

Aus der Klinik für Neurologie,
Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hexokinase II-vermittelte Hypoxietoleranz und
endogene Neuroprotektion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Mergenthaler

aus Dachau

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Andreas Meisel
 2. Prof. Dr. med. Josef Priller
 3. Prof. Dr. med. Dirk Hermann

Datum der Promotion: 04. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****VII****1. EINLEITUNG** **9****1.1. DER SCHLAGANFALL** **9****1.2. PATHOPHYSIOLOGIE DES SCHLAGANFALLS** **9**1.2.1. ZELLTODREGULATION BEIM SCHLAGANFALL **10**1.2.2. APOPTOSEREGULATION **11****1.3. PRÄKONDITIONIERUNG UND ENDOGENE NEUROPROTEKTION** **12**1.3.1. MECHANISMEN DER ISCHÄMISCHEN PRÄKONDITIONIERUNG **13**1.3.2. GENREGULATION UNTER HYPOXIE - HIF-1 **13**1.3.3. VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IM RAHMEN VON ISCHÄMISCHEN EREIGNISSEN **14****1.4. HEXOKINASE** **15**1.4.1. STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN DER HEXOKINASEN UND REGULATION IHRER FUNKTION **15**1.4.2. EXPRESSIONSMUSTER UND EXPRESSIONSREGULATION DER HEXOKINASEN **17**1.4.3. APOPTOSEREGULATION DURCH HEXOKINASEN **18****1.5. TRANSFEKTION UND ÜBEREXPRESSION VON GENEN IN PRIMÄRKULTUREN****NEURONALER ZELLEN** **19**1.5.1. ELEKTROPORATION **20**1.5.1.1. Grundlagen der Elektroporation **20**1.5.1.2. Elektroporation von Neuronen **21****1.6. FLUORESZENZPROTEINE** **22**1.6.1. AEQUOREA VICTORIA GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) **23**1.6.2. REEF CORAL FLUORESCENT PROTEINS (RCFP) **24**1.6.3. VERBESSERTE MONOMERE FLUORESZENZPROTEINE **25****2. AUFGABENSTELLUNG** **27****3. MATERIALIEN UND METHODEN** **28****3.1. MATERIALIEN** **28**3.1.1. CHEMIKALIEN **28**3.1.2. KITS **28**3.1.3. BAKTERIENSTÄMME **28**3.1.4. KOMMERZIELLE PLASMIDE **28**

3.1.5.	ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	29
3.1.6.	ANTIKÖRPER	29
3.1.7.	GERÄTE	29
3.1.8.	MEDIEN- UND PUFFERZUSAMMENSETZUNGEN	30
3.1.9.	TIERE	30
3.1.10.	SOFTWARE	30
3.1.11.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.2.	METHODEN	31
3.2.1.	MOLEKULARBIOLOGIE	31
3.2.1.1.	Konstruktion des Grundvektors pCAG-MCSn1	32
3.2.1.2.	Klonierung der Expressionsvektoren	33
3.2.1.2.1.	Klonierung pCAG-eGFP	34
3.2.1.2.2.	Klonierung pCAG-DsRedE	34
3.2.1.2.3.	Klonierung pCAG-mOrange	34
3.2.1.2.4.	Klonierung pCAG-mCherry	34
3.2.1.2.5.	Klonierung pCAG-BclXL	35
3.2.1.2.6.	Klonierung pCAG-HK2	35
3.2.1.3.	Sequenzierung der Plasmide	35
3.2.2.	ZELLKULTUR	35
3.2.2.1.	Beschichtung der Kulturgefäße	36
3.2.2.2.	Präparation von primären Ratten-Kortexneuronen	36
3.2.2.3.	Herstellung von konditioniertem Medium	37
3.2.2.4.	Transfektion mittels Nucleofection™ und Kultivierung der primären Kortexneuronen	37
3.2.2.5.	Bestimmung der Transfektionseffizienz	38
3.2.2.6.	Schadensmodelle der Zellkultur	38
3.2.2.6.1.	Kombinierte Sauerstoff- und Glukosedepriivation (OGD)	38
3.2.2.6.2.	Sauerstoffdeprivation (OD)	39
3.2.2.6.3.	Glukosedepriivation (GD)	39
3.2.2.7.	Evaluation des Zellschadens	39
3.2.2.7.1.	Manuelle Zellzählung	39
3.2.2.7.2.	Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Test	39
3.2.3.	IMMUNZYTOCHEMIE	40
3.2.4.	WESTERNBLOTTING	40
3.2.5.	DAS SPLIT-UBIQUITIN TWO-HYBRID SYSTEM ZUR IDENTIFIZIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER DER HEXOKINASE II AN DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN	41
3.2.6.	STATISTIK	42

4. ERGEBNISSE **43**

4.1. ETABLIERUNG DES KOTRANSFEKTIONS-/KOKULTIVIERUNGSMODELL **45**

4.1.1.	ELEKTROPORATION ALS NEURONAL SPEZIFISCHE TRANSFEKTIONSMETHODE _____	45
4.1.2.	ENTWICKLUNG EINER TRANSFEKTIONSSTRATEGIE _____	45
4.1.3.	DIE NUCLEOFECTION™ ERMÖGLICHT EINE HOHE KOTRANSFEKTIONSRATE _____	46
4.1.4.	EINFLÜSSE DES PROMOTORS AUF DIE TRANSFEKTIONSRATE IM ZEITVERLAUF _____	47
4.1.5.	NEUROPROTEKTION DURCH BCLXL _____	48
4.1.6.	EXPRESSION VON BCLXL NACH TRANSFEKTION IN IMMUNZYTOCHEMISCH NACHWEISBARER MENGE _____	48
4.1.7.	ETABLIERUNG DES KOKULTIVIERUNGSMODELLS _____	49
4.1.8.	ZELLTODQUANTIFIZIERUNG – VERGLEICH MTT-ASSAY UND MANUELLE ZELLZÄHLUNG _____	53
4.1.9.	VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER TRANSFEKTIONSZUSTÄNDER DURCH DAS KOTRANSFEKTIONS- / KOKULTIVIERUNGSMODELL _____	54
4.1.10.	ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG DER KOTRANSFEKTION / KOKULTIVIERUNG _____	56
4.2.	UNTERSUCHUNG DER NEUROPROTEKTIVEN EIGENSCHAFTEN DER HEXOKINASE II _____	57
4.2.1.	HEXOKINASE II-VERMITTELTE NEUROPROTEKTION UNTER OGD-BEDINGUNGEN _____	58
4.2.2.	HEXOKINASE II-VERMITTELTE NEUROPROTEKTION IST GLUKOSEABHÄNGIG _____	59
4.2.3.	HEXOKINASE II-PROTEINNACHWEIS MIT WESTERNBLOT _____	62
4.3.	DAS SPLIT-UBIQUITIN TWO-HYBRID SYSTEM ZUR IDENTIFIZIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER DER HEXOKINASE II AN DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN	63
5.	DISKUSSION _____	66
5.1.	ETABLIERUNG EINES KOTRANSFEKTIONS-/KOKULTIVIERUNGSMODELLS _____	66
5.1.1.	NEURONEN-SPEZIFISCHE TRANSFEKTION MIT HILFE DER ELEKTROPORATION _____	66
5.1.2.	ETABLIERUNG DES KOTRANSFEKTIONS-/KOKULTIVIERUNGSMODELLS _____	67
5.1.3.	HOHE KOTRANSFEKTIONSRATE DURCH NUCLEOFECTION™ _____	68
5.1.4.	BEDEUTUNG DES PROMOTORS FÜR DIE TRANSFEKTIONSRATE _____	68
5.1.5.	BCLXL – EIN PROTOTYPISCHES NEUROPROTEKTIVES PROTEIN _____	70
5.1.6.	DAS KOTRANSFEKTIONS-/KOKULTIVIERUNGSMODELL _____	72
5.1.7.	VERBESSERTE ANWENDBARKEIT DES KOTRANSFEKTIONS-/ KOKULTIVIERUNGSMODELLS DURCH MONOMERE FLUORESZENZPROTEINE _____	74
5.1.8.	BEDEUTUNG VERSCHIEDENER PARAMETER VON FLUORESZENZPROTEINEN _____	75
5.2.	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IM RAHMEN VON ISCHÄMISCHEN EREIGNISSEN _____	76
5.3.	SCHUTZ VOR HYPOXIE-INDUZIERTEM NEURONALEM ZELLTOD DURCH HEXOKINASE II	77
5.3.1.	ANTIAPOPTOTISCHE EFFEKTE UND APOPTOSEREGULATION MITOCHONDRIALER HEXOKINASEN _____	78
5.3.2.	HEXOKINASEREGULATION DURCH AKT-KINASE _____	82
5.3.3.	MITOCHONDRIALE HEXOKINASEN ALS ZENTRALES BINDEGLIED ZWISCHEN METABOLISMUS UND APOPTOSE _____	83

Inhaltsverzeichnis	VI
5.3.4. INTERAKTION MITOCHONDRIALER HEXOKINASE MIT VDAC	84
5.3.5. MITOCHONDRIALE ASSOZIATION DER HEXOKINASE VERBINDET OXIDATIVE PHOSPHORYLIERUNG UND GLYKOLYSE	86
5.4. DUALMEMBRANES™ SCREEN - DAS SPLIT-UBIQUITIN TWO-HYBRID SYSTEM ZUR IDENTIFIZIERUNG NEUER INTERAKTIONSPARTNER DER HEXOKINASE II AN DER ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN	87
5.4.1. ERGEBNISSE DES DUALMEMBRANE™ INTERAKTIONSSCREENES	90
6. ZUSAMMENFASSUNG	94
7. REFERENZEN	96
DANKSAGUNG	109
LEBENS LAUF	110
PUBLIKATIONS LISTE	111
ORIGINAL- UND ÜBERSICHTSARBEITEN	111
KONFERENZBEITRÄGE	111
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	114

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	analysis of variance (Abweichungsanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	Abkürzung für englisch <i>B-cell lymphoma 2</i> ; Name für ein an der Apoptoseregulation beteiligtes Protein und Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie
bp	Basenpaare
BSS	balanced salt solution (ausgewogene Salzlösung)
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DIV	day in vitro (Tag in Kultur)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia Coli
GD	Glucose Deprivation (Glukosedeprivation)
GFP	green-fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HK	Hexokinase
HK II / HK2	Hexokinase II
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Molar
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization (Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran)
mRNA	messenger RNA (Botenribonukleinsäure)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

	diphenyltetrazoliumbromid
nm	Nanometer
OD	Oxygen Deprivation (Sauerstoffdeprivation)
OGD	Oxygen Glucose Deprivation (Sauerstoff- Glukosedepression)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
VDAC	voltage dependent anion channel (spannungsabhängiger Anionenkanal der äußeren Mitochondrienmembran)

1. Einleitung

1.1. Der Schlaganfall

Vor über 2400 Jahren beschrieb Hippokrates erstmals die plötzlich einsetzende Paralyse – Apoplexia – und suchte die Ursache dieses Zustandes in der Fehlmischung der nach der damaligen Lehrmeinung relevanten „Kardinalsäfte“ Blut, Schleim, Gelbe Galle, Schwarze Galle. Im Jahr 1658 lieferte der Schweizer Arzt Johann Jakob Wepfer in seinem Werk *Anatomische Beobachtungen an Leichen von Personen, die einer Apoplexie erlegen sind, samt Überlegungen zu dem dabei betroffenen Teil des Körpers* erste Hinweise darauf, dass die Ursache der Apoplexie in Hirnblutung oder Verschluss einer zerebralen Arterie zu suchen sei (Karenberg, 2004).

Heute ist der Schlaganfall eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes sind 7,5 % bzw. 3,3 % der jährlichen Todesfälle in Deutschland auf zerebrovaskuläre Erkrankungen bzw. Schlaganfälle zurückzuführen. Damit stellt der Schlaganfall nach kardialen Erkrankungen und Bronchialkarzinomen die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches-Bundesamt, 2007). Weiterhin ist der Schlaganfall die häufigste Ursache dauerhafter Behinderung.

Die bisher einzige kausal wirksame Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist die Thrombolyse. Deren Wirksamkeit nimmt mit der Zeit nach Beginn des Gefäßverschlusses ab, während das Blutungsrisiko zunimmt. Nur ca. 3-10% der Patienten erreicht das Krankenhaus rechtzeitig, um die Therapie innerhalb des notwendigen 3-Stunden Zeitfensters durchführen zu können (Diener und Ackermann, 2008). Während sich das Wissen um die pathophysiologischen Mechanismen des Schlaganfalls von Jahr zu Jahr vergrößert, wird heute vor allem nach einer effektiven Schlaganfalltherapie gesucht, die über eine Wiederherstellung der Blutversorgung des Gehirns hinausgeht. Neben der Optimierung der revaskularisierenden Therapie müssen vor allem die Abläufe endogener Neuroprotektion und regenerativer Mechanismen besser verstanden und charakterisiert werden, um diese auch therapeutisch nutzbar zu machen (Dirnagl et al., 2003; Dirnagl et al., 2009).

1.2. Pathophysiologie des Schlaganfalls

Der akute Verschluss eines intrakraniellen Gefäßes führt zu einer Reduktion des Blutflusses in der versorgten Gehirnregion. Der Abfall des Blutflusses hängt u. a. von der vaskulären Anatomie und der Kollateralisierung der versorgten Region ab. Wird die Durchblutung vor Eintreten eines substanziellen Schadens wiederhergestellt, erleidet der Patient eine transiente ischämische Attacke (TIA). Allerdings können im Verlauf des Krankheitsgeschehens auch

sekundäre Schäden auftreten, die einen verzögerten Zelltod im Gewebe nach sich ziehen. Eine fokale Ischämie entwickelt sich nach permanenter oder vorübergehender Blutflussreduktion in dem Gebiet einer hirnversorgenden Arterie. Dieser Verschluss wird in der Regel durch eine Thrombembolie des Gefäßes hervorgerufen. Charakteristisch für die fokale Ischämie ist die Entstehung einer sogenannten „ischämischen Penumbra“.

Als Penumbra wird der Teil des Hirnparenchyms bezeichnet, der zwischen dem irreversibel geschädigten Kern des Schlaganfallgebiets und dem normalen Hirnparenchym liegt. In der Penumbra ist der Blutfluss eingeschränkt, der Metabolismus aber noch teilweise erhalten. Nach einer gewissen Zeit breitet sich bei ausbleibender, beispielsweise revaskularisierender Therapie, das Infarktareal auf das Gebiet der Penumbra aus. Die Pathobiologie der fokalen zerebralen Ischämie gliedert sich in eine komplexe Abfolge von Schadensmechanismen. Diese umfassen sehr frühe Mechanismen wie die Exzitotoxizität, Periinfarktdepolarisationen und späte Mechanismen wie die Inflammation, Apoptose oder Nekrose (Dirnagl et al., 1999; Dirnagl et al., 2009).

1.2.1. Zelltodregulation beim Schlaganfall

Kurz zusammengefasst kommt es im Rahmen der Exzitotoxizität zur Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Ca^{2+}), dadurch zur Depolarisation von Neuronen und damit zur Ausschüttung exzitotoxischer Aminosäuren. So wird in erster Linie Glutamat in den Extrazellulärraum abgegeben. Die Aktivierung von Glutamatrezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Folge ist eine gestörte Ionenhomöostase, die durch einen passiven Wassereinstrom in die Zelle zum Gewebeödem und zur osmotischen Lyse der Zelle führt.

Durch exzitotoxische und anoxische Depolarisationen reichern sich Glutamat und Kalium im Extrazellulärraum des Infarktkerns an. Glutamat und Kalium können in das Gebiet der Penumbra diffundieren und so zur Ausbreitung der Depolarisation, den sogenannten Periinfarktdepolarisationen, in das Gebiet der Penumbra führen.

Eine durch Ischämie induzierte Entzündung kann über verschiedenste Mechanismen zur Gewebeschädigung beitragen. Als Antwort auf den hypoxischen oder anoxischen Zustand der Zellen erfolgt die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene, die zur Einwanderung von Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten in das Infarktgebiet führt.

Die Nekrose tritt hauptsächlich im Kern des Infarktgebietes einer zerebralen Ischämie auf. Dort ist das Perfusionsdefizit und das daraus resultierend Sauerstoff- und Energiedefizit so groß, dass die Zelle ihre Homöostase verliert. Mechanismen, die dem Homöostaseverlust entgegenwirken oder Reparatur einleiten sollen, haben hier keine funktionelle Relevanz.

Der Zelltod im Gebiet der Penumbra gleicht dem Bild der Apoptose und wird auf molekularer Ebene sowohl über eine Kaskade von Proteasen, den Caspasen, als auch Caspasen-unabhängig reguliert (Broughton et al., 2009). Obwohl die meisten experimentellen Schlaganfallstudien die Bedeutung der Apoptose sowie ihre biochemischen Merkmale nachweisen konnten, sind die charakteristischen histopathologischen Merkmale der Apoptose wie Chromatinkondensation oder Schrumpfung des Zytoplasmas insbesondere beim Menschen selten darstellbar (Dirnagl et al., 1999).

1.2.2. Apoptoseregulation

Die Regulation der Apoptose (programmierter Zelltod) basiert auf der Initiation einer Signalkaskade, die in Folge eines schädlichen Stimulus in der Zelle aktiviert wird und in ihren grundlegenden Mechanismen in allen Zellen, Geweben und Spezies durch hochkonservierte Signalwege vermittelt wird (Danial und Korsmeyer, 2004). Wenngleich sich nicht in allen experimentellen Schlaganfallstudien die typischen morphologischen und histopathologischen Kriterien der Apoptose nachweisen liessen, so sind doch eine Reihe molekularer und biochemischer Kriterien der Apoptose im Rahmen des ischämischen neuronalen Zelltods erfüllt. Die Bedeutung der Apoptose für die Pathophysiologie des Schlaganfalls ist in mehreren Übersichtsarbeiten zusammen gefasst (Dirnagl et al., 1999; Galluzzi et al., 2009b; Lo et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004).

Die Apoptose wird u. a. durch die Initiierung einer Kaskade biochemischer Reaktionen die letztlich zur Aktivierung der Caspasen führt charakterisiert. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein Proteasen, die auch im Gehirn konstitutiv exprimiert werden und nach Aktivierung durch extrinsische und intrinsische Stimuli die Zerstörung der Zelle, ihrer Kompartimente und Moleküle vermitteln (Galluzzi et al., 2009b).

Auf molekularer Ebene wird die Apoptose durch den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg reguliert. Der extrinsische Signalweg ist durch die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren (death receptors) charakterisiert. Zu dieser Rezeptorfamilie gehören TNF-R (Tumornekrosefaktorrezeptor), CD95/Fas und DR4/5, die durch TNF (Tumornekrosefaktor), FasL (Fas Ligand) und Apo21/TRAIL („TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand“) stimuliert werden. Nach Stimulation der Todesrezeptoren formiert sich ein zytoplasmatischer Proteinkomplex, der sogenannte Death-Inducing Signaling Complex (DISC) (Danial und Korsmeyer, 2004). Zu den intrinsischen Aktivatoren der Apoptose gehören u. a. erhöhte intrazelluläre Kalziumlevel, freie Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS), Glutamat und DNA Schaden. Beide Signalwege führen durch direkte oder indirekte Schädigung mitochondrialer Membranen zur Aktivierung der Caspasen (Galluzzi et al.,

2009b; Nicotera und Lipton, 1999). Nachdem sie aktiviert wurden, degradieren Caspasen eine Vielzahl Substrate wie beispielsweise DNA-Reparaturenzyme wie PARP, Strukturproteine des Zytoskeletts, Presinilin, Huntingtin, Caspase-aktivierte Deoxyribonucleasen (ICAD) oder aktivieren andere Caspasen (sogenannte Executionercaspasen). So wird beispielsweise Caspase3, die wichtigste Executionercaspase im Gehirn, im Rahmen der zerebralen Ischämie vor allem in den Periinfarktregionen aktiviert (Endres et al., 1998). Die Bedeutung der Caspasen für den Parenchymschaden in experimentellen Schlaganfallmodellen zeigt sich u. a. darin, dass pharmakologische Inhibition oder genetische Disruption von Caspasen einen robusten neuroprotektiven Effekt zeigen bzw. die Läsionsgröße reduzieren (Endres et al., 1998; Fink et al., 1998; Le et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Faktor in der Apoptoseregulation und -induktion ist Cytochrom C. Sobald es aus Mitochondrien freigesetzt wird induziert Cytochrom C die Bildung des Apoptosoms, einem Multiproteinkomplex bestehend aus Cytochrom C, dem zytosolischen Protein Apaf-1 und Procaspase 9. Durch das Apoptosom wird Caspase 9 aktiviert, welche wiederum zu einer Aktivierung weiterer Caspasen führt (Galluzzi et al., 2009b). Die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien hängt maßgeblich von der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran ab. Diese wird u. a. durch die Familie der Bcl-2 Proteine reguliert. Diese apoptoseregulierende Proteinfamilie ist in Proteine mit proapoptotischer Funktion (z. B. Bid, Bax, Bak, Bad) und solche mit antiapoptotischer Funktion aufgeteilt (z. B. Bcl-2 und BclXL) (Danial, 2007). Diese können die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran entweder durch Kompetition der anti- und proapoptotischen Proteine fördern, oder durch eine geordnete Abfolge einzelner Schritte zu ihrer Permeabilisierung beitragen (Billen et al., 2008; Lovell et al., 2008). Zu den Charakteristika der Apoptose gehören beispielsweise die Translokation von Phosphatidylserin auf die äußere Seite der Plasmamembran (dargestellt mittels Annexin V Färbung) oder oligonucleosomale DNA-Fragmentierung („DNA laddering“), welche sich auch in einer Vielzahl experimenteller Schlaganfallstudien finden (Endres et al., 1998; Galluzzi et al., 2009a; Mergenthaler et al., 2004).

1.3. Präkonditionierung und endogene Neuroprotektion

Beim Schlaganfall werden nicht nur Kaskaden eingeleitet, die in den Zelluntergang münden, sondern auch endogene protektive Mechanismen aktiviert. Die Präkonditionierung stellt einen Prozess dar, der die endogenen Mechanismen der Protektion gegenüber einem schädlichen Stimulus aktiviert. Sie hat sich als globales biologisches Konzept des Organismus zur Toleranz bzw. zum Schutz vor schädlichen Stimuli herausgestellt (Dirnagl et al., 2003).

Durch Einwirkung eines schädigenden, mit reduzierter Intensität einwirkenden Stimulus kann ein Gewebe einen später folgenden, unter normalen Umständen tödlichen Stimulus tolerieren. Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung bezeichnet im Gehirn kurze, nicht letale ischämische Intervalle, die zu Toleranz gegenüber folgenden, eigentlich letalen Ischämien führen (Kitagawa et al., 1990).

Nach der Stimulation entwickelt sich die ischämische Toleranz in zwei Phasen. Bei der sogenannten klassischen Präkonditionierung entwickelt das Gewebe Innerhalb weniger Minuten eine für ca. fünf bis 120 Minuten anhaltende Toleranz. Die verzögerte Präkonditionierung der zweiten Phase entwickelt sich ca. 24 bis 72 Stunden nach dem präkonditionierenden Stimulus und hält mindestens drei Tage an. Nach sieben Tagen ist ein Zustand der Toleranz nicht mehr nachweisbar. Der verzögerten Phase der Präkonditionierung wird heute die größte wissenschaftliche Aufmerksamkeit gewidmet, da aus ihrer Robustheit und ihrem lang anhaltenden Bestehen potenzielle klinische Relevanz abgeleitet wird (Dirnagl et al., 2009).

Neben der ischämischen Präkonditionierung kann Toleranz gegenüber einer zerebralen Ischämie auch durch verschiedene andere Faktoren induziert werden. Zu diesen Stimuli gehören u. a. Hypo- und Hyperthermie, Zytokine, Inflammation, Epilepsie und *spreading depressions*. Präkonditionierungsphänomene werden neben dem Gehirn in einer Reihe weiterer Organe beobachtet, von denen das Herz zu den am besten untersuchten Organen gehört und bedeutend zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen beigetragen hat (Dirnagl et al., 2003).

1.3.1. Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung

Die Induktion der ischämischen Präkonditionierung und die Entstehung von Ischämietoleranz beruhen auf der Abfolge verschiedener, gut charakterisierter Signaltransduktionskaskaden. Hierbei spielt u. a. eine auf dem Transkriptionsfaktor HIF-1 basierende Signalkaskade eine bedeutende Rolle (Dirnagl et al., 2003; Kirino, 2002).

1.3.2. Genregulation unter Hypoxie - HIF-1

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (*hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1) ist ein wichtiger Regulator in der Adaptation der Zelle und des Organismus auf Veränderungen in der Sauerstoffhomöostase (Semenza, 2007). HIF-1 wird in Säugetieren in nahezu allen Zellen exprimiert und wird als Antwort auf hypoxische Veränderungen des Milieus reguliert (Wang und Semenza, 1993). So aktiviert HIF-1 z. B. die Transkription von

Genen, die die Sauerstoffverteilung erhöhen oder eine metabolische Anpassung des Zellstoffwechsels an die reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit ermöglichen.

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, das aus HIF-1 α und HIF-1 β Untereinheiten besteht. Beide Untereinheiten enthalten aminoternale *basic-helix-loop-helix-PAS* Domänen, die die Dimerisation der Untereinheiten und die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA vermitteln (Semenza, 2007). Die Stabilität der HIF-1 α Untereinheit wird in hohem Maße von der zellulären Sauerstoffkonzentration beeinflusst. Unter normoxischen Bedingungen erfolgt ein rascher Abbau von HIF-1 α . HIF-1 α wird im Zytoplasma und im Zellkern von Prolylhydroxylasen hydroxyliert und damit dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. Die HIF-1 Prolylhydroxylasen 1, 2 und 3 (HPH1, HPH2 und HPH3) hydroxylieren die Prolinreste 402 und 564 der ODD (oxygen-dependent degradation domain) von HIF-1 α . Über eine Interaktion mit dem von Hippel-Lindau-Protein wird HIF-1 α nun ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen akkumuliert HIF-1 α im Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 β und reguliert die Transkription einer großen Anzahl von Genen, die u. a. den Zellmetabolismus, die Gefäßbiologie, Proliferation und Apoptose beeinflussen (Sharp und Bernaudin, 2004).

Neben den ubiquitären HIF-1 α und HIF-1 β Untereinheiten sind weitere Untereinheiten der HIF-Familie beschrieben (z. B. HIF-2 α und HIF-3 α). Sie scheinen aber, im Gegensatz zu den generellen Funktionen von HIF-1 bei der Reaktion des Zellapparats auf Hypoxie, spezialisiertere Aufgaben in der Sauerstoffhomöostase zu haben (Semenza, 2007).

Die Genregulation durch HIF-1 hat in einer Reihe von Krankheiten eine große Bedeutung. Neben der Relevanz in der Tumorbilogie, pulmonaler Hypertension und der Präeklampsie hat HIF-1 auch Einfluss auf eine Reihe neurologischer Erkrankungen (Schlaganfall, amyotrophe Lateralsklerose, Parkinson, Hirntumore). Im Rahmen der durch hypoxische Präkonditionierung hervorgerufenen ischämischen Toleranz (IT) wird der hypoxischen Induktion von HIF-1 und der Regulation von HIF-1-Zielgenen Bedeutung beigemessen (Dirnagl et al., 2003; Sharp und Bernaudin, 2004).

1.3.3. Veränderungen der Genexpression im Rahmen von ischämischen Ereignissen

In Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Neeb, 2006) ebenso wie in Arbeiten anderer Gruppen (Bernaudin et al., 2002) wurde gezeigt, dass sich die Expressionsmuster verschiedenster Gene im Rahmen der Präkonditionierung verändern. So findet sich bei der Präkonditionierung durch Induktion von HIF-1 u. a. eine deutliche Regulation des Gens Hexokinase II.

1.4. Hexokinase

Der Glukosestoffwechsel hat in nahezu allen Organismen eine zentrale Bedeutung. Der erste Schritt des Glukosemetabolismus ist die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Glukose-6-Phosphat ist das Substrat für verschiedene Wege des Glukosestoffwechsels wie der Glykolyse zur Energiegewinnung, der Umwandlung in die Speicherformen Glykogen und Stärke und dem Pentosephosphatweg. Die Phosphorylierung von Glukose erfolgt durch das Enzym Hexokinase (Abb. 1.1).

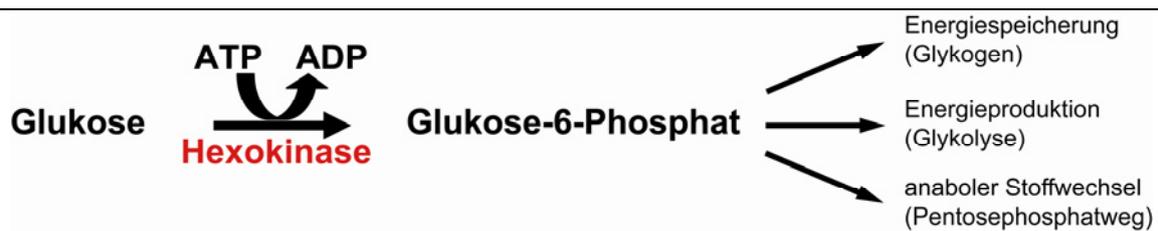


Abb. 1.1: Die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch die Hexokinase stellt den gemeinsamen ersten Schritt in den Stoffwechselwegen des Glukosemetabolismus dar. Nach (Wilson, 2003).

1.4.1. Strukturelle Eigenschaften der Hexokinasen und Regulation ihrer Funktion

In den Geweben von Säugetieren finden sich vier Isoenzyme der Hexokinase, die als Typ I, Typ II, Typ III und Typ IV Isoenzym bezeichnet werden. Die Hexokinase IV wird auch als Glukokinase bezeichnet und unterscheidet sich in mehreren Eigenschaften von den Hexokinasen I-III. Während die Hexokinase IV ein Molekulargewicht von 50 kDa aufweist, haben die Hexokinasen Typ I-III ein Molekulargewicht von 100 kDa. Die Isoenzyme I-III haben sich im Laufe der Evolution wahrscheinlich durch Duplikation und Fusion aus einer urtümlichen 50 kDa Hexokinase entwickelt. Hierfür sprechen interne Sequenzrepetitionen und weit reichende Ähnlichkeiten der Sequenz der N- und C-Termini sowohl untereinander als auch im Vergleich zu Hexokinasen in Hefen und anderen Organismen. Für die Hexokinasen I-III stellt Glukose-6-Phosphat einen potenten Inhibitor dar. Weiterhin haben die Hexokinasen I-III eine hohe Glukoseaffinität und die Hexokinase III wird durch Glukose inhibiert. Die Hexokinase IV dagegen wird weder durch Glukose-6-Phosphat noch durch Glukose inhibiert und zeigt außerdem nur eine geringe Affinität zu Glukose. Die katalytische Aktivität der Hexokinase I liegt in der C-terminalen Hälfte des Proteins, während die N-terminale Hälfte eine regulatorische Funktion erfüllt. Bei der Hexokinase II besitzen dagegen sowohl die C- als auch die N-terminale Hälfte katalytische Aktivität (Pastorino und Hoek, 2003; Wilson, 2003).

Nur die Hexokinasen I und II haben die Fähigkeit direkt an Mitochondrien zu binden. Ein Anionenkanal der äußeren Mitochondrienmembran, der *voltage-dependent anion channel* (VDAC) stellt die Bindungsstelle an Mitochondrien dar (Felgner et al., 1979; Fiek et al., 1982; Pastorino und Hoek, 2008). Die Lokalisation der Hexokinase I und II in der Mitochondrienmembran oder im Zytosol wird dynamisch reguliert und kann zwischen einzelnen Geweben deutlich variieren (Robey und Hay, 2005). Beide Isoenzyme besitzen eine mitochondriale Lokalisationssequenz, die aus einer hydrophoben Sequenz am N-Terminus des Proteins besteht (Abb. 1.2). Diese N-terminale Sequenz ist ausreichend für die mitochondriale Bindung der Proteine (Pastorino und Hoek, 2008). Weiterhin wird die mitochondriale Lokalisation der Hexokinase II durch die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin an Position 473 der Aminosäuresequenz (T473; Abb. 1.2) durch die Akt-Kinase reguliert (Miyamoto et al., 2008). Die Hexokinase III und die Glukokinase besitzen keine mitochondriale Lokalisationssequenz und binden auch nicht an Mitochondrien. Für die Hexokinase III wurde allerdings eine Bindung an nukleäre Membranen beobachtet, wobei die funktionelle Implikation dieser Lokalisation unklar ist. Die Glukokinase ist zwar als rein zytosolisches Enzym beschrieben (Pastorino und Hoek, 2003), kann aber als Teil eines Multiproteinkomplexes auch mitochondrial lokalisiert sein (Danial et al., 2003).

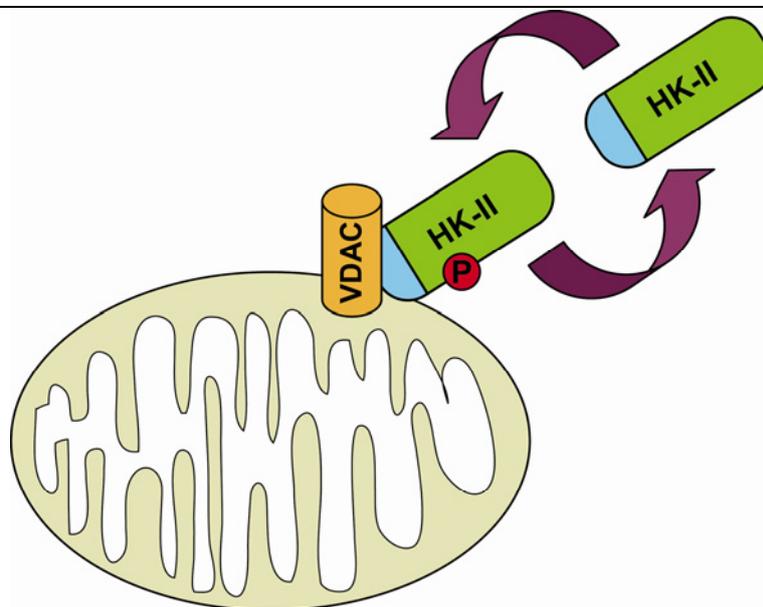


Abb. 1.2: Regulation der Bindung der Hexokinase II an VDAC in der äußeren Mitochondrienmembran. Hierfür sind die N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz (blau) sowie die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase notwendig. Im dephosphorylierten Zustand ist die Hexokinase II im Zytosol lokalisiert.

1.4.2. Expressionsmuster und Expressionsregulation der Hexokinasen

Die Hexokinase weist unter homöostatischen Bedingungen ein Isoenzym-spezifisches Expressionsmuster auf. Die Hexokinase I ist das vorherrschende Isoenzym im Gehirn, die Hexokinase II stellt die Hauptisoform in Insulin-sensitiven Geweben wie Herz- und Skelettmuskel, den Mesangiumzellen der Niere und dem Fettgewebe dar. Allerdings ist die Hexokinase I in einer Vielzahl weiterer Gewebe konstitutiv exprimiert, während die Expression der Hexokinase II einer stärkeren Regulation unterliegt (Robey und Hay, 2006). Die Hexokinase III ist in geringem Maße in vielen verschiedenen Geweben zu finden und wird in der Lunge in stärkerem Maße exprimiert. Die Hexokinase IV wird ausschließlich in der Leber und den β -Zellen des Pankreas exprimiert (Pastorino und Hoek, 2003), wobei es auch Berichte über eine Expression dieses Hexokinase Isoenzym in spezialisierten Neuronenpopulationen gibt (Iynedjian, 2009).

Schon seit den 1920er Jahren ist bekannt, dass Zellen maligner Tumore einen deutlichen Unterschied hinsichtlich ihrer Stoffwechselfunktionen zu normalen Zellen aufweisen (Warburg et al., 1927). So ist die Glykolyse für schnell wachsende, maligne Tumore eine Hauptquelle ihres Energiebedarfs (Dang und Semenza, 1999). Selbst unter Bedingungen normaler Sauerstoffspannung kommt es zu einem Anstieg der glykolytischen ATP-Synthese, dem sogenannten Warburg-Effekt (Cohen et al., 2002). In vielen hochmalignen Tumorzellen kann in dieser Hinsicht, unabhängig vom Ursprungsgewebe des Tumors, eine starke Expression der Hexokinase II und z. T. eine schwächere Expression der Hexokinase I, beobachtet werden (Mathupala et al., 1997). In Hepatomazellen dominiert beispielsweise nicht mehr die Expression der Hexokinase IV wie in gesundem Leberparenchym, sondern in hohem Maße die der Hexokinase II. In Nierenzellkarzinomen findet sich eine Expressionsverschiebung von Hexokinase I in normalen Nierenzellen zu Hexokinase II in malignen Zellen. Auch in den Zellen von Bronchialkarzinomen und weiterer maligner Tumore findet sich eine erhöhte Hexokinaseaktivität oder eine Zunahme des Transkripts der Hexokinase II. Weiterhin wird Hexokinase II z. B. normalerweise nicht in der adulten Leber, wohl aber in fetalen Leberzellen und in der adulten Leber während regenerativer Vorgänge, erhöhter Leberzellproliferation und reduzierter Apoptose exprimiert (Pastorino und Hoek, 2003; Smith, 2000; Wilson, 2003).

Die regulierenden Elemente der Hexokinasen wie Bindungsstellen und Promotorregionen sind weitgehend bekannt (Wilson, 2003). So ist die Promotorregion der Hexokinase II nicht nur durch Glukose, Glukagon und Insulin, sondern auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Hypoxie aktivierbar (Pastorino und Hoek, 2003), und die Expression der Hexokinase II

wird durch HIF-1 reguliert (Iyer et al., 1998). Der Hexokinase II Promotor besitzt neben einer Bindungsstelle für HIF-1 ein überlappendes Basenmotiv, das die Regulationsantwort auf unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst (Mathupala et al., 2001).

1.4.3. Apoptoseregulation durch Hexokinasen

Neben ihrer Rolle im Rahmen des Glukosemetabolismus konnte für die Isoenzyme I, II und IV der Hexokinase eine Beteiligung an der Regulation antiapoptotischer Signalwege nachgewiesen werden (Danial et al., 2003; Majewski et al., 2004a; Majewski et al., 2004b). In einer Reihe unterschiedlicher experimenteller Ansätze zeigten diese Isoenzyme der Hexokinase eine Apoptose-inhibierende Aktivität (Kim und Dang, 2005). In verschiedenen experimentellen Paradigmen wurde gezeigt, dass die mitochondriale Lokalisation der Hexokinase I und II Voraussetzung für die antiapoptotische Wirkung ist (Majewski et al., 2004a; Miyamoto et al., 2008; Pastorino et al., 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Bindung und damit die antiapoptotische Aktivität der Hexokinase II über den Phosphatidylinositol-3-Akt-Kinase-Signalweg reguliert wird (Miyamoto et al., 2008). Darüber hinaus scheint die Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) einen negativen Regulator der Hexokinase II darzustellen (Gimenez-Cassina et al., 2009). Eine vermehrte mitochondriale Bindung führt über eine Inhibition der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung zur Inhibition der Apoptose (Gottlob et al., 2001; Majewski et al., 2004a; Pastorino et al., 2002). Die genauen molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition der Hexokinase sind allerdings noch unklar. Derzeit werden zwei unterschiedliche Mechanismen in der Inhibition der Apoptose diskutiert. Zum einen soll es eine Behinderung der Oligomerisierung sowie eine direkte Interferenz mit den proapoptotischen Proteinen Bax und Bak geben (Robey und Hay, 2005). Zum anderen wird aber auch ein Bax/Bak-unabhängiger Mechanismus diskutiert. Dieser äußert sich darin, dass auch in Abwesenheit von Bax/Bak Apoptose durch Dissoziation von Hexokinase II und Mitochondrien induziert werden kann (Majewski et al., 2004a). Des Weiteren ergaben Analysen der Proteinstruktur, dass die Hexokinase II eine Domäne aufweist, wie sie für einige antiapoptotische Proteine wie z. B. Bcl_{XL} oder Bcl-2 typisch ist. Diese sogenannte BH4-Domäne stellt eine Bindungsstelle für proapoptotische Proteine dar und befindet sich bei der Hexokinase II im C-terminalen Teil des Moleküls (Pastorino und Hoek, 2003).

1.5. Transfektion und Überexpression von Genen in Primärkulturen neuronaler Zellen

Um die Bedeutung der Hexokinase II für die Mechanismen der endogenen Neuroprotektion untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Transfektion und allgemeinen funktionellen Charakterisierung transfizierter Gene in primären Kortexneuronen etabliert.

Die Transfektion ist eine gebräuchliche Methode, um mit einem Expressionsvektor ein bestimmtes Gen in Zellen zu überexprimieren oder zellfremde DNA zu exprimieren. Die Methode findet bei einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen erfolgreich Anwendung. Es gibt verschiedene gebräuchliche Transfektionsverfahren, die sich in ihrer Technik deutlich unterscheiden: chemische Transfektion, physikalische Transfektion, Elektroporation und Transfektion mit speziellen Viren. In der neuronalen Zellkultur finden alle Methoden Anwendung, jedoch mit einigen, zum Teil bedeutenden Einschränkungen. Auf die Möglichkeiten dieser Techniken beim Gentransfer in vivo wird hier nicht eingegangen.

Über lange Zeit war die Transfektion kultivierter, postmitotischer Neuronen ineffektiv, zytotoxisch und nur mit sehr großem Aufwand möglich. In den letzten Jahren ist es jedoch gelungen, Transfektionsansätze für die verschiedensten Bedingungen und Forschungsfelder der Neurowissenschaften zu etablieren. Bis auf die Elektroporation werden die verschiedenen technischen Transfektionsmöglichkeiten hier nur kurz beschrieben. Eine detailliertere Beschreibung der unterschiedlichen Methoden sowie ihre Vor- und Nachteile bietet die Arbeit von Washbourne und McAllister (Washbourne und McAllister, 2002).

Die viralen Transfektionsverfahren ermöglichen eine besonders hohe Transfektionseffizienz von nahezu 100 %, weisen jedoch z. T. eine gewisse Toxizität für kultivierte Neuronen auf. Außerdem besteht je nach verwendetem Virus eine Beschränkung hinsichtlich der Größe des zu transfizierenden Gens, und es ist nicht auszuschließen, dass die virale Infektion einen Einfluss auf Proteinsynthese hat.

Bei den chemischen Transfektionsverfahren werden unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet. Der klassische Ansatz ist die Calcium-Phosphat-Kopräzipitation, bei der DNA-Phosphat-Komplexe durch Endozytose aufgenommen werden. Dem gleichen Prinzip folgen auch die anderen chemischen Transfektionsverfahren wie Lipofektion, kationische Lipide und kationische Polymere. Allen Verfahren ist gemein, dass es auf einem weitgehend unbekanntem Weg zur Endozytose der DNA kommt. Die chemischen Transfektionsverfahren kommen bei einer Vielzahl von Zelllinien erfolgreich zum Einsatz, in der neuronalen Zellkultur ist die

Bedeutung dieser Verfahren allerdings aufgrund der relativ schlechten Transfektionseffizienz von 0,5% - 3% eher gering.

Zu den physikalischen Transfektionsmethoden gehören Techniken wie die Mikroinjektion, bei der einzelne Zellen mit einer Mikroinjektionskanüle punktiert werden und biolistische Verfahren [Wortschöpfung aus „biologische Ballistik“], bei denen die Zellen mit DNA-beschichteten Partikeln beschossen werden. Beide Verfahren eignen sich nicht zur Transfektion einer großen Population kultivierter Neurone (Washbourne und McAllister, 2002).

1.5.1. Elektroporation

1.5.1.1. Grundlagen der Elektroporation

Die Elektroporation ist heute eine Routinetechnik mit vielerlei Anwendungsmöglichkeiten. Neben dem Hauptanwendungsgebiet, der Transfektion von DNA, können auch verschiedene andere Makromoleküle wie Antikörper, Enzyme, Farbstoffe oder pharmakologische Stoffe transfiziert werden (Washbourne und McAllister, 2002).

Stark vereinfacht gliedert sich die Elektroporation in zwei Schritte: Zuerst wird ein elektrisches Feld an in einem speziellen Elektroporationspuffer suspendierte Zellen angelegt, so dass ein plötzlicher Anstieg des Transmembranpotenzials zur Bildung transienter Poren in der Zellmembran führt (Abb. 1.3a). Haben die Poren eine gewisse Größe, kann die zu transfizierende DNA im zweiten Schritt in die Zelle eindringen. Die Poren sind nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt, sondern konzentrieren sich an den den Elektroden der Elektroporationsvorrichtung zugewandten Polen der Zellen (Abb. 1.3b). Der Eintritt in die Zelle erfolgt durch elektrophoretische Kräfte, anhand derer sich die DNA im angelegten elektrischen Feld bewegt (Gehl, 2003). Während die Porenbildung innerhalb weniger Mikro- bis Millisekunden erfolgt, benötigt die Zelle im Anschluss an die Elektroporation mehrere Minuten, um die Poren wieder zu verschließen (Martinez und Hollenbeck, 2003).

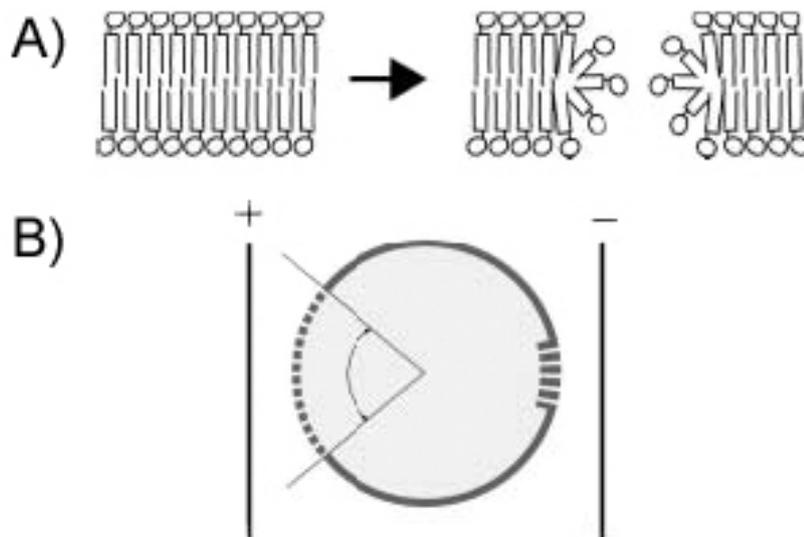


Abb. 1.3: (a) Bei der Elektroporation wird durch ein externes elektrisches Feld die elektrische Kapazität der Zellmembran überschritten. Dies führt zur Bildung transientser hydrophiler Poren in der Zellmembran. (b) Da das Transmembranpotenzial im Inneren der Zelle negativ ist, wird zuerst der der positiven Elektrode zugewandte Teil der Zellmembran permeabilisiert. *Modifiziert nach (Gehl, 2003)*

Bei der Elektroporation sind im Hinblick auf die Transfektionseffizienz und das Überleben der Zellen verschiedene Faktoren der Prozedur von Bedeutung. Sie beinhalten die Gesamtzahl der Zellen, die elektroporiert werden soll, die Größe des Zelltypus, die Parameter des angelegten elektrischen Feldes (Höhe der Spannung, Dauer des elektrischen Pulses, Aussehen der Pulskurve), die Zusammensetzung des Transfektionspuffers, sowie die Behandlung der Zellen nach der Transfektion. Die variablen Parameter müssen zur Etablierung der optimalen Elektroporationsbedingungen in der Regel für jeden Zelltypus empirisch bestimmt werden. Die Relevanz der einzelnen Faktoren sowie der physikalischen Prinzipien sind detailliert in (Gehl, 2003) und (Washbourne und McAllister, 2002) beschrieben.

1.5.1.2. Elektroporation von Neuronen

Die ersten erfolgreichen Versuche der Elektroporation von Neuronen resultierten noch in einer sehr geringen Transfektionseffizienz von maximal 2,3% (Li et al., 1997). Insgesamt ist eine effiziente Elektroporation von Neuronen deutlich schwerer zu erreichen als bei anderen Zelltypen. Neurone tolerieren die Permeabilisation ihrer Zellmembran schlechter als die meisten anderen Zelltypen. Es wurde gezeigt, dass sich die Transfektionseffizienz umgekehrt proportional zur Größe einer Zelle verhält. Dies erschwert die Elektroporation von Neuronen, da diese größer als viele andere Zelltypen sind. Als weiterer Grund für die relativ geringe Transfektionseffizienz wurde vermutet, dass die geringere Expression des transfizierten Gens

von der terminalen Differenzierung neuronaler Zellen abhängt, da die Plasmid-DNA nicht wie bei mitotischen Zellen in jedem Zellzyklus in den Zellkern gelangen kann (Martinez und Hollenbeck, 2003).

Während die Charakteristika neuronaler Zellen nicht verändert werden können, wurden Versuche unternommen, die Elektroporationsbedingungen so zu modifizieren, dass eine möglichst hohe Transfektionseffizienz erlangt werden konnte. Auf diesem Ansatz basiert eine kürzlich verfügbar gewordene Methode zur Elektroporation einer Vielzahl primärer und sonstiger schwer transfizierbarer Zelltypen (Gresch et al., 2004), die Amaxa Nucleofection™. Wie für viele andere Zelltypen auch werden die Elektroporationsbedingungen bei der Nucleofection™ durch einen speziellen Elektroporationspuffer und zelltypspezifische Parameter des elektrischen Pulses für Neuronen angepasst.

Die Stärken der Elektroporation bei der transienten Transfektion von Zelllinien, die hohe Reproduzierbarkeit der Transfektionsergebnisse, die Einfachheit der Anwendung durch wenige notwendige Arbeitsschritte und eine hohe Transfektionsrate, lassen sich mit der Nucleofection™ auch auf Neuronen übertragen. Die Transfektionsrate mit dieser Methode beträgt am Tag 1 nach Transfektion bis zu 60%. Die Methode eignet sich für eine Fülle verschiedener Anwendungen. So konnte z. B. mittels Transfektion eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und eines rot fluoreszierenden Proteins (DsRed) das Neuritenwachstum und die Interaktion unterschiedlicher Neuronenpopulationen beobachtet werden (Dityateva et al., 2003).

1.6. Fluoreszenzproteine

Seit einigen Jahren sind genetisch kodierte Fluoreszenzproteine als Reportergene verfügbar. Ihr großer Vorteil im Vergleich zu anderen Reportersystemen liegt in der Möglichkeit, ihre Expression oder die Expression eines Fusionsproteins in lebenden Zellen zu beobachten. Es konnten auch gesunde transgene Tiere mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen erzeugt werden. Normalerweise benötigen fluoreszierende Moleküle weitere Substrate oder Enzyme für ihre Biosynthese in lebenden Organismen. Die Fluoreszenzproteine GFP und die Familie der GFP-ähnlichen Proteine benötigen in der Regel keinen weiteren Kofaktor außer molekularem Sauerstoff und werden von den meisten Zelltypen gut toleriert (Voss et al., 2005).

1.6.1. Aequorea victoria Green Fluorescent Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde bereits 1962 in der zu Biolumineszenz fähigen Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und seine Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert (Shimomura et al., 1962). Erst 30 Jahre später wurde es jedoch durch die Klonierung der cDNA Sequenz des GFP Gens (Chalfie et al., 1994) möglich, das Protein als molekularen Fluoreszenzmarker einzusetzen (Tsien, 2009).

Durch mehrere Mutationen des ursprünglichen Wildtyp-GFP (wtGFP), wurde die Sequenz der zuletzt gebräuchlichen GFP Variante, eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), für die bessere Expression in humanen Zellen und für hellere Fluoreszenz optimiert (Heim et al., 1995).

Neben weiteren Mutationen, die zur Verbreiterung des Fluoreszenzspektrums in die GFP Sequenz eingeführt wurden und in den Proteinen eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und eCFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) resultierten, wurden mittlerweile auch in anderen biolumineszenten Tiefseetieren grün fluoreszierende Proteine entdeckt, die große genetische und strukturelle Ähnlichkeiten mit GFP aufwiesen.

GFP besteht aus einem Zylinder, der aus einem elf-strängigen β -Faltblatt und einer α -Helix, als Achse des Zylinders, gebildet wird. Das eigentliche Fluorophor ist an die α -Helix angeschlossen und liegt nahezu im Zentrum des Zylinders (*β -can* genannt). Es wird von den Aminosäuren 65 – 67 des Wildtyp Proteins gebildet und besteht aus der Abfolge von Serin, Tyrosin und Glyzin (Ser – Tyr – Gly). Der einzige für die komplette Faltung des fertigen Proteins notwendige Kofaktor ist molekularer Sauerstoff. Er bewirkt eine Dehydrogenierung der α - β Bindung von Tyr66. Die sichtbare Fluoreszenz tritt nur durch diesen Schritt auf. Unter komplett anaeroben Bedingungen ist daher keine Fluoreszenz detektierbar. Auf die Eigenschaften des maturierten Proteins hat Sauerstoff jedoch keinen Einfluss. Eine Konsequenz der Oxidation mit O_2 ist, dass Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Verhältnis 1:1 mit GFP gebildet wird. Dies ist möglicherweise auch ein Grund dafür, dass in manchen Fällen von besonders starker GFP Expression zerstörerische Effekte für die exprimierenden Zellen beobachtet wurden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Variante eGFP der Firma BD Clontech beinhaltet eine für die Expression in humanen Zellen optimierte Kodonfolge. Hierfür wurde ein neues Kodon (GTG) zwischen Aminosäure 1 und 2 eingefügt. Außerdem bewirkt die Mutation von Phe64 zu Leu eine verbesserte Proteinfaltung bei 37°C, und die Mutation von Ser65 zu Thr fördert die Ionisierung des Fluorophors. Für GFP wurden sowohl monomere als auch dimere Zustände beschrieben. Kommt es zu einer Dimerisation von eGFP, so ist diese relativ schwach und durch eine Mutation (A206K) aufzuheben (Shaner et

al., 2005). Einer solche Dimerisation scheint aber nur bei Proteinkonzentrationen über 1 mg/ml zu erfolgen (Leutenegger et al., 2007).

1.6.2. Reef Coral Fluorescent Proteins (RCFP)

Mit der Entdeckung von fluoreszierenden Proteinen in Spezies die nicht über biolumineszente Eigenschaften verfügen, wurde das Frequenzspektrum der verfügbaren Fluoreszenzproteine deutlich erweitert (Matz et al., 1999). Neben weiteren grün fluoreszierenden Proteinen wurden auch gelb und rot fluoreszierende Proteine entdeckt. Diese neuen Fluoreszenzproteine wiesen zwar insgesamt nur eine etwa 30%ige Ähnlichkeit mit dem Aequorea GFP auf, zeigten jedoch eine hohe Konservierung von wichtigen GFP Strukturen. Sie beinhalten u. a. die β -can Struktur des Proteins und die Aminosäuren aus denen das Fluorophor gebildet ist (1.4). Wie bei GFP benötigt die Bildung des Fluorophors nur molekularen Sauerstoff als Kofaktor. Im Gegensatz zu GFP bilden die von Matz et al. beschriebenen Fluoreszenzproteine bis auf eine Ausnahme alle Tetramere (Tsien, 2009). Das Protein drFP583 ist die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Varianten DsRed2 und DsRedExpress der Firma BD Clontech. Die Variante DsRed2 beinhaltet Mutationen, die zu einer schnelleren Maturation des Proteins führen. Die Mutationen der Variante DsRedExpress führen zu einer noch schnelleren Detektierbarkeit sowie zu einer Reduktion der residualen grünen Fluoreszenz des Proteins (Clontech, 2003).

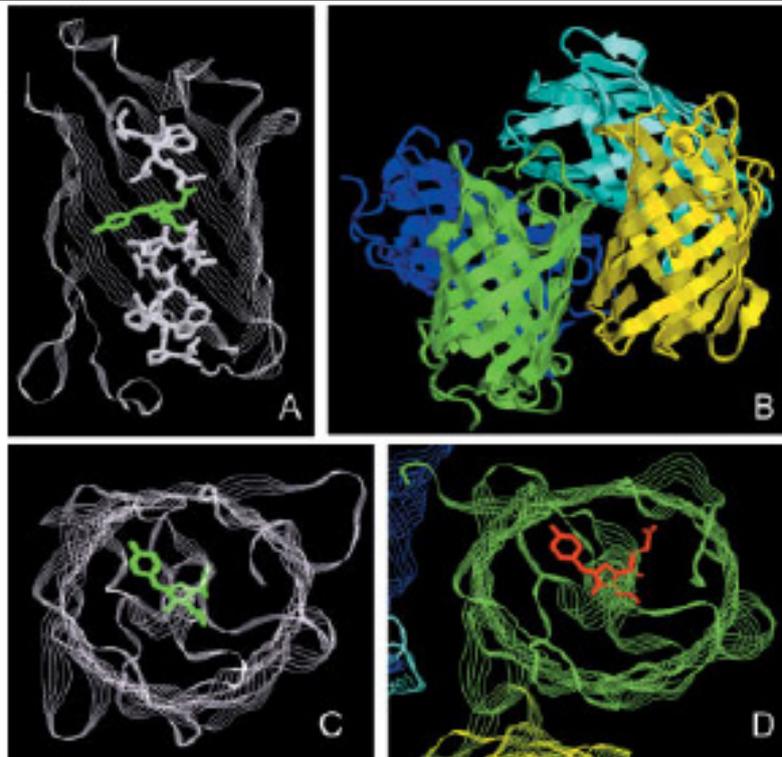


Abb. 1.4: Gemeinsamkeiten der Struktur von GFP und DsRed (a) β -can Struktur des *Aequorea victoria* GFP. Der vordere Teil der β -can ist entfernt worden um das Fluorophor (grün) darzustellen. (b) Darstellung eines DsRed Tetramers. (c) Aufsicht auf die β -can Struktur von GFP. (d) Aufsicht auf die β -can Struktur von DsRed. Aus (Matz et al., 2002).

1.6.3. Verbesserte monomere Fluoreszenzproteine

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden einige neue Varianten einer monomeren Form von DsRed (mRFP1) beschrieben (Shaner et al., 2004). Diese neuen Varianten sind allesamt Monomere und überwinden somit eine der wesentlichen Limitationen von DsRed beim Einsatz als Reporterprotein. Neben Veränderungen, die zu einer flexibleren Verwendbarkeit bei der Generierung von Fusionsproteinen führten, konnte die Helligkeit aller wichtigen Varianten im Vergleich zu mRFP1 deutlich erhöht und das Fluoreszenzspektrum erweitert werden, so dass nun eine Fülle von monomeren Fluoreszenzproteinen im Spektralbereich von grün bis dunkelrot (507 nm bis 610 nm) zur Verfügung steht. Eine der neuen Varianten, mCherry (610 nm), wurde schon erfolgreich zur Generierung eines funktionellen Fusionsproteins verwendet. Einen Vergleich der wichtigsten Charakteristika bietet Tabelle 1.1.

Fluoreszenzprotein	Anregungs- maximum	Emissions- maximum	Helligkeit (*)	Quartär- struktur	Zeit bis Detektion	Genbank Referenz
eGFP	488 nm	507 nm	34	schwaches Dimer	8-12 h	<i>n. v.</i>
DsRed2	563 nm	582 nm	<i>n. v.</i>	Tetramer	24 h	<i>n. v.</i>
DsRedExpress	557 nm	579 nm	17,1	Tetramer	8-12 h	<i>n. v.</i>
mOrange	548 nm	562 nm	49	Monomer	2,5 h	gi:55420614
mCherry	587 nm	610 nm	16	Monomer	0,25 h	gi:55420612

Tab. 1.1: [*n. v.*: Information nicht verfügbar] Charakteristika der im Text erwähnten Fluoreszenzproteine. (*) Die Helligkeit wird als Produkt aus *quantum yield* und Extintionskoeffizient in $(\text{mM} * \text{cm})^{-1}$ angegeben. Eine ausführliche Darstellung der Charakteristika aller z. Zt. Verfügbaren Fluoreszenzproteine findet sich in (Shaner et al., 2005; Shaner et al., 2007).

2. Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit gliederte sich in zwei Teilaspekte.

Zum einen war es Ziel der Arbeit nachzuweisen, dass die Hochregulation der Hexokinase II mRNA, wie sie im Zustand der endogenen Toleranz beobachtet wurde (Neeb, 2006), zur Neuroprotektion führt. Die Neuroprotektion sollte mittels Überexpression des Gens der Hexokinase II untersucht werden.

Zur Durchführung der Überexpression war es zum anderen notwendig, ein effektives Transfektionssystem zur Untersuchung protektiver Gene in primären Kortexneuronen zu entwickeln. Hierbei sollte zunächst die Methode der NucleofectionTM optimal an die Anforderungen der primären neuronalen Kortexkultur angepasst und gewährleistet werden, dass die Transfektion spezifisch für Neuronen ist. Weiterhin sollte ein System zur spezifischen Detektion transfizierter Neurone entwickelt werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Produkt	Lieferant
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) >99.5%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Agar-Agar (pure)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Agarose NEEO Ultra	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
dNTP-mix	Promega, Mannheim (Deutschland)
EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Ethanol	Baker, Deventer (Niederlande)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Glycerol, >99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Milchpulver, blocking grade	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Paraformaldehyd, extra pure	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Peptone	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim (Deutschland)
TEMED	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, ~98% purity	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Tris-hydrochloride, >99% purity	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Triton®X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Western Blotting Luminol Reagent	Santa-Cruz, Heidelberg (Deutschland)
Yeast extract	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
β -mercaptoethanol	Merck, Darmstadt (Deutschland)
β -Nicotinamid Adenin Dinucleotid, reduziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)

3.1.2. Kits

Kit	Hersteller
BCA assay	Pierce, Bonn (Deutschland)
QIAGEN Endofree Maxiprep Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAquick Gel extraction/PCRPurification Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)

3.1.3. Bakterienstämme

	Hersteller
One Shot TOP 10 Competent Cells (elektrokompetent)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland)

3.1.4. Kommerzielle Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pDRIVE-CAG	Invitrogen-Cayla, Toulouse (Frankreich)
pDsRed2-N1	Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pEGFP-N1	Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pEGFP-N2	Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pIRES-DsRedExpress	Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
pRSET-B_mCherry	Roger Tsien, UCSD, LaJolla, CA (USA)
pRSET-B_mOrange	Roger Tsien, UCSD, LaJolla, CA (USA)

3.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
B27 supplement	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
B27 supplement w/o retinoic acid	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Collagen G	Biochrom, Berlin (Deutschland)
D-(+)-Glucose >99.5% purity	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
DMEM High Glucose	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
FCS (fetal calf serum)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
FCS (fetal calf serum) GOLD	PAA, Linz (Österreich)
Glutamate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
HEPES 1M	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Insuline	Aventis, Frankfurt (Deutschland)
L-glutamine	Biochrom, Berlin (Deutschland)
MEM-Earle	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Neurobasal A Medium	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Neurobasal Medium	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin 10,000IE/ Streptomycin 10,000 µg/ml (Pen/Strep)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
PBS w/o	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Poly-L-Lysine (0.1 mg/ml)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Trypan Blau	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin (Deutschland)

3.1.6. Antikörper

Antikörper	Hersteller
rabbit anti-BclXL monoclonal antibody	Cell Signaling Technology, Frankfurt (Deutschland)
Rabbit anti-Hexokinase Typ II	Chemicon, Millipore, Schwalbach (Deutschland)
Mouse anti-rat brain microtubule-associated proteins	Sigma-Aldrich, München (Deutschland)
donkey anti-rabbit Alexa594 IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Goat anti-rabbit Texas Red IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Goat anti-mouse FITC IgG	Sigma-Aldrich, München (Deutschland)
donkey anti-rabbit HRP-linked	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)

3.1.7. Geräte

Gerät	Hersteller
Anaerobierkammer Concept 400	Ruskinn Technologies, Bridgend (UK)
Bakterien Elektroporator	Bio-Rad, München (Deutschland)
Bakterieninkubator	Minitron, Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Blotting System	Biorad Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, München (Deutschland)
Elektrophoresesystem – horizontal	Biorad Mini-Sub Cell, Biorad, München (Deutschland)
Elektrophoresesystem – vertikal	Biorad Miniprotean 3 cell, Biorad, München (Deutschland)
Fluoreszenzfilter für Mikroskop DMIL: F41-025, F41-027, F41-041	AHF Analysetechnik AG, Tübingen (Deutschland)
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Lo Laboroptik, Friedrichsdorf (Deutschland)
Kühl- / Gefrierschränke	AEG, Frankfurt; Liebherr Ochsenhausen (Deutschland)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA Labortechnik, Staufen (Deutschland)
Mikroskope Leica DMIL mit Fluoreszenz- / Kamerasystem, Stereomikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Mikrowelle	Braun, Kronberg (Deutschland)
Nucleofector I	Amaxa GmbH, Köln (Deutschland)
pH Meter	pH100, VWR International, Darmstadt (Deutschland)
Photometer	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Plate reader	MRXTC Revelation, Thermo Labsystems, Dreieich (Deutschland)
Reinstwasseranlage	Millipore GmbH, Schwalbach (Deutschland)

Schüttler	Edmund Bühler Lab Tec, Tübingen (Deutschland)
Spannungsquelle für Gelelektrophorese	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Sterilwerkbank (laminar flow)	Nuaire, COTECH Berlin (Deutschland)
Thermocycler	
Hybaid PCRexpress	Thermo Scientific, Bonn (Deutschland)
Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen (Deutschland)
Thermomixer	IKA Labortechnik, Staufen (Deutschland)
Tischschüttler	IKA Labortechnik, Staufen (Deutschland)
Typhoon 8600	Amersham Biosciences, Freiburg (Deutschland)
Vakuumpumpe	Vacubrand, Wertheim (Deutschland)
Wagen	CP225D Sartorius, Göttingen (Deutschland) BL150 Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen (Deutschland)
Zellkulturinkubator	Nuaire, COTECH Berlin (Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Universal 30RF, Hettich Universal 32R, Thermo Electron, Oberhausen (Deutschland), Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

3.1.8. Medien- und Pufferzusammensetzungen

Medium	Zusammensetzung
Collagen-Med	MEM, 5% FKS Gold, 1% Pen/Strep, 1% 1 M HEPES, 1% CollagenG
DMEM	DMEM (w 3,7 g/l NaHCO ₃ , w 4,5 g/l D-Glucose, w/o L-Glutamine, w/o Na-Pyruvate), 10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin
Elektroporationspuffer B1	NaCl 192 mmol/l, KCl 9,6 mmol/l, MgCl ₂ 10 mmol/l
Elektroporationspuffer B2	NaCl 192 mmol/l, KCl 9,6 mmol/l, MgCl ₂ 15 mmol/l
LB-Med / -Agar	Bacto-Tryptone 1% (w/v), Bacto-yeast extract 0,5% (w/v), NaCl 1% (w/v) für Agar: +0,75% (w/v) Agar
NBM	NBM-A (w/o L-Glutamine), 2% B27, 1% Pen/Strep, 0,25% L-Glutamin
NBM-A	NBM-A (w/o L-Glutamine), 2% B27, 1% Pen/Strep, 2 µM L-Glutamin
N-Med	MEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep, 0,25% Insulin, 1% 1 M HEPES, 0,8% Glukose
BSS ₀	NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, MgSO ₄ 0,8 mM, NaH ₂ PO ₄ 1 mM, NaHCO ₃ 26,2 mM, HEPES 10 mM, Glycine 9,96 µM, CaCl ₂ 1,8 mM
BSS ₁	BSS ₀ + Glukose 1 mM

3.1.9. Tiere

Embryonen von Wistar Ratten, Embryonaltag 17 – 19	Versuchstierhaltung der Charité, Tucholskystrasse, Berlin
---	---

3.1.10. Software

Software	Hersteller
Nucleotide, Protein, pubmed Datenbanken, BLAST Programm	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA; http:// www.ncbi.nlm.nih.gov
EndNote	Thomson Reuters, New York, NY (USA)
Microsoft Office	Microsoft GmbH, Unterschleißheim (Deutschland)
SPSS	SPSS GmbH, München (Deutschland)
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München (Deutschland)

3.1.11. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Elektroporationsküvetten (steril) für Nucleofector 1™	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
Plastikwaren	Eppendorf, Hamburg (Deutschland) Nunc, Langenselbold (Deutschland) Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Fuji Röntgenfilm RX	Kisker Biotech, Steinfurt (Deutschland)

3.2. Methoden3.2.1. Molekularbiologie

Alle molekularbiologischen Techniken wurden nach standardisierten Protokollen durchgeführt (Mülhardt, 2003; Sambrook und Russel, 2001).

Die Klonierung der Expressionsvektoren erfolgte nach einem Standardprotokoll (Sambrook und Russel, 2001). Die einzelnen Schritte bestanden aus der Vorbereitung des Leervektors pCAG-MCSn1 mittels Restriktionsverdau und der Herstellung des Inserts mittels PCR oder Restriktionsverdau. Nach erfolgter Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit und der Bestätigung der Größenanalyse des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese wurden Insert und Vektorgerüst mit T4-DNA-Ligase nach Protokoll des Herstellers ligiert. Es wurden immer 25 ng linearisierter Vektor zur Ligation verwendet. Zur Bestimmung der benötigten Menge Insert wurde folgende Formel verwendet (Mülhardt, 2003):

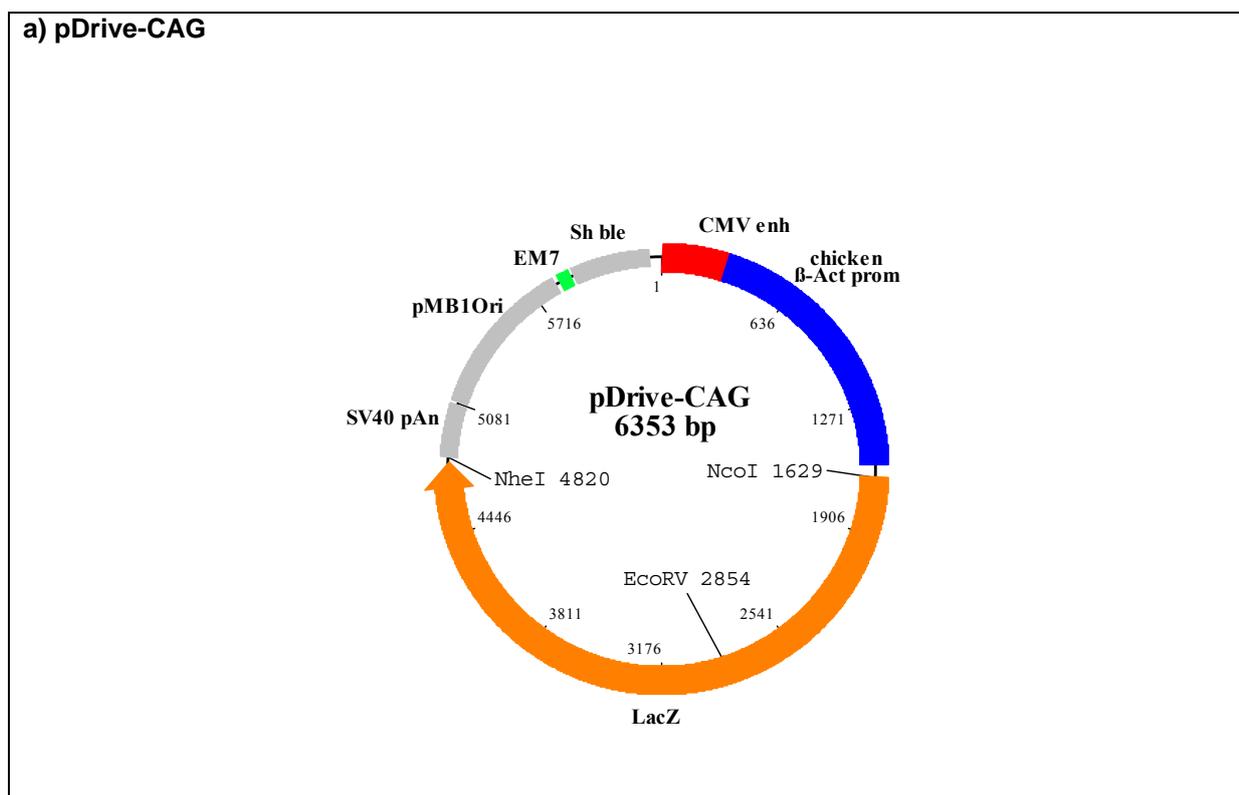
$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] * \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Es erfolgte die Transformation des ligierten Plasmids in einen modifizierten Escherichia Coli Stamm (Genotyp: *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*; TOP-10, Invitrogen) und darauf folgender einstündiger Inkubation bei 37°C in SOC Medium. Im Anschluss wurde die SOC-Bakterien Suspension auf vorbereiteten LB-Agar Platten, die mit dem Selektionsantibiotikum des Vektors versetzt worden waren, ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 12-16 Stunden bis zu einem Durchmesser der Bakterienkolonien von ca. 1,5 mm inkubiert. Nun wurden mehrere Kolonien in 3 ml LB Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt und für 8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Aus einer 3 ml Kultur wurde nun mit einer 1:1000 Verdünnung eine 100 ml Kultur angelegt und für 12-16 Stunden in LB Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum bei 37°C geschüttelt. Die Präparation der DNA erfolgte mit dem QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Güte und Menge der resultierenden endotoxinfreien Plasmid-DNA wurde photometrisch gemessen. Die Überprüfung der Klonierung erfolgte mittels Restriktionsverdau des gereinigten Vektors zur Größenanalyse des Inserts. Die Sequenzen der

Vektorinserts und des Grundvektors pCAG-MCSn1 wurden außerdem mittels Sequenzierung überprüft.

3.2.1.1. Konstruktion des Grundvektors pCAG-MCSn1

Aus dem Plasmid pDRIVE-CAG mit dem kombinierten CMV-enhancer / chicken- β -Actin Promotor (Niwa et al., 1991) der Firma Invivogen wurde mittels sequenziellem Restriktionsverdau die im Vektor enthaltene LacZ Sequenz entfernt. Zuerst erfolgte ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *NcoI*. Dieser ergab ein Vektorfragment mit 3162 bp Länge und ein LacZ-Fragment von 3191 bp Länge. Es folgte eine Gelaufreinigung und ein weiterer Verdau mit dem Enzym *EcoRV*, welches das LacZ-Fragment in zwei weitere Fragmente teilte (1966 bp und 1225 bp). Nun wurde das Vektorfragment (3162 bp) gelelektrophoretisch isoliert, aufgereinigt und quantifiziert. Die Erstellung einer *multiple cloning site* erfolgte durch PCR Amplifikation der multiple cloning site des Vektors pEGFP-N1 mit den Primern LP-MCS-N1_FWD und LP-MCS-N1_REV. Das 100 bp große PCR-Produkt wurde ebenfalls aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NheI* verdaut, erneut aufgereinigt und quantifiziert. Im letzten Schritt erfolgte die Ligation der *multiple cloning site* mit dem Vektorfragment (25 ng Vektor und 4,35 ng multiple cloning site). Dem fertigen Expressionsvektor wurde der Name pCAG-MCSn1 gegeben. Dieser Vektor bildete die Grundlage für alle im Folgenden beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit verwendeten Varianten von pCAG-MCSn1 (Abb. 3.1).



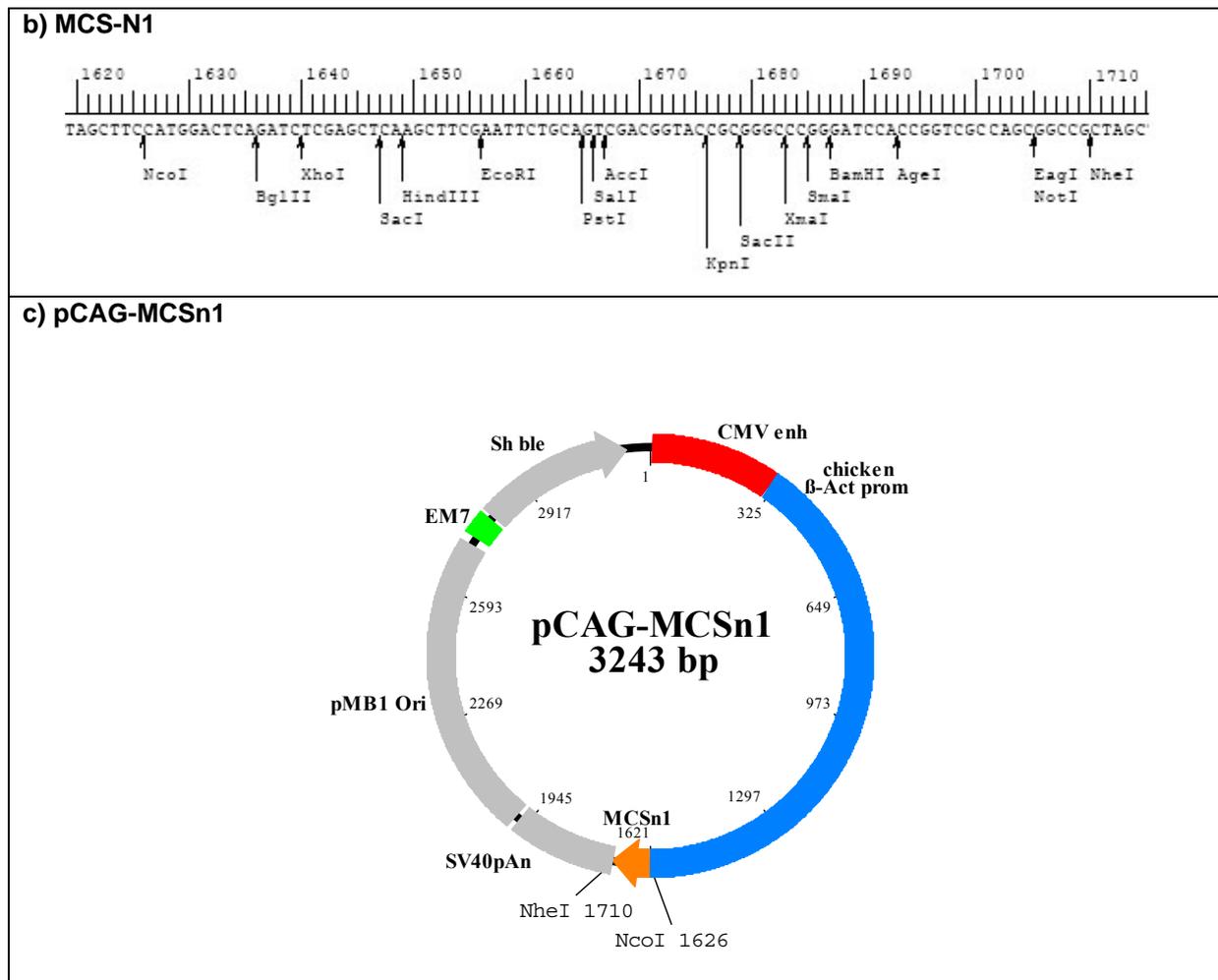


Abb. 3.1: (a) Vektorkarte des Plasmids pDrive-CAG (Invivogen) (b) Multiple Cloning Site des Vektors pEGFP-N1 (Clontech) (c) Vektorkarte des Plasmids pCAG-MCSn1

3.2.1.2. Klonierung der Expressionsvektoren

Die Referenzsequenzen stammen entweder vom Hersteller des Originalplasmids oder aus der Datenbank Nucleotide (gekennzeichnet durch die „gi“-Zugriffsnummer). Angaben zur Basenposition in einer Sequenz beziehen sich auf die genannten Sequenzen. Primer wurden in der Regel mit einer Restriktionsschnittstelle versehen; diese ist im Primernamen angegeben (Tab. 3.1).

Primernamen	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)	Referenz	Tm [°C] / Endkonzentration MgCl ₂
BclXL-FWD+XhoI	GTATCCTCGAGTGATGTCTCAGAGCAACCGGGA	243 – 262 in gi:561740	61°C / 1,5mM
BclXL-REV+SacII	GTACTGGCGCCTCACTTCCGACTGAAGAGTG	944 – 924 in gi:561740	61°C / 1,5mM
mHK2+NcoI/FWD2	ACGTCCCATGGATGATCGCCTCGCATATGATCG	475 – 494 in	66°C / 2,5 mM

		NM_013820.3	
HK2aREV	CACTGCCTTATGGAGACGCTTGG	1744 – 1767 in NM_013820.3	66°C / 2,5 mM
HK2bFWD	CTCCACCATCGGCGTGGATGG	1685 – 1706 in NM_013820.3	66°C / 2,5 mM
mHK2+Nhe/REV2	ACGTCGCTAGCCTATCTCTGCCCGGCTCCCG	3207 – 3228 in NM_013820.3	66°C / 2,5 mM
LP-MCS-N1_FWD	GTATCACCATGGACTCAGATCTCGAGCTCAAG	603 – 625 in gi:1377911	65°C / 1,5 mM
LP-MCS-N1_REV	TAGTATGCTAGCGCCGCTGGCGACCGGTGGATCCC	658 – 676 in gi:1377911	65°C / 1,5 mM
mFP_FWD+XhoI	TTAGTACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG		56°C / 1,5mM
mFP_REV+BamHI	GAGTTAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCC		56°C / 1,5mM

Tab 3.1: Übersicht der PCR-Primer zur Klonierung

3.2.1.2.1. Klonierung pCAG-eGFP

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-eGFP wurde das eGFP Insert mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NheI* aus dem Vektor pEGFP-N2 ausgeschnitten und nach Aufreinigung in die MCS des Leervektors pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.2.2. Klonierung pCAG-DsRedE

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-DsRedE wurde das DsRedExpress Insert mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* aus dem Vektor pIRES-DsRedExpress ausgeschnitten und nach Aufreinigung in die MCS des Leervektors pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.2.3. Klonierung pCAG-mOrange

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-mOrange wurde das mOrange Insert mit den Primern mFP_FWD+*XhoI* und mFP_REV+*BamHI* mittels PCR aus dem Vektor pRSET-B_mOrange (Shaner et al., 2004) amplifiziert. Das 696 bp große Amplifikat wurde nach entsprechender Aufreinigung mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* in die MCS des Leervektors pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.2.4. Klonierung pCAG-mCherry

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-mCherry wurde das mCherry Insert mit den Primern mFP_FWD+*XhoI* und mFP_REV+*BamHI* mittels PCR aus dem Vektor pRSET-B_mCherry (Shaner et al., 2004) amplifiziert. Das 696 bp große Amplifikat wurde nach entsprechender Aufreinigung mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* in die MCS des Leervektors pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.2.5. Klonierung pCAG-BclXL

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-Bcl_{XL} wurde Bcl_{XL} mit den Primern Bcl_{XL}-FWD+*XhoI* und Bcl_{XL}-REV+*SacII* mittels PCR aus einem Maus-Gehirn-cDNA Pool amplifiziert. Das 700 bp große Bcl_{XL} Amplifikat wurde nach entsprechender Aufreinigung mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *SacII* in die MCS des Vektors pEGFP-N2 eingefügt. Dieses Plasmid wurde pBcl_{XL}-N2 genannt. Zur Konstruktion des Vektors pCAG-Bcl_{XL} wurde das Bcl_{XL} Insert aus pBcl_{XL}-N2 mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *SmaI* in die MCS des Leervektors pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.2.6. Klonierung pCAG-HK2

Zur Erstellung des Plasmids pCAG-HK2 wurde Hexokinase II in zwei Fragmenten aus einem Maus-Gehirn-cDNA Pool amplifiziert. Das erste Fragment, HK2a, mit der Länge von 1292 bp (Position 475 – 1767 der Hexokinase II Sequenz NM_013820.3) wurde mit den Primern mHK2+*NcoI*/FWD2 und HK2aREV amplifiziert. Das zweite Fragment, HK2b, mit der Länge von 1533bp (Position 1685 – 3228 der Hexokinase II Sequenz NM_013820.3) wurde mit den Primern HK2bFWD und mHK2+*NheI*/REV2 amplifiziert. Beide PCR-Produkte enthalten die *AccI*-Schnittstelle *GT/MKAC*, die nur einmal innerhalb der Hexokinase II Sequenz an Position 1726/1728 vorkommt. Das HK2a Fragment wurde nun mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *AccI*, das HK2b Fragment mit *AccI* und *NheI* und der Leervektor pCAG-MCSn1 mit *NcoI* und *NheI* inkubiert. Nach Aufreinigung erfolgte die Ligation der Fragmente HK2a und HK2b und des linearisierten Vektors pCAG-MCSn1 in einem Schritt. Hiermit wurde das ligierte Hexokinase II Insert an den Schnittstellen *NcoI* und *NheI* in pCAG-MCSn1 eingefügt.

3.2.1.3. Sequenzierung der Plasmide

Die Sequenzierung aller Plasmide erfolgte durch die Firmen SMB Dr. M. Meixner, Berlin und AGOWA, Berlin. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Vorgabe der ausführenden Firma. Die jeweilige Sequenz wurde mit der Referenzsequenz mit Hilfe des Programms BLAST des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen.

3.2.2. Zellkultur

Zur Verwendung kamen in der Regel Zellkulturplatten mit 48 oder 24 Vertiefungen (wells). Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Kapitel 3.1.8 angegeben. Die Zellkulturbedingungen entsprachen 5 % CO₂, 95% Luft, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 36,5°C in den Inkubatoren.

3.2.2.1. Beschichtung der Kulturgefäße

Die Multiwellplatten für die Zellkultur wurden mit Poly-L-Lysin (MG > 300.000; 0,1 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:20 in PBS beschichtet und über Nacht bei +4°C inkubiert. Danach wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und mit kollagenhaltigem N-Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Platten zweimal mit PBS gespült und mit dem jeweiligen Kulturmedium befüllt (Tab. 3.2).

	24 wells	48 wells
Fläche	2 cm ² / well	1,1 cm ² / well
Menge Kulturmedium (DMEM, NBM-A)	650 µl / well	400 µl / well
Menge Schadensmedium (BSS ₀ , BSS ₁)	500 µl / well	225 µl / well

Tabelle 3.2: Vergleich der Parameter in 24 und 48 well Platten.

3.2.2.2. Präparation von primären Ratten-Kortexneuronen

Die Präparation der primären Neuronen der Großhirnrinde (Kortex) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Brewer (Brewer, 1995).

Alle Tiere wurden gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen behandelt. Die Anzeige zur Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken ist unter der Nummer T0322/96 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin registriert.

Zwischen dem 17. und 19. Gestationstag trächtige Wistarratten wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Desinfektion des Fells wurde der Uterus keimarm präpariert und in eine sterile Glaspetrischale überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entnommen und in PBS gelagert. Die Haut und die knöchernen Anteile des Schädels wurden unter stereomikroskopischer Kontrolle eröffnet, die Gehirne entnommen und in NBM + B27 überführt. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten in NBM + B27 und unter Mikroskopsicht. Die Gehirne wurden halbiert, die Meningen entfernt und die Kortices isoliert. Das kortikale Gewebe wurde in ein 10 ml Röhrchen überführt und nach einmaligem Spülen mit PBS und Entfernung jeglichen Überstands mit 10 ml einer gebrauchsfertigen, einfachkonzentrierten Trypsin/EDTA-Lösung für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Trypsin wurde durch einmaliges Waschen in N-Med inaktiviert und durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Folgenden wurde das Gewebe in 8 ml NBM + B27 aufgenommen und mit Pasteurpipetten mit unterschiedlichem Lumen in zwei

Schritten mechanisch dissoziiert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 100xg bei Raumtemperatur für 2 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem NBM + B27 und unter Zusatz von 25 mM Glutamat aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Das Verhältnis aus lebenden und toten Zellen, welche mit einer gebrauchsfertigen Trypanblaulösung angefärbt wurden, wurde zur Bestimmung der Qualität der Präparation herangezogen.

3.2.2.3. Herstellung von konditioniertem Medium

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurden Neuronen in einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in NBM-A +25 µM Glutamat oder DMEM ausgesät. Nach drei Tagen und darauf folgend alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und mit frischem DMEM oder NBM-A ohne Glutamat ersetzt. Das abgenommene Medium wurde gepoolt und bei 4°C gelagert. Am 10. Tag in vitro (day in vitro, DIV) wurde das gesamte Medium von den Zellkulturplatten genommen und mit dem gelagerten Pool bei 5000 RPM für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Sterilität des konditionierten Mediums wurde mittels Inkubation eines kleinen Rests Überstand und Anteilen des verbleibenden Zellpellets über mehrere Tage unter Zellkulturbedingungen überprüft. Vor Verwendung wurde das konditionierte Medium auf 37°C angewärmt.

3.2.2.4. Transfektion mittels Nucleofection™ und Kultivierung der primären Kortexneuronen

Die Transfektion erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Präparation der Neuronen. In der Etablierungsphase wurde der *Amaxa Rat Neuron Nucleofection Kit™* mit dem Programm O-03 des *Nucleofector I™* analog unter Verwendung des Protokolls des Herstellers verwendet.

Zur Etablierung des vorliegenden modifizierten Protokolls wurde das Originalprotokoll zu Grunde gelegt. Das modifizierte Protokoll ist im Folgenden beschrieben und verzichtet auf den Kit von *Amaxa™*.

In jedem Transfektionsansatz wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen bei 720 RPM zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µg Endotoxin-freier DNA wurde die gesamte Zell-DNA-Suspension in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem für primäre neuronale Zellen vorgesehenen Programm O-03 des *Amaxa Nucleofector I™*. Unmittelbar nach Ende des Elektroporationsvorgangs wurden 500 µl zimmerwarmes DMEM in die Küvette gefüllt. Das Protokoll wurde so durchgearbeitet, dass zwischen Aufnahme der Zellen in

Elektroporationspuffer und der Zugabe des Kulturmediums zu den transfizierten Zellen höchstens 15 Minuten verstrichen.

Der gesamte Kuvetteninhalt wurde mit einer sterilen Plastikpasteurpipette in ein steriles Plastikröhrchen überführt. Die transfizierten Neuronen wurden unmittelbar im Anschluss in vorgewärmtem DMEM bei einer Zelldichte von $3,1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in DMEM unter Zellkulturbedingungen. Vier bis sechs Stunden nach Transfektion wurde das gesamte Kulturmedium abgenommen und mit 2/3 konditioniertem DMEM und 1/3 frischem DMEM ersetzt. 17–19 Stunden nach Transfektion wurde das gesamte Medium erneut abgenommen und mit 2/3 konditioniertem NBM-A + B27 und 1/3 frischem NBM-A + B27 und 25 µM Glutamat ersetzt. Am 5. DIV wurden 20% des Ausgangsvolumens des Mediums abgenommen und mit 25% frischen NBM-A + B27 (ohne Glutamat) ersetzt. Die Experimente mit Schadensmodellen der neuronalen Primärkultur erfolgten am 9. oder 10. DIV (s. u.).

3.2.2.5. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Es wurde ein für GFP kodierender Expressionsvektor (pEGFP-N2 oder pCAG-eGFP) transfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde nun am Mikroskop die Anzahl der lebenden Zellen und der grün fluoreszierenden Zellen in mehreren Gesichtsfeldern bestimmt und ein Verhältnis aus der Anzahl grün fluoreszierender Zellen und der Gesamtzahl lebender Zellen gebildet. Die Zellzählung erfolgte an verschiedenen Tagen nach Transfektion. Die einzelnen Zeitpunkte sind im Text angegeben.

3.2.2.6. Schadensmodelle der Zellkultur

Die Inkubationszeiten für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Schadensmodelle der neuronalen Primärkultur wurden unter Verwendung etablierter Modelle (Bruer et al., 1997) und Erfahrungswerten (Freyer, unpublizierte Daten) bestimmt.

3.2.2.6.1. Kombinierte Sauerstoff- und Glukosedepriavation (OGD)

Das gesamte Medium wurde abgenommen und die Kultur zwei Mal mit zimmerwarmem PBS gespült. Anschließend wurden die Kulturplatten in die OGD Kammer überführt. In der Kammer wurde das auf der Kultur verbliebene PBS abgenommen und mit desoxygeniertem BSS₀ ersetzt. Die OGD-Zeiten (Zeit, die die Kulturen in der OGD Kammer verblieben) betragen 150 bis 200 Minuten. Nach Ende der OGD wurde das BSS₀ mit oxygeniertem NBM-A, bestehend aus 50 % konditioniertem (s. Kap. 3.2.2.3.) und 50 % frischem Medium, ersetzt.

Vor der weiteren Datenerhebung wurden die Kulturen für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen weiter kultiviert.

3.2.2.6.2. Sauerstoffdeprivation (OD)

Das Vorgehen entsprach dem in Abschnitt OGD beschriebenen Vorgehen. Die Versuchszeit wurde im Vergleich zur OGD Zeit verdoppelt und betrug 300 bis 400 Minuten. Statt desoxygeniertem BSS₀ wurde desoxygeniertes BSS₁ verwendet.

3.2.2.6.3. Glukosedeprievation (GD)

Das gesamte Medium wurde abgenommen und die Kultur zwei Mal mit zimmerwarmem PBS gespült. Anschließend wurde das auf der Kultur verbliebene PBS abgenommen und mit oxygeniertem BSS₀ ersetzt. Die Experimente fanden unter Zellkulturbedingungen statt. Die Versuchsdauer entsprach der Dauer der OD Experimente (s. o.). Nach Ende der GD wurde das BSS₀ mit NBM-A, bestehend aus 50 % altem und 50 % frischem Medium, ersetzt. Vor der weiteren Datenerhebung wurden die Kulturen für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen weiter kultiviert.

3.2.2.7. Evaluation des Zellschadens

3.2.2.7.1. Manuelle Zellzählung

Unmittelbar vor sowie 24 Stunden nach einem Experiment wurden die grün bzw. rot fluoreszierenden Zellen gezählt. Zur Vergleichbarkeit der Zellpopulationen zu beiden Zeitpunkte wurde das Gesichtsfeld des Fluoreszenzmikroskops exakt auf die Mittellinie eines jeden Wells ausgerichtet. Somit konnten vor und nach dem Experiment die Zellen des genau gleichen Abschnitts des Wells gezählt werden. Die Differenz der Zellzahl wurde als Maßstab des Zellschadens verwendet. Eine genauere Erklärung zur Quantifizierung des Zellschadens findet sich in Abschnitt 4.1.10.

3.2.2.7.2. Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Test

Tetrazoliumsalz (MTT) wurde in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS w/o gelöst und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die MTT- Stammlösung wurde in einer 1:10 Verdünnung zum Zellkulturmedium zugesetzt und 35 Minuten unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde eine 10%-ige SDS Lösung mit 0,01 M HCl in einer dem Volumen des Zellkulturmediums entsprechender Menge hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C. Es wurden nun 150 µl der Lösung in eine

Mikrotiterplatte gegeben, und die optische Dichte wurde in einem MRX Plattenreader bei einer Wellenlänge von 550 nm analysiert.

3.2.3. Immunzytochemie

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden im Well der 24-well Zellkulturplatten durchgeführt und mit einem Leica DM IL-Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Zu Beginn wurden die Zellkulturen ein Mal mit PBS gespült. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehydlösung (4% PFA in PBS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Darauf folgend wurde drei Mal mit PBS gespült. Nun erfolgte die Inkubation der Zellkultur mit Serum der Spezies des Sekundärantikörpers (10% Serum, 0,3% TritonX-100 in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 24 Stunden bei 4°C mit 10% Serum der Spezies des Sekundärantikörpers, 0,3% TritonX-100 und dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tab 3.3) in PBS. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Kultur drei Mal für je 15 Minuten mit PBS gespült. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in der in Tab. 3.3 angegebenen Verdünnung in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht.

Antikörper	Antigen	Firma	Verdünnung
rabbit anti-Bcl _{XL} monoclonal antibody	Bcl _{XL} in Ratte, Maus, Affe, Mensch	Cell Signaling Technology	1:25
mouse anti-rat brain microtubule-associated proteins (MAPs)	Alle bekannten Formen von Map2 in Ratte	Sigma	1:500
donkey anti-rabbit Alexa594 IgG (H+L)	lange IgG Ketten und kurze Ketten aller Immunglobuline des Kaninchen	Molecular Probes	1:300
goat anti-rabbit Texas Red IgG	lange IgG Ketten und kurze Ketten aller Immunglobuline des Kaninchen	Molecular Probes	1:200
goat anti-mouse FITC IgG	alle Maus IgG	Sigma	1:100

Tabelle 3.3: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

3.2.4. Westernblotting

Diskontinuierliche Tris Glycine SDS Polyacrylamidgele wurden nach einem Western Blot Standardprotokoll mit einem Sammelgel (Tris-Glycine Puffer pH 6.8; 5% Polyacrylamid) und einem Trenngel (Tris-Glycine Puffer pH 8.8; 7.5% - 16% Polyacrylamid) erstellt. Die Zellextrakte wurden zu gleichen Teilen mit einem zweifach konzentrierten Probenpuffer versetzt und vor Beladen des Gels für fünf Minuten gekocht. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt mit 1x Laemmli Puffer durchgeführt. Für den Proteintransfer auf

Nitrozellulosemembranen wurde ein semi-dry Blotting System verwendet. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran kurz in Transferpuffer (10% Methanol, 1x Laemmli Puffer) inkubiert und darauf folgend mit dem Gel und sechs Whatmann Papieren zu einem Sandwich zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte bei 200 mA für 45 Minuten. Die Nitrozellulosemembrane wurde daraufhin nach drei Waschschrritten (10 Minuten, RT) in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (5% Trockenmilchpulver in TBST) inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C mit 5% Trockenmilchpulver in TBST. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte nach drei Waschschrritten (10 Minuten, RT) in TBST für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 5 % Trockenmilchpulver in TBST (Tab. 3.4). Der Blot wurde nach weiteren drei Waschschrritten (10 Minuten, RT) in TBST mit Luminol Reagenz nach Angaben des Herstellers inkubiert. Dauf folgend wurde ein Röntgenfilm für 1 bis 10 Minuten belichtet, entwickelt und fixiert.

Antikörper	Antigen	Firma	Verdünnung
rabbit anti-Type II Hexokinase Polyclonal Antibody	Typ II Isoenzym der Hexokinase in Ratte und anderen Vertebraten	Chemicon	1:1000
donkey anti-rabbit HRP-linked	alle Kaninchen IgG	GE Healthcare	1:5000

Tabelle 3.4: Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot

3.2.5. Das Split-Ubiquitin Two-Hybrid System zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran

Der Split-Ubiquitin Screen mit der Maus-Hexokinase II als *bait* wurde von Dualsystems Biotech AG, Zürich, Schweiz durchgeführt. Das *bait*-Konstrukt wurde durch Subklonierung der kompletten cDNA der Maus-Hexokinase II in die Vektoren pBT3-C und pDHB1 (Dualsystems Biotech AG, Zürich, Schweiz) erstellt. Das *bait*-Konstrukt wurde mit Standardmethoden in den Hefestamm NMY32 (MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3,112 ADE2:::(lexAop)8-ADE2 LYS2:::(lexAop)4-HIS3 URA3:::(lexAop)8-lacZ GAL4) transformiert. Die korrekte Expression der *bait* wurde mittels Western Blotting von Zellextrakten mit einem monoklonalen Antikörper gegen die LexA Domäne (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) kontrolliert. Fehlende Selbstaktivierung wurde mit Kotransformationen der *bait* mit mehreren Kontroll-*preys* und Selektion in Selektivmedium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin sichergestellt. Für den Split-

Ubiquitin Screen wurde die *bait* mit einer pNubG-HA-x Maus Gehirn cDNA Bibliothek (complexity $3,2 \cdot 10^6$) in den Hefestamm NMY32 kotransformiert. Alle der 107 gescreenten Klone wuchsen auf Selektivmedium und wurden in einem Hochdurchsatzassay auf β -Galaktosidase Aktivität untersucht (Mockli und Auerbach, 2004). Alle 107 Klone zeigten β -Galaktosidase-Aktivität und wurden als positive Interaktoren angesehen. Von diesen 107 positiven Klonen wurden in der Folge 22 Klone weiter untersucht. Aufgrund von unterschiedlichen Größen im Restriktionsverdau der Klone 9 und 12 wurden insgesamt 24 cDNA-Bibliotheksplasmide aus den 22 Klonen isoliert und in den Hefestamm NMY32 retransformiert, um sicher zu stellen, dass die Interaktion reproduzierbar ist. Von den 24 analysierten Klonen waren im Konfirmationsassay 20 positiv und wurden als Klone mit reproduzierbarer Interaktion angesehen. Vier Klone wurden als unsichere Interaktoren bzw. Interaktoren mit nicht reproduzierbarer Interaktion angesehen. Die Identität aller 24 Interaktoren wurde durch Sequenzierung festgestellt.

3.2.6. Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Boxplots wurden mit der Software SPSS erstellt und zeigen Median, 25. und 75. Perzentile als untere bzw. obere Grenze der Box und 5. und 95. Perzentile durch die Whisker an. Ausreißer sind als Punkte, Extremwerte als Rauten markiert. Die statistischen Auswertung der Daten erfolgte mittels one-way ANOVA und Tukey-HSD oder Duncan post-hoc test. Die jeweiligen post-hoc-Teste, Anzahl unabhängiger Experimente (N) und p-Werte sind in den Abbildungen angegeben.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gliedern sich zum einen in die Charakterisierung und Etablierung einer Neuronen-spezifischen Transfektionsmethode mit der Elektroporation (Nucleofection™). Hierfür wurde ein Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell, das auf der Transfektion zweier unterschiedlicher Fluoreszenzproteine und der nachfolgenden Kokultivierung beruht. Durch die Transfektion des antiapoptotischen und neuroprotektiven Gens Bcl_{XL} konnte gezeigt werden, dass sich das Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell eignet, transfizierte Gene hinsichtlich ihrer protektiven Effekte in der neuronalen Primärkultur zu untersuchen. Ferner wurde sichergestellt, dass bei der Transfektion nur Neurone transfiziert werden.

Zum anderen wurden mit Hilfe des Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell die antiapoptotischen Eigenschaften des glykolytischen Enzyms Hexokinase II in verschiedenen Schadensmodellen der neuronalen Zellkultur charakterisiert. Dabei zeigte sich nach Transfektion Hexokinase II exprimierender Plasmide eine glukoseabhängige, Hexokinase II-vermittelte Protektion. Die Protektion durch Transfektion der Hexokinase II ging einher mit einer Zunahme der Proteinmenge im Westernblot.

Abschließend wurden durch einen membran-basierten Yeast Two-Hybrid Screen potentielle Interaktionspartner der Hexokinase II analysiert.

In einer Präparation primärer kortikaler Neurone liegen nicht nur Zellen neuronalen Typs, sondern auch ca. 5% astrogliale Zellen vor (Freyer, persönliche Kommunikation). Deshalb ist es von großer Bedeutung, mit einer anzuwendenden Transfektionsstrategie nur Neurone zu transfizieren, wenn die Relevanz eines transfizierten Gens für neuronale Zellen untersucht werden soll. Die Präparation primärer neuronaler Zellen erfolgt im undifferenzierten Embryonalstadium, die Untersuchungen in den verschiedenen Schadensmodellen aber mit über 10 Tage kultivierten Zellen, bei denen von einem ausdifferenzierten Phänotyp ausgegangen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb nach Kenntnis des Autors erstmalig die Entwicklung der Transfektionsrate embryonaler Rattenneurone über einen längeren Kulturzeitraum untersucht.

Die Bestimmung der Transfektionsrate sowie die Zellzählung zum Vergleich verschiedener Zustände in dem Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell erfolgte durch die manuelle Zählung grün oder rot fluoreszierender Neurone, nach Transfektion eines ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP) oder ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed) exprimierenden Plasmids.

Zwei potenzielle Schwierigkeiten in der Etablierung des Transfektionsmodells in der primären Neuronenkultur liegen einerseits in der Transfektionsrate, die nach 10 Tagen unter optimalen Bedingungen bei ca. 30% liegt, und andererseits in der Möglichkeit einer selektiven Transfizienz bestimmter Neuronensubpopulationen. Hier wurde allerdings eine Transfektionsstrategie entwickelt, die es ermöglicht, nicht auf die üblichen, auf der Untersuchung von Gesamtpopulationen basierenden Methoden zur Schadensquantifizierung wie z. B. einem MTT-Test, der die Viabilität der gesamten Kultur misst, angewiesen zu sein, sondern nur die Populationen transfizierter Neurone zu untersuchen. Der Vorteil eines solchen Systems wird in Anbetracht der auf die Gesamtzellzahl einer Neuronenkultur bezogenen relativ geringen Transfektionsrate am Tag 10 deutlich. An diesem Kultivierungstag sind noch ca. 30% transfizierte Neurone in der Gesamtpopulation erhalten. So besteht die Möglichkeit, dass Effekte eines transfizierten Gens in der Untersuchung der Gesamtpopulation nicht klar zu erkennen sind oder gar untergehen. Ferner kann im Unterschied zu Gesamtpopulationsbasierten Assays wie dem MTT-Test, die letztlich auf einer Lyse der untersuchten Zellen basieren, durch die Markierung transfizierter Neuronenpopulationen mit Fluoreszenzproteinen eine Viabilitätsquantifizierung nicht nur nach den Experimenten, sondern auch unmittelbar zuvor durchgeführt werden. Weiterhin ermöglicht das Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell durch die Kokultivierung unterschiedlich fluoreszierender Neuronenpopulationen eine Kontrolle der Effekte transfizierter Gene unter exakt gleichen Zellkulturbedingungen. Zusammengefasst kann mit diesem Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell ein genaueres Bild des Effekts eines transfizierten Gens für die damit transfizierten Neurone erstellt werden.

Die in Abschnitt 4.1.2 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass bei der Nucleofection™ nicht alle Zellen einer Kultur transfiziert werden. Die Rate der erfolgreich transfizierten Neurone ist abhängig vom Tag der Kultivierung. Aus diesem Grund ist es notwendig, eine Möglichkeit zu haben, mit der transfizierte von nicht-transfizierten Neuronen unterschieden werden können. Diese Möglichkeit bietet sich durch die Transfektion von den als Reportergenen verwandten Fluoreszenzproteinen. In den oben beschriebenen Versuchen zur Etablierung der Nucleofection™ wurde die Erfahrung gemacht, dass die zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeiten gebräuchlichsten Fluoreszenzproteine, eGFP und DsRed, von Neuronen gut toleriert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kotransfektion zweier Plasmide mit einer sehr hohen Kotransfektionsrate einhergeht.

4.1. Etablierung des Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell

4.1.1. Elektroporation als neuronal spezifische Transfektionsmethode

Um zu überprüfen, ob die Transfektion von Neurone mit der Nucleofection™ (Elektroporation) und den entsprechenden Transfektionsparametern für Neurone eine neuronal spezifische Transfektionsmethode ist und nicht die in der Neuronenkultur vorhandenen Zellen astroglialen Ursprungs transfiziert werden, wurde eine mit dem Plasmid pDsRed2-N1 (Clontech, DsRed2 = rot fluoreszierendes Protein) transfizierte Neuronenkultur am vierten Tag nach Transfektion mit einem gegen das neuronal-spezifische Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) gerichteten Primärantikörper (anti-MAP2) und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper immunzytochemisch analysiert (Abb. 4.1 a und b). Die Überlagerung des Bildes der Immunfluoreszenzfärbung mit dem der rot fluoreszierenden Neurone zeigt, dass alle DsRed2 exprimierenden Zellen auch MAP-2 exprimieren und damit einem neuronalen Zelltyp zuzuordnen sind (Abb. 4.1 c). Mit der Nucleofection™ werden also nur Neurone transfiziert.

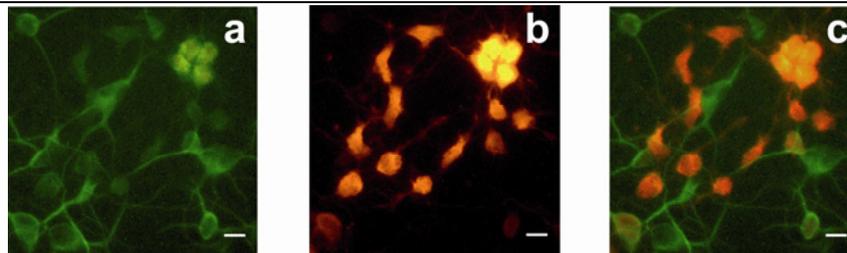


Abb. 4.1: (a) Ausschnitt einer mit DsRed2 transfizierten Neuronenkultur. DIV 4, nach Fixierung und Antikörperinkubation, Anregung der DsRed2 Fluoreszenz. (b) Gleicher Ausschnitt wie in a). Darstellung des neuronal-spezifischen Primärantikörpers anti-MAP2 mit Fluoreszenzanregung des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers. (c) Überlagerung beider Bilder. Maßstabsbalken: 10 μ M

4.1.2. Entwicklung einer Transfektionsstrategie

Es wurde zunächst untersucht, ob die Transfektion kortikaler Neurone mit einem eigens angesetzten Transfektionspuffer mit der Transfektion mit dem *Rat Neuron Nucleofection Kit*™ von Amaxa vergleichbar war. Es wurden verschiedene Puffer als Alternative zum Transfektionsreagenz des Nucleofection Kit™ verwendet. Zum einen war dies PBS, zum anderen wurden zwei Puffer, B1 und B2, mit gleichen NaCl und KCl Konzentrationen (NaCl = 192mM; KCl = 9,6 mM) und unterschiedlichen MgCl₂ Konzentrationen verwendet (B1 = 10 mM MgCl₂, B2 = 15 mM MgCl₂). Weiterhin wurden die anderen Komponenten des Transfektionskits (Elektroporationsküvetten, Pipetten) durch

Produkte anderer Hersteller ersetzt. Die Transfektionsrate wurde am ersten, siebten und dreizehnten Tag nach Transfektion eines eGFP exprimierenden Plasmids durch die Zählung eGFP exprimierender, also grün fluoreszierender Neurone bestimmt (Abb. 4.2a).

Die Analyse dreier unabhängiger Transfektionen zeigte, dass sich der *Rat Neuron Nucleofection Kit*TM, insbesondere der Elektroporationspuffer, durch andere Komponenten ersetzen ließ. Die Transfektionsrate war in allen Versuchen mit dem Puffer B2 gleich hoch oder sogar höher als mit dem Amaxa Nucleofectionsreagenz. In allen weiteren Versuchen wurde deshalb Puffer B2 zur Transfektion verwandt. Abbildung 4.2b zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus einer Serie von drei unabhängigen Versuchen.

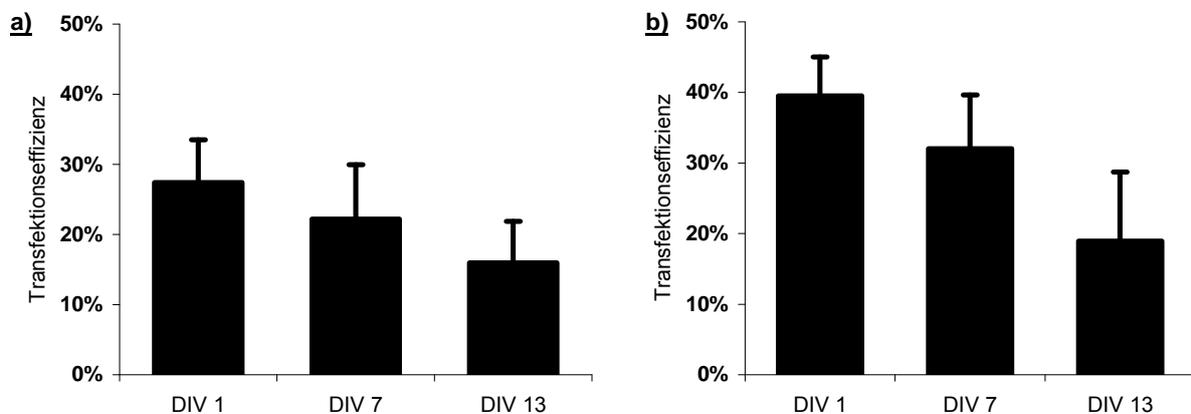


Abb. 4.2: (a) Bestimmung der Transfektionsrate bei der Nucleofection mit dem Nucleofections-Reagenz (b) Transfektionsrate bei Verwendung des Puffers B2

4.1.3. Die NucleofectionTM ermöglicht eine hohe Kotransfektionsrate

Da in der vorliegenden Arbeit die gleichzeitige Transfektion zweier Gene erfolgen sollte, wurde die Kotransfektionsrate bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pEGFP-N2 und pDsRed2-N1 gleichzeitig, in einem Transfektionsansatz, transfiziert. Die Analyse der transfizierten Kultur ergab eine Kolokalisation von 89,9% von eGFP und DsRed2 nach acht Kultivierungstagen (Abb. 4.3). Demnach beträgt die Kotransfektionsrate nahezu 90%.

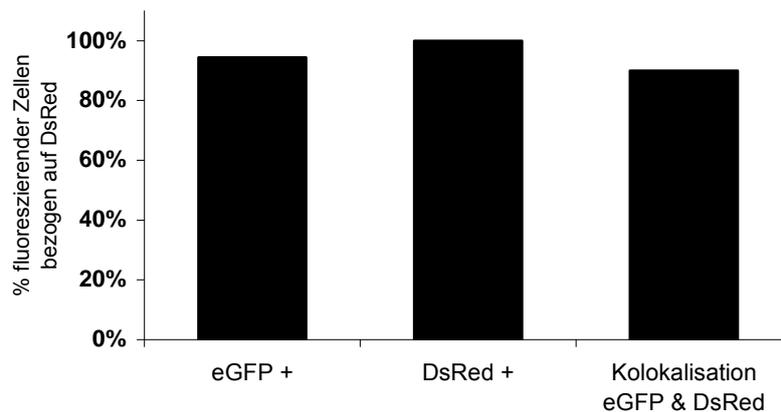


Abb. 4.3: Kotransfektionsrate von eGFP und DsRed2, dargestellt durch die Kolokalisation von GFP und DsRed in 90% der analysierten Neurone am Tag 8 nach Transfektion. Es zeigt sich also eine 90%ige Kotransfektionsrate.

4.1.4. Einflüsse des Promotors auf die Transfektionsrate im Zeitverlauf

In den Experimenten zur Überprüfung der alternativen Elektroporationspuffer fand sich über die Kultivierungszeit der transfizierten Neurone nicht nur ein deutlicher Abfall der durch die eGFP Expression charakterisierten Transfektionsrate (vgl. Abb. 4.2), sondern auch der Intensität des Fluoreszenzsignals bis an die Detektionsgrenze des verwandten Mikroskopiersystems. Überraschenderweise zeigte sich nach 150-minütiger OGD ein erneuter Anstieg der Intensität des GFP-Fluoreszenzsignals (Daten nicht gezeigt). Damit nahm die Zahl der transfizierten Zellen scheinbar zu. Bei der Transfektion eines DsRed-Plasmids (pDsRed2-N1, BD-Clontech) zeigte sich zwar auch eine während der Kultivierung abnehmende Transfektionsrate, aber es wurde keine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (Mergenthaler, nicht publizierte Daten).

Aufgrund dieses Expressionsverhaltens wurde ein neuer Expressionsvektor generiert, der nicht unter Kontrolle des CMV-Promotors, sondern unter dem CAG-Promotor (chicken- β -Actin Promotor mit CMV-enhancer Sequenz) exprimiert. Mit diesem Plasmid wurde erneut die Transfektionsrate untersucht. Im Vergleich zur Transfektionsrate der Versuche mit dem CMV-GFP-Vektor, zeigte sich schon initial eine deutlich höhere Transfektionsrate von über 50% an den ersten beiden Tagen sowie ebenfalls eine Abnahme der Transfektionsrate über den Kulturzeitraum. Die Transfektionsrate und damit die Anzahl eGFP exprimierender Neurone im Vergleich zur Gesamtzahl der Neurone ist aber an Tag 10 mit 29,97% deutlich höher als in den vorher beschriebenen Versuchen (Abb. 4.4). Ferner war die Intensität und damit die Detektierbarkeit des Fluoreszenzsignals über den gesamten Kulturzeitraum stabil.

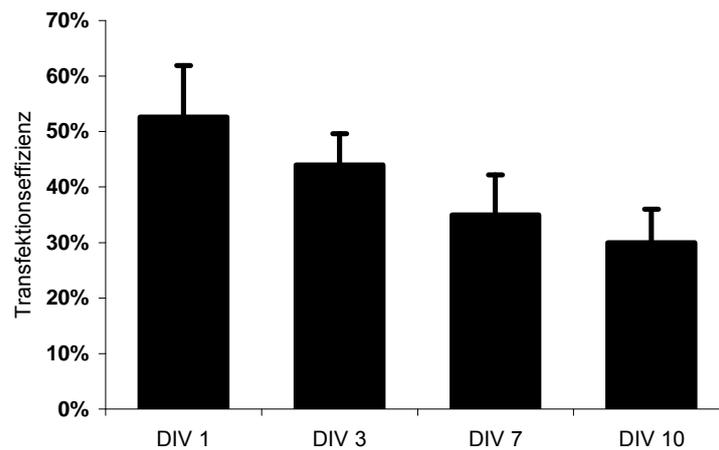


Abb. 4.4: Verlauf der Transfektionsrate bei der Transfektion des Plasmid pCAG-GFP, gemessen durch die Anzahl eGFP exprimierender Neurone über einen Kulturzeitraum von 10 Tagen.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Transgens von der Beschaffenheit des Promotors des Expressionsvektors abhängen kann. Um auszuschließen, dass eine Veränderung der Expression der transfizierten Gene durch eine veränderte Aktivität des CMV-Promotors den eigentlichen Effekt dieser Gene auf die transfizierten Neurone überlagert, wurde für alle folgenden Untersuchungen der ubiquitär exprimierende CAG-Promotor verwendet.

4.1.5. Neuroprotektion durch BclXL

Eine der Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit war es, ein System zur Untersuchung potentiell neuroprotektiver Gene zu entwickeln. Um exemplarisch zu untersuchen, ob sich die Transfektion mit Elektroporation hierzu eignet, wurde ein Expressionsvektor mit Bcl_{XL} erstellt. Die antiapoptotischen und neuroprotektiven Eigenschaften von Bcl_{XL} sind seit einiger Zeit bekannt (Boise et al., 1993; Chipuk und Green, 2008), und es wurde hier untersucht, ob die Überexpression von Bcl_{XL} einen protektiven Effekt auf die transfizierte Zellpopulation hat und ob hierdurch die transfizierte Neuronenpopulation vor hypoxischem Zelltod geschützt werden kann.

4.1.6. Expression von BclXL nach Transfektion in immunzytochemisch nachweisbarer Menge

Für den Nachweis, dass die Expression von Bcl_{XL} durch die Transfektion deutlich gesteigert wird, wurden mit Bcl_{XL} und eGFP kotransfizierte Neurone am 8. Tag nach Transfektion immunzytochemisch untersucht.

Es zeigte sich ein spezifisches Fluoreszenzsignal mit einem für Bcl_{XL} spezifischen Primärantikörper und einem TexasRed-markierten Sekundärantikörper in der Mehrzahl der eGFP exprimierenden Neurone (Abb. 4.5).

Weiterhin fanden sich einzelne Neurone ohne eGFP Signal aber mit Immunfluoreszenzsignal für Bcl_{XL} und einzelne eGFP positive Neurone ohne Bcl_{XL} Signal (Daten nicht gezeigt). Zusammen genommen spricht dies dafür, dass mit der hier angewandten immunzytochemischen Färbung nur transfiziertes, nicht aber endogenes Bcl_{XL} dargestellt wird.

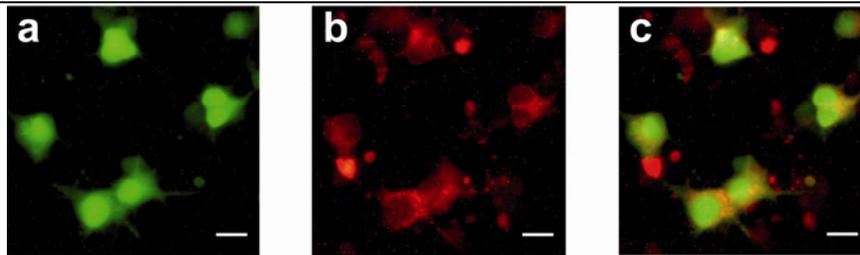


Abb. 4.5: Bcl_{XL} wird überexprimiert. Repräsentativer Ausschnitt aus einer mit eGFP und Bcl_{XL} kotransfizierten Neuronenkultur, Darstellung der eGFP Fluoreszenz (a). Die Kultur wurde mit einem primären Antikörper gegen Bcl_{XL} und einem sekundären Texas Red Antikörper inkubiert, Darstellung der Texas Red Fluoreszenz (b). Die Überlagerung (c) zeigt, dass alle kotransfizierten Neurone Bcl_{XL} in immunzytochemisch nachweisbarer Menge exprimieren. Maßstabsbalken: 10 μ M

4.1.7. Etablierung des Kokultivierungsmodells

Es wurde nun geprüft, ob sich die beiden Neuronenpopulationen im Schadensmodell der OGD gleichartig verhalten. Hierzu wurden für eGFP und DsRedExpress kodierende Plasmide transfiziert und in unterschiedlichen Wells kultiviert. Am zehnten Tag nach Transfektion wurde eine OGD durchgeführt. Die grün bzw. rot fluoreszierenden Zellen wurden unmittelbar vor und 48 Stunden nach OGD gezählt. Es zeigte sich eine nahezu gleiche Abnahme der fluoreszenten Zellen in beiden Zuständen (Abb. 4.6).

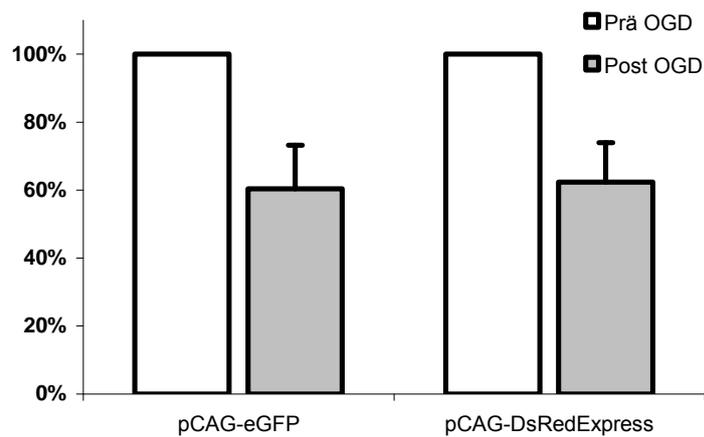


Abb. 4.6: eGFP bzw. DsRedExpress transfizierte Neurone wurden unmittelbar vor und 48 Stunden nach OGD gezählt. Die angegebenen Prozentwerte nach OGD setzen die Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach OGD ins Verhältnis zur Anzahl der fluoreszierenden Zellen vor OGD. In beiden Transfektionsansätzen mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen zeigt sich eine nahezu gleiche Abnahme fluoreszierender Zellen nach OGD.

In den folgenden Untersuchungen wurden die mit eGFP bzw. DsRedExpress transfizierten Neurone unmittelbar nach Transfektion in gleichem Verhältnis gemischt und daraufhin kultiviert (Kokultivierung). Dieser Zustand ist nachfolgend als *Negativkontrolle* bezeichnet. Weiterhin wurde in einem zweiten Versuchszustand eine Neuronenpopulation mit Bcl_{XL} und eGFP exprimierenden Plasmiden kotransfiziert und mit einer zweiten, nur mit DsRedExpress transfizierten Neuronenpopulation kokultiviert; nachfolgend als *Positivkontrolle* bezeichnet. Die Kultur wurde der OGD zugeführt, grüne und rote Zellen wurden unmittelbar vor und 48 Stunden nach OGD gezählt. Erneut zeigte sich kein relevanter Unterschied im Verhältnis grüner zu roter Zellen in der Negativkontrolle. In der Positivkontrolle zeigte sich schon vor OGD ein deutlich verbessertes Überleben der grünen, mit Bcl_{XL} transfizierten Neurone. Der hier zum Ausdruck kommende Schutz vor Apoptose stellt sich in dem Verhältnis grüner zu roter Zellen mit einem Wert >1 dar (Ratio = 1,31; Abb. 4.7). Diese Ratio bedeutet, dass deutlich mehr lebende grün als rot fluoreszierende Zellen in der Kultur vorhanden sind. Die Protektion der grünen, Bcl_{XL} kotransfizierten, Neuronenpopulation verstärkt sich nach OGD nochmals deutlich. Die Ratio grüner zu roter Zellen steigt auf einen Wert von 2,08. Dies ist ein Indikator für das deutlich bessere Überleben der Bcl_{XL}-transfizierten Neurone in der OGD. Die Kontrollpopulation hat vor OGD eine Ratio grüner zu roter Zellen von 0,95 und nach OGD von 1,16 und weist damit keine relevanten Unterschiede zu den beiden Beobachtungszeitpunkten auf (Abb. 4.7). Da es sich bei diesem Experiment um einen

Vorversuch handelte, der hier exemplarisch dargestellt ist, erfolgte keine statistische Auswertung.

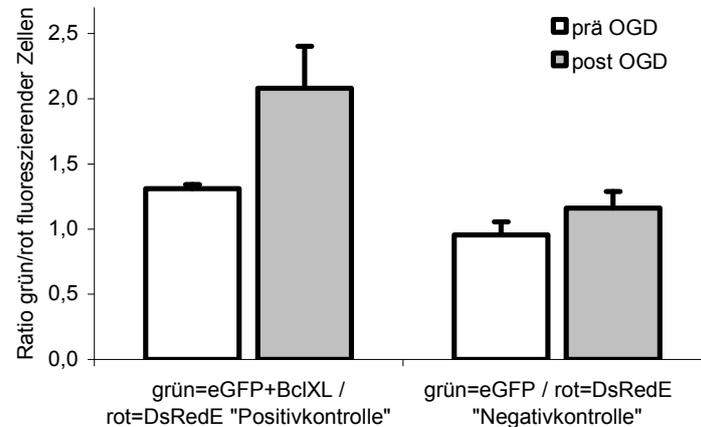


Abb. 4.7: Vergleich der Ratio grün fluoreszierender Neurone / rot fluoreszierender Neurone (grün/rot) vor und nach OGD eines einzelnen Experiments. In der Positivkontrolle zeigt sich bereits vor OGD ein Wert der Ratio >1 . Hierdurch wird ein Schutz der grün fluoreszierenden Neuronenpopulation bereits vor OGD zum Ausdruck gebracht. Nach OGD vergrößert sich dieser Wert auf 2,08. Hierdurch wird angezeigt, dass grün fluoreszierende Neurone unter OGD Bedingungen besser überleben als rot fluoreszierende Neurone. Die Ratio vor und nach OGD in der Negativkontrolle zeigt keinen relevanten Unterschied und liegt vor und nach OGD bei Werten um 1. Dieser Wert drückt aus, dass in etwa gleich viele Neurone grün bzw. rot fluoreszieren.

Da die beschriebenen Zustände in zukünftigen Versuchen als Positiv- bzw. Negativkontrolle in den nachfolgenden funktionellen Experimenten Verwendung finden sollten, wurde der in einem einzelnen Experiment gezeigte (Abb. 4.7), protektive Effekt von Bcl_{XL} in 14 unabhängigen Experimenten untersucht und ausgewertet. In der Gesamtauswertung zeigte sich eine deutliche Bcl_{XL}-vermittelte Protektion. Der Mittelwert der Ratio der Negativkontrolle betrug vor OGD $1,02 \pm 0,1$ und nach OGD $1,1 \pm 0,08$. In der Positivkontrolle betrug er vor OGD $1,43 \pm 0,16$ und nach OGD $1,89 \pm 0,35$. Die multivariate Analyse ergab sowohl für den Vergleich der Positiv- und Negativkontrolle vor OGD als auch für die Positivkontrolle (Bcl_{XL}-transfiziert) vor und nach OGD einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$, oneway ANOVA mit Duncan post-hoc Test; Abb. 4.8). In dieser Analyse zeigte sich eindeutig die Bcl_{XL}-abhängige Protektion, die nicht nur vor OGD-bedingtem Zelltod schützt, sondern auch schon vor OGD im Verlauf der Kulturzeit einen Überlebensvorteil (ausgedrückt durch den statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich der beiden Zustände vor OGD) für die mit Bcl_{XL} transfizierten Neurone im Vergleich zur Kontrolltransfektion darstellt.

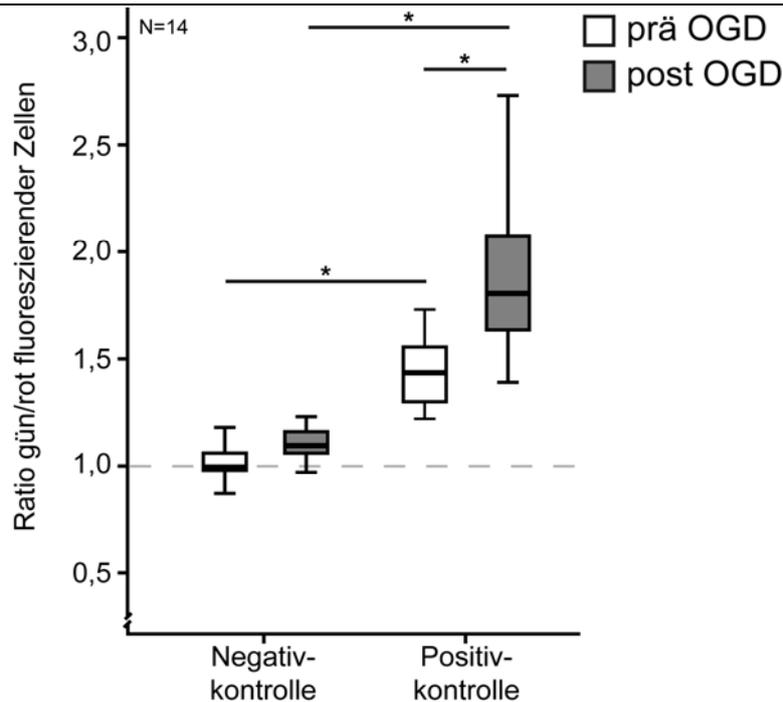


Abb. 4.8: Vergleich der Ratio grün fluoreszierender Neurone zu rot fluoreszierender Neurone (grün/rot) vor und nach OGD für die Zustände der Negativ- und der Positivkontrolle (s. Text). Der Mittelwert der Ratio der Negativkontrolle betrug vor OGD $1,02 \pm 0,1$ und nach OGD $1,1 \pm 0,08$. In der Positivkontrolle betrug er vor OGD $1,43 \pm 0,16$ und nach OGD $1,89 \pm 0,35$. * $p < 0,001$, oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der in Abb. 4.8 dargestellten Ergebnisse wurden nach Abschluss der Experimenteserie zur Hexokinase (s. u., Kap. 4.2) die Negativ- und Positivkontrollen aus der Etablierungsserie (Serie 1, vgl. Abb. 4.8) mit denen der Hexokinaseserie (Serie 2) verglichen (Abb. 4.9). Der Mittelwert der Ratio der Negativkontrolle betrug vor OGD $0,98 \pm 0,08$ und nach OGD $1,06 \pm 0,09$. In der Positivkontrolle betrug er vor OGD $1,24 \pm 0,12$ und nach OGD $1,67 \pm 0,31$. Die multivariate Analyse ergab sowohl für den Vergleich der Positiv- und Negativkontrolle vor OGD als auch für die Positivkontrolle (Bcl_{XL}-transfiziert) vor und nach OGD einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$, oneway ANOVA mit Duncan post-hoc Test; Abb. 4.9), während sich beim Vergleich zusammengehöriger Werte (beispielsweise PK prä OGD in Serie 1 und 2) zwischen den Serien kein signifikanter Unterschied feststellen ließ. Hierdurch wurde gezeigt, dass sich Experimente verschiedener Experimenteserien durch die Bestimmung der Ratio miteinander vergleichen lassen, sowie dass mit dem hier etablierten Transfektions- und Kokultivierungsschema reproduzierbare Ergebnisse erstellt werden können.

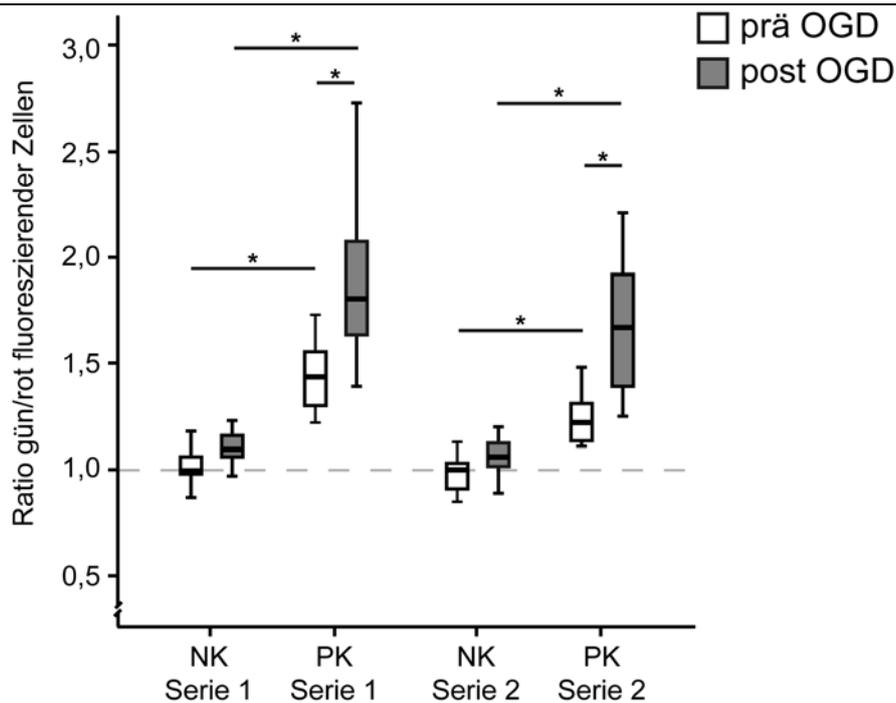


Abb. 4.9: Vergleich der Experimenteserie zur Etablierung des Kotransfektions- / Kokultivierungsmodells (Serie 1) mit den Daten der NK und PK aus der Hexokinaseserie (Serie 2). Die Mittelwerte der Serie 1 waren für die Negativkontrolle vor OGD $1,02 \pm 0,1$ und nach OGD $1,1 \pm 0,08$, für die Positivkontrolle vor OGD $1,43 \pm 0,16$ und nach OGD $1,89 \pm 0,35$. In der Serie 2 betrug der Mittelwert der Ratio der Negativkontrolle vor OGD $0,98 \pm 0,08$ und nach OGD $1,06 \pm 0,09$. In der Positivkontrolle vor OGD $1,24 \pm 0,12$ und nach OGD $1,67 \pm 0,31$. * $p < 0,001$, oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

4.1.8. Zelltodquantifizierung – Vergleich MTT-Assay und manuelle Zellzählung

Der MTT- Test ist ein Standardtest zur Bestimmung der Zytotoxizität. Er erlaubt jedoch nur eine Untersuchung des Schadens der gesamten Kultur und ermöglicht nicht die Differenzierung des Schadens auf bestimmte Subpopulationen der Neuronenkultur oder gar auf einzelne Neurone. Es wurden bei einigen Experimenten zusätzlich zur Zellzählung MTT-Teste durchgeführt, um die Ergebnisse der Schadensquantifizierung der Zellzählung zu objektivieren. In Abb. 4.10 ist ein Experiment exemplarisch dargestellt. Bei der Auswertung erfolgte erst die Zellzählung und danach der MTT-Test. Dabei war eine Protektion mit dem MTT-Test nicht nachzuweisen (beispielhaft Abb. 4.10a), bzw. waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht so deutlich nachweisbar wie bei der Zellzählung (Abb. 4.10b). Weiterhin kann aufgrund der methodenbedingten Zellyse beim MTT-Test eine Kultur nur zu einem Zeitpunkt analysiert werden und nicht wie bei der Zellzählung vor und nach OGD. Die Auswertung der manuellen Zellzählung zeigt deutlich die Stärke dieser Auswertungsmethode. So lassen sich durch die Zellzählung nicht nur zwei unterschiedliche Zustände nach OGD vergleichen, sondern es können zudem auch Beobachtungen vor dem Experiment erfolgen

und so die Zustände vor und nach OGD miteinander verglichen werden. Weiterhin lassen sich mit der Zellzählung am Fluoreszenzmikroskop lebende Zellen direkt miteinander vergleichen, während im MTT-Assay der mitochondriale Metabolismus als Marker für metabolisch aktive (und damit lebende) Zellen verwendet wird.

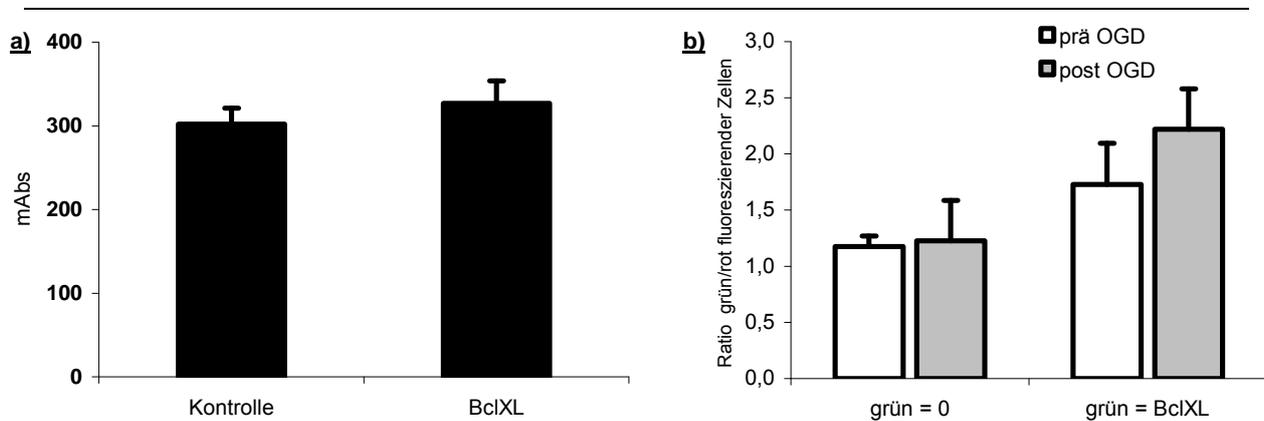


Abb. 4.10: Vergleich der beiden Auswertungsmethoden, MTT-Test und manuelles Zählen in einem Experiment. (a) Im MTT-Test zeigt sich nach OGD kein deutlicher Unterschied zwischen der mit Bcl_{XL} kotransfizierten Gruppe und der Kontrolle. (b) In der manuellen Zellzählung ergibt sich im Vergleich der beiden Zustände nach OGD ein deutlicher Schutz in der mit Bcl_{XL} kotransfizierten Neuronenpopulation (ausgedrückt durch eine Ratio von 2,22 im Vergleich zu 1,23).

4.1.9. Vergleich unterschiedlicher Transfektionszustände durch das Kotransfektions- / Kokultivierungsmodell

Da das beschriebene Modell möglichst vielfältig einsetzbar sein sollte, wurde der Versuchsaufbau umgekehrt und damit eGFP alleine und Bcl_{XL} mit DsRedExpress kotransfiziert (Abb. 4.11). Hierbei zeigte sich zwar in der Ratio rot fluoreszierender, mit Bcl_{XL} geschützten Zellen zu grün fluoreszierenden Zellen ein besseres Überleben der mit DsRedExpress und Bcl_{XL} kotransfizierten Neurone nach 9 Tagen in Kultur, ausgedrückt durch eine Ratio > 1. Dieser Schutz verstärkte sich im Rahmen der OGD jedoch nicht wie im Zustand der Positivkontrolle in diesem (Abb. 4.11) und den vorbeschriebenen Experimenten weiter (Abb. 4.10).

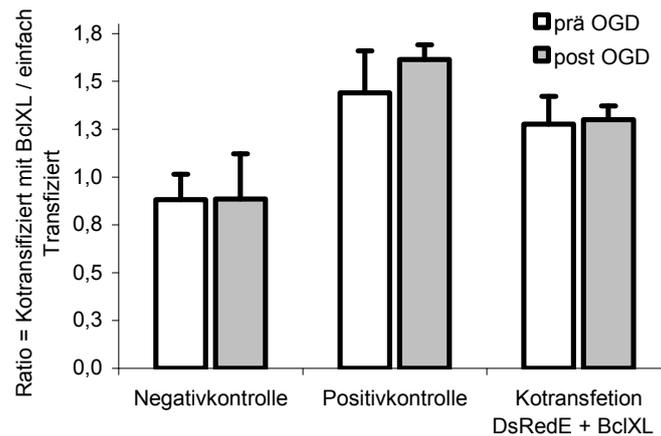


Abb. 4.11: Dargestellt ist die Ratio Bcl_{XL} kotransfizierter Neurone zu der jeweils nicht kotransfizierten Population. In der Kotransfektion von Bcl_{XL} mit DsRedExpress zeigt sich nicht wie in der Kotransfektion von Bcl_{XL} mit eGFP (Positivkontrolle) ein deutlicher Schutz, ausgedrückt durch den Anstieg der Ratio nach OGD.

Im Verlauf der Arbeiten wurden neue monomere Fluoreszenzproteine beschrieben (Shaner et al., 2004). Zwei dieser neuen Fluoreszenzproteine wurden aufgrund ihrer am ehesten mit eGFP vergleichbaren Fluoreszenzintensität und Photostabilität ausgewählt. Die beiden Proteine *mOrange* und *mCherry* sind andererseits mit den Fluoreszenzfarben orange (Emissionsmaximum 562 nm) und dunkelrot (Emissionsmaximum 610 nm) klar von eGFP (Emissionsmaximum 507 nm) differenzierbare Fluorophore.

Mit diesen beiden Fluoreszenzproteinen erfolgten nun weitere Transfektionen. Hierbei wurde Bcl_{XL} je einmal mit eGFP und mit *mOrange* bzw. *mCherry* kotransfiziert. Vor OGD zeigte sich bereits ein deutlicher Schutz aller mit Bcl_{XL} kotransfizierten Neuronenpopulationen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollpopulation. Wie bei den Etablierungsexperimenten und anders als bei der Kotransfektion von Bcl_{XL} mit DsRedExpress, zeigte sich nach OGD auch ein deutlicher Anstieg der Ratio. Dies ist Ausdruck für den starken Schutz in den Bcl_{XL}-Populationen (Abb. 4.12). Da *mOrange*, *mCherry* und eGFP anders als DsRed monomere Fluoreszenzproteine sind, legt dieses Experiment nahe, dass nur die Kombination mit einem monomeren Fluoreszenzprotein die Analyse eines kotransfizierten Gens ermöglicht.

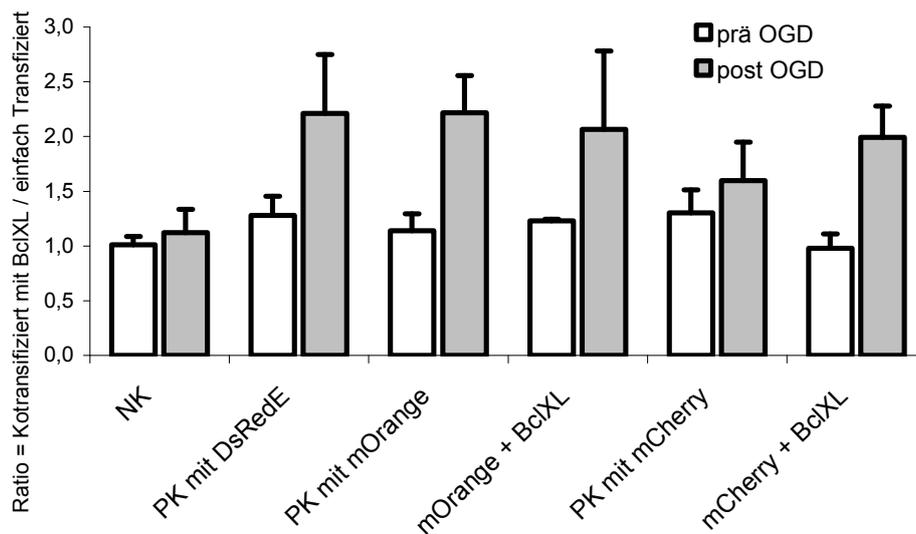


Abb. 4.12: Dargestellt ist die Ratio mit Bcl_{XL} kotransfizierter Neurone zu der jeweils nicht kotransfizierten Population. In der Negativkontrolle (NK) zeigt sich kein relevanter Unterschied vor und nach OGD, in der Positivkontrolle (PK) ein ausgeprägter Schutz, dargestellt durch die Ratio $\gg 1$. Auch in den Kotransfektionen mit verbesserten Fluoreszenzproteinen zeigt sich ein deutlicher Schutz der mit Bcl_{XL} kotransfizierten Neuronenpopulation.

4.1.10. Zusammenfassende Darstellung der Kotransfektion / Kokultivierung

Im Folgenden ist das experimentelle Vorgehen und die Modellierung bei dem hier Etablierten System der Kotransfektion und Kokultivierung dargestellt (Abb. 4.13).

Zunächst werden für grün und rot fluoreszierende Proteine kodierende Plasmide getrennt voneinander in Neurone transfiziert und anschließend kokultiviert. Dieser Zustand ist als Negativkontrolle (NK) bezeichnet. Weiterhin werden für den Zustand der Positivkontrolle (PK) für Bcl_{XL} und eGFP kodierende Plasmide kotransfiziert und anschließend mit einer mit einem für ein rot fluoreszierendes Protein kodierenden Plasmid transfizierten Neuronenpopulation kokultiviert. Zur Untersuchung der Hexokinase II als *gene of interest* (GOI) wird wie bei der Positivkontrolle vorgegangen und das Bcl_{XL} Plasmid durch ein Hexokinase II exprimierendes Plasmid ersetzt. Nach neun Tagen Kultivierungszeit werden die grün und rot fluoreszierenden Zellen wie beschrieben gezählt (prä OGD). Anschließend wird das Experiment (OGD, OD, GD) durchgeführt. 24 Stunden nach dem Experiment werden die Zellen erneut gezählt (post OGD) und aus beiden Zuständen die Ratios grün und rot fluoreszierender Zellen gebildet und verglichen.

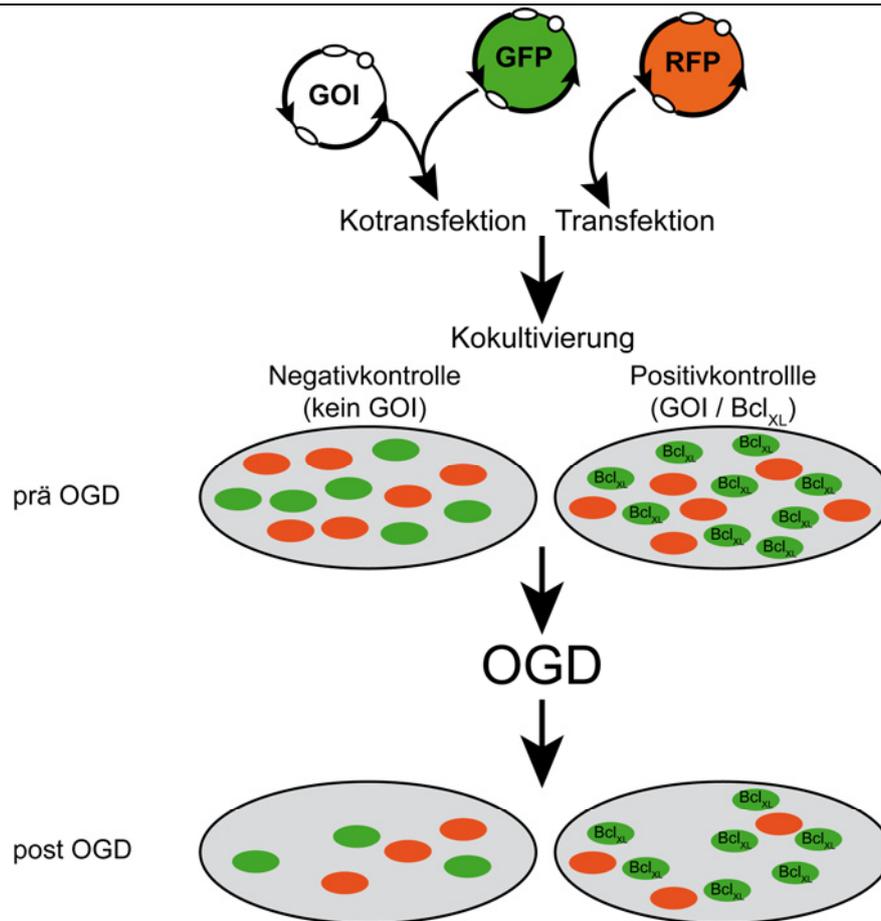


Abb. 4.13: Zusammenfassung des experimentellen Paradigmas der Kotretransfektion und Kokultivierung. GFP – grün fluoreszierendes Protein, RFP – rot fluoreszierendes Protein, GOI – gene of interest (zu untersuchendes Gen). Genaue Beschreibung des Vorgehens: siehe Text.

4.2. Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften der Hexokinase II

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden Untersuchungen über die Expressionsregulation HIF-1 abhängiger Gene bei Präkonditionierung auf transkriptioneller Ebene angestellt. Aufgrund der deutlichen Induktion der Hexokinase II mRNA bei der Präkonditionierung kultivierter kortikaler Neurone (Mergenthaler et al., 2010; Neeb, 2006), wurde die Hexokinase II als möglicher, endogene Neuroprotektion vermittelnder Kandidat ausgewählt.

Die cDNA der Hexokinase II wurde in den oben beschriebenen CAG Expressionsvektor kloniert, über den auch Bcl_{XL} und die Fluoreszenzproteine in der neuronalen Kultur exprimiert wurden.

In den anschließenden Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, inwiefern sich eine Überexpression der Hexokinase II auf die Toleranz von Neuronen gegenüber OGD auswirkt.

Hierzu wurden Kotransfektionen der Hexokinase II mit eGFP durchgeführt, welche mit DsRedExpress transfizierten Neurone kokultiviert wurden.

4.2.1. Hexokinase II-vermittelte Neuroprotektion unter OGD-Bedingungen

In 16 unabhängigen Experimenten zeigte sich ein ausgeprägter Schutz in der mit Hexokinase II transfizierten Neuronenpopulation beim Vergleich der Zustände vor OGD (Ratio $1,14 \pm 0,11$) und nach OGD (Ratio $1,31 \pm 0,12$). Weiterhin zeigte sich ein Schutz im Vergleich der Hexokinase II transfizierten Neurone mit der Kontrollpopulation (NK, nur mit GFP transfiziert). In Abb. 4.14 sind alle Experimente zusammengefasst und statistisch ausgewertet. In der multivariaten Analyse zeigte sich neben den zu erwartenden signifikanten Unterschieden der Positivkontrolle sowohl vor (Ratio $1,25 \pm 0,12$) als auch nach OGD (Ratio $1,67 \pm 0,31$) ein statistisch signifikanter Unterschied der mit Hexokinase II transfizierten Neurone im Sinne einer Protektion durch Hexokinase II. Dieser Schutz ist sowohl im Vergleich des Hexokinase II transfizierten Zustandes vor und nach OGD als auch im Vergleich der Zustände vor bzw. nach OGD der Hexokinase II Transfektion mit der Nullkontrolle statistisch signifikant.

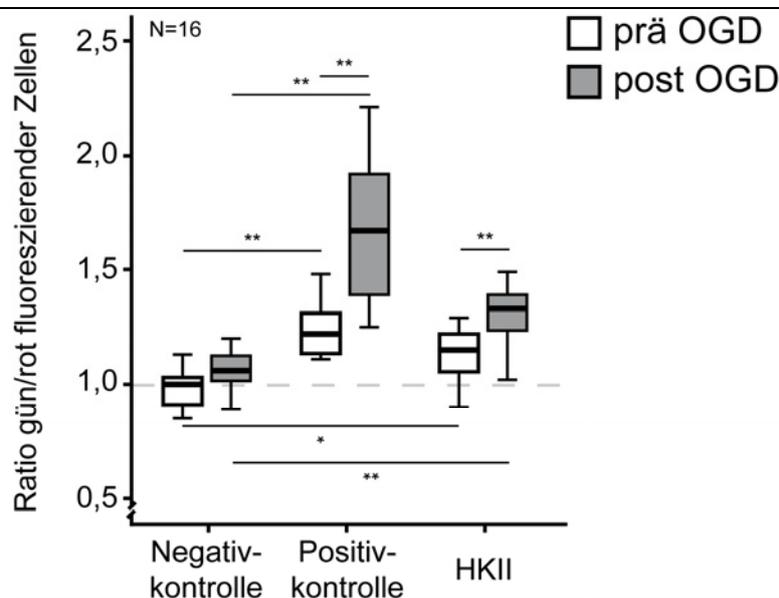


Abb. 4.14: Darstellung der Zusammenfassung der Hexokinase II OGD Experimenteserie mit 16 unabhängigen Experimenten. Die multivariate Analyse zeigte statistisch signifikante Unterschiede für den Vergleich der mit Hexokinase II transfizierten Populationen vor und nach OGD, ebenso wie für den Vergleich der PK vor und nach OGD. Des Weiteren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied für den Vergleich der Hexokinase II transfizierten Population mit den Neuronen der Kontrollpopulation (NK) vor OGD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

4.2.2. Hexokinase II-vermittelte Neuroprotektion ist glukoseabhängig

Die Isoenzyme der Hexokinase stellen Schlüsselenzyme des Glukosemetabolismus dar. Neben der Frage nach einer Hexokinase II vermittelten Protektion unter OGD Bedingungen sollte die Bedeutung des Substrates Glukose für die Funktion der Hexokinase II untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Neurone mit Hexokinase II und eGFP kotransfiziert und mit DsRedExpress kokultiviert. Diese Kulturen wurden dann in parallelen Experimenten einer reinen Sauerstoffdeprivation (OD, Abb. 4.15) oder einer reinen Glukosedepriavation (GD, Abb. 4.16) ausgesetzt.

Ebenso wie in der OGD zeigte sich bei der OD ein deutlicher Schutz der Hexokinase II transfizierten Neuronenpopulation gegenüber der internen Kontrolle (Transfektion mit DsRedE). Dies ist durch den statistisch signifikanten Anstieg in der Ratio im Vergleich vor (Ratio $1,07 \pm 0,08$) und nach OD (Ratio $1,38 \pm 0,11$) ausgedrückt. Auch im Vergleich der post-OD-Zustände der Negativkontrolle (Ratio $1,09 \pm 0,09$) und der Hexokinase II Neuronenpopulation zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der Neurone (Abb. 4.15). Interessanterweise wurde dieser Schutz unter GD-Bedingungen nicht nur aufgehoben, sondern insgesamt zeigte sich ein destruktiver Effekt in der Hexokinase II transfizierten Neuronenpopulation nach GD (Ratio vor GD: $1,11 \pm 0,11$; nach GD: $0,93 \pm 0,09$), der allerdings keine statistische Signifikanz erreichte. Dass dieser Effekt nicht grundsätzlich auf das experimentellen Paradigma der Glukosedepriavation an sich zurück zu führen ist, zeigte sich anhand des ausbleibenden Effekts der GD auf die Ratio der Negativkontrolle (Ratio vor GD: $1,00 \pm 0,03$; nach GD: $1,04 \pm 0,13$) und durch die auch in diesem Ansatz vorhandene deutliche Protektion (Ratio vor GD: $1,34 \pm 0,07$; nach GD: $1,80 \pm 0,35$) in der Positivkontrolle (Abb. 4.16).

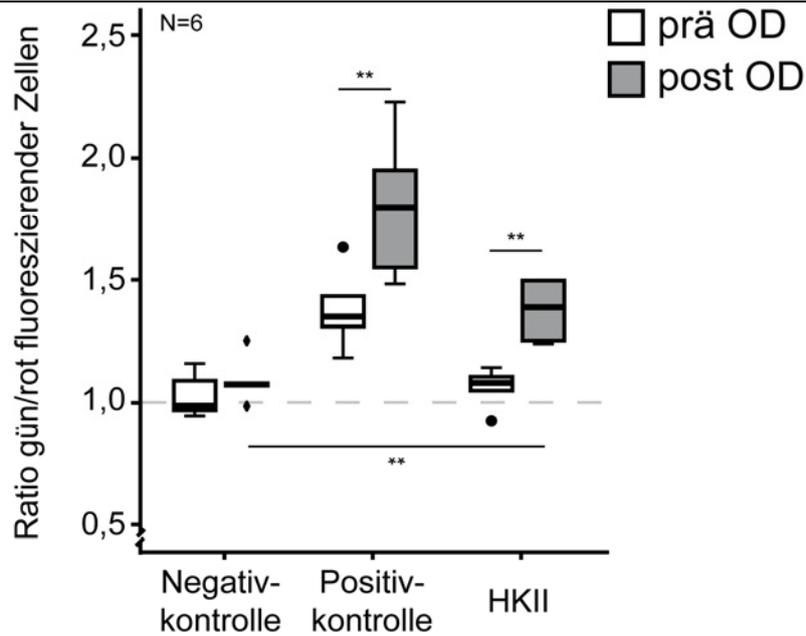


Abb. 4.15: Darstellung der Zusammenfassung der Hexokinase II-OD-Experimenteserie mit insgesamt sechs unabhängigen Experimenten. Die multivariate Analyse zeigte statistisch signifikante Unterschiede für den Vergleich der mit Hexokinase II-transfizierten Populationen vor und nach OD ebenso wie für den Vergleich der PK vor und nach OD. Des Weiteren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied für den Vergleich der Hexokinase II-transfizierten Population mit den Neuronen der Kontrollpopulation (NK) nach OD. ** $p < 0,01$ oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

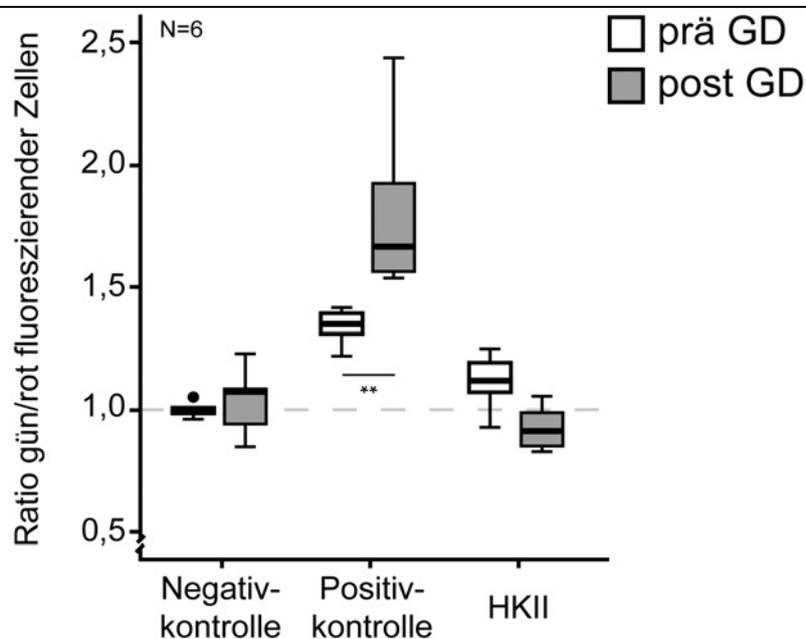


Abb. 4.16: Darstellung der Zusammenfassung der Hexokinase II-GD-Experimenteserie mit insgesamt sechs unabhängigen Experimenten. Die multivariate Analyse zeigte lediglich in der PK einen statistisch signifikanten Unterschied. ** $p < 0,01$ oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

Zusammenfassend zeigte sich also ein glukoseabhängiger antiapoptotischer Effekt der Hexokinase II in der kombinierten Sauerstoff-Glukose-Deprivation (OGD) sowie in der Sauerstoffdeprivation (OD). Die Bedeutung des Substrats Glukose für die Hexokinase II-vermittelte Protektion zeigte sich in den Experimenten der Glukosedepression (GD), in der sich ein zerstörerischer Effekt der mit Hexokinase II transfizierten Neuronenpopulation darstellte.

In der Analyse der OGD Experimente der Hexokinaseserie zeigte sich schon vor OGD ein protektiver Effekt durch Hexokinase II-Überexpression im Vergleich der Hexokinase II-Neuronenpopulation mit der Population der Negativkontrolle. Dieser protektive Effekt ließ sich in der statistischen Analyse der OD und GD Experimente allerdings nicht nachweisen. Unter der Hypothese, dass in diesen Experimenteserien eine nicht ausreichend hohe Anzahl Experimente zur Darstellung dieses im Vergleich zur Protektion durch Hexokinase II beispielsweise nach OGD oder zur Protektion durch Bcl_{XL}, relativ schwachen Effekts durchgeführt wurden (16 Experimente OGD versus jeweils sechs Experimente OD bzw. GD), wurden sämtliche Werte aus allen OGD, OD und GD Experimenten der Negativkontrolle, der Positivkontrolle und der Hexokinase II-transfizierten Zustände zusammengefasst und statistisch analysiert (Abb. 4.17). Die genannten Gruppen sind untereinander vergleichbar, da die jeweiligen Werte vor Schädigungsmechanismus (OGD, OD oder GD) jeweils den gleichen Zustand repräsentieren. Sie sind somit in diesem Fall als weitere Werte des hier zu vergleichenden Zustandes zu werten. Es zeigte sich hierbei nicht nur die zu erwartende statistisch signifikante Protektion durch Bcl_{XL} in der Positivkontrolle (Mittelwert der Ratio $1,29 \pm 0,11$) beim Vergleich mit der Negativkontrolle (Mittelwert der Ratio $1,0 \pm 0,07$), sondern auch ein statistisch signifikanter, protektiver Effekt in der Hexokinase-II Gruppe (Mittelwert der Ratio $1,12 \pm 0,11$).

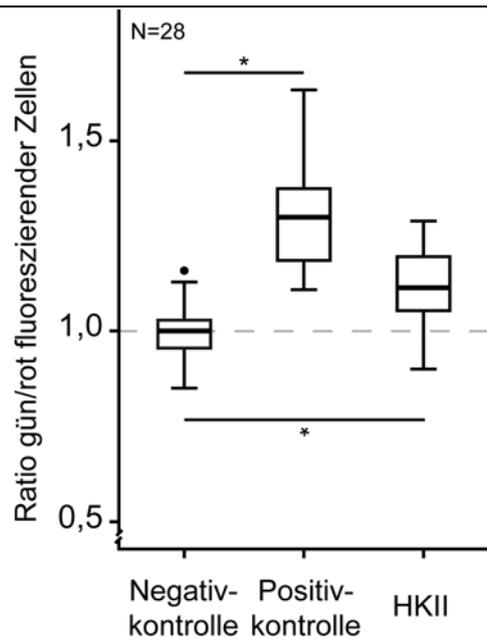


Abb. 4.17: Darstellung der Zusammenfassung der prä OGD, OD, GD Werte, die eine durch Hexokinase II vermittelte, signifikante Protektion vor Zelltod zeigt. ** $p < 0,001$ oneway ANOVA, Duncan post-hoc Test.

Zusammenfassend spricht diese Analyse für eine Protektion der transfizierten Neurone allein durch die Überexpression der Hexokinase II. Der statistisch signifikante Unterschied repräsentiert das bessere Überleben der mit Hexokinase II-transfizierten Neuronenpopulation im Verlauf der Kulturzeit über neun Tage.

4.2.3. Hexokinase II-Proteinnachweis mit Westernblot

Um nachzuweisen, dass die Transfektion des Hexokinase II Expressionsvektors zu einer Zunahme der Proteinmenge der Hexokinase II führt, wurde ein Westernblot mit einem polyklonalen Primärantikörper gegen Hexokinase II aus einer transfizierten Neuronenkultur durchgeführt.

Im Kontrollzustand (Lysat aus untransfizierten Neuronen) zeigte sich eine Hexokinase II-spezifische Bande bei 100 kDa. Im Lysat von mit GFP und Hexokinase II kotransfizierten Neuronen zeigte sich ebenfalls eine für Hexokinase II spezifische Bande bei 100 kDa. Im Vergleich mit dem Kontrollzustand, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Intensität der Hexokinase II-spezifischen Bande im transfizierten Zustand. Dies spricht für eine transfektionsbedingte Zunahme der Proteinmenge von Hexokinase II. Interessanterweise zeigte sich in der Kontrolltransfektion mit GFP ebenfalls eine Zunahme der Intensität der Hexokinase II-spezifischen Bande. Dies spricht für eine Induktion der endogenen Hexokinase II-Expression aufgrund der Elektroporation (Abb. 4.18).

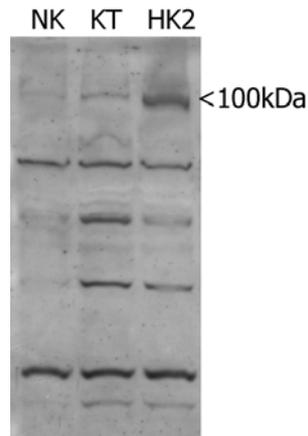


Abb. 4.18: Durch Transfektion zeigt sich im Westernblot für Hexokinase II eine deutliche Zunahme der Hexokinase II Proteinmenge, ausgedrückt durch eine Verstärkung der Hexokinase II-spezifischen Bande (100 kDa, Vergleich Bahn „NK“ und „HK2“). *NK* nicht-transfizierte Neurone, *KT* Kontrolltransfektion mit pCAG-eGFP, *HK2* Kotransfektion mit pCAG-HK2 & pCAG-eGFP.

4.3. Das Split-Ubiquitin Two-Hybrid System zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran

Um mögliche Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran zu identifizieren, wurde ein auf dem artifiziellen Transkriptionsfaktor LexA-VP16 basierender Split-Ubiquitin Two-Hybrid Screen (DUALmembrane™) mit der kompletten Maus-Hexokinase II cDNA als *bait* und einer Maus-Gehirn cDNA Bibliothek als *prey* durchgeführt. Mit dem DUALmembrane System lassen sich Interaktionen zwischen Membranproteinen und von Membranproteinen mit Membran-assoziierten oder zytosolischen Proteinen untersuchen, ohne dass *bait* und *prey* wie beim konventionellen Yeast Two-Hybrid System im Zellkern vorliegen müssen (Stagljar und Fields, 2002).

Der Screen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma DUALSystems (Zürich, Schweiz) durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.

Im ersten Ansatz, dem Screen mit dem *bait*-Plasmid pBT3-C_mHK2, zeigte sich eine Selbstaktivierung im Funktionsassay. Aus diesem Grund wurde der Funktionsassay mit dem *bait*-Plasmid pDHB1-mHK2 erneut durchgeführt. Dieses Plasmid enthält einen Membrananker (OST4), der es ermöglicht, Membran-assoziierte oder zytosolische Proteine in der Membran des endoplasmatischen Retikulums von Hefezellen zu verankern und auf der zytosolischen Seite zu präsentieren. Bei diesem Ansatz wurden 107 Klone identifiziert, die potenzielle Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran darstellen. Hiervon wurden zunächst 24 Klone weiter untersucht, von denen in den Kontrollen vier Klone keine oder nur eine schwache Interaktion zeigten. Diese 24 Klone wurden sequenziert und ihre Identität mit einer BLAST-Suche der Sequenz festgestellt.

In Tabelle 4.1 ist eine Übersicht aller potenzieller, in diesem Screen identifizierter Interaktionspartner der Maus-Hexokinase II mit dem Ergebnis der BLAST-Suche dargestellt.

Name Gen (nach BLAST Suche)	Klon Nummer	Bewertung d. Interaktion (*)
RTN1	mHK2_pre_y_02-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Cytochrom b5	mHK2_pre_y_11-1, 18-1, 19-1, 22-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Glycoprotein Gpsn2	mHK2_pre_y_01-1, 13-1, 16-1, 17-1, 21-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
BM88	mHK2_pre_y_03-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
ALS2	mHK2_pre_y_04-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
HMBG-1b	mHK2_pre_y_05-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Spcs2 (Spc25)	mHK2_pre_y_06-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Bnip3l	mHK2_pre_y_07-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Nsg-1	mHK2_pre_y_08-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Itm2b	mHK2_pre_y_09-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Fraglich (evtl. zinc finger)	mHK2_pre_y_09-2	negative oder schlecht reproduzierbare Interaktion
Fraglich (evtl. Sys1)	mHK2_pre_y_10-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Basigin	mHK2_pre_y_12-1	negative oder schlecht reproduzierbare Interaktion
PEA15	mHK2_pre_y_12-2	negative oder schlecht reproduzierbare Interaktion
TRAP1	mHK2_pre_y_14-1	negative oder schlecht reproduzierbare Interaktion
NSPL1 / RTN2	mHK2_pre_y_15-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion
Selenoprotein K	mHK2_pre_y_20-1	positive bzw. reproduzierbare Interaktion

Tab. 4.1: Ergebnis des DUALmembranes Screens zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der Maus-Hexokinase II an der Mitochondrienmembran. Darstellung des Ergebnisses der BLAST-Suche mit jeweils korrespondierendem Klon.

(*) Bewertung der Interaktion: Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Interaktion, basierend auf den Ergebnissen der Re-Testung der Interaktion und des HTX-Assays der Re-Tests (laut DUALsystems Screening Report).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur effizienten Transfektion primärer kortikaler Neuronenkulturen etabliert und daraus ein auf einer Kotransfektions-/Kokultivierungsstrategie basierendes Modell zur Untersuchung neuroprotektiver Gene in Schadensmodellen der neuronalen Zellkultur entwickelt. Es basiert auf der Kotransfektion des Kandidatengens (*gene of interest*) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) in primäre embryonale kortikale Neurone der Ratte oder Maus, der Kokultivierung dieser Kotransfektion mit einer zweiten (Einzel-)Transfektion eines rot fluoreszierenden Proteins (DsRed oder mOrange). Das System wurde mit Hilfe des bekanntermaßen neuroprotektiv wirksamen Gen Bcl_{XL} etabliert.

Anschließend wurden mit dem Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell die protektiven Eigenschaften des von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 regulierten Gens Hexokinase II in verschiedenen Schadensmodellen der neuronalen Zellkultur charakterisiert. Aufgrund der vermuteten Apoptose-modulierenden Eigenschaften der Hexokinase II wurde abschließend mit einem genetischen Interaktionsscreen, einem modifizierten Yeast Two-Hybrid Systems, nach neuen Interaktionspartnern der Hexokinase II als mögliche funktionelle Vermittler der Hexokinase II-abhängigen Neuroprotektion gesucht.

5.1. Etablierung eines Kotransfektions-/Kokultivierungsmodells

5.1.1. Neuronen-spezifische Transfektion mit Hilfe der Elektroporation

In einer Präparation kortikaler Rattenneurone sind bis zu 20% nicht-neuronale Zellen zu finden (Bruer et al., 1997). Ähnlich wie bei der viralen Transfektion kann bei der Elektroporation durch die Auswahl eines neuronal-spezifischen Promotors grundsätzlich eine Selektivität der Transfektionsmethode für Neurone gewährleistet werden. Hierbei liegt jedoch häufig eine relativ schwache Expression des Transgens vor. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem CMV- bzw. CAG-Promotor ubiquitär exprimierende Promotoren verwendet. Die exklusive Transfektion von Neuronen mit der Nucleofection™ durch die Verwendung eines spezifischen Puffers sowie Elektropulsprogramms wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals mit einer neuronal spezifischen Immunfluoreszenzfärbung transfizierter Neurone gezeigt. Nach Kenntnis des Autors wurden in der Vergangenheit nur Immunfärbungen nicht-neuronal spezifischer Antigene wie z. B. NCAM (neural cell adhesion molecule), das nicht nur von Neuronen, sondern z. B. auch von Astrozyten oder aktivierten T-Zellen exprimiert wird, durchgeführt (Dityateva et al., 2003). Im Gegensatz zur potenziell humanpathogenen viralen Transfektion kann mit der Elektroporation unter niedrigeren Sicherheitsstandards

gearbeitet werden. Weiterhin ist die Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren erheblich einfacher und nicht, wie bei der viralen Transfektion, durch eine maximal mögliche Größe eines Vektorinserts limitiert. Im Gegensatz zur chemischen Transfektion ermöglicht die Elektroporation in der neuronalen Zellkultur hohe Transfektionsraten. Ein weiterer Vorteil bei der Elektroporation ist es, dass nur bei ihr zwei (oder mehr) unterschiedlich transfizierte Neuronenpopulationen kokultiviert werden können. Dies ermöglicht die Kultivierung und Untersuchung der unterschiedlich transfizierten Zellen unter gleichartigen Bedingungen. Dieser Vorteil wurde bei der Entwicklung des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell genutzt.

5.1.2. Etablierung des Kotransfektions-/Kokultivierungsmodells

Die Nucleofection™ ist ein Elektroporationsverfahren, bei dem die Elektroporationsbedingungen für verschiedenste Zelltypen spezifisch eingestellt werden können. Wie in der Einleitung ausgeführt, sind die entscheidenden Parameter durch die Beschaffenheit des angelegten elektrischen Pulses und den Elektroporationspuffer bedingt. Der elektrische Puls ist durch die Programme des Nucleofactors™ vorgegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen ein eigener Elektroporationspuffer und nicht der des Herstellers (Gresch et al., 2004) eingesetzt, der eine mindestens genauso effiziente Transfektion erlaubt wie der Puffer des Herstellers. Die neuronale Identität der Zellen wurde, wie oben ausgeführt, mit einer Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Weiterhin konnten auch murine mesenchymale Stammzellen (Priller und Scheibe, persönliche Kommunikation) sowie mehrere murine und humane Zelllinien (HT-22, HeLa, MCF-7) mit dem Puffer B2 erfolgreich und mit hoher Effizienz transfiziert werden.

In der hier erfolgreich verwendeten Zusammensetzung enthielt der Puffer B2 192 mmol/l NaCl, 9,6 mmol/l KCl und 15 mmol/l MgCl₂, wobei die optimale Zusammensetzung des Elektroporationspuffers jedoch für verschiedene Zelltypen empirisch bestimmt werden muss. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die Zelltyp-spezifische Transfektion bei der Elektroporation hauptsächlich von den Parametern des elektrischen Pulses abhängt. Hierzu wurden zwar keine weiterführenden Untersuchungen angestellt, allerdings finden sich auch in der Literatur Hinweise auf die größere Bedeutung der angelegten Spannung und der Dauer des elektrischen Pulses im Vergleich zu den anderen Parametern (Martinez und Hollenbeck, 2003). Für die Zusammensetzung eines für Neurone optimalen Elektroporationspuffers gibt es bisher kein einheitliches Protokoll. So gibt es verschiedene Ansätze, salzhaltige Puffer wie PBS, HeBS oder HEPES als Elektroporationspuffer zu verwenden (Li et al., 1997; Potter, 1997). Die eigenen Versuche mit

PBS ergaben allerdings eine deutlich niedrigere Transfektionsrate im Vergleich zu den anderen verwandten Puffern (Mergenthaler, unpublizierte Beobachtung). Vor allem der Zusatz von Calcium (Ca^{2+}) wird kontrovers diskutiert. So scheint es möglich, dass sich die Präsenz von Ca^{2+} aufgrund eines plötzlichen Anstiegs des intrazellulär verfügbaren Ca^{2+} negativ auf das Überleben der Zellen auswirken könnte (Gehl, 2003). Andererseits soll Ca^{2+} im Elektroporationspuffer den Wiederverschluss der Zellmembran fördern und die Transfektionsrate deutlich erhöhen (Martinez und Hollenbeck, 2003). Da die Bedeutung von Ca^{2+} im Puffer für das Überleben der Zellen und die Transfektionsrate in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde, ist nicht auszuschließen, dass sich durch die Zugabe von Ca^{2+} zum Elektroporationspuffer die Transfektionsrate noch weiter steigern ließe.

5.1.3. Hohe Kotransfektionsrate durch Nucleofection™

Eine hohe Kotransfektionsrate ist die notwendige Voraussetzung des hier etablierten Kotransfektions-/Kokultivierungsmodells. Die hier beobachteten sehr hohen Kotransfektionsraten von 85%-95% decken sich mit der erzielten Kotransfektionsrate von 88% bei der Transfektion primärer Neurone von Dityateva et al. (Dityateva et al., 2003).

5.1.4. Bedeutung des Promotors für die Transfektionsrate

Über den Kultivierungszeitraum von zehn Tagen zeigte sich eine Abnahme der Transfektionsrate, die durch die Rate eGFP-exprimierender Neurone im Vergleich zur Gesamtzahl der kultivierten Neurone gemessen wurde, sowie der Fluoreszenzintensität von eGFP transfizierten Neuronen. Für diesen Effekt konnten weder die Zunahme der Gesamtzellzahl der Kultur ab DIV 7, die vor allem auf einer Proliferation von Astrozyten beruht (Freyer, persönliche Kommunikation), noch der normale Untergang von Neuronen in der neuronalen Primärkultur verantwortlich gemacht werden. Überraschenderweise nahm nach einer OGD-Behandlung am Tag 10 die Anzahl eGFP-produzierender Zellen wieder zu. Dies spricht gegen einen Untergang der transfizierten Neurone im Verlauf der Kultivierung und für eine Abnahme der Expression von eGFP im Verlauf von 10 Tagen vor OGD als zumindest teilweise relevantem Faktor für die Abnahme der Transfektionsrate und der Fluoreszenzintensität.

Für diesen Effekt ist wahrscheinlich der Aufbau, d. h. vor allem die Regulationselemente und insbesondere der Promotor des Expressionsvektors verantwortlich. Der zunächst verwandte Vektor regulierte die Expression mittels des CMV immediate early (CMVie) Promotors. Ein weiteres wichtiges regulatorisches Element in diesem als CMV-Vektor bezeichneten Plasmid

ist das für die Genexpression in eukaryoten Zellen wichtige SV40-Polyadenylierungssignal zur korrekten Prozessierung der mRNA.

Diese Elemente sind Standard im Design von Expressionsvektoren für eukaryote Zellen und bekannt für ihren förderlichen Einfluss auf die Expression eines Transgens (Xu et al., 2001). Im Hinblick auf die genannten Elemente gibt es lediglich für den CMV_{ie}-Promotor Hinweise auf mögliche Probleme bei der Expression transfizierter Gene in Neuronen.

In vielen Studien zur transgenen Expression *in vivo*, die eine Expression transfizierter Gene über kurze Zeit untersuchten, konnte mit dem CMV-Promotor eine stabile Expression in unterschiedlichen Hirnregionen beobachtet werden. Allerdings wurde in mehreren Studien zur Langzeitexpression eines Transgens eine mit der Zeit abnehmende Expression beobachtet (Fitzsimons et al., 2002). In anderen Modellen wurde eine transkriptionelle Inaktivierung des CMV-Promotors durch Methylierung der Promotorregion oder Histondeacetylierung beobachtet (Curradi et al., 2002; Prosch et al., 1996; Rietveld et al., 2002). Da diese Erkenntnisse ausschließlich auf Untersuchungen *in vivo* beruhen, ist eine Übertragung auf die Situation *in vitro* nicht in vollem Umfang möglich. Einen Hinweis für eine mögliche Lösung lieferte jedoch die Beobachtung, dass mit dem kombinierten CMV enhancer / chicken β -actin Promotor (CAG-Promotor) eine stabile Expression über längere Zeiträume möglich war (Fitzsimons et al., 2002). Der CAG-Promotor wurde von Niwa et al. aus dem β -Actin Promotor entwickelt. Die Arbeitsgruppe konnte ferner zeigen, dass der CAG Promotor eine starke Expression in verschiedenen Zelltypen ermöglicht (Niwa et al., 1991). Eine eGFP-transgene Mauslinie zeigte unter dem CAG-Promotor außer in Haaren und Erythrozyten eGFP-Expression in allen anderen Geweben (Okabe et al., 1997). In einer *in vitro*-Studie zur Expression von eGFP in kultivierten hippocampalen Neuronen wurde eine deutlich stärkere eGFP-Expression in den mit einem CAG-eGFP-Plasmid transfizierten Kulturen als in den mit einem CMV-eGFP-Plasmid transfizierten Kulturen beobachtet (Kawabata et al., 2004). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Plasmide mit CMV-Promotor ein Transgen stärker in nicht-neuronalen Zellen als in Neuronen exprimieren (Kugler et al., 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde trotz der vergleichbar hohen Transgen-Expression durch CAG- und CMV-Promotoren in unterschiedlichen Zelltypen (Xu et al., 2001) die Hypothese aufgestellt, dass der CMV-Promotor unter den in der vorliegenden Arbeit verwandten Transfektionsbedingungen nach einer initial starken Expression des transfizierten eGFPs partiell bis vollständig inaktiviert wird. Inwieweit dabei Sequenzmodifikationen wie Methylierung oder Histondeacetylierung von Bedeutung sind, wurde hier allerdings nicht untersucht. Durch die Verwendung des CAG-Promotors wurde dieses Problem umgangen und

eine starke eGFP-Expression über die vollen zehn Tage des Kulturzeitraums erreicht. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass keine vergleichenden quantitativen Studien zur Expression durch die beiden Promotoren durchgeführt wurden, da dies für das Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell nicht von Bedeutung war.

Die dargestellten Einflüsse des Promotors auf die Expression des transfizierten Gens erklären allerdings nicht die langzeitige Nachweisbarkeit von DsRed, trotz CMV-getriebener Expression, in dem hier verwandten Zellkultursystem. Allerdings ist bekannt, dass der Abbau von GFP einer Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 26 Stunden folgt (Corish und Tyler-Smith, 1999). In einem Vergleich der Expression von transient transfiziertem eGFP und DsRed wurde eine mehr als vierwöchige stabile Expression von DsRed beobachtet, während sich das Fluoreszenzsignal von eGFP bereits nach einer Woche deutlich verminderte, wobei hierbei statt der Transfektion von Plasmiden die Mikroinjektion der jeweiligen mRNA erfolgte (Matz et al., 1999). Dieses Ergebnis deckt sich mit den eigenen Beobachtungen, bei denen eine deutliche Reduktion der eGFP Fluoreszenzintensität während des sechsten bis zehnten Tags nach Transfektion beobachtet wurde. Da DsRed als Protein mit über vier Wochen eine deutlich längere Stabilität als eGFP besitzt, liefert die genannte Arbeit von Matz et al. eine Erklärung, warum sich die Intensität der DsRed-Fluoreszenz über den Kultivierungszeitraum in den eigenen Experimenten nicht veränderte.

Vor diesem Hintergrund liefert auch die über den Kultivierungszeitraum stabile eGFP-Fluoreszenzintensität des CAG-eGFP-Plasmids einen Hinweis für den hypothetisierten Unterschied in der Aktivität des CAG- bzw. CMV-Promotors bei der Transfektion von Neuronen mit Elektroporation. Im vorliegenden Fall scheint der CMV-Promotor vorwiegend unter Stressbedingungen (Elektroporation, OGD) aktiv zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten bei zukünftigen Transfektionen von Neuronen mit dem hier beschriebenen System in der Regel Plasmide mit CAG-Promotor zur Verwendung kommen, zumal eine direkte Visualisierung des Transgens und damit eine Beobachtung der Expression nur im Falle von Fluoreszenzproteinen möglich ist.

5.1.5. BclXL – ein prototypisches neuroprotektives Protein

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass das antiapoptotische Protein Bcl_{XL}, ein Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie, sowohl in embryonalen als auch in adulten Neuronen exprimiert wird (Gonzalez-Garcia et al., 1995). Die Bedeutung von Bcl_{XL} für das Überleben neuronaler Zellen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Bcl_{XL}-defiziente Neurone schon im frühen Embryonalstadium untergehen (Akhtar et al., 2004). Ferner scheint Bcl_{XL} von Bedeutung für die Physiologie und normale Funktion von Mitochondrien in Neuronen und anderen Zelltypen

zu sein (Berman et al., 2009). Neben seiner Bedeutung für die Entwicklung und das Überleben neuronaler Zellen spielt die Expression von Bcl_{XL} als antiapoptotisches Protein v. a. in der Biologie maligner Tumoren eine bedeutende Rolle (Grad et al., 2000). Bcl_{XL} verhindert die Induktion apoptotischer Signalwege durch Bindung proapoptischer Bcl-2 Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran und dadurch die Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilisation) (Billen et al., 2008; Garcia-Saez et al., 2009; Lovell et al., 2008). Bcl_{XL} findet sich auch in zytoplasmatischer Form, was aufgrund verschiedener Translokationsmechanismen der subzellulären Bcl_{XL} Fraktionen (Dietz et al., 2002) möglicherweise ein Grund für die größere Potenz von Bcl_{XL} im Vergleich zu Bcl-2 bei der Apoptoseinhibition ist (Fiebig et al., 2006; Gonzalez-Garcia et al., 1995). Die Bedeutung der Bcl-2 Proteine für die Apoptoseregulation sowie die molekularen und zellulären Regulationsmechanismen waren nicht Thema der vorliegenden Arbeit und werden daher im Folgenden nicht näher erörtert. Eine Übersicht findet hierzu findet sich in Danial und Korsmeyer 2004 (Danial und Korsmeyer, 2004).

Die wichtige Rolle, die die Bcl-2 Proteinfamilie, v. a. Bcl_{XL}, bei der Apoptoseregulation im Rahmen der experimentellen zerebralen Ischämie spielt, ist hinreichend bekannt. In einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die transgene Überexpression von Bcl_{XL} in Neuronen, im Gegensatz zur Überexpression von Bcl-2, eine signifikante Reduktion des Schlaganfallvolumens zur Folge hatte (Wiessner et al., 1999). Dies wird unterstützt durch Daten, die zeigen, dass durch die Überexpression von Bcl_{XL} eine deutliche Reduktion der Infarktgröße und des neurologischen Defizits erreicht wird (Kilic et al., 2002). In Zellkulturmodellen der neuronalen Apoptose konnte eine durch verschiedene Stimuli induzierte Apoptose sowohl durch überexprimiertes als auch exogen zugeführtes Bcl_{XL} verhindert werden (Dietz et al., 2002; Kugler et al., 2001). Neben diesen antiapoptotischen Funktionen wurde außerdem ein positiver Effekt von Bcl_{XL} auf die neuronale Regeneration in vivo und in vitro nachgewiesen. Dieser Effekt basiert jedoch möglicherweise auf anderen Mechanismen als die Apoptoseinhibition durch Bcl_{XL} (Kretz et al., 2004).

Aufgrund der beschriebenen antiapoptotischen Funktion von Bcl_{XL} in Neuronen wurde Bcl_{XL} im Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell als Positivkontrolle verwendet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich das für die vorliegende Arbeit etablierte Transfektionsmodell zur Charakterisierung protektiver, den Zelltod verhindernder Effekte eines transfizierten Gens eignet.

5.1.6. Das Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell

Für die Bestimmung des Effekts eines überexprimierten Gens wurde ein Kotransfektions-/Kokultivierungsansatz gewählt. Voraussetzung hierfür war eine Kotransfektionsrate in ausreichender Höhe. Mit einer Kotransfektionsrate von nahezu 90% ist diese in dem in dieser Arbeit beschriebenen Transfektionsverfahren gegeben (siehe Abschnitt 4.1.3). So konnte sichergestellt werden, dass die zur Untersuchung des Effekts des transfizierten Gens herangezogenen grün fluoreszierenden Neurone auch in ausreichend großer Zahl das zu untersuchende Gen überexprimieren. Die Kokultivierung zweier unterschiedlich transfizierter und markierter Neuronenpopulationen (GFP und DsRed, grün und rot) ermöglichte eine interne Kontrolle in dem hier beschriebenen Ansatz und gestattete die ausschließliche Untersuchung transfizierter Neurone in zwei unterschiedlichen Zuständen. Mit diesem Ansatz war es möglich, mit Hilfe der Positivkontrolle Bcl_{XL} nachzuweisen, dass mit dem Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell protektive Effekte transfizierter Gene untersucht werden können.

Die Identifikation transfizierter Neurone bei der Analyse des Effekts transfizierter Proteine hat mehrere wichtige Gründe. Zum Einen werden bei der Elektroporation von primären Kortexneuronen, wie in Abschnitt 4.1.2 gezeigt wurde, nicht alle Neurone, sondern nur ca. 20% - 50% der Zellen eines Transfektionsansatzes transfiziert. Dies deckt sich mit Literaturangaben, in denen die Transfektionsrate bei der Elektroporation primärer Neurone mit dem gleichen Elektroporationssystem (Nucleofector™) mit ca. 50% 24 Stunden nach Transfektion angegeben wird (Dityateva et al., 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass die Zellintegrität eines großen Teils erfolgreich transfizierter Neurone durch die Elektroporation so großen Schaden nimmt, dass diese vorgeschädigten Zellen eine längere Kultivierungszeit nicht überleben und die Transfektionsrate bei der Elektroporation deshalb nicht noch höher liegt. Ein Argument für dieses Szenario ist die Abnahme der Transfektionsrate im Laufe des Kultivierungszeitraums. Andererseits ist es auch möglich, dass diese in unterschiedlichen Experimenten immer wieder reproduzierbare Transfektionsrate ein Ausdruck einer selektiven Transfizierbarkeit bestimmter Neuronensubpopulationen ist. In einer Präparation primärer kortikaler Neurone sind unterschiedliche Neuronentypen zu finden, von denen nicht jeder Typ der Elektroporation, einer Transfektion überhaupt oder der Überexpression eines Gens zugänglich sein könnte (Dityateva et al., 2003).

Eine weitere Rolle spielt, dass der Vorgang der Transfektion die Neurone in Kultur nicht nur kurzfristig schädigen und töten, sondern auch längerfristige Auswirkungen auf das Überleben der Kultur und das Verhalten transfizierter Neurone in späteren Experimenten haben könnte.

Damit könnte die Transfektion also einen Selektionsmechanismus für besonders widerstandsfähige Neurone darstellen und so dargestellte Effekte beim Vergleich mit nicht transfizierten Neuronen verfälschen (Davidson et al., 2004). Ein Hinweis für die Selektion besonders schadensresistenter Neurone durch die Elektroporation könnte sein, dass für die Erzeugung eines messbaren Schadens bei einer transfizierten Neuronenkultur deutlich längere Zeiten in der OGD erforderlich sind als im Vergleich zu nicht transfizierten Neuronen (Mergenthaler, unpublizierte Beobachtung).

Die Markierung transfizierter Neurone mit Fluoreszenzproteinen ermöglicht es, von diesen möglicherweise verfälschenden Umständen ebenso wie von anderen externen Faktoren die die gesamte Kultur beeinflussen, bei der Analyse der Ergebnisse abzusehen. Die Stärke der OGD ist unter anderem vom Alter der in der Hypoxiekammer befindlichen Sauerstoffkatalysatoren, die für den Umsatz des Restsauerstoffs notwendig sind, abhängig und damit durch die Wahl verschiedener OGD-Zeiten nur teilweise beeinflussbar. Die Verwendung der Ratio grüner zu roter Zellen bei der Auswertung ermöglicht einen qualitativen und quantitativen Vergleich einzelner Experimente auch bei unterschiedlichen Schadensintensitäten in den einzelnen Experimenten. Dies zeigt sich beispielsweise durch die Reproduzierbarkeit der robusten Protektion durch Bcl_{XL}, ausgedrückt durch eine vergleichbare Ratio, in allen Experimenten die aufgrund der Variabilität der neuronalen Zellkultur z. T. mit unterschiedlichen OGD-Zeiten durchgeführt werden mussten, welche vor jedem Experiment nach morphologischen Kriterien festgelegt wurden.

Wenig überraschend ist das Ergebnis, dass die protektiven Eigenschaften von Bcl_{XL} mit Hilfe des MTT-Tests zwar auch einen protektiven Trend für die Bcl_{XL}-Transfektion zeigten, dieser aber keine Signifikanz aufwies. Der MTT-Test wird zwar häufig zur Zelltodquantifizierung eingesetzt, spiegelt aber eigentlich die Aktivität mitochondrialen Metabolismus wieder. Entsprechend kann die Aussagekraft durch Veränderungen des Metabolismus eingeschränkt sein (Galluzzi et al., 2009a). Ferner kann dieser Test, ähnlich wie andere populationsbasierte Schadensassays wie beispielsweise der LDH-Assay, lediglich den Zustand der gesamten Zellpopulation eines Versuchsansatzes darstellen. Wie schon diskutiert, sind aber bei weitem nicht alle Neurone eines Ansatzes der Transfektion zugänglich. Am Tag der OGD sind ca. 20% bis 30% aller Neurone einer Kultur transfiziert. Die Differenzierung unterschiedlich transfizierter Neuronenpopulationen mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen und die manuelle Zellzählung am Fluoreszenzmikroskop ermöglichen es daher, nur transfizierte Neurone in unterschiedlichen Zuständen miteinander zu vergleichen.

Es wurde weiterhin untersucht, ob das Kotransfektions-/Kokultivierungsmodell auch bei der Kotransfektion von Bcl_{XL} mit dem roten Fluoreszenzprotein durchführbar ist. Prinzipiell sind Fragestellungen vorstellbar, die es erforderlich machen, auch in beiden, grün und rot fluoreszierend markierten Neuronenpopulationen Gene überzuexprimieren. Voraussetzung hierfür ist, dass sich eGFP-transfizierte und DsRedE-transfizierte Neurone in der OGD gleichartig verhalten. Hierfür wurde Bcl_{XL} mit DsRed kotransfiziert und mit einer alleinigen GFP Transfektion kokultiviert. Dabei zeigte sich zwar eine gewisse Protektion durch Bcl_{XL}, die aber zum einen nicht mit der Protektion bei der Kotransfektion von Bcl_{XL} mit GFP (Positivkontrolle) vergleichbar war, und sich zum anderen nicht, wie in allen Experimenten der Positivkontrolle der Fall, nach OGD deutlich verstärkte. In den hier durchgeführten Experimenten war die Ratio vor und nach OGD nahezu gleich.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass DsRed ebenso wie viele verwandte Fluoreszenzproteine Tetramere bildet. Für Fusionsproteine mit DsRed ist bekannt, dass sie häufig intrazelluläre Aggregate bilden (Verkhusha und Lukyanov, 2004). Analog zu Untersuchungen mit einem Fusionsprotein eines funktionellen Proteins mit einem dimerisierenden Fluoreszenzprotein, bei dem die Funktionalität dieses Fusionskonstruktes eingeschränkt war (Voss et al., 2005), könnte es auch bei der Überexpression zweier Proteine in einer Zelle zu einer ähnlichen Funktionseinschränkung des funktionellen Proteins, z. B. durch die Integration von Bcl_{XL} in DsRed-Tetramere kommen. Hierdurch könnte beispielsweise die freie Beweglichkeit von Bcl_{XL} innerhalb von Zellkompartments eingeschränkt sein, die als ein Grund für die starke Apoptoseinhibition durch Bcl_{XL} angesehen wird (Dietz et al., 2002). Dagegen scheint die Dimerisation von eGFP in der Praxis keine große Rolle zu spielen, da in Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Fluktuations-Spektroskopie selbst bei hohen GFP-Konzentrationen keine signifikante Selbstassoziation des Fluoreszenzproteins beobachtet werden konnte (Voss et al., 2005). Auch in den eigenen Experimenten scheint eGFP trotz Überexpression nicht in relevantem Umfang zu dimerisieren und die Funktion des kotransfizierten Gens einzuschränken (Mergenthaler, nicht publizierte Daten).

5.1.7. Verbesserte Anwendbarkeit des Kotransfektions-/ Kokultivierungsmodells durch monomere Fluoreszenzproteine

Im Verlauf der Durchführung dieser Arbeit wurde über neue monomere Fluoreszenzproteine berichtet (Shaner et al., 2004). Diese Fluoreszenzproteine sind Mutanten von mRFP1, einer monomeren Variante von DsRed. Sollte, wie im vorhergehenden Absatz angenommen, die Tetramerisation von DsRed die Funktion von Bcl_{XL} beeinträchtigen, so müsste sich eine Protektion unter Verwendung monomerer Fluoreszenzproteine vergleichbar zur Koexpression

mit eGFP darstellen. Für die eigenen Versuche wurden die beiden Varianten mOrange (Anregungsmaximum 548 nm / Emissionsmaximum 562 nm) und mCherry (Anregungsmaximum 587 nm / Emissionsmaximum 610 nm) ausgewählt. Wie in den vorhergehenden Fällen erfolgte nun die Kotransfektion eines roten Fluoreszenzproteins mit Bcl_{XL} und die Kokultivierung mit eGFP-transfizierten Neuronen. Es zeigte sich in allen Zuständen schon vor OGD eine deutliche Protektion der Bcl_{XL}-Population, die sich nach OGD noch einmal verstärkte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bildung von Tetrameren überexprimierter Fluoreszenzproteine, wie bei DsRed der Fall, die Funktion kotransfizierter Gene beeinflussen und verändern kann.

Auch wenn aus den vorliegenden Daten kein generelles Prinzip abgeleitet werden kann, ist es möglich, dass das Problem der Funktionsbeeinflussung durch überexprimierte multimere Proteine generelle Relevanz hat. Dies sollte bei zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden. Vor diesem Hintergrund sollten, wann immer möglich, monomere Proteine für entsprechende Experimente verwendet werden.

Aus den beschriebenen Experimenten wird auch deutlich, dass die alleinige Verwendung des tetrameren Fluoreszenzproteins DsRed zur Markierung der Kontrollpopulation des Kotransfektions-/Kokultivierungsmodells zu keinem negativen Effekt für die Kontrollpopulation führt. Würde die alleinige Überexpression von DsRed zu problematischen Interaktionen mit endogenen Proteinen der Kontrollpopulation führen, dürften die Ergebnisse der DsRed Experimente im Hinblick auf die Protektion der Bcl_{XL} Population nicht den Ergebnissen der Experimente gleichen, in denen ausschließlich monomere Fluoreszenzproteine zum Einsatz kamen. Eine abschließende Bewertung ist jedoch nur schwer möglich, da der potenzielle Einfluss von DsRed-Tetrameren auf physiologische Prozesse der Neurone nicht systematisch untersucht wurde.

5.1.8. Bedeutung verschiedener Parameter von Fluoreszenzproteinen

Mit der Beschreibung des rot fluoreszierenden Proteins DsRed (Matz et al., 1999), dessen Anregungs- und Emissionsspektren sich deutlich von den bis dahin verfügbaren GFP-Mutanten unterschieden, wurde eine wichtige Basis zur gleichzeitigen Darstellung verschiedener Transfektionszustände mit Fluoreszenzproteinen geschaffen. Die neuen monomeren Fluoreszenzproteine (Shaner et al., 2004) bieten nun die Möglichkeit, nahezu das gesamte Farbspektrum des sichtbaren Lichts abzudecken, und erlauben, je nach experimentellem Aufbau, die gleichzeitige Differenzierung von zwei bis vier verschiedenen Farben (Shaner et al., 2005).

Zu einer Reihe wichtiger, bei der Auswahl der passenden Fluoreszenzproteine zu berücksichtigender Eigenschaften zählt die Helligkeit des Proteins. Sie wird hauptsächlich durch den Extinktionskoeffizienten und die Quanten-Ausbeute (*quantum yield*) bestimmt und von Faktoren wie der Photostabilität und der Reifungs- und Faltungsgeschwindigkeit des Proteins beeinflusst (Shaner et al., 2005). Bei den eigenen Experimenten konnte keine Einschränkung durch mangelhafte Photostabilität der Fluoreszenzproteine beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), obwohl v. a. für mOrange eine kurze Halbwertszeit in Photostabilitätsexperimenten angegeben wird (Shaner et al., 2004; Shaner et al., 2005). Bei Experimenten, die lange Beobachtungszeiten erfordern, sollte dieser Faktor jedoch ggfs. berücksichtigt werden.

Weiterhin erlauben es die monomeren Fluoreszenzproteine einfacher Fusionsproteine zu generieren. So ist in diesem Fall die Bildung von Multimeren, und damit eine Funktionseinschränkung des fusionierten Proteins, aufgrund der Aggregation des Fluoreszenzproteins ausgeschlossen (Shaner et al., 2007). Allerdings gibt ein Fluoreszenzsignal keine Auskunft über die Funktion des untersuchten Proteins, da das Fluoreszenzprotein z. B. durch Interaktionen der beiden Fusionspartner die Funktion des fusionierten Proteins behindern kann.

5.2. Veränderungen der Genexpression im Rahmen von ischämischen Ereignissen

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass sich die Expressionsmuster verschiedenster Gene im Rahmen der Präkonditionierung verändern (Bernaudin et al., 2002; Neeb, 2006; Stenzel-Poore et al., 2003).

In den Arbeiten von Bernaudin et al. und Neeb wurde die Regulation HIF-1 abhängiger Gene im Rahmen der Hypoxie bzw. verschiedenen Präkonditionierungsparadigmen charakterisiert. Stenzel-Poore et al. untersuchten dagegen generelle Veränderungen der Genexpression im Kontext des Schlaganfalls und der Präkonditionierung. Allen drei Studien ist gemeinsam, dass sie ihre Untersuchungen nur auf transkriptioneller Ebene durchführten. Die mRNA der regulierten Gene wurde entweder mit quantitativer real-time-PCR (q-rt-PCR) oder Microarrays nachgewiesen. Die Bedeutung der Veränderungen in der Genexpression für die Proteinsynthese wurde allerdings in keinem der Ansätze untersucht. Auch auf die funktionelle Relevanz der beobachteten Expressionsmuster wurde nicht eingegangen. Die Autoren fanden z. B. eine Regulation bekannter neuroprotektiver Gene wie Erythropoietin (EPO) oder vascular endothelial growth factor (VEGF). In früheren Arbeiten aus unserer Gruppe konnten bereits die protektiven Eigenschaften von EPO im Rahmen der Präkonditionierung

charakterisiert werden (Prass et al., 2003; Ruscher et al., 2002). Aufgrund der deutlichen HIF-1-abhängigen Regulation der Hexokinase II bei der Präkonditionierung primärer kortikaler Rattenneurone (Mergenthaler et al., 2010) sollten die neuroprotektiven Eigenschaften der Hexokinase II näher charakterisiert werden.

5.3. Schutz vor Hypoxie-induziertem neuronalen Zelltod durch Hexokinase II

Der zentrale erste Schritt des Glukosemetabolismus aller Organismen ist die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch die Hexokinase Isoenzyme. Des Weiteren gibt es deutliche Hinweise für eine Beteiligung der Hexokinase I und II an der Regulation der Apoptose (siehe Kapitel 1.4).

Die ersten Experimente dieser Arbeit zur Untersuchung der Hexokinase wurden mit der kombinierten Sauerstoff und Glukose Deprivation (*oxygen and glucose deprivation*, OGD) als schädigendem Stimulus durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein deutlich protektiver Effekt der Hexokinase II für das Überleben der neuronalen Kultur in der OGD. Durch die mitochondriale Lokalisation der Hexokinase II könnte dem Enzym eine zentrale Rolle in der Regulation der Verhinderung der Freisetzung proapoptotischer Faktoren, die sich im mitochondrialen Zwischenmembranraum befinden (Pastorino und Hoek, 2003) zukommen. Die Bedeutung der mitochondrialen Lokalisation des Enzyms für seine antiapoptotische Potenz (Pastorino et al., 2002) und für die Protektion vor hypoxischem Zellschaden zeigt sich beispielsweise in der Aufhebung dieser Effekte durch die Dissoziation der Hexokinase II von Mitochondrien (Kahl und Mergenthaler, nicht publizierte Daten).

Die weiteren Experimente, die Sauerstoffdeprivation (*oxygen deprivation*, OD) und Glukosedepriuation (*glucose deprivation*, GD) als schädigende Stimuli verwandten, zeigten ferner, dass die Hexokinase II nur in Gegenwart des Substrats Glukose schützend wirkt. Bei der Glukosedepriuation zeigte sich dagegen ein schädigender Effekt der Hexokinase.

In der Zusammenschau der Ergebnisse stellt sich ein deutlicher Hexokinase II-vermittelter Schutz vor Hypoxie-induziertem Zelltod dar (Schutz vor OGD- oder OD-induziertem Zelltod), der offenbar unter bestimmten Bedingungen von der Verfügbarkeit von Glukose abhängig ist, da keine Protektion vor GD-induziertem Zelltod besteht. Die Aufnahme von Glukose und ihr Metabolismus werden grundsätzlich als wichtige Determinanten des Überlebens von Zellen und als Modifikatoren des programmierten Zelltods in verschiedenen Zelltypen und Systemen angesehen (Robey und Hay, 2006). Die antiapoptotischen Eigenschaften der mitochondrialen Hexokinasen (siehe auch Kapitel 1.4) werden ebenfalls als glukoseabhängig beschrieben (Robey und Hay, 2006). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Glukosedepriuation zu einer Verminderung der mitochondrialen Hexokinaseaktivität führt

(Majewski et al., 2004b). Der Hexokinase II könnte also eine Art Wächterfunktion über die Glukoseverfügbarkeit der Zelle zukommen, welche im Falle von Hypoxie einen glykolytischen Zellstoffwechsel einleitet und unter Aglykämie durch die verhinderte Glykolyse zur Apoptoseinduktion führt. Allerdings stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, warum die Hexokinase II eine deutliche Protektion in der OGD hervorruft. Da Neurone in der Regel auf exogen zugeführte Glukose als Substrat angewiesen sind und in der Vorbereitung der OGD das glukosehaltige Kulturmedium sorgfältig ausgewaschen wird, erscheint unwahrscheinlich, dass residuelle intrazelluläre Glukosespeicher mobilisiert werden. Möglicherweise liegen der Protektion unter OGD-Bedingungen – also der kombinierten Sauerstoff- und Glukosedepriavation – aber auch andere Mechanismen zu Grunde als unter isoliertem Sauerstoff- oder isoliertem Glukoseentzug. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen ausschließlich in der neuronalen Primärkultur mit Schadensmodellen der zerebralen Ischämie durchgeführt. Die Hexokinase II bzw. die Hexokinasen im Allgemeinen haben indes für den Glukosemetabolismus der Zellen von Säugetieren große Relevanz. Die Expression der Hexokinase II wird in einer Vielzahl von Zellen reguliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der antiapoptotischen Funktion der Hexokinase II werden durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in anderen Zellsystemen wie Kardiomyozyten (Miyamoto et al., 2008) und Rat1a-Fibroblasten (Majewski et al., 2004a; Majewski et al., 2004b) unterstützt. So kann möglicherweise davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene protektive Funktion der Hexokinase II als genereller biologischer Mechanismus auch über neuronale Zellen hinaus von Relevanz ist.

5.3.1. Antiapoptotische Effekte und Apoptoseregulation mitochondrialer Hexokinasen

Seit rund 30 Jahren ist bekannt, dass kurze Ischämien zur intrazellulären Distributionsänderung von Hexokinase führen können. So zeigte sich, dass Hexokinase im Gehirn von Küken durch einen kurzen ischämischen Stimulus an Mitochondrien angereichert wurde (Knull et al., 1973). Im Gehirn von neugeborenen Ferkeln zeigte sich während zerebraler Ischämie ebenfalls eine Verlagerung der Hexokinaseaktivität an Mitochondrien, die nach Reperfusion wieder aufgehoben wurde (Gray et al., 1994). In diesem Fall ähnelte der Ablauf der mitochondrialen Bindung und nachfolgenden Freisetzung der Hexokinase dem zeitlichen Ablauf der Protektion im Rahmen der klassischen ischämischen Präkonditionierung (Zuurbier et al., 2005). Ischämische Präkonditionierung führt auch im Herz zu einer Redistribution der Hexokinase vom Zytosol an Mitochondrien. Nach ischämischer

Präkonditionierung zeigte sich eine deutlich höhere Hexokinaseaktivität an Mitochondrien als im Zytosol (Zuurbier et al., 2005). Allerdings wurde bei keiner dieser Untersuchungen eine Unterscheidung der einzelnen Isoenzyme durchgeführt, so dass unklar bleibt, ob sich die in diesen Arbeiten beschriebenen Effekte der Hexokinasen auf ein bestimmtes Isoenzym zurückführen lassen. Grundlegende Untersuchungen zu Funktion und Lokalisation der Hexokinasen legen allerdings nahe, dass es sich bei den mitochondrial lokalisierten Hexokinasen um die Isoenzyme Hexokinase I und II handelt (Wilson, 2003).

Für die Hexokinase I ist nachgewiesen worden, dass eine erhöhte Enzymaktivität ebenso wie die Überexpression zu einem Schutz renaler Epithelzellen vor Apoptose führte. Diese schützenden Effekte waren glukoseabhängig. Die Glukosedeprivation der Zellen führte zur Aufhebung dieser protektiven Effekte (Bryson et al., 2002). Ebenso wurde gezeigt, dass die antiapoptotische Funktion der Hexokinase II glukoseabhängig ist (Majewski et al., 2004a; Majewski et al., 2004b) und dass die Induktion der Hexokinase II mRNA unter präkonditionierenden Bedingungen mit einer erhöhten Enzymaktivität der Hexokinase II sowie einem Schutz vor hypoxischem Zelltod einhergeht (Mergenthaler et al., 2010).

Transgene Kardiomyozyten, die die Hexokinase B von *Saccharomyces cerevisiae* überexprimierten, wurden durch Hypoxie ebenfalls erheblich weniger geschädigt als unmanipulierte Kardiomyozyten (Ye et al., 2005). Da die Hexokinase B von *S. cerevisiae* einige bedeutende Unterschiede zu den Hexokinasen I und II der Vertebraten aufweist, erscheint es möglich, dass die beobachtete Protektion in der genannten Arbeit auf anderen Mechanismen als bei der Hexokinase I/II beruht. So sind die Hexokinasen der Hefe unspezifische Enzyme, die nicht nur Glukose, sondern alle Keto- und Aldoheptosen phosphorylieren. Ein weiterer funktioneller Unterschied von Bedeutung ist, dass die Hexokinasen der Hefe nicht durch Glukose-6-phosphat inhibiert werden (Cardenas et al., 1998; Wilson, 2003). Die Hexokinasen von *S. cerevisiae* weisen ein Molekulargewicht von 50 kDa auf und besitzen vor allem nicht die Fähigkeit, an Mitochondrien zu binden. Weiterhin unterscheiden sie sich in ihren enzymkinetischen Parametern deutlich von der Hexokinase I und II der Säugetiere. Möglicherweise könnte die von Ye et al. beobachtete Protektion (Ye et al., 2005) aber durch einen ähnlichen Proteinkomplex-vermittelten Mechanismus zustande kommen wie er durch Hexokinase IV vermittelt wird (Danial et al., 2003).

Hexokinase I und II sind an zentraler Stelle in der Regulation der Apoptose in den Zellen von Säugetieren beteiligt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mittlerweile die antiapoptotische Potenz der mitochondrial gebundenen Hexokinase beschrieben (Danial et al., 2003; Pastorino et al., 2002; Robey und Hay, 2005, 2006). Die Überexpression von Hexokinase verhindert beispielsweise die Cytochrom C-vermittelte Apoptose (Gottlob et al., 2001). Hierbei stellt sich die mitochondriale Assoziation der beiden Hexokinaseisoenzyme als grundlegende Voraussetzung für die Apoptoseregulation dar (Kim und Dang, 2005). Allerdings ist der molekulare Mechanismus dieser Apoptoseinhibition nicht klar charakterisiert. So soll einerseits die mitochondriale Bindung von Hexokinase mit der Bindung und Oligomerisation der proapoptotischen Proteine Bax und Bak an mitochondrialen Kontaktstellen, an denen sich äußere und innere Mitochondrienmembran aneinander anlagern, interferieren (Majewski et al., 2004b; Pastorino et al., 2002). Durch die mitochondriale Hexokinasebindung wird hier die Bindung von Bax und damit die Freisetzung von Cytochrom C verhindert (Pastorino et al., 2002; Robey und Hay, 2005, 2006). Weiterhin wird die Apoptoseinduktion durch tBid (Majewski et al., 2004b) und Bax (Pastorino et al., 2002) durch ektope Expression und mitochondriale Bindung der Hexokinase beeinträchtigt (Robey und Hay, 2006). Diese Ergebnisse legen nahe, dass für Bax- oder Bak-Oligomere und Hexokinase eine gemeinsame Bindungsstelle an der äußeren Mitochondrienmembran bestehen könnte. Auf diese Weise könnte die mitochondriale Bindung von Hexokinase die Akkumulation von Bax und Bak an der Mitochondrienmembran behindern (Robey und Hay, 2006).

Andererseits ist auch ein Bax-/Bak-unabhängiger Mechanismus der Apoptoseregulation durch mitochondrial gebundene Hexokinase beschrieben (Majewski et al., 2004a). Normalerweise unterliegt die Cytochrom C Freisetzung und die darauf folgende Apoptose Ca^{2+} -abhängigen Stimuli (Robey und Hay, 2005). In der Arbeit von Majewski et al. wurde Apoptose allerdings durch die Dissoziation von Hexokinase II und Mitochondrien über einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus herbeigeführt (Majewski et al., 2004a). Interessanterweise wurde Apoptose auch in der Abwesenheit von Bax/Bak ausgelöst, was einen weiteren Bax-/Bak-unabhängigen Mechanismus der Regulation nahe legt. Dieser Mechanismus basiert möglicherweise auf einer dynamischen Interaktion von mitochondrialer Hexokinase und VDAC (Pastorino und Hoek, 2008). In diesem Modell ist ein geschlossener Zustand von VDAC aufgrund anhaltender Dissoziation der Hexokinase von der Mitochondrienmembran Auslöser einer Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran. Dies kann zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix und zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran

mit darauf folgender Freisetzung proapoptotischer Proteine wie z. B. Cytochrom C führen (Robey und Hay, 2006).

Eine weitere Möglichkeit, wie die Hexokinase II Apoptose reguliert, besteht darin, dass Hexokinase II direkt mit proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie interagiert. Hexokinase II besitzt in ihrer C-terminalen Hälfte eine Domäne, die einer BH4-Domäne stark ähnelt (Pastorino und Hoek, 2003). Eine solche BH4-Domäne ist ein wichtiges Charakteristikum von antiapoptotischen Proteinen wie z. B. Bcl_{XL}. Diese Domäne stabilisiert eine hydrophobe Struktur der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine, die für die Interaktion mit der BH3-Domäne eines proapoptotischen Bindungspartners verantwortlich ist (Danial, 2007).

Möglicherweise regulieren mitochondrial gebundene Hexokinasen aber auch nicht nur durch ihre direkte Interaktion mit dem Mitochondrium Apoptose, sondern verfügen z. B. durch die indirekte Hemmung von Caspase-2 über weitere Möglichkeiten zur Apoptoseinhibition (Robey und Hay, 2006).

Seit über 50 Jahren ist bekannt, dass sich die subzelluläre Hexokinaseaktivität in Gewebeextrakten in einen löslichen und einen korpuskularen Anteil unterteilen lässt. Für den korpuskularen Anteil der Hexokinaseaktivität ist eine dynamisch regulierte Bindung der Hexokinasen I und II an die äußere Mitochondrienmembran verantwortlich (Robey und Hay, 2006; Wilson, 2003). Die Hexokinase II kann neben ihrer mitochondrialen Bindung auch in zytosolischer Form vorliegen. Gerade in bestimmten Zellen des Hirngewebes soll diese zytosolische Hexokinase II vorkommen (Wilson, 2003), wobei sich andererseits auch ein besonders hoher Anteil mitochondrialer Hexokinase im Gehirn findet (Robey und Hay, 2005). Die Translokation an Mitochondrien basiert möglicherweise auf einem besonderen, phosphorylierungsabhängigen Regulationsmechanismus, der die Hexokinase II, die nicht das primäre Isoenzym im Gehirn darstellt, z. B. in Neuronen mit Mitochondrien interagieren lässt. Das Vorkommen unterschiedlicher Hexokinasefraktionen könnte dafür sprechen, dass die eigentliche Protektion, ähnlich wie bei Bcl_{XL} der Fall (s.o.), durch die Translokation der zytosolischen Hexokinase-Fraktion an das Mitochondrium vermittelt wird.

Ob solch ein Regulationsmechanismus zu dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten Schutz neuronaler Zellen vor Hypoxie beiträgt, lässt sich unter Verwendung der vorliegenden Daten nur spekulieren. Die Tatsache, dass der Promotor der Hexokinase II ein Bindungselement des durch Hypoxie aktivierten Transkriptionsfaktors HIF-1 enthält (Pastorino und Hoek, 2003), könnte aber für eine generelle Hypoxie-induzierte und

Hexokinase II-vermittelte Protektion und gegen einen neuronenspezifischen protektiven Effekt der Hexokinase II sprechen. Die in dieser Arbeit beschriebene Hexokinase II-vermittelte Protektion kortikaler Neurone würde somit beispielhaft für die protektive und antiapoptotische Potenz der Hexokinase II stehen und sich damit auch in anderen Apoptosemodellen nachweisen lassen.

In unterschiedlichen Tumoren findet sich eine erhöhte Hexokinaseaktivität mit einer Zunahme der mitochondrial-gebundenen Hexokinase-Isoformen (Smith, 2000). Neben einem schnellen Zugriff von Tumorzellen auf Metabolite wie Glukose und mitochondrial synthetisiertes ATP wird die Hexokinase-Mitochondrien-Interaktion ebenfalls als Schlüsselkomponente in der Regulation der zellulären Apoptosesignalkaskaden angesehen, die letztlich das Schicksal der Tumorzellen bestimmen (Wilson, 2003). In diesem Rahmen gilt auch die Modulation antiapoptotischer Stimuli in Tumoren durch Akt als wichtiges Steuerelement (s. u.). Im Wesentlichen werden hierbei zwei Mechanismen als relevant angesehen: Zum einen soll die Induktion der Hexokinase-VDAC Bindung die Erhöhung der mitochondrial gebundenen Hexokinasefraktion bewirken. Zum anderen soll das antiapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie, Bcl_{XL}, durch Akt ebenfalls eine Bindung mit VDAC eingehen (Mathupala et al., 2006).

5.3.2. Hexokinaseregulation durch Akt-Kinase

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg (PI3K/Akt) ist ein hoch konservierter Signalweg und hat eine grundlegende Bedeutung für das Überleben von Säugetierzellen. Er kann verschiedene apoptotische Stimuli antagonisieren. Viele Wachstumsfaktoren vermitteln außerdem ihre zytoprotektive Wirkung über den PI3K/Akt-Signalweg (Datta et al., 1999). In den Zellen von Säugetieren kann aktivierte Akt die mitochondriale Integrität erhalten und so die Freisetzung von Cytochrom C verhindern. Um diese antiapoptotische Funktion auszuführen, ist Akt auf die Verfügbarkeit von Glukose angewiesen. Zur Apoptoseinhibition und Verhinderung der Cytochrom C Freisetzung ist die mitochondrial gebundene Hexokinase, genauso wie Akt, auf die Verfügbarkeit von Glukose angewiesen (Robey und Hay, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Abhängigkeit protektiver Effekte transfizierter Hexokinase II von der Verfügbarkeit von Glukose beobachtet. Weiterhin korreliert die Fähigkeit von Akt, die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran aufrecht zu erhalten und Apoptose zu verhindern, mit der Assoziation von Hexokinase und Mitochondrien (Gottlob et al., 2001). Ferner behindert die Dissoziation von Mitochondrien und Hexokinase die antiapoptotischen Eigenschaften von Wachstumsfaktoren (Majewski et al., 2004a; Robey und

Hay, 2005), ebenso wie Wachstumsfaktoren die Bindung von Hexokinase an Mitochondrien fördern können (Majewski et al., 2004a). Akt erhält demnach die Assoziation der Hexokinase mit der Mitochondrienmembran aufrecht. Die Hexokinase stellt damit einen *downstream effector* im antiapoptotischen Signalweg von Akt dar (Robey und Hay, 2006). Die gezielte Unterbrechung der Hexokinase-Mitochondrien-Bindung vermindert die antiapoptotischen Eigenschaften und die die Integrität der Mitochondrienmembran stabilisierenden Funktionen von Akt (Majewski et al., 2004a).

Weiterhin befinden sich Akt Phosphorylierungsmotive in der Hexokinasesequenz, so dass Akt auch die Phosphorylierung der Hexokinase beeinflussen und dadurch auf die Interaktion zwischen Hexokinase und Mitochondrium einwirken könnte (Robey und Hay, 2006). So zeigt sich in Kardiomyozyten eine Akt-Phosphorylierungs-abhängige Protektion vor H₂O₂-induzierter Apoptose (Miyamoto et al., 2008). Die Verhinderung der Phosphorylierung der Hexokinase II durch Akt führt zur Aufhebung der antiapoptotischen Potenz (Kahl und Mergenthaler, unpublizierte Daten).

5.3.3. Mitochondriale Hexokinasen als zentrales Bindeglied zwischen Metabolismus und Apoptose

Die Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für die Regulation der mitochondrialen Assoziation der Hexokinase I/II legt eine zentrale Rolle der Hexokinasen in der Integration von metabolischen und apoptotischen Prozessen nahe.

Danial et al. (Danial et al., 2003) identifizierten solch einen Apoptose und Metabolismus verbindenden Mechanismus. Sie zeigten, dass ein Mitglied der BCL-2-Familie, BAD, in einen Proteinkomplex integriert ist, der auch Hexokinase IV (Glukokinase) enthält. Eine Verbindung von Metabolismus und Apoptose durch diesen Proteinkomplex deutet sich dadurch an, dass zum einen die Verfügbarkeit von Glukose oder von Wachstumsfaktoren zur Phosphorylierung von BAD und damit zu dessen Abbau führt. Interessanterweise kann auch Akt BAD phosphorylieren (Downward, 2003). Zum anderen beeinflusst die Phosphorylierung von BAD die Aktivität der Glukokinase. In BAD-Knockout-Zellen verringerte sich zum Beispiel die mitochondriale Glukokinaseaktivität (Danial et al., 2003). BAD könnte also im Zusammenspiel mit Glukokinase Apoptose regulieren und eine wichtige Rolle für den Glukosemetabolismus spielen.

Die Arbeit von Danial et al. liefert mit dem Nachweis eines BAD-Glukokinase Proteinkomplexes zwar einen Ansatz für die Verbindung zwischen Glukosemetabolismus und Apoptose, jedoch lassen sich aus der Arbeit keine Schlüsse für eine generelle Relevanz einer BAD-Hexokinase-Assoziation auf die Beeinflussung von Apoptosesignalwegen durch die

Hexokinasen ableiten. Im Vergleich zu den anderen Hexokinasen weist die Glukokinase (Hexokinase IV) einige relevante Unterschiede auf. So wird sie beispielsweise ausschließlich in Hepatozyten und den β -Zellen des Pankreas exprimiert. Des Weiteren hat die Glukokinase lediglich ein Molekulargewicht von 50 kDa, die anderen Hexokinasen eines von 100 kDa. Besonders bedeutend im Kontext der Integration von Apoptose und Metabolismus erscheint auch, dass die Glukokinase, im Gegensatz zu den Hexokinasen I und II, keine mitochondriale Lokalisationssequenz aufweist (siehe auch Kap. 1.4.1). Der BAD-Glukokinase-Proteinkomplex lokalisiert allerdings durch BAD mitochondrial (Danial et al., 2003).

5.3.4. Interaktion mitochondrialer Hexokinase mit VDAC

Für die Bindung von Hexokinase I und II an Mitochondrien sind sich stark ähnelnde N-terminale hydrophobe Aminosäuresequenzen verantwortlich (Pastorino und Hoek, 2008; Wilson, 2003). Neben dieser Bindungsstelle bestehen vermutlich noch weitere Interaktionen des N-Terminus mit der Mitochondrienmembran selbst oder mit Membranproteinen der äußeren Mitochondrienmembran (Pastorino und Hoek, 2008; Smith und Wilson, 1991).

Ausgehend von der Entdeckung und der ausführlichen Charakterisierung eines Hexokinase bindenden Proteins, wird VDAC als spezifischer Bindungspartner der Hexokinase am Mitochondrium angesehen (Felgner et al., 1979; Fiek et al., 1982; Linden et al., 1982; Pastorino und Hoek, 2008). Wahrscheinlich ist VDAC aber nicht der einzige Bindungspartner der Hexokinase an der Mitochondrienmembran, sondern möglicherweise Teil oder Anker eines Komplexes von Bindungsproteinen (Aflalo und Azoulay, 1998; Nakashima et al., 1986; Pastorino und Hoek, 2003). So legen auch die Ergebnisse von Kabir und Wilson nahe, dass es neben der Bindung von Hexokinase und VDAC mindestens einen weiteren mitochondrialen Bindungspartner der Hexokinase geben muss (Kabir und Wilson, 1994; Wilson, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden mit einem genetischen Interaktionsassay erstmalig andere Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen (siehe Kap. 4.3).

Die Forschung der letzten Jahre beschränkte sich im Hinblick auf die Bindung von Hexokinase an Mitochondrien auf die Untersuchung der Interaktion von Hexokinase und VDAC. Die Möglichkeit anderer Interaktionspartner, wie sie von verschiedenen Autoren nahegelegt wurden (Aflalo und Azoulay, 1998; Kabir und Wilson, 1994; Nakashima et al., 1986), ist nach Kenntnisstand des Autors bisher nicht weiter bearbeitet worden.

Wie vorangehend dargelegt, wird davon ausgegangen, dass die Hexokinase zum Erhalt des offenen Zustandes von VDAC beiträgt und dass dies einen wichtigen Faktor bei der antiapoptotischen Funktion der Hexokinase darstellt (Robey und Hay, 2006). Allerdings gibt es auch Beobachtungen, nach denen die Hexokinase zum Schluss von VDAC führt und hierdurch Apoptose verhindert (Azoulay-Zohar et al., 2004). Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass nicht der offene oder geschlossene Zustand von VDAC für die Freisetzung von Cytochrom C und damit für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist, sondern ein Mechanismus, der die Oligomerisation von VDAC reguliert und die Apoptoseinduktion durch die Freisetzung von Cytochrom C durch Konformationsänderungen der VDAC Oligomere herbeiführt (Zaid et al., 2005; Zalk et al., 2005). In diesem Modell wird allerdings die Hypothese, dass die Hexokinase durch die Interaktion mit VDAC begünstigten Zugang zu mitochondrialem ATP hat, nicht berücksichtigt (Robey und Hay, 2006). Weiterhin wird das von Zalk et al. beschriebene Modell aufgrund von technischen und methodischen Schwierigkeiten hinterfragt (Rostovtseva et al., 2005).

Die mitochondrial gebundene Hexokinase interagiert mit der VDAC-Isoform VDAC-1 ebenso wie viele andere apoptosemodulierende Proteine, die ihre Wirkung über eine Interaktion mit Mitochondrien ausüben (Mathupala et al., 2006). So binden antiapoptotische Proteine wie Bcl_{XL} ebenso wie proapoptotische Proteine wie Bax an VDAC (Pastorino und Hoek, 2003). Die Bedeutung der Interaktion von Hexokinase mit VDAC zur Apoptoseinhibition lässt sich möglicherweise auch therapeutisch, beispielsweise bei malignen Tumoren, durch pharmakologische Dissoziation und damit Apoptoseinduktion nutzen (Galluzzi et al., 2008; Goldin et al., 2008; Shulga et al., 2009). Interessanterweise scheinen sich enteroinvasive Bakterien den Mechanismus der Apoptoseinhibition durch die Hexokinase-VDAC-Interaktion zunutze gemacht zu haben. Mit dem löslichen Pilusprotein FimA stabilisieren sie die Interaktion von Hexokinase und VDAC und verzögern so die Induktion der Apoptose ihrer Wirtszellen (Sukumaran et al., 2010).

Abschließend lässt sich die Bedeutung von VDAC für die mitochondriale Bindung allerdings nicht beurteilen. Einerseits kann Bindung von Hexokinase II an Mitochondrien durch die Cholesterolkonzentration der äußeren Mitochondrienmembran beeinflusst werden (Pastorino und Hoek, 2008), andererseits scheinen die Mechanismen der Apoptoseinhibition durch Hexokinase II auch in VDAC-1/-3-Doppleknockoutzellen zu wirken (Chiara et al., 2008). In dieser Arbeit fand sich zwar keine Assoziation von Hexokinase II mit VDAC-2, allerdings

wurden für die Immunpräzipitation Bedingungen verwandt (Zelllyse mit 1% NP40 oder 1% Triton X-100), die auch in eigenen Experimenten die Interaktion von Hexokinase II mit Interaktionspartnern zerstörten (Mergenthaler, nicht publizierte Daten). Dahingegen ist nicht auszuschließen, dass Hexokinase II ähnlich wie Hexokinase I an alle drei Isoformen von VDAC binden kann (Neumann et al., 2010).

5.3.5. Mitochondriale Assoziation der Hexokinase verbindet oxidative Phosphorylierung und Glykolyse

Die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-phosphat erfolgt ATP-abhängig durch die Hexokinase Isoenzyme. Durch die Interaktion und mitochondriale Lokalisation der Hexokinase I und II mit VDAC, dem wichtigsten Adenin Nukleotid Kanal, ist die Hexokinase mit dem Kanal, durch den ATP die Mitochondrien verlässt, assoziiert und soll so einen begünstigten Zugang zu einem intramitochondrialen Pool von durch oxidative Phosphorylierung gewonnenem ATP und damit freigesetztes ATP vor anderen zytoplasmatischen ATP-verbrauchenden Enzymen verwenden können (Wilson, 2003). Auf diese Weise scheint mitochondrial gebundene Hexokinase intramitochondriales ATP unter enger Koordination von oxidativer Phosphorylierung und Glukosephosphorylierung zu verwenden (Laterveer et al., 1993; Pastorino und Hoek, 2003; Wilson, 2003). Die mitochondrial gebundene Hexokinase verwendet wahrscheinlich selbst dann vornehmlich intramitochondriales ATP für die oxidative Phosphorylierung, wenn extramitochondriales ATP verfügbar ist, wobei der Grad der bevorzugten Verwendung intramitochondrialen ATPs vom Zelltyp abhängig zu sein scheint (Cesar Mde und Wilson, 1998; Robey und Hay, 2005). Möglicherweise reflektieren diese Unterschiede die unterschiedliche Expression von Hexokinase I und II in den verschiedenen Zelltypen, oder den Unterschied in der katalytischen Aktivität von Hexokinase I und II (Ardehali et al., 1996).

Unter normalen Bedingungen ist die Hexokinase in der Lage, die Rate, mit der Glukose glykolytisch bzw. oxidiert wird, zu beeinflussen. Die Rate der Phosphorylierung von Glukose wird so mit den terminalen Stadien des intramitochondrialen Glukosemetabolismus und der assoziierten ATP-Synthese koordiniert (Wilson, 2003). Hierdurch wird eine exzessive Glykolyse und damit die Produktion von neurotoxischem Laktat vermieden. Zudem soll die Hexokinase durch die primäre Verwendung intramitochondrialer ATP-Vorräte beispielsweise in der Lage sein, auch im Falle niedriger zytoplasmatischer ATP-Level die Energievorräte der Zelle wieder aufzufüllen (Birnbaum, 2004; Smith, 2000).

Die Bedeutung der mitochondrialen Bindung der Hexokinase zur bevorzugten Verwendung intramitochondrialen ATPs ist vornehmlich für das Isoenzym Typ I beschrieben worden.

Aufgrund von Experimenten mit Tumorzellen ist aber davon auszugehen, dass auch das Isoenzym Typ II der Hexokinase den beschriebenen Zugang zu mitochondrialem ATP hat. Allerdings ist bisher noch nicht untersucht worden, ob sich diese Ergebnisse aus Tumorzellen, so wie bei der Hexokinase I, auch auf Zellen normaler Gewebe übertragen lassen (Arora und Pedersen, 1988; Wilson, 2003). Bisher ist nicht völlig geklärt, welchen Vorteil der bevorzugte Zugang zu intramitochondrialem ATP durch die Hexokinase der Zelle verschafft. Möglicherweise gibt es einen solchen Vorteil in Situationen eingeschränkter ATP-Synthese, wie dies z. B. unter Hypoxie der Fall ist, bei der die zytosolischen ATP Spiegel sinken (Pastorino und Hoek, 2003).

5.4. DUALmembranes™ Screen - Das Split-Ubiquitin Two-Hybrid System zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran

Mit dem DUALmembranes™ Screening System wurde nach neuen Interaktionspartnern der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran gesucht. Hierbei wurden 107 Klone entdeckt, die potenzielle Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran darstellen. Die weitere Analyse von 24 der gefundenen Klone zeigte, dass es sich z. T. um unterschiedliche Proteine handelte. Das Screeningsystem ermöglicht es nicht, die verschiedenen Klone zu unterscheiden. Auch gibt es keine Möglichkeit, anhand der β -Galaktosidase-Aktivität im Konfirmationsassay auf die Stärke der Interaktion zu schließen. So bestand grundsätzlich die Möglichkeit, dass sich hinter den 107 positiven Klonen 107 verschiedene Interaktionspartner verbergen, ebenso wie dass 107-mal dasselbe Protein die Interaktion verursacht hat. Entsprechend bedeutet das mehrfache Auffinden des gleichen Proteins (Cytochrom b5 und Glycoprotein Gpsn2) in unterschiedlichen Klonen eine zufällige Häufung in den ausgesuchten Klonen.

In diesem Screen konnte keine Interaktion mit VDAC nachgewiesen werden. Dies kann auf die Auswahl der analysierten und sequenzierten Klone zurückzuführen sein. Weiterhin ist die Rate falsch negativer Ergebnisse in konventionellen Yeast-Two Hybrid-Screens relativ hoch. Es kann also nur ein kleiner Teil der tatsächlich zu erwartenden Interaktionspartner eines Proteins nachgewiesen werden (Suter et al., 2006). Da diese Limitation mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für den hier verwendeten DUALmembranes™ Screen gilt, ist es möglich, dass sich VDAC als Interaktionspartner der Hexokinase II nicht in den restlichen Klonen des hier durchgeführten Screens findet. Weiterhin schränkt die ausschließliche Verwendung einer NubG-x cDNA-Bibliothek, bei der das cDNA Insert an das 3'-Ende der

NubG kodierenden Sequenz angefügt wird, die Gesamtzahl der potentiell zu findenden Interaktionspartner ein. Mit einer solchen NubG-x cDNA-Bibliothek können lediglich integrale Membranproteine vom Typ II sowie lösliche Proteine als Bindungspartner einer *bait* identifiziert werden. Eine entsprechende x-NubG cDNA-Bibliothek, mit einer Fusion des cDNA-Inserts an das 5'-Ende der NubG-Sequenz, war zum Zeitpunkt des Screens nicht verfügbar. Mit einer solchen zusätzlichen cDNA-Bibliothek hätten zwar mehr mögliche Interaktionspartner der Hexokinase II gefunden werden können (zusätzlich integrale Membranproteine vom Typ I), allerdings wäre wie schon erwähnt auch bei diesem Komplettsatz nicht zu erwarten, sämtliche Interaktionspartner der Hexokinase II zu finden. Die Struktur von VDAC (Bayrhuber et al., 2008) legt nahe, dass sich mit einer N- oder C-terminalen Fusion von NubG gar keine Interaktion nachweisen ließe, da sich NubG bei einer N-terminalen Fusion mit VDAC im Lumen des Kanals oder bei einer C-terminalen Fusion auf der endoluminalen Membranseite befände und so eine Interaktion mit Cub behindert oder nicht möglich wäre. Eine weitere Einschränkung im Hinblick auf die Vollständigkeit der gefundenen Interaktionspartner erfährt der Screen dadurch, dass wichtige posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie sie in höheren eukaryoten Zellen erfolgen, in Hefen nur sehr eingeschränkt möglich sind. Aus diesem Grund können in einem Yeast-Two Hybrid-System Proteininteraktionen die auf Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung beruhen, nicht erkannt werden (Suter et al., 2006). Auch dies könnte einen Grund für den nicht erfolgten Nachweis einer Hexokinase II-VDAC-Interaktion darstellen, zumal es Hinweise auf eine Beeinflussung der Hexokinase II-VDAC-Interaktion durch Phosphorylierung gibt (Miyamoto et al., 2008; Pastorino und Hoek, 2008). Beim konventionellen Yeast-Two Hybrid-System müssen die interagierenden Proteine im Zellkern lokalisiert sein, da die Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors, die durch die Protein-Protein-Interaktion eingeleitet wird, am Promotor des Reportergens erfolgen muss. Da Membranproteine häufig nicht löslich sind oder Aggregate bilden, wenn sie nicht in einer Membran verankert sind, stellen sie schlechte Kandidaten zur Identifikation einer Interaktion mit dem Yeast-Two Hybrid System dar. Diese Limitation wird mit dem hier angewandten, auf dem Split-Ubiquitin Membran-basierten Yeast-Two Hybrid-System aufbauenden DUALmembranes™ Verfahren dagegen umgangen: *bait* und *prey* müssen hier nicht im Zellkern lokalisiert sein. Bei diesem System werden die beiden inaktiven Hälften von Ubiquitin, *Cub* (C-terminales Ubiquitin, mit einem Reporterprotein fusioniert) und *NubG* (N-terminales Ubiquitin, gentechnisch verändert zur Verhinderung einer Autoassoziation des C- und N-Terminus), mit potenziell interagierenden Proteinen fusioniert. Kommt es zu einer

Interaktion dieser Proteine, assoziieren auch Cub und NubG zu aktivem Ubiquitin, und es kommt zu einer Freisetzung des Reporterproteins (Abb. 5.1). Beim DUALmembranes™ Verfahren handelt es sich bei dem Reporterprotein um den artifiziellen Transkriptionsfaktor LexA-VP16, der nach Freisetzung im Zellkern der Hefe die Transkription der Reportergene HIS3 und LacZ aktiviert (Stagljar und Fields, 2002). Dies ermöglicht die in dieser Arbeit vorgenommene Suche nach Interaktionspartnern von Membran-assoziierten Proteinen.

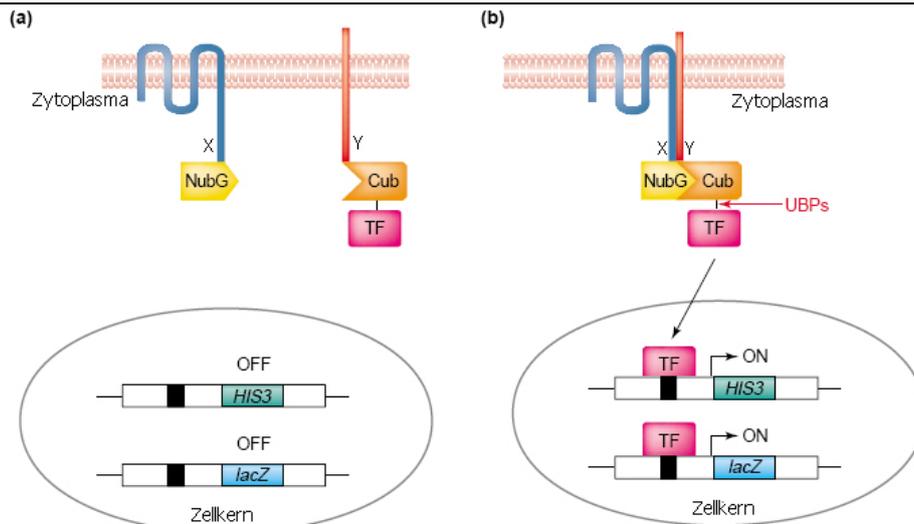


Abb. 5.1: Beim Split-Ubiquitin basierten Yeast-Two Hybrid-System (DUALmembranes™ System) ist (a) ein Membranprotein Y mit der Cub-Domäne, die mit einem artifiziellen Transkriptionsfaktor (TF) gekoppelt ist, fusioniert (Y-Cub-TF). Ein Membranprotein (oder zytoplasmatisches Protein) X ist mit der NubG-Domäne fusioniert (X-NubG). Die Koexpression von Y-Cub-TF mit einem nicht-interagierenden X-NubG führt nicht zur Assoziation von Cub und NubG und damit auch nicht zur Expression der Reportergene. (b) Bei der Interaktion der Proteine Y und X wird Ubiquitin rekonstituiert. Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) führen zur protolytischen Spaltung der Cub-TF Verbindung und zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors. Dieser aktiviert die Reportergene im Zellkern und führt zur Expression der Reportergene Histidin und lacZ. *Modifiziert nach (Stagljar und Fields, 2002)*

Die Ergebnisse des hier vorgenommenen Interaktionsscreens mit der Maus-Hexokinase II als *bait* und einer Maus-Gehirn-cDNA-Bibliothek als *prey*, weisen neben VDAC erstmals weitere Interaktionspartner der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran nach, deren Existenz von verschiedenen Autoren bisher nur vermutet worden war (Aflalo und Azoulay, 1998; Kabir und Wilson, 1994; Nakashima et al., 1986). Die Verwendung einer Maus-Gehirn-cDNA-Bibliothek schränkt die auffindbaren Interaktionspartner der Hexokinase II allerdings auf im Gehirn der Maus exprimierte Proteine ein.

In dem ersten Screeningansatz mit dem *bait*-Plasmid pBT3-C_mHK2 zeigte sich eine Selbstaktivierung im Kontrollassay. Da die Hexokinase II ein membranassoziertes Protein ist und nicht fest in der Membran verankert ist, besteht die Möglichkeit, dass diese *bait* in den Zellkern der Hefe gelangt und dort die Expression der Reportergene veranlasst (Rutschmann, Dualsystems, persönliche Kommunikation), oder aber, dass die Hexokinase II aufgrund einer fehlenden Phosphorylierung (s. o.) nicht mit den entsprechenden intrazellulären Membranen assoziieren kann. Aus diesem Grund wurde der Screen erneut mit dem Bait-Plasmid pDHB1-mHK2 durchgeführt. Es enthält zusätzlich einen Membrananker, der, an das N-terminale Ende der Hexokinase II fusioniert, zu einer spezifischen Interaktion der Bait in den Funktions- und Kontrollassays führte. Solch ein Membrananker kann in der Untersuchung zytosolischer und Membran-assoziierter Proteine Anwendung finden (Suter et al., 2006). Als Membrananker wurde die Oligosaccharyltransferase OST4 der Hefe verwendet.

Während die Ergebnisse des Screens viel versprechende Perspektiven für weitere Untersuchungen eröffnen, bedürfen die möglichen Interaktionspartner der Hexokinase II weiterer Kontrollexperimente zur Überprüfung der Spezifität der Interaktion im Yeast-Two Hybrid Assay. Zwar gilt das angewandte Verfahren der DUALmembranes™ Technologie, das auf dem Split-Ubiquitin Mechanismus beruht, als etabliertes Verfahren, um Proteininteraktionen nachzuweisen (Stagljar und Fields, 2002), allerdings ist beispielsweise ungeklärt, ob durch die Verwendung des Membranankers OST4 eine Konfigurationsänderung der Hexokinase II eintritt, die zu unspezifischen Interaktionen führen könnte. Weiterhin ist einer der gefundenen Interaktionspartner, Selenoprotein K, ein seltener falsch-positiver Interaktionspartner in vielen Screens mit dem DUALmembranes™ System. Dies bedeutet zwar nicht, dass das Selenoprotein K kein spezifischer Interaktionspartner der Hexokinase II sein könnte, bedürfte aber einer weiterführenden Untersuchung der Interaktion. Zur Untersuchung der Spezifität der Interaktion der Hexokinase II mit den gefundenen potenziellen Interaktionspartnern eignet sich beispielsweise die Coimmunpräzipitation.

5.4.1. Ergebnisse des DUALmembrane™ Interaktionsscreens

Im Folgenden soll kurz auf die Interaktionspartner der Hexokinase II eingegangen werden, für die eine Bedeutung in der Apoptoseregulation oder eine Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben ist.

Zur Funktion der Familie der Reticulon Gene, von der zwei Mitglieder, RTN1 und RTN2, in diesem Screen gefunden wurden, ist relativ wenig bekannt. In der Regel sind diese Proteine mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert, es sind aber auch andere intrazelluläre

Membranassoziationen beschrieben. Diese Proteinfamilie ist relativ hoch konserviert und findet sich in verschiedenen Spezies. Interessanterweise spielt sie gerade in Prozessen der neuronalen Differenzierung und Regeneration und des axonalen Wachstums eine wichtige Rolle. Neben den vier Hauptformen RTN1-4 existieren mehrere Splicevarianten, die größtenteils in Hirngewebe, aber auch in anderen Gewebetypen sowie in wechselnder Expressionsstärke in Neuronen exprimiert werden. Auch wenn die Funktionen dieser Proteine bisher nicht ausführlich charakterisiert wurden, ist die Reticulon Proteinfamilie doch mit mehreren Erkrankungen assoziiert worden. So finden sich Assoziationen von Proteinen aus der Reticulon Familie mit neurologischen, vornehmlich neurodegenerativen Erkrankungen wie der alzheimerschen Demenz oder der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Des Weiteren sollen Mitglieder der Reticulon Familie eine apoptosemodulierende Funktion besitzen (Fergani et al., 2005; Yan et al., 2006).

ALS2 (Alsin) ist als wichtiges Protein im Rahmen der autosomal-dominanten familiären ALS identifiziert worden. Es wird in verschiedenen Neuronenpopulationen exprimiert. Interessanterweise wirkt eine Splicevariante des Alsin, AlsinLF, über den PI3K/Akt-Signalweg neuroprotektiv. Diese Protektion konnte allerdings nicht bei anderen neurodegenerativen Prozessen beobachtet werden (Matsuoka und Nishimoto, 2005).

BM88 ist ein Marker neuronaler Zellen in allen Entwicklungsstadien. Die höchste Expression findet sich in adulten Neuronen, aber auch neuronale Präkursoren exprimieren das Protein. BM88 ist mit verschiedenen intrazellulären Membranen assoziiert. In Neuroblastomzellen der Maus konnte durch Überexpression von BM88 ein Austritt aus dem Zellzyklus und die neuronale Differenzierung der Neuroblastomzellen erreicht werden (Georgopoulou et al., 2006; Koutmani et al., 2004).

BNip31 (BNip3 like protein) ist ein proapoptotisches Protein aus der Bcl Familie mit nur einer proapoptotischen BH Domäne (BH3), welches an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und dessen Transkription aufgrund eines HIF-1 α -Responseelements bei Hypoxie aktiviert wird. Weiterhin wird die Transkription von BNip31 auch von dem Tumorsuppressorgen p53 reguliert. Während die biologischen Funktionen von BNip31 bisher nicht gut charakterisiert sind, wird vermutet, dass es den programmierten Zelltod mittels eines Bax-ähnlichen Mechanismus mit Cytochrom C-Freisetzung und Caspasenaktivierung

herbeiführt. Beispielsweise wurde in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie BNip31 schneller als Bax exprimiert (Birsen-Archbold et al., 2005; Fei et al., 2004).

Itm2b ist ein integrales Membranprotein aus einer mindestens zwei weitere Mitglieder umfassenden Proteinfamilie und wird in verschiedenen Gewebetypen exprimiert. Durch alternatives Splicing entstehen eine lange und eine kurze Variante von Itm2b. Die kurze Variante, Itm2b_s, besitzt eine BH3-Domäne und kann über die Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials Apoptose auslösen (Fleischer et al., 2002; Pittois et al., 1998).

Pea-15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes of 15 kDa) wird im Gehirn in bestimmten Subpopulationen von Astrozyten und Neuronen sowie in anderen Geweben exprimiert. Es hat antiapoptotische Funktionen die z. T. über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert werden, sowie Einflüsse auf den Glukosemetabolismus. Eine Überexpression von Pea-15 findet sich in unterschiedlichen malignen Tumoren (Fiory et al., 2009; Kitsberg et al., 1999; Sharif et al., 2004).

TRAP1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1) gehört zur Familie der Heat Shock Proteine und wird auch als HSP75 bezeichnet. Weiterhin weist TRAP1 große Homologien zu dem molekularen Chaperone-Protein HSP90 auf, besitzt aber durch seine mitochondriale Lokalisation und die fehlende Interaktion mit Interaktionspartnern von HSP90 möglicherweise eigenständige Funktionen. TRAP1 zeigt ebenso wie HSP90 eine Apoptose-inhibierende Funktion mit ähnlichem, Cytochrom C modulierendem Mechanismus (Masuda et al., 2004).

Selenoprotein K gehört zu der mehr als 20 Proteine umfassenden Gruppe der Selenoproteine. Selenoprotein K wird beim Menschen ubiquitär, u. a. auch im Gehirn, exprimiert und bedingt in Kardiomyozyten eine Protektion vor durch freie Sauerstoffradikale ausgelöster Zytotoxizität (Lu et al., 2006).

Für die Proteine Cytochrom b5, Glycoprotein Gpsn2, HMBG-1b, Spcs2 (Sp25), Nsg-1, Basigin und die zwei Proteine, deren Sequenzen nicht mit einer einfachen BLAST-Suche zugeordnet werden konnten, gab es zum Zeitpunkt der Auswertung in der Literatur keinen

Hinweis auf Apoptose-modulierende Funktionen oder eine Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen.

Zusammenfassend erweisen sich einige der gefundenen Interaktionspartner der Hexokinase II am Mitochondrium durch ihre teilweise bekannten antiapoptotischen Eigenschaften als interessante Kandidaten für eine weitere Testung der Relevanz der jeweiligen Interaktion für die Beeinflussung Hexokinase II-spezifischer antiapoptotischer Signalwege oder das Überleben der untersuchten Zellen. Allerdings müssten zur abschließenden Beurteilung der Spezifität und Relevanz der Interaktionen weitere Untersuchungen erfolgen. Möglicherweise ließe sich auch durch solche weiterführenden Untersuchungen klären, ob für die Protektion der Hexokinase II unter OGD und OD Bedingungen unterschiedliche Mechanismen bzw. verschiedene Interaktionspartner der Hexokinase II von Relevanz sind.

Nachdem eine Kontrolle spezifischer Interaktionen beispielsweise mit der Coimmunpräzipitation erfolgt ist, würde sich das in der vorliegenden Arbeit etablierte Kotransfektions/Kokultivierungsmodell ideal zur weiteren funktionellen Analyse der jeweiligen Interaktionen eignen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nachzuweisen, dass durch die Überexpression der Hexokinase II in primären Kortexneuronen ein Zustand ähnlich der endogenen Neuroprotektion und daraus resultierende Hypoxietoleranz induziert wird.

Zunächst wurde hierzu ein Transfektionssystem zur Untersuchung protektiver Gene in primären Kortexneuronen etabliert. Basierend auf einem Elektroporationssystem (Nucleofection™) wurde hierbei mit einem Kotransfektions- / Kokultivierungsansatz unter Verwendung grüner und roter Fluoreszenzproteine sowie dem antiapoptischen Gen Bcl_{XL} als Positivkontrolle ein neues System zur Analyse potenziell neuroprotektiver Gene in transfizierten primären Kortexneuronen etabliert. Die transfizierten Zellen lassen sich bei diesem Ansatz durch die Markierung mit Fluoreszenzproteinen unabhängig von der Gesamtzellpopulation, bestehend aus überwiegend nicht transfizierten Neuronen, untersuchen.

Mit diesem Kotransfektions- / Kokultivierungsansatz wurde der Effekt der Überexpression des glykolytischen Enzyms Hexokinase II auf das Überleben transfizierter primärer Kortexneurone unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Hierbei zeigte sich ein Schutz der Hexokinase II-transfizierten Neurone vor hypoxischem Zelltod. Dieser Hexokinase II-vermittelte Schutz vor neuronalem Zelltod stellte sich als glukoseabhängig dar.

Die Familie der Hexokinase-Isoenzyme, zu der die Hexokinase II gehört, phosphoryliert Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Damit stellen die Hexokinasen Schlüsselenzyme des Glukosemetabolismus dar. Weiterhin gibt es seit einiger Zeit Hinweise auf eine Modulation der Apoptose durch die Hexokinase II. Da hierfür die mitochondriale Lokalisation der Hexokinase II von großer Bedeutung ist, wurde zum Abschluss der vorliegenden Arbeit mit einem genetischen Screeningverfahren nach neuen Interaktionspartnern der Hexokinase II an der äußeren Mitochondrienmembran gesucht. Hierbei wurden mit einem modifizierten Yeast-Two Hybrid-Assay erstmals Kandidaten, die an der Hexokinase II vermittelten Zelltodregulation beteiligt sein könnten, als direkte Interaktionspartner der Hexokinase II identifiziert.

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte neuroprotektive Wirkung der Hexokinase II stellt einen Ansatz für die Entwicklung neuer Konzepte für eine optimierte Schlaganfalltherapie dar. Die Verbindung apoptotischer Regulationsprozesse mit Mechanismen des Glukosemetabolismus hat allerdings auch eine über das pathobiologische Verständnis der zerebralen Ischämie hinausgehende Bedeutung. Aufgrund der zentralen Rolle der Hexokinasen im Glukosemetabolismus aller Säugerzellen ist es möglich, dass die in dieser

Arbeit beschriebenen Mechanismen der glukoseabhängigen Protektion vor Hypoxie-induziertem apoptotischen Zelltod durch Hexokinase II und ihrer hier identifizierten Bindungspartner eine grundsätzliche biologische Relevanz besitzen. Hierdurch ergeben sich aufgrund des neuen Verständnisses der Hexokinase-abhängigen Apoptosemodulation u. A. auch Ansätze für eine Optimierung der Therapie verschiedener maligner Tumore, bei denen eine deutliche Überexpression der Hexokinase II zu beobachten ist.

7. Referenzen

- Aflalo, C., and Azoulay, H. (1998). Binding of rat brain hexokinase to recombinant yeast mitochondria: effect of environmental factors and the source of porin. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 245-255.
- Akhtar, R.S., Ness, J.M., and Roth, K.A. (2004). Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 189-203.
- Ardehali, H., Yano, Y., Printz, R.L., *et al.* (1996). Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH₂- and COOH-terminal halves. *J Biol Chem* **271**, 1849-1852.
- Arora, K.K., and Pedersen, P.L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem* **263**, 17422-17428.
- Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., and Shoshan-Barmatz, V. (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* **377**, 347-355.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., *et al.* (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15370-15375.
- Berman, S.B., Chen, Y.B., Qi, B., *et al.* (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J Cell Biol* **184**, 707-719.
- Bernaudin, M., Tang, Y., Reilly, M., Petit, E., and Sharp, F.R. (2002). Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* **277**, 39728-39738.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* **6**, e147.
- Birnbaum, M.J. (2004). On the InterAktion between hexokinase and the mitochondrion. *Dev Cell* **7**, 781-782.

- Birse-Archbold, J.L., Kerr, L.E., Jones, P.A., McCulloch, J., and Sharkey, J. (2005). Differential profile of Nix upregulation and translocation during hypoxia/ischaemia in vivo versus in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1356-1365.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., *et al.* (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608.
- Brewer, G.J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* **42**, 674-683.
- Broughton, B.R., Reutens, D.C., and Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-339.
- Bruer, U., Weih, M.K., Isaev, N.K., *et al.* (1997). Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* **414**, 117-121.
- Bryson, J.M., Coy, P.E., Gottlob, K., Hay, N., and Robey, R.B. (2002). Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death. *J Biol Chem* **277**, 11392-11400.
- Cardenas, M.L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* **1401**, 242-264.
- Cesar Mde, C., and Wilson, J.E. (1998). Further studies on the coupling of mitochondrially bound hexokinase to intramitochondrially compartmented ATP, generated by oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **350**, 109-117.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chiara, F., Castellaro, D., Marin, O., *et al.* (2008). Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS ONE* **3**, e1852.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **18**, 157-164.
- Clontech (2003). Living Colors User Manual Volume 2 (Becton, Dickinson and Company).

- Cohen, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (2002). Tantalizing Thanatos: unexpected links in death pathways. *Trends Cell Biol* **12**, 293-295.
- Corish, P., and Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* **12**, 1035-1040.
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., and Landsberger, N. (2002). Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* **22**, 3157-3173.
- Dang, C.V., and Semenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72.
- Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**, 952-956.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Danial, N.N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* **13**, 7254-7263.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**, 2905-2927.
- Davidson, T.J., Harel, S., Arboleda, V.A., *et al.* (2004). Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* **24**, 10040-10046.
- Diener, H.C., and Ackermann, H. (2008). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Dietz, G.P., Kilic, E., and Bahr, M. (2002). Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo using TAT-mediated protein transduction. *Mol Cell Neurosci* **21**, 29-37.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397.
- Dirnagl, U., Simon, R.P., and Hallenbeck, J.M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* **26**, 248-254.

- Dirnagl, U., Becker, K., and Meisel, A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* **8**, 398-412.
- Dityateva, G., Hammond, M., Thiel, C., *et al.* (2003). Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons. *J Neurosci Methods* **130**, 65-73.
- Downward, J. (2003). Cell biology: metabolism meets death. *Nature* **424**, 896-897.
- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., *et al.* (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 238-247.
- Fei, P., Wang, W., Kim, S.H., *et al.* (2004). Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth. *Cancer Cell* **6**, 597-609.
- Felgner, P.L., Messer, J.L., and Wilson, J.E. (1979). Purification of a hexokinase-binding protein from the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **254**, 4946-4949.
- Fergani, A., Dupuis, L., Jokic, N., *et al.* (2005). Reticulons as markers of neurological diseases: focus on amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* **2**, 185-194.
- Fiebig, A.A., Zhu, W., Hollerbach, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2006). Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer* **6**, 213.
- Fiek, C., Benz, R., Roos, N., and Brdiczka, D. (1982). Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **688**, 429-440.
- Fink, K., Zhu, J., Namura, S., *et al.* (1998). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 1071-1076.
- Fiory, F., Formisano, P., Perruolo, G., and Beguinot, F. (2009). Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E592-601.

- Fitzsimons, H.L., Bland, R.J., and During, M.J. (2002). Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* **28**, 227-236.
- Fleischer, A., Ayllon, V., and Rebollo, A. (2002). ITM2BS regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. *Eur J Immunol* **32**, 3498-3505.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Tajeddine, N., and Kroemer, G. (2008). Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene* **27**, 4633-4635.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., *et al.* (2009a). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* **16**, 1093-1107.
- Galluzzi, L., Blomgren, K., and Kroemer, G. (2009b). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **10**, 481-494.
- Garcia-Saez, A.J., Ries, J., Orzaez, M., Perez-Paya, E., and Schwillie, P. (2009). Membrane promotes tBID interaction with BCL(XL). *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1178-1185.
- Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* **177**, 437-447.
- Georgopoulou, N., Hurel, C., Politis, P.K., *et al.* (2006). BM88 is a dual function molecule inducing cell cycle exit and neuronal differentiation of neuroblastoma cells via cyclin D1 down-regulation and retinoblastoma protein hypophosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 33606-33620.
- Gimenez-Cassina, A., Lim, F., Cerrato, T., Palomo, G.M., and Diaz-Nido, J. (2009). Mitochondrial hexokinase II promotes neuronal survival and acts downstream of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **284**, 3001-3011.
- Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., *et al.* (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene* **27**, 4636-4643.
- Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., *et al.* (1995). bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4304-4308.

- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., *et al.* (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* **15**, 1406-1418.
- Grad, J.M., Zeng, X.R., and Boise, L.H. (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* **12**, 543-549.
- Gray, S.M., Adams, V., Yamashita, Y., *et al.* (1994). Hexokinase binding in ischemic and reperfused piglet brain. *Biochem Med Metab Biol* **53**, 145-148.
- Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., *et al.* (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**, 151-163.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12**, 149-162.
- Iynedjian, P.B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* **66**, 27-42.
- Kabir, F., and Wilson, J.E. (1994). Mitochondrial hexokinase in brain: coexistence of forms differing in sensitivity to solubilization by glucose-6-phosphate on the same mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **310**, 410-416.
- Karenberg, A. (2004). Johann Jakob Wepfer (1620-1695). *J Neurol* **251**, 501-502.
- Kawabata, I., Umeda, T., Yamamoto, K., and Okabe, S. (2004). Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. *Neuroreport* **15**, 971-975.
- Kilic, E., Dietz, G.P., Hermann, D.M., and Bahr, M. (2002). Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol* **52**, 617-622.
- Kim, J.W., and Dang, C.V. (2005). Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* **30**, 142-150.
- Kirino, T. (2002). Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1283-1296.

- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., *et al.* (1990). 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* **528**, 21-24.
- Kitsberg, D., Formstecher, E., Fauquet, M., *et al.* (1999). Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNFalpha-induced apoptosis. *J Neurosci* **19**, 8244-8251.
- Knull, H.R., Taylor, W.F., and Wells, W.W. (1973). Effects of energy metabolism on in vivo distribution of hexokinase in brain. *J Biol Chem* **248**, 5414-5417.
- Koutmani, Y., Hurel, C., Patsavoudi, E., *et al.* (2004). BM88 is an early marker of proliferating precursor cells that will differentiate into the neuronal lineage. *Eur J Neurosci* **20**, 2509-2523.
- Kretz, A., Kugler, S., Happold, C., Bahr, M., and Isenmann, S. (2004). Excess Bcl-XL increases the intrinsic growth potential of adult CNS neurons in vitro. *Mol Cell Neurosci* **26**, 63-74.
- Kugler, S., Meyn, L., Holzmuller, H., *et al.* (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Mol Cell Neurosci* **17**, 78-96.
- Laterveer, F., Nicolay, K., BeltrandelRio, H., and Wilson, J.E. (1993). Brain hexokinase and intramitochondrial compartments of ATP: fact and artifact. *Arch Biochem Biophys* **306**, 285-286.
- Le, D.A., Wu, Y., Huang, Z., *et al.* (2002). Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15188-15193.
- Leutenegger, A., D'Angelo, C., Matz, M.V., *et al.* (2007). It's cheap to be colorful. *Febs J* **274**, 2496-2505.
- Li, H., Chan, S.T., and Tang, F. (1997). Transfection of rat brain cells by electroporation. *J Neurosci Methods* **75**, 29-32.
- Linden, M., Gellerfors, P., and Nelson, B.D. (1982). Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. *FEBS Lett* **141**, 189-192.

- Lo, E.H., Dalkara, T., and Moskowitz, M.A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**, 399-415.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., *et al.* (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* **135**, 1074-1084.
- Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., *et al.* (2006). Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. *FEBS Lett* **580**, 5189-5197.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., *et al.* (2004a). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **16**, 819-830.
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R.B., and Hay, N. (2004b). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol* **24**, 730-740.
- Martinez, C.Y., and Hollenbeck, P.J. (2003). Transfection of primary central and peripheral nervous system neurons by electroporation. *Methods Cell Biol* **71**, 339-351.
- Masuda, Y., Shima, G., Aiuchi, T., *et al.* (2004). Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *J Biol Chem* **279**, 42503-42515.
- Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (1997). Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 339-343.
- Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* **276**, 43407-43412.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25**, 4777-4786.

- Matsuoka, M., and Nishimoto, I. (2005). Anti-ALS activity of alsin, the product of the ALS2 gene, and activity-dependent neurotrophic factor. *Neurodegener Dis* **2**, 135-138.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., *et al.* (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-973.
- Matz, M.V., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A. (2002). Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays* **24**, 953-959.
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U., and Meisel, A. (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* **19**, 151-167.
- Mergenthaler, P., Kahl, A., Kamitz, A., *et al.* (2010). A mitochondrial Hexokinase II / Pea 15 complex regulates hypoxic cell death. *submitted*.
- Miyamoto, S., Murphy, A.N., and Brown, J.H. (2008). Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* **15**, 521-529.
- Mockli, N., and Auerbach, D. (2004). Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* **36**, 872-876.
- Mülhardt, C. (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 4th edn (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Nakashima, R.A., Mangan, P.S., Colombini, M., and Pedersen, P.L. (1986). Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry* **25**, 1015-1021.
- Neeb, L. (2006). Genexpressionsanalyse der Induktion von HIF-1-Zielgenen durch Präkonditionierung im Gehirn in vivo und in vitro. In *Klinik für Neurologie* (Berlin, Charité Universitätsmedizin Berlin).
- Neumann, D., Buckers, J., Kastrup, L., Hell, S.W., and Jakobs, S. (2010). Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms. *PMC Biophys* **3**, 4.

- Nicotera, P., and Lipton, S.A. (1999). Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 583-591.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319.
- Pastorino, J.G., Shulga, N., and Hoek, J.B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 7610-7618.
- Pastorino, J.G., and Hoek, J.B. (2003). Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* **10**, 1535-1551.
- Pastorino, J.G., and Hoek, J.B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 171-182.
- Pittois, K., Deleersnijder, W., and Merregaert, J. (1998). cDNA sequence analysis, chromosomal assignment and expression pattern of the gene coding for integral membrane protein 2B. *Gene* **217**, 141-149.
- Potter, H. (1997). Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Neuroscience*, 1-5.
- Prass, K., Scharff, A., Ruscher, K., *et al.* (2003). Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* **34**, 1981-1986.
- Prosch, S., Stein, J., Staak, K., *et al.* (1996). Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 195-201.
- Rietveld, L.E., Caldenhoven, E., and Stunnenberg, H.G. (2002). In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes. *EMBO J* **21**, 1389-1397.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2005). Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria. *Cell Cycle* **4**, 654-658.

- Robey, R.B., and Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **25**, 4683-4696.
- Rostovtseva, T.K., Tan, W., and Colombini, M. (2005). On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 129-142.
- Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., *et al.* (2002). Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* **22**, 10291-10301.
- Sambrook, J., and Russel, D.W., (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Semenza, G.L. (2007). Life with oxygen. *Science* **318**, 62-64.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., *et al.* (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-909.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., and Davidson, M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**, 4247-4260.
- Sharif, A., Renault, F., Beuvon, F., *et al.* (2004). The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain. *Neuroscience* **126**, 263-275.
- Sharp, F.R., and Bernaudin, M. (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* **5**, 437-448.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Shulga, N., Wilson-Smith, R., and Pastorino, J.G. (2009). Hexokinase II detachment from the mitochondria potentiates cisplatin induced cytotoxicity through a caspase-2 dependent mechanism. *Cell Cycle* **8**, 3355-3364.

- Smith, A.D., and Wilson, J.E. (1991). Disposition of mitochondrially bound hexokinase at the membrane surface, deduced from reactivity with monoclonal antibodies recognizing epitopes of defined location. *Arch Biochem Biophys* **287**, 359-366.
- Smith, T.A. (2000). Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* **57**, 170-178.
- Stagljar, I., and Fields, S. (2002). Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem Sci* **27**, 559-563.
- Statistisches-Bundesamt, (2007). Todesursachen in Deutschland 2005 (Wiesbaden: Statistisches Bundesamt).
- Stenzel-Poore, M.P., Stevens, S.L., Xiong, Z., *et al.* (2003). Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* **362**, 1028-1037.
- Sukumaran, S.K., Fu, N.Y., Tin, C.B., *et al.* (2010). A soluble form of the pilus protein FimA targets the VDAC-hexokinase complex at mitochondria to suppress host cell apoptosis. *Mol Cell* **37**, 768-783.
- Suter, B., Auerbach, D., and Stagljar, I. (2006). Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques* **40**, 625-644.
- Tsien, R.Y. (2009). Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 5612-5626.
- Verkhusha, V.V., and Lukyanov, K.A. (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* **22**, 289-296.
- Voss, T.C., Demarco, I.A., and Day, R.N. (2005). Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus. *Biotechniques* **38**, 413-424.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4304-4308.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **8**, 519-530.

- Washbourne, P., and McAllister, A.K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 566-573.
- Wiessner, C., Allegrini, P.R., Rupalla, K., *et al.* (1999). Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett* **268**, 119-122.
- Wilson, J.E. (1997). Homologous and heterologous interactions between hexokinase and mitochondrial porin: evolutionary implications. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 97-102.
- Wilson, J.E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **206**, 2049-2057.
- Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., *et al.* (2001). Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* **272**, 149-156.
- Yan, R., Shi, Q., Hu, X., and Zhou, X. (2006). Reticulon proteins: emerging players in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* **63**, 877-889.
- Ye, G., Donthi, R.V., Metreveli, N.S., and Epstein, P.N. (2005). Overexpression of hexokinase protects hypoxic and diabetic cardiomyocytes by increasing ATP generation. *Cardiovasc Toxicol* **5**, 293-300.
- Zaid, H., Abu-Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I., and Shoshan-Barmatz, V. (2005). The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **12**, 751-760.
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E.S., Azoulay-Zohar, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **386**, 73-83.
- Zuurbier, C.J., Eerbeek, O., and Meijer, A.J. (2005). Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H496-499.

Danksagung

Herr Professor Dr. Andreas Meisel hat meine Arbeit nicht nur ausgezeichnet betreut, sondern vor allem auch durch die frühe Gewährung wissenschaftlicher Freiräume und seine Offenheit zur wissenschaftlichen Diskussion meiner und anderer Daten, meinen Spaß und meine Begeisterung für die experimentellen Forschung begründet und meine Fähigkeit zur wissenschaftlichen Argumentation geschult. Hierfür möchte ich ihm besonders Danken.

Ich danke Herrn Professor Dr. Ulrich Dirnagl und Herrn Professor Dr. Josef Priller für die stets rege und offene Diskussion und meine dadurch fundierte wissenschaftliche Ausbildung.

Für die geduldige und genaue Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und die grundsätzlichen Aspekte der Laborarbeit sowie für ihre experimentelle Unterstützung möchte ich insbesondere Frau Claudia Muselmann meinen Dank aussprechen. Frau Dr. Dorette Freyer, Frau Renate Gusinda und Herrn Dr. Nikolai Isaev danke ich für kompetente Hilfe und Einführung in die Arbeitstechniken und Modelle der primären neuronalen Zellkultur. Herrn Professor Dr. Josef Priller danke ich für die Unterstützung bei den Immunfluoreszenzfärbungen und Herrn Dr. Dirk Megow für die bereitwillige Unterstützung mit seiner biochemischen Expertise.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und in der Abteilung für Experimentelle Neurologie für vielfältige Unterstützung und Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Für die geduldige und kritische Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktiven Anregungen danke ich Herrn Vincent van Laak und Herrn Ulrich Brömming.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung das Entstehen und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Original- und Übersichtsarbeiten

Mergenthaler, P., Kahl, A., Kamitz, A., van Laak, V., Thomsen, S., Stohlmann, K., Neeb, L., Freyer, D., Megow, D., Collins, T. J., Priller, J., Dirnagl, U., Andrews, D. W., and Meisel, A., 2010. A mitochondrial Hexokinase II / Pea 15 complex regulates hypoxic cell death. *Manuskript in Vorbereitung*.

Stelmashook, E. V., Lozier, E. R., Goryacheva, E. S., **Mergenthaler, P.**, Novikova, S. V., Zorov, D. B., and Isaev, N. K., 2010. Glutamine-Mediated Protection From Neuronal Cell Death Depends On Mitochondrial Activity. *Neurosci Lett*. DOI:10.1016/j.neulet.2010.07.022

Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Lukin, S. V., Freyer, D., **Mergenthaler, P.**, and Zorov, D. B., 2010. Acidosis-Induced Zinc-Dependent Death of Cultured Cerebellar Granule Neurons. *Cell Mol Neurobiol*. DOI:10.1007/s10571-010-9516-x.

Mergenthaler, P., Dirnagl, U., and Meisel, A., 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19, 151-167. *Review*.

Endres, M., Biniszkiwicz, D., Sobol, R. W., Harms, C., Ahmadi, M., Lipski, A., Katchanov, J., **Mergenthaler, P.**, Dirnagl, U., Wilson, S. H., Meisel, A., and Jaenisch, R., 2004. Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase. *J Clin Invest* 113, 1711-1721.

Konferenzbeiträge

Mergenthaler, P., Bärwald, R., Kahl, A., Harms, C., Lehmann, A., Priller, J., Dirnagl, U., Andrews, D. W., and Meisel, A., 2010. A mitochondrial Hexokinase II macromolecular complex regulates hypoxic cell death. *Gordon Research Conferences - Cell Death, Newport, RI. angenommen*.

Mergenthaler, P., Kahl, A., Kamitz, A., Freyer, D., Megow, D., Priller, J., Dirnagl, U., Andrews, D. W., and Meisel, A., 2010. Mitochondrial Hexokinase II protects against hypoxic cell death by interacting with Pea-15, *Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. Vortrag*.

Lehmann, A., Stohlmann, K., Thomsen, S., Megow, D., Meisel, A., and **Mergenthaler, P.**, 2010. Proteomic analysis of a neuroprotective mitochondrial multiprotein complex. Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. *Poster*.

Bärwald, R., Muselmann, C., Stohlmann, K., Thomsen, S., Meisel, A., and **Mergenthaler, P.**, 2010. Characterization of a Hexokinase II-centered multiprotein complex mediating neuroprotection. Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. *Poster*.

Mergenthaler, P., Kahl, A., Kamitz, A., Freyer, D., Megow, D., Priller, J., Dirnagl, U., Andrews, D. W., and Meisel, A., 2010. Interaction of mitochondrial Hexokinase II and Pea-15 protects against cell death, Metabolism in Cancer, Berlin. *Vortrag, aus Abstracts ausgewählt*.

Kahl, A., Freyer, D., Megow, D., van Laak, V., Dirnagl, U., Meisel, A., and **Mergenthaler, P.**, 2009. Hexokinase II - a novel mediator of energy metabolism and cell survival. Program No. 52.17. In Neuroscience Meeting Planner, Neuroscience 2009, Chicago, IL. *Poster*.

Mergenthaler, P., Kahl, A., Freyer, D., Neeb, L., van Laak, V., Stohlmann, K., Thomsen, S., Megow, D., Collins, T. J., Chneiweiss, H., Dirnagl, U., Andrews, D. W., and Meisel, A., 2009. Hexokinase II and Pea-15 act together to promote cellular survival. Cold Spring Harbor Meeting on Cell Death, Cold Spring Harbor, NY. *Vortrag, aus Abstracts ausgewählt*.

Mergenthaler, P., Freyer, D., Neeb, L., Megow, D., Harms, C., Priller, J., Dirnagl, U., and Meisel, A., 2008. Hexokinase II - a glucose dependent mediator of survival, Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. *Poster*.

Mergenthaler, P., Freyer, D., Neeb, L., Muselmann, C., Megow, D., Harms, C., Priller, J., Dirnagl, U., and Meisel, A., 2008. Hexokinase II - a glucose dependent mediator of survival. Keystone Symposia - Cell Death and Cellular Senescence, Breckenridge, CO. *Poster*.

Mergenthaler, P., Freyer, D., Muselmann, C., Dirnagl, U., and Meisel, A., 2006. A novel approach to study neuroprotective genes, Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde. *Poster*.

Mergenthaler, P., Freyer, D., Muselmann, C., Dirnagl, U., and Meisel, A., 2005. A novel approach to study neuroprotective genes, Program No. 356.3. In Neuroscience Meeting Planner, Neuroscience 2005, Washington, D.C. *Vortrag*.

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

Ich, Philipp Mergenthaler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Hexokinase II-vermittelte Hypoxietoleranz und endogene Neuroprotektion* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Philipp Mergenthaler

Berlin, 26. Juli 2010