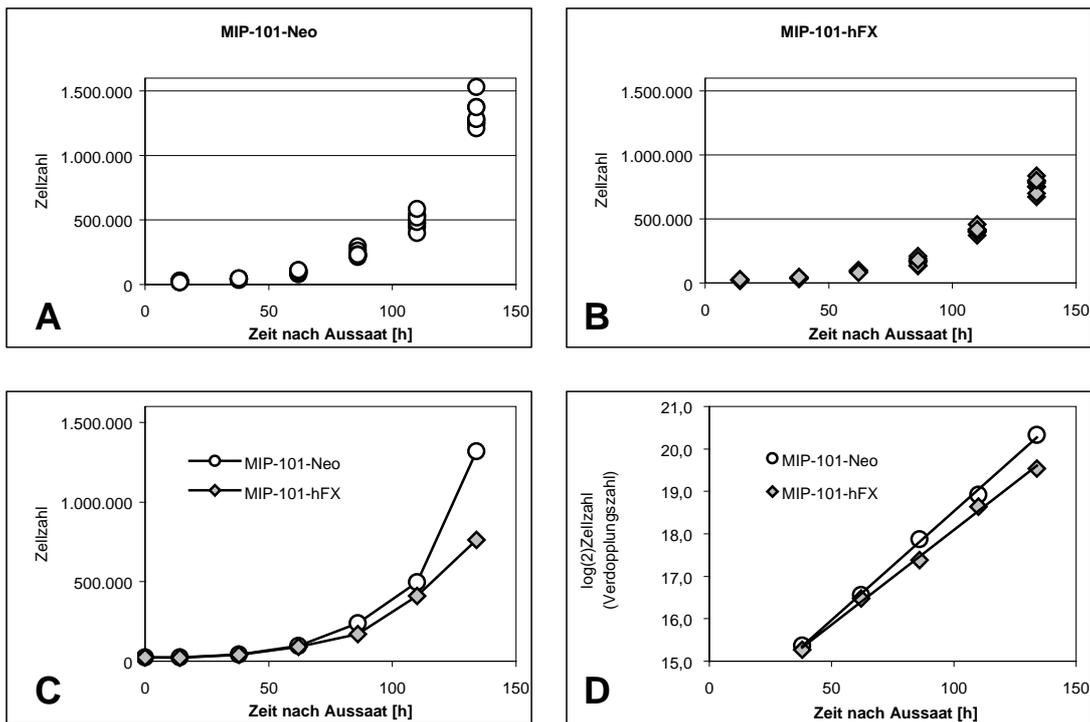


Abbildung 4: Ermittlung der Populationsverdopplungszeit

Alle ermittelten Zellzahlen wurden in zeitlicher Reihenfolge in einem Diagramm dargestellt (A, B). Die errechneten Mittelwerte der Zählungen zu einem Zeitpunkt wurden verwendet, um eine Wachstumskurve darzustellen (C). Zur Ermittlung der Verdopplungszeit wurden die Verdopplungszahlen errechnet. Trägt man diese in einem Diagramm auf, so erhält man eine Wachstumskurve, welche in drei Abschnitte eingeteilt wird (nicht abgebildet). Zu Beginn des Zellwachstums verdoppeln sich die Zellen langsamer (lag-Phase). Es folgt eine Phase ungehinderten Zellwachstums (lineare Wachstumsphase). Erreichen die Zellen eine bestimmte Populationsdichte im Kulturgefäß, behindern sich die Zellen gegenseitig in ihrem Wachstum. Die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt ab, bis gar kein Wachstum mehr stattfindet (Plateauphase). Durch lineare Regression der linearen Wachstumsphase (D) erhält man den reziproken Wert der Populationsverdopplungszeit.

2.3.4 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Zur Herstellung stabil exprimierender Zelllinien wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, welches das zur Selektion geeignete Resistenzgen trägt. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums G418 selektiert.

Ermittlung der Antibiotikaresistenz

Zur Ermittlung der zu verwendenden Konzentration des Selektionsmarkers G418 wurde die Konzentration festgestellt, bei welcher die Ausgangszellen absterben. Dafür wurden Zellen in 6-cm-Kulturschalen eingesät und nach 2 Tagen dem vorgesehenen Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Durch regelmäßige Kontrolle der Zellen konnte die niedrigste letale Konzentration innerhalb von 4 Wochen bestimmt werden. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Essigsäure (1 %, 4 °C) fixiert und mit Sulforhodamin B gefärbt.

Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Die DNA wird in einer CaCl_2 -Lösung aufgenommen und mit Phosphatpuffer gemischt. Die gebildeten DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitate werden in das Kulturmedium gegeben, adsorbieren an der Zelloberfläche und werden von der Zelle durch Phagozytose aufgenommen. Der Weg der DNA aus dem Endosom in den Zellkern ist bisher unklar. Die Transfektionen erfolgten mit dem CellPfect-Kit der Firma Pharmacia. Für eine erfolgreiche Transfektion werden Zellen verwendet, welche sich in der linearen Wachstumsphase befinden.

Durchführung:

- 3 h vor Transfektion den Zellen frisches Kulturmedium geben
- in Polystyrolröhrchen 20 µg Plasmid mit dH_2O auf 700 µl Gesamtvolumen auffüllen
- 700 µl Puffer A hinzugeben, vortexen
- unter ständigem Einsprudeln von Luft langsam 1,4 ml Puffer B dazutropfen
- kurz vortexen
- 8 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 2,5 ml der Lösung langsam zu den Zellen tropfen (Kulturschalendurchmesser: 15 cm)

- Kulturschale vorsichtig schwenken
- nach 8 bis 16 h Subkultivierung der Zellen
- nach weiteren 24 h Selektion der resistenten Zellen

Klonale Selektion der resistenten Zellen

Nur die Zellen, welche erfolgreich transfiziert wurden, besitzen nun ein Resistenzgen, welches ein Überleben im Selektionsmedium ermöglicht. Eine Selektion ist beendet, wenn alle Kontrollzellen, welche unter gleichen Bedingungen wie die transfizierten Zellen gehalten wurden, gestorben sind. In den transfizierten Zellpopulationen sollten sich resistente Kolonien gebildet haben. Um Zelllinien mit hohem Frataxin-expressionsniveau zu erhalten, wurden die Zellen einer klonalen Selektion unterzogen. Alle erhaltenen Zellpopulationen wurden einem ständigen Selektionsdruck ausgesetzt.

Durchführung:

- Kulturmedium durch ein Selektionsmittel enthaltendes Medium ersetzen
- Selektionsmedium regelmäßig wechseln, bis die Zellklone einen Durchmesser von etwa 3 mm erreicht haben
- Zellen mit PBS waschen
- sterile Klonierringe unter Zuhilfenahme von Klonierfett auf der Kulturschale um den Klon positionieren
- 40 µl Trypsin in den Klonierring pipettieren (Ablösung der Zellen)
- mit Kulturmedium Zellen resuspendieren
- jeden Klon in ein *well* einer 24-*well*-Platte überführen
- vor Erreichen der Subkonfluenz Zellen in Kulturschale (Durchmesser: 6 cm) überführen

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteingewinnung aus Gewebe

Gewinnung von Gesamtprotein

- Gewebe nach Entnahme aus dem Tier sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -80 °C
- Gewebe im flüssigen Stickstoff enthaltenden Mörser mit Pistill zerkleinern
- Gewebestück gewünschter Größe in kaltem Tris-Puffer pottern, dabei starke Erwärmung vermeiden (z.B. Leber mit 3 mm Kantenlänge in ca. 800 µl Puffer)
- erhaltenes Gewebshomogenat gekühlt mit Ultraschall-Homogenisator homogenisieren (10 x in 10 s bei 75 %)
- Zentrifugation: 16.000 x g, 5 min, 4 °C: Pellet verwerfen
- Mengenbestimmung des im Überstand befindlichen Proteins nach Bradford (Kapitel 2.4.3)

Anreicherung subzellulärer Fraktionen

- Gewebestück (z.B. 1/3 einer normal großen Leber oder 2 Nieren) entnehmen
- in 2,5 ml eiskalte, isotone (250 mM) Saccharoselösung geben
- 15 s gekühlt mit Ultra-Turrax homogenisieren
- Zentrifugation: 10 min, 300 x g: Überstand₁, Pellet₁
- Pellet₁ in 2,5 ml 250 mM Saccharoselösung suspendieren
- Zentrifugation: 10 min, 300 x g: Überstand₂, Pellet₂ (Kernfraktion)
- Pellet₂ in 0,5 ml Sörensen-Puffer mit Protease-Inhibitor suspendieren
- Überstand₁ und Überstand₂ vereinigen: Überstand_{1,2}
- Zentrifugation Überstand_{1,2}: 10 min, 35.000 x g: Pellet₃ (Mitochondrienfraktion), Überstand₃ (Zytosolfraktion)
- Pellet₃ in 0,5 ml Sörensen-Puffer mit Protease-Inhibitor suspendieren
- Überstand₃ mit Protease-Inhibitor (7x) vermischen
- Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.4.3)

für Aconitase-Aktivitätsbestimmung:

- Pellet₃ in Tris-Puffer aufnehmen und sonifizieren
- Zusatz von 0,1 % Triton X 100, vortexen, 10 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation: 5 min, 10.000 x g: Überstand enthält mitochondriale Proteine

2.4.2 Proteingewinnung aus Kulturzellen

Gewinnung von Gesamtprotein

- Ausgangsmaterial: subkonfluente Kulturschale (Durchmesser: 15 cm)
- Kulturschale im 45°-Winkel auf Eisbad stellen
- Medium absaugen, mit eiskaltem PBS waschen, PBS vollständig absaugen
- mit eiskaltem Sörensen-Puffer waschen und diesen absaugen
- Sörensen-Puffer mit Protease-Inhibitor auf Kulturschale geben
- Zellen mit Zellschaber abschaben und in Reaktionsgefäß überführen
- mit Ultraschall-Homogenisator gekühlt homogenisieren (10 x in 10 s bei 75 %)
- Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.4.3)

Anreicherung subzellulärer Fraktionen

- Zellen mit warmem PBS waschen
- gewünschtes Volumen warmes PBS zu den Zellen geben
- Zellen im PBS abschaben (Zellschaber)
- Zellen resuspendieren und in Zentrifugenröhrchen geben
- Zentrifugation: 10 min, 800 x g, RT (Zellpellet)
- Überstand absaugen, Pellet in kaltem MSH-Puffer resuspendieren
- Zellen in kaltem MSH-Puffer pottern (Zerstörung der Zellwände)
- Zentrifugation: 5 min, 800 x g, 4 °C
(ergibt Pellet mit Zellkernen, Zelltrümmern und einzelnen intakten Zellen)
- Überstand zentrifugieren: 10 min, 10.000 x g, 4 °C
(ergibt Pellet mit Mitochondrien)
- Überstand besteht im Wesentlichen aus Zytosol
- gewonnene Fraktionen mit Ultraschall-Homogenisator gekühlt homogenisieren (10 x in 10 s bei 75 %)
- Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.4.3)

2.4.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte spektralfotometrisch nach Bradford (Bradford, 1976). Sie basiert auf einer Veränderung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G250. In der kationischen ungebundenen Form hat er ein Absorptionsmaximum von

465 nm, welches sich zu 595 nm verschiebt, wenn er im sauren Milieu in der Gegenwart von Proteinen als anionisch gebundene Form vorliegt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird direkt im Anschluss an die Proteingewinnung der Proteine durchgeführt. Bradford-Reagenz wird 1:5 mit dH₂O verdünnt. Die Erstellung der Standardreihe erfolgt mittels eines BSA-Standards (1 mg / ml), von dem 0, 4, 8, 12, 16 bzw. 20 µl mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt und eingesetzt werden. Von den Proteinproben werden je 5 µl eingesetzt. Zu jeder Probe wird 1 ml verdünntes Bradford-Reagenz pipettiert, gevortext und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 595 nm. Sowohl bei der Erstellung der Standardreihe als auch bei der Messung der eigentlichen Proben wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.4.4 Proteinseparation und Immunoblot

Die unter 2.4.1 und 2.4.2 gewonnenen Proteine können bei -80 °C gelagert, oder für weitere Analysen denaturiert werden. Dafür werden die Proben in Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und bei Bedarf bei -20 °C gelagert (Laemmli, 1970).

Für den Proteinnachweis werden die Proben zunächst mittels einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt, anschließend elektrophoretisch auf eine Membran transferiert (Immunoblot) und immobilisiert.

Ein primärer Antikörper bindet an das spezifische Zielprotein. In einem zweiten Schritt bindet ein sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Marker versehen, der den Nachweis des Protein-Antikörper-Komplexes ermöglicht.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes. Zunächst werden alle nichtkovalenten Wechselwirkungen der nativen Proteine durch SDS gelöst. Eine Zerstörung möglicher Disulfidbrücken wird durch die Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT) erreicht. Die Polymerisation des Acrylamid erfolgt durch eine radikalische Kettenreaktion, welche

durch Ammoniumpersulfat (APS) angestoßen und durch Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin (TEMED) katalysiert wird.

Ein elektrisches Feld im Polyacrylamidgel bewirkt eine Wanderung der Proteine, die dem Logarithmus ihrer Masse proportional ist. Zur späteren Abschätzung der Größe der Proteinbanden wird gleichzeitig ein Standard bekannter Proteingrößen mit aufgetrennt. Je nach gesuchter Proteingröße werden Polyacrylamidgele unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen verwendet. Zur Anwendung kamen je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins 10 %ige und 16 %ige Gele (Tabelle 2).

	Sammelgel	Trenngel	
Geldichte	4 %	10 %	16 %
dH ₂ O	6,1 ml	4,1 ml	2,1 ml
30 % Acrylamid/Bis	1,3 ml	3,3 ml	5,3 ml
Gel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS (w/v)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl	5 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentration

Die Elektrophorese wurde bei 100 V für ca. 1,5 h durchgeführt, bzw. solange, bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Immunoblot mittels Semi-Dry-Transfer-Blotkammer

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine senkrecht zum Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Strom fließt dabei über Filterpapiere, die in elektrolythaltigen Puffern getränkt wurden. Das in den eingesetzten Puffern enthaltene Methanol verringert die Wechselwirkung zwischen Protein und SDS und bewirkt eine stärkere Bindung der Proteine an die Membranoberfläche. Die Immobilisierung der Proteine auf der Membran erfolgt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen.

Das Gel wurde zusammen mit den Filterpapieren und der Zellulosemembran für 30 min in den jeweiligen Puffern äquilibriert. Der Blot wurde entsprechend der Hersteller-

anleitung (Bio-Rad) zusammengebaut. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 30 min bei einem 10 %igen und für 35 min bei einem 16 %igen Gel. Anschließend wurden Gel und Filterpapiere verworfen.

Ponceau-Färbung und Blockierung

Die Überprüfung des Transfer ermöglicht eine reversible Färbung der Proteine mittels Ponceau-Rot. Dabei werden diese durch die in der Lösung enthaltene Trichlor-essigsäure zusätzlich fixiert. Die Proteine auf der Membran wurden für ca. 1 min in Ponceau-Lösung schwenkend angefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch dH₂O abgewaschen. Die Ponceau-Färbung wurde mittels eines Geldokumentationssystems (Firma LTF) dokumentiert. Anschließend erfolgte die Absättigung noch freier Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Zugabe von 20 ml einer je 1 %igen (w/v) Lösung von BSA und Milchpulver in TBST-Puffer für 1 h.

Antikörperbindung

Der primäre Antikörper wurde, soweit nicht anders bekannt, nach Herstellerangabe in TBST-Puffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Orbitalschüttler. Zur Entfernung des Antikörpers wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in TBST-Puffer verdünnt. Die Membran wurde wiederum bei 4 °C inkubiert (1 h, Orbitalschüttler) und anschließend nochmals 3 x 5 min in TBST-Puffer gewaschen.

Detektion

Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe eines entsprechenden Substrats kann durch dieses Enzym ein Signal generiert werden. In der Regel kommen zyklische Diazylhydrazide wie Luminol zum Einsatz, die durch die Peroxidase in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Rückfall in den Ausgangszustand kommt es zur Emission von Licht, das in Gegenwart von Phenolen zusätzlich verstärkt wird. Diese Chemielumineszenz kann als Belichtung eines Fotofilms detektiert werden.

Die Anwendung der ECL-Kit-Lösungen erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Belichtung des ECL-Films in der Dunkelkammer beträgt je nach Antikörper 10 s bis

8 min. Entwickelt wurde für ca. 2 min unter leichtem Schwenken der Schale. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser erfolgte die Fixierung ebenfalls unter Schwenken bis zur vollständigen Transparenz des Films. Der Film wurde anschließend in Leitungswasser und dH₂O gespült und getrocknet.

2.4.5 Aconitaseaktivitäts-Bestimmung

Die Aconitase ist ein Enzym des Zitratzyklus' und isomerisiert Zitrat zu Isozitrat. Im nächsten Schritt des Zitratzyklus' wird Isozitrat durch die Isozitrat-Dehydrogenase oxidiert und anschließend zu α -Ketoglutarat decarboxyliert. Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert. Gibt man zu einer biologischen Probe unbekannter Aconitaseaktivität Zitrat, NAD⁺ (oder NADP⁺, da dies in höherem Maße umgesetzt wird) und Isozitrat-Dehydrogenase im Überschuss dazu, so ist die Menge an gebildetem NADH (NADPH) ein Maß für die Aconitaseaktivität. Die gebildete NADH- (NADPH-) Menge lässt sich fotometrisch bestimmen. Die Aconitaseaktivitäts-Bestimmung erfolgte als 4fach-Bestimmung im 96-*well*-Format.

Durchführung:

- Reaktionsgemisch frisch herstellen:

50 mM Tris, 30 mM Natriumzitrat, 0,5 mM MnCl₂, 0,2 mM NADP⁺, 2 U / ml Isocitrat-Dehydrogenase

- gewonnenes Protein in Tris-Puffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) so verdünnen, dass jeweils 30 μ g Gewebeprotein (2.4.1) in 150 μ l je *well* oder 90 μ g der mitochondrialen Fraktion von Kulturzellen (2.4.2) in 150 μ l je *well* eingesetzt werden können

- im Fall der Aconitasereaktivierung:

DTT (0,5 M), Na₂S (20 mM) und Mohrs Salz (20 mM) nacheinander dazupipettieren, zwischendurch vortexen (je 90 μ l Ansatz: 10 μ l DTT, 1 μ l Na₂S und 1 μ l Mohrs Salz)

- Proteinlösung in die *wells* pipettieren

- als Positivkontrolle dient Proteinlösung bekannter Aktivität, in der Negativkontrolle wird kein Protein eingesetzt

- 150 μ l Reaktionsgemisch je *well* dazupipettieren

- Messung der Enzymaktivität im Plattenfotometer bei 340 nm, 37 °C

- die Anstiegsphase der Absorption sollte über einen Zeitraum von mindestens 5 min linear sein

Auswertung:

- von jedem Messwert wird der zeitlich entsprechende Absorptionswert der Negativkontrolle subtrahiert
- der Anstieg der linearen Aktivitätsphase jeder Messung wird errechnet und der Mittelwert für die jeweilige Mehrfachbestimmung gebildet
- gemittelter Anstiegswert entspricht der relativen Aconitaseaktivität

2.4.6 ATP-Quantifizierung

Eine Quantifizierung des in den Kulturzellen oder Geweben enthaltenen ATPs erfolgte mittels einer Chemilumineszenz-Detektion, bei welcher die Menge des freigesetzten Lichtes von der ATP-Menge abhängig war.

Detektionsprinzip:

Kulturzellen oder Gewebe werden durch Perchlorsäure fixiert und die Aktivität vorhandener ATPasen durch EGTA unterbunden. Durch die Fixierung wird das intrazelluläre ATP freigesetzt. Die Zugabe von Luziferin und Luziferase verursacht eine Reaktion zu Adenyl-Luziferin. Unter Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert Adenyl-Luziferin zu Oxyluziferin. Dabei werden AMP, CO₂ und Licht freigesetzt. Da ATP der limitierende Faktor dieser Reaktion ist, erhält man durch Quantifizierung des emittierten Lichtes ein Maß für das enthaltene ATP.

Reagenzien und Lösungen:

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit (Sigma-FLAA)

PCA-Lösung (0,6 M Perchlorsäure; 1 mM EGTA)

Assay-Puffer: FLA-AM in FLA-AB 25x verdünnen

Vorbereitung Kulturzellen:

- ca. 1 Mio. Zellen / Kulturschale (Durchmesser: 4 cm)
- Zellen mit PBS waschen
- je 0,5 ml PCA-Lösung (eisgekühlt) aufpipettieren
- sofort bei -80 °C einfrieren und bis zu 2 Wochen aufbewahren

Durchführung:

- Gewebe: Homogenisierung etwa 30 mg tiefgefrorenen Gewebes in eisgekühlter PCA-Lösung (je 50 µl Lösung / mg Gewebe)
- Kulturzellen: Zellen auftauen und (auf Eis) abschaben; in Reaktionsgefäß überführen
- Inkubation: 10 min, Eis
- Zentrifugation: 7 min, 4 °C, 16.000 x g
- Überstand vollständig in neues Reaktionsgefäß überführen; Eis
- Pellet in 100 µl NaOH (1 M) bei RT lösen; Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.4.3)
- Überstand mit 3 M KOH/KCl neutralisieren (pH 7,0 - 8,0)
- mind. 10 min auf Eis inkubieren (Natriumperchlorat fällt als weißer Niederschlag aus)
- Zentrifugation: 7 min, 4 °C, 16.000 x g
- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen (kann bis zu 2 Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden)
- ATP-Bestimmung in 96-well-Platte erfolgt in je 3 wells
- zu bestimmende Proben werden in autoklaviertem dH₂O verdünnt
- je well werden 50 µl Verdünnung und 50 µl Assaypuffer pipettiert

Messung und Auswertung:

Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte am Luminometer Fluoroskan Ascent FL. Eine Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Gerätesoftware Fluoroskan FL (Version 2.2.4). Eine relative Quantifizierung der erhaltenen Messwerte wird durch eine Verdünnungsreihe bekannter ATP-Konzentrationen erreicht (1.000, 500, 250, 100, 50, 10 bzw. 5 pmol ATP in autoklaviertem dH₂O). Durch Gewichtsbestimmungen der erhaltenen Pellets und die Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.4.3) ist es für Kulturzellen möglich, die gemessenen ATP-Konzentrationen auf die Proteinmenge zu beziehen und damit gut vergleichbare und reproduzierbare Werte zu erhalten. Die ATP-Werte der Gewebe werden auf die ursprüngliche Einwaage bezogen.

2.5 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des mitochondrialen Membranpotenzials

Fluoreszenzfarbstoffe werden sichtbar gemacht, indem man sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregt (Anregungswellenlänge). Die Absorption eines Anregungsphotons hebt ein Elektron aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand. Geht dieses wieder in den Grundzustand zurück, wird die frei werdende Energie als Fluoreszenzphoton emittiert. Die Energie des emittierten Photons ist immer geringer als die des absorbierten Photons – damit ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes größer als die des Anregungslichtes (Stokesche Regel). Die fluoreszierenden Moleküle in der Probe senden demzufolge Fluoreszenzlicht einer bestimmten größeren Wellenlänge aus (Emissionswellenlänge).

Für die fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen dieser Arbeit wurde ein Umkehrmikroskop TE-300 der Firma NIKON in Kombination mit dem Fluoreszenzfilterblock GFP(R)-BP (Anregungswellenlänge 460-500 nm, dichroischer Spiegel 505 nm, Bandpassfilter 510-560 nm) eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit einer digitalen Kamera (NIKON DXM 1200) dokumentiert. Die digitale Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm LUCIA Image (on DXM 1200 V 4.61). Zur Fluoreszenzquantifizierung wurde die frei verfügbare Software SCION Image (Release beta 4.0.2) unter Verwendung eines selbst erstellten Makros genutzt.

Rhodamin 123 ist ein membrangängiger, nicht zytotoxischer, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher innerhalb weniger Minuten von aktiven Mitochondrien aufgenommen wird. Der Farbstoff eignet sich zur Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien und, da seine Aufnahme in die Mitochondrien von der protonenmotorischen Kraft abhängig ist, zur Visualisierung unterschiedlicher mitochondrialer Transmembranpotenziale.

Durchführung:

- Zellen auf mikroskopischen Objektträgern kultivieren
- Rhodamin 123 in das Kulturmedium hineingeben (Endkonzentration 10 µg / ml)
- 10 min Inkubation im Brutschrank
- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- fluoreszenzmikroskopische Kontrolle und Bilddokumentation der Zellen

Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des mitochondrialen Membranpotenzials

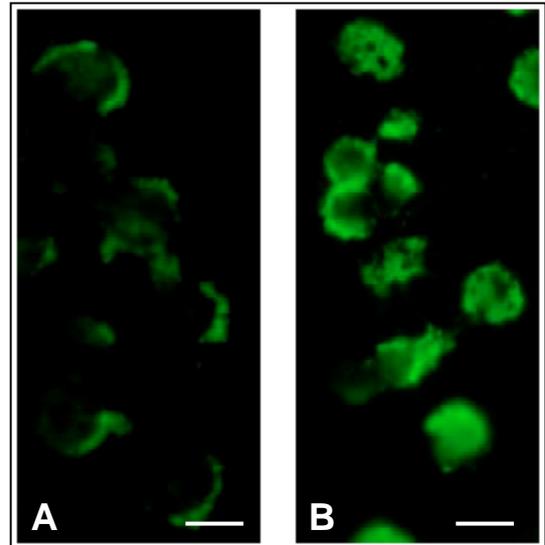
Leervektortransfizierte (A) und frataxinüberexprimierende (B) MIP-101-Zellen wurden mit Rhodamin 123 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch miteinander verglichen.

Fluoreszenzfilterblock: GFP(R)-BP,

Belichtungszeit: 1 s,

Objektiv: 40x (Ph),

Maßstab: 20 µm.



Auswertung:

Zur relativen Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotenzials wurden die zu vergleichenden Zellen gleichzeitig gefärbt und abwechselnd mehrere Bilder unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Durch die Software Scion Image wurden unter Zuhilfenahme eines selbst erstellten Makros die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität ermittelt.

Funktionsweise des Makros:

- geladen wird ein zuvor in Graustufen konvertiertes Fluoreszenzbild
- die Graustufen werden invertiert, damit intensivere Fluoreszenz durch höhere Grauwerte dargestellt wird
- durch eine Grauwertschwelle werden automatisch die Bereiche des Bildes erfasst, welche eine Mindestfluoreszenz aufweisen
- manuelle Auswahl von Bereichen, welche ausgewertet werden sollen
- die Software errechnet die Fläche, welche das Mindestfluoreszenzsignal aufweist und den dazugehörigen mittleren Grauwert (analog der mittleren Fluoreszenzintensität)
- es wird automatisch die mittlere Fluoreszenzintensität aller gewählten Flächen errechnet, welche als Endwert zum Vergleich herangezogen wird

```

{macro rhodamine 123}
{for SCION-Image; by R. Thierbach}

var
  counter:      integer;           {counts number of measurements}
  threshold:    integer;           {this value discriminates the cell-area from the background}
  area:         integer;
  int:          integer;
  fluor:        integer;
  TotalArea:    integer;
  TotalInt:     integer;
  TotalFluor:   integer;
  MeanInt:      integer;

macro 'acquire an image from a file [F]';

begin
  DisposeAll;
  TotalArea:=0; TotalInt:=0; TotalFluor:=0;
  Open(""); {Change to "Import('File Name')" if you have to import a file}
  SetPicName ('Image');
  begin {Create a Data window for the measurement;}
    NewTextWindow('Data',100,100);
    Writeln('MeasNr Data');
    counter:=1;
  end;
  SelectWindow('Image'); {Go back to the Image Window}
  Invert; threshold:=30;
  SetThreshold(threshold);
  SelectTool('wand');
  SelectWindow('Image');
end;

macro 'Measure [M]';

begin
  Measure;
  Area:=rArea[rCount]; Int:=rMean[rCount]; Fluor:=Area*Int;
  TotalArea:=Area+TotalArea;
  TotalInt:=TotalInt+Int;
  TotalFluor:=TotalFluor+Fluor;
  MeanInt:=TotalFluor/TotalArea;

  SelectWindow("Data"); {write results into the data window}
  Write(counter:5, ' ');
  Write(' Area ',area:10:2, ' ');
  Write(' Intensity ',int:10:2, ' ');
  Write(' Fluor ',fluor:10:2, ' ');
  Write(' TotalArea ',totalarea:10:2);
  Write(' TotalInt ',totalint:10:2);
  Write(' TotalFluor ',totalfluor:10:2);
  Writeln(' MeanInt ',meanint:10:2);
  Clear;
  counter:=counter+1;
end;

macro 'Quit [Q]';

begin
  DisposeAll;
  counter:=0;
  TotalArea:=0;
  TotalInt:=0;
  TotalFluor:=0;
  Exit;
end;

```

Quelltext des für die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten verwendeten Makros

2.6 Bestimmung der Respirationsrate mittels Clark-Elektrode

Zur Ermittlung der Respirationsrate der Zellen wurde der zeitliche Verlauf des Sauerstoffgehaltes der umgebenden Lösung mit einer Clark-Elektrode gemessen. Die verwendete Clark-Elektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Silberanode, welche elektrolytisch durch eine KCl-Lösung verbunden sind. Die Elektrode befindet sich am Boden eines temperierten Reaktionsgefäßes (37 °C) und ist von der zu messenden Zellsuspension durch eine Teflonmembran getrennt. Der in der Suspension enthaltene Sauerstoff diffundiert durch die Membran und wird an der polarisierten Kathode reduziert. Der sich ergebende Strom in der Elektrode ist dem Partialdruck des Sauerstoffs direkt proportional und stellt damit ein Maß für den Sauerstoffgehalt in der Suspension dar.

Vor jedem Messtag wurde die Elektrode entsprechend der Betriebsanleitung kalibriert. Für eine Messung wurden jeweils 1 Million Kulturzellen oder 10 mg frisch homogenisiertes Gewebe (Ultra-Turrax) in 1 ml einer physiologischen Lösung (HBSS) eingesetzt. Die Aufrechterhaltung einer homogenen Suspension erfolgte durch einen Magnetrührer. Aus dem Abfall der Sauerstoffkonzentration über der Zeit ergibt sich die Respirationsrate der Zellen.

2.7 Methoden zur Bestimmung der Tumorigenität von Zellen

Normale Epithelzellen benötigen zum Überleben und für eine normale Differenzierung eine Reihe von Faktoren (z.B. Kontakt zu benachbarten Zellen und zum Wachstums substrat, verschiedene Wachstumsfaktoren), während viele Tumorzellen von diesen Beschränkungen unabhängig sind. Diese Unterschiede macht man sich in verschiedenen Assays zu Nutze, um den Grad der Malignität verschiedener Zellen abzuschätzen.

In dieser Arbeit wurden der Soft-Agar-Assay und das Nacktmausmodell verwendet, um zu untersuchen, ob der Grad der Malignität von Tumorzellen durch eine erhöhte Expression von Frataxin beeinflusst wird.

2.7.1 Soft-Agar-Assay

Die Zellen werden in einem Agargel ausgesät, wodurch der Kontakt zu benachbarten Zellen und auch die Anheftung an das Wachstumssubstrat verhindert werden. Das Heranwachsen von Kolonien im Agargel ist als ein Zeichen von Malignität zu werten. Bei unterschiedlichem Malignitätsgrad sind unterschiedliche Koloniegrößen zu erwarten.

Versuchskonzept:

In ein Zellkulturgefäß wird ein Bodenagar (1 % Agar in Kulturmedium) vorgelegt und dieser mit einem, die zu prüfenden Zellen enthaltenden Topagar (0,35 % Agar in Kulturmedium) überschichtet. Die Zellen haben keine Möglichkeit, an den Boden des Gefäßes zu gelangen. Da viele Zelllinien nur wachsen, wenn sie bestimmte Signalstoffe im Kulturmedium vorfinden, welche durch benachbarte Zellen gebildet werden, setzt man teilweise ein Kulturmedium ein, welches schon zuvor zur Kultivierung dieser Zelllinie verwendet wurde (konditioniertes Medium).

Vorbereitung:

Die zu testenden Zellen wurden kultiviert und nach 22 h das Kulturmedium abgenommen. Aus diesem konditionierten Medium wurden eventuell enthaltene Zellen abzentrifugiert. Es wird ein Prä-Mix hergestellt, welcher so berechnet ist, dass der Soft-Agar insgesamt 0,9 x DMEM, 10 % FBS und einen entsprechenden Agaroseanteil besitzt. Ein Drittel des Soft-Agars besteht aus konditioniertem Medium.

Material:

- Bactoagar (2 % und 0,7 % in dH₂O; DIFCO) autoklavieren
- Prä-Mix bestehend aus:
 - 10/15 konditioniertem Medium
 - 3/15 6 x DMEM
 - 2/15 FBS

Durchführung:

- Bactoagar (2 %) auf 90 °C im Wasserbad erwärmen, bis er flüssig ist und anschließend auf 45 °C temperieren
- Prämix (37 °C) 1 : 1 mit dem Bactoagar (2 %) mischen
- je well einer 6-well-Platte 2 ml als Bodenagar hineinpipettieren und fest werden lassen

- Bactoagar (0,7 %) auf 90 °C im Wasserbad erwärmen, bis er flüssig ist und anschließend auf 45 °C temperieren
- Zellen im Prämix (37 °C) auf 2×10^4 Zellen / ml einstellen, sofort 1:1 mit dem 0,7 %igen Agar gut mischen (Endkonzentration 0,35 % Agar) und auf eine mit Grundagar vorbereitete 6-well-Platte pipettieren (je well 2 ml der Agar-Zellsuspension)
- wöchentlich 400 µl je well Kulturmedium zu den Kulturen geben
- nach etwa 14 Tagen Inkubation sind Klone zu erkennen

2.7.2 Nacktmaus-Assay

Den wohl schlüssigsten Beleg für eine maligne Transformation von Zellen liefert die Fähigkeit dieser, nach Injektion in die Nacktmaus ein Tumorwachstum auszulösen. Die verwendeten thymusaplastischen Nacktmäuse (*nu/nu*) sind nicht in der Lage, Antikörper gegen die injizierten Karzinomzellen zu entwickeln und diese abzustoßen. Dadurch entwickeln sich in den Nacktmäusen Tumoren, was in Tieren mit intaktem Immunsystem nicht möglich ist. Das Heranwachsen von Tumoren in Nacktmäusen wird als ein Zeichen von Malignität gewertet. Bei unterschiedlichem Malignitätsgrad sind demzufolge unterschiedliche Tumorgrößen zu erwarten.

Tiere: Nacktmäuse (CrI:CD1-*nu/nu*, Charles River Deutschland)

Durchführung:

- Kulturzellen mit PBS waschen und mit Trypsin ablösen
- Trypsinaktivität durch Zugabe von Kulturmedium abstoppen
- Zellen zählen, abzentrifugieren (10 min, 4 °C, 200 x g) und auf eine Konzentration von 2 Mio. Zellen / ml PBS bringen (Aufbewahrung auf Eis)
- 1 Mio. Zellen (500 µl der Zellsuspension) einer Nacktmaus seitlich unter die Haut injizieren
- zum Vergleich zweier unterschiedlicher Zelllinien diese auf je eine Seite einer Maus injizieren

Auswertung:

Nach ca. 1 bis 3 Wochen zeigten sich die ersten stecknadelkopfgroßen Tumoren unter der Haut der Tiere. 3 bis 8 Wochen nach der Injektion wurden die Tiere gewogen und getötet. Die Tumoren wurden freipräpariert und ihr Gewicht bestimmt.

2.8 Histologie

Die Bewertung der Gewebefeinstruktur erfolgte an gefärbten Gewebsschnitten. Diese wurden unter Anleitung von Fachpersonal nach Standardprotokollen angefertigt (Romeis, 1989) und von Prof. Dr. F. Dombrowski (Magdeburg) und Dr. K. Müller-Schmehl (Berlin) begutachtet.

2.8.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Für histologische Untersuchungen wurden den Tieren die Lebern entnommen und in histologische Kassetten überführt. Diese wurden für 48 h in eine frisch angesetzte Formalinlösung (4 % Formalin in PBS) eingelegt. Nach der Einbettung der Proben in Paraffin wurden Mikrotomschnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden in Toluol und anschließend in einer Ethanol-Verdünnungsreihe (100 %, 96 %, 75 %, 40 % Ethanol, dH₂O) entparaffiniert und rehydratisiert, ohne die Zellstrukturen zu verändern.

2.8.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Eine histologische Übersichtsfärbung erfolgte mittels Hämalaun und Eosin nach Mayer. Im Wesentlichen werden Zellkerne blau und weitere Zellstrukturen in verschiedenen Rottönen gefärbt. Zunächst wird die Probe in Hämalaun zur Kernfärbung eingestellt, gespült und gebläut und anschließend eine Eosinfärbung vorgenommen. Nach dem Spülen der Präparate in Wasser und in Ethanol werden diese in Permount eingebettet.

2.8.3 Immunhistologie

Die immunhistologische Färbung erfolgte an 2 µm dicken Gewebsschnitten mit einem Ki-67-spezifischen Antikörper (Dianova). Dieser erkennt ein nukleäres Antigen, welches nur während der Zellzyklusphasen detektierbar ist und ermöglicht damit die Markierung von Hepatozyten, welche sich nicht in der Ruhephase befinden.

2.9 Statistische Analyse

Alle nachfolgenden statistischen Verfahren erfolgten auf Formel- und Tabellengrundlage eines Statistiklehrbuches (Zöfel, 2002) und unter Zuhilfenahme der Software Microsoft EXCEL.

2.9.1 Kolmogorov-Smirnov-Test

Die in den Experimenten erhobenen Daten wurden auf Normalverteilung hin überprüft. Das Ergebnis des dafür eingesetzten Kolmogorov-Smirnov-Tests (K-S-Test) diente der Entscheidung, welche Werte für eine deskriptive Statistik berechnet werden sollen und welche analytischen Tests für eine statistische Bewertung geeignet sind.

Da in allen Experimenten relativ kleine Fallzahlen zu bewerten waren, eignete sich hier der K-S-Test. Durch die Berechnung einer Prüfgröße kann hier in Abhängigkeit der Fallzahl entschieden werden, ob eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorliegt.

2.9.2 Deskriptive Statistik

Zur Beschreibung der Daten wurden entsprechend ein Lokalisationsparameter (Mittelwert oder Median) und ein Dispersionsparameter (Standardabweichung oder halber Quartilsabstand) errechnet. Eingesetzt wurden die EXCEL-Funktionen MITTELWERT, STABW, MEDIAN und QUARTILE.

2.9.3 Students t-Test

Der t-Test nach Student dient dem Vergleich zweier Stichprobenkennwerte. Dabei wird ermittelt, ob die beiden Stichproben einer Grundgesamtheit angehören, oder diese sich voneinander signifikant unterscheiden. Voraussetzung zur Anwendung des Tests sind zwei voneinander unabhängige, normalverteilte Stichproben. Unter Berücksichtigung vorliegender Varianzenhomogenität oder Varianzenheterogenität wurde mittels Microsoft EXCEL (Funktion TTEST) das vorliegende Signifikanzniveau ermittelt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

2.9.4 U-Test von Mann und Whitney

Im Falle nicht gegebener Normalverteilung wurde der U-Test als parameterfreies Prüfverfahren zum Vergleich zweier Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz eingesetzt.

Beim U-Test werden die Werte der beiden Stichproben mit einer gemeinsamen Rangreihe versehen. Nachfolgend wird die Prüfgröße U berechnet, welche auf das vorliegende Signifikanzniveau schließen lässt.

2.9.5 Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test dient dem Vergleich zweier abhängiger Stichproben bezüglich ihrer zentralen Tendenz (Mediane). Eine Normalverteilung der zusammengehörigen Messwertdifferenzen ist keine Bedingung für diesen Test.

Dieser Test fand Anwendung bei der Auswertung der Experimente mit Nacktmäusen. Jedem Tier wurden einerseits Zellen mit Frataxinüberexpression und andererseits Kontrollzellen subkutan injiziert. Das Wachstumsmaß der Tumoren auf beiden Seiten war gleichermaßen von dem jeweiligen Tier abhängig.

Die absolute Differenz der gepaarten Werte wird in eine Rangfolge gebracht und die Rangsummen der positiven bzw. negativen Differenzen ermittelt. Dabei erhält die kleinste Differenz den Rangplatz 1; Nulldifferenzen bleiben unberücksichtigt. Die kleinere der beiden Rangsummen stellt die Prüfgröße T dar. Aus einer T-Wert-Tabelle kann nun abgelesen werden, ob ein signifikanter Unterschied für die jeweilige Fallzahl auf der betreffenden Stufe vorliegt.

2.10 Geräte

Blottingapparatur	Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD, München
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator	WTB Binder, Tuttlingen
Geldokumentationssysteme	Fluorescent Combi Light	LTF, Wasserburg
	FujiFilm Intelligent Dark Box	Fuji Photo Film, Tokyo
Gelelektrophorese-Systeme	Mini-PROTEAN 3	BIO-RAD, München
	Mini SUB Cell GT	BIO-RAD, München
Homogenisatoren	Schütt Homgen (Potter)	Schütt, Göttingen
	Sonoplus 2070 (Ultraschall)	Bandelin, Berlin
	Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
Küvetten-Photometer	GeneQuant pro	Biochrom, Cambridge
Küvetten-Spektralphotometer	UVIKON 922	Biotek, Neufarn
Mikroskop	TE-300 mit DXM-1200	NIKON, Düsseldorf
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Köln
Plattenphotometer	iEMS Reader MF	Labsystems, Helsinki
Plattenfluorometer	Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Helsinki
Sauerstoffmesszelle	CLARK-Elektrode	Hansatech, Norfolk UK
Zellzählgerät	Casy 1 TT	Schärfe, Reutlingen

2.11 Antikörper

Bezeichnung	Host	Applikation	Firma	Bestell-Nr.
Anti- α -Tubulin	monoklonal Maus	1 : 1.000	Sigma	T9026
Anti-Cytochrome C	monoklonal Maus	1 : 1.000	BD Biosciences	556433
Anti-HA clone 12CA5	monoklonal Maus	1 : 1.000	Roche	1 666 606
Anti-Human-Frataxin	monoklonal Maus	1 : 1.000	Chemicon	1594
Anti-Maus-Frataxin	polyklonal	1 : 1.000	(Puccio, 2001)	
Bax	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#2772
Caspase-3	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#9662
ERK1/2 Phospho-Specific	monoklonal Maus	1 : 1.000	BD Biosciences	612358
HSP-25	polyklonal Kaninchen	1 : 10.000	Stressgen	SPA-801
HSP-70	monoklonal Maus	1 : 1.000	Stressgen	SPA-810
Ki-67			Dianova	
p38-MAPK	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#9212
Phospho-AMPK- α	monoklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#2535
Phospho-HSP-27	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#2401
Phospho-p38-MAPK	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#9211
Phospho-SAPK/JNK	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#9251
SAPK/JNK	polyklonal Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling	#9252

anti-mouse IgG (whole molecule), Peroxidase conjugate	1 : 1.000	SIGMA	A8924
anti-rabbit IgG, HRP-linked	1 : 1.000	Cell Signaling	#7074

2.12 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

Acrylamid/Bis (Rotiphorese-Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Applichem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat, APS	Sigma, Steinheim
Casyton	Schärfe, Reutlingen
CellPhect-Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DIFCO Bacto Agar	Becton Dickinson, Sparks USA
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos Modified Eagles Medium, DMEM	Sigma, Steinheim
ECL-Western Blotting Detektionsreagenzien	Amersham Biosciences, Freiburg
fötales Rinderserum, FBS	Biochrom, Berlin
Geneticin G 418-Sulphate	Gibco, Karlsruhe
Hanks Balanced Salt Solutions, HBSS	Sigma, Steinheim
High-Vacuum Silicone Grease, Klonierfett	Dow Corning, Midland USA
HYBAID Taq-DNA-Polymerase (mit Puffern)	Hybaid, London UK
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Isocitrat-Dehydrogenase	Sigma, Steinheim
NADP ⁺	Roche, Mannheim
PCR-Primer, lyophilisiert	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Sigma, Steinheim
Protean-Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Proteinase K (fungal)	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase MMLV-RT	Roche, Mannheim
Rhodamine 123	Sigma, Steinheim
RNAsin	Promega, Mannheim
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Sulforhodamin B	Sigma, Steinheim
Taq-DNA-Polymerase (mit Puffer und MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamine, TEMED	BIO-RAD, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma, Steinheim

Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde von den Firmen Biochrom (Berlin), Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.13 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I:	0,3 M Tris; 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II:	25 mM Tris; 20 % Methanol (v/v)
Bradford-Lösung:	1 Teil Roti-Quant + 4 Teile dH ₂ O
DMPC-Wasser:	1 % DMPC (v/v); 50 % Ethanol; in dH ₂ O; 30 min rühren; autoklavieren
Ethidiumbromidbad:	0,5 µg Ethidiumbromid / ml TAE-Puffer
Gitschier-Puffer (10x):	670 mM Tris-HCl pH 8,8; 166 mM NH ₄ SO ₄ ; 65 mM MgCl ₂ ; 0,5 % Triton X100
Hämalaun-Lösung:	1 g Hämatoxylin; 0,2 g NaJO ₃ ; 50 g Kalialaun; 50 g Chloralhydrat; 1 g Zitronensäure; ad 1 l dH ₂ O
Kathodenpuffer:	40 mM ε-Aminocaprinsäure; 0,01 % SDS (w/v); 20 % Methanol (v/v)
Laemmli-Puffer (3x):	30 Vol.-% Glycerol; 30 % Vol.-% Tris-HCl pH 6,8; 30 Vol.-% SDS (20 %); Bromphenolblau; frisch dazu: 10 % 1 M DTT
MSH-Puffer:	210 mM Mannitol; 70 mM Saccharose; 5 mM K ⁺ -HEPES; pH 7,4
PBS:	137 mM NaCl; 5,36 mM KCl; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,5
PCA-Lösung:	600 mM Perchlorsäure; 1 mM EGTA
Ponceau-Lösung:	0,02 % Ponceau S in 3 %iger Trichloessigsäure
Saccharose-Lösung:	250 mM Saccharose in dH ₂ O; frisch ansetzen
SDS-PAGE-Laufpuffer (5x):	3 % Tris (w/v); 14,4 % Glycin; 0,5 % SDS (w/v); pH 8,3
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; filtriert
SDS-PAGE-Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; filtriert
Sörensen-Puffer:	66,7 mM KH ₂ PO ₄ und 66,7 mM Na ₂ HPO ₄ zusammengeben bis pH 7,4
TAE-Puffer:	2 M Tris; 5,71 % Essigsäure (v/v); 0,05 mM EDTA, pH 7,5
TBST-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
TCM-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 60 mM Natriumzitat, 1 mM MnCl ₂
Tris-Puffer:	50 mM Tris-Base; pH 7,4

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Maus

3.1.1 Verteilung der Genotypen in einer Versuchspopulation

Die Feststellung des Genotyps eines Tieres (Tabelle 1) erfolgt durch *Cre*-PCR und *loxP*-PCR. Dadurch ist es möglich, Tiere mit leberspezifischem Frataxin-Knock-out zu identifizieren (Abbildung 2) und die genotypische Verteilung innerhalb der Population zu kontrollieren. Diese ist exemplarisch in der Tabelle 3 dargestellt. Von 35 verpaarten Weibchen wurden 28 trächtig und warfen insgesamt 210 Jungtiere. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug also 7,5 Jungtiere.

Genotyp	männliche Nachkom- menzahl	weibliche Nachkom- menzahl	Nach- kommen insgesamt	Prozentsatz [%]	erwarteter Prozentsatz [%]
<i>ko</i>	10	15	25	11,9	12,5
<i>het-ko</i>	26	23	49	23,3	25,0
<i>cre</i>	24	14	38	18,0	12,5
<i>lox</i>	12	9	21	10,0	12,5
<i>het-lox</i>	26	22	48	22,9	25,0
<i>wt</i>	10	19	29	13,8	12,5
gesamt	108	102	210	100,0	100,0

Tabelle 3: Genotypenbezogene Nachkommenzahlen einer Versuchsgruppe

3.1.2 Nachweis veränderter Transkription und Translation des Frataxin-Gens

Die Genotypisierung ermöglicht eine theoretische Aussage darüber, ob das Frataxin-Gen ausgeschaltet wird. Der Nachweis eines erfolgreichen Knock-outs kann jedoch nur direkt am Lebergewebe *ex vivo* erbracht werden.

Mittels RT-PCR wird gezeigt, dass in den genotypischen *ko*-Tieren leberspezifisch verkürzte Frataxin-mRNA vorliegt (Abbildung 6.1). In diesen Proben ist das Frataxin-Protein folglich kaum durch Immunoblotting nachweisbar (Abbildung 6.2). Zwar sind auch in diesen Spuren schwache Signale einer Antikörperbindung erkennbar, jedoch wird diese darauf zurückgeführt, dass im Leberhomogenat neben den Hepatozyten, in welchen der Knock-out stattfindet, weitere in der Leber vorkommende Zelltypen (Kupffer-Zellen, Endothelzellen, usw.) enthalten sind.

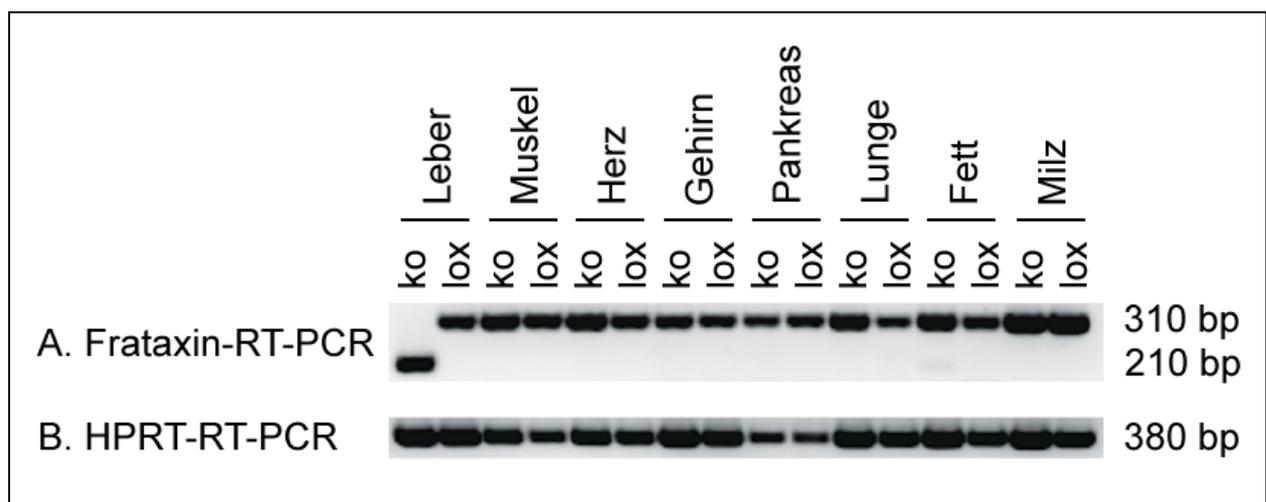


Abbildung 6.1: Nachweis des leberspezifischen Frataxin-Knock-outs auf mRNA-Ebene.

(A) Aus mRNA wurde mittels RT-Reaktion cDNA synthetisiert. Durch spezifische Primer, welche sich am Exon 3 bzw. Exon 5 der Frataxin-mRNA anlagern, erhält man nach erfolgter PCR ein Produkt von 310 bp. Fehlt durch erfolgten Knock-out das Exon 4, so ist das PCR-Produkt nur noch 210 bp groß. (B) Zum Nachweis, dass die Proben der verschiedenen Gewebe gleicher Qualität waren, wurde eine RT-PCR für die HPRT-mRNA durchgeführt. Nach erfolgter Gelelektrophorese wird deutlich, dass der Knock-out des Frataxingens auf mRNA-Ebene ausschließlich im Lebergewebe der Knock-out-Tiere nachweisbar ist.

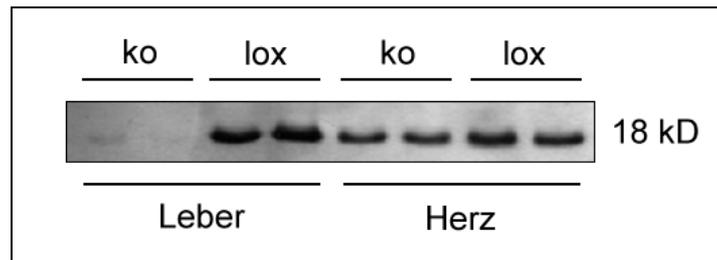


Abbildung 6.2: Nachweis des leberspezifischen Frataxin-Knock-outs auf Proteinebene

Von zwei Knock-out-Tieren und zwei (lox-)Kontrolltieren wurden Proteinextrakte aus Leber und Herz gewonnen. Der spezifische Nachweis des Frataxins erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot. Nur in der Leber der Knock-out-Tiere ist Frataxin nahezu nicht nachweisbar.

3.1.3 Überlebensrate der Tiere mit leberspezifischem Frataxin-Knock-out

Durch eine Überlebensgrafik (Abbildung 7) wird die verminderte durchschnittliche Lebenserwartung der Frataxin-Knock-out-Tiere veranschaulicht.

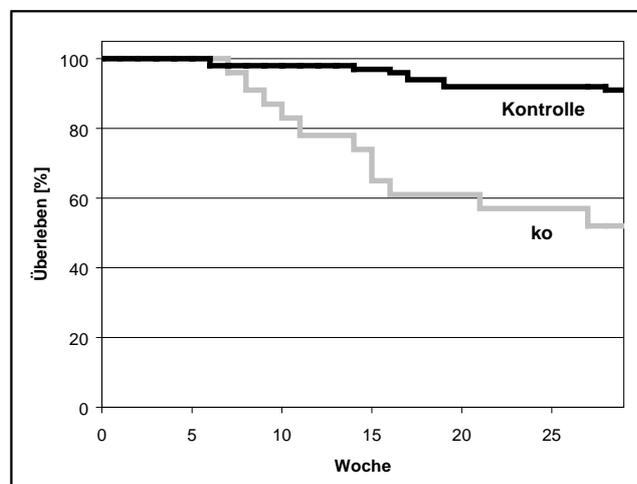


Abbildung 7: Überlebensgrafik

Dargestellt ist die Überlebensrate von Knock-out-Tieren ($n = 23$) und Kontrolltieren (wt, lox, cre; $n = 90$) über einen Zeitraum von 29 Wochen. Erkennbar ist eine verminderte Lebenserwartung der Knock-out-Tiere innerhalb des dargestellten Zeitraumes.

3.1.4 Veränderungen der Leber in Knock-out-Tieren

Eine mögliche Antwort auf die Ursache der verminderten Lebenserwartung bietet die makroskopische und mikroskopische Betrachtung der Leber dieser Tiere. An der Oberfläche der Leber sind hyperplastische Auswüchse zu erkennen, die möglicherweise auf Tumoren hinweisen (Abbildung 8.1).



Abbildung 8.1: Makroskopische Veränderungen der Leber eines Tieres mit leberspezifischem Frataxin-Knock-out

Aufnahme einer präparierten Leber eines 4 Monate alten Knock-out-Tieres. Erkennbar sind deutliche Veränderungen der Leberlappen.

Mikrofotografien der gefärbten Leberschnitte lassen massive Veränderungen der Leberfeinstruktur erkennen (Abbildung 8.2). Auffällig sind vermehrte Proliferation und Apoptose der Hepatozyten, sowie eine starke Ovalzellproliferation. Zahlreiche präneoplastische Herde bestätigen den Verdacht einer Tumorbildung.

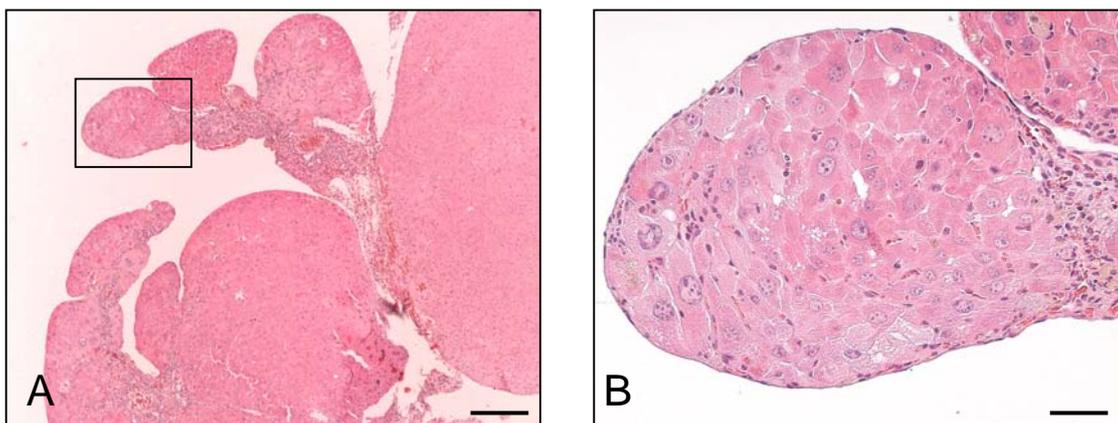


Abbildung 8.2: Mikroskopische Veränderungen der Leber eines Tieres mit leberspezifischem Frataxin-Knock-out

Fotografien eines mit Hämalaun-Eosin gefärbten Leberschnittes eines 4 Monate alten Knock-out-Tieres. Originalvergrößerung (A) 40fach und Ausschnittsvergrößerung (B) 200fach.

Objektive: 4x (A) und 20x (B)

Maßstäbe: 150 μm (A) und 30 μm (B)

3.2 Immunhistologischer Nachweis erhöhter Proliferation

Vermehrte Leberzellproliferation in Verbindung mit einer Leberzirrhose erhöhen das Risiko eines hepatozellulären Karzinoms beim Menschen (Ballardini, 1994). Ein möglicher Proliferationsnachweis in verändertem Gewebe ist die Markierung des nukleären Ki-67-Antigens, welches nur während der Zellzyklusphasen detektierbar ist (Tannapfel, 1999; Scholzen, 2000). Durch die Verwendung eines Ki-67-spezifischen Antikörpers erfolgte der immunhistologische Nachweis zahlreicher proliferierender Zellen in Gewebsschnitten makroskopisch veränderter Lebern 4 Monate alter Tiere (Abbildung 9).

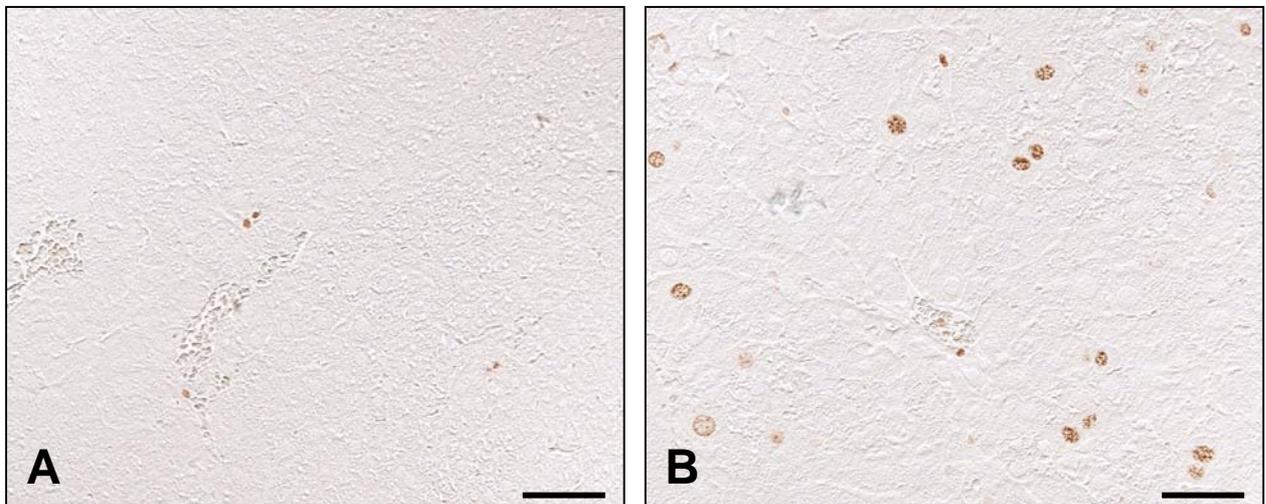


Abbildung 9: Immunhistologischer Nachweis einer erhöhten Proliferationsrate in der Leber eines Knock-out-Tieres

Die Abbildungen zeigen mikroskopische Darstellungen immunhistologischer Färbungen von Lebergewebe von Kontrolltieren (A) und Knock-out-Tieren (B). Als Proliferationsmarker wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Ki-67-Protein verwendet. Während in (A) keine Ki-67-positiven Zellen erkennbar sind, sind in (B) mehrere Zellen markiert, welche sich im Zellzyklus befinden.

Objektiv: 20x (HMC),

Maßstab: 30 μm .

3.3 Energiestoffwechsel in Frataxin-Knock-out-Hepatozyten

Eine Verminderung des Energiestoffwechsels infolge einer Frataxindepletion in den Hepatozyten sollte auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden. Dementsprechend wurden drei wichtige Marker, welche derartige Veränderungen zeigen und darüber hinaus eine Kausalanalyse zulassen, untersucht.

3.3.1 Bestimmung der Aconitaseaktivität

Die Aconitase ist ein Eisen-Schwefel-Protein des Zitratzyklus'. Eine verminderte Aconitaseaktivität indiziert eine Verminderung des Energiestoffwechsels, da die Effektivität des Zitratzyklus' abnimmt und in der Folge weniger Reduktionsäquivalente für die oxidative Phosphorylierung zur Verfügung gestellt werden können.

Durch fotometrische Aconitase-Aktivitätsbestimmungen wird diese Reduktion deutlich (Abbildung 10.1).

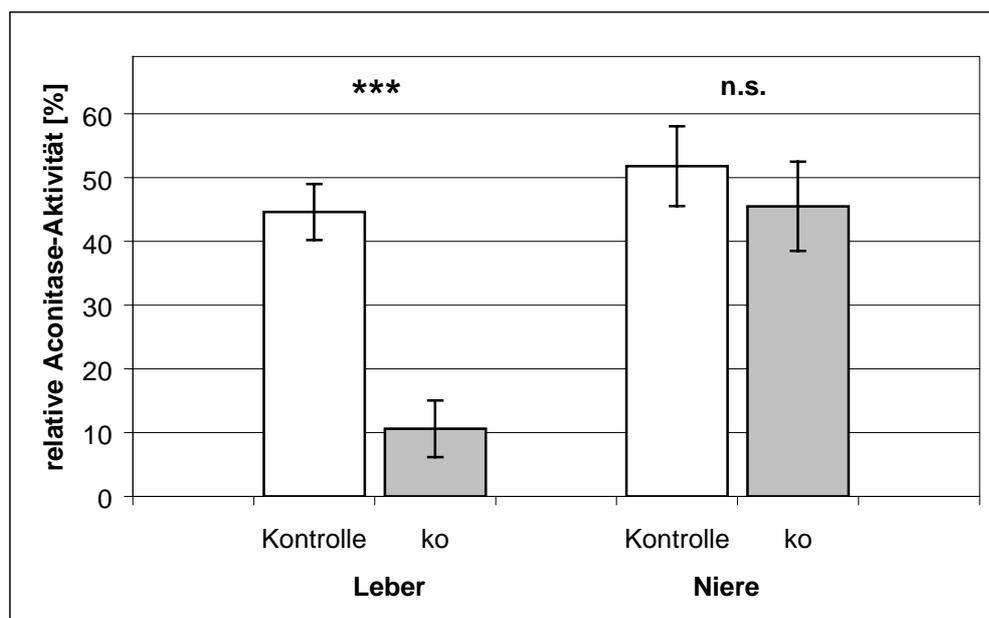


Abbildung 10.1: Verminderte Aconitase-Aktivität in den Lebern von Knock-out-Tieren

Die Aconitase-Aktivitäten von Knock-out-Tieren (ko) und Kontrolltieren wurde jeweils in Leber und Niere bestimmt. Die Aktivität der reaktivierten Aconitase der Kontrolltiere (2.4.5) diente als Referenzwert (= 100 %; nicht dargestellt). Es zeigt sich, dass die Aconitase-Aktivität der Knock-out-Tiere leberspezifisch vermindert ist.

(4 Kontrolltiere (cre), 3 Knock-out-Tiere; Normalverteilung; dargestellt: Mittelwerte \pm SD; Varianzhomogenität; t-Test: $p = 0,00017$)

3.3.2 Bestimmung der Respirationsrate

Die ATP-Bildung der Zelle erfolgt im Wesentlichen durch oxidative Phosphorylierung. Da nur dieser Prozess Sauerstoff verbraucht, kann die Respirationsrate als direktes Maß für die oxidative Phosphorylierung herangezogen werden.

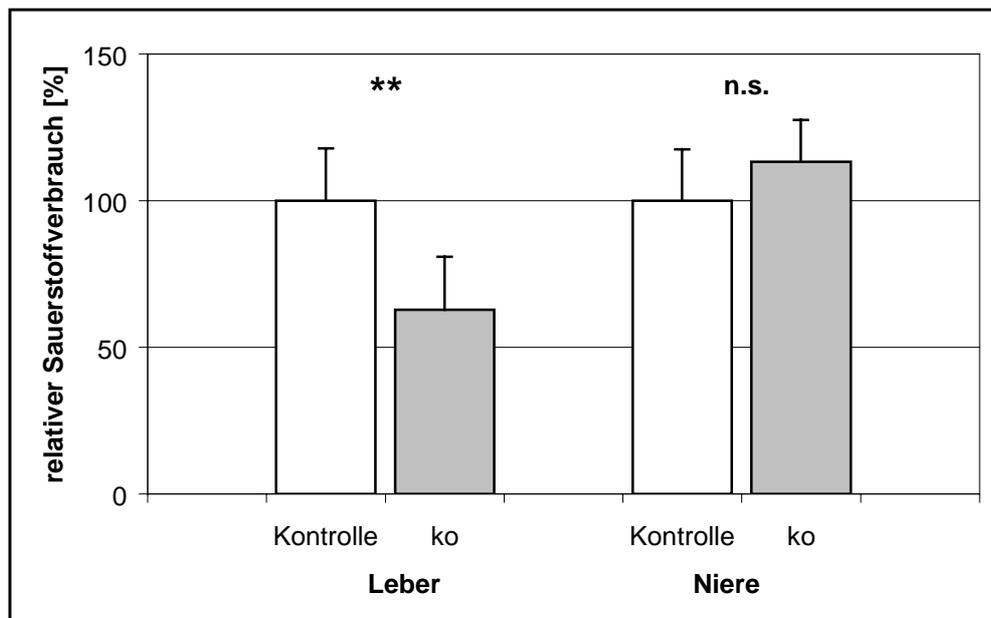


Abbildung 10.2: Verminderter Sauerstoffverbrauch in den Lebern von Knock-out-Tieren

Der Sauerstoff-Verbrauch von Knock-out-Tieren (ko) und Kontrolltieren wurde jeweils in Leber und Niere bestimmt. Der organspezifische Sauerstoffverbrauch der Kontrolltiere wurde als Referenzwert herangezogen. Es zeigt sich, dass der Sauerstoffverbrauch der Knock-out-Tiere leberspezifisch vermindert ist. (5 Kontrolltiere (wt, cre, lox, het-lox), 5 Knock-out-Tiere; keine Normalverteilung; dargestellt: Median + halber Quartilsabstand; U-Test: $p < 0,01$)

Mittels einer Clark-Elektrode ist es möglich, den Sauerstoffgehalt einer Zellsuspension über einen bestimmten Zeitraum zu verfolgen. Der so ermittelte Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten mit Frataxin-Knock-out ist im Vergleich zu Kontrollhepatozyten vermindert, während der entsprechende Vergleich der Nieren keinen signifikanten Unterschied ergibt (Abbildung 10.2).

3.3.3 Bestimmung des ATP-Gehaltes

Die Reduktion des ATP-Gehaltes in einem Gewebe ist das Ergebnis eines verminderten Energiestoffwechsels und kann durch einen Luziferase-Assay nachgewiesen werden. Während in dem als Kontrollgewebe verwendeten Muskel kein genotypenspezifischer Unterschied im ATP-Gehalt festzustellen ist, zeigt sich im Knock-out-Lebergewebe eine deutlich verminderte ATP-Menge (Abbildung 10.3).

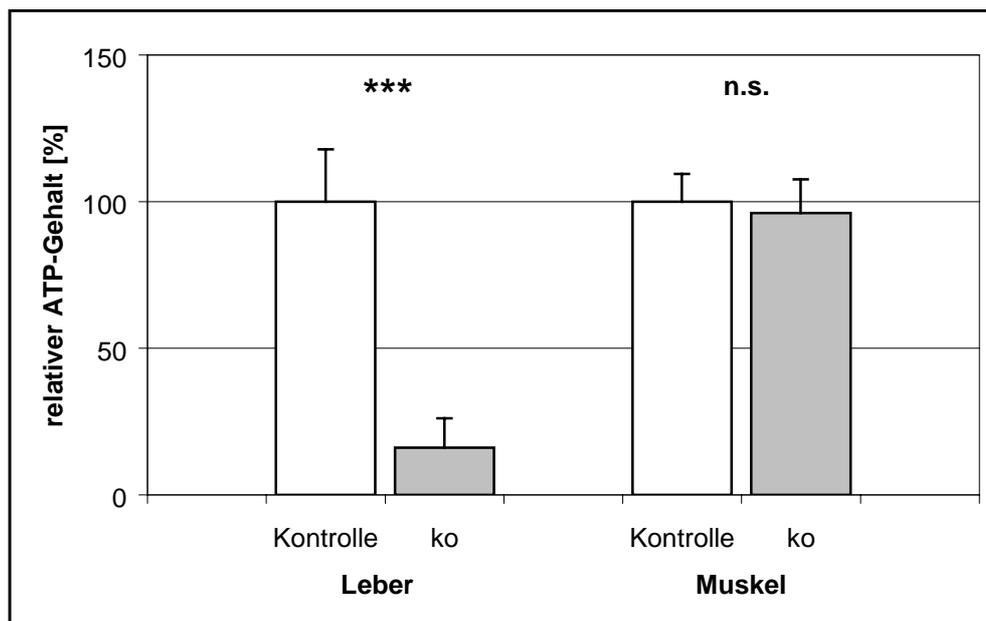


Abbildung 10.3: Verminderter ATP-Gehalt in den Lebern von Knock-out-Tieren

Der im Gewebe enthaltene ATP-Gehalt von Knock-out-Tieren (ko) und Kontrolltieren wurde jeweils in Leber und Muskel bestimmt. Der organspezifische ATP-Gehalt der Kontrolltiere wurde als Referenzwert herangezogen. Es zeigt sich, dass der ATP-Gehalt der Knock-out-Tiere leberspezifisch vermindert ist. (Leber: 7 Kontrolltiere (het-lox), 7 Knock-out-Tiere; Muskel: 4 Kontrolltiere (het-lox), 4 Knock-out-Tiere; keine Normalverteilung; dargestellt Median + halber Quartilsabstand; U-Test: $p < 0,001$)

3.4 Mechanistische Untersuchungen

In den vorangegangenen Beobachtungen zeigten sich bei den Knock-out-Tieren erhöhte Lebertumorinzidenz, altersabhängig erhöhte Proliferations- und erhöhte Apoptoseraten der Leberzellen sowie leberspezifisch reduzierter Energiestoffwechsel. Das Ziel der folgenden biochemischen Untersuchungen war es, an sehr jungen Tieren vorhandene Mechanismen aufzudecken, die zu den beschriebenen Beobachtungen führen können.

3.4.1 Apoptose-Signalweg

Mittels Immunoblot sollten mögliche Signalwege gefunden werden, welche zu der unter 3.1.4 beschriebenen vermehrten Apoptose der Hepatozyten führen. Trotz des Einsatzes zahlreicher spezifischer Antikörper war es mit dieser Methode nur möglich, frühe proapoptotische Ereignisse nachzuweisen.

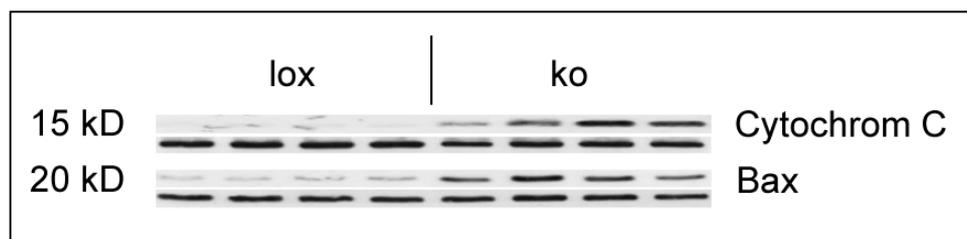


Abbildung 11: Nachweis der Aktivierung des Apoptosesignalweges in Lebern von Knock-out-Tieren

Die Abbildung zeigt Immunoblots von Lebergewebsproben aus jeweils 4 Kontrolltieren (lox) und 4 Knock-out-Tieren. Dargestellt ist jeweils die antikörperspezifische Bande mit der Angabe des Molekulargewichtes. Die jeweils darunter liegende Bande dient als Auftragskontrolle. Dafür wurde die Proteinmembran gestrippt und mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin (55 kD) nachgewiesen. Für den Cytochrom C-Nachweis wurde nur die zytosolische Proteinfraction eingesetzt. Die Abbildung zeigt klar, dass nur in den Knock-out-Tieren Cytochrom C im Zytosol nachweisbar ist und das proapoptotische Protein Bax im Gesamtprotein der Knock-out-Tiere in größerer Menge nachweisbar ist.

In der zytosolischen Fraktion der Knock-out-Hepatozyten sind erhebliche Mengen Cytochrom C zu detektieren (Abbildung 11). Die Organspezifität des Ergebnisses bestätigt ein entsprechender Immunoblot an Nierengeweben, in welchem kein Cytochrom C im Zytosol zu detektieren ist (nicht dargestellt). Eine erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins Bax ist ebenfalls nur im Proteinextrakt der Knock-out-Lebern nachweisbar (Abbildung 11). Aktivierte Caspase 3 ist mittels Immunoblot nicht belegbar (nicht dargestellt).

3.4.2 Veränderte Aktivität stressassoziierter Proteine

Zellen reagieren auf Stress mit der Aktivierung von verschiedenen mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) und der vermehrten Transkription so genannter Hitzeschockproteine, um sich vor Schäden (z.B. durch Proteindenaturierung) zu schützen. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper sollten aktivierte Mechanismen der Stressantwort mittels Immunoblot aufgedeckt werden.

Die zentralen mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2, p38-MAPK und SAPK/JNK wurden auf eine Aktivierung hin untersucht. Für die Hitzeschockproteine HSP-25 und HSP-70 erfolgte ein Expressionsnachweis.

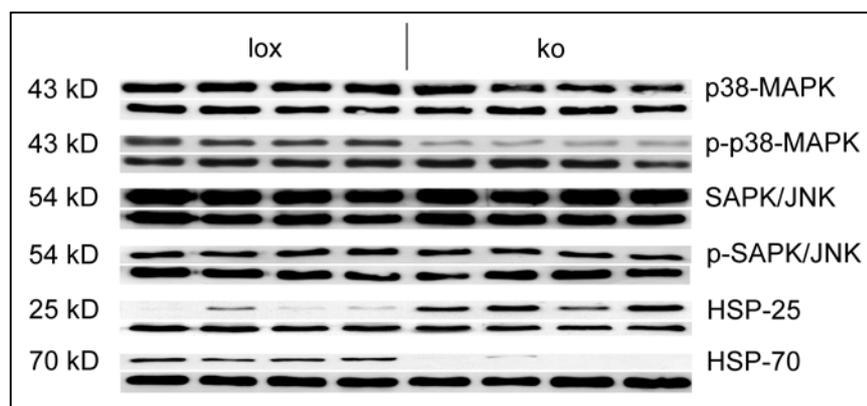


Abbildung 12: Nachweis der Modulation stressassoziierter Proteine in Lebern von Knock-out Tieren

Die Abbildung zeigt Immunoblots von Lebergewebsproben aus jeweils 4 Kontrolltieren (lox) und 4 Knock-out-Tieren. Dargestellt ist jeweils die antikörperspezifische Bande mit der Angabe des Molekulargewichtes. Die jeweils darunter liegende Bande dient als Auftragskontrolle. Dafür wurde die Proteinmembran gestrippt und mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin (55 kD) nachgewiesen.

Die p38-MAPK ist in den Knock-out-Tieren in geringerer Menge phosphoryliert. Die basale Proteinmenge ist vergleichbar. Ein derartiger Unterschied konnte nicht für SAPK/JNK gezeigt werden. Für HSP-25 konnte in den Knock-out-Tieren eine erhöhte Proteinmenge und für HSP-70 eine niedrigere Proteinmenge als in den Kontrolltieren nachgewiesen werden.

Die basale Expression der p38-MAPK und der SAPK/JNK ist nachweisbar, jedoch ist kein Unterschied in der Expression zwischen Knock-out- und Kontrollgeweben festzustellen. Eine unterschiedliche Regulation der Phosphorylierung ist nur für die p38-MAPK erkennbar (Abbildung 12, ERK1/2 nicht dargestellt).

Während eine vermehrte Expression des HSP-25 in den Knock-out-Geweben nachgewiesen werden kann, ist die Expression von HSP-70 stark vermindert.

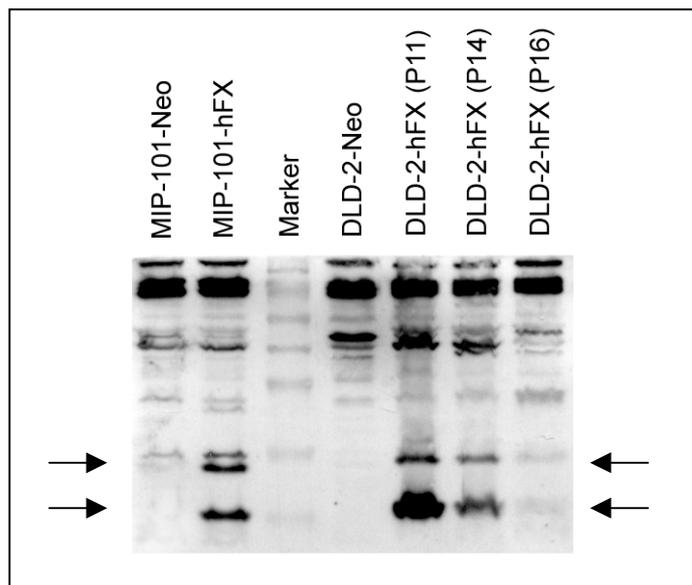
3.5 Charakterisierung frataxinüberexprimierender Zellen

3.5.1 Nachweis der erhöhten Frataxinexpression

Durch die Transfektion zweier Kolonkarzinomzelllinien mit je einem Kontrollvektor und einem das Frataxin-Gen enthaltenden Vektor entstanden nach klonaler Selektion die verwendeten Zelllinien DLD-2-Neo, DLD-2-hFX, MIP-101-Neo und MIP-101-hFX. Der Frataxinexpressions-Nachweis erfolgte in regelmäßigen Abständen und versuchsbegleitend.

Abbildung 13: Frataxin-Expressionsnachweis in Kolonkarzinomzelllinien

Die Expression des transfizierten Frataxins wurde mittels Immunoblot unter Anwendung eines Antikörpers gegen einen HA-tag nachgewiesen. Erkennbar sind zwei frataxinspezifische Banden von 18 bzw. 21 kD (Cavadini, 2000), welche nur in den überexprimierenden Zelllinien erkennbar sind (Pfeile). Weiterhin erkennbar ist das Nachlassen des Expressionssignals bei den DLD-2-hFX-Zellen unterschiedlicher Passagezahlen (in Klammern). Details im Text.



Einen vom endogen vorhandenen Frataxin unabhängigen Expressionsnachweis erhält man durch den Nachweis des am Fremdprotein befindlichen HA-tags. Dieses Frataxinsignal konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Karzinomzelllinien exprimieren mit fortlaufender Kultivierungspassage weniger Fremdprotein. Dieser Effekt konnte auch bei MIP-101-Zellen und DLD-2-Zellen festgestellt werden. Während der Expressionsverlust bei den MIP-101-Zellen langsam stattfand, verloren die DLD-2-Zellen innerhalb weniger Zellpassagen die gesamte Frataxinexpression. Aus diesem Grund waren nur sehr frühe Passagen dieser Zelllinie experimentell einsatzfähig und einige Experimente wurden nur mit MIP-101-Zellen durchgeführt.

Ein Nachweis, dass der Gesamt-Frataxingehalt der Zellen durch die Transfektion erhöht war, erfolgte mittels eines frataxinspezifischen Antikörpers (nicht dargestellt).

3.5.2 Wachstum der Zellen

Auffälliges Merkmal der frataxinüberexprimierenden Zellen ist ein im Vergleich zur Kontrollpopulation langsames Wachstum. Durch die Aufnahme von Wachstumskurven und die Ermittlung der jeweiligen Populationsverdopplungszeiten konnten signifikante Unterschiede bestätigt werden (Tabelle 4 und Abbildung 14).

	Verdopplungszeit	Unterschied	t-Test
MIP-101-Neo	19,6 ± 0,74 h	2,8 h	$p = 1,8 * 10^{-5}$
MIP-101-hFX	22,4 ± 1,04 h		
DLD-2-Neo	17,9 ± 0,56 h	2,3 h	$p = 7,4 * 10^{-7}$
DLD-2-hFX	20,2 ± 0,53 h		

Tabelle 4: Unterschiedliches Wachstum der Zelllinien mit und ohne Frataxinüberexpression.

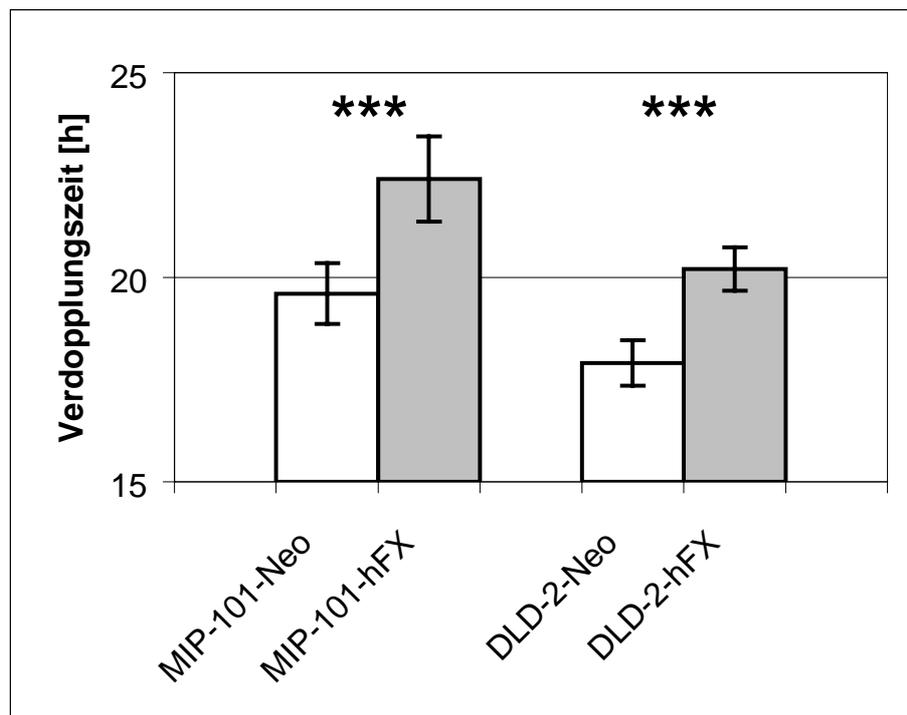


Abbildung 14: Langsameres Wachstum der Populationen frataxinüberexprimierender Zellen

Aus Wachstumskurven errechnete Populationsverdopplungszeiten zeigen ein langsames Wachstum frataxinüberexprimierender Zellen. (n = 8; Normalverteilung; dargestellt: Mittelwerte ± SD; Varianzhomogenität; t-Test siehe Tabelle 4)

3.6 Energiestoffwechsel in den frataxinüberexprimierenden Zellen

Nachdem in den Lebergeweben der leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Tiere festgestellt wurde, dass ein verminderter Energiestoffwechsel vorliegt (Kapitel 3.3), sollten entsprechende Experimente an frataxinüberexprimierenden Zellen einen erhöhten Energiestoffwechsel belegen. Entsprechende Messungen der Aconitaseaktivität, der Respirationsrate und des ATP-Gehaltes wurden durch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des mitochondrialen Membranpotenzials ergänzt. Durch eine semiquantitative Auswertung ist es auch hier möglich, signifikante Unterschiede festzustellen.

Wie aus den Abbildungen 15.1 bis 15.4 deutlich wird, verfügen frataxinüberexprimierende Zellen über einen erhöhten Energiestoffwechsel. Dies manifestiert sich durch eine erhöhte Aconitase-Aktivität, gesteigerte Respirationsrate, erhöhtes mitochondriales Membranpotenzial und größeren ATP-Gehalt der frataxinüberexprimierenden Zellen.

Für die DLD-2-hFX-Zellen ließen sich ebenfalls vermehrte Aconitaseaktivitäten und erhöhte Respirationsraten feststellen. Die stark abnehmende Expression des Frataxins (Kapitel 3.5.1) ermöglichte jedoch keine Erhebung signifikanter Datensätze für alle gewünschten Parameter des Energiestoffwechsels. Auf die Darstellung der ermittelten Werte wurde daher verzichtet.

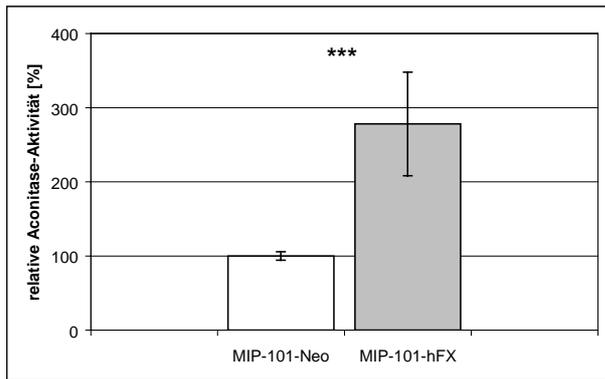


Abbildung 15.1

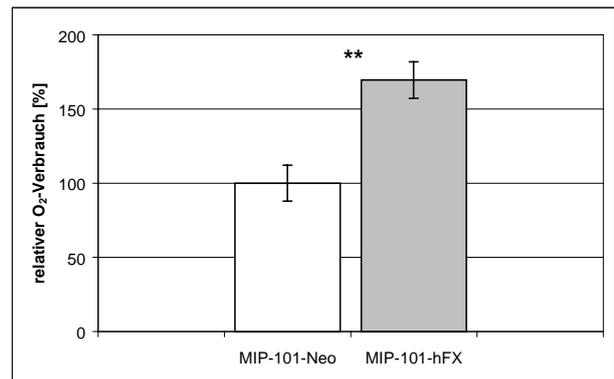


Abbildung 15.2

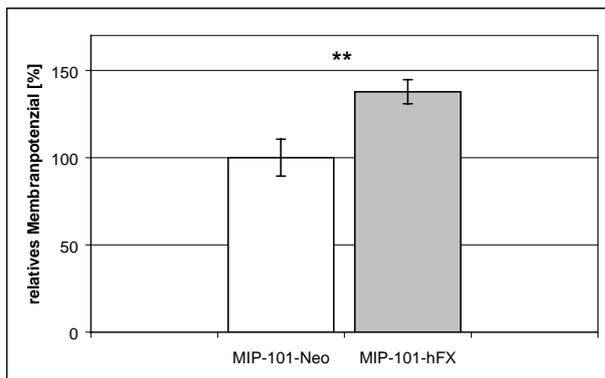


Abbildung 15.3

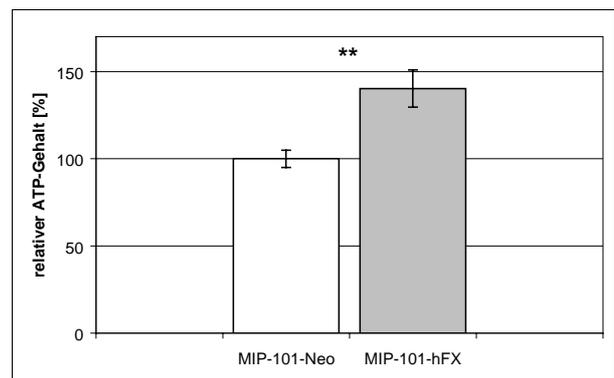


Abbildung 15.4

Abbildung 15: Erhöhter Energiestoffwechsel frataxinüberexprimierender Zellen

Die frataxinüberexprimierenden Zellen (MIP-101-hFX) zeigen in allen Untersuchungen einen im Vergleich zu den leervektortransfizierten Kontrollzellen (MIP-101-Neo) erhöhten Energiestoffwechsel.

15.1: Aconitaseaktivität

Fotometrische Aconitaseaktivitätsbestimmung in der mitochondrialen Fraktion.

Mittelwerte \pm SD: MIP-101-Neo 100 % \pm 5,6 %; MIP-101-hFX 278 % \pm 69,8 %.

(n = 12; Normalverteilung; Varianzenheterogenität; t-Test: $p = 1,2 \cdot 10^{-8}$)

15.2: Sauerstoffverbrauch

Sauerstoffverbrauchsermittlung mittels Clark-Elektrode.

Mittelwerte \pm SD: MIP-101-Neo 100 % \pm 12,2 %; MIP-101-hFX 170 % \pm 12,3 %.

(n = 14; Normalverteilung; Varianzenhomogenität; t-Test: $p < 0,01$)

15.3: Mitochondriales Membranpotenzial

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des mitochondrialen Membranpotenzials nach semiquantitativer Auswertung. Mittelwerte \pm SD: MIP-101-Neo 100 % \pm 10,6 %; MIP-101-hFX 138 % \pm 6,9 %.

(n = 3; Normalverteilung; Varianzenhomogenität; t-Test: $p = 0,0066$)

15.4: ATP-Gehalt

Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels Chemilumineszenz.

Mittelwerte \pm SD: MIP-101-Neo 100 % \pm 5,0 %; MIP-101-hFX 140 % \pm 10,6 %.

(n = 4; Normalverteilung; Varianzenhomogenität; t-Test: $p = 0,0021$)

3.7 Aktivierung der p38-MAPK

Die bei den leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Tieren beobachtete verminderte Phosphorylierung der p38-MAPK (Abbildung 12) legte die Vermutung nahe, dass diese in den frataxinüberexprimierenden Zellen ebenfalls in ihrer Phosphorylierung verändert vorliegen könnte. Mittels Immunoblot wird gezeigt, dass die p38-MAPK bei MIP-101-hFX-Zellen stärker phosphoryliert vorliegt, als in Kontrollzellen (Abbildung 16). Die Expression der p38-MAPK ist bei beiden Zelllinien vergleichbar stark (Abbildung 16).

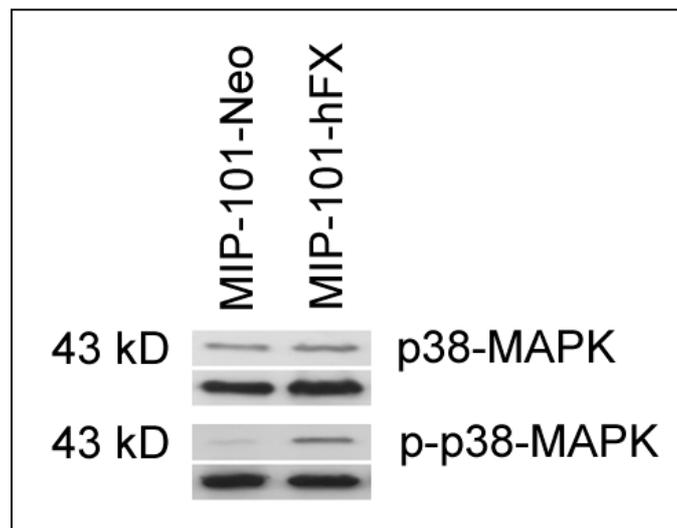


Abbildung 16: Phosphorylierung der p38-MAPK

Die Abbildung zeigt Immunoblots von MIP-101-Zellen mit und ohne Frataxinüberexpression. Dargestellt ist jeweils die antikörperspezifische Bande für die basale und die phosphorylierte Form der p38-MAPK. Die jeweils darunter liegende Bande dient als Auftragskontrolle. Dafür wurde die Proteinmembran gestrippt und mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin (55 kD) nachgewiesen. Die p38-MAPK liegt in den frataxinüberexprimierenden Zellen stärker phosphoryliert vor.

3.8 Methoden zur Bestimmung der Tumorigenität von Zellen

Viele Tumorzellen haben eine Reihe von Überlebensbeschränkungen, wie z. B. den Kontakt zu benachbarten Zellen, verloren. Die Tumorigenität lässt sich durch verschiedene Methoden bestimmen. Der Frage, ob vermehrte Frataxinexpression und damit vermehrter Energiestoffwechsel zu einer Verminderung der Tumorigenität führt, sollte auf diese Weise nachgegangen werden.

3.8.1 Wachstum im Soft-Agar

Transformierte Zellen sind gegenüber zahlreichen Wachstumsbeschränkungen normaler Zellen unempfindlich. Im Soft-Agar-Assay wird gezeigt, ob die verwendeten Zellen Kontakt zu benachbarten Zellen und Möglichkeiten für eine Anheftung benötigen.

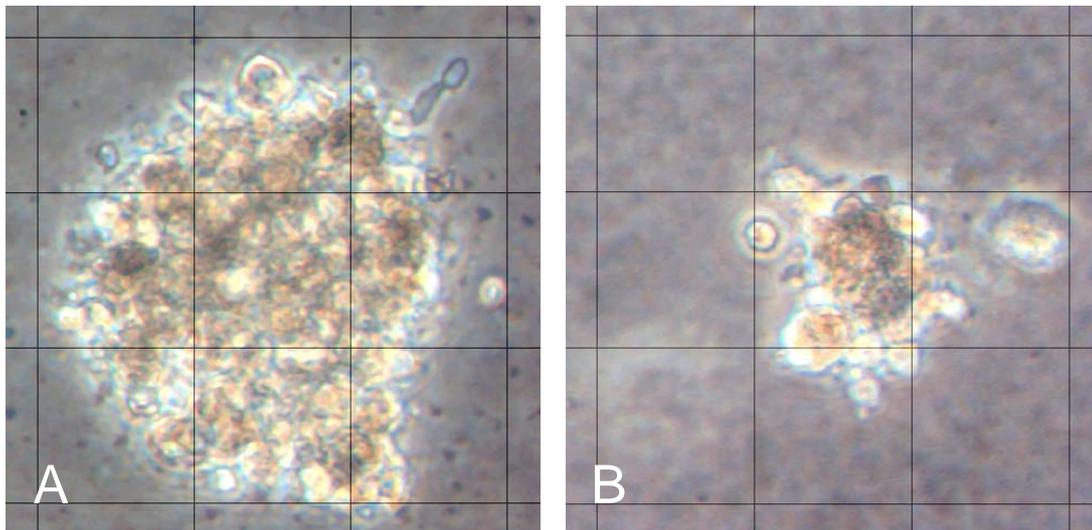


Abbildung 17.1: Wachstum der Zellen im Soft-Agar

Die Abbildung zeigt exemplarisch klonal gewachsene Zellen der Zelllinie MIP-101 im Soft-Agar-Assay. Dargestellt sind repräsentative Zellklone für (A) leervektortransfizierte Kontrollzellen und (B) frataxinüberexprimierende Zellen am Tag 16 nach der Einsaat der Zellen.

Objektiv: 20x (Ph); dargestellte Rasterweite 50 μm .

Alle verwendeten Zelllinien waren in der Lage, im Soft-Agar Kolonien zu bilden (Beispiel: Abbildung 17.1). Eine Auswertung der erhaltenen Zellklone erfolgte auf qualitativer und quantitativer Ebene. In den Kulturschalen der MIP-101-Kontrollzellen waren insgesamt etwa 100 Klone mit einem Durchmesser von mindestens 80 μm gewachsen. 50 Klone davon hatten einen Durchmesser von 90 μm oder mehr. In den

Kulturschalen der frataxinüberexprimierenden Zellen wurden insgesamt weniger als 50 klonartige Zellansammlungen gezählt. Nur 15 dieser Zellhaufen wurden als Zellklone eingestuft. Dementsprechend werden für die MIP-101-Zellen die jeweils 15 größten Klone miteinander verglichen (Abbildung 17.2).

Die DLD-2-Zellen sind im Soft-Agar noch effizienter gewachsen als die MIP-101-Zellen. Auffällig war, dass auch hier die frataxinüberexprimierenden Zellen weniger effizient Klone gebildet hatten. Von beiden Populationen wurden jeweils die 100 größten Klone in die Auswertung einbezogen (Abbildung 17.2).

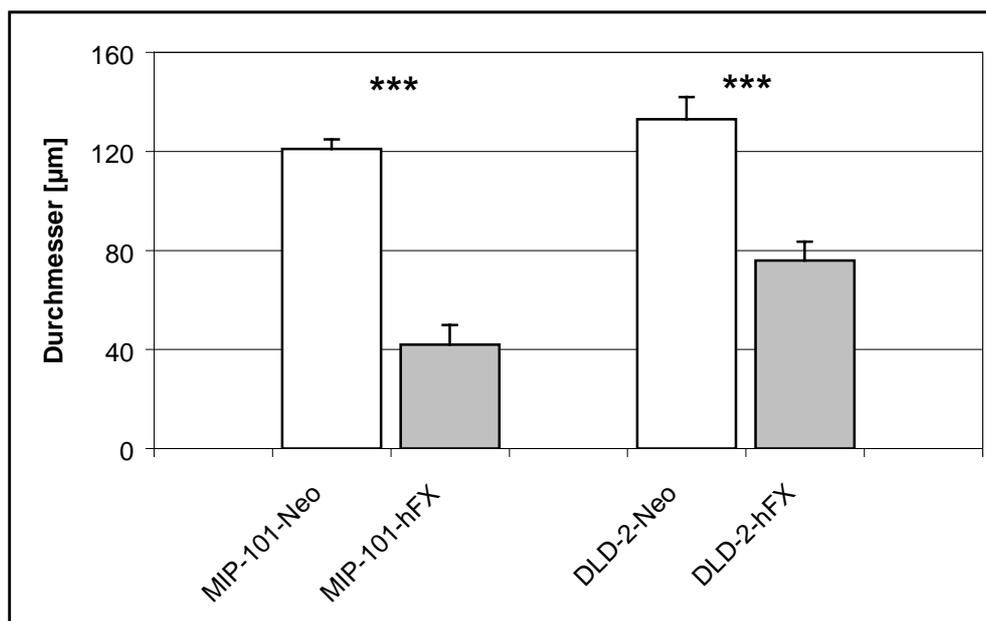


Abbildung 17.2: Vergleich der Zellklondurchmesser im Soft-Agar-Assay

Frataxinüberexprimierende Kolonkarzinomzellen bilden im Soft-Agar-Assay kleinere Klone als leervektortransfizierte Kontrollzellen. Details im Text.

(Werte nicht normalverteilt; dargestellt sind Mediane + halber Quartilsabstand; U-Test)

MIP-101: 121 ± 3,8 µm (Neo); 42 ± 8,0 µm (hFX); n = 15; p < 0,001

DLD-2: 133 ± 9,0 µm (Neo); 76 ± 7,5 µm (hFX); n = 100; p < 0,001

Der Soft-Agar-Assay zeigt eindrücklich, dass durch eine Frataxinüberexpression die Tumorigenität der Zellen erheblich abnimmt. Es sind bei beiden Kolonkarzinomzelllinien weniger und kleinere Klone aus frataxinüberexprimierenden Zellen entstanden als dies bei Kontrollzellen zu beobachten ist.

3.8.2 Nacktmaus-Assay

Die aussagekräftigste Methode zur Beurteilung der Tumorigenität von Zelllinien beruht auf der subkutanen Injektion von Zellen in Nacktmäuse. Maligne transformierte Zellen führen im subkutanen Gewebe zur Bildung von Tumoren.

Nachdem die Zellen stark vermindertes Wachstum im Soft-Agar-Assay gezeigt hatten, wurde das Zellverhalten in diesem Modell untersucht. Einer Nacktmaus wurden dafür auf einer Seite eine Million frataxinüberexprimierende Zellen und gegenüberliegend eine Million Kontrollzellen injiziert.



Abbildung 18.1: Wachstum der Kolonkarzinomzellen in Nacktmäusen.

Die Abbildung zeigt exemplarisch die unterschiedliche Größe von Tumoren verschiedener Herkunft in einer Nacktmaus. Dargestellt ist der abdominale Teil einer repräsentativen Nacktmaus (A), welcher 8 Wochen zuvor 1 Mio. leervektor-transfizierte Kontrollzellen linksseitig und 1 Mio. frataxinüberexprimierende Zellen rechtsseitig (beides MIP-101) subkutan injiziert wurden. (B) Tumoren *in situ*; die Haut des Tieres aus Abbildung A wurde abpräpariert. (C) Tumoren freipräpariert.

Tumoren, die von Kontrollzellen gebildet werden, sind früher zu erkennen und werden i.d.R. größer als die Tumoren aus frataxinüberexprimierenden Zellen (Abbildungen 18.1 und 18.2). Damit kann auch in diesen Experimenten eindeutig die frataxinbedingte Verminderung der Tumorigenität von Kolonkarzinomzellen gezeigt werden.

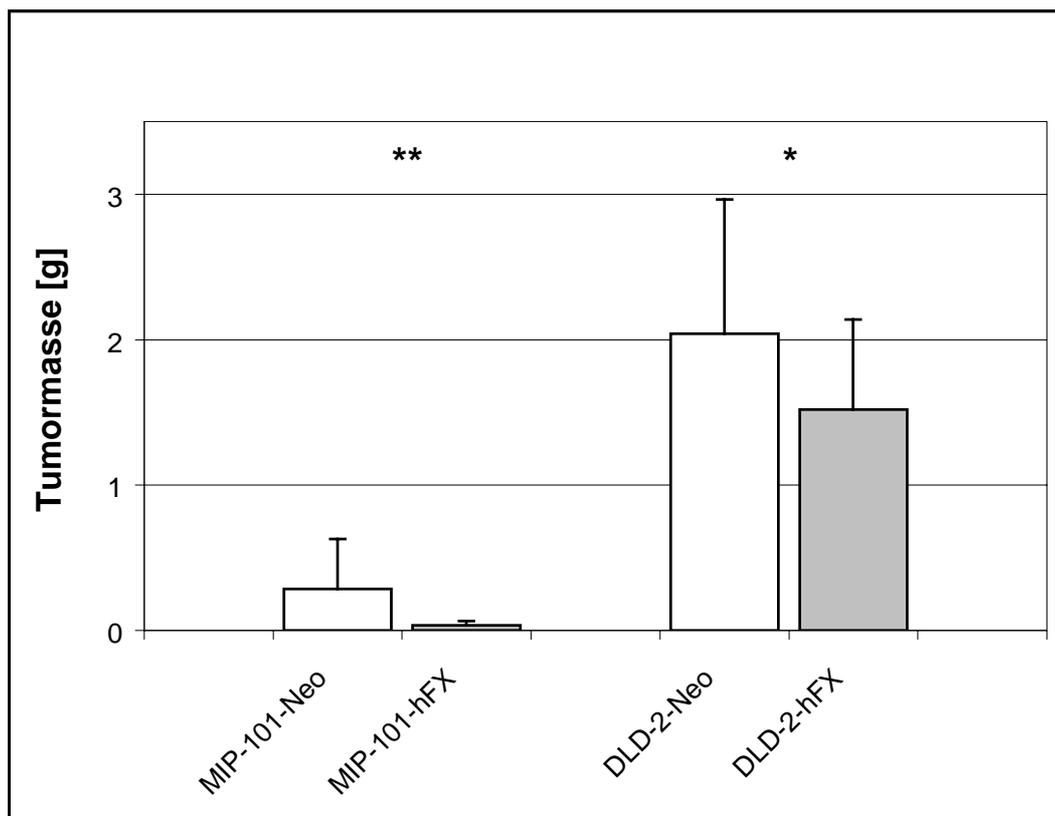


Abbildung 18.2: Veränderte Tumorigenität der frataxinüberexprimierenden Zellen.

Je einem Tier wurden auf einer Seite 1 Million frataxinüberexprimierende Zellen und auf der gegenüberliegenden Seite entsprechend Kontrollzellen subkutan injiziert. Nach Tötung der Tiere wurden die Tumoren freipräpariert und deren Masse bestimmt. Erkennbar ist, dass die Tumoren durch Frataxinüberexpression eine geringere Masse aufweisen.

(Werte nicht normalverteilt; dargestellt sind Mediane + halber Quartilsabstand; Wilcoxon-Test)

MIP-101: $285 \pm 343,5$ mg (Neo); $34 \pm 30,0$ mg (hFX); $n = 11$; $p < 0,01$

DLD-2: $2,04 \pm 0,925$ mg (Neo); $1,52 \pm 0,620$ mg (hFX); $n = 5$; $p < 0,05$

4 Diskussion

Die Friedreich-Ataxie ist eine Erkrankung, welche auf die Reduktion der Frataxin-Proteinexpression zurückzuführen ist. Das Fehlen von Frataxin wird mit mehreren pathophysiologischen Defekten in Verbindung gebracht. Wichtige Funktionen übernimmt das Protein wahrscheinlich bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen und der Regulation des zellulären Eisenhaushaltes. Oxidativer Stress und verminderte oxidative Phosphorylierung sind die Folgen eines Frataxinmangels.

Frataxin-Knock-out-Mausmodelle zeigen, dass ein kompletter Verlust des Proteins schon während der frühen Embryonalentwicklung letal wirkt (Cossée, 2000). Durch die gewebsspezifische Ausschaltung des Frataxin-Gens in Neuronen, Herzmuskulatur und quergestreifter Muskulatur werden unter anderem die Aktivitäten der Aconitase und der Eisen-Schwefel-Proteine der Atmungskette vermindert (Puccio, 2001). Die Ausschaltung von Frataxin in den beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse führt unter anderem zu erhöhter Apoptoserate, verminderter Proliferationsrate und zu oxidativem Stress (Ristow, 2003).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob das kernkodierte Protein Frataxin für den mitochondrialen Stoffwechsel essenziell ist. Dazu wurde Mäusen leberspezifisch das Exon 4 des Frataxin-Gens ausgeknockt. Die hohe Effektivität des Knock-outs wurde auf transkriptioneller und translationeller Ebene nachgewiesen. Die Genotypenverteilung der Würfe entsprach der erwarteten Mendelschen Häufigkeit. Die leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Tiere hatten gegenüber allen anderen Genotypen eine stark verminderte Lebenserwartung. Nach etwa 30 Wochen war die Hälfte dieser Tiere gestorben. Die Leber vieler dieser Tiere zeigte an der Oberfläche hyperplastische Auswüchse. Histologische Untersuchungen des Lebergewebes ließen massive Schädigungen der Leberfeinstruktur erkennen. Besonders auffällig waren die erhöhten Proliferations- und Apoptoseraten der Hepatozyten, starke Ovalzellproliferation, sowie zahlreiche präneoplastische Herde.

Als Konsequenz dieser Beobachtungen wurde für die hier vorliegende Arbeit eine entsprechende Arbeitshypothese aufgestellt, die davon ausgeht, dass auch diese Tiere

– wie es schon in anderen experimentellen Systemen mit Frataxin-Depletion beobachtet wurde – einen verminderten Energiestoffwechsel im frataxindefizienten Organ aufweisen. Dieser könnte ursächlich an der Entstehung der beobachteten neoplastischen Veränderungen beteiligt sein. Obwohl Otto Warburg bereits 1924 einen Zusammenhang zwischen verminderter Energiegewinnung und der Entstehung von Krebserkrankungen herstellte, fehlt ein experimenteller Nachweis *in vivo*.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der frataxinbedingten Veränderung des Energiestoffwechsels und der Entstehung der Lebertumoren zu finden. In einem weiteren experimentellen System galt es, Karzinomzelllinien mit Frataxinüberexpression bezüglich des Energiemetabolismus und der Tumorigenität zu charakterisieren und auch hier Indizien dafür zu finden, dass ein Zusammenhang zwischen diesen besteht. Für die Bearbeitung dieser komplementären Aufgabenstellung wurden Teilfragestellungen formuliert, die es durch entsprechendes experimentelles Vorgehen zu beantworten galt:

- Ist der zelluläre Energiestoffwechsel in den frataxindefizienten Lebern reduziert?
- Können der Leberentartung zugrunde liegende Mechanismen gefunden werden?
- Kann der Energiestoffwechsel von Kolonkarzinomzellen *in vitro* durch Überexpression von Frataxin erhöht werden?
- Wird die Tumorigenität von Kolonkarzinomzellen durch Frataxinüberexpression vermindert?

Besonderes Augenmerk während der fortlaufenden experimentellen Planung wurde auf die Differenzierung gefundener Mechanismen nach möglichen Ursachen gelegt. Es galt darauf zu achten, frataxinbedingte Veränderungen auf einen ursprünglich veränderten oxidativen Stress oder veränderten Energiestoffwechsel zurückzuführen.

Frataxinmangel führt zu vermindertem zellulären Energiestoffwechsel

Hinweise auf eine Verminderung des zellulären Energiestoffwechsels durch Frataxinmangel lieferten andere, zuvor publizierte experimentelle Systeme. Gezeigt wurden verminderte Aktivitäten der Eisen-Schwefel-Proteine Aconitase bzw. der Atmungskettenkomplexe I, II und III, sowie ein verringerter ATP-Gehalt (Rötig, 1997; Lodi, 1999; Vorgerd, 2000; Puccio, 2001; Lodi, 2001).

Der Nachweis einer Reduktion des Energiestoffwechsels in den vorliegenden frataxindefizienten Lebern sollte auf mehreren Ebenen erfolgen, um später einen kausalen Zusammenhang zwischen diesem und der Frataxindefizienz zu ermöglichen.

Die Aconitase-Aktivität wurde durch das Fehlen von Frataxin um 76 % reduziert. Der Vergleich der Aconitaseaktivitäten der Niere als Kontrollorgan ergab keinen signifikanten Unterschied. Eine Verminderung der Aconitase-Aktivität in gleicher Größenordnung zeigten sowohl die Knock-out-Gewebe der neuron- und skelettmuskel-/herzmuskelspezifischen Frataxin-Knock-out-Mausmodelle (Puccio, 2001), als auch Herzmuskelgewebe von FRDA-Patienten (Rötig, 1997). Mögliche Ursachen verringerter Aconitaseaktivität sind verminderte Eisen-Schwefel-Protein-Synthese (Chen, 2002) oder vermehrter oxidativer Stress (Rötig, 1997; Cairo, 2002; Bulteau, 2004). Die Aconitase als Enzym des Zitratzyklus ist mit an der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die in den Mitochondrien ablaufende oxidative Phosphorylierung beteiligt. Ihre reduzierte Aktivität deutet eine verminderte oxidative Phosphorylierungsrate an (Gu, 2000).

Neben Reduktionsäquivalenten erfordert die oxidative Phosphorylierung Sauerstoff zur ATP-Gewinnung. Entsprechend liefert die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs eines Gewebes ein direktes Maß für die oxidative Phosphorylierungsrate und parallel dazu der ATP-Gehalt des Gewebes eine Aussage über seinen energetischen Zustand.

Die gemessene Reduktion des Sauerstoffverbrauchs um ca. 40 % und der um 84 % verminderte ATP-Gehalt im Knock-out-Gewebe bestätigen also einen verminderten Energiestoffwechsel. Verminderte ATP-Produktion im Muskel wurde *in vivo* bei FRDA-Patienten festgestellt (Lodi, 1999; Vorgerd, 2000). Für den veränderten Sauerstoffverbrauch können aus der Literatur keine Vergleichsdaten herangezogen werden.

Frataxinmangel verursacht eine Aktivierung des Apoptosesignalweges

Bei den histologischen Untersuchungen des neoplastischen Lebergewebes fiel ein erhöhter Zell-*turnover*, d.h. erhöhte Proliferations- und Apoptoseraten der Hepatozyten, auf. Fraglich war, ob diese Veränderungen eine unmittelbare Auswirkung der Frataxindefizienz sind. Mit immunologischen Nachweistechiken wurde nun in Geweben junger Knock-out-Tiere (4-8 Wochen) nach Proteinen gesucht, welche bekanntermaßen an der Regulation von Zellproliferation oder Apoptose beteiligt sind, und eine veränderte Expression aufweisen.

Im Immunoblot war keine unterschiedliche Regulation der untersuchten zellzyklusassoziierten Proteine zwischen Knock-out-Tieren und Kontrolltieren zu erkennen (nicht dargestellt). Als Ursache dafür wird angenommen, dass die zuvor beschriebene vermehrte Proliferation erst in einem höheren Alter der Knock-out-Tiere, d.h. bei fortgeschrittener Leberveränderung auftritt. Erhöhte Proliferationsraten werden regelmäßig in Verbindung mit Lebertumoren beschrieben und gelten als Motor der Promotionsphase (Eferl, 2003; Übersichtsartikel: Kountouras, 2003).

In Verbindung mit Frataxindefizienz wurden sowohl im Hefemodell (Karthikeyan, 2002), in FRDA-Fibroblasten (Willers, 1991; Willers, 1993) als auch in einem Mausmodell (Ristow, 2003) verminderte Proliferationsraten beschrieben. Ein direkter Zusammenhang zwischen frataxinbedingter Änderung des Energiestoffwechsels, veränderter Proliferationsrate und nachfolgend veränderter Tumorigenität scheint demzufolge nicht vorzuliegen.

Eine Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade lässt sich durch erhebliche Mengen an Cytochrom C im Zytosol (Liu, 1996; Yang, 1996; Kluck, 1997) und vermehrte Expression des proapoptotischen Proteins Bax (Yin, 1997) belegen. In gesunden Zellen enthält das Zytosol inaktives Bax, welches durch apoptotische Signale zur Konformationsänderung und Translokation veranlasst wird (Volter, 1997; Yamaguchi, 2001). Die Kontrolle der mitochondrialen Fraktion des Lebergewebes zeigte, dass Bax nur im isolierten Protein der Knock-out-Tiere nachweisbar ist (nicht dargestellt). Das in seiner Konformation veränderte Bax oligomerisiert an der mitochondrialen Außenmembran und führt damit zur Cytochrom-C-Freisetzung (Hsu, 1997; Crompton, 1999; Martinou, 2001).

Das zytosolisch nachgewiesene Cytochrom C lässt eine Aktivierung der Effektor-Caspase 3 vermuten. Entsprechend erschien der Befund, dass sich mittels Immunoblot keine erhöhte Aktivierung der Caspase 3 nachweisen ließ, zunächst unerwartet. Aktivierte Effektor-Caspasen sind ein Zeichen für den unwiderruflichen Untergang der Zellen. Allerdings schützen zahlreiche antiapoptotische Signale die Zellen vor diesem endgültigen Schritt in den Zelltod. Einen solchen Schutz bietet z.B. die vermehrte Expression von HSP-25, wie sie weiter unten im Text beschrieben wird. Es gibt darüber hinaus Arbeiten die zeigen, dass unterhalb einer kritischen ATP-Konzentration die Apoptosombildung ausbleibt (Purring, 1999) und der unphysiologische Zelltod eintritt (Leist, 1997; Stridh, 1999).

Das Gesamtbild der Beobachtungen suggeriert, dass schon in sehr jungen Tieren eine vermehrte Aktivierung der caspasevermittelten Apoptose-Signalkaskade vorliegt, welche die erhöhte Apoptoserate verursacht. Wahrscheinlich verhindert der zelluläre ATP-Mangel das Einsetzen massiver Apoptoseereignisse in der Leber der Knock-out-Tiere.

Die dem Zelltod zugrunde liegenden komplizierten Regulationsmechanismen sind immer noch Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen. Aufgrund der vorliegenden Befunde erscheint die leberspezifische Frataxin-Knock-out-Maus als ein lohnendes Modell zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs von Zelltodereignissen unter Bedingungen chronischen ATP-Mangels.

Erhöhte Apoptoseraten sind ein oft beschriebenes Merkmal von Frataxindefizienz. Sie wurden für embryonale Frataxin-Knock-out-Mäuse (Cossée, 2000), frataxindefiziente Embryozellen (Santos, 2001) und beta-Zellen mit Frataxin-Knock-out im Mausmodell (Ristow, 2003) beschrieben. In FRDA-Lymphozyten sind zahlreiche Transkripte, welche in die Apoptosemaschinerie eingebunden sind, hochreguliert (Tan, 2003). FRDA-Fibroblasten zeigen außerdem eine erhöhte Apoptoseempfindlichkeit (Wong, 1999; Pianese, 2002). Häufig werden als Ursachen für die erhöhte Apoptoserate vermehrter oxidativer Stress und erhöhter Eisenspiegel in den Mitochondrien angenommen. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch zeitweise zelluläre Energiedepletion in einer Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade resultiert (Izumov, 2004). Sowohl vermehrter oxidativer Stress als auch verminderte oxidative Phosphorylierung können Apoptose auslösen (Cadenas, 2000; Kokoszka, 2001). Umgekehrt verursachen apoptotische Vorgänge die Verminderung der oxidativen Phosphorylierung und vermehrten

oxidativen Stress. In der Leber werden erhöhte Apoptoseraten i.d.R. in der Tumorinitiationsphase gefunden, während neoplastisches Gewebe durch verminderte Apoptoseraten gekennzeichnet ist (Kountouras, 2003).

Die enge Verflechtung apoptotischer Ereignisse mit Frataxindefizienz einerseits und oxidativem Stress, energetischem Zustand und Tumorigenität der Zellen andererseits, bietet Grund zu der Annahme, dass die Regulation apoptotischer Vorgänge einen wesentlichen Bestandteil der gesuchten Ereigniskaskade darstellt (Abbildung 19).

Frataxinmangel verursacht eine Modulation stressassoziierter Proteine.

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) regulieren Prozesse, die in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen. Es werden drei Hauptfamilien unterschieden: extrazellulär regulierte Kinasen (ERK), c-Jun-N-terminale Kinasen (SAPK/JNK) und die p38-MAPK. Ihre Aktivierung erfolgt u.a. durch oxidativen Stress. SAPK/JNK und p38-MAPK werden darüber hinaus durch eine Vielzahl weiterer Stressoren aktiviert (Übersichtsartikel: Martindale, 2002). In stimulierten FRDA-Fibroblasten konnte eine Aktivierung der SAPK/JNK-Signalkaskade nachgewiesen werden (Pianese, 2002).

Immunoblots sollten zeigen, welche Stressantworten in den Knock-out-Lebern aktiviert vorlagen. Überraschenderweise zeigte sich keine Regulation des SAPK/JNK- sowie des ERK1/2-Signalwegs. Völlig unerwartet war jedoch die Beobachtung, dass die p38-MAPK weniger phosphoryliert vorliegt.

Die p38-MAPK-Kaskade reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Entzündungsantworten, Zelldifferenzierung oder Apoptose. So wurde eine Beteiligung von aktivierter p38-MAPK beispielsweise bei der Entwicklung der Haut (Zhong, 2001) und beim Wachstum und der Differenzierung der Hepatozyten (Awad, 2000) beschrieben.

Mendelson et al. beobachteten bei Mäusen nach Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄), dass die konstitutiv aktive Form der p38-MAPK für eine gewisse Zeit depletiert wird (Mendelson, 1996). Die hepatotoxische Substanz CCl₄ wird in der Leber metabolisch aktiviert und verursacht in den zentrilobulären Hepatozyten von Nagetieren apoptotische und nekrotische Veränderungen. Ort der toxischen Primärläsion ist das endoplasmatische Retikulum. Als primärer Schädigungsmechanismus wird eine Lipidperoxidation angesehen. Nachfolgend kommt es u.a. zu einer Störung der Mitochondrienfunktion mit Abfall des intrazellulären ATP-Gehalts. Es wird vermutet,

dass die chronische Leberschädigung, die experimentell im Langzeitversuch mit CCl₄ insbesondere an Mäusen beobachtet wird, im kausalen Zusammenhang mit der Entstehung von Lebertumoren angesehen werden muss (Marquardt, 2004).

Aktiviert wird die p38-MAPK-Signalkaskade unter anderem durch oxidativen Stress, woraus wiederum eine Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren resultiert (Kulisz, 2002; Brancho, 2003). Infolge dieser werden Apoptose und Zellzyklusarrest beobachtet. Veränderungen im p38-MAPK-Signalweg werden mit der Tumorigenese assoziiert (Bulavin, 2002). Es wird vermutet, dass der p38-MAPK-Signalweg in ein tumor-suppressives Signalnetzwerk eingebunden ist (Übersichtsartikel: Yee, 2004). Vor diesem Hintergrund scheint die Annahme zulässig, dass im vorliegenden Tiermodell die gezeigte zelluläre ATP-Reduktion zu einer verminderten Aktivierung der p38-MAPK führt und damit eine tumorsuppressive Barriere verloren geht.

Eine weitere zelluläre Antwort auf verschiedene Stressoren ist die vermehrte Expression so genannter Hitzeschockproteine (HSP). Als Reaktion auf vermehrten oxidativen Stress kann u.a. eine stärkere Präsenz von HSP-27 und HSP-70 beobachtet werden (Übersichtsartikel: Garrido, 2003). Beide sind in zahlreichen Geweben konstitutiv exprimiert und gelten als universelle und stark induzierbare Chaperone. In Erwartung einer vermehrten Expression von HSP-70 und HSP-25, dem HSP-27-Homologen in der Maus (Gaestel, 1993), wurden Immunoblots durchgeführt. Während HSP-25 tatsächlich vermehrt exprimiert wird, ist HSP-70 nur noch schwach nachweisbar.

Diese überraschende, ambivalente Regulation ist schwer interpretierbar, liefert jedoch einige interessante Anhaltspunkte, welche Spekulationen über vorliegende Regulationsmechanismen ermöglichen.

HSP sind hochkonservierte Proteine, welche in verschiedene Familien eingeteilt werden. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal ist, dass die höhermolekularen HSP (HSP-70) ATP-abhängig sind, während die kleinen HSP (HSP-27) ATP-unabhängig agieren (Jakob, 1993). Kommt es zu einer stressbedingten ATP-Depletion, so ist die vorrangige Aufgabe der kleinen, ATP-unabhängigen HSP, das Überleben der Zellen zu ermöglichen, bis der zelluläre ATP-Gehalt stabilisiert ist. HSP-27 vermittelt dabei unter anderem die Stabilisierung des Zytoskeletts, verhindert die Proteinaggregation defekter Proteine und blockiert zahlreiche proapoptotische Signalwege (Garrido, 1999; Bruey, 2000).

In Stresssituationen ist eine transient erhöhte Expression von HSP-27 ein zellprotektiver Mechanismus. Der im vorliegenden Modell vorliegende dauerhafte ATP-Mangel lässt aber auf eine dauerhaft erhöhte Expression des Proteins schließen. Derartige Überexpression wurde für verschiedene Krebszellen demonstriert (Oesterreich, 1993; Love, 1994; Ehrenfried, 1995; Langdon, 1995; Preville, 1999; Cornford, 2000). HSP-27 erhöht in diesen Zellen die Tumorigenität (Übersichtsartikel: Concannon, 2003).

HSP-70 hat ähnliche zytoprotektive Aufgaben wie HSP-27, ist jedoch ATP-abhängig und greift meist an anderer Stelle in die Signalkaskaden ein. So kann HSP-70 beispielsweise noch nach der Aktivierung der Effektor-Caspase 3 eine Apoptose verhindern und ist auch an der Inhibition caspase-unabhängiger Apoptosewege beteiligt. Die verminderte Expression von HSP-70 im vorliegenden Knock-out-Modell könnte demnach eine mögliche caspaseunabhängige Apoptose ermöglichen und die Diskrepanz zwischen beobachteter vermehrter Apoptoserate und fehlender Effektor-Caspaseaktivität erklären (Gurbuxani, 2003).

Der Leberentartung im leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Modell liegt ein Netzwerk stressregulierter Mechanismen zugrunde

Frataxinmangel verursacht im vorliegenden Mausmodell neoplastische Veränderungen der Leber. In der Eingangshypothese wurden zwei mögliche Entstehungsmechanismen formuliert. Verminderter zellulärer Energiestoffwechsel wurde als Ursache der Krebsentstehung schon von Otto Warburg postuliert. Vermehrter oxidativer Stress ist eine bekannte Ursache für die Entstehung von Lebertumoren. Da sich in Zusammenschau der vorliegenden Daten keiner der vorliegenden möglichen Mechanismen beweisen oder ausschließen lässt, wird eher ein Zusammenspiel beider vermutet.

Der bei Frataxinmangel mehrfach nachgewiesene oxidative Stress könnte Ursache zahlreicher beobachteter Phänomene, so z.B. der verminderten Aconitase-Aktivität, folglich des verringerten Energiegehalts der Zellen und des später erhöhten Zellturnovers, sein.

Allerdings gibt es für das vorliegende Knock-out-Modell eine Reihe von Argumenten gegen eine wesentliche Rolle des oxidativen Stresses *per se* bei der Entwicklung der neoplastischen Veränderungen:

- Obwohl eine Verdopplung des oxidierten Glutathiongehalts (GSSG) im Gewebe nachweisbar ist, war der Level des reduzierten Glutathions (GSH) nicht vermindert, was für eine untergeordnete Rolle des oxidativen Stresses spricht (unveröffentlichte Daten, PD Dr. M. Ristow).
- Die HSP-70-Expression wird durch vermehrten oxidativen Stress erhöht. Die vorliegenden Daten zeigen aber eine geringere Expression.
- Oxidativer Stress im Gewebe verursacht die Aktivierung von Stress-Signalkaskaden wie der SAPK/JNK-Kaskade und der p38-MAPK-Kaskade. Eine Hochregulation der SAPK/JNK-Kaskade war nicht nachweisbar, während die p38-MAPK weniger phosphoryliert als in Kontrollgeweben vorlag.

Frataxinüberexprimierende Kolonkarzinomzelllinien zeigen verminderte Wachstumsraten

Die Untersuchungen des Knock-out-Modells belegen eindrucksvoll eine durch Frataxinmangel erhöhte Krebshäufigkeit. Ein weiterer experimenteller Ansatz sollte zeigen, dass durch eine Frataxinüberexpression eine Abnahme der Tumorigenität erfolgt.

Zwei humane Kolonkarzinomzelllinien wurden so transfiziert, dass eine erhöhte Frataxinexpression nachzuweisen war. Eine Ermittlung der Verdopplungszeit zeigt, dass diese Populationen signifikant langsamer wachsen als die Populationen leervektortransfizierter Kontrollzellen. Langsameres Zellwachstum ist bei erhöhtem extrazellulären ATP-Gehalt in Zellkulturen zu beobachten (Katayama, 1998; Maaser, 2002) und kann *in vitro* auch durch Energierestriktion verursacht werden. Beobachtet werden dabei erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und erhöhte Expression stressaktivierter Proteine (de Cabo, 2003).

Der Energiestoffwechsel frataxinüberexprimierender Kolonkarzinomzellen ist erhöht

Entsprechend den Experimenten im Knock-out-Modell wurden Aconitaseaktivität, Sauerstoffverbrauch und ATP-Gehalt sowie darüber hinaus das mitochondriale Membranpotenzial der MIP-101-Zellen bestimmt. Eine frataxinbedingte Steigerung des Energiestoffwechsels konnte auf allen genannten Ebenen gezeigt werden. Solche frataxinbedingte Erhöhung des Energiestoffwechsels wurde bereits für eine nicht

transformierte Fibroblastenzelllinie gezeigt (Ristow, 2000). Mit den frataxinüberexprimierenden Kolonkarzinomzellen steht damit ein *in-vitro*-Modell zur Verfügung, das Untersuchungen zum Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Tumorigenität der Zellen zulässt.

Frataxinüberexprimierende Kolonkarzinomzellen verfügen über gesteigerte p38-MAPK-Aktivität

Die Untersuchung der Frataxin-Knock-out-Lebern zeigte eindeutige Veränderungen sowohl in der p38-MAPK-Aktivität als auch in der Expression von HSP-25 und HSP-70. Die mittels Immunoblot untersuchte Expression von HSP-27 und HSP-70 in den MIP-101-Zellen war nicht verändert (nicht dargestellt). Nachweisbar war eine erhöhte Phosphorylierung der p38-MAPK. Diese im Vergleich zu den Knock-out-Tieren inverse Regulation der p38-MAPK ermöglicht die Herstellung eines direkten Zusammenhanges zur Frataxinexpression: Die Phosphorylierung der p38-MAPK erscheint dem Frataxinlevel proportional. Da bisher Frataxinmangel mit erhöhtem oxidativen Stress und dieser in unabhängigen Experimenten im Zusammenhang mit vermehrter Phosphorylierung der p38-MAPK beobachtet wurden, verdient der hier hergestellte Zusammenhang eine besondere Beachtung.

Die frataxinbedingte Aktivierung der p38-MAPK stellt daher einen Mechanismus dar, der im gesuchten Zusammenhang zwischen Frataxinexpression, oxidativer Phosphorylierung, oxidativem Stress und veränderter Krebsentstehung stehen könnte (siehe auch Seite 74, Absatz 2).

Frataxinüberexpression erweist sich als tumorsuppressiv

Die verwendeten Kolonkarzinomzelllinien MIP-101 und DLD-2 wachsen sowohl im Softagar als auch im Nacktmausmodell. Diese Nachweismethoden für die Tumorigenität von Zellen (Freedman, 1974; Putman, 1977) wurden hier angewandt, um einen umgekehrten Effekt – die Reduktion einer vorhandenen Tumorigenität – zu untersuchen. Sehr eindrucksvoll zeigte sich, dass frataxinüberexprimierende Kolonkarzinomzelllinien im Soft-Agar-Assay einen geringeren Kolonidurchmesser und im Nacktmausmodell eine geringere Tumorigenität aufwiesen als die leervektortransfizierte Kontrollzellen.

Untransformierte epitheliale Zellen sterben, wenn sie den Kontakt zu einer extrazellulären Matrix verlieren. Gegen diesen auf Apoptose basierenden Effekt, welcher Anoikis genannt wird (Frisch, 1994), sind Karzinomzellen in der Regel resistent. In intestinalen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass Anoikis unter anderem eine Aktivierung der p38-MAPK zu Grunde liegt (Rosen, 2002). Da im vorliegenden Zellmodell ebenfalls eine vermehrte Aktivierung der p38-MAPK nachweisbar ist, lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung der p38-MAPK und der verminderten Tumorigenität der Zellen vermuten.

Das Zusammenspiel von oxidativem Stress und oxidativer Phosphorylierung ermöglicht die Herleitung verschiedener Hypothesen der frataxinbedingt veränderten Tumorigenität

Wie auch im Knock-out-Modell kann im beschriebenen Zellmodell eine Mitwirkung des oxidativen Stresses an der veränderten Tumorigenität nicht ausgeschlossen werden. Schon 1956 vermutete Harman, dass ROS in Mitochondrien generiert werden und der entstehende oxidative Stress verantwortlich für Alterung und Krankheiten wie Krebs ist (Harman, 1956). In der darauffolgenden Zeit konnte eine Vielzahl der vermuteten Zusammenhänge aufgeklärt werden. Die während der oxidativen Phosphorylierung mitochondrial gebildeten ROS schädigen zahlreiche zelluläre Strukturen und führen zu Mutationen in der nukleären und mitochondrialen DNA (Hartman, 2004; Beckman, 1998), deren Folge Krebserkrankungen sind (Penta, 2001).

Vermehrte Frataxinexpression führt zu vermehrter oxidativer Phosphorylierung. Diese sollte entsprechend den bisherigen Erkenntnissen zu einer vermehrten Bildung von ROS führen. Tatsächlich könnte die vermehrte Phosphorylierung der p38-MAPK als ein Indikator für vermehrten oxidativen Stress herangezogen werden. Zunächst bestätigend wirkt weiterhin die Beobachtung, dass frataxinüberexprimierende Zellen langsamer wachsen. Langsameres Zellwachstum ist eine oft beobachtete Reaktion der Zellen auf schädigende Einflüsse (Tokino, 2000; Ryan, 2001). Die so gewonnene Zeit wird von den Zellen zur Reparatur entstandener Schäden oder zur Einleitung der Apoptose genutzt. Eine Folge vermehrten oxidativen Stresses wäre jedoch paradoxerweise eine verminderte oxidative Phosphorylierung zu erwarten, wie es in einigen Mausmodellen beobachtet werden kann (Williams, 1998; Esposito, 2000). Untersuchungen an Hefen,

welche einen Zusammenhang zwischen Energierestriktion und Alterung darlegen, zeigen, dass oxidativer Stress nicht zwangsläufig die Folge vermehrter Respiration ist (Lin, 2002).

Die verminderte Tumorigenität im Zellmodell könnte durch eine p-p38-MAPK-vermittelte Anoikis-Sensibilität erklärt werden. So bilden Endothelzellen, welchen die extrazelluläre Matrix vorenthalten wird, vermehrt ROS. Diese sind für den Anoikis genannten Zelltod verantwortlich (Li, 1999).

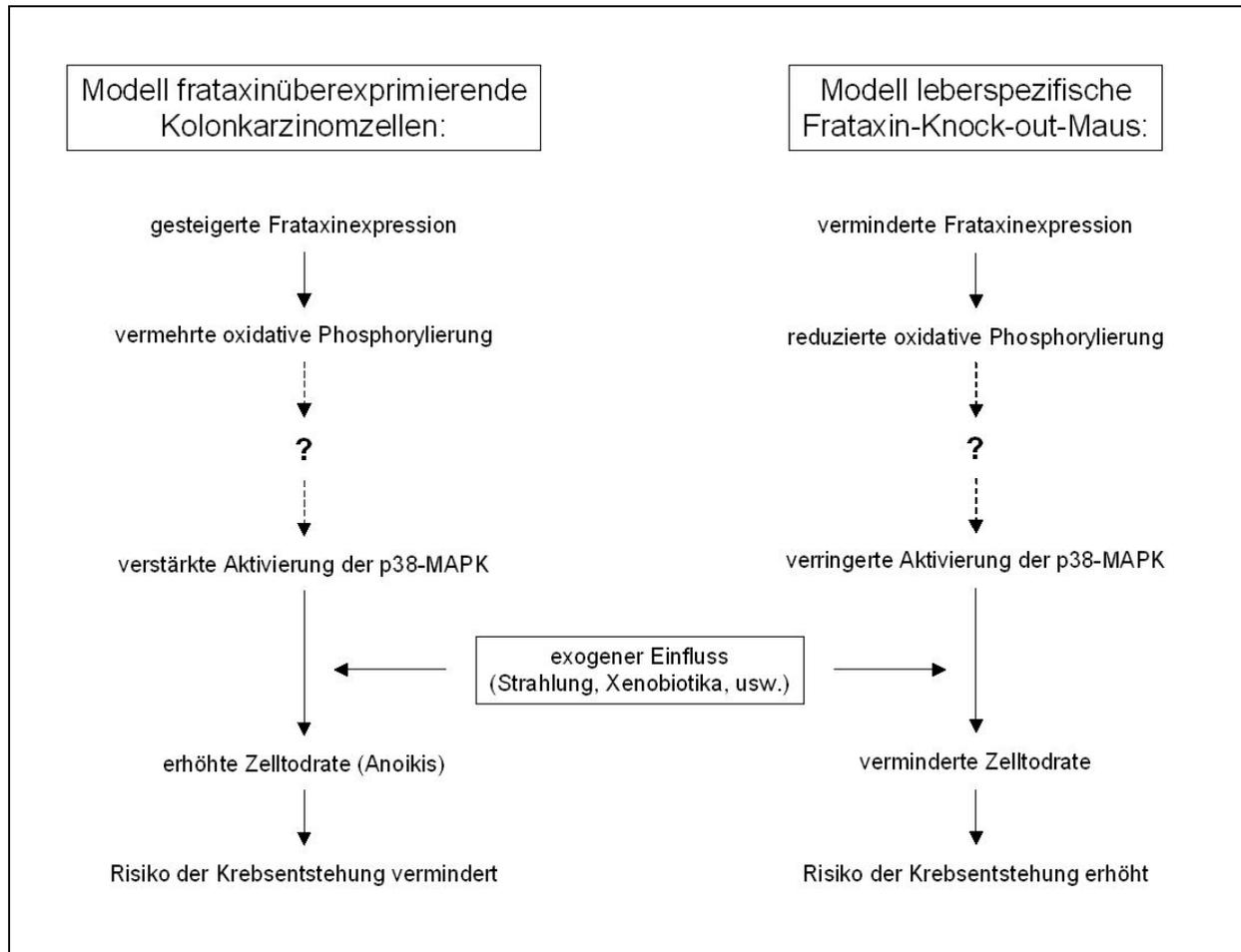


Abbildung 19: Modell der frataxinvermittelt veränderten Tumorigenität

Für beide verwendeten Modelle ist dargestellt, wie durch eine veränderte Frataxinexpression der Energiestoffwechsel verändert wird und als Folge daraus das Risiko einer Krebsentstehung verändert werden könnte. Details im Text.

Es ergibt sich ein Gesamtbild, in welchem der Zusammenhang zwischen frataxinbedingt veränderter oxidativer Phosphorylierung und veränderter Krebsentstehung durch zwei Meilensteine konkretisieren lässt (Abbildung 19). So konnte in beiden Modellen ein veränderter Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK in Folge veränderter oxidativer

Phosphorylierung gezeigt werden. Eine entsprechende Veränderung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber exogenen Einflüssen (z.B. Strahlung, Xenobiotika, usw.) führt zu veränderten Apoptoseraten und letztendlich zur Veränderung der Tumorigenität.

Der Zusammenhang zwischen veränderter oxidativer Phosphorylierung und veränderter Aktivierung der p38-MAPK kann hier nur durch Hypothesen hergestellt werden und ist Ziel nachfolgender Untersuchungen. Dabei ist zum einen der schon diskutierte Einfluss der ROS auf die Ereigniskaskade näher zu untersuchen. Alternativ ermöglichen die gewonnenen Daten die Herstellung eines direkten Zusammenhanges zwischen intrazellulärem ATP-Gehalt und dem Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK (Abbildung 19). Eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase, welche als zellulärer Energiesensor beschrieben wurde (Hardie, 2001; Shaw, 2004), konnte mittels Immunoblot nicht gezeigt werden (nicht dargestellt). Aus der bekannten wissenschaftlichen Literatur lässt sich kein unmittelbarer Hinweis auf den postulierten Zusammenhang entnehmen. Allerdings fordern Izyumov et al. (Izyumov, 2004) einen zellulären ATP-Sensor, welcher im millimolaren Bereich arbeitet und an der Regulation apoptotischer Signale beteiligt ist. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die fehlende Phosphorylierung der p38-MAPK denkbar.

Der durch den Frataxinexpressionslevel veränderte zelluläre Energiemetabolismus beeinflusst die Tumorigenität

Wie bereits aus der Literatur bekannt, wird der zelluläre Energiestoffwechsel durch veränderte Frataxinexpression beeinflusst (siehe Einleitung). In dieser Arbeit konnte damit an zwei voneinander wesentlich verschiedenen Modellen der Einfluss veränderten Energiehaushaltes auf tumorigenes Zellverhalten untersucht werden. Es zeigte sich, dass ein verminderter Energiestoffwechsel mit dem Erwerb einer Tumorigenität und ein erhöhter Energiestoffwechsel mit der Verringerung bereits vorhandener Tumorigenität korreliert. In beiden Modellen wurden die p38-MAPK in ihrer Aktivität derart reguliert, dass eine Mitwirkung veränderten oxidativen Stresses als Ursache nur infolge veränderter oxidativer Phosphorylierung denkbar erscheint. Damit wäre ein direkter Zusammenhang zwischen dem zellulären Energiestoffwechsel und veränderter Tumorigenität gegeben.

Mit dieser Arbeit war es möglich, Indizien für eine Energiestoffwechsel-abhängige Krebsentstehung zu sammeln. Zwei wichtige Meilensteine zwischen der frataxinbedingt veränderten oxidativen Phosphorylierung und der veränderten Tumorigenität sind die Regulation der p38-MAPK und die Regulation der Apoptosekaskade. Es zeigte sich, dass die komplizierte Verflechtung zwischen oxidativem Stress und oxidativer Phosphorylierung zu teilweise schwer interpretierbaren zellulären Reaktionen führen kann. Eine Kenntnis der Wirkung, welche ein veränderter Energiemetabolismus auf die Krebsentstehung hat, würde eine gezieltere therapeutische Einflussnahme ermöglichen. Aus diesem Grund ist eine weitere Vertiefung des Wissens um diesen möglichen Zusammenhang von enormer Bedeutung. Die Skizzierung mechanistischer Hypothesen sowie der Zugang zu neuen Modellsystemen werden notwendige weitere Arbeiten auf diesem Gebiet ermöglichen.

Ausblick

Die vorliegenden Experimente haben einen Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und Tumorigenität zeigen können. Die unerwartete Regulation der p38-MAPK-Phosphorylierung ist ein Hinweis darauf, dass die vorzufindenden tumorigenen Wirkungen nicht zwangsläufig eine Folge vermehrten oxidativen Stresses sind. Der mögliche Zusammenhang zwischen dem zellulären Energiestatus und der p38-MAPK-Phosphorylierung soll in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden. Eine gut etablierte Methode zur ATP-Depletion in Hepatozyten ist die Gabe von hohen Fructose-Konzentrationen (Maenpaa, 1968; Raivio, 1969). Ähnlich wie im beschriebenen Knock-out-Modell verbleibt ein Rest-ATP-Level von ca. 15 % gegenüber Kontrolltieren im Gewebe. Dieser ist ausreichend, um nekrotischen Zelltod zu verhindern (Snyder, 1993; Lemasters, 1999), welcher durch größeren ATP-Verlust eintreten würde (Gores, 1988; Lemasters, 1999). Um metabolische Nebeneffekte auszuschließen, kann der zelluläre ATP-Gehalt auch durch Hemmung (Rotenon) oder Entkopplung (Dinitrophenol) der Atmungskette eingeschränkt werden (Dennis, 2001). Derartige ATP-Minderungen in *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen könnten zeigen, ob eine Dysregulation der Expression oder Aktivität bestimmter Proteine vorliegt.

Die Mäuse mit gewebsspezifischem Frataxin-Knock-out in der Leber stellen ein neues Modell dar, welches es ermöglicht, Ursachen der Krebsentstehung zu untersuchen. Die Leber ist ein Organ, welches unter dem Einfluss verschiedener Diäten auch in der Krebsentstehung beeinflusst wird (Enzmann, 1989). Es ist vorgesehen, in einem darmspezifischen (Madison, 2002) Frataxin-Knock-out-Modell zu untersuchen, ob ähnliche tumorigene Effekte ausgelöst werden und ob sich diese durch veränderte Diäten beeinflussen lassen.

Kürzlich wurde ein Mausmodell mit transgener Frataxinüberexpression vorgestellt (Miranda, 2004). Die Tiere exprimieren in allen Organen – zusätzlich zu dem natürlich enthaltenen Frataxin – transgenes humanes Frataxin. Sollten diese Tiere ebenfalls einen erhöhten Energiestoffwechsel aufweisen, so erscheint es lohnenswert, nach Optimierung des genetischen Hintergrundes, Kanzerisierungsstudien mit diesen Tieren durchzuführen (Schwarz, 2003). Diese könnten die Daten des vorgestellten Kolonkarzinomzell-Modells ergänzen.

Tumoren können zum Teil durch Chemotherapien beseitigt werden. Ein Einsatz entsprechender Substanzen in der Krebstherapie setzt eine genaue Kenntnis der Mechanismen voraus, die sowohl für die maligne Veränderung der Zellen als auch für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika ausschlaggebend sind. Es gibt Hinweise darauf, dass Frataxin die Chemotherapieresistenz beeinflusst (Ghazizadeh, 2003; eigene unveröffentlichte Daten). Da sowohl die p38-MAPK als auch HSP-27 und HSP-70 mögliche tumortherapeutische Ziele darstellen (Olson, 2004; Jäättelä, 1999; Garrido, 2003), und in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen Frataxinexpression und Expression bzw. Aktivierung der genannten Proteine hergestellt werden konnte, sollte dieser genauer beleuchtet werden. Ziel solcher Untersuchungen könnte es sein, anhand einer festgestellten Proteinausstattung des Patienten idealerweise fallspezifische Vorhersagen über die zu erwartende Wirksamkeit eines Chemotherapeutikums treffen zu können, um eine gezieltere Medikation einzusetzen.

5 Zusammenfassung

Die Krebsentstehung wurde vor rund 80 Jahren auf veränderten zellulären Energiestoffwechsel zurückgeführt. Diese Hypothese konnte bisher weder experimentell bewiesen noch widerlegt werden. Durch den Einsatz zweier Modellsysteme mit unterschiedlicher Expression des mitochondrialen Proteins Frataxin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der mitochondriale Energiestoffwechsel einen Einfluss auf die Tumorentstehung zu besitzen scheint.

Eine Reduktion des mitochondrialen Energiestoffwechsels wurde durch die hepatozytenspezifische Ausschaltung des mitochondrialen Proteins Frataxin in Mäusen erreicht. Der durch das Cre-/loxP-Rekombinasesystem erreichte organspezifische Knock-out wurde auf Transkriptions- und Translationsebene nachgewiesen. Anhand verminderter Aconitaseaktivität, geringeren Sauerstoffverbrauches und reduzierten ATP-Gehaltes im Lebergewebe wurde ein signifikant verminderter Energiestoffwechsel dargestellt. Zwar entsprach die Genotypenverteilung in den Versuchsgruppen der erwarteten Mendelschen Verteilung, dennoch war die mittlere Lebenserwartung der Knock-out-Tiere mit ca. 30 Wochen stark reduziert. Bereits in jungem Alter war bei diesen Tieren die Ausbildung von präneoplastischen Herden zu beobachten. Mit proteinbiochemischen Nachweistechiken konnte in Lebergewebe 4-8 Wochen alter Tiere eine verstärkte Aktivierung des Apoptosesignalweges (Cytochrom C im Zytosol, verstärkte Expression von Bax) sowie eine Modulation stressassoziierter Proteine (geringere Phosphorylierungsrate p38-MAPK, vermehrte Expression HSP-25, verminderte Expression HSP-70) aufgezeigt werden.

Im inversen Ansatz wurde eine Steigerung des mitochondrialen Energiestoffwechsels durch stabile transgene Frataxinüberexpression in zwei Kolonkarzinomzelllinien erreicht. Diese Steigerung zeigte sich durch erhöhte Aconitaseaktivität, erhöhten Sauerstoffverbrauch, gesteigertes mitochondriales Membranpotenzial und erhöhten ATP-Gehalt in den Zellen. Die frataxinüberexprimierenden Zellen wuchsen signifikant langsamer als Kontrollzellen und zeigten im Soft-Agar-Assay und im Nacktmausmodell ein deutlich geringeres Potenzial zur Ausbildung von Kolonien bzw. Tumoren. Mittels Immunoblot war hier eine vermehrte Phosphorylierung der p38-MAPK festzustellen.

Die zusammenfassende Betrachtung beider Modelle zeigt, dass ein reduzierter mitochondrialer Energiestoffwechsel durch Regulation der p38-MAPK und apoptotischer Signalwege ein erhöhtes Krebsrisiko zu verursachen vermag.

6 Summary

Eighth years ago, it was suggested that impaired energy metabolism might cause cancer. Compelling experimental evidence for this hypothesis is lacking. By use of two different model systems here we show that impaired expression of the mitochondrial protein frataxin leading to impaired mitochondrial energy metabolism appears to be inversely related to tumour growth.

To generate mice with reduced mitochondrial energy metabolism the expression of mitochondrial protein frataxin was disrupted in a hepatocyte-specific manner by using the cre/loxP-system. Presence, efficiency and specificity of disruption were shown at transcriptional and translational levels. Decreased activity of aconitase, reduced oxygen consumption and diminished ATP level in the liver revealed diminished energy metabolism. Although knock-out mice were born in the expected Mendelian frequency, they exhibited a significantly decreased life expectancy. Young mice exhibited hepatic preneoplasia. The use of proteinbiochemical techniques revealed activation of apoptotic pathways (cytochrome c in the cytosol, increased expression of bax) and modulation of stress-associated cascades (decreased phosphorylation of p38-MAPK, increased expression of HSP-25 and diminished expression of HSP-70).

Inversely, transgenic overexpression of frataxin in colon cancer cell lines lead to increased mitochondrial energy metabolism as demonstrated by elevated activity of aconitase, increased oxygen consumption, elevated mitochondrial membrane potential and increased ATP levels. Frataxin-overexpressing colon cancer cells exhibit a concurrent decrease in replication rate. The colony forming capacity in soft-agar-assay and tumour formation in nude mice were clearly decreased. Immunoblotting revealed elevated phosphorylation of p38-MAPK.

Taken together, these models suggest that reduced mitochondrial energy metabolism may promote cancer through regulation of p38-MAPK and apoptotic pathways.

7 Literaturverzeichnis

- **Ackroyd R, Shorthouse AJ and Stephenson TJ (1996)** Gastric carcinoma in siblings with Friedreich's ataxia. *Eur J Surg Oncol* 22(3): 301-303
- **Awad MM, Enslin H, Boylan JM, et al. (2000)** Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. *J Biol Chem* 275(49): 38716-38721
- **Babcock M, de Silva D, Oaks R, et al. (1997)** Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276(5319): 1709-1712.
- **Ballardini G, Groff P, Zoli M, et al. (1994)** Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. *J Hepatol* 20(2): 218-222
- **Barr H, Page R and Taylor W (1986)** Primary small bowel ganglioneuroblastoma and Friedreich's ataxia. *J R Soc Med* 79(10): 612-613
- **Beckman KB and Ames BN (1998)** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78(2): 547-581
- **Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- **Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, et al. (2000)** Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 9(2): 275-282
- **Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, et al. (2003)** Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 17(16): 1969-1978
- **Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, et al. (2000)** Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2(9): 645-652
- **Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, et al. (2002)** Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 31(2): 210-215
- **Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, et al. (2004)** Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305(5681): 242-245
- **Cadenas E and Davies KJ (2000)** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 222-230
- **Cairo G, Recalcati S, Pietrangelo A, et al. (2002)** The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 32(12): 1237-1243
- **Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. (1996)** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271(5254): 1423-1427.
- **Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, et al. (1997)** Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 6(11): 1771-1780
- **Cavadini P, Adamec J, Taroni F, et al. (2000)** Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem* 275(52): 41469-41475
- **Chen OS, Hemenway S and Kaplan J (2002)** Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12321-12326.
- **Concannon CG, Gorman AM and Samali A (2003)** On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8(1): 61-70
- **Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, et al. (2000)** Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 60(24): 7099-7105
- **Cossée M, Puccio H, Gansmuller A, et al. (2000)** Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9(8): 1219-1226.

-
- **Crompton M (1999)** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2): 233-249
 - **Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, et al. (2002)** The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62(22): 6674-6681
 - **de Cabo R, Furer-Galban S, Anson RM, et al. (2003)** An in vitro model of caloric restriction. *Exp Gerontol* 38(6): 631-639
 - **de Pas T, Martinelli G, De Braud F, et al. (1999)** Friedreich's ataxia and intrathecal chemotherapy in a patient with lymphoblastic lymphoma. *Ann Oncol* 10(11): 1393
 - **Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, et al. (2001)** Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294(5544): 1102-1105
 - **Dexter DL, Barbosa JA and Calabresi P (1979)** N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 39(3): 1020-1025
 - **Dexter DL, Spremulli EN, Matook GM, et al. (1982)** Inhibition of the growth of human colon cancer xenografts by polar solvents. *Cancer Res* 42(12): 5018-5022
 - **Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi YI, et al. (2000)** Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem* 275(40): 30753-30756.
 - **Dürr A, Cossee M, Agid Y, et al. (1996)** Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335(16): 1169-1175
 - **Eferl R, Ricci R, Kenner L, et al. (2003)** Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112(2): 181-192
 - **Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM, Jr., et al. (1995)** Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg Oncol* 4(4): 197-203
 - **Emond M, Lepage G, Vanasse M, et al. (2000)** Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* 55(11): 1752-1753
 - **Enzmann H, Ohlhauser D, Dettler T, et al. (1989)** Enhancement of hepatocarcinogenesis in rats by dietary fructose. *Carcinogenesis* 10(7): 1247-1252
 - **Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, et al. (2000)** Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med* 28(5): 754-766
 - **Fearon ER and Vogelstein B (1990)** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759-767.
 - **Finocchiaro G, Baio G, Micossi P, et al. (1988)** Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology* 38(8): 1292-1296
 - **Fouy F and Cazzalini O (1997)** Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* 411(2-3): 373-377
 - **Fouy F (1999)** Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* 456(2): 281-284
 - **Freedman VH and Shin SI (1974)** Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3(4): 355-359
 - **Frisch SM and Francis H (1994)** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124(4): 619-626
 - **Gaestel M, Gotthardt R and Muller T (1993)** Structure and organisation of a murine gene encoding small heat-shock protein Hsp25. *Gene* 128(2): 279-283
 - **Gakh O, Adamec J, Gacy AM, et al. (2002)** Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* 41(21): 6798-6804
 - **Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, et al. (1999)** HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* 13(14): 2061-2070
-

-
- **Garrido C, Schmitt E, Cande C, et al. (2003)** HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2(6): 579-584
 - **Ghazizadeh M (2003)** Cisplatin may induce frataxin expression. *J Nippon Med Sch* 70(4): 367-371
 - **Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, et al. (1988)** Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am J Physiol* 255(3 Pt 1): C315-322
 - **Grompe M, St-Louis M, Demers SI, et al. (1994)** A single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I. *N Engl J Med* 331(6):353-357
 - **Gu M, Cooper JM, Butler P, et al. (2000)** Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356(9228): 469-474
 - **Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, et al. (2003)** Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22(43): 6669-6678
 - **Hardie DG and Hawley SA (2001)** AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23(12): 1112-1119
 - **Harman D (1956)** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300
 - **Hartman P, Ponder R, Lo HH, et al. (2004)** Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. *Mech Ageing Dev* 125(6): 417-420
 - **Hebinck J, Hardt C, Schols L, et al. (2000)** Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes* 49(9): 1604-1607.
 - **Hsu YT, Wolter KG and Youle RJ (1997)** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3668-3672
 - **Izumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, et al. (2004)** "Wages of Fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2): 141-147
 - **Jäättelä M (1999)** Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248(1): 30-43
 - **Jakob U, Gaestel M, Engel K, et al. (1993)** Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268(3): 1517-1520
 - **Karthikeyan G, Lewis LK and Resnick MA (2002)** The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage. *Hum Mol Genet* 11(11): 1351-1362.
 - **Karthikeyan G, Santos JH, Graziewicz MA, et al. (2003)** Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* 12(24): 3331-3342
 - **Katayama B, Sakaguchi M, Li JW, et al. (1998)** ATP inhibition of proliferation of immortalized human fibroblasts is greater than that of normal human diploid fibroblasts. *Int J Mol Med* 2(5):603-606
 - **Kidd A, Coleman R, Whiteford M, et al. (2001)** Breast cancer in two sisters with Friedreich's ataxia. *Eur J Surg Oncol* 27(5): 512-514
 - **Klaunig JE and Kamendulis LM (2004)** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44(239-267
 - **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. (1997)** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303): 1132-1136
 - **Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, et al. (2001)** Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2278-2283
 - **Kountouras J, Zavos C and Chatzopoulos D (2003)** Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 37(4): 242-249
 - **Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, et al. (1997)** Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 16(4): 345-351.
 - **Kowaltowski AJ and Vercesi AE (2001)** Chapter 14: Reactive Oxygen Generation by Mitochondria. In: J. J. Lemasters and A. L. Nieminen eds. *Mitochondria in Pathogenesis*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 281-300
-

-
- **Kulisz A, Chen N, Chandel NS, et al. (2002)** Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(6): L1324-1329
 - **Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-685
 - **Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, et al. (1995)** Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1(12): 1603-1609
 - **Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. (1997)** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8): 1481-1486
 - **Lemasters JJ (1999)** V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1): G1-6
 - **Li AE, Ito H, Rovira, II, et al. (1999)** A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res* 85(4): 304-310
 - **Lill R, Diekert K, Kaut A, et al. (1999)** The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* 380(10): 1157-1166
 - **Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, et al. (2002)** Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418(6895): 344-348
 - **Liu X, Kim CN, Yang J, et al. (1996)** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147-157
 - **Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, et al. (1999)** Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11492-11495.
 - **Lodi R, Rajagopalan B, Blamire AM, et al. (2001)** Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc Res* 52(1): 111-119
 - **Lottspeich F and Zorbas H (1998)** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin: 3-8274-0041-4
 - **Love S and King RJ (1994)** A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 69(4): 743-748
 - **Maaser K, Hopfner M, Kap H, et al. (2002)** Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br J Cancer* 86(4): 636-644
 - **Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, et al. (2002)** Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem* 277(36): 33275-33283.
 - **Maenpaa PH, Raivio KO and Kekomaki MP (1968)** Liver adenine nucleotides: fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis. *Science* 161(847): 1253-1254
 - **Marquardt H and Schäfer S (2004)** Lehrbuch der Toxikologie. 2. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 3-8047-1777-2
 - **Martindale JL and Holbrook NJ (2002)** Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192(1): 1-15
 - **Martinou JC and Green DR (2001)** Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-67
 - **Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, et al. (1996)** Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12908-12913
 - **Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, et al. (2004)** Frataxin overexpressing mice. *FEBS Lett* 572 (1-3): 281-288
 - **Mühlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, et al. (2002)** The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11(17): 2025-2036.
-

-
- **Mühlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, et al. (2003)** Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* 22(18): 4815-4825
 - **Musco G, Stier G, Kolmerer B, et al. (2000)** Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure Fold Des* 8(7): 695-707
 - **Niles RM, Wilhelm SA, Steele GD, Jr., et al. (1987)** Isolation and characterization of an undifferentiated human colon carcinoma cell line (MIP-101). *Cancer Invest* 5(6): 545-552
 - **Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, et al. (1993)** The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 53(19): 4443-4448
 - **Olson JM and Hallahan AR (2004)** p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med* 10(3): 125-129
 - **OMIM:229300 (2004)** Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 229300: last edited 4/29/2004. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
 - **Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, et al. (2001)** Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 488(2): 119-133
 - **Pianese L, Busino L, De Biase I, et al. (2002)** Up-regulation of c-Jun N-terminal kinase pathway in Friedreich's ataxia cells. *Hum Mol Genet* 11(23): 2989-2996.
 - **Postic C, Shiota M, Niswender KD, et al. (1999)** Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274(1): 305-315
 - **Preville X, Salvemini F, Giraud S, et al. (1999)** Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res* 247(1): 61-78
 - **Puccio H, Simon D, Cossee M, et al. (2001)** Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27(2): 181-186.
 - **Purring C, Zou H, Wang Z, et al. (1999)** Stoichiometry, Free Energy, and Kinetic Aspects of Cytochrome c: Apaf-1 Binding in Apoptosis. *J Am Chem Soc* 121(7435-7436)
 - **Putman DL, Park DK, Rhim JS, et al. (1977)** Correlation of cellular aggregation of transformed cells with their growth in soft agar and tumorigenic potential. *Proc Soc Exp Biol Med* 155(4): 487-494
 - **Raivio KO, Kekomaki MP and Maenpaa PH (1969)** Depletion of liver adenine nucleotides induced by D-fructose. Dose-dependence and specificity of the fructose effect. *Biochem Pharmacol* 18(10): 2615-2624
 - **Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, et al. (2000)** Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12239-12243.
 - **Ristow M, Mulder H, Pomplun D, et al. (2003)** Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest* 112(4): 527-534
 - **Ristow M (2004)** Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med* 82(8): 510-529
 - **Romeis B (1989)** *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage Urban & Schwarzenberg München - Wien - Baltimore: 3-541-11227-1
 - **Rosen K, Shi W, Calabretta B, et al. (2002)** Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277(48): 46123-46130
 - **Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, et al. (2004)** Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64(3): 985-993
 - **Rötig A, de Lonlay P, Chretien D, et al. (1997)** Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17(2): 215-217.
-

-
- **Rouault TA and Klausner RD (1996)** Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci* 21(5): 174-177
 - **Ryan KM, Phillips AC and Vousden KH (2001)** Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 332-337.
 - **Santos MM, Ohshima K and Pandolfo M (2001)** Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* 10(18): 1935-1944
 - **Scholzen T and Gerdes J (2000)** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322
 - **Schulz JB, Dehmer T, Schols L, et al. (2000)** Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* 55(11): 1719-1721
 - **Schwarz M, Wanke I, Wulbrand U, et al. (2003)** Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol Pathol* 31(1): 99-102.
 - **Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, et al. (2004)** The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3329-3335
 - **Shoichet SA, Baumer AT, Stamenkovic D, et al. (2002)** Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum Mol Genet* 11(7): 815-821.
 - **Snyder JW, Pastorino JG, Thomas AP, et al. (1993)** ATP synthase activity is required for fructose to protect cultured hepatocytes from the toxicity of cyanide. *Am J Physiol* 264(3 Pt 1): C709-714
 - **Stridh H, Fava E, Single B, et al. (1999)** Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine triphosphate production. *Chem Res Toxicol* 12(10): 874-882
 - **Tan G, Chen LS, Lonnerdal B, et al. (2001)** Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. *Hum Mol Genet* 10(19): 2099-2107
 - **Tan G, Napoli E, Taroni F, et al. (2003)** Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells. *Hum Mol Genet* 12(14): 1699-1711
 - **Tannapfel A, Geissler F, Kockerling F, et al. (1999)** Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 187(4): 439-445
 - **Tokino T and Nakamura Y (2000)** The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 33(1): 1-6.
 - **Vorgerd M, Schols L, Hardt C, et al. (2000)** Mitochondrial impairment of human muscle in Friedreich ataxia in vivo. *Neuromuscul Disord* 10(6): 430-435
 - **Warburg O, Posener K and Negelein E (1924)** Über den Stoffwechsel der Tumoren (On metabolism of tumours). *Biochemische Zeitschrift* 152(319-344)
 - **Warburg O (1956)** On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309-314
 - **Wei YH and Lee HC (2002)** Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(9): 671-682
 - **Willers I, Koeppen A, Singh S, et al. (1991)** Growth studies on fibroblasts of patients with autosomal recessive Friedreich's ataxia. *Pathobiology* 59(5): 357-360
 - **Willers I, Ressler B, Singh S, et al. (1993)** Immunocytochemical studies on the vimentin distribution and cell proliferation of fibroblasts in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 117(1-2): 159-163
 - **Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, et al. (1998)** Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273(43): 28510-28515
 - **Wilson RB and Roof DM (1997)** Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* 16(4): 352-357.
 - **Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. (1997)** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5): 1281-1292
-

- **Wong A, Yang J, Cavadini P, et al. (1999)** The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet* 8(3): 425-430.
- **Yamaguchi H and Wang HG (2001)** The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20(53): 7779-7786
- **Yang F, Moss LG and Phillips GN, Jr. (1996)** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14(10): 1246-1251.
- **Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, et al. (2004)** The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 336(1): 1-13
- **Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, et al. (1997)** Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385(6617): 637-640
- **Zhong SP, Ma WY, Quealy JA, et al. (2001)** Organ-specific distribution of AP-1 in AP-1 luciferase transgenic mice during the maturation process. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(2): R376-381
- **Zöfel P (2002)** Statistik verstehen Addison-Wesley Verlag München: 3-8273-1690-1
- **Zu XL and Guppy M (2004)** Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 459-465

Erklärung

Die für diese Arbeit notwendigen Vordaten wurden von Tim Schulz im Rahmen seiner Diplomarbeit zum Thema „Hepatozyten-spezifische Inaktivierung des mitochondrialen Frataxin-Proteins“ gewonnen. Sie umfassen die Zucht der leberspezifischen Frataxin-Knock-out-Mäuse, die Etablierung der Genotypisierung der Versuchstiere sowie den Frataxinnachweis auf translationeller Ebene.

Die Immunoblots, welche für die mechanistischen Untersuchungen der Mäuse erforderlich waren, wurden von Brun Mietzner im Rahmen seiner Diplomarbeit zum Thema „Proteinbiochemische Analyse der Stressantwort in einem Mausmodell mit hepatozytenspezifischer Reduktion des mitochondrialen Stoffwechsels“ unter meiner Betreuung angefertigt.

Die immunhistologische Färbung und Bewertung der Leberschnitte wurde von Dr. Katrin Müller-Schmehl durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ich erkläre, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

René Thierbach

Danksagung

Während meiner Promotionszeit haben mich viele Menschen auf unterschiedliche Weise unterstützt und dadurch die Voraussetzungen für die Fertigstellung dieser Arbeit geschaffen.

- Prof. Dr. Pablo Steinberg und PD Dr. Michael Ristow ermöglichten mir, durch die interessante Aufgabenstellung und weit über diese Arbeit hinausgehende Anleitungen, wissenschaftliche Konzepte zu erarbeiten und umzusetzen.
- Anja Voigt, Gunnar Drewes und Brun Mietzner haben durch ihre Einsatzbereitschaft die Bildung eines hervorragenden Arbeitsteams und damit zum Teil logistisch komplizierte Arbeitsabläufe ermöglicht.
- Tim Schulz und Doreen Pomplun waren sehr hilfsbereite Ansprechpartner, die mir unter anderem halfen die Geheimnisse der Knock-out-Tierzucht zu erlernen. Dr. Frank Isken ermöglichte durch Vorarbeiten und Hilfestellungen die Etablierung der Sauerstoff- und ATP-Messungen in unserem Labor.
- Innerhalb der Promotionszeit wurde ich kontinuierlich durch die Mitarbeiterinnen der Abteilung Ernährungstoxikologie Dr. Wera Teubner, Dr. Ingrid Bartsch, Dr. Bettina Scholtka, Monika Haseloff, Ingrid Zschaler und Heidi Mahler unterstützt. Durch langjährigen gemeinsamen Laboralltag und viele fachliche Auseinandersetzungen fühle ich mich Uta Herbst und Dana Kühnel besonders verbunden.
- Bei den Tierversuchen wurde ich von zahlreichen Mitarbeiterinnen des Max-Rubner-Labors unterstützt. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Elke Thom, Swetlana König und Janet Krause.
- Bei der Anfertigung und Begutachtung der histologischen Präparate haben mich Prof. Dr. F. Dombrowski, Dr. Katrin Müller-Schmehl und Elisabeth Meyer unterstützt.
- Prof. Dr. Gerhard Püschel, Dr. habil. Frank Neuschäfer-Rube, Dr. Alexandra Fennekohl und Manuela Kuna waren hilfsbereite Ansprechpartner in vielen Fragen der Biochemie und des Laboralltags.
- Nicht zuletzt hat Andreas Cramer durch zahlreiche Hinweise germanistischer Art für eine hoffentlich bessere Verständlichkeit dieser Arbeit gesorgt.

Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.