

Universität Ulm  
Abteilung Neurologie  
Leiter: Prof. Dr. Albert C. Ludolph

# **Eisenstoffwechsel in einem Zellmodell für Amyotrophe Lateralsklerose**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Ulm

vorgelegt von:  
Lea Huber  
geb. in Laupheim

Ulm 2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Ludolph
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Grissmer
Tag der Promotion:	22.11.07

## Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis: .....	
1 Einleitung .....	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose.....	1
1.2 Epidemiologie.....	1
1.3 Diagnostik.....	2
1.4 Klinischer Verlauf .....	2
1.5 Pathogenese .....	3
1.6 Beziehung zwischen SOD1 und Eisen-Metabolismus in der Hefe .....	3
1.7 Eisenstoffwechsel und ALS .....	4
1.8 Hintergrund zu Eisen.....	5
1.9 Konsequenzen der Dysregulation von Eisenkonzentrationen .....	5
1.10 Verbindung zwischen SOD1 und Eisen in ALS.....	5
1.11 Zytosolische eisensensitive Proteine IRP1 und IRP2.....	6
1.12 IRP1 und oxidativer Stress .....	9
1.13 Fragestellung .....	10
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Chemikalien:.....	11
2.1.2 Vektoren: .....	12
2.1.3 Antikörper: .....	13
2.1.4 Zellen:.....	13
2.1.5 Geräte: .....	13
2.1.6 Rezepte: .....	14
2.1.7 Statistik:.....	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Zelllinie und Transfektion .....	18
2.2.2 Ernten der Zellen .....	18
2.2.3 Western Blot für Transferrinrezeptor .....	19
2.2.4 SOD1-Knockdown-Klone .....	20
2.2.5 Western Blot für Ferritin .....	21
2.2.6 IRE/IRP-Bindungsassay .....	21
2.2.7 Auswertung.....	23

3	Ergebnisse.....	24
3.1	Expression des Transferrinrezeptors .....	24
3.1.1	Gliazellen (nicht transfiziert) nach Eiseninkubation .....	24
3.1.2	Gliazellen (nicht transfiziert) nach DFO-Inkubation.....	28
3.1.3	Gliazellen mit SOD1-Wildtyp oder SOD1-Mutante transfiziert.....	29
3.2	Expression der SOD1-Knockdown-Klone .....	32
3.3	Expression von Ferritin .....	34
3.3.1	Gliazellen mit SOD1-Wildtyp oder SOD1-Mutante transfiziert.....	34
3.4	IRP-IRE-Bindungsassay.....	36
4	Diskussion .....	38
5	Schlussfolgerung .....	45
6	Zusammenfassung .....	46
7	Literaturverzeichnis:.....	48

## Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPS	2-Acrylamido-2-methyl 1-propansulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphate
B6-Zellen	Rat C6 glioma Zellen von American Type Culture Collection (ATCC).
BM	<i>Benchmark</i>
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i>
CaN	Calcineurin
Cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidin 5'-triphosphat
Cu	Kupfer
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DFO	Deferoxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EMS	Elektrische Muskel Stimulation
fALS	Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fe	Eisen
Gb	Genbank
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IRE	<i>Iron responsive element</i>
IRP	<i>Iron regulatory protein</i>
2-ME	Mercaptoethanol
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ntg	nicht transfizierte Zellen

OD	<i>Optical Density</i>
ODU	Absorptionseinheit pro cm
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PmE	Potential motorischer Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SOD1	Superoxid Dismutase
SReLAB	<i>Strong reducing Lämmli Buffer</i>
TBE	TRIS-Borsäure-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrinrezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester
UTP	Urindin-5'-triphosphat
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WT	Zellen, die mit SOD1-Wildtyp transfiziert wurden

# 1 Einleitung

## 1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine erst im fortgeschrittenen Lebensalter auftretende, jedoch rasch progredient verlaufende Motoneuronenerkrankung. Charakterisiert ist die Erkrankung durch eine Kombination von Muskelatrophie (bei Vorderhornzelluntergang) und Spastik mit Pyramidenbahnzeichen (bei Seitenstrangbefall). Verursacht wird die Erkrankung durch den Verlust des 1. sowie des 2. Motoneurons.

## 1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz wird auf 1-3/100000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz auf 4-6/100000 Einwohner angegeben. Das Erkrankungsrisiko ist mit 1,5:1 (m:w) weltweit zu Ungunsten der Männer verschoben. In der Altersgruppe der 55-75jährigen ist ein Anstieg der Inzidenzrate zu beobachten (s. Abbildung 1). ALS tritt zu 90% sporadisch und zu ca. 10% als familiäre Motoneuronenerkrankung auf.

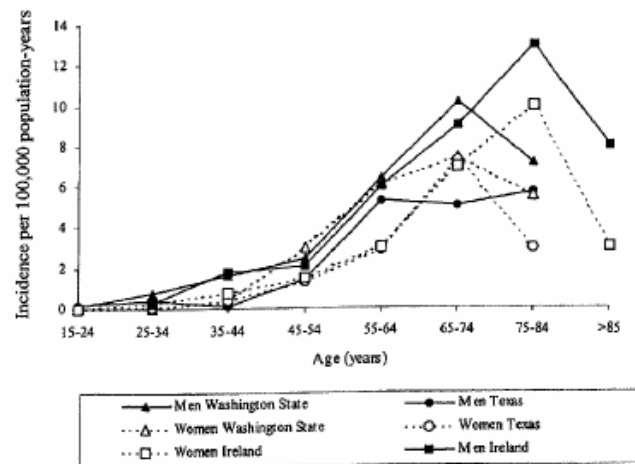


Abbildung 1: **Altersbezogene Inzidenzrate von ALS**, aufgeteilt nach Männern und Frauen von West Washington State, Texas und Irland aus (Majoor-Krakauer et al 2003).

### **1.3 Diagnostik**

Die Diagnose wird anhand klinischer Parameter gestellt. Es sollte immer eine Beteiligung des 1. und 2. Motorneurons zu sehen sein.

Diagnostische Kriterien sind:

- Gute Auslösbarkeit der Eigenreflexe an Extremitäten mit Muskelatrophien
- Faszikuläre Zuckungen bei Spastik beider Beine oder spastische Tetraparese
- Fibrillieren der Zunge
- Gesteigerter Masseter-Reflex

In der Muskelbiopsie findet man neben neurogener Degeneration der IIA-Fasern eine kompensatorische Hypertrophie von Muskelfasern. Zusätzlich kann das EMS zur Diagnosefindung hilfreich sein. Es zeigt:

- neurogen umgebaute PmE
- gelichtetes, hohes Aktivitätsmuster
- pathologische Spontanaktivität und Faszikulationen. (Poeck und Hacke 2001)

### **1.4 Klinischer Verlauf**

Subjektiv bemerken die Patienten zunächst eine Muskelschwäche, die distal wie auch proximal beginnen kann. Sie ist teilweise beidseitig, teilweise einseitig lokalisiert. Zudem kommt es zur Muskelatrophie, die meist an den Handmuskeln zuerst bemerkt wird. Weitere Zeichen können Muskelkrämpfe und Faszikulationen sein. Objektiv finden sich Paresen, die asymmetrisch, distal oder proximal auftreten können. Im Gegensatz dazu bleiben Sensibilität und Blasenfunktion erhalten.

Die Bulbär-Zeichen treten z. T. erst später in Erscheinung. Zu ihnen gehören: zunehmend undeutliche Sprache, Schluckstörungen und schlaffe Mimik. Wenn zentrale und periphere Bulbärsymptome vorliegen (sog. Pseudobulbärparalyse), treten oft pathologisches Lachen und Weinen auf. Durch die Schluckstörungen besteht die Gefahr einer Aspirationspneumonie. Viele Patienten werden in Folge einer fortschreitenden Ateminsuffizienz mit der Zeit beatmungspflichtig (Mumenthaler und Mattle 2002).



## **1.5 Pathogenese**

ALS ist eine Krankheit mit unvollständig charakterisierter Pathogenese. 10% aller ALS Erkrankungen treten familiär gehäuft auf (sog. familiäre ALS, fALS) und ca. 20% dieser Patienten haben eine Mutation im Cu,Zn Superoxid Dismutase (SOD1) kodierenden Gen (Rosen et al 1993).

Zum heutigen Zeitpunkt sind ca. 100 verschiedene Punktmutationen bekannt, die meisten sind unter <http://www.alSOD.org> (Gowrie et al) aufgelistet. Die verschiedenen Mutationen haben auf molekularer Ebene unterschiedliche Auswirkungen auf das SOD1-Protein. So bewirken einige Mutationen eine Verringerung der SOD1-Aktivität, andere eine so genannte „gain of function“ Peroxidase Aktivität. Wieder andere führen zu einer Veränderung an der Dimer-Schnittstelle oder der Cu- bzw Zn-Bindungsstelle (Valentine und Hart 2003; Valentine et al 1999). Trotz dieser molekularen Unterschiede verursachen alle Mutationen ALS. Die Phänotypen unterscheiden sich allerdings in der klinischen Prognose und Überlebenszeit der Patienten erheblich. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch bis heute unklar. Es gibt eine Vielfalt von Hypothesen zur Pathogenese von ALS, z.B. wurden Akkumulationen von Neurofilamenten (Julien 1999), Glutamat-Vergiftung (Exzitotoxizität) (Rothstein et al 1992), eine mitochondriale Dysfunktion (Beal 2000) und ein Einfluss der zellulären Umgebung (Ferri et al 2004) beschrieben. Gegenwärtig ist jedoch das meist genutzte genetische Erklärungsmodell die SOD1-Mutation. Es ist wahrscheinlich, dass die ALS bzw. fALS multifaktorielle Erkrankungen sind und dass ein komplexes Zusammenwirken mehrerer oder aller dieser Faktoren den ALS-Phänotyp verursacht.

## **1.6 Beziehung zwischen SOD1 und Eisen-Metabolismus in der Hefe**

Auf Grund der Bedeutung und Übertragbarkeit für Säugetierzellen wird die Hefe oft als System für das Studium der Metall-Homöostase genutzt, hauptsächlich bezüglich Eisen (Fe) und Kupfer (Cu). Die SOD1 ist ein Cu enthaltendes Enzym, welches das toxische Superoxidradikal zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid dismutiert. In der Hefe bewirkt ein Verlust der SOD1, durch eine Veränderung des Eisenstatus und Eisenbedarfs der Zelle, eine Hochregulation der hochaffinen Eisentransportsysteme.

Es wird vermutet, dass die Änderung im Eisenbedarf der Zelle eine Konsequenz des Verlustes an biologisch aktiven Eisens in Fe/S-Clustern ist. Dieses aktive Eisen ist der zelluläre Indikator des Eisenstatus (De Freitas et al 2000; Srinivasan et al 2000). Der Verlust von SOD1 in der SOD1-knockout-Hefe führt zu einer erhöhten Superoxidkonzentration, welche dann den Verlust an intakten Fe/S-Clustern zur Folge haben könnte. Es ist denkbar, dass die Änderung im oxidativen Status der Zelle einen ähnlichen Effekt auf die zytosolischen oder mitochondrialen eisenhaltigen Proteine hat (z.B. Fe/S enthaltende Proteine wie Complex I oder Calcineurin mit seinem Fe/Zn-Zentrum).

### **1.7 Eisenstoffwechsel und ALS**

Es gibt Hinweise für Veränderungen in der Eisenhomöostase in ALS Patienten. Eisenlevel sind in bestimmten Regionen in Gehirnen von ALS Patienten erhöht (Kasarskis et al 1995). Zudem können Veränderungen in der Expression einiger Fe-regulierter Gene oder Fe-enthaltender Proteine in ALS Patienten beobachtet werden. Vor allem werden mitochondriale Schäden oder Dysregulation von Complex I (ein Fe-S-Cluster beinhaltendes Protein (Ludolph et al 2000) beschrieben. Zudem zeigt sich eine Hochregulation von Ferritin in SOD1-G93A Mäusen, kurz vor dem Endstadium der Krankheit, was auf starke Eisenakkumulation hinweist (Olsen et al 2001). Beim heutigen Stand der Forschung ist es völlig unklar, wie diese Ablagerungen zu Stande kommen und ob sie zum Zelluntergang beitragen (Good et al 1992; Leveugle et al 1994; Oba et al 1993).

Alle Proteine, die eine Rolle im Eisenstoffwechsel spielen, werden durch die zelluläre Eisenkonzentration reguliert, die meisten von ihnen durch die zytosolischen eisensensiblen Proteine IRP1 und IRP 2 (Hentze und Kuhn 1996). Es ist denkbar, dass eines oder beide Proteine bei fALS als Folge der mutierten SOD1 oder des geänderten oxidativen Status der Zelle dysreguliert sind. An einem Zellmodell für ALS, welches die SOD1-Mutationen G93A und H46R enthält, wurde die Hypothese einer veränderten Eisenhomöostase getestet. Dabei wurde die Expression von repräsentativen eisenregulierten Proteinen gemessen. Eine Fehlfunktion in der Feinregulation der Eisenhomöostase würde einen zusätzlichen Stress in den „ALS-Zellen“ verursachen.

## **1.8 Hintergrund zu Eisen**

Eisen ist ein essenzielles, jedoch auch toxisches Metall. Beide Eigenschaften beruhen auf der Möglichkeit des Eisens zwischen  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  zu variieren. Somit kann Eisen sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor wirken. Eisen wird für eine sehr große Anzahl von Reaktionen im Körper benötigt, z.B. für die Entgiftungsreaktion der Peroxisomen, im Citratzyklus und in der mitochondrialen Atmungskette.

Gleichzeitig ist ein Eisenüberschuss für alle Zellen toxisch. Wird es nicht passend gebunden, kann Eisen eine Reaktion vom Fenton-Typ hervorrufen, bei der hochreaktive Superoxid-Anionen entstehen. Aus diesem Grund muss der Eisengehalt jeder Zelle sehr genau reguliert werden. Die Mechanismen, die diese Feinregulation vermitteln, sind in der langen Kette von biologischen Systemen in der Evolution sehr ähnlich geblieben, von der Hefe bis zu Säugetier und Mensch. Dies unterstreicht nicht nur die Bedeutung einer passenden Eisenumgebung für alle Formen des Lebens, sondern zeigt auch, warum die Hefe *S.cerevisiae* ein gängiges und extrem nützliches Modell zur Studie des Eisenstoffwechsels ist (Klausner und Dancis 1994).

## **1.9 Konsequenzen der Dysregulation von Eisenkonzentrationen**

Eisen spielt in einer Reihe von Krankheitsbildern eine Rolle. Manche dieser Krankheiten hängen direkt und ursächlich mit dem Eisentransport zusammen, z.B. die Hämochromatose (Gross et al 1998). Es werden jedoch auch Eisenablagerungen bei Krankheiten beobachtet, die keinen unmittelbaren Zusammenhang aufweisen. Als Beispiel ist hier die ganze Familie der neurodegenerativen Erkrankungen zu nennen. Ein überraschend hoher Anteil dieser Störungen tritt zusammen mit Eisenablagerungen auf. Beispiele für Erkrankungen mit hoher Prävalenz sind die Parkinson-Erkrankung mit Eisenablagerungen in der Substantia nigra (Hirsch et al 1991; Sofic et al 1991) und Morbus Alzheimer. Dort wurden Eisenablagerungen im Kortex und den Amyloid-Plaques beschrieben (Connor et al 1992; Good et al 1992).

## **1.10 Verbindung zwischen SOD1 und Eisen in ALS**

Die Erkenntnis, dass ein Verlust der SOD1 eine Inaktivierung der zytosolischen eisenhaltigen Proteine in der Hefe bewirken kann, ist wichtig für Säugetierzellen. Das

beste Beispiel dafür ist CaN, ein eisenabhängiges Enzym mit einem Fe/Zn-Zentrum. CaN kommt im zentralen Nervensystem vor und ist beteiligt an der zellulären Reaktion auf Ca-mobilisierende Signale wie z.B. der Kontrolle der Neurotransmitter-Freisetzung und der Ionenkanäle. Die CaN-Aktivität ist empfindlich auf reaktiven Sauerstoff und die WT-SOD1 schützt CaN vor dieser Inaktivierung (Volkel et al 2001; Wang et al 1996). Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf den Schutz des sensiblen Fe/Zn-aktiven Zentrums zurückzuführen ist. Während WT-SOD1 einen schützenden Effekt hat, ist CaN selektiv inaktiviert in Zellen mit fALS-mutierter SOD1. Es wird berichtet, dass diese Inaktivierung durch reaktiven Sauerstoff (ROS) vermittelt wird (Ferri et al 2001). Es ist denkbar, dass die WT-SOD1 und die mutierte SOD1 ähnliche Effekte auf zelluläre ROS-sensitive Zentren haben könnten, wie z.B. zytosolische Fe/S-Clusters.

### **1.11 Zytosolische eisensensitive Proteine IRP1 und IRP2**

Die Regulation der zellulären Eisen-Homöostase steht unter der posttranskriptionellen Kontrolle des *Iron Regulatory Protein* IRP1 und IRP2. Es handelt sich hierbei um zytoplasmatische RNA-Bindungsproteine, wobei IRP1 einen stärkeren Anteil an der Regulation besitzt und nicht alle Zellen IRP2 exprimieren. Diese Proteine binden spezifisch an eine sogenannte mRNA-„stem-loop“ Struktur, bekannt als das *Iron Responsive Element* (IRE). Schon in den 80er und 90er Jahren gab es Berichte über dieses System der Regulation (Casey et al 1988; Hentze et al 1988). Mit wenigen Ausnahmen enthalten alle wichtigen Proteine des Eisenstoffwechsels dieses IRE.

IRP 1 ist chemisch das einfachste Beispiel eines Fe-S-Clusters und hat die gleiche Struktur wie die Aconitase, ein Enzym aus dem Krebs-Zyklus. Wenn bindungsfähiges Eisen im Zytoplasma enthalten ist, bindet das Cluster ein viertes Eisenatom. Dabei wird das Cluster „geschlossen“ und die Bindung des IRP an das IRE verhindert. In der Situation des Eisendefizits, wenn also wenig bindungsfähiges Eisen im Zytoplasma vorhanden ist, ist die vierte Bindung für Eisen frei und somit das Cluster offen. Dies ermöglicht eine Bindung an das IRE. Somit verhält sich die Aconitase-Aktivität reziprok zu der RNA-Bindungsaktivität (Abb. 2). Die Struktur kann durch diese eiseninduzierte posttranslationale Modifikation zwischen den beiden Funktionen wechseln, ohne dass es dabei zu einer Änderung des Proteinlevels kommt. Zudem wurde in anderen Arbeiten

gesehen, dass oxidativer Stress ebenfalls einen Einfluss auf dieses System hat (Missirlis et al 2003).

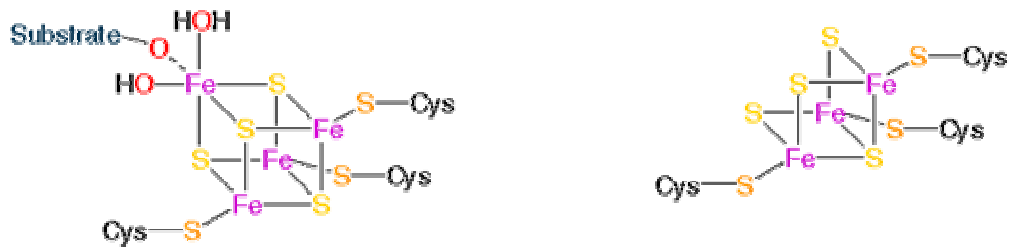


Abbildung: 2: **Darstellung der Konformationsänderung des aktiven Zentrums von IRE bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen im Medium**

links:	rechts:
hohes zytosolisches Eisenlevel	niedriges Eisenlevel
niedrige RNA-Bindung	hohe RNA-Bindung
hohe Aconitase-Aktivität	niedrige Aconitase-Aktivität

Die mRNA des TfR enthält die IRE-Sequenz in der 3'-UTR (Owen und Kuhn 1987). Bei hohen zytosolischen Eisenkonzentrationen verhindert das Eisen die Bindung des IRP an die mRNA des TfR. Dieser Umstand verhindert die stabile Translation, wodurch es zu einer Abnahme des Rezeptorproteins kommt. Im umgekehrten Fall, bei der Verminderung des Eisenlevels, stabilisiert das IRP die Translation und es kommt zur Vermehrung des TfR (Abb. 3) (Hentze und Kuhn 1996).

### TfR- Regulation durch IRE/IRP

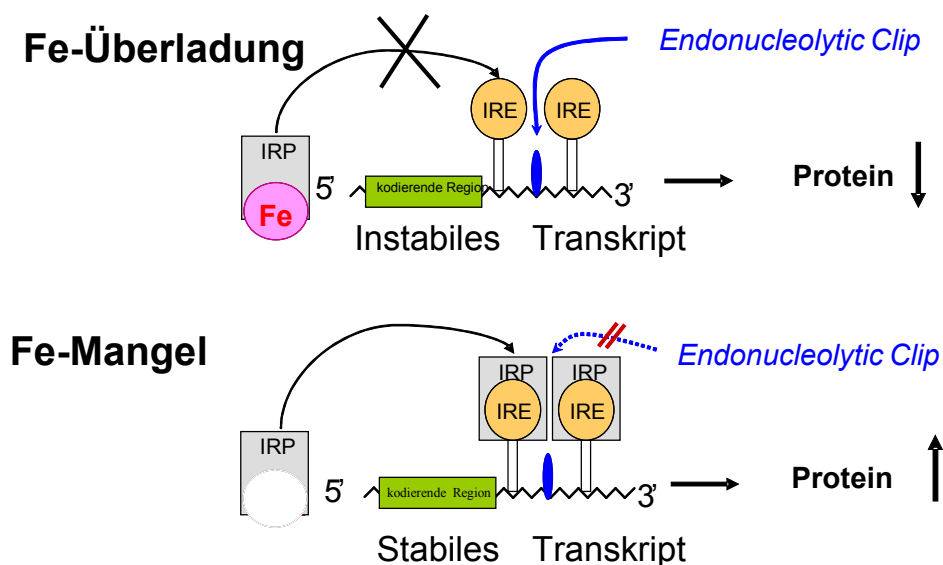


Abbildung 3: **Regulation der Transferrinrezeptor-Expression** bei Eisenmangel und Eisenüberschuss, durch IRE/IRP-Interaktion (Hentze und Kuhn 1996).

Im Gegensatz dazu enthält die mRNA des Ferritins das IRE in der 5'-UTR (Hentze et al 1987). Ist der Eisengehalt der Zelle hoch, vermindert sich die Bindung des IRP an das IRE. Aus diesem Grund ist es dem Präinitiations-Komplex möglich, sich an das IRE anzulagern. Dies führt zu einer vermehrten Expression des Ferritins. Kommt es zu einer Verminderung des Eisengehaltes in der Zelle, bindet das IRP an das IRE. Die Interaktion des Präinitiations-Komplexes wird verhindert und somit nimmt die Transkription des Ferritins ab (Abb.4) (Hentze und Kuhn 1996).

## Ferritin- Regulation durch IRE/IRP

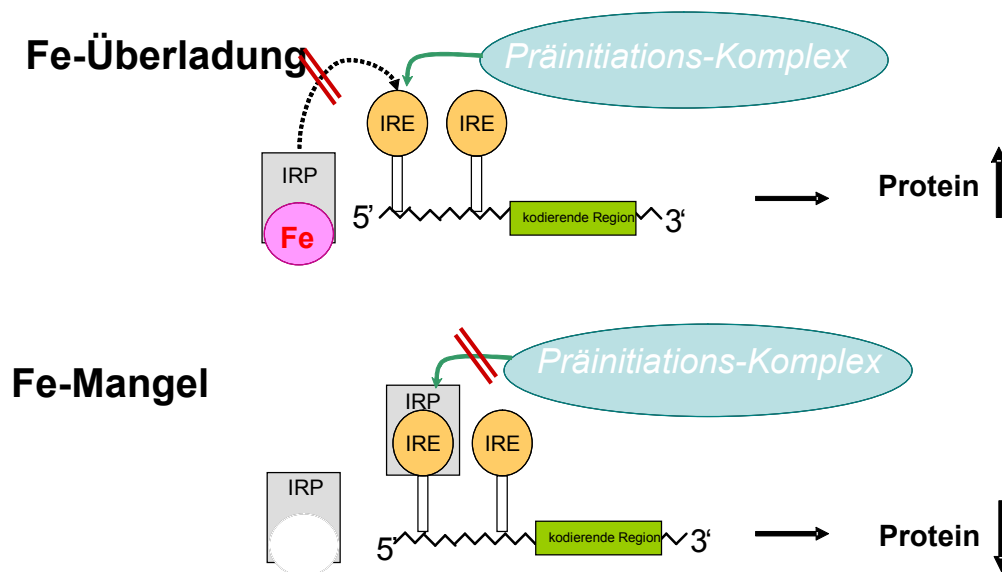


Abbildung 4: **Regulation der Ferritin-Expression** bei Eisenmangel und Eisenüberschuss durch IRE/IRP-Interaktion (Hentze und Kuhn 1996).

Durch diesen Mechanismus wird ersichtlich, dass ein hoher intrazellulärer Eisengehalt zu einer Suppression des TfR führt. Die Zelle wird vor zu hohem Eisengehalt geschützt. Gleichzeitig kommt es zur Erhöhung des Ferritins, um das vermehrte Eisen zu binden.

Unter normalen Bedingungen sind nur ca. 10 % des IRP1-Pools aktiv, erst durch Zugabe von DFO erhöht sich die Aktivität der IRE-Bindung auf 100%. Zellen sind abhängig vom Gleichgewicht zwischen mRNA-gebundenem und freiem IRP (Seiser et al 1995). Dies gibt

ihnen die Möglichkeit, auf Änderungen im Eisenlevel oder des Eisenbedarfs flexibel zu reagieren.

### **1.12 IRP1 und oxidativer Stress**

Das IRP1 wird nicht nur durch das zytosolische Eisenlevel reguliert. Auch oxidative Substanzen wie  $H_2O_2$  beeinflussen die Konformation des IRP1. Die vier Fe-S-Cluster sind sehr sensitiv für oxidative Substanzen. Dies zeigt sich im Verlust der Aconitase-Aktivität des Clusters. Bei *Drosophila* führt die Exposition gegenüber dem Superoxid-generierenden Wirkstoff Paraquat bei erwachsenen Tieren zu einer Konversion der zytosolischen Aconitase zu aktivem IRP1 (Missirlis et al 2003).

Wahrscheinlich verhindert oder hemmt Superoxid den Einschluss des vierten Fe-Atoms in das Fe-S-Cluster (Liochev and Fridovich 1994). Es kommt zu einem Verlust der Aconitase-Aktivität und einer nicht physiologischen Erhöhung der IRE/IRP-Bindungsaktivität. Dies führt in B6-Zellen zur Erhöhung des TfR-mRNA-Levels und vermindert die Ferritin-Synthese (Pantopoulos und Hentze 1998). Aber nicht in allen Zelllinien ist dieser Effekt in gleicher Weise zu bemerken. (Starzynski et al 2005) beschrieben auch eine Aconitase-Verminderung, sahen aber ebenfalls eine Verminderung des IRP1-Protein- und des mRNA-Gehalts in der Leber.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht (Danzeisen et al 2006).

### **1.13 Fragestellung**

In vielen Arbeiten mit verschiedenen biologischen Systemen wird eine Verbindung zwischen SOD1 und dem Eisenstoffwechsel beschrieben. In dieser Arbeit soll ein Zusammenhang zwischen SOD1 und dem Eisenstoffwechsel in Säugetierzellen untersucht werden. Aufgrund der Relevanz der SOD1 in der ALS-Pathogenese werden humane Gliazellen als Zellmodell verwendet, welche WT- und mutierte-SOD1 exprimieren.

Neben der Fragestellung aus der Grundlagenforschung, ob eine Verbindung zwischen SOD1 und eisenregulierten Proteinen besteht, interessierte uns zusätzlich die klinisch relevante Fragestellung, inwiefern Veränderungen im Eisenstoffwechsel zur ALS Pathogenese beitragen können.

Inbesondere ist es Ziel meiner Arbeit, folgende Fragen zu beantworten:

Regulieren Gliazellen die Expression des Transferrinrezeptors als Folge eines geänderten Eisen-Status?

Ändert sich die Expression der wichtigsten Eisenstoffwechsel-Proteine, TfR und Ferritin, in einem Zellmodell für „ALS-Glia“?

Durch welchen Mechanismus werden diese Veränderungen verursacht?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien:

[ <sup>32</sup> P]CTP 60 µCi	Amersham
Acrylamide	BioRad
Ammoniumpersulfate	Sigma
AMPS	Sigma
BamH1	Promega
Benchmark prestained Protein Ladder	Invitrogen
Borsäure	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
Butanol	Merck
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Cytidine 5'-[α- <sup>32</sup> P]triphosphate	Amersham
DEPC-treated H <sub>2</sub> O	Promega
DFO	Sigma
Digitonin	Roth
D-MEM/F12, liquid 1:1	Gibco
DTT	Promega
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham
EcoRI und XhoI	New England Biolabs
Expressions Vektor für siRNAs	Drs. T. Tuschl und T. Achsel
FBS	Biochrom AG
FeCl <sub>3</sub>	Sigma
Geneticin	Invitrogen
Glycerin	Roth
Glycerol	Sigma
HEPES	Promega
Hyperfilm ECL	Amersham
Lipofectamine 2000	Invitrogen

Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Sigma
NaCl	Sigma
Nitrocellulose Membran	Amersham
PBS	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG
Protein detection kit	Sigma
rATP,	Promega
rCTP	Promega
rGTP,	Promega
RNase	Calbiochem
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega
T7 RNA polymerase	Promega
Running-buffer Buffer NuPAGE® Tris-Acetate SDS (20X)	Invitrogen
rUTP	Promega
Saccharose 0,25M	Roth
SDS solution 10%	Sigma
SDS	Sigma
Skim milk powder	Sigma
TBE	Sigma
TEMED	Promega
Transcription Optimized 5X Buffer	Promega
Tris	Sigma
Trypsin	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Tween 20	BioRad
Whatman Filter (1 MM)	BioRad
<b>2.1.2 Vektoren:</b>	
pRC/CMV	Invitrogen
pcDNA3	Invitrogen
pSPT-fer Plasmid für IRE/IRP Bindungsassay	freundlicherweise überlassen von:C. Bouton, Institut de Chimie des Substances Naturelles,

Centre National de la  
Recherche Scientifique,  
Avenue de la Terrasse,  
91190 Gif-sur-Yvette,  
France

Original von L C Kühn  
Swiss Institute for  
Experimental Cancer  
Research, Genetics Unit,  
Epalinges.

### 2.1.3 Antikörper:

anti-Cu,Zn SOD, rabbit polyclonal  
Mouse anti-human TfR  
Mouse anti-human Actin  
Rabbit anti-mouse IgG polyclonal  
Sheep anti-human Ferritin  
Goat anti-sheep IgG

Stressgen  
Zymed  
Sigma  
Santa Cruz  
The Binding Side  
Sigma

### 2.1.4 Zellen:

Zelllinie U373 MG

ECACC (European  
Collection of Cell Cultures,  
<http://www.ecacc.org.uk>,  
ECACC-Cat.Nr. 89081403,  
human glioblastoma  
astrocytoma).

### 2.1.5 Geräte:

Flowcabinet und Inkubator mit 37°C, 5% CO<sub>2</sub>  
Kulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>, mit Filter-Top  
Sonopuls GM70  
Gesamte Western Blot Ausrüstung von:

Heräus  
Nunc  
Bandelin  
BioRad

384 well Platten	Nunc
NucAway Spin Columns	Ambion
Geltrockner	BioRad
Storm Imaging System	Amersham Biosciences

### 2.1.6 Rezepte:

Medium für Zellkultur:

D-MEM/F12	500ml
FBS	75ml
Penicillin/Streptomycin	10ml

BSS:

NaCl	40g
KCl	2g
1M Lösung CaCl <sub>2</sub>	5ml
1M Lösung MgCl <sub>2</sub>	5ml
HEPES	23.85g
aauflösen in H <sub>2</sub> O	500mg

Menge immer für 1 Gel

6% Polyacrylamid gel für IRE/IRP-Bindungsassay:

Acrylamide 40 %	7.5 m
TBE 10 X	1.5 ml
H <sub>2</sub> O	41 ml
APS 10%	600 µl
TEMED	30 µl

Gel für Ferritin Blot:

15% Lower Gel:

Acrylamide (30%)	5ml
Tris-HCl 3 M pH 8,8	1,25ml
10% SDS	100µl
H <sub>2</sub> O	3ml

10% APS	82,5 $\mu$ l
TEMED	8,25 $\mu$ l
<u>4% Upper Gel</u>	
Acrylamide (30%)	0,53ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1ml
10% SDS	40 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2,4ml
10%APS	50 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

Gel für TfR-Blot:

7.5% Lower gel

Acrylamide (30%)	1,5ml
3M Tris-HCl, pH 8,8	1,5ml
H <sub>2</sub> O	3ml
10% SDS	60 $\mu$ l
10%AMPS	20 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

4% Upper gel

Acrylamide (30%)	0,45ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,8ml
H <sub>2</sub> O	0,75ml
10% SDS	30 $\mu$ l
10% AMPS	9 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

Loading-dye für TfR-Blot:

1M Tris-Cl pH 6.8	2.4ml
20% SDS	3ml
Glycerol (100%)	3ml
0,1% Bromophenol blue	zum Blaufärben

10x Tris-Gly Stock:

192mM Glycerin	144,13g
250mM Tris, pH 8,3	30,28g
in 1l H <sub>2</sub> O	

Transfer-buffer für Ferritin-Blot:

Methanol	200ml
10x Tris-Gly	100ml
zu einem Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

Running-buffer für Ferritin-Blot:

10x Tris-Gly stock	50ml
10% SDS	5 ml
zu 500 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

4x SRe Lab:

Tris-HCl 1M, pH 6,8	5ml
2-Mercaptoethanol	5ml
Glycerol	10ml
20% SDS	5ml
0,1% Bromphenol Blau	zum Blaufärben

Reaktionspuffer für IRE/IRP-Bindungsassay

für 20µl Reaktionsvolumen

5x Transcriptions Buffer	4µl
AGU-TP 10X (0.5 mM final conc.)	2 µl
DTT 0.1 M	2µl
CTP (cold) 0.6 mM	0,7µl
32P-CTP 60 µCi	3µl
linearisiertes DNA-Template (1µg/µl)	1-2 µl
DEPC-treated H <sub>2</sub> O 1	20µl
Rnasin (40U/µl, Promega)	0,5 µl
T7 RNA polymerase (20 U/ml)	1.0 µl
1h 38°C	

---

T7 RNA polymerase (20 U/ml) 1.0  $\mu$ l  
1h 38°C

### **2.1.7 Statistik:**

Scannerprogramm GIMP 2.2.4 Released

Berechnung der OD ImageJ

Microsoft® Excel 2002, Copyright® Microsoft Corporation 1985-2001

Sigma Plot 2004 for Windows Version 9, Copyright® 2004 Systat Software Inc

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zelllinie und Transfektion**

Die Zelllinie menschlichen Glioblastomzellen U373 MG wurden transfiziert mit dem Vektor pRC/CMV, die dort enthaltene DNA kodiert entweder für die Wildtyp-SOD1 oder für die mutierte SOD1 (G93A oder H46R). Die Transfektion wurde mit Lipofectamine 2000 nach dem von Invitrogen vorgeschlagenen Standardprotokoll durchgeführt. Monoklonale Zelllinien wurden isoliert und die Anwesenheit von Transgenen mit Hilfe von PCR und Sequenzierung der SOD1-Transkripte überprüft.

Die transfizierten Zelllinien wurden im Laboratorium von Prof. M.T. Carri, Fondazione Santa Lucia, EBRI, Rom etabliert. Ich bin dankbar, dass ich diese Zellen im Rahmen einer Laborzusammenarbeit nutzen konnte.

### **2.2.2 Ernten der Zellen**

Die Zellen wuchsen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> innerhalb einer Woche in einem Medium aus D-MEM/F12, FBS und Penicillin/Streptomycin, bis sie ca. 60-70 % konfluent waren. In diesem Stadium wurden sie für 18 Stunden mit 0, 10, 20, 50 oder 100 µM FeCl<sub>3</sub> bzw. DFO im Nährmedium inkubiert. Diese Zeit der Inkubation wurde gewählt, da frühere Arbeiten nach 18 Stunden den maximalen Effekt gesehen haben (Gambling et al 2001, Rao et al 1986). Danach wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Nährmedium entfernt und die Flaschen dreimalig mit 10 ml 4°C kaltem BSS gespült. Am Ende des Waschvorgangs wurden 5 ml kaltes BSS in die Flasche gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen daraufhin vom Flaschenboden gelöst und mittels einer Pasteurpipette in ein 15-ml Röhrchen transferiert. Der Ablösevorgang wurde mit weiteren 5 ml BSS wiederholt. Anschließend wurde das Röhrchen mit der BSS/Zellsuspension bei 4°C und 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen der überstehenden BSS wurden die Zellen in 500 µl kalter BSS resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Sonoplus GM70 mit 20% der max. Amplitude für 10s homogenisiert und anschließend in 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.



### 2.2.3 Western Blot für Transferrinrezeptor

Nachdem die Proben auf Eis völlig aufgetaut waren, wurden je 20µl der Probe mit 20µl loading-dye gut gemischt. Zum Denaturieren wurde das Gemisch für 5 min bei 100°C in einem Thermocycler gekocht und dann wieder auf 4°C abgekühlt. Für die Elektrophorese wurden Acrylamid Gele hergestellt (Lower und Upper Gel nach Rezept). Zuerst wurde das untere Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Erkalten wurde der obere Teil mit dem 2. Gemisch ergänzt. Mit Hilfe eines Kammes wurden die Ladegruben freigehalten. Die Elektrophorese von 2 Gelen wurde in einer Elektrophoresekammer bei 150 mV für eine Stunde durchgeführt. Pro Ladegrube wurden 30 µl Probe und loading-dye Gemisch geladen. Als Puffer wurde Running-buffer verwendet. Um das molekulare Gewicht jeder Bande bestimmen zu können wurde jeweils in die erste Ladegrube BM gegeben.

Für den Transfer wurden alle Materialien in Transfer-buffer vorinkubiert. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, zwischen zwei Whatman Filter und zwei Schwämmen. Zum Transfer wurden alle Schichten in eine Transferkassette geklemmt und in einer Transferkammer für 2 Gele über Nacht bei 90 mA oder wahlweise auch bei 350 mA für eine Stunde transferiert.

Um die Stärken der Banden zu dokumentieren, wurde die Membran nach dem Transfer mit einem *Protein detection kit* gefärbt und anschließend eingescannt. Die Entfärbung und das gleichzeitige Blockieren der Proteine auf der Membran fand mit einer Blocking Solution aus 5% skim milk in 10 ml PBS-Tween Puffer statt. Nach einer Blockierzeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Membran mit dem Erstantikörper mouse anti-human TfR Rezeptor 1:5000 und Erstantikörper mouse anti-human Actin 1:1500 in 5% skim milk/PBS für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend in der Reihenfolge PBS, PBS-Tween, PBS-Tween und PBS für je 5 min gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für eine weitere Stunde mit dem Zweitantikörper rabbit anti mouse IgG polyclonal 1:5000 in 5% skim milk/PBS inkubiert. Danach folgte ein Waschvorgang wie zuvor beschrieben. Die Membran wurde dann mit *ECL-Detection Reagents* inkubiert. Das entstehende Lichtsignal wurde in der Dunkelkammer mittels Kodakfilm detektiert. Der Film wurde für 1, 2, 10, 30 und 60 Sekunden belichtet und entwickelt. Aus den entwickelten Bildern wurde mit Hilfe von ImageJ die „optical density“ (OD) und somit die Stärke der Banden gemessen.

### 2.2.4 SOD1-Knockdown-Klone

In dieser Studie wurde ein Plasmid verwendet, das für die Expression einer Stem-Loops in Säugerzellen geeignet ist. Es benutzt den RNA Polymerase III-spezifischen Promotor des menschlichen H1-RNS Gens und enthält am 3' Ende der Expressionskassette einen dT<sub>6</sub> Transkriptionsterminator. Zwischen Promotor und Terminator wird das DNA-Fragment, das für den jeweiligen Stemloop kodiert, in die dafür vorgesehenen EcoRI und XhoI Schnittstellen eingefügt. Die vermutete Transkriptions-Startseite ist das erste Nukleotid nach der EcoRI-Seite. Hier wurde ein 23 bp langer Stem-Loop gewählt, der den Nukleotiden 646-668 (Nummer entsprechend des gb-Eintrags NM\_000454) in der 3'UTR des menschlichen SOD1-Genes entspricht. Der 3'Teil der Stem-loop entspricht dem codierenden Strang der mRNA und der 5'Teil enthält den entsprechenden Gegenstrang. Die Helix wird durch einen künstlichen Tetraloop (UUCG) geschlossen, und am 3' Ende wird ein weiterer dT<sub>6</sub> Terminator eingefügt. Das EcoRI-XhoI-Fragment, das für diesen Stem-Loop kodiert, wurde chemisch synthetisiert und in den Stem-loop-Expressionsvektor subkloniert. Die Sequenz wurde durch Dideoxy-Sequenzierung bestätigt.

Dieses Plasmid wurde mir freundlicherweise von Tilmann Achsel Fondazione Santa Lucia, EBRI, Rom, zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion der Zellen wurde wie oben (Zelllinien und Transfektion) beschrieben durchgeführt. Diese Zellen wurden in einem Medium weitergezüchtet, das 6 µl Geneticin pro ml enthält. Während den nächsten sechs Wochen wurde alle 48 Stunden das Medium gewechselt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche abgelöst. Von der nun entstandenen Suspension wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt mit 0.5, 1 bzw 2 Zellen pro 1 ml Suspension. Jede Verdünnung wurde auf einem *well* der 384-Wellplatte aufgebracht. Die Zellen wurden während der nächsten 6 Wochen beobachtet und nur *wells*, die Einzel-Klone enthielten, wurden weiterverwendet. Als diese Wells konfluent waren, wurde jeweils in den einzelnen Zellklonen die SOD1-Expression per Western Blot gemessen. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen sehr stark an der Oberfläche der Wells anhaften und deshalb der Puffer vorher erhitzt werden sollte. Vier dieser Zellklone enthielten weniger als 49% der SOD1- Expression verglichen mit nicht transfizierten Klonen. Von diesen Zellen wurde mit Hilfe des Western Blot den TfR-Proteingehalt gemessen.

### 2.2.5 Western Blot für Ferritin

Die Zellproben wurden im Verhältnis 1:4 mit SReLab gemischt. Das Gemisch wurde dann für 20 Minuten gekocht und anschließend auf Eis etwas abgekühlt. In die Ladegruben des Gels sollten max. 30µl pro Grube geladen werden. Wieder wurde in die erste Grube BM gegeben. Da der SReLab sehr geruchsbelästigend ist, wurde das Laden der Gele wie auch die Elektrophorese unter einem Abzug durchgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Kammer von Biorad bei 25mA/Gel mit Running-buffer durchgeführt, so lange bis sich der BM von 20kDa im unteren Drittel des Gels befand. Je 2 Gele wurden in eine Transferkammer gegeben und in Transfer-buffer bei 200mA für 2h transferiert.

Als nächster Schritt folgte das Blockieren der Membran über Nacht bei 4°C in 5% skim milk/PBS-tween. Nach einmaligem Waschen mit PBS, folgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit sheep anti-human Ferritin 1:400 in 5% skim milk/PBS. Nach dem Inkubieren wurde die Membran zweimal 5 min in PBS, dreimal 10 min in PBS-tween und zweimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit dem Zweitantikörper (Goat anti sheep IgG) 1:2500 für 2 Stunden inkubiert. Vor der Inkubation mit *ECL-Detection Reagens* wurde die Membran noch einmal gewaschen (5 min in PBS, dreimal 5 min in PBS-tween und 5 min in PBS). Nach Inkubation wurde die Membran in der Dunkelkammer belichtet und anschließend entwickelt. Die Messung der Banden erfolgte wiederum mit ImageJ.

### 2.2.6 IRE/IRP-Bindungsassay

#### Präparation von Zellextrakten

Es wurden zytosolische, mitochondrienfreie Extrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen ( $4-5 \times 10^6$ ) geerntet, mit eiskaltem PBS gewaschen und in 0,25M Saccharose, 100 mM HEPES und 0.007% Digitonin bei pH 7,4 resuspendiert. Die Digitonin-Stock-Lösung (5%) wurde in DMSO hergestellt und in einer Endkonzentration von 0,007 % verwendet. In dieser Konzentration permeabilisiert Digitonin selektiv Plasmamembranen und lässt Mitochondrienmembranen intakt. Das Gemisch wurde vorsichtig geschüttelt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1800g wurde der Überstand für eine weitere Stunde bei 4 °C und 100000g ultrazentrifugiert. Für alle weiteren Schritte wurde der Überstand nach Ultrazentrifugation verwendet.

Präparation von einer [<sup>32</sup>P]CTP-markierten IRE-RNA-Sonde:

Um die Bindungsaktivität von IRP in den obigen Zellextrakten zu analysieren, wurde eine [<sup>32</sup>P]CTP-markierte IRE-RNA-Sonde durch eine in vitro-Transkription des pSPT-fer Plasmids hergestellt. Dieses enthält die korrespondierende DNA-Sequenz zum IRE der 5'-UTR der schweren Kette der humanen Ferritin-mRNA.

1 µg des Plasmids wurde mit BamH1 linearisiert, und dann in vitro transkribiert mit T7-RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in folgendem Puffer durchgeführt: 0,5 mM ATP, GTP und UTP, 0,02 mM CTP, 20 Units von RNase-Inhibitor-Rnasin, 10 mM DTT und 60 µCi von [<sup>32</sup>P]CTP (~800Ci/mmol), in 20µl Reaktionsvolumen. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal für eine Stunde bei 38°C mit je 20 Units von T7-RNA-Polymerase inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize für 15 min bei 37°C unter Zugabe von 3µl Rnase freier Dnase 10U/µl verdaut. Als nächster Schritt wurde eine RNA-Extraktion mit Hilfe einer Säule (NucAway Spin Columns) durchgeführt. Diese Säule liefert die aufgereinigte RNA in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Radioaktivität der aufgereinigten RNA-Sonde (1µl) gemessen.

Die IRE/IRP-Bindungsaktivität wurde durch Inkubation von 2-5 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischem Extrakt mit einem Exzess von 40000 cpm [<sup>32</sup>P]CTP-markierter Ferritin-IRE-Sonde gemessen. Das Reaktionsgemisch ist zusammengesetzt wie folgt: 20µl, bestehend aus 10mM HEPES, ph 7,6, 40mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 5% Glycerol. In einem parallelen Experiment wurden die Proben mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) in einer Konzentration von 2% vorbehandelt. Dies muss vor der Zugabe der IRE-Probe geschehen, um eine volle Expression der IRE-Bindungsaktivität des Ferritins zu ermöglichen. Dabei reduziert 2-ME und „öffnet“ alle Fe-S-Cluster und ermöglicht so die maximale Bindungskapazität. Nach einer Inkubation bei RT von 20 Minuten folgt eine 10-minütige Inkubation bei RT mit 1µl RNase 1 U/µl, um die ungebundene RNA-Sonde zu verdauen. Danach wurden die unspezifischen RNA-Protein-Interaktionen durch Zugabe von 2µl Heparin (50 mg/ml) für 10 min bei RT verdrängt. Zur Elektrophorese wurde den Proben 5 µl loading-dye gegeben. Es wurden 16 µl des Gemisches geladen. Die Elektrophorese wurde bei 200-220V ca. zwei Stunden bei 4°C durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einem 4% Acrylamid Gel und 0,3x TBE-buffer aufgetrennt. Als Kontrolle wurde auch eine in vitro-Transkription des pSPT-fer Plasmids ohne [<sup>32</sup>P]CTP, mit 0,5 mM CTP durchgeführt. Die unmarkierte Sonde wurde in einem weiteren parallelen Reaktionsgemisch eingesetzt, um die Spezifität der auftretenden Bande zu verifizieren.

Das Gel wurde mit Hilfe eines Gel-Trockners getrocknet und für 48 Stunden in eine Phosphor-Entwicklungskassette gelegt. Sichtbar gemacht wurden die Bilder mit Storm Imaging System. Um die Stärke der Banden zu messen, wurde wiederum ImageJ verwendet.

### **2.2.7 Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Scannerprogramms GIMP 2.2.4 Released und unter Verwendung des Scanner EPSON Perfection 1260 und ImageJ. Die abschließende Statistik wurde mit Excel und Sigma Plot 2004 for Windows erstellt. Als statistisches Verfahren wurde der t-Test angewendet. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde eine Signifikanz angenommen.

Für alle Messungen wurde die OD verwendet. Die OD ist das Absorptionsvermögen eines Optischen Elements für eine bestimmte Wellenlänge pro Einheit Entfernung. Sie wird in ODU angegeben.

Zur Berechnung der Expression aller Proteine wurde die OD des zu messenden Proteins durch OD-Aktin geteilt. Wann immer im Text von OD gesprochen wird handelt es sich um diesen Quotienten. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Veränderung der Expression nicht auf die Veränderung des Gesamtproteins in den einzelnen Zellen zurückzuführen war. Die OD von nicht transfizierten Zellen und Zellen, die nicht mit  $\text{FeCl}_3$  behandelt wurden, wurde immer auf 100 normiert. Die Ergebnisse der anderen Konzentrationen bzw. Zellklone wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression des Transferrinrezeptors

Zunächst wurde die Expression des Transferrinrezeptors an nicht transfizierten U373-MG-Zellen mit Hilfe von Antikörpern (s. Material und Methoden) gemessen.

#### 3.1.1 Gliazellen (nicht transfiziert) nach Eiseninkubation

Es sollten die Veränderungen der TfR-Expression nach Zugabe von verschiedenen Eisenkonzentrationen ins Nährmedium bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Western Blots gemessen.

Um die unterschiedlichen Gesamtprotein-Konzentrationen in den einzelnen Zellen zu berücksichtigen, wurden immer TfR und Aktin gemessen (s. Abbildung 5).

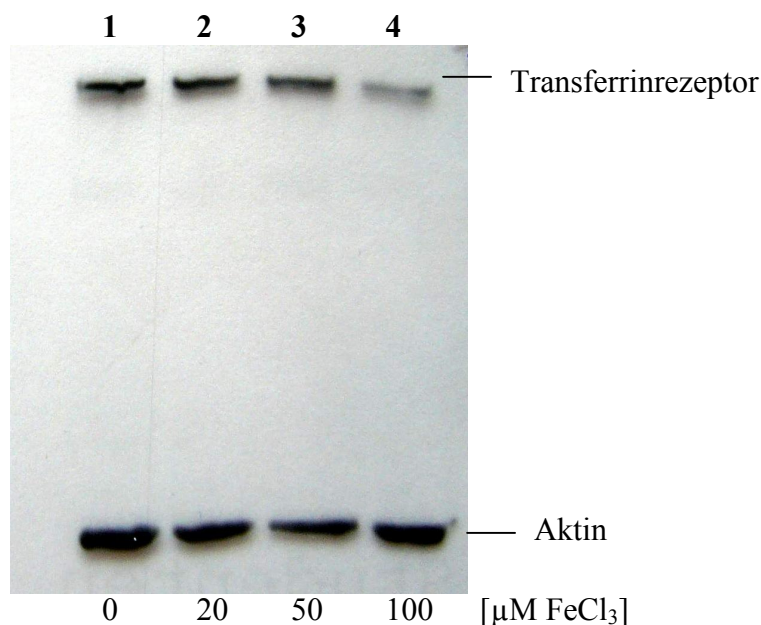


Abbildung 5: **Western-Blot Analyse zum Einfluss steigender Eisenkonzentrationen auf die Expression von Transferrinrezeptor und Aktin in nicht transfizierten U373-Zellen.**

Es ist eine Abnahme der Expression von Transferrinrezeptor mit steigender  $\text{FeCl}_3$ -Konzentration von Probe 1 zu Probe 4 anhand der verminderten Bandenstärke zu sehen. Die Messung des Aktins in den gleichen Zellen dient dazu, eventuelle Unterschiede im Gesamtproteingehalt der einzelnen Zellen zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Es wurde angenommen, dass Aktin von Eisen nicht reguliert wird. Um die Richtigkeit dieser Annahme zu bestätigen, wurde von jedem Blot eine Färbung der Nitrozellulosemembran mit *Protein Detection Kit* angefertigt (Abb. 6). Mit ImageJ wurde die OD von gut zu sehenden Banden gemessen. So konnte die Konzentration an Gesamtprotein mit der Konzentration von Aktin verglichen werden.

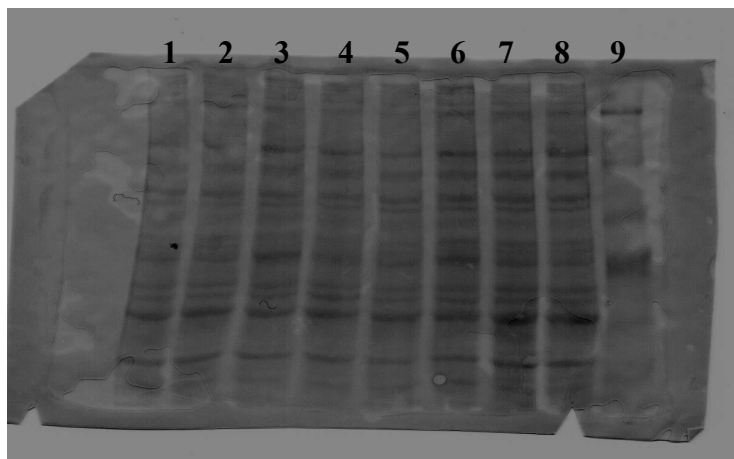


Abbildung 6: **Beispiel einer Nitrozellulosemembran nach Färbung mit Protein Detection Kit**

Durch die Färbung kommt das elektrophoretisch aufgetrennte Gesamtprotein zur Darstellung. Auf dieser Membran wurden 8 unterschiedliche Proteinproben aufgetrennt. Balken 9 stellt den Bench-Mark dar.

In jedem Balken sind die einzelnen elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Banden dargestellt. Die Stärke der Banden spiegelt die Proteinkonzentration wieder. Die Banden 6, 7 und 8 sind im gesamten dunkler und enthalten damit eine höhere Gesamtproteinkonzentration als z.B. Probe 1. Als Proben wurden U373-Gliablastomzellen untersucht.

Es konnte im überwiegenden Teil der Fälle ein linearer Zusammenhang zwischen den Gesamtprotein-OD-Werten und den Aktin-OD-Werten festgestellt werden (s. Abb. 7).

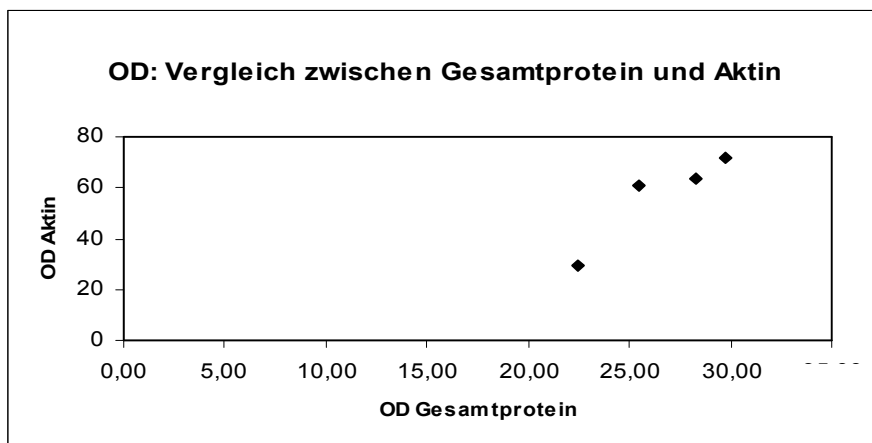


Abbildung 7: **Dargestellt ist die Optical Density (OD) von Aktin und des Gesamtproteingehalts einer exemplarischen Probe (U373 MG, nicht transfiziert)** Die Bandenintensitäten von Aktin und Gesamtprotein stehen in linearem Zusammenhang. Somit wird der Aktiningehalt in den jeweiligen Zellen nicht durch die Eisenkonzentration reguliert, sondern allein durch den Proteingehalt bestimmt.

Durch die Zugabe steigender Konzentrationen von Eisen als  $\text{FeCl}_3$   $0\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$  verringert sich die Expression des TfR (s. Abb. 8). Für die Berechnung wurden die Zellen mit  $0\mu\text{M}$  Fe auf 100 normiert und die anderen Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt.



Mit dem t-Test gerechnet bedeutet das eine Signifikanz bei:

Fe 0- Fe 50	P < 0,001	signifikant
Fe 0- Fe 100	P < 0,01	signifikant
Fe 10- Fe 50	P < 0,05	signifikant
Fe 10- Fe 100	P < 0,01	signifikant
Fe 20- Fe 50	P < 0,05	signifikant

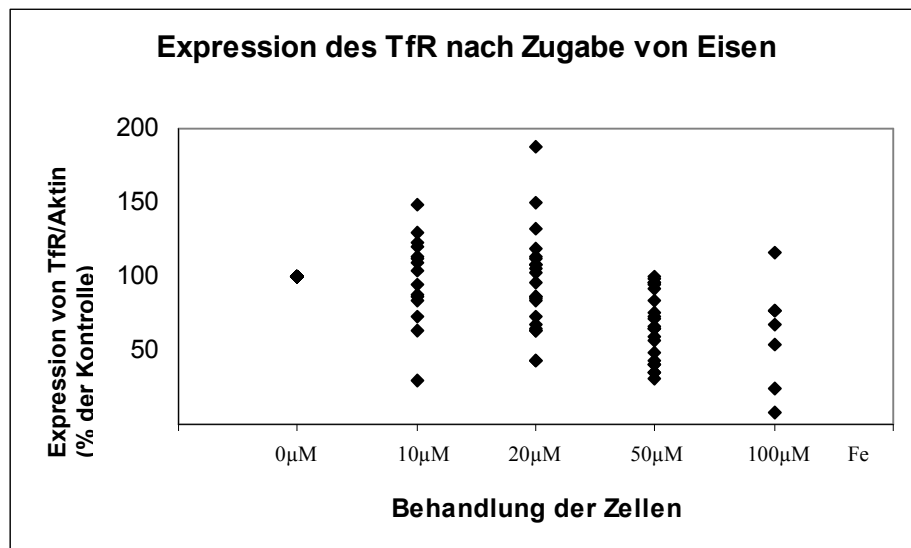


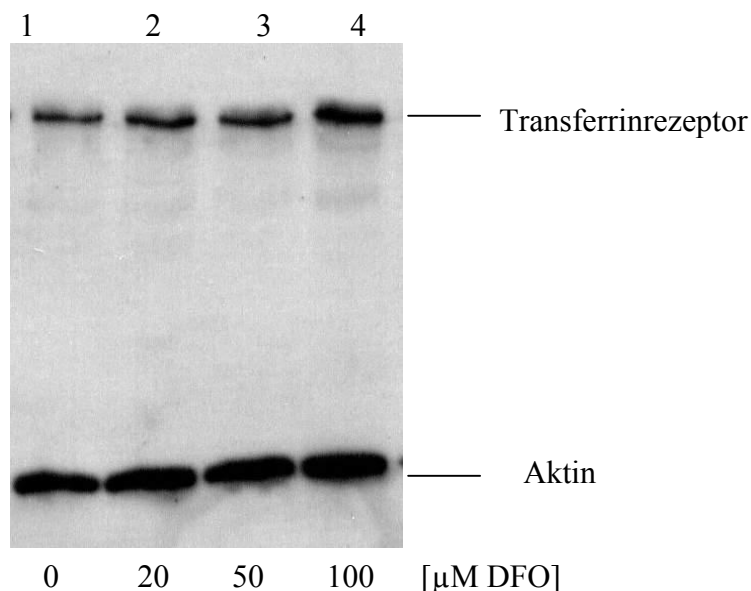
Abbildung 8: **Darstellung der Expression des TfR nach Zugabe von Eisen**

Zugabe von 0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Eisen für 18 Stunden im Nährmedium der Gliazellen. Dargestellt ist der Quotient OD TfR/OD Aktin, ausgedrückt als Prozent der Kontrolle. Als Kontrolle wurde der Quotient OD TfR/OD Aktin der unbehandelten Zellen (0  $\mu\text{M}$  Fe) auf 100 normiert. Jeder Punkt bedeutet eine eigenständige Messung. Es wurden 22 Messungen von Zellen mit Fe 0  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 15 Messungen von Zellen mit Fe 10  $\mu\text{M}$  und 7 Messungen von Zellen mit Fe 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

### 3.1.2 Gliazellen (nicht transfiziert) nach DFO-Inkubation

Des Weiteren wurde die Expression des Transferrinrezeptors nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von DFO ins Nährmedium gemessen. DFO ist ein Eisenchelatbildner (s. Abb. 9).

Wie bereits beschrieben, wurde wieder die Expression des TfR und des Aktins gemessen.



**Abbildung 9: Western-Blot Analyse zum Einfluss steigender DFO-Konzentration auf die Expression von Transferrinrezeptor und Aktin in nicht transfizierten U373-Zellen.**

Es ist eine Zunahme der Expression von Transferrinrezeptor mit Steigerung der DFO-Konzentration (und damit Verminderung der Fe-Konzentration) von Probe 1 zu Probe 4 zu sehen. Die Bandenstärke der einzelnen Proben nimmt zu. Die Messung des Aktins in den gleichen Zellen dient dazu, eventuelle Unterschiede im Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Durch Zugabe steigender Konzentrationen von DFO ins Nährmedium verringerte sich die Konzentration an Eisen. Die schwindende Menge an Eisen führte in den Zellen zu einer Anhebung der Expression des Transferrinrezeptors (Abb. 10). Für die Berechnung wurden die Zellen mit 0µM DFO auf 100 normiert und die anderen Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt.

Mit dem t-Test gerechnet bedeutet das eine Signifikanz bei:

DFO 0- DFO 20	P < 0,01	signifikant
DFO 0- DFO 50	P < 0,01	signifikant
DFO 0- DFO 100	P < 0,05	signifikant

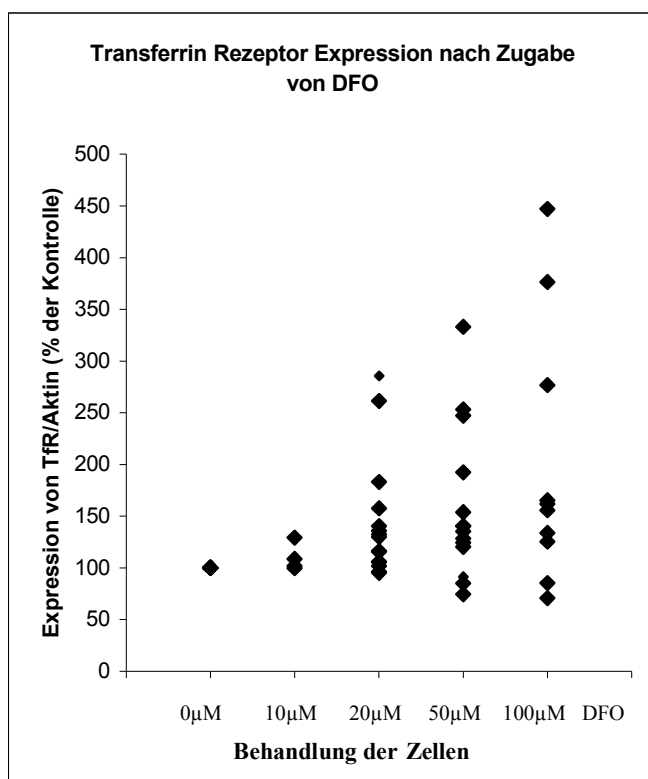


Abbildung 10: **Darstellung der Expression des Transferrinrezeptors nach Zugabe von DFO**

In Gliazellen wurde durch Zugabe von 0µM, 10µM, 20µM, 50µM, 100µM DFO für 18 Stunden im Nährmedium Fe-Mangel induziert. Dargestellt ist der Quotient OD TfR/OD Aktin, ausgedrückt als Prozent der Kontrolle. Als Kontrolle wurde der Quotient OD TfR/OD Aktin der unbehandelten Probe (0µM DFO) auf 100 normiert. Jeder Punkt bedeutet eine eigenständige Messung. Es wurden 15 Messungen bei DFO 0µM, 20µM, 50µM, 5 Messungen bei DFO 10µM und 10 Messungen bei DFO 100µM durchgeführt.

### 3.1.3 Gliazellen mit SOD1-Wildtyp oder SOD1-Mutante transfiziert

Es standen uns verschiedene Zelllinien zur Verfügung. Diese Zellen wurden mit WT-SOD1, G93A- oder H46R-Mutante der SOD1 transfiziert (s. Material und Methoden). Die ursprüngliche Zelllinie wurde ntg genannt. Zum Ausschluss von klonalen Effekten wurden von jedem Zelltyp verschiedene Klone verwendet. Die Zellen wurden mir freundlicherweise vom Labor von Prof. M.T. Carri, EBRI, Rom zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in Kulturflaschen für ca. eine Woche gezüchtet, bis ca. 60-70% Konfluenz erreicht war. Anschließend wurde mit Hilfe des Western Blots die Expression des Transferrinrezeptors gemessen.

Auch hier wurde von jeder Probe die gleiche Gesamtprotein-Menge geladen und die OD von Transferrinrezeptor und Aktin gemessen (s. Abb. 11).

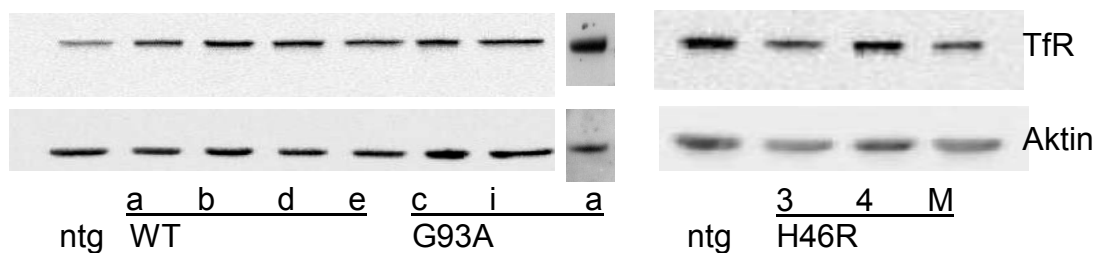


Abbildung 11: **Western-Blot Analyse von Tfr und Aktin in transgenen Zellen**

Fragestellung war der Einfluss der unterschiedlichen Mutationen im SOD1-Gen auf die Tfr-Expression in Gliazellen. Es sind Ausschnitte aus drei verschiedenen Western-Blot Filmen abgebildet. Der Western-Blot wurde in verschiedenen Zelllinien (ntg, WT, G93A, H46R) durchgeführt. „Ntg“ entspricht der nicht transgenen Zelllinie. „WT“ ist der mit Wildtyp SOD1 transfizierte Zellklon. „G93A“ und „H46R“ sind Zellklone, die mit der jeweiligen SOD1-Mutante transfiziert wurden. Von den WT- wurden 4 Klone, von G93A- 3 Klone und von H46R-Zellen 3 Klone gemessen. Die Messung des Aktins in den gleichen Zellen dient dazu, eventuelle Unterschiede im Gesamtproteingehalt der einzelnen Zellen zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Es ist zu sehen, dass es zu einer stärkeren Expression des Tfr sowohl bei Zellen mit WT- als auch G93A-SOD1 kommt, wobei die Erhöhung bei WT-Zellen etwas stärker ausgeprägt ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellklone, die mit einer H46R-SOD1 transfiziert wurden, keinen Unterschied zu ntg-Zellen (Abb. 12).

Mit dem t-Test gerechnet bedeutet das eine Signifikanz bei:

ntg – WT a	P < 0,01	signifikant
ntg – WT b	P < 0,01	signifikant
ntg – WT d	P < 0,05	signifikant
ntg – WT e	P < 0,05	signifikant
ntg – G93A a	P < 0,05	signifikant
ntg – G93A c	P < 0,05	signifikant
ntg – G93A i	P < 0,05	signifikant

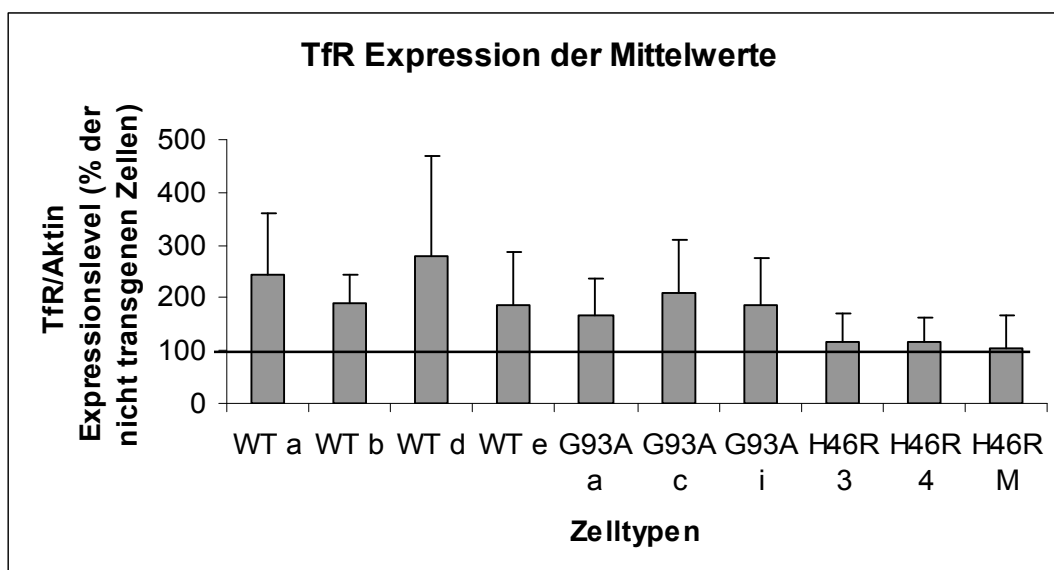


Abbildung 12: **Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Expression von TfR.**

Dargestellt ist der Quotient OD TfR/OD Aktin, ausgedrückt als Prozent der Kontrolle. Als Kontrolle wurde der Quotient OD TfR/OD Aktin der nicht transgenen Zellen auf 100 normiert, in der Abbildung als Linie dargestellt. Für WTa und G93Aa wurden jeweils 16, für ntg, WTb, WTd, WTe, G93Ac und G93Ai jeweils 8 und für die H46R-Klone jeweils 3 Einzelmessungen durchgeführt.

### 3.2 Expression der SOD1-Knockdown-Klone

Zur Bestätigung des Zusammenhangs zwischen SOD1-Aktivität und Expression des TfR wurden vier monoklonale SOD1-Knockdown-Zelllinien generiert. Mit dem Western Blot wurde der Proteingehalt sowohl der SOD1 als auch des Aktins dargestellt (Abb. 13). Um Änderungen im Gesamtprotein der Zellen auszugleichen, wurde immer mit dem Quotienten SOD1/Aktin gearbeitet. Die Klone 6, 7, 9 und 11 enthielten zwischen 18% und 49% der normalen SOD1-Expression. Diese Klone wurden später verwendet, um weitere Messungen des TfR-Niveaus durchzuführen.

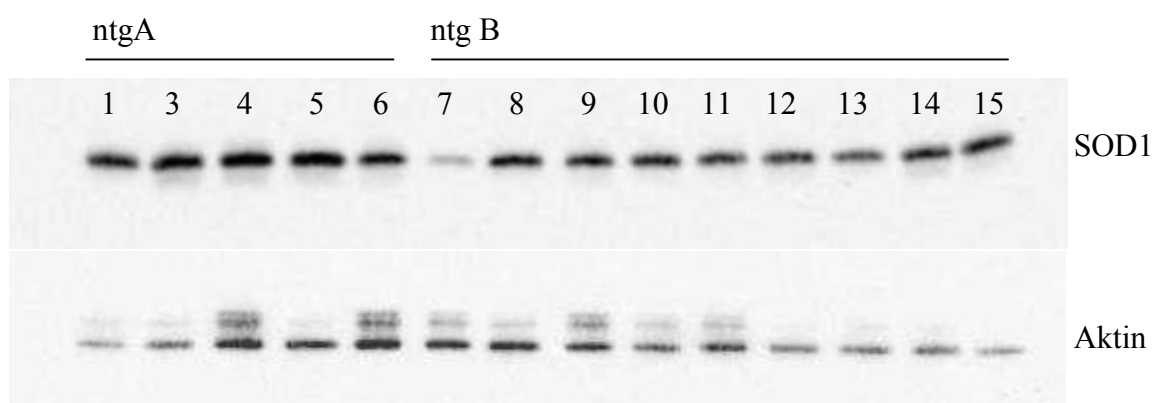


Abbildung 13: **Western-Blot Analyse zum Proteingehalt von SOD1 und Aktin**

Mit Hilfe eines Plasmids wurde die Expression des SOD1-Gens in verschiedenen Zellklonen herunter reguliert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Durchführung wurde der SOD1-Proteingehalt gemessen. Für dieses Experiment wurden der Zellstamm ntgA mit 5 Zellen und der Zellstamm ntg B mit 9 Zellen verwendet. Es wurde festgestellt, dass die Klone 6, 7, 9 und 11 zwischen 18% und 48% der normalen SOD1-Konzentration enthielten. Von diesen Klonen wurde im nächsten Schritt die TfR-Expression gemessen. Die Messung des Aktins in den gleichen Zellen dient dazu, eventuelle Unterschiede im Gesamtproteingehalt der einzelnen Zellen zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

In unbehandelten Zellen mit unveränderter SOD1- und unveränderter TfR-Proteinexpression wurden die SOD1- und TfR-Expressionswerte auf 100 normiert. In den SOD1-Knockdown-Zellen wurde zuerst die SOD1-Proteinexpression gemessen. Bei Zellen mit verminderter SOD1-Expression wurde dann die TfR-Proteinexpression ermittelt. Der Mittelwert aller erfolgreich durchgeführten Knockdown-Klone ergab eine Verminderung des SOD1-Proteinlevels auf 35%. In diesen Zellen wurde im Durchschnitt eine TfR-Expression von 71% im Vergleich zu ntg-Zellen (Abb. 14) gesehen. Allerdings konnte

keine Dosis-Wirkungs-Kurve beobachtet werden. Es war lediglich möglich, einen Trend zu beobachten.



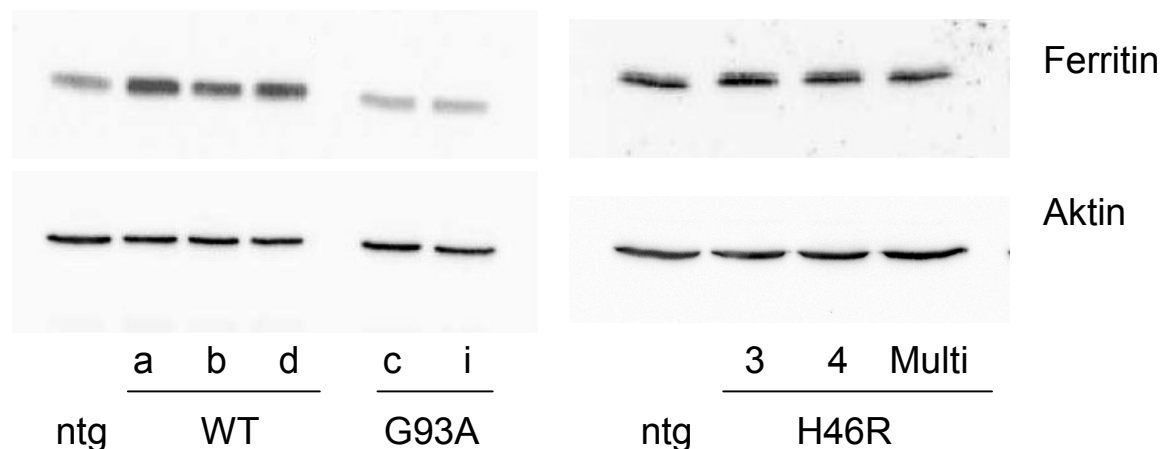
Abbildung 14: **Darstellung der Mittelwerte der SOD1/Aktin-Expression und der Transferrinrezeptor/Aktin-Expression in nicht transfizierten Zellen (ntg) und SOD1-Knockdown-Klonen.**

Es wurden 4 SOD1-Knockdown-Klone gemessen. Als Kontrolle wurden der SOD1- und TfR-Proteingehalt in unbehandelten Zellen (ntg) gemessen und auf 100 normiert (beide linksstehende Balken). Rechts sind die Mittelwerte der Zellklone mit vermindertem SOD1-Proteingehalt aufgetragen. Die Proteinexpression von SOD1 ist hellgrau dargestellt, die Expression von TfR schwarz.

### 3.3 Expression von Ferritin

Ebenfalls mit dem Western Blot wurde die Expression von Ferritin gemessen. Dafür wurde je ein Zellklon, der mit ntg-, WT- G93A-, H46R 3-, H46R 4- oder H46R M-SOD1 transfiziert wurde, beobachtet. Um zu zeigen, dass es sich bei WT und G93A nicht um einen klonalen Effekt handelt, wurde das Ergebnis einmalig in mehreren Klonen bestätigt (s. Abbildung 15).

#### 3.3.1 Gliazellen mit SOD1-Wildtyp oder SOD1-Mutante transfiziert



#### Abbildung 15: Western-Blot Analyse von Ferritin und Aktin in transgenen Zellen

Fragestellung war der Einfluss der unterschiedlichen Mutationen im SOD1-Gen auf die Ferritin-Expression in Gliazellen. Es sind Ausschnitte aus zwei verschiedenen Western-Blot Filmen abgebildet. Der Western-Blot wurde in verschiedenen Zelllinien (ntg, WT, G93A, H46R) durchgeführt. „ntg“ entspricht der nicht transgenen Zelllinie. „WT“ ist der mit Wildtyp SOD1 transfizierte Zellklon. „G93A“ und „H46R“ sind Zellklone, die mit der jeweiligen SOD1-Mutante transfiziert wurden. Von den WT- wurden 3 Klone, von G93A- 2 Klone und von H46R-Zellen 3 Klone gemessen. Die Messung des Aktins in den gleichen Zellen dient dazu, eventuelle Unterschiede im Gesamtproteingehalt der einzelnen Zellen zu erkennen und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Von jeder Transfektion wurden mehrere Klone gemessen, um klonale Effekte auszuschließen. Dargestellt sind Einzelmessungen. Teilweise sind die leichte und die schwere Kette des Ferritins zu unterscheiden. Beide wurden zur Berechnung der OD des Gesamtferritins verwendet.

Zur Berechnung der Expression wurde die OD des Gesamtferritins durch die OD des Aktins geteilt. Die ntg-Zellen wurden auf 100 normiert und die anderen Ergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt. Um klonale Effekte auszuschließen wurden einmalig mehrere Klone



der einzelnen Zelllinien gemessen. Es waren keine klonalen Effekte zu sehen. Somit wurden die restlichen Versuche und Berechnungen nur noch mit je einem Klon von ntg-, WT- und G93A-Zellen und 3 Klonen von H46R-Zellen durchgeführt.

Es ist zu sehen, dass es zu einer stärkeren Expression des Ferritin in WT-Zellen kommt, bei G93A- sowie H46R3-Zellen und H46R4 ergibt sich keine Unterschied zu ntg-Zellen (Abb. 16). Bei H46R M ergibt sich eine Verminderung der Expression.

Mit dem t-Test gerechnet bedeutet das eine Signifikanz bei

ntg - WT	P < 0,01	signifikant
ntg - H46R M	P < 0,01	signifikant
WT - G93A	P < 0,01	signifikant
WT - H46R 3	P < 0,5	signifikant
WT - H46R 4	P < 0,5	signifikant
WT - H46R M	P < 0,01	signifikant

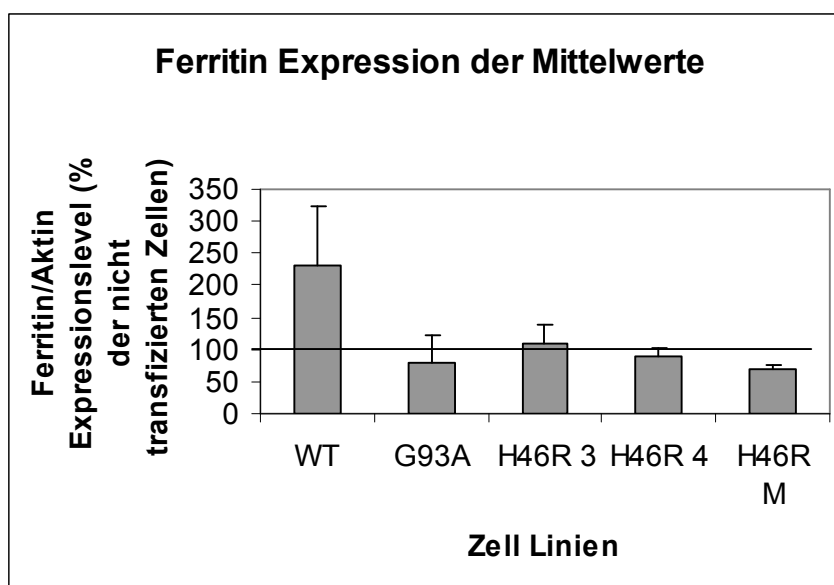
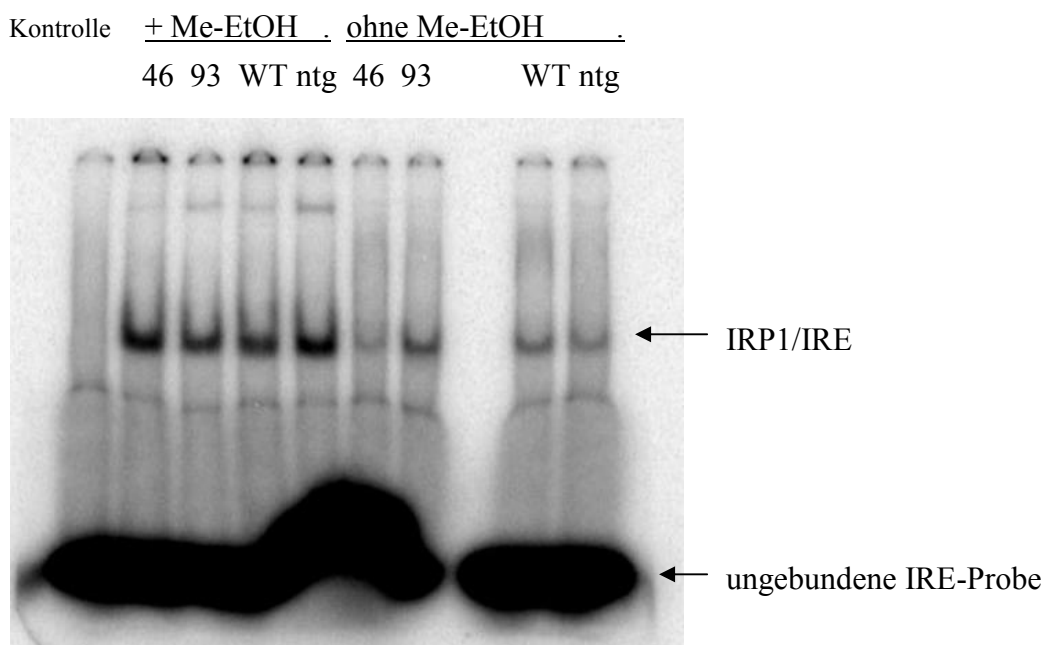


Abbildung 16: **Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Expression von Ferritin.**

Dargestellt ist der Quotient OD Ferritin/OD Aktin, ausgedrückt als Prozent der Kontrolle. Als Kontrolle wurde der Quotient OD Ferritin/OD Aktin der nicht transgenen Zellen auf 100 normiert, in der Abbildung als Linie dargestellt. Von ntg, WT und G93A wurden 7 Messungen, von den H46R-Zellklonen jeweils 3 Messungen durchgeführt.

### 3.4 IRP-IRE-Bindungsassay

Proteine, die im Eisenstoffwechsel eine Rolle spielen, werden hauptsächlich durch Interaktionen zwischen IRP und IRE reguliert. Mit einem IRE/IRP-Bindungsassay wurde getestet, ob die Änderungen auf Proteinniveau (Ergebnis Teil 2) durch diesen Mechanismus hervorgerufen werden. Hierfür wurden mit dem Western Blot ntg-, H46R-, G93A- und WT-Zellen (Abb. 17) verglichen.



#### Abbildung 17: Western-Blot Analyse zur IRP1/IRE-Bindung

Mit Hilfe einer radioaktiven IRE-Sonde wurde der IRP1-IRE-Komplex in den einzelnen Zellen sichtbar gemacht.

Banden von links nach rechts:

Kontrolle (Verdrängung der Bindung durch Zugabe einer nicht radioaktiv markierten IRE-Sonde), H46R, G93A, WT, ntg (jeweils mit Zugabe von Me-EtOH, um die maximale Bindung zu ermöglichen); H46R, G93A, WT, ntg (jeweils ohne Me-EtOH). Die mittlere Bande gibt die IRE/IRP-Bindungsaktivität an. Im unteren, sehr dicken Streifen ist die ungebundene IRE-Probe zu sehen, die im Überschuss zugegeben wurde.

Für die Bewertung der IRP1-Bindungsaktivität wurde die OD aller Banden gemessen. Der Wert der unbehandelten Proben wurde von der korrespondierenden Probe, die mit Me-EtOH behandelt wurde, subtrahiert. Somit sind die Ergebnisse invers.

Statistisch ergibt sich keine Signifikanz zwischen den verschiedenen Zelllinien. Somit konnte nur einen Trend beobachtet werden und dieser weist darauf hin, dass sich die IRP1-Bindungsaktivität sowohl bei den WT- als auch bei den G93A-Zelllinien erhöht (Abb. 18).

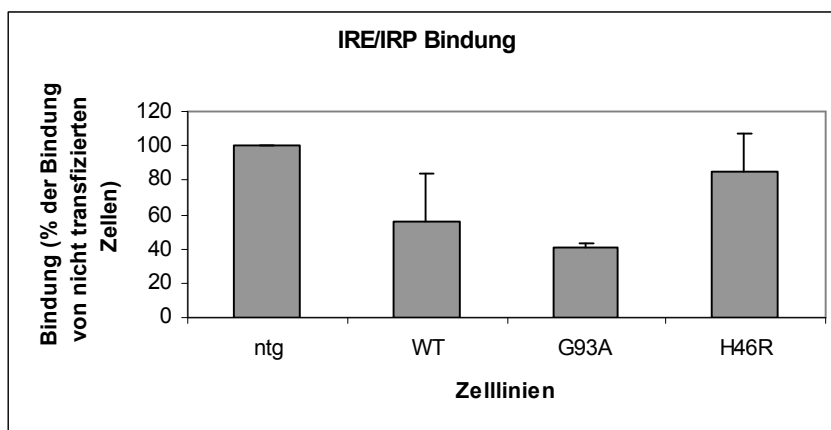


Abbildung 18: **Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IRP1-Bindungsaktivität.**

Darstellung der OD des IRP1/IRE Komplexes und damit der IRP1-Bindungsaktivität in Prozent der Kontrolle. Als Kontrolle wurde die OD der nicht transgenen Zellen auf 100 normiert. Die Darstellung ist invertiert, da jeder Messwert (nicht vorbehandelte Probe) von der korrespondierenden Probe mit maximaler Bindungskapazität (mit Me-EtOH vorbehandelte Probe) subtrahiert wurde. Somit weisen die niedrigen Werte der WT- und G93A-Zellen auf eine höhere IRP-Bindungsaktivität hin. ntg- und H46R-Zelllinien hingegen zeigen eine niedrigere Bindungsaktivität. Für alle Zelllinien wurden 3 Einzelmessungen durchgeführt.

## 4 Diskussion

Zur Untersuchung des Eisenstoffwechsels bei ALS haben wir uns für ein in vitro-System entschieden. Dieses System bietet einige Vorteile. Hervorzuheben ist hierbei die Möglichkeit der Herstellung und Untersuchung verschiedener SOD1-Mutationen. Nur so war es möglich, ntg- und WT-Zellen sowie die G93A- und H46R-Mutante miteinander zu vergleichen. Durch die Wahl dieses Systems bestand zudem die Möglichkeit, Einfluss auf das Eisenlevel zu nehmen und es nach unseren Vorstellungen zu verändern. Außerdem sprachen technische Gründe für dieses System. Es standen eine unbegrenzte Menge an Zellen als Material zur Verfügung und der Umgang gestaltete sich einfacher, da sich das Wachstum der Zellen planen und die Aufbereitung damit leichter organisieren ließ. Frühere Arbeiten nutzten zum Thema „SOD1 und Eisenstoffwechsel“ ebenfalls ein in vitro-System (De Freitas et al 2000; Srinivasan et al 2000). In diesen Arbeiten wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Untersuchung verschiedener Phänomene des Eisenstoffwechsels verwendet. Versuche in dieser Arbeit wurden an Glioblastomzellen durchgeführt. Die Übertragung der Fragestellung von der Hefe auf die Säugetierzelle sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich in der Hefe um universelle Mechanismen handelt, die in anderen Zellen und ultimativ auch in vivo von Bedeutung sein können.

In der Literatur gibt es viele gut beschriebene Hinweise über den Mechanismus der Eisenhomöostase (Hentze und Kuhn 1996). Stellvertretend für den gesamten Eisenstoffwechsel wurden der TfR und Ferritin untersucht. Der TfR ist das wichtigste Protein der Eisenaufnahme (Kuhn 1989). Aus früheren Ergebnissen geht hervor, dass es durch Eisenüberladung der Zelle zu einer Verminderung der TfR-Expression kommt. Im Gegenzug dazu führt Eisenentzug zu einer Überexpression des Rezeptors (Tong et al 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob dieser Mechanismus auch bei Gliazellen erhalten bleibt. Wie erwartet ließen sich die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den früheren Erkenntnissen bringen. Auch hier war eine verminderte TfR-Expression bei Eisenüberladung und eine Überexpression des TfR bei Eisenentzug zu sehen. Mit diesem kompensatorischen Mechanismus versuchen die Zellen, das Eisenlevel innerhalb einer physiologisch geeigneten Konzentration zu halten.

Weiterhin sollten diese Versuche zeigen, ob unsere Methode für eine semi-quantitative Messung der Proteine des Eisenstoffwechsels geeignet ist. Die TfR-Expression bei

verschiedenen Eisenstatus der Zelle eignete sich zur Evaluation unserer Methode sehr gut, da die Ergebnisse aus Experimenten mit anderen Zellen vorhersehbar waren.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von TfR in Zellen gemessen, die mit verschiedenen humanen SOD1-Mutationen transfiziert wurden. Für die Versuche standen uns WT-Zellen und Zellen mit den häufigsten ALS-verursachenden Mutationen zur Verfügung. Diese sind die G93A-Mutante, welche SOD1-Aktivität aufweist, und die H46R-Mutante, welche keine SOD1-Aktivität besitzt.

In Zellen mit Zusatz von WT- sowie G93A-mutierter-SOD1 zeigt sich eine Überexpression des Transferrinrezeptors. Hingegen ergibt die Messung in Zellen mit Zusatz von H46R-mutierten Zellen keine Änderung der Expression von TfR gegenüber nicht transfizierten Zellen.

Um die Vermutung, dass die SOD1-Aktivität mit dem TfR assoziiert ist, nochmals genauer zu untersuchen, wurde die SOD1-Expression mit Hilfe der siRNA-Methodik im hier benutzten Zelltyp herabreguliert. Die „Knockdown“-Zellklone enthielten nur etwa 35% des normalen SOD1-Protein-Levels. In den „knockdown“-Zelllinien sahen wir einen Trend, der unsere Vermutung bestätigte. Mit der verminderten SOD1-Expression in der Zelle verminderte sich ebenfalls der Proteingehalt des TfR. Wir beobachteten allerdings, dass es sich dabei nicht um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung handelte. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Anzahl von nur 4 Knockdown-Zellklonen zurückzuführen. Außerdem wurde beobachtet, dass bei Aktin in diesem Versuch eine Doppelbande zu sehen war. Die Zellen haften sehr stark an ihrer Unterlage, somit musste beim Ernten der Zellen der Puffer stark erhitzt werden und es bestand eine längere Inkubationszeit. Dies führt zum Abbau von Aktin, woraus die Doppelbande resultiert.

Um weitere Erkenntnisse über den Eisenstoffwechsel zu erhalten, wurde im nächsten Schritt die Expression von Ferritin bei verschiedenen Zellen untersucht. Dabei wurden die ntg-, WT-, G93A-, und H46R-Klone miteinander verglichen.

Ferritin ist das wichtigste Protein der Eisenspeicherung. Erniedrigtes Ferritin ist ein Zeichen für „leere“ Eisenspeicher und niedrigen Eisenstatus. Unter diesen Bedingungen ist normalerweise der TfR erhöht, um die leeren Eisenspeicher aufzufüllen. Unter

physiologischen Bedingungen verhalten sich TfR und Ferritin in ihrer Antwort auf Veränderungen im Eisenstatus immer gegenläufig. Wir gingen davon aus, dass alle Zelllinien mit hochreguliertem TfR (WT und G93A) eine verminderte Ferritin-Expression zeigen würden. Unerwartet war in WT-Zellen ebenfalls eine Überexpression des Ferritins und somit eine gleichsinnige Regulation zum TfR zu sehen. In der G93A-Mutante war kein Unterschied zu nicht-transfizierten Zellen zu messen.

In den H46R-Klonen war keine Änderung der Ferritinexpression im Vergleich zu nicht transgenen Zellen zu sehen. Dies stimmt mit der Beobachtung, dass H46R-Zellen TfR nicht überexprimieren, überein. Im Vergleich zu den G93A-Zellen, besteht in den H46R-Klonen keine erhöhte Eisenaufnahme und somit auch kein Bedarf, vermehrt freies Eisen sicher zu speichern. Unseren Ergebnissen zufolge ist keine Änderung des Eisenstoffwechsels in den H46R-Zellen zu beobachten. Wie schon oben beschrieben besteht in den H46R-Zellen keine Änderung der SOD1-Aktivität.

Im nächsten Schritt wurde der Mechanismus untersucht, welcher die Veränderungen in der TfR- und Ferritinexpression bewirkt. Sowohl TfR als auch Ferritin werden durch das IRE/IRP-System reguliert, so dass in den G93A- und den WT-Klonen eine Veränderung in der IRE/IRP Bindungsaktivität vermutet wurde. Zur Bestätigung dieser Theorie wurde ein IRE/IRP-Bindungsassay durchgeführt. Auch wenn sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten, was sehr wahrscheinlich auf die geringe Anzahl gemessener Klone, sowie den aufwendigen Versuch zurückzuführen ist, war dennoch ein Trend zu beobachten, der diese Vermutung bestätigte. Bei den WT- und G93A-Zellen zeigte sich eine leichte Erhöhung der Bindungsaktivität, wohingegen bei ntg- und H46R-Zellen keine Änderung der Bindungsaktivität zu sehen war. Die beiden letzteren Zelllinien besitzen normale SOD1-Aktivität.

Ein wichtiger Aspekt unserer Ergebnisse ist das unterschiedliche Verhalten von G93A- und H46R- mutierter SOD1. Alle Veränderungen sind nur bei der G93A-Mutante zu beobachten. Es ergeben sich, bis auf ein Ergebnis, keinerlei Änderungen in der H46R-Mutante und zwar weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene. Wiederum zeigt sich, der große Unterschied zwischen den einzelnen SOD1-Mutanten deutlich. Es ist bekannt, dass zwar alle SOD1-Mutanten das Krankheitsbild der ALS hervorrufen. Andererseits gibt es aber sehr große Unterschiede z.B. in der Überlebenszeit der Patienten. Patienten mit

einer G93A-Mutation in der SOD1 haben eine Überlebenswahrscheinlichkeit von ein bis drei Jahren, andererseits zeigen Patienten mit der H46R mutierten SOD1 eine Überlebenswahrscheinlichkeit von mehr als 17 Jahren. Die G93A-Mutante scheint einen größeren Einfluss auf die Nervenzellen zu haben. Auch in einer anderen Arbeit wurde ersichtlich, dass die verschiedenen SOD1-Mutanten unterschiedlich reagieren. Dort zeigte die G93A Mutante eine stärkere Inaktivierung von Calcineurin als andere Mutanten (Volkel et al 2001).

In der vorliegenden Arbeit ist zu bedenken, dass TfR und Ferritin in den hier benutzten Zellen nicht durch Änderungen im Eisenstatus beeinflusst wurden. Der Eisenstatus der Zellen und der zellulären Umgebung bleibt unverändert. Die Regulation von TfR und Ferritin wird durch Transfektion mit SOD1 bewirkt, also durch die Veränderung des oxidativen Status der Zelle. Frühere Arbeiten aus anderen Laboren haben gezeigt, dass die Regulation des Eisenstoffwechsels zusätzlichen Input durch oxidativen Stress erhält (Missirlis et al 2003). Es ist möglich, dass unter unseren experimentellen Bedingungen der durch oxidativen Stress bedingte Signalweg den normalen Eisen-Signalweg überlagert.

Es gibt starke Hinweise dafür, dass es durch die Veränderungen des oxidativen Status der Zelle zu Änderungen auf molekularer Ebene kommt. Unter unseren experimentellen Bedingungen ist ein Trend zu sehen, der stärkere Bindungsaktivität des IRP bei G93A- und WT-Zellen vermuten lässt. Dieser erklärt die vermehrte Expression des TfR in diesen Zelllinien. Bei ntg- und H46R-Zellen sahen wir keine Änderung der Bindungsaktivität beim IRE/IRP-Bindungs-Assay. Die Transkription wird nicht verändert und es ergibt sich auch keine Änderung der wichtigsten Proteine im Eisenstoffwechsel.

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Mutanten ist die unterschiedliche SOD1-Aktivität der Zellen. Alle transfizierten Zelllinien weisen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen einen ca. 2,5-fachen SOD1-Proteingehalt auf. Die SOD1-Aktivität ist nur in den WT- und den G93A-Zellen um das ca. 2,5-fache erhöht, bei H46R-Zellen ergibt sich keine Veränderung der SOD1-Aktivität (Carri et al 2003). Die G93A- und H46R-Mutanten unterscheiden sich somit nur durch ihre Enzymaktivität. Durch diese Ergebnisse ist zu vermuten, dass nicht der Proteingehalt der SOD1, sondern die SOD1-Aktivität eine entscheidende Rolle bei der Expression des TfR spielt.

Die SOD1 spielt eine wichtige Rolle im Schutz der Zelle vor toxischen Sauerstoffradikalen. Sie katalysiert die Dismutation von Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ). SOD1-Knockout ist in der Maus nicht letal. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Änderung oder der Verlust der SOD1 zu verschiedenen Veränderungen in der Zelle führt (De Freitas et al 2000; Srinivasan et al 2000). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen wurde in diesen beiden Arbeiten jedoch eine erhöhte Eisenaufnahme in Zellen mit SOD1-Mangel gezeigt.

Für die beobachteten Unterschiede gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum ersten handelt es sich bei den zuvor untersuchten Zellen um einen einzelligen Organismus, die Hefe *S. cerevisiae*, welche andere biologische Anforderungen und Aufgaben erfüllen muss als eine Zelle aus einem komplexen Zellverband. Einzellige Organismen, wie z.B. die Hefe oder Bakterien, können sehr hohen, toxischen Metallkonzentrationen in ihrer Umgebung ausgesetzt sein, die zudem stark schwanken können. Unter beiden Bedingungen können sie überleben. Säugetierzellen, mit Ausnahme der Darm- und Hautzellen, sind Metallen aus der Umgebung nicht direkt ausgesetzt. Sie werden durch verschiedene Mechanismen davor geschützt. Hierzu gehören vor allem das Ausmaß der Absorption im Darm sowie die Regulation der Metallhomöostase durch die Leber. Besonders das Gehirn ist eines der bestgeschützten Gewebe, da es extrem empfindlich gegenüber oxidativem Stress ist. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass sich die regulatorische Antwort auf oxidativen Stress zwischen *S. cerevisiae* und humaner Glia unterscheidet und dass die SOD1-Expression den Eisenmetabolismus in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

Der Verlust der SOD1 in der Hefe und die Zugabe von SOD1 in den Gehirnzellen haben den gleichen Effekt auf die TfR-Expression: In beiden Fällen kommt es zu einer Erhöhung. Es ist denkbar, dass Glioblastomzellen durch die höhere SOD1-Aktivität oxidativen Stress besser tolerieren. Eisen ist ein wichtiges Element für die Zelle, durch die Fenton-Reaktion entwickeln sich aber Sauerstoffradikale. Wenn dies im Übermaß geschieht, bedeutet es oxidativen Stress für die Zelle. Durch die erhöhte SOD1-Aktivität könnte die Zelle ein Plus an aufgenommenem Eisen tolerieren. Dies könnte die Überexpression des TfR bei G93A-Zellen erklären. Die H46R-Zellen besitzen keine erhöhte SOD1-Aktivität und sind somit nicht in der Lage, mehr Eisen aufzunehmen, was mehr oxidativen Stress bedeuten könnte.



Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass der oxidative Stress im Zusammenhang mit der SOD1-Aktivität einer Gaußschen Verteilungskurve folgt. Viele biologische Zusammenhänge folgen nicht einer linearen Dosis-Wirkungs-Kurve, sondern einer glockenförmigen Verteilung. Dies würde bedeuten, dass sowohl Zellen mit wenig SOD1 (z.B. der *S.cerevisiae*-Knockout), (De Freitas et al 2000) als auch Zellen mit erhöhter SOD1-Aktivität (z.B. die in dieser Arbeit verwendeten Gliablastomzellen) erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt und somit anfälliger für schädigende Prozesse in den Zellen sind.

Der IRE/IRP-Bindungsassay liefert uns keine Erklärung, warum es zur parallelen Regulation von TfR und Ferritin bei WT-Zellen kommt, wohingegen die G93A-Zellen keine Änderung ihres Ferritins zeigen. Hier können beim jetzigen Stand der Forschung nur Vermutungen angestellt werden.

Durch die Überexpression des TfR kommt es wahrscheinlich zu erhöhter Eisenaufnahme. Es könnte sein, dass die WT-Zellen Ferritin erhöhen, um das Eisen besser speichern zu können. Vielleicht ist es den Zellen durch die erhöhte Speicherkapazität möglich, größere Mengen an Eisen „sicher“ in der Zelle abzulagern. Somit ist zu vermuten, dass sich durch diesen Mechanismus weniger freies und damit schädliches Eisen in den Zellen befindet. Der G93A-Mutante ist es aus bisher ungeklärter Ursache nicht möglich, ihr Ferritin ebenfalls stärker zu exprimieren. Es ist möglich, dass dieses Verhalten zu einer Erhöhung des „freien“ Eisens in den Zellen führt. Zu vermuten ist, dass diese Zellen zwar den TfR wie die WT-Zellen überexprimieren und damit mehr Eisen als natürliche Zellen aufnehmen, aber nicht in der Lage sind, dieses Eisen sicher zu speichern. In früheren Arbeiten wurde ein erhöhter oxidativer Stress dieser G93A-Zellen beschrieben (Carri et al 2003). Möglicherweise hängt dieser erhöhte oxidative Stress mit der Erhöhung an freiem Eisen zusammen.

Der wichtigste Aspekt dieser Arbeit ist die starke Bedeutung der Gliazellen in der Pathogenese der ALS. Deutlich ist hier zu sehen, dass zwei bekannte Mutationen in Neuronen von ALS-Patienten ebenfalls zu Veränderungen in Gliazellen führen. In anderen Arbeiten wurde der starke Zusammenhang zwischen Gliazellen und Neuronen in der Pathogenese von ALS beschrieben. (Clement et al 2003) sahen, dass gesunde Gliazellen die Degeneration von Neuronen verlangsamen. In einer weiteren Arbeit (Ferri et al 2004)

wurden die Wechselwirkungen zwischen Gliazellen und Neuronen mit G93A-mutierter SOD1 beschrieben. Nach (Ferri et al) kommt es in den Gliazellen zu einer stärkeren Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Interferon  $\gamma$ , NO (Stickoxid) und ROS. Dies führt zur gegenseitigen Schädigung von Gliazellen und Neuronen. Auch wir sehen, in Form eines veränderten Eisenstoffwechsels, Änderungen in den Gliazellen, die durch Wechsel des oxidativen Status der Zellen hervorgerufen wurden. Bleibt der oxidative Status wie bei H46R-Zellen gleich, sehen wir keine Änderung im Bezug auf den Eisenstoffwechsel. Die Patienten sind weniger betroffen, also dürfen wir davon ausgehen, dass auch die Neuronen weniger geschädigt werden. Es ist zu vermuten, dass bei H46R-Zellen keine so ausgeprägte gegenseitige Schädigung von Neuronen und Gliazellen wie bei G93A-Zellen vorliegt. Der nächste Schritt wird sein, verschiedene Mutanten von Gliazellen und Neuronen in Cokultur zu züchten. Nur so wird es möglich sein, die gegenseitigen Auswirkungen von mutierten Gliazellen und Neuronen erforschen zu können. Um genauere Aussagen treffen zu können, sollten diese Ergebnisse auf ein *in vivo* Modell übertragen werden. Zumindest gibt es auch durch diese Arbeit starke Hinweise, dass Gliazellen einen nicht unerheblichen Anteil an der Pathogenese der ALS haben.

## 5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von SOD1 (WT oder Mutante) die Eisenhomöostase in isolierten Gliazellen beeinflusst. Es ergab sich sowohl eine Änderung im Transferrinrezeptor als auch im Ferritin. Zudem war eine Änderung der Bindungsaktivität des IRE/IRP-Systems ersichtlich. Auffällig war, dass sich Änderungen nur bei der G93A-Zelllinie und nicht bei der H46R-Zelllinie zeigten.

Aus diesem Grund scheint der oxidative Status der Zelle eine Rolle in der Pathogenese der ALS zu spielen. Um ein abschließendes Urteil darüber abgeben zu können, werden weitere Experimente notwendig sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Mutationen Gliazellen unterschiedlich beeinflussen. Schon vorher war bekannt, dass sich diese Mutationen unterschiedlich auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit ALS auswirken. Es gibt somit deutliche Hinweise, dass Gliazellen einen erheblichen Anteil an der Pathogenese von ALS besitzen. Frühere Arbeiten bestätigen ebenfalls die Wechselwirkungen von Neuronen und Gliazellen.

Der nächste Schritt wird sein, unsere Ergebnisse zunächst auf Cokultur- und später auf *in vivo*-Modelle zu übertragen. Auf diesem Weg wird es möglich sein, gegenseitige Einflüsse von Gliazellen und Neuronen auch im Bezug auf den Eisenstoffwechsel besser beurteilen zu können.

Es ist möglich, dass eine Entgleisung der Regulation des Eisenstoffwechsels den Krankheitsverlauf auf zellulärer Ebene zusätzlich ungünstig moduliert. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen auf einem anderen, für sie toxischen Weg geschädigt werden und es in diesen schon vorgeschädigten Zellen zu einer Änderung des Eisenstoffwechsels kommt und damit zu zusätzlichem oxidativem Stress in den Gliazellen. Dies wiederum könnte ebenfalls einen Einfluss auf Neurone haben.

## 6 Zusammenfassung

Die Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) ist eine multifaktorielle neurodegenerative Erkrankung mit weitgehend unbekannter Ätiologie. Zu den wenigen gesicherten Faktoren der familiären ALS (fALS) zählen verschiedene Mutationen im Superoxid-Dismutase1-Gen (SOD1). Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass die gleichzeitige Expression der SOD1-Mutationen sowohl in Neuronen als auch in den dazugehörigen Gliazellen für die Pathogenese der ALS essentiell ist. Vorausgegangene Arbeiten an *S. cerevisiae* und Neuroblastomzellen stellten fest, dass die beiden hier untersuchten Mutationen G93A und H46R Veränderungen im Eisenstoffwechsel zur Folge haben. So führt z. B. die SOD1-G93A-Mutation zu einer Inaktivierung des eisenhaltigen Proteins Calcineurin. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der beiden SOD1-Mutationen auf den Eisenstoffwechsel von Gliazellen untersucht.

Alle Versuche wurden sowohl an nicht transgenen Gliazellen (ntg) als auch an transgenen Gliazellen mit Wildtyp-SOD1 (WT) und mutierter SOD1 (G93A, H46R) durchgeführt. Zunächst wurde die Expression der beiden wichtigsten Proteine des Eisenstoffwechsels, Transferrinrezeptor (TfR) und Ferritin, untersucht. Es zeigte sich, dass TfR in WT- und G93A-Zellen überexprimiert wird, in H46R-Zellen war im Vergleich zu ntg-Zellen kein Unterschied festzustellen. Bei der Ferritinexpression zeigte sich in WT-Zellen eine Überexpression, in G93A- und H46R-Zellen war kein Unterschied gegenüber ntg-Zellen zu sehen. Über die Messung der Bindungsaktivität des Iron regulatory protein (IRP) und Iron responsive element (IRE) konnten die obigen Ergebnisse der TfR-Expression in WT-, G93A- und H46R-Zellen auf translationaler Ebene bestätigt werden. Darüber hinaus konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass Ferritin über einen zum jetzigen Zeitpunkt noch unklaren Mechanismus reguliert wird.

Da WT- und G93A-Zellen im Gegensatz zu den H46R- und ntg-Zellen eine erhöhte SOD1-Aktivität besitzen, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss der SOD1-Aktivität auf den Eisenstoffwechsel untersucht. Hierzu wurde eine SOD1-Knockdown-Zelllinie mit verringerter SOD1-Aktivität generiert. Es zeigte sich, dass die SOD1-Knockdown-Zellen eine verminderte TfR-Expression besitzen. Somit konnte ein proportionaler Zusammenhang zwischen SOD1-Aktivität und TfR-Expression nachgewiesen werden.

Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass die beiden SOD1-Mutationen (G93A und H46R) unterschiedliche Auswirkungen auf den Eisenstoffwechsel von Gliazellen haben. Dies

steht in engem Zusammenhang mit bereits publizierten Arbeiten, die ähnliche Effekte an neuronalen Zellen nachweisen konnten.

Ziel zukünftiger Projekte wird es sein, die gewonnenen Erkenntnisse in einer Co-Kultur von Neuronen und Gliazellen und später in einem *in-vivo*-Modell zu untersuchen.

Damit leistet die Untersuchung des Eisenstoffwechsels mit einer Mutation im SOD1-Gen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathomechanismen bei der ALS.

## 7 Literaturverzeichnis:

- Beal MF (2000): Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298-304.
- Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G (2003): Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull* 61:365-74.
- Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, , Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, Harford JB (1988): Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240:924-8.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia M. L, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante R. J, Brown Jr. RH, Julien J-P, Goldstein LSB, Cleveland DW (2003): Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-7.
- Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ (1992): Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 31:327-35.
- Danzeisen R, Achsel T, Bederke U, Cozzolino M, Crosio C, Ferri A, Frenzel M, Gralla EB, Huber L, Ludolph A, Nencini M, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT (2006): Superoxide dismutase 1 modulates expression of transferrin receptor. *J Biol Inorg Chem* 11:489-98
- De Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentine JS, Gralla EB (2000): Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem* 275:11645-9.
- Ferri A, Gabbianelli R, Casciati A, Celsi F, Rotilio G, Carri MT (2001): Oxidative inactivation of calcineurin by Cu,Zn superoxide dismutase G93A, a mutant typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 79:531-8.
- Ferri A, Nencini M, Casciati A, Cozzolino M, Angelini DF, Longone P, Spalloni A, Rotilio G, Carri MT (2004): Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells. *Faseb J* 18:1261-3.
- Gambling L, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, Solanky N, Joory KD, Srani SK, McArdle HJ (2001): Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem J* 356:883-9.

- Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J (1992): Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol* 31:286-92.
- Gowrie IJ, Radunovic A, Leigh PN ALSOD1.org  
The online database for mutations in ALS related genes, Vol 2000-2004.
- Gross CN, Irrinki A, Feder JN, Enns CA (1998): Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem* 273:22068-74.
- Hentze MW, Rouault TA, Caughman SW, Dancis A, Harford JB, Klausner RD (1987): A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6730-4.
- Hentze MW, Caughman SW, Casey JL, Koeller DM, Rouault TA, Harford JB, Klausner RD (1988): A model for the structure and functions of iron-responsive elements. *Gene* 72:201-8.
- Hentze MW, Kuhn LC (1996): Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8175-82.
- Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y (1991): Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 56:446-51.
- Julien JP (1999): Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 9:554-60.
- Kasarskis EJ, Tandon L, Lovell MA, Ehmann WD (1995): Aluminum, calcium, and iron in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis using laser microprobe mass spectroscopy: a preliminary study. *J Neurol Sci* 130:203-8.
- Klausner RD, Dancis A (1994): A genetic approach to elucidating eukaryotic iron metabolism. *FEBS Lett* 355:109-13.
- Kuhn LC (1989): The transferrin receptor: a key function in iron metabolism. *Schweiz Med Wochenschr* 119:1319-26.
- Leveugle B, Spik G, Perl DP, Bouras C, Fillit HM, Hof PR (1994): The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res* 650:20-31.

- Liochev SI, Fridovich I (1994): The role of O<sub>2</sub>·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 16:29-33.
- Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW (2000): The role of excitotoxicity in ALS--what is the evidence? *J Neurol* 247 Suppl 1:17-16.
- Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A (2003): Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet* 63:83-101.
- Missirlis F, Hu J, Kirby K, Hilliker AJ, Rouault TA, Phillips JP (2003): Compartment-specific protection of iron-sulfur proteins by superoxide dismutase. *J Biol Chem* 278:47365-9.
- Mumenthaler M, Mattle H. (2002): *Neurologie*. Georg Thieme, Stuttgart, S. 436-440.
- Oba H, Araki T, Ohtomo K, Monzawa S, Uchiyama G, Koizumi K, Nogata Y, Kachi K, Shiozawa Z, Kobayashi M (1993): Amyotrophic lateral sclerosis: T2 shortening in motor cortex at MR imaging. *Radiology* 189:843-6.
- Olsen MK, Roberds SL, Ellerbrock BR, Fleck TJ, McKinley DK, Gurney ME (2001): Disease mechanisms revealed by transcription profiling in SOD1-G93A transgenic mouse spinal cord. *Ann Neurol* 50:730-40.
- Owen D, Kuhn LC (1987): Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron. *Embo J* 6:1287-93.
- Pantopoulos K, Hentze MW (1998): Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10559-63.
- Poeck K., Hacke W. (2001): *Neurologie*, 11 ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S.668-672.
- Rao K, Harford JB, Rouault T, McClelland A, Ruddle FH, Klausner RD (1986): Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. *Mol Cell Biol* 6:236-40.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SA, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz R, Brown Jr RH, (1993): Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.



- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncel RW (1992): Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-8.
- Seiser C, Posch M, Thompson N, Kuhn LC (1995): Effect of transcription inhibitors on the iron-dependent degradation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 270:29400-6.
- Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB (1991): Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem* 56:978-82.
- Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB (2000): Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* 275:29187-92.
- Starzynski RR, Lipinski P, Drapier JC, Diet A, Smuda E, Bartlomiejezyk T, Gralak MA, Kruszewski M (2005): Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism. *J Biol Chem* 280:4207-12.
- Tong X, Kawabata H, Koeffler HP (2002): Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br J Haematol* 116:458-64.
- Valentine JS, Hart PJ (2003): Misfolded CuZnSOD1 and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3617-22.
- Valentine JS, Hart PJ, Gralla EB (1999): Copper-zinc superoxide dismutase and ALS. *Adv Exp Med Biol* 448:193-203.
- Volkel H, Scholz M, Link J, Selzle M, Werner P, Tunnemann R, Jung G, Ludolph AC, Reuter A (2001): Superoxide dismutase mutations of familial amyotrophic lateral sclerosis and the oxidative inactivation of calcineurin. *FEBS Lett* 503:201-5.
- Wang X, Culotta VC, Klee CB (1996): Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* 383:434-7.