

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

DISSERTATION

Molekulare Mechanismen der glukoseabhängigen Regulation des neuronalen Zelltodes durch
die Hexokinase II

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Kahl

aus

Beeskow

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Andreas Meisel
 2. Prof. Dr. med. Dirk Hermann
 3. PD Dr. rer. nat. Ulrich Schweizer

Datum der Promotion: 30. November 2012

Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.
– Aristoteles

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
<u>1. EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
1.1. ZEREBRALE DURCHBLUTUNGSSTÖRUNG.....	1
1.2. PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	2
1.3. ENDOGENE NEUROPROTEKTION UND ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG.....	3
1.3.1. MECHANISMEN DER ISCHÄMISCHEN PRÄKONDITIONIERUNG	4
1.4. MITOCHONDRIEN UND DER NEURONALE ZELLTOD	4
1.5. MITOCHONDRIALE PERMEABILITÄT-TRANSITIONSPOREN UND DIE INDUKTION VON ZELLTOD.....	6
1.5.1. ROLLE DES SPANNUNGSABHÄNGIGEN ANIONENKANALS IN DER APOPTOSEREGULATION	7
1.6. APOPTOSEREGULATORISCHE PROTEINE	8
1.6.1. PROTEINE DER BCL-2 FAMILIE	8
1.7. FAMILIE DER HEXOKINASEN.....	9
1.7.1. KATALYTISCHE FUNKTION DER HEXOKINASE	9
1.7.1.1. Gewebs- und zellspezifische Regulation der Hexokinase Isotypen	11
1.7.1.2. Induktion der Hexokinase II Expression durch Präkonditionierung in neuronalen Zellen	11
1.7.1.3. Strukturell-regulatorische Organisation der Hexokinasen.....	12
1.7.1.4. Rolle der Hexokinase in der Apoptoseregulation	13
1.8. ARBEITSHYPOTHESEN UND ARBEITSPROGRAMM	14
<u>2. MATERIAL & METHODEN</u>	<u>17</u>
2.1. MATERIAL	17
2.1.1. GERÄTE	17
2.1.2. SOFTWARE	18
2.1.3. CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, ENZYME, PROTEINE	18
2.1.4. ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	19
2.1.5. ANTIKÖRPER	20
2.1.6. KITS UND GELE.....	20
2.1.7. BAKTERIENSTÄMME	20
2.1.8. VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	20
2.1.9. MEDIEN- UND PUFFERZUSAMMENSETZUNGEN.....	21

2.1.9.1. Zellkulturmedien.....	21
2.1.9.2. Westernblot-Lösungen.....	21
2.1.9.3. Molekularbiologiemedien.....	22
2.1.10. TIERE.....	22
2.2. METHODEN.....	23
2.2.1. ZELLKULTUR.....	23
2.2.1.1. Herstellung von konditioniertem Medium.....	23
2.2.1.2. Präparation von primären Kortexneuronen.....	23
2.2.2. MODELL ZUR DETEKTION DER ZELLSCHÜTZENDEN EFFEKTE DER HEXOKINASE II	24
2.2.2.1. Transfektion der primären Kortexneurone.....	26
2.2.2.2. Sauerstoff- und Glukose-Deprivationsexperimente.....	27
2.2.3. HERSTELLUNG DER HEXOKINASE II MUTANTEN	28
2.2.3.1. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der mitochondrialen Lokalisations- sequenz defizienten HKII Mutante	31
2.2.3.2. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante.....	32
2.2.3.3. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante	33
2.2.3.4. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der HKII-BH-4 Domäne Mutante	34
2.2.3.5. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante ..	35
2.2.3.6. Sequenzierung der Expressionsvektoren	36
2.2.4. WESTERN BLOT.....	37
2.2.4.1. Gewinnung der Zellen für die Western Blot-Analyse	37
2.2.4.2. Proteinbestimmung	37
2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.4.4. Durchführung der Western Blot-Analyse	38
2.2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG	39
<u>3. ERGEBNISSE.....</u>	<u>40</u>
3.1. BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIALEN LOKALISATION DER HKII FÜR DIE VERMITTLUNG VON NEUROPROTEKTION	40
3.2. BEDEUTUNG DER AKT-PHOSPHORYLIERUNG DER HKII FÜR DIE VERMITTLUNG VON NEUROPROTEKTION	41
3.2.1. AKT-PHOSPHORYLIERUNGSDEFIZIENTE HKII MUTANTE VERFÜGT ÜBER KEINE NEURO- PROTEKTIVEN EIGENSCHAFTEN	42
3.2.2. PHOSPHOMIMETISCHE HKII MUTANTE VERFÜGT ÜBER NEUROPROTEKTIVE EIGENSCHAFTEN ...	44
3.3. BEDEUTUNG DER PUTATIVEN HKII-BH-4 DOMÄNE FÜR DIE VERMITTLUNG DIE NEUROPROTEKTION	45

3.4. BEDEUTUNG DER KATALYTISCH-INAKTIVEN HKII DOPPELMUTANTE FÜR DIE VERMITTLUNG DER NEUROPROTEKTION	48
3.5. PROTEINNACHWEIS DES HKII EXPRESSIONSVEKTORS IM WESTERN BLOT.....	50
3.6. PROTEINNACHWEIS DER HKII-MUTANTEN IM WESTERN BLOT	51
4. DISKUSSION.....	53
4.1. HEXOKINASE UND DER ANTIAPOPTOTISCHE EFFEKT DER GLYKOLYSE	54
4.2. APOPTOSE-REGULATORISCHE EIGENSCHAFTEN DER MITOCHONDRIALEN HK	56
4.2.1. INTERAKTION MITOCHONDRIALER HEXOKINASE MIT PEA-15 UND VDAC	59
4.3. HEXOKINASEREGULATION DURCH AKT-KINASE	62
4.4. MITOCHONDRIALE HEXOKINASEN ALS BINDEGLIED ZWISCHEN ZELLMETABOLISMUS UND APOPTOSEREGULATION.....	64
4.5. BEDEUTUNG EINER PUTATIVEN BH-4 DOMÄNE DER HEXOKINASE II	66
4.6. AUSBLICK	68
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
LITERATURVERZEICHNIS.....	VII
DANKSAGUNG.....	XVII
CURRICULUM VITAE	XIX
PUBLIKATIONSLISTE	XX
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XXI

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Abweichungsanalyse)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2 Name für ein an der Apoptoseregulation beteiligtes Protein und Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie
Bcl-x _L	antiapoptotischer Vertreter der Bcl-2 Familie
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BSS	<i>balanced salt solution</i> (ausgewogene Salzlösung)
DIV	<i>day in vitro</i> (Tag in Kultur)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
c-DNA	komplementäre DNA
DFO	Deferoxamin
E. coli	Escheria coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alteres</i> (lat.: und andere)
FCS/FKS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
GD	<i>glucose deprivation</i> (Glukose-Deprivation)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HKI	Hexokinase I
HKII	Hexokinase II
Kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani

mRNA	„messenger“ (Boten-) Ribonukleinsäure
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran)
MPTP	mitochondriale Permeabilität-Transitions-pore: mitochondrialer Multiproteinkomplex, der an der Initiierung von Apoptose beteiligt ist
mtHK	mitochondriale Hexokinase
NBM-A	Neurobasal-A-Medium
NBM	Neurobasalmedium
OD	<i>oxygen deprivation</i> (Sauerstoff-Deprivation)
OGD	<i>oxygen glucose deprivation</i> (Sauerstoff-/Glukose-Deprivation)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
p.c.	<i>post conceptionem</i> (nach der Empfängnis)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffradikale)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i> (spannungsabhängiger Anionenkanal in der äußeren Mitochondrienmembran)
<i>well</i>	Zellkulturplattenvertiefung
WT	Wildtyp bzw. Plasmid ohne Mutation
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Mitochondrial vermittelter Apoptose-Signalweg.....	6
Abbildung 2: Putative molekulare Architektur der mitochondrialen Permeabilität-Transitions-pore	7
Abbildung 3: Glukosemetabolismus	10
Abbildung 4: m-RNA Expressionsraten der Hexokinase I und Hexokinase II.....	12
Abbildung 5: Putativer neuroprotektiver Mechanismus der Hypothese 1	15
Abbildung 6: Putativer neuroprotektiver Mechanismus der Hypothese 2	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Hypothese 3	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hypothese 4.....	16
Abbildung 9: Transfektionsstrategie zur Überexpression der Hexokinase II Varianten.....	26
Abbildung 10: Vektorkarte und Multiple Cloning Site des Plasmids pCAG-MCSn1	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung der ortsgebundenen Mutagenese	29
Abbildung 12: Konstruktion der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante ...	31
Abbildung 13: Übersicht der Herstellung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante	32
Abbildung 14: Übersicht der Herstellung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante	33
Abbildung 15: Schematische Darstellung der HKII-BH-4 Domäne Mutante.	34
Abbildung 16: Schematische Darstellung der katalytisch-inaktiven HKII Mutante.....	35
Abbildung 17: Box-Plot der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante	41
Abbildung 18: Darstellung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante	43
Abbildung 20: Darstellung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante.....	44
Abbildung 21: Box-Plot der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante	45
Abbildung 22: Darstellung der HKII-BH-4 Domäne defiziente Mutante.....	46
Abbildung 23: Box-Plot der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante	47
Abbildung 24: Box-Plot der OD-Experimente der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante	49
Abbildung 25: Box-Plot der GD-Experimente der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante	50
Abbildung 26: HKII Western Blot-Analysen aus Skelettmuskel und Kortexneuronen der Ratte.	51
Abbildung 27: Hexokinase II Western Blot aus primären Kortexneuronen der Ratte.....	52

1. EINLEITUNG

1.1. Zerebrale Durchblutungsstörung

Jedes Jahr erleiden in Deutschland etwa 196 000 Menschen erstmals und circa 60 000 Menschen wiederholt einen Schlaganfall (Heuschmann *et al.*, 2010). Statistisch gesehen stellt der Hirninfarkt bei den Frauen die vierthäufigste und bei den Männern die fünfthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik dar. Rund 30% der Schlaganfallpatienten versterben innerhalb eines Jahres nach dem Ereignis oder sind von bleibenden neurologischen Funktionseinschränkungen betroffen (Diederichs *et al.*, 2011). In Anbetracht der Zahlen bildet der Schlaganfall einen der häufigsten Gründe für vorzeitige Invalidität im Erwachsenenalter und stellt gemeinhin die lebensbedrohliche neurologische Erkrankung dar (Mumenthaler und Mattle, 2008). Insgesamt sind 78,7% aller zerebralen Durchblutungsstörungen ischämisch bedingt, während 12,6% auf eine intrazerebrale Blutung und 2,7% auf eine Subarachnoidalblutung zurückzuführen sind. Weitere 6,0% werden als nicht näher bezeichnete Insulte klassifiziert (Günster *et al.*, 2011).

Bei einem ischämischen Schlaganfall handelt es sich definitionsgemäß um ein globales oder fokales Sauerstoffdefizit des Gehirns hervorgerufen durch eine Restriktion der zerebralen Blutzufuhr, welche sowohl durch eine Thrombose, eine Embolie als auch durch eine systemische Hypoperfusion bedingt sein kann (Doyle *et al.*, 2008). Derzeit stellt die systemische Thrombolyse mit rtPA (*recombinant tissue plasminogen activator*) die einzige durch Studien belegte medikamentöse und arzneimittelrechtlich zugelassene Therapieoption des ischämisch bedingten Insults dar (DGN Leitlinien 2008). Allerdings können aufgrund der Latenz zwischen dem Ereignis und einer neurologischen Vorstellung im Mittel nur 7-10% der Schlaganfallpatienten einer Lysetherapie zugeführt werden (Heuschmann *et al.*, 2010). Im Dezember 2011 wurde das Zeitfenster der rtPA-Rekanalisationstherapie von 3 auf 4,5 Stunden erweitert, jedoch korreliert ein verzögerter Beginn mit einer Abnahme der Wirksamkeit der Thrombolysetherapie und der Zunahme des Risikos einer sekundären Diapedeseblutung (Hacke *et al.*, 2008; Wahlgren *et al.*, 2008). Aufgrund der Häufigkeit der Erkrankung und den damit verbundenen sozialmedizinischen Folgen wird derzeit nach geeigneten Therapieansätzen zur Optimierung der Versorgung von Schlaganfallpatienten gesucht, wobei die suffiziente Wiederherstellung des zerebralen Blutflusses und die Minimierung des Infarktolumens im zentralen Fokus stehen. Die medizinische Forschung konzentriert sich insbesondere auf das Verständnis von ablaufenden pathophysiologischen Prozessen und der Charakterisierung von endogenen Schutzmechanismen im Gehirn (Iadecola und Anrather, 2011).

1.2. Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Obwohl das menschliche Gehirn nur circa 2% der Körpermasse umfasst, beansprucht es 20% der totalen Sauerstoffversorgung des Organismus (Edvinsson und Krause, 2002). Dieser vergleichsweise hohe Sauerstoffbedarf wird vom Organ benötigt, um über oxidative Phosphorylierung den Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren und mit dessen Hilfe Ionengradienten aufrechtzuerhalten, beziehungsweise im Bedarfsfall wiederherstellen zu können. Es wird vermutet, dass die an der Plasmamembran von Neuronen lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase etwa 70% der bereitgestellten Energie innerhalb des Gehirns verbraucht (Edvinsson und Krause, 2002). Die Aufgabe dieser speziellen Ionenpumpe ist es, sowohl die hohe intrazelluläre Kalium-Konzentration als auch die niedrige intrazelluläre Natrium-Konzentration, welche für die Initiierung von Aktionspotentialen notwendig sind, sicherzustellen. Durch Inhibition der mitochondrialen ATP-Synthese führt eine Ischämie innerhalb von zwei Minuten zu einem zerebralen ATP-Defizit mit nachfolgender Membrandepolarisation und Ionenfreisetzung (Caplan, 2000).

Innerhalb des Infarktkerns fällt der Blutfluss unter 20% der normalen Flussrate, sodass die dort lokalisierten Neurone aufgrund des akut einsetzenden und stark reduzierten Blutflusses mit nachfolgendem ATP-Defizit innerhalb von wenigen Minuten in den nekrotischen Zelltod übergehen (Sims und Muyderman, 2010). Die massive funktionelle und strukturelle Zellschädigung macht es den Zellen unmöglich ihre verlorene Homöostase wiederherzustellen oder notwendige Reparaturmechanismen zu aktivieren.

Zwischen dem irreversibel geschädigtem Infarktkern und dem normalen Hirnparenchym kommt es charakteristischerweise zur Ausbildung einer ischämischen Periinfarktzone, der Penumbra. In diesem Gebiet ist der Blutfluss und Energiemetabolismus weniger stark eingeschränkt, da die Substratversorgung durch bereits vorhandene Gefäßkollaterale partiell kompensiert werden kann (Sims und Muyderman, 2010; Dirnagl *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum nekrotisch bedingten Zelluntergang im Infarktkern, sind im Gebiet der Penumbra zumeist pro- und antiapoptotische Signalkaskaden aktiv. Durch schnelle Einleitung einer revaskularisierenden Therapie ist man hier in der Lage, den Zelluntergang zu limitieren und das Infarktvolumen zu reduzieren (Sims und Muyderman, 2010). Unterbleibt jedoch die therapeutische Intervention oder die spontane Thrombolyse geht auch dieser Teil des Hirnparenchyms von einer reversiblen funktionellen Schädigung in eine irreversible strukturelle Schädigung über (Dirnagl *et al.*, 1999).

1.3. Endogene Neuroprotektion und ischämische Präkonditionierung

Im Verlauf der zerebralen Ischämie kommt es neben der Aktivierung von destruktiven im Zelltod mündenden Signalkaskaden auch zu einer Induktion von zelleigenen Schutz- und Reparaturmechanismen. So führt ein potentiell schädigender Stimulus, welcher kurzzeitig nahe aber unterhalb der Schadensschwelle appliziert wurde, zur Aktivierung von endogenen Schutzmechanismen und nachfolgend zur Ausbildung einer endogenen Toleranz (Janoff, 1964). Dieser körpereigene Schutzmechanismus wird als Präkonditionierung bezeichnet und wurde in einer Vielzahl von Organen wie beispielsweise dem Gehirn beobachtet (Kitagawa *et al.*, 1990). Hier bezeichnet es kurze nicht letale ischämische Intervalle, die zur Entwicklung von Toleranz gegenüber folgenden eigentlich letalen Ischämien führt. Die erworbene Toleranz bewirkt eine fundamentale Verschiebung der endogenen Schadensantwort von Zelltod zu Zellüberleben (Dirnagl und Meisel, 2008).

Im menschlichen Gehirn kann das Auftreten einer „transienten ischämischen Attacke“ (TIA) die Ausbildung einer endogenen Toleranz mit einem anschließenden neuronalen Schutz bewirken (Dirnagl *et al.*, 2003; Weih *et al.*, 1999). Klinisch definiert wird die TIA als eine durch Ischämie hervorgerufene funktionell neurologische Störung ohne Existenz eines strukturell-morphologischen Korrelats. Die Symptomatik der TIA ist innerhalb von 24 Stunden vollständig reversibel und kann über die Aktivierung von endogenen neuroprotektiven Mechanismen einen positiven Einfluss auf das klinisch-neurologische Bild bei Auftreten eines nachfolgenden ischämisch bedingten Schlaganfalls haben (Dirnagl *et al.*, 2003; Weih *et al.*, 1999).

Weih *et al.* präsentierten im Jahr 1999 klinische Daten über neuroprotektive Effekte von transienten ischämischen Attacken. In der Studie wurden 148 Schlaganfallpatienten mit und ohne vorangegangene TIA nach dem Schweregrad der neurologischen Symptomatik bei stationärer Aufnahme und ihrem klinisch-neurologischem Ergebnis beurteilt. Die Patienten mit anamnestisch eruiertes TIA im gleichen vaskulären Territorium zeigten einen leichteren klinischen Verlauf kombiniert mit besserer Genesung nach einem ischämischen Insult (Weih *et al.*, 1999). Dies bedeutet, dass die aufgetretenen neurologischen Defizite geringer ausgeprägt und die Zahl an dauerhaften klinisch relevanten Spätfolgen kleiner waren. Diese Beobachtung konnte auch durch Studien von Moncayo *et al.*, 2000; Sitzer *et al.*, 2004 und Wegener *et al.*, 2004 bestätigt werden.

1.3.1. Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung

Im Rahmen der Präkonditionierung sind zwei zeitlich voneinander abzugrenzende Formen bekannt. Zum einen die klassische Präkonditionierung (schnelle Präkonditionierung), welche innerhalb von Minuten nach dem subletalen Stimulus nachweisbar ist und zum anderen eine zeitlich verzögert einsetzende Form, die erst nach einigen Stunden bis Tagen auftritt und die Synthese von Proteinen benötigt (Kitagawa *et al.*, 1990).

Die Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung können aus Gründen der Didaktik in drei verschiedene Module aufgeteilt werden, wobei die einzelnen Komponenten in einem definierten, zeitlich versetzten Profil ablaufen.

Das erste Modul umfasst die Signal-/Sensor-Komponente, wodurch verschiedene die Zelle bedrohende Stimuli von zelleigenen Sensoren detektiert und in ein intrazelluläres Signal konvertiert werden. Der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF-1) und eine Vielzahl von sauerstoffsensitiven Ionenkanälen kontrollieren die zelluläre Hypoxieantwort nicht nur auf spezialisierten Neuronen, sondern auch auf anderen Zelltypen (Semenza, 2007; Kemp und Peers, 2007).

Ist die Bedrohung von der Zelle detektiert, wird diese im Rahmen des Transduktionsmoduls in eine zelluläre Antwort übersetzt. An diesem Prozess sind eine Reihe von Kinasen, wie beispielsweise die Janus-Kinasen (JAKs), p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) (Nishimura *et al.*, 2003) und die Akt-Kinase (Akt) (Ruscher *et al.*, 2002) beteiligt.

Der dritte Baustein der ischämischen Präkonditionierung ist das Effektor-Modul, welches über die Induktion von Genen die eigentliche Protektion vermittelt. Zu den bekanntesten Mediatoren der endogenen Toleranz zählen: freie Sauerstoffradikale (ROS), Superoxid-Dismutase (SOD) (Danielisova *et al.*, 2005), Erythropoetin (EPO) (Ruscher *et al.*, 2002), Stickstoffoxid (NO), Hexokinase (HK) (Pastorino *et al.*, 2003) und Vertreter der Bcl-2 Proteinfamilie (Liu *et al.*, 2002).

1.4. Mitochondrien und der neuronale Zelltod

Bei der Entwicklung von ischämisch bedingter Gewebsschädigung und damit verbundenem Zelltod kommt den Mitochondrien eine zentrale Bedeutung zu. Unter hypoxischen Bedingungen ist die mitochondriale Funktion als Hauptlieferant des Energieträgers ATP beeinträchtigt, was über ein wachsendes Energiedefizit zur Schädigung der Zellhomöostase und Funktion führt. Außerdem besitzen die Mitochondrien eine Schlüsselposition in diversen im Zelltod mündenden Signalwegen (Sims *et al.*, 2002).

In Säugetieren existieren zwei alternative Signalkaskaden, um den programmierten Zelltod zu induzieren: der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg (*extrinsic pathway*) und der mitochondrial-vermittelte Apoptoseweg (*intrinsic pathway*). Beide Signalwege benutzen spezifische intrazelluläre Caspasen (*cysteine aspartyl-specific proteases*), um die charakteristischen Veränderungen des programmierten Zelltodes zu bewirken, wobei die Signaltransduktion an unterschiedlichen Stellen verstärkt oder inhibiert werden kann.

Da in der vorliegenden Arbeit die Funktion der Mitochondrien im Rahmen der Apoptoseantwort im zentralen Fokus der Betrachtung steht, soll im folgenden insbesondere auf den mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg eingegangen werden. Bei dieser Form des programmierten Zelltodes führt eine Erhöhung der äußeren mitochondrialen Membranpermeabilität zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem intermembranären Raum in das Zytosol. Zu diesen apoptoseeinleitenden Molekülen gehören Cytochrom C, Smac/Diablo, HtrA2 (Omi), AIF (*apoptosis-inducing factor*) und DNaseG (Green *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Die zytosolische Freisetzung von Cytochrom C resultiert aus einem ionischen Ungleichgewicht mit einer nachfolgenden osmotisch bedingten mitochondrialen Schwellung durch Formation von in der Mitochondrienmembran liegenden Kanälen, sogenannten mitochondrialen Permeabilität-Transitions-poren (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*, MPTP) (Leung und Halestrap, 2008). Der Prozess der mitochondrialen Außenmembranpermeabilisierung wird als *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP bezeichnet (Youle und Strasser, 2008). In Anwesenheit von ATP bindet das durch MOMP freigesetzte Cytochrom C im Zytosol an Apaf-1 (*apoptotic protease activation factor-1*), veranlasst seine Oligomerisation und führt zur Rekrutierung und Autoaktivierung von Procaspase-9. Der entstandene Proteinkomplex aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet und sorgt mit der anschließenden Aktivierung der Caspase-3 für den finalen Kaskadenpunkt des intrinsischen Wegs (Desagher *et al.*, 2000).

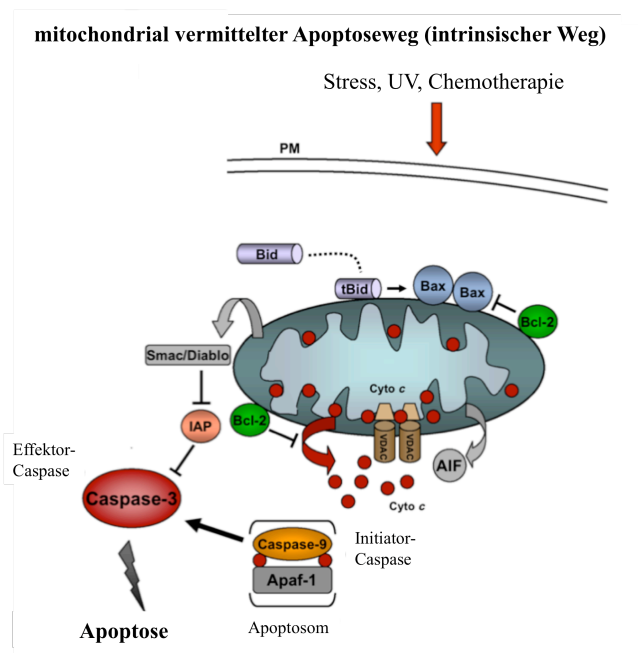


Abbildung 1: Mitochondrial vermittelter Apoptose-Signalweg. Multiple Stimuli wie beispielsweise UV-Licht, DNA-Schäden, Oxidantien, Chemotherapeutika oder ein vermehrter Kalzium-Einstrom induzieren eine Zunahme der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt zu einem Ausstrom von apoptogenen Faktoren wie Cytochrom C, AIF, Smac/Diablo aus dem Mitochondrium ins Zytosol. Das freigesetzte Cytochrom C bindet an Apaf-1, was seine Oligomerisierung und die Rekrutierung und Autoaktivierung von Pro-Caspase 9 verursacht. Der entstandene Proteinkomplex aus Cytochrom C, Apaf-1 und Pro-Caspase 9 wird als Apoptosom bezeichnet und sorgt für die Aktivierung der Caspase 3. Diese Effektorcaspase vermittelt im finalen Schritt des intrinsischen Wegs den programmierten Zelltod. Abbildung modifiziert aus Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010.

1.5. Mitochondriale Permeabilität-Transitionsporen und die Induktion von Zelltod

Eine dramatische Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt klassischerweise zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und mündet im Zelltod. Es wird vermutet, dass verschiedene proapoptotische Stimuli maßgeblich zur Formation des MPTP-Kanals in der mitochondrialen Membran beitragen und über eine gezielte Modulation des MPTP für die Induzierung von Zelluntergangsmechanismen verantwortlich sind (Tsujiimoto und Shimizu, 2007; Shoshan-Barmatz und Gincel, 2003; Halestrap *et al.*, 2000).

In der Literatur wird der MPTP mehrheitlich als ein dynamischer Multiproteinkomplex, bestehend aus dem spannungsabhängigen Anionkanal (*voltage dependent anion channel*, VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondrial membrane*, OMM), dem Adenin-Nukleotid Translokator (ANT) in der inneren Mitochondrienmembran (IMM), Cyclophilin D (Cyp D) als regulatorisches Matrixprotein und weiteren möglichen Molekül(en), beschrieben

(Sims und Muyderman, 2010; Leung und Halestrap, 2008; Tsujimoto und Shimizu, 2007). Die genaue Zusammensetzung des Multiproteinkomplexes ist derzeit Gegenstand vieler Diskussionen, denn bisher konnte nur Cyclophilin D als eine obligate Komponente des MPTP bestätigt werden (Halestrap *et al.*, 2007). Zudem sind die zugrunde liegenden Mechanismen für die MPTP-Formation und Modulierung nicht vollständig verstanden (Sims und Muyderman, 2010; Leung und Halestrap, 2008).

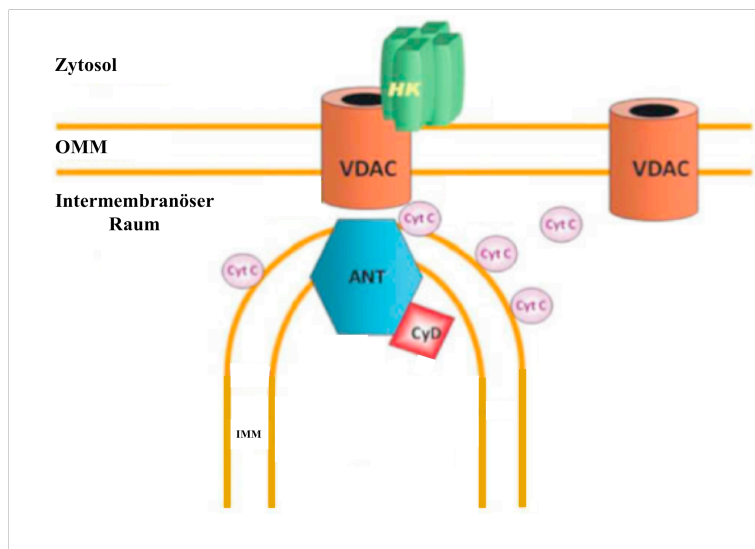


Abbildung 2: Putative molekulare Architektur der mitochondrialen Permeabilität-Transitionspore.

Darstellung der putativen Strukturkomponenten der mitochondrialen Permeabilität-Transitionspore (MPTP). Der dynamische Multiproteinkomplex besteht aus dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran (OMM), dem Adenin-Nukleotid Translokator (ANT) in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) und Cyclophilin D (CyD) als regulatorisches Matrixprotein. Angedeutet ist auch eine Assoziation der mitochondrialen Hexokinase (HK) mit VDAC, was über noch nicht eindeutig geklärte Mechanismen die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C verhindern könnte. Abbildung modifiziert aus Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010.

1.5.1. Rolle des spannungsabhängigen Anionenkanals in der Apoptoseregulation

Die VDAC Proteinfamilie wurde erstmals 1976 beschrieben und beinhaltet drei Isoformen VDAC1-VDAC3, welche alle in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.

Der spannungsabhängige Anionenkanal, VDAC1 stellt nicht nur eine mögliche Strukturkomponente des MPTP dar, sondern trägt über eine Oligomerbildung auch zur mitochondrialen Cytochrom C Freisetzung mit nachfolgender Induktion von Apoptose bei (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2008). Es liegt die Vermutung nahe, dass die VDAC1-Aktivität und die Apoptoseregulation über den MPTP-Proteinkomplex und MOMP eng miteinander verbunden sind.

Als wichtiges Schlüsselprotein in mitochondrial vermitteltem Zelltod ist VDAC1 maßgeblich an der Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem intermembranösen Raum beteiligt und

fungiert als wichtiger Interaktionspartner von zelltodregulatorischen Proteinen wie Bcl-2 und der Hexokinase (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Halestrap *et al.*, 2002). Es gibt eindeutige Hinweise, dass die Bindung von antiapoptotischem Bcl-2 an VDAC1 zu einer direkten Unterdrückung der VDAC1 Überexpression mit nachfolgender Suppression der Apoptose führt (Tsujimoto und Shimizu, 2000).

Analog wird auch eine über VDAC1-vermittelte mitochondriale Bindung der Hexokinase beschrieben, welche die Aktivität des MPTP inhibiert und darüber zur Reduzierung des Zelltodes in Kardiomyozyten beiträgt (Zuurbier *et al.*, 2005).

1.6. Apoptoseregulatorische Proteine

1.6.1. Proteine der Bcl-2 Familie

Die Familie der B-cell Lymphoma-2 Proteine (Bcl-2) ist durch vielfältige Mechanismen an der Apoptoseregulation beteiligt (Youle und Strasser, 2008). Verschiedene Vertreter der Bcl-2 Proteine besitzen die Fähigkeit, die Aktivität des an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten spannungsabhängigen Anionenkanals (VDAC) suffizient zu modulieren. (Shimizu *et al.*, 2000). Dazu umfasst die Bcl-2 Familie pro- und antiapoptotische Vertreter mit charakteristischen Strukturhomologien, welche klassischerweise in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. So inhibieren beispielsweise antiapoptotische Vertreter wie Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w, die Öffnung des MPTP-Kanals durch Bildung von Heterodimeren mit Bax, Bak oder BH-3-only Proteinen. Die zweite Gruppe mit den proapoptotischen Vertretern Bax und Bak fördert über nicht vollständig geklärte Mechanismen, die MPTP-Kanalbildung durch Homooligomerisation und stimuliert darüber die mitochondriale Cytochrom C Ausschüttung. Alle anderen proapoptotischen Bcl-2 Proteine, wie Bad, Bim und Bid, gehören in die divergierende Gruppe der BH-3-only Proteine und fungieren als Stresssensoren durch Induzierung von Apoptose und Antagonisierung der Bcl-2/Bcl-x_L Antwort (Youle und Strasser, 2008; Kroemer und Reed, 2000). Daran anlehnend aktivieren und unterstützen BH3-only Proteine direkt die Bax- und Bak-Oligomerisation an der äußeren Mitochondrienmembran mit einer damit verbundenen Apoptoseinduktion (Robey und Hay, 2006).

Die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine weisen vier strukturell hochkonservierte Aminosäuresequenzen, sogenannte BH Domänen (BH-1 bis BH-4) auf (Adams und Cory, 1998). Mutationen und Strukturanalysen innerhalb der BH Domänen von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen haben

ergeben, dass die BH-1 und BH-2 Domäne und wahrscheinlich auch die BH-3 Domäne für die Bildung von Heterodimeren mit proapoptotischen Bcl-2 Proteinvertretern verantwortlich sind und so gezielt deren proapoptotische Aktivität unterdrücken (Sugioka *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den BH-1 bis BH-3 Domänen stellt die BH-4 Domäne eine – mit Ausnahme der proapoptotischen Vertreter Bcl-x_s und Bcl-x_{AK} – nur innerhalb der antiapoptotischen Bcl-2 Familie vorkommende Domäne dar (Hossini und Eberle, 2008). Die Mutation der N-terminal homologen BH-4 Domäne in Bcl-2 und Bcl-x_L führte in verschiedenen experimentellen Ansätzen zur Aufhebung der zellschützenden Eigenschaft dieser Proteine (Pastorino und Hoek, 2003; Shimizu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1998). Eine Studie mit VDAC Liposomen zeigte, dass Bcl-x_L im Gegensatz zu Bcl-x_L ohne BH-4 Domäne in der Lage war, die VDAC Aktivität zu unterdrücken. Die BH-4 Oligopeptide von Bcl-2 und Bcl-x_L besaßen die Fähigkeit, anders als in der BH-4 Domäne mutierte Peptide, die VDAC Aktivität an Liposomen auch in der Gegenwart von Bax entgegenzuwirken und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in isolierten Mitochondrien zu inhibieren (Shimizu *et al.*, 2000). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die BH-4 Domäne, fusioniert an die Protein Transduktionsdomäne vom HI Virus (*human deficiency virus*, HIV) (TAT-BH-4) vor Apoptose schützt (Ju *et al.*, 2007; Sugioka *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2000).

Diese experimentellen Daten beweisen, dass allein die BH-4 Domäne von Bcl-2/Bcl-x_L essentiell und suffizient die VDAC-Aktivität blockiert, vor apoptotischen Membranpotentialveränderungen schützt und maßgeblich apoptotischen Zelltod unterdrückt (Ju *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2000).

1.7. Familie der Hexokinasen

1.7.1. Katalytische Funktion der Hexokinase

Die Hexokinase (HK) ist klassischerweise als Schlüsselenzym aus dem Glukosemetabolismus bekannt, wo sie ATP-abhängig die erste obligate Reaktion der Glykolyse katalysiert (Wilson, 1995). Durch Phosphorylierung von intrazellulärer Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) ist die Hexokinase essentiell für die Aufrechterhaltung des Glukosekonzentrationsgradienten. Die phosphorylierte Hexose ist nun unfähig die lipophile Zellmembran zu passieren und wird dem weiteren Energiemetabolismus der Zelle zugeführt (Robey und Hay, 2006; Wilson, 2003). Nachfolgend kann das entstandene G-6-P in Form der Energiereserve Glykogen intrazellulär gespeichert, der weiteren Glykolyse zur Energiegewinnung zugeführt oder zur Gewinnung von Reduk-

tionsäquivalenten (NADPH/H^+) und Nukleotiden (ATP, GTP) im Pentose-Phosphatweg verstoffwechselt werden (Wilson, 2003).

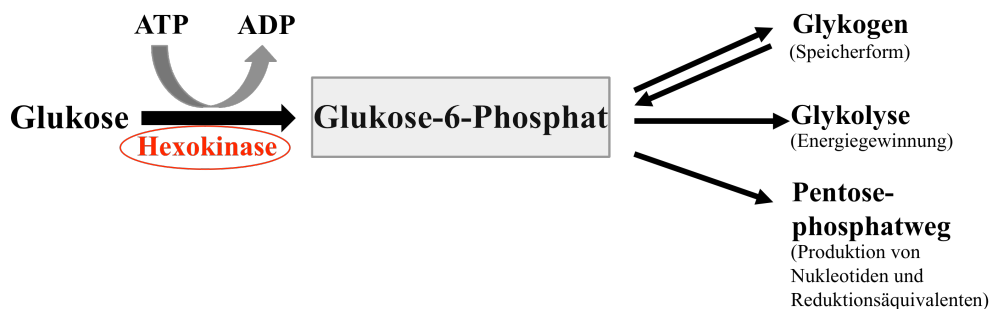


Abbildung 3: Glukosemetabolismus. Die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch die Hexokinase stellt die gemeinsame erste Reaktion in den Stoffwechselwegen des Glukosemetabolismus dar. Abbildung modifiziert aus Wilson, 2003.

In den Geweben von Säugetieren findet sich eine Familie von vier Isoenzymen der Hexokinase (HKI-IV) mit unterschiedlichen katalytischen, regulatorischen und expressionsspezifischen Eigenschaften (Robey und Hay, 2006).

Die HKI-III haben eine hohe Affinität zu dem Substrat Glukose (K_M -Wert: 0.02-0.03 mM) und können durch das Produkt G-6-P mittels eines potenten negativen Rückkopplungsmechanismus inhibiert werden (Pastorino und Hoek, 2003). Dazu besitzen die HKI-III eine durch Glukose, Glukagon, Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren aktivierbare Promoterregion, welche eine transkriptionelle Regulation der HK Expression ermöglicht. So ist die HK in der Lage ihre Proteinkonzentration den unterschiedlichen intrazellulären Stoffwechselbedürfnissen anzupassen.

Während in der HKI nur der C-Terminus eine katalytische Aktivität besitzt und der N-Terminus eine regulatorische Funktion übernimmt, verfügt die HKII über zwei intrinsisch katalytisch aktive Termini (Robey und Hay, 2006). Zusätzlich besteht bei der HKII eine enge funktionelle Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Hälfte des Proteins. So bewirkt eine Glukosebindung am N-Terminus des glykolytischen Enzyms eine Herunterregulierung der katalytischen Aktivität im C-Terminus (Ardehali *et al.*, 1999).

Die Isoenzyme I-III der Hexokinase Familie umfassen eine Proteingröße von 100 kDa und besitzen zwei strukturell homologe 50 kDa Hälften, welche durch vermutliche Genduplikation mit anschließender Tandemligation entstanden sind (Sun *et al.*, 2008; Robey und Hay, 2006; Tsai und Wilson, 1995).

Die Isoform IV der Hexokinase Familie wird als Glukokinase (HKIV) bezeichnet. Im Gegensatz zu den Hexokinasen, welche definitionsgemäß neben Glukose auch andere eng verwandte Hexosen wie Mannose, 2-Desoxyglukose, Glukosamin und Fruktose an ihrer sechsten Carboxylgruppe phosphorylieren, katalysiert die Glukokinase diese Reaktion nur mit dem Substrat Glukose. Das Isoenzym IV ist 50 kDa groß und unterliegt bei einer geringeren Affinität zu Glukose (K_M -Wert: 5-8 mM) nicht der G-6-P-Rückkopplung (Pastorino und Hoek, 2003).

1.7.1.1. Gewebs- und zellspezifische Regulation der Hexokinase Isotypen

Alle Hexokinasen besitzen unter homöostatischen Bedingungen charakteristische Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben. Die konstitutiv in allen Geweben vorkommende HKI stellt zudem die Hauptisoform im Gehirn dar. Hingegen ist die HKII die prädominante Isoform in insulinsensitiven Geweben wie Herz- und Skelettmuskel, Fettgewebe und den Mesangiumzellen der Niere (Robey und Hay, 2006). Die HKIII unterliegt einer ubiquitär niedrigen Expression, wogegen die Glukokinase isoliert in der Leber und in den β -Zellen des Pankreas vorkommt (Pastorino und Hoek, 2003).

Im Unterschied zu gesunden Geweben ist die Glykolyserate in Tumoren auch unter physiologischen Sauerstoffbedingungen stark erhöht. Diese fundamentale Änderung der Stoffwechselfunktion in Tumorzellen wird unter dem Begriff Warburg-Effekt zusammengefasst (Pedersen, 2008; Pastorino und Hoek, 2003). In schnell wachsenden und schlecht differenzierten Tumoren ist insbesondere die Expressionsrate der HKII signifikant erhöht, was für eine wichtige Bedeutung des überexprimierten Proteins in dysreguliertem Wachstum spricht (Sun *et al.*, 2008; Pastorino *et al.*, 2002). In den veränderten Zellen ist bis zu 70% der HKII über Interaktion mit VDAC am Mitochondrium gebunden, wodurch das Enzym einen direkten Zugriff auf mitochondrial generiertes ATP hat. Unter diesen Bedingungen sind Tumore in der Lage eine gesteigerte aerobe Glykolyserate zu etablieren und über einen potenten Schutz gegenüber apoptotischen Zelltod, uneingeschränkt zu wachsen (Pastorino und Hoek, 2003).

1.7.1.2. Induktion der Hexokinase II Expression durch Präkonditionierung in neuronalen Zellen

In einer früheren Dissertation (Neeb, 2006) in unserer Arbeitsgruppe wurde die Induktion von Hypoxie induzierbarem Faktor 1 (HIF-1) Zielgenen durch Präkonditionierung mittels Genex-

pressionsanalyse im Gehirn untersucht. Bei HIF-1 handelt es sich um einen globalen Regulator der intrazellulären Sauerstoffhomöostase, welcher eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der zellulären Regulation auf einen präkonditionierenden Stimulus spielt (Semenza, 2011; Semenza, 2007; Semenza, 2000).

Wie bereits beschrieben, stellt die HKI die prädominante Isoform im Gehirn dar, während die HKII nur in geringem Umfang in diesem Gewebe exprimiert wird. Bei Behandlung der primären Kortexneurone mit dem Eisenchelator und HIF-1 Induzierer Deferoxamin (DFO) konnte eine isolierte Erhöhung der HKII m-RNA Expression beobachtet werden, während die HKI m-RNA nicht induziert wurde (Abb. 5).

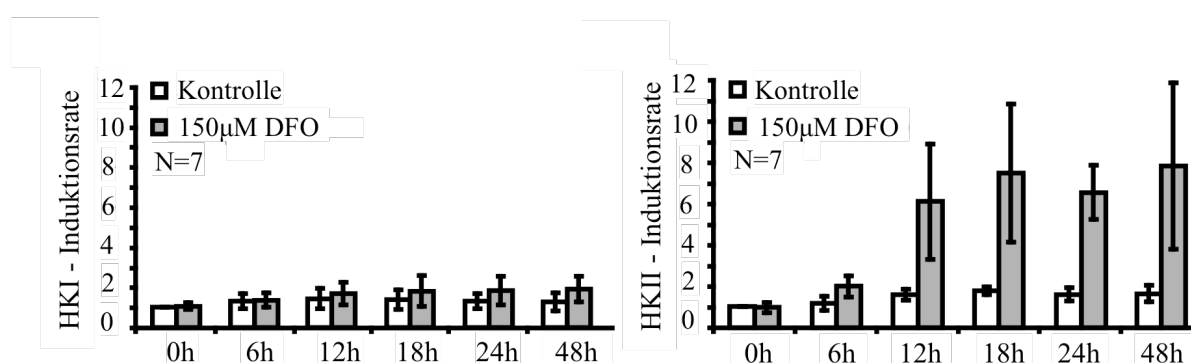


Abbildung 4: m-RNA Expressionsraten der Hexokinase I und Hexokinase II.

Endogene Hexokinase I (HKI) und Hexokinase (HKII) m-RNA Induktion nach Behandlung primärer Kortexneuronen mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFO). Abbildung modifiziert aus Mergenthaler *et al.*, 2012.

Folglich unterliegt die HKII Expression in neuronalen Zellen einer HIF-1-abhängigen Regulation, welche vermutlich durch die spezifische HIF-1 Bindungsstelle am HKII Promoter vermittelt wird (Pastorino und Hoek, 2003).

1.7.1.3. Strukturell-regulatorische Organisation der Hexokinasen

Während die HKIII vorwiegend perinukleär und die HKIV rein zytosolisch lokalisiert sind, haben nur die HKI-II die Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen einen Kompartimentwechsel zu vollziehen und sich zwischen Zytosol und Mitochondrium zu bewegen (Mathupala *et al.*, 2009). Dazu besitzen die N-Termini der HKI und HKII eine hochkonservierte 21 Aminosäuren lange mitochondriale Lokalisationssequenz, welche imstande ist eine hydrophobe α -Helix zu formen und darüber eine Bindung an die Mitochondrienmembran zu vermitteln (Sun *et al.*, 2008). Der spannungsabhängige Anionenkanal ist ein bekannter Bindungspartner der HKI und HKII an der

äußeren Mitochondrienmembran, wobei insbesondere eine Interaktion zwischen der HK und der Isoform VDAC1 beschrieben wird (Pastorino und Hoek, 2008; Robey und Hay, 2006).

Der Zellkompartimentwechsel der HKI und HKII unterliegt einer dynamischen Regulation und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu diesen regulierenden Parametern gehören die physiologische G-6-P-Konzentration, zweiwertige Kationen, ATP, anorganisches Phosphat und der intrazelluläre pH-Wert (Wilson, 2003; Wilson, 1978).

Im Hinblick auf die mitochondriale Assoziation der HKI und HKII kommt auch der Akt-Kinase/Proteinkinase B (Akt) eine wichtige regulatorische Rolle zu. Bei Akt handelt es sich um eine hochkonservierte Proteinkinase, welche eine Vielzahl zellulärer Funktionen beeinflussen und gezielt modulieren kann. So unterstützt sie beispielsweise glukoseabhängig die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität und inhibiert die auf einen apoptotischen Stimulus folgende Cytochrom C Ausschüttung. Bisher besteht Unklarheit über die molekularen Mechanismen des Akt-vermittelten Zellschutzes (Robey und Hay, 2006). Interessanterweise wurde in der Aminosäuresequenz der HKI und HKII ein charakteristisches Akt-Phosphorylierungsmotif beschrieben, worüber der Phosphorylierungszustand der zwei HK Isoformen über Akt aktiv gesteuert und möglicherweise die Interaktion zwischen HK und Mitochondrium gezielt modifiziert werden kann (Robey und Hay, 2006; Miyamoto *et al.*, 2004a).

Anhand von Strukturanalysen wurde von Pastorino and Hoeck, 2003 eine putative BH-4 Domäne im HKII Gen beschrieben. Die Bedeutung und Funktion der BH-4 Domäne wurde in Kapitel 1.6.1. erläutert. In der deskriptiven Übersichtsarbeit wurden die BH-4 Domänen zahlreicher antiapoptotischer Bcl-2 Proteine gegenüber gestellt und mit der HKII-Sequenz verglichen. Die Strukturanalyse zeigte eine Bcl-2 homologe Region im C-Terminus des HKII Gens, welche zur Vermittlung der antiapoptotischen Effekte des Proteins beitragen könnte.

1.7.1.4. Rolle der Hexokinase in der Apoptoseregulation

Möglicherweise verfügen die HKI und HKII neben ihrer zentralen Bedeutung im Glukosemetabolismus über eine zusätzliche Funktion bei der Regulation von intrazellulären Zelltodmechanismen. Ahmad *et al.* 2002 exprimierte die HKII in Lungenepithelzellen und konnte einen Schutz gegenüber oxidativ induzierten Zelltod zeigen. In Kardiomyozyten demonstrierten Gürel *et al.*, 2009 und Zuubier *et al.*, 2005 einen vergleichbaren Effekt des Proteins unter Ischämiebedingungen. Sie beschrieben eine HKII-vermittelte Protektion durch mitochondriale Lokalisation und damit einhergehender Unterdrückung der MPTP-Öffnung. Im Vergleich zum kardioprotek-

tiven Effekt der HKII unterlag die HKI in diesem experimentellen Ansatz keiner Expressionssteigerung oder Kompartimentverschiebung. Die Ergebnisse sind kongruent mit experimentellen Daten aus unserer Arbeitsgruppe, welche einen Schutz von HKII transfizierten Neuronen im Vergleich zu unbehandelten Neuronen im kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivationsmodell zeigte (Mergenthaler *et al.*, 2012). Auf Grund der isolierten, hypoxisch bedingten Expressionsinduktion der HKII-mRNA, fokussierten sich die Experimente ausschließlich auf die Detektion von HKII-assoziiertem Zellschutz.

Die molekularen Mechanismen, durch welche die HKII in den unterschiedlichen Geweben ihre protektiven Effekte vermittelt, sind nicht vollständig verstanden und derzeit Gegenstand intensiver Forschung (Mergenthaler *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2008; Robey and Hay, 2006; Pastorino and Hoek, 2003). Aus neurologischer Sicht ist insbesondere der Einfluss der HKII auf die endogen ablaufenden Schutz- und Reparaturmechanismen im Periinfarktgebiet des ischämischen Schlaganfalls interessant. Da das Hirngewebe in diesem Bereich einer primär reversiblen funktionellen Schädigung unterliegt, könnte das Verständnis der antiapoptotischen Mechanismen dazu beitragen den drohenden Gewebsuntergang in der Penumbra zu reduzieren und darüber das klinische Ergebnis der Patienten zu verbessern (Dirnagl *et al.*, 1999).

1.8. Arbeitshypothesen und Arbeitsprogramm

In Anbetracht der HIF-1 vermittelten Expressionssteigerung der HKII und dem damit einhergehenden Schutz vor Hypoxie-induzierten neuronalen Zelltod, stellt sich nun die Frage nach den Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung der HKII. Ziel der vorgelegten Arbeit ist eine strukturell-funktionelle Charakterisierung der glukoseabhängigen Apoptoseregulation durch die HKII. Die Arbeitshypothesen basieren auf den in der Einleitung beschriebenen HKII Eigenschaften.

1. Hypothese: Die N-terminale Domäne der Hexokinase II ist essentiell für die mitochondriale Assoziation und dem damit verbundenen neuroprotektiven Effekt des Proteins.

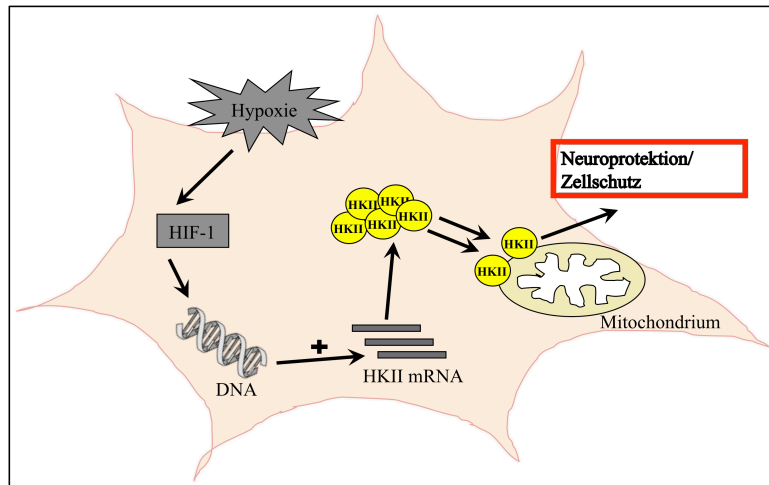


Abbildung 5: Putativer neuroprotektiver Mechanismus der Hypothese 1. Zerebraler Sauerstoffmangel führt zu einer Aktivierung des Hypoxie induzierenden Faktors 1 (HIF-1), welcher über eine spezielle HIF-1 Bindungsstelle im Hexokinase II Gen (HKII) die Hochregulierung der HKII-mRNA Expression mit Steigerung der HKII Proteinexpression induziert. Nachfolgend bindet die HKII über die mitochondriale Lokalisationssequenz an das Mitochondrium und vermittelt die Neuroprotektion.

2. Hypothese: Die Phosphorylierung der Hexokinase II durch die Akt-Kinase/Proteinkinase B vermittelt über eine mitochondriale Assoziation die neuroprotektiven Effekte des Proteins.

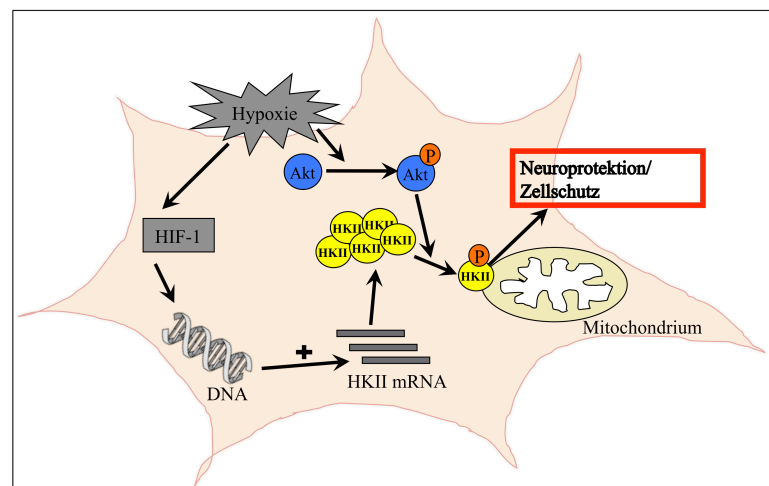


Abbildung 6: Putativer neuroprotektiver Mechanismus der Hypothese 2. Zerebraler Sauerstoffmangel führt zu einer intrazellulären Aktivierung des Hypoxie induzierenden Faktors 1 (HIF-1), welcher über eine spezielle HIF-1 Bindungsstelle im Hexokinase II Gen (HKII) die Hochregulierung der HKII-mRNA Expression mit einer nachfolgenden Steigerung der HKII Proteinexpression induziert. Gleichzeitig wird Akt durch Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert anschließend die zytosolische HKII, welche durch diesen Stimulus an das Mitochondrium bindet und die Neuroprotektion vermittelt.

3. Hypothese: Die putative BH4 Domäne der HKII ist essentiell für die neuroprotektiven Eigenschaften der HKII.

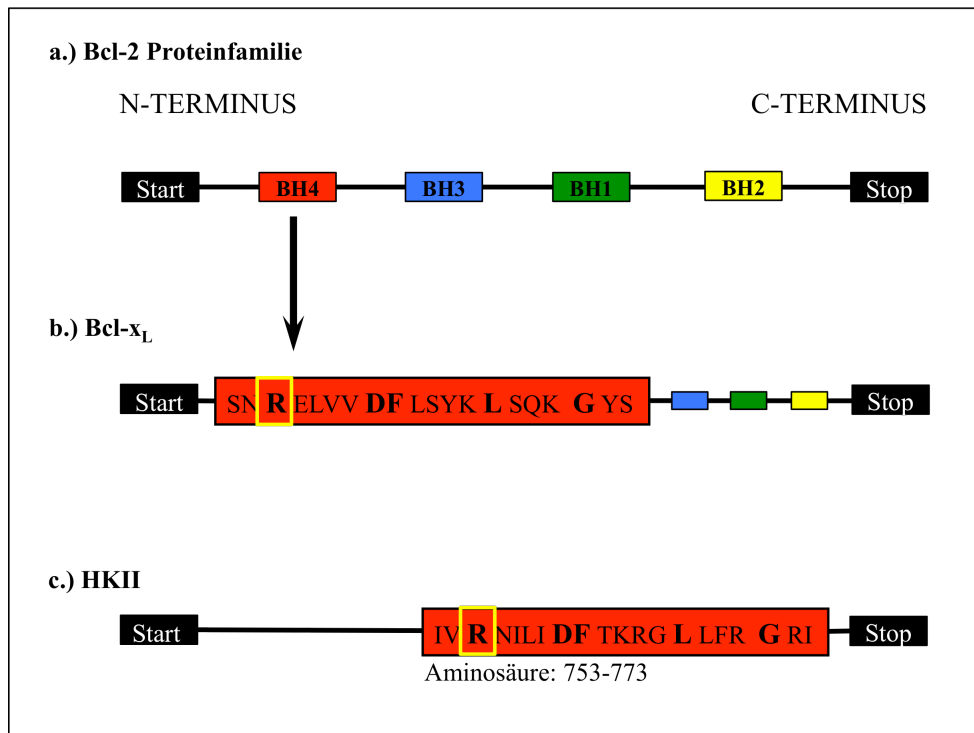


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Hypothese 3. a.) Charakteristische BH Domänen Anordnung innerhalb der Bcl-2 Familie. b.) BH-4 Domäne von Bcl-x_L. c.) putative HKII-BH-4 Domäne mit Markierung von Aminosäure-Homologien zu Vertretern der Bcl-2 Familie.

4. Hypothese: Die katalytische Aktivität der Hexokinase II ist essentiell für die antiapoptotische Wirkung der HKII.

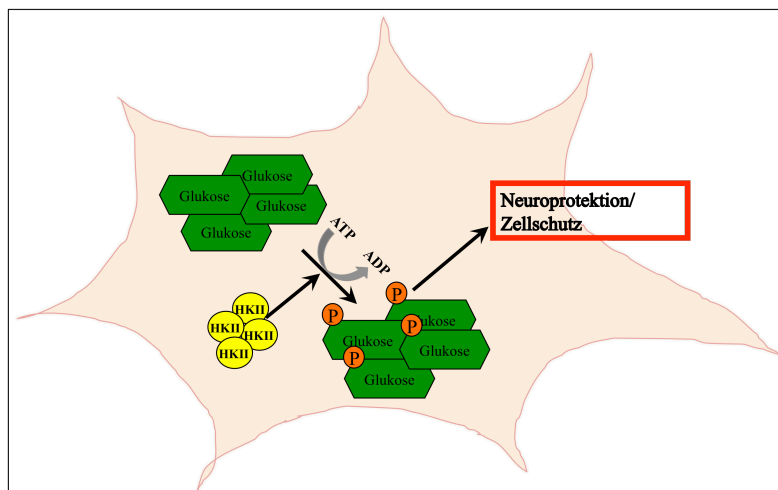


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hypothese 4. Die ATP-abhängige Phosphorylierung von intrazellulärer Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) durch die Hexokinase II (HKII) stellt nicht nur die Schlüsselreaktion im Glukosemetabolismus dar, sondern ist auch essentiell für die Vermittlung der neuroprotektiven Effekte der HKII.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim (Deutschland)
Bakterieninkubator	Minitron, Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Fluoreszenzfilter für Mikroskop DMIL: F41-025, F41-027, F41-041	AHF Analysetechnik AG, Tübingen (Deutschland)
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Lo Laboroptik, Friedrichsdorf (Deutschland)
Gelscanner Typhoon 8600	Amersham Biosciences, Freiburg (Deutschland)
Homogenisierer	VWR International, Darmstadt (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)
OGD-Kammer, Concept 400	Ruskin Technologies, Bridgend (UK)
pH Meter pH100	VWR International, Darmstadt (Deutschland)
Photometer	Eppendorf, Hamburg (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)
UV-Lampe	Bioblock Scientific, Illkirch (Frankreich)

Vakuumpumpe	Vacubrand, Wertheim (Deutschland)
Waagen CP225D	Sartorius, Göttingen (Deutschland) BL150 Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetzte/Hänigsen (Deutschland)
Western Blot Elektrophorese-Kammer	Biorad, München (Deutschland)
Western Blot Entwicklungs-Kamera: Proline 9000, mit Objektiv Canon EF 50mm F/1.2L USM	Finger Lakes Instrumentation, Lima (USA)
Zellkulturinkubator	Nuaire, COTECH Berlin (Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Universal 30RF, Hettich Universal 32R, Thermo Electron, Oberhausen (Deutschland), Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

2.1.2. Software

Software	Hersteller
pubmed Datenbanken, BLAST Programm http://www.ncbi.nlm.nih.gov	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, CA (USA)
SPSS	SPSS GmbH, München (Deutschland)
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München (Deutschland)

2.1.3. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Proteine

Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Agarose NEE0 Ultra	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Ethanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Glyzerol, >99%	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Glyzin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)

Milchpulver, blocking grade	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim (Deutschland)
Proteinmolekulargewichtsmarker Page Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot (Deutschland)
Phosphatase Inhibitor Cocktail A & B	Roche, Mannheim (Deutschland)
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes OY, Espoo (Finnland)
Laurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Methanol	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
T4-DANN-Ligase	Roche, Mannheim (Deutschland)
TEMED	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trizma-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Trizma-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
TMRE Molecular Probes	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin (Deutschland)
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Westernblot Luminol-Reagenz: sc-2048	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt (Deutschland)

2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
Ampuva Spüllösung	Fresenius Kabi (Deutschland)
B27 supplement	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Collagen G	Biochrom, Berlin (Deutschland)
D-(+)-Glukose >99.5% Reinheit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
DMEM mit Glukose	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
DPBS 10x (<i>Dulbecco phosphate-buffered saline</i>)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom, Berlin (Deutschland)
FCS (<i>fetal calf serum</i>) GOLD	PAA, Linz (Österreich)
Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
HEPES 1M	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Insulin (Insuman Rapid)	Sanofi Aventis, Frankfurt (Deutschland)

L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
MEM-Earle	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Neurobasal A Medium (NBM-A)	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Neurobasal Medium (NBM)	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin 10.000IE/	
Streptomycin 10.000 µg/ml (Pen/Strep)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
PBS w/o	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Poly-L-Lysin (0.1 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Trypan Blau	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)

2.1.5. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-HKII goat, polyklonal IgG, (sc-6521)	Santa Cruz, Santa Cruz (CA, USA)
Anti-Actin goat, polyklonal IgG, (sc-1616)	Santa Cruz, Santa Cruz (CA, USA)
Donkey anti-goat IgG HRP-linked (sc-2020)	Santa Cruz, Santa Cruz (CA, USA)
Donkey anti-goat IgG HRP-linked (sc-2033)	Santa Cruz, Santa Cruz (CA, USA)

2.1.6. Kits und Gele

Produkt	Hersteller
BCA protein assay kit, reducing agent compatible (23250)	Pierce, Bonn (Deutschland)
QIAGEN Endofree Maxiprep Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAquick Gel extraction/PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
Precise TM Proteingele	Pierce, Bonn (Deutschland)

2.1.7. Bakterienstämme

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

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Elektroporationsküvetten (steril) für	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Nucleofector I™	(Deutschland)
Plastikwaren	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
	Falcon, Franklin Lakes (NJ, USA)
	Nunc, Langenselbold (Deutschland)
	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Kodak Biomax Light-1 X-ray Filme	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach (Deutschland)

2.1.9. Medien- und Pufferzusammensetzungen

2.1.9.1. Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
BSS ₀	116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , 26.2 mM NaHCO ₃ , 10 mM HEPES, 9.96 µM Gylzin, 1.8 mM CaCl ₂
BSS ₁	BSS ₀ , 1 mM Glukose
Collagen-Med	MEM, 5% FKS Gold, 1% Pen/Strep, 1% 1 M HEPES, 1% Collagen G
DMEM (Transfektionsmedium)	DMEM (w 3,7 g/l NaHCO ₃ , w 4,5 g/l D-Glukose, w/o L-Glutamin, w/o Na-Pyruvat), 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
NBM-A (Wachstumsmedium)	NBM-A (w/o L-Glutamin), 2% B27 Supplement, 1% Pen/Strep, 0.5 mM L-Glutamin
NBM-B27	NBM, 2% B27 Supplement, 1% Pen/Strep, 0.25% L-Glutamin
N-Medium	MEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin, 0.25% Insulin, 1% 1 M HEPES, 0.9% Glukose
PBS	H ₂ O _{dest.} (Ampuva), DPBS w/o Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺ (Konzentration 1:10)
Starter-Medium	NBM-B27, 0.1 % Glutamat

2.1.9.2. Westernblot-Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
4-fach SDS Probenpuffer	200 mM Tris/HCl (pH 6.8), 8% SDS, 0.4% Bromphenolblau, 40% Glycerol, 400mM DTT
Ripa-Lysepuffer	50 ml H ₂ O _{dest.} , 0.5 g Natrium-Deoxycholat, 1.5 ml 5 M NaCl, 0.5 ml 10% SDS, 0.5 ml Triton X-100, 2,5 ml 1 M Tris pH 7.4
1 x Tris-HEPES-SDS-Puffer	H ₂ O _{dest.} , 100 mM Tris, 100mM HEPES, 3 mM SDS

2.1.9.3. Molekularbiologiemedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Med/-Agar	Bacto-Trypton 1% (w/v), Bacto-Hefeextrakt 0,5% (w/v), NaCl 1% (w/v) für Agar: +0,75% (w/v) Agar

2.1.10. Tiere

Embryonen von Wistar Ratten (Embryonaltag 17 – 19)	Versuchstierhaltung der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin (Deutschland)
---	---

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellkulturbedingungen in den Inkubatoren entsprachen 5% CO₂, 95% Luft, 95% Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 36,5°C. Für die kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivations Experimente wurden Zellkulturplatten mit 48 Vertiefungen und einem Volumen von 1,1 cm²/Vertiefung eingesetzt. Platten mit 6 Zellkulturgefäßen und 9,0 cm²/Vertiefungen wurden für die Kultivierung von primären Neuronen zur Westernblotanalyse genutzt. Die Zelldichte der embryonalen Kortexneurone betrug 200.000 Zellen/cm². Im Kapitel 2.1.4. ist die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien beschrieben.

Die Zellkulturgefäße wurden vor Aussaat der adhärenenten, embryonalen Zellen mit Poly-L-Lysin (0,1mg/ml), in einer Konzentration von 1:20 in PBS, bei 4°C über Nacht inkubiert, anschließend mit PBS gespült und für eine Stunde mit kollagenhaltigem Medium bei 36,5°C in den Inkubator gestellt. Nach zweimaliger Spülung mit PBS erfolgte die Befüllung der Platten mit dem jeweiligen Zellkulturmedium.

Am 5. Tag nach Aussaat der Neurone erfolgte ein Mediumaustausch, um den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Dazu wurde $\frac{1}{4}$ des Volumens einer Zellkulturplattenvertiefung entfernt und durch $\frac{1}{3}$ frisches serumfreies Medium ersetzt.

2.2.1.1. Herstellung von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden 175 cm² Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin beschichtet, zweimal mit PBS gespült und mit Wachstumsmedium (NBM-A) beziehungsweise Transfektionsmedium (DMEM) befüllt. Das Gesamtvolumen pro Flasche betrug 35 ml und wurde ab dem 4. Tag nach Aussaat der Neurone alle zwei Tage durch Austausch von $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ des Volumens erneuert. Das abgenommene Medium wurde in sterilen Flaschen gesammelt, gepoolt und bei 4°C gelagert. Am 10. Tag wurde das gesamte Volumen von den Zellkulturflaschen abgenommen, zusammen mit dem zuvor gewonnenem Medium bei 3500 x g abzentrifugiert und der Überstand in 10 ml Röhrchen abgefüllt. Nach Zusatz von 25 mM Glutamat wurde das konditionierte Medium bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. Präparation von primären Kortexneuronen

Für die Präparation der primären Kortexneurone wurden schwangere Wistar-Ratten (17.-18. Ge-

stationstag) mittels Isofluran narkotisiert und durch zervikale Delokalisation getötet. Der Uterus wurde freigelegt und in eine PBS-gefüllte Petrischale gelegt. Nach Entnahme der Embryonen folgten alle weiteren Arbeitsschritte unter Mikroskop-Kontrolle an der Sterilbank.

Die Embryonen wurden in eine sterile mit NBM+B27 gefüllte Petrischale überführt, die Kalotte und Dura mater sagittal eröffnet und die Gehirne mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus dem Schädel gelöst. Nach Trennung der Hemisphären wurde das Zerebellum verworfen und die Meningen vollständig abgezogen. Für die Kortexneuronen-Präparation wurden weiterhin das Septum, Thalamus, Basalganglien sowie der Hippokampus entfernt, um später ein möglichst homogenes, neuronales Zellbild zu erhalten. Die präparierten Hemisphären wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen. Zur Lösung der Neuronen aus dem Zellverband wurden die Kortexhälften für 15 Minuten in 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Absaugen des Trypsins und Waschen mit PBS und N-Med, wurde das Gewebe vorsichtig mittels zweier Pasteur-Pipetten mit abnehmender Lumenöffnung mechanisch dissoziiert und bei RT für zwei Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Es folgte die Redissoziation in 10-15 ml Startermedium und die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe von Trypanblau. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension in 180 µl Trypanblau gelöst, in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert und bei vier großen Quadraten jeweils eine Viererreihe ausgezählt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde folgende Formel herangezogen:

$$\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 4 \text{ (Quadratenzahl)} \times 10 \text{ (Verdünnung in Trypanblau)}}{3,2 \mu\text{l (Zählkammervolumen)}}$$

Anhand der Zählung von lebenden und toten Zellen in der Zählkammer war es möglich eine Aussage über die Qualität der Präparation und Aufarbeitung zu treffen. Die Ausbeute der Präparation betrug circa 15-20 Millionen Kortexzellen pro Embryo und 20-30% tote Zellen.

2.2.2. Modell zur Detektion der zellschützenden Effekte der Hexokinase II

Zur Charakterisierung der neuroprotektiven Eigenschaften der HKII wurde ein spezielles auf Kotransfektion und Kokultivierung basierendes System nach Mergenthaler, 2011 verwendet. Der Vorteil dieses Transfektionsmodells ist die Möglichkeit der isolierten Betrachtung und Untersuchung potentiell protektiver Gene unabhängig von der Gesamtzellpopulation. Folglich können auch kleine und empfindliche Zelleffekte dargestellt werden, welche aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz (DIV 9: 25-35% der Gesamtzellpopulation) bisher nicht detektiert werden konnten.

Praktisch umgesetzt wurde dies durch Kotransfektion primärer Kortexneurone mit dem zu untersuchenden Gen („*gene of interest*“, *GOI*) und dem grünen Fluoreszenzprotein eGFP. Durch die von Mergenthaler, 2011 beschriebene Kotransfektionseffizienz von über 90% kann bei einem grün fluoreszierenden Neuron mit der Anwesenheit des zu untersuchenden Gens in derselben Zelle ausgegangen werden.

Um eine detektierbare Kontrollpopulation mit vergleichbarem Transfektionsstress und entsprechender Zellzahl zu rekrutieren, wurde das Fluoreszenzprotein m-Orange einfach transfiziert und nachfolgend mit dem kotransfizierten Zellansatz gemischt und kokultiviert. Diese interne Kontrolle ist notwendig, da nur der direkte Vergleich von kotransfizierten zu einfach transfizierten Zellen innerhalb einer Neuronenkultur eine Aussage über die Protektivität von Genen zulässt.

Zur Auswertung der Daten wurde jeweils die Ratio aus grün und orange fluoreszierenden Zellen innerhalb einer Zellkulturplattenvertiefung errechnet. Eine Ratio = 1 entspricht weder einem positiven noch einem negativen Effekt des zu untersuchenden Gens auf die Zelle und stellt sich durch gleiche Mengenverhältnisse an orangenen und grünen Zellen in einem Transfektionszustand dar. Definitionsgemäß steht eine Ratio > 1 für einen zytoprotektiven Einfluss des Gens, da verhältnismäßig mehr grüne als orangene Zellen nach bzw. auch vor der OGD vorhanden sind. Im Gegensatz dazu impliziert eine Ratio < 1 eine zellschädigende bzw. destruktive Wirkung des zu charakterisierenden Gens auf die Zellvitalität. In diesem Fall befinden sich mehr einfach transfizierte orangene Zellen als mit eGFP und dem zu untersuchenden Gen kotransfizierte Zellen in einer Zellkulturplattenvertiefung. Da die Kokultivierung aus einfach transfizierten eGFP und m-Orange Neuronen keinen Unterschied im Hinblick auf das Zellüberleben erwarten lässt, fungiert dieser Transfektionsansatz als Null-Kontrolle und entsprach einer reproduzierbaren Ratio von eins. Das stark antiapoptotisch wirkende Gen Bcl-x_L wurde in diesem Protokoll als Positivkontrolle verwendet, da es vor als auch nach der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation einen robusten zellschützenden Effekt auf die primären Kortexneurone ausübt (Pastorino und Hoek, 2003).

Der Zellschaden wurde durch Auszählung der fluoreszierenden Zellen unmittelbar vor und 24 Stunden nach der OGD mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Je Zustand wurden standardisiert drei Plattenvertiefungen kalkuliert. Es wurden pro Vertiefung 13 Gesichtsfelder vom höchsten Punkt des Wells senkrecht nach unten gezählt, da so sichergestellt werden konnte, dass nach der OGD wieder dieselben Zellen bewertet werden. Durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfilter war es möglich, sowohl die grünen als auch die orange fluoreszierenden Neuronen innerhalb eines Gesichtsfeldes zu zählen, um später die Ratio aus denselben kalkulieren zu können.

Zur Testung der unterschiedlichen HKII Varianten wurde in der vorgelegten Arbeit ausschließlich die beschriebene Transfektionsmethode in Verbindung mit einem *in vitro* Schadensmodell der zerebralen Ischämie angewendet.

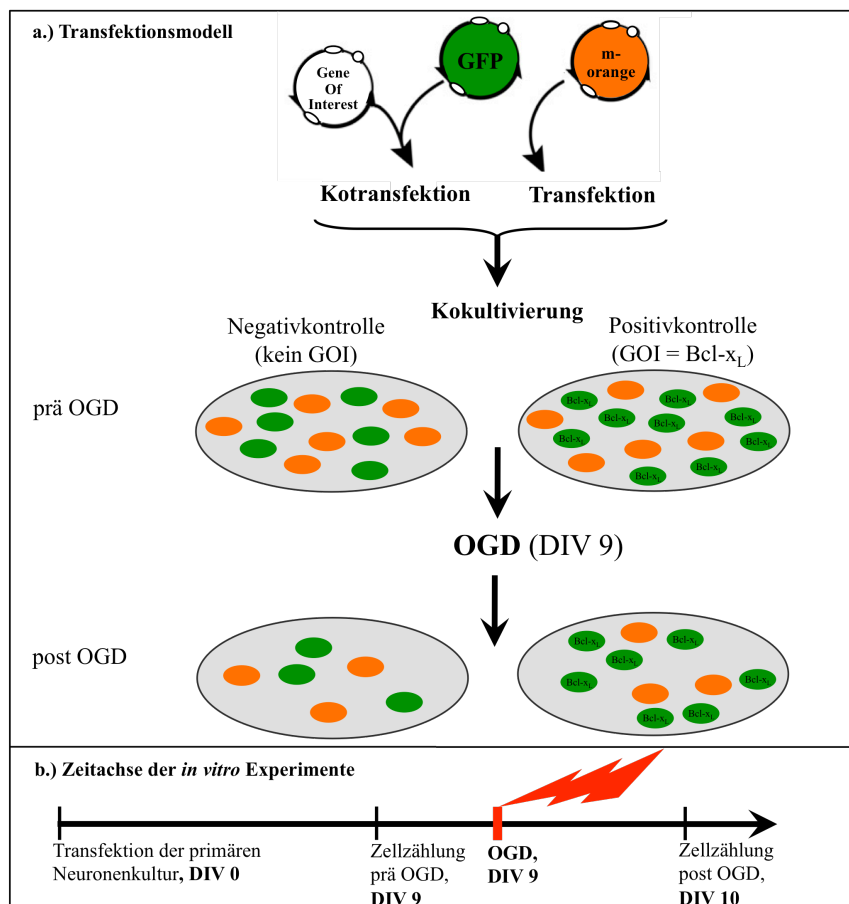


Abbildung 9: a.) und b.) Transfektionsstrategie zur Überexpression der Hexokinase II Varianten.

Zu a.) Kotransfektion des gewünschten Gens („Gene of Interest“, GOI) mit dem grünen Fluoreszenzprotein eGFP und nachfolgende Kokultivierung mit dem einfach transfizierten orangenen Fluoreszenzprotein m-orange. Als Negativkontrolle fungierte eine kokultivierte Neuronenkultur aus einfach transfizierten eGFP und m-orange. Die Kotransfektion aus dem antiapoptotischen Gen Bcl-x_L und dem Fluoreszenzprotein eGFP diente als Positivkontrolle. **Zu b.)** Die Sauerstoff- und Glukose-Deprivationsexperimente (OGD) wurden am 9. Tag nach Transfektion durchgeführt und die transfizierten Neurone unmittelbar davor bzw. 24 Stunden nach der OGD gezählt und die Ratio aus grünen zu orangenen Zellen kalkuliert. Abbildung modifiziert aus Mergenthaler *et al.*, 2012.

2.2.2.1. Transfektion der primären Kortexneurone

Unmittelbar nach der Neuronenpräparation erfolgte die Transfektion der primären Kortexneurone mittels Nukleofector™ Technologie von Amaxa. Dazu wurden die Zellen bei 720 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Zellpellett in Elektroporationspuffer resuspendiert. Als Grundlage für die Transfektion wurde das von Mergenthaler *et al.*, 2012 eta-

blierte Protokoll und Transfektionsmodell (Kapitel 2.2.2.) genutzt.

Für die Transfektion wurden jeweils 3 Millionen Zellen in 100 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und nach Zusatz von 5 µg endotoxinfreier Plasmid-DNA bzw. 10 µg DNA bei Kotransfektion in die Elektroporationsküvetten pipettiert. Anschließend wurden die primären Kortexneurone mit dem Amaxa Nucleofector I Programm O-003 für primäre neuronale Zellen elektroporiert. Nach der Transfektion wurden 500 µl Transfektionsmedium (DMEM) in die Küvette gegeben und die Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Bei Kokultivierung mit dem einfach transfizierten Fluoreszenzprotein m-Orange wurde dieses nach Transfektion mit dem dazugehörigen kotransfizierten Ansatz gemischt. Das Endvolumen von 1200 µl Zellsuspension wurde auf zwei mit Poly-L-Lysin beschichtete und mit 300 µl Transfektionsmedium befüllte 48er-Zellkulturplatten mit jeweils 69 µl Transfektionsansatz pro Vertiefung pipettiert. Pro Transfektionszustand wurden in jeweils vier Vertiefungen pro Platte transfizierte Zellen ausgesät.

Nach 4-6 Stunden im Inkubator erfolgte der erste Mediumwechsel mit konditioniertem DMEM, um den gestressten Kortexneuronen wichtige Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Das konditionierte DMEM wurde dazu mit einfachem DMEM in einem Verhältnis von $\frac{2}{3}$ zu $\frac{1}{3}$ angesetzt und das Medium auf den Zellkulturplatten mit 400 µl konditioniertem Medium ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneut mit konditioniertem, serumfreiem Wachstumsmedium (NBM-A) nach gleichem Schema ausgetauscht.

2.2.2.2. Sauerstoff- und Glukose-Deprivationsexperimente

Nach 9 Tagen in Kultur (DIV 9) wurden die transfizierten Kortexneurone auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften in einem *in vitro* Schadensmodell der zerebralen Ischämie getestet. Das Medium auf den Zellen wurde dazu entfernt und in einem Falcongefäß gesammelt. Um Glukose und Nährstoffreste von den Zellen zu beseitigen, wurde die Zellkulturplatte zweimal mit PBS gespült, wobei die 2. PBS-Lösung nicht abgesaugt wurde. Die Platte wurde anschließend in die Hypoxiekammer eingeschleust und das verbliebene PBS durch 225 µl glukosefreie, deoxygenierte, bilanzierte Salzlösung BSS₀ ersetzt. In der Hypoxiekammer wurde der Sauerstoffpartialdruck pO₂ unter 2 mmHg/1% (5% CO₂; 95% N₂) gehalten und mit einer polarographischen Elektrode überwacht. Die Temperatur betrug 36,5°C ± 0,5°C und die relative Luftfeuchtigkeit über 90%. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen nach 1:45-2:30 Stunden aus der Kammer entnommen. Nach Austausch von BSS₀ mit oxygeniertem NBM-A, bestehend aus 50% zuvor asserviertem NBM-A und 50% frischem NBM-A wurden die Zellen bis zur weiteren Da-

tenerhebung für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Der Zellschaden wurde mittels einer sensitiven Zellzähltechnik unmittelbar vor und 24 Stunden nach der OGD ermittelt. Das dazu verwendete Modell ist im Kapitel 2.2.2. dargestellt.

2.2.3. Herstellung der Hexokinase II Mutanten

Die hier verwendeten molekularbiologischen Standardtechniken sind im „Molecular Cloning“ von Sambrook und Russel, 2001 und im „Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics“ von Mülhardt, 2006 beschrieben. Alle Oligonukleotid-Primer wurden anhand der Gensequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information entworfen und von der MWG Eurofins Biotech AG hergestellt.

Die Klonierung des p-CAG-MCSn1 Grundvektors erfolgte aus dem Plasmid pDRIVE-CAG mit dem kombinierten CMV Enhancer/chicken- β -Actin Promotor und ist detailliert in der Dissertation von Mergenthaler, 2011 dargestellt.

Das HKII-Gen wurde in zwei Fragmenten aus post-ischämischer Mausgehirn cDNA amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NheI* in den pCAG-MCSn1 Vektor ligiert. Bei Beginn der Arbeit lag das pCAG-HKII Plasmid bereits vor (Mergenthaler, 2011). Die HKII-Referenzsequenz gi:7305142 bzw. NM_013820.3 stammt aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information.

Die Klonierung der HKII Varianten erfolgte mittels ortsgebundener Mutagenese nach dem Cold Spring Harbor Protokoll von Vallejo *et al.*, 2008. Eine Übersicht der Vorgehensweise ist in Abb. 11 dargestellt.

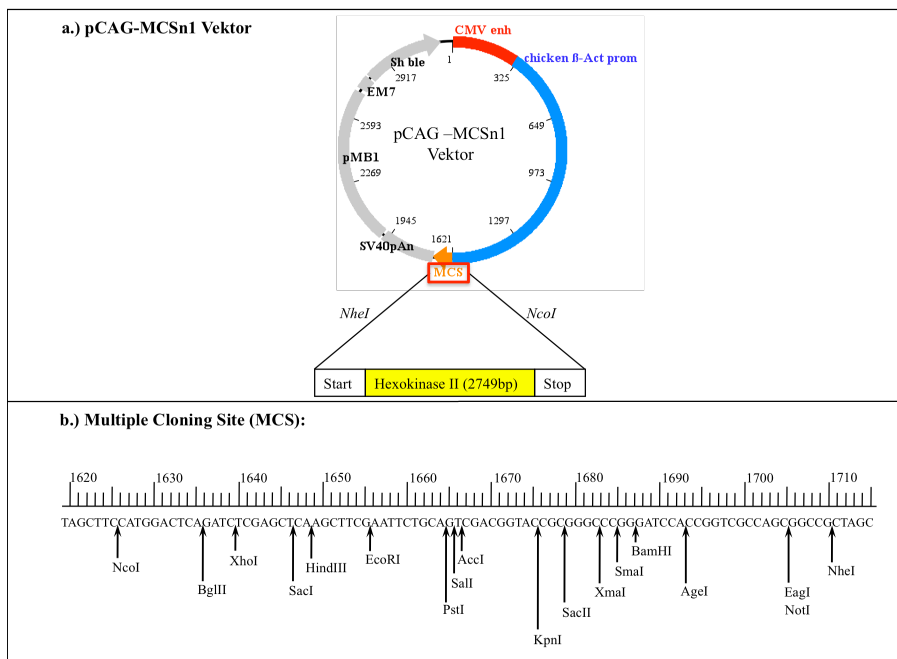


Abbildung 10: a.) Vektorkarte des Plasmids pCAG-MCSn1. b.) Multiple Cloning Site des Vektors pCAG-MCSn1. Die Klonierung des pCAG-MCSn1 Grundvektors erfolgte aus dem Plasmid pDrive-CAG mit dem kombinierten CMV Enhancer/chicken-β-Actin Promotor. Das Hexokinase II Gen wurde mit den Restriktionsschnittstellen *NheI* (5'-Ende) und *NcoI* (3'-Ende) in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors eingefügt.

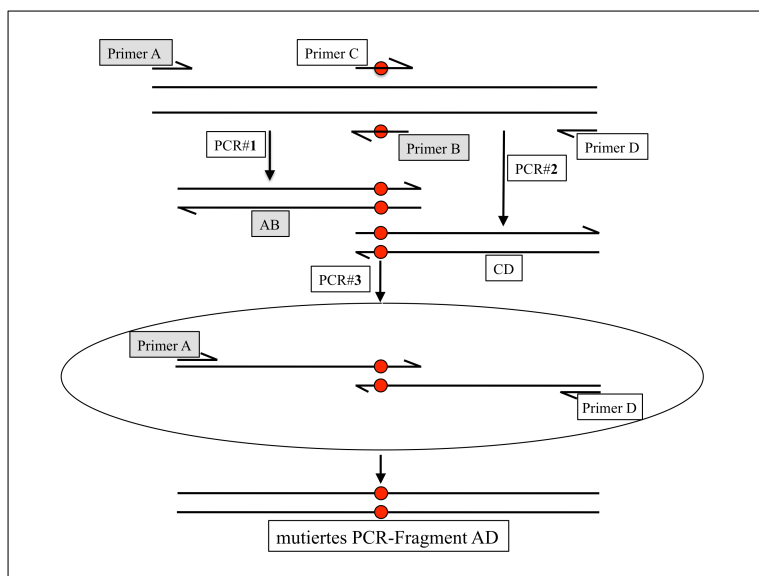


Abbildung 11: Schematische Darstellung der ortsgebundenen Mutagenese mit Überlappungsexension. Es wurden zwei komplementäre Primer, die in der Mitte die gewünschte Punktmutation tragen (Primer B+C) und zwei weitere Primer (Primer A+D), die in 5'- und 3'-Richtung der Mutationsstelle liegen entworfen. Im ersten Schritt wurde jeweils eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Primer A und Primer B bzw. Primer C und Primer D durchgeführt und beide PCR-Produkte (Fragment AB bzw. Fragment CD) in gleichen Mengenverhältnissen in der folgenden PCR als DNA-Templat eingesetzt. Im 2. PCR Schritt wurden die Primer A und Primer D zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts verwendet. Das mutierte PCR-Fragment AD wurde nach Restriktionsverdau in den Hexokinase II (HKII) Vektor ligiert. Modifiziert nach Vallejo *et al.*, 2008.

Zur Generierung der HKII Mutanten wurden jeweils vier Oligonukleotidprimer entworfen. Zwei komplementäre Primer, die in der Mitte die gewünschte Punktmutation tragen (Primer B+C) und zwei weitere Primer (Primer A+D), die in 5'- und 3'-Richtung der Mutationsstelle liegen. Als DNA-Vorlage wurde der HKII Expressionsvektor (HKII_pCAG) in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Im ersten Schritt wurde jeweils eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einem mutierten Primer und einem äußeren Primer durchgeführt (Primer A+B) bzw. (Primer C+D) (Abb. 11). Beide PCR-Produkte (Fragment AB bzw. Fragment CD) wurden anschließend aufgereinigt und als DNA-Vorlage in gleichen Mengenverhältnissen für die zweite PCR eingesetzt. Da die PCR-Fragmente aus der ersten PCR im Bereich der mutierten Primer überlappen, können sie in diesem Bereich hybridisieren und durch die zweite PCR verlängert werden (Überlappungsextension). Nach PCR-Amplifikation des HKII Inserts (mutiertes PCR-Fragment AD) mittels Phusion DNA-Polymerase, sowie Größenanalyse durch Gelelektrophorese, wurde das PCR-Fragment unter UV-Licht aus dem 1%igen Agarose-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Kits extrahiert. Es folgte der Restriktionsverdau vom HKII Vektor und Insert mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen und die Dephosphorylierung des HKII Vektors durch alkalische Phosphatase (CIP). Zur Beseitigung der zuvor verwendeten Restriktionsenzyme wurde eine Säulenaufreinigung von Vektor und Insert mit dem QIAquick Kit durchgeführt. Nach der Gelquantifizierung von Insert und linearisiertem HKII Vektor wurden beide mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Es wurden 25 ng Vektor zur Ligation verwendet. Die benötigte Menge Insert wurde nach folgender Formel bestimmt (Mülhardt, 2006):

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

Es folgte die Transformation des DNA-Plasmids in einen modifizierten *Escherichia coli* Stamm (TOP10 Chemically Competent *E. coli*, invitrogen). Da chemisch kompetente Bakterien empfindlich gegen zu große DNA-Mengen sind, wurden 100 µl kompetente *E. coli*s mit 4 µl eines 20 µl Ligationsansatzes gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden die Bakterien für 30 Sekunden ins 42°C temperierte Wasserbad gestellt (Hitzeschock) und nach Zugabe von 500 µl S.O.C. Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf selektive LB-Agarplatten ausgetrichen. Als Resistenzantibiotikum diente Zeocin in einer Konzentration von 1:2000. Die Platten wurden bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert. Darauf folgend wurden einzelne Kolonien in 3 ml selektivem LB-Medium überführt und bei 37°C geschüttelt. Nach achtstündiger Inkubation wurden jeweils 100 µl Medium aus den

Tageskulturen abpipettiert und bei 4°C gelagert. Aus dem Rest der Bakterienkulturen wurde mittels QIAquick Mini DNA Prep Kit einzelne Mini DNA-Präparationen angefertigt und Kontrollrestriktionsverdau zur Überprüfung der Klonierung durchgeführt. Nach positiver Größenanalyse des Inserts wurde eine 100 ml Bakterienkultur mit dem dazu gehörigen, zuvor asservierten 3 ml Kulturansatz in einer Konzentration von 1:2000 in LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C für 12-16 Stunden geschüttelt. Zeocin diente wie bei der 3 ml Kultur als Resistenz-Antibiotikum.

Die Präparation der DNA erfolgte mit dem QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kit. Die Konzentration der aufgereinigten, endotoxinfreien Plasmid-DNA wurde im Photometer gemessen.

2.2.3.1. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante

Zur Herstellung der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante (pCAG-HKII_Del21AS) wurden im N-Terminus des HKII Gens die ersten 21 Aminosäuren (AS) deletiert und das Startcodon entsprechend vor die 22. AS gesetzt. Die Translation des HKII Proteins beginnt folglich mit der 22. AS.

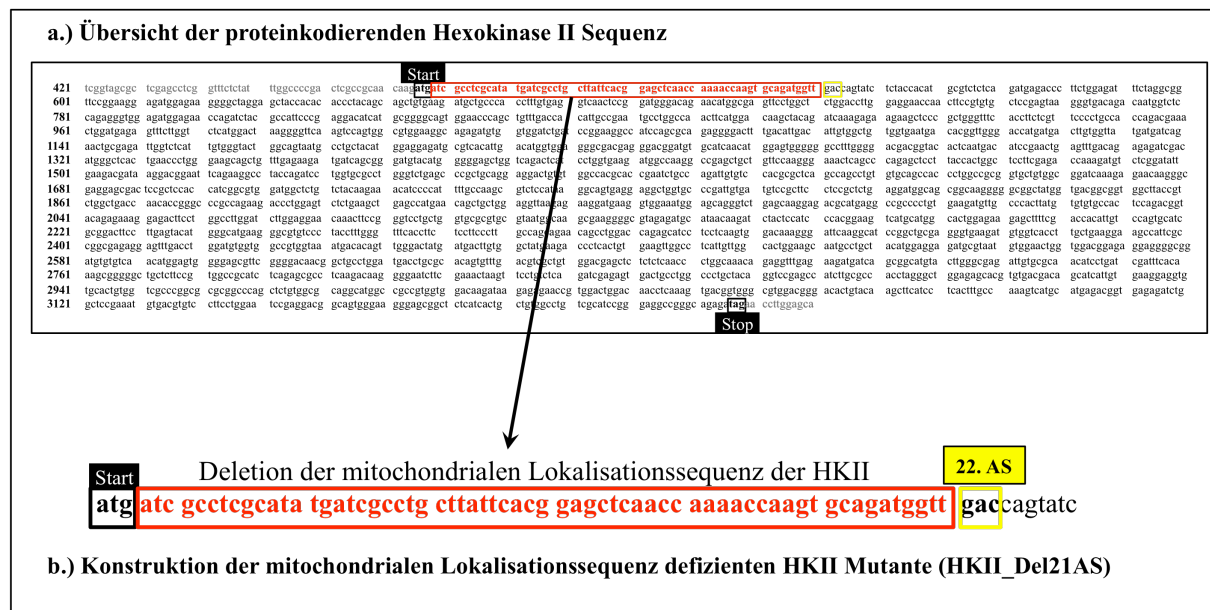


Abbildung 12: a.) und b.) Konstruktion der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante (HKII_Del21AS). Deletion der ersten 21 Aminosäure (AS) im N-Terminus des HKII Gens und versetzen des Startcodons vor die 22. AS.

Beim Entwurf des Fwd-Primers wurde auf die ersten 21 Aminosäuren verzichtet und das Startcodon direkt vor die 22. Aminosäure gesetzt. Um sicherzustellen, dass die Phusion-Polymerase

das Oligonukleotid als Primer akzeptiert, wurde darauf geachtet, dass der homologe Bereich am 3'-Ende des Oligonukleotidprimers ausreichend lang ist (> 10 Basen). Das mutierte HKII Insert und der HKII Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRV* verdaut und anschließend ligiert.

Primername	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)	Referenz	T _m [°C]
HKII_mito_Fwd	acgtccatggaccagatctctaccacat	NM_013820.3	69,5°C
HKII_1527_Rev	cttctgaattccgctccttatcgtc	NM_013820.3	61,0°C

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer für die Kontruktion der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante (HKII_Del21AS).

2.2.3.2. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante

Zur Herstellung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Variante (HKII_T473A) wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Threonin (T) an Position 473 der HKII-Sequenz zu Alanin (A) mutiert und damit die Akt-Kinase/Proteinkinase B (Akt) Phosphorylierungsstelle innerhalb des HKII Proteins ausgeschaltet.

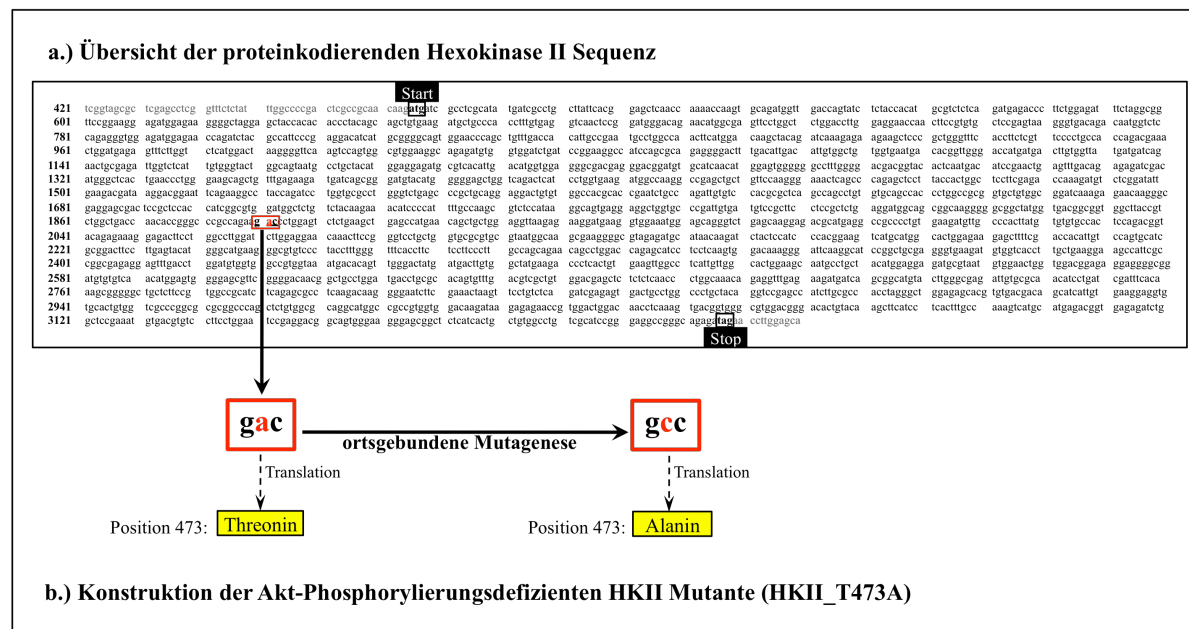


Abbildung 13: a.) und b.) Übersicht der Herstellung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante (HKII_T473A). Zur Ausschaltung des Akt-Phosphorylierungsmotifs im Hexokinase II (HKII) Gen wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Threonin (T) an Position 473 der HKII Aminosäuresequenz zu Alanin (A) mutiert.

Die Konstruktion des HKII Inserts ist in Kapitel 2.2.3. dargestellt und die verwendeten Oligonukleotidprimer in Tabelle 2 aufgeführt. Das PCR-Produkt AD und der HKII Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen *StuI* und *BstEII* verdaut und anschließend miteinander ligiert.

Primername	Sequenz (in 5' zu 3'-Orientierung)	Referenz	T _m [°C]
HKII_muta_A	ttcagaaggcctaccagatcctgtg	NM_013820.3	66,4°C
HKII_muta_B	ttcagagactccagggccttctggeg	NM_013820.3	71,0°C
HKII_muta_C	ccgccagaaggccctggagtctctgaa	NM_013820.3	71,0°C
HKII_muta_D	tccttcagcaaggtgaccacatcttc	NM_013820.3	64,8°C

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer für die Konstruktion der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante (HKII_T473A).

2.2.3.3. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante

Zur Herstellung der Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D) wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Threonin (T) an Position 473 der HKII-Sequenz zu Aspartat (D) mutiert und somit die Akt-Kinase/Protein-Kinase B Phosphorylierungstelle scheinbar phosphoryliert.

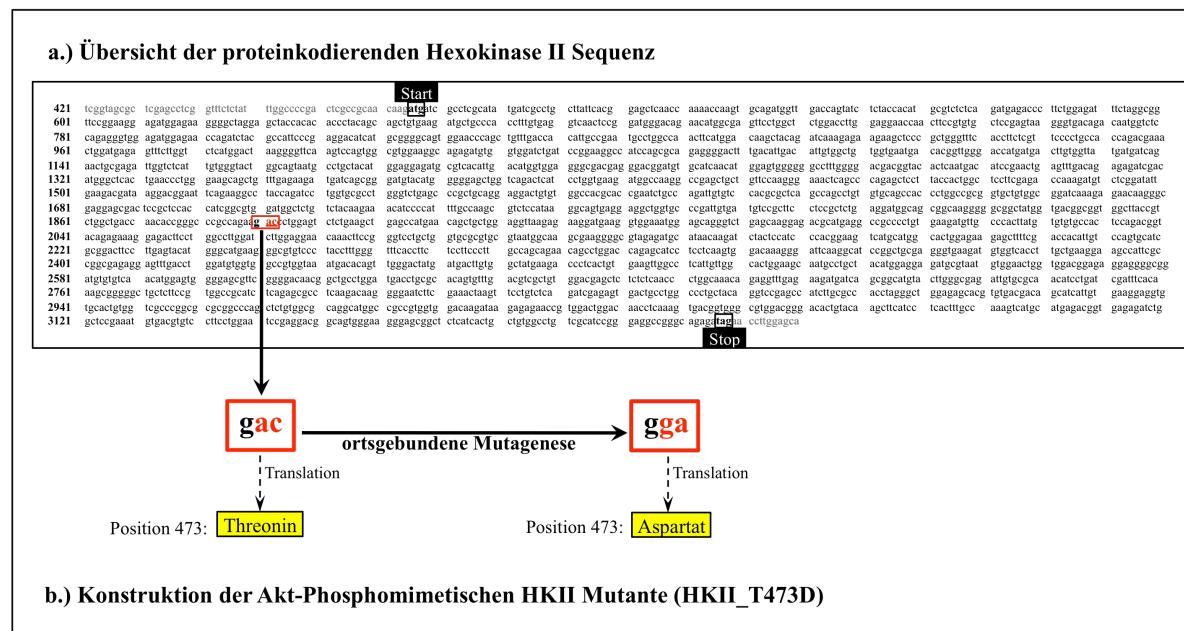


Abbildung 14: a.) und b.) Übersicht der Herstellung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D). Zur Imitierung einer Phosphorylierung im Akt-Phosphorylierungsmotif der Hexokinase II (HKII) wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Threonin (T) an Position 473 der HKII Aminosäuresequenz zu Aspartat (D) mutiert.

Für die Konstruktion der Phosphomimetischen HKII Mutante wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Primer genutzt. Die Klonierung ist in Kapitel 2.2.3. dargestellt. Das PCR-Produkt AD wurde mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *BstEII* in den HKII Vektor eingefügt.

Primername	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)	Referenz	T _m [°C]
HKII_muta_A	ttcagaaggcctaccagatcctgtg	NM_013820.3	66,4°C
HKII_phosph_B	ttcagagactccaggctcttctg	NM_013820.3	69,5°C
HKII_phosph_C	ccgccagaaggacctggagtctctg	NM_013820.3	69,5°C
HKII_muta_D	tccttcagcaagggtaccacatcttc	NM_013820.3	64,8°C

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer die für Konstruktion der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D).

2.2.3.4. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der HKII-BH-4 Domäne Mutante

Zur Herstellung der HKII-BH4 Domäne Mutante (HKII_R755Q) wurde mittels ortsgebundener Mutagenese der Aminosäure Arginin (R) an Position 755 der HKII Sequenz zu Glutamin (Q) mutiert. Die postulierte C-terminale HKII-BH4 Domäne basiert auf einer vergleichenden Strukturanalyse in der Aminosäure-Übereinstimmungen zwischen der HKII und antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2 Familie gefunden wurden. Die Aminosäure Arginin an Position 755 der Hexokinase Sequenz wurde für die Mutation ausgewählt, da sie nicht nur eine strukturelle Übereinstimmung zum stark antiapoptotischen Gen Bcl-x_L darstellt, sondern auch eine hochkonservierte Aminosäure innerhalb der Bcl-2 Proteine ist.

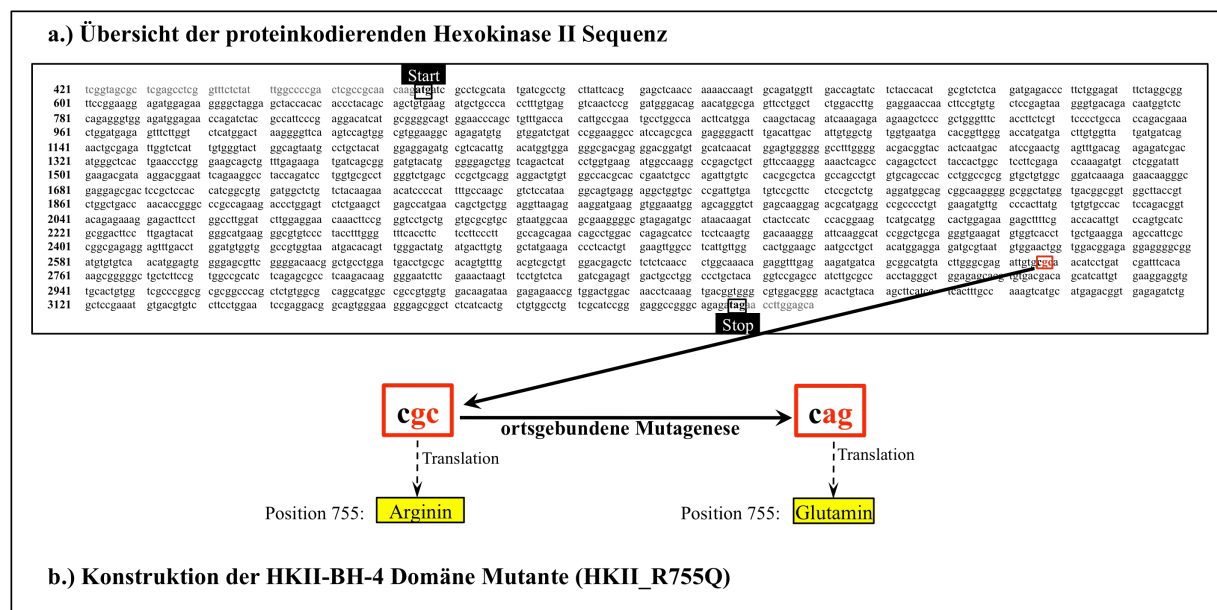


Abbildung 15: a.) und b.) Schematische Darstellung der HKII-BH-4 Domäne Mutante (HKII_R755Q). Zur

Ausaltung der putativen Hexokinase II (HKII)-BH-4 Domäne wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Aspartat (R) an Position 755 der HKII Aminosäuresequenz zu Glutamin (Q) mutiert.

Die Konstruktion der HKII-BH-4 Domäne Mutante ist in Kapitel 2.2.3. dargestellt und die verwendeten Oligonukleotid-Primer in Tabelle 4 aufgelistet. Das Produkt der zweiten PCR wurde mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *NheI* verdaut und in den HKII Vektor kloniert.

Primername	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)	Referenz	T _m [°C]
HKII_BH4_muta_A	gaagatgtggtcaccttctgctgaagga	NM_013820.3	64,8°C
HKII_BH4_muta_B	tcgatcaggatgttctgcacaatctcg	NM_013820.3	65,0°C
HKII_BH4_muta_C	cgagattgtgcagaacatcctgatcga	NM_013820.3	65,0°C
mHK2+NheI_Rev1	acgtcgtctagcctatctctcccggcctcccg	NM_013820.3	> 75°C

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer für die Konstruktion der HKII-BH-4 Domäne Mutante.

2.2.3.5. Konstruktion des Vektors zur Untersuchung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante

Bei der Klonierung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante (HKII_S155A/S603A) wurde mit Hilfe ortsgebundener Mutagenese sowohl N-terminal (S155A) als auch C-terminal (S603A) die Aminosäure Serin zu Alanin verändert und damit die katalytisch-aktiven Zentren des HKII Gens ausgeschaltet (Tsai and Wilson, 1996).

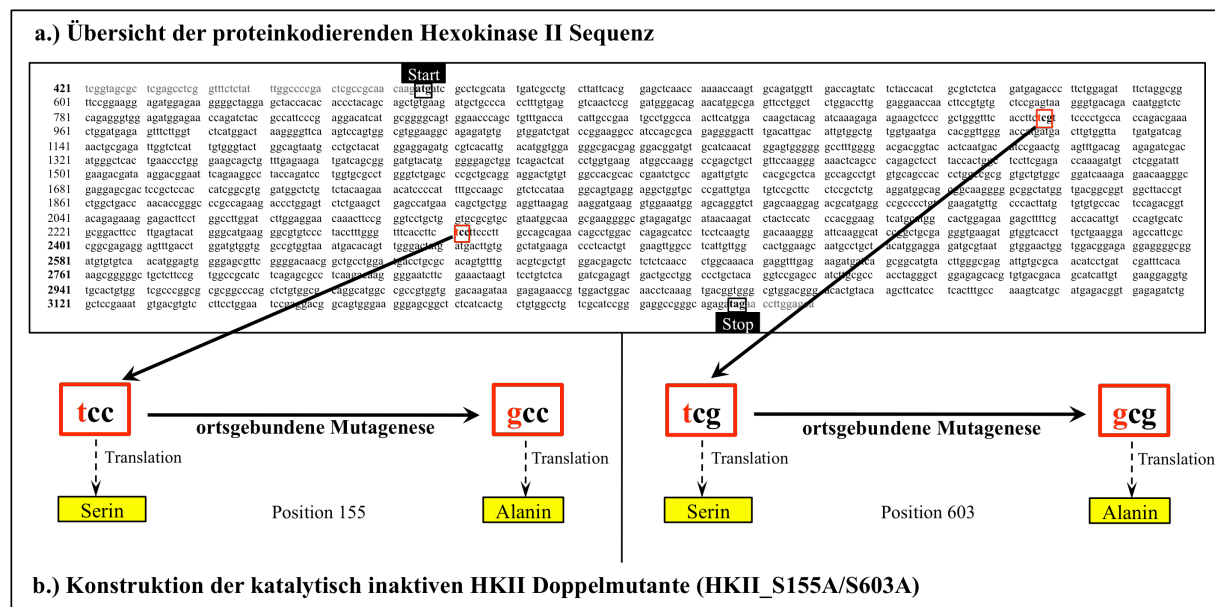


Abbildung 16: a.) und b.) Schematische Darstellung der katalytisch-inaktiven HKII Mutante (HKII_S155A/S603A). Zur Ausschaltung der katalytischen Zentren im Hexokinase II (HKII) Gen wurde mittels ortsgebundener Mutagenese die Aminosäure Serin (S) an Position 155 und 603 der HKII Aminosäuresequenz zu Alanin (A) mutiert.

Die Generierung der Einzelmutationen ist im Kapitel 2.2.3. beschrieben und die verwendeten Oligonukleotid-Primer in Tabelle 5 aufgeführt. Beide Einzelmutationen wurden nacheinander in einen gemeinsamen HKII Vektor kloniert. Das PCR-Produkt mit der Mutation HKII_S155A wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRV* in den HKII Vektor eingefügt, während für das Insert HKII_S603A die Restriktionsschnittstellen *StuI* und *BstEII* genutzt wurden.

Primername	Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)	Referenz	T _m [°C]
mHK2+Nco1Fwd	acgtcccatggatgatgcctcgcat	NM_013820.1	68,0°C
HKII_Ser155_Pr_B	tctggtggcaggggaacgcgaaggtgaaacca	NM_013820.1	65,0°C
HKII_Ser155_Pr_C	tgggtttcaccttcgcttccctgccaccaga	NM_013820.1	65,0°C
HKII_Asp209_Pr_D	actcagttcggatatacattgagtgtac	NM_013820.1	61,9°C
HKII_Ser603_Pr_A	tgaccaacaccgggcccgcagaagac	NM_013820.1	72,6°C
HKII_Ser603_Pr_B	tgtctgctggcaaggaagcgaaggtgaaaccaaaggta	NM_013820.1	> 75°C
HKII_Ser603_Pr_C	taccttgggttcaccttcgcttccctgccagaca	NM_013820.1	> 75°C

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Konstruktion der katalytisch-inaktiven HKII Mutante.

2.2.3.6. Sequenzierung der Expressionsvektoren

Die Sequenzierung der Konstrukte wurde von AGOWA, Berlin übernommen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach den Vorgaben der Firma. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 6 aufgelistet. Zur Auswertung der Sequenzierungen wurde das Programm BLAST des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet.

Sequenzierungsprimer	Sequenz (in 5' zu 3'-Orientierung)
pCAG-Ins_Fwd	ttcggcttctggcgtgtgac
pCAG-Ins_Rev	gtggtttgtccaaactc
HKII_seq_Fwd_A	tacagatcaaagagaagaagctc
HKII_seq_Rev_A	ctggatggccttccggatcag
HKII_seq_Fwd_B	cagcccagagctccttaccac
HKII_seq_Fwd_C	ggagcagggctctgagcaagg
HKII_seq_Fwd_D	ctatgatgacttggctatgaag
HKII_seq_Fwd_E	aggtgtgactgtgtgcgc
HKII_seq_Fwd_F	cggctctcatcactgctgtgg

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Hexokinase II (HKII) Sequenzierungsprimer.

2.2.4. Western Blot

2.2.4.1. Gewinnung der Zellen für die Western Blot-Analyse

Für den Western Blot wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung auf einer 6er-Zellkulturplatte ausgesät. Eine Platte mit 9×10^6 primären Kortexneuronen entsprach jeweils einem Zustand im Western Blot. Die Neurone wurden am 9. Tag nach Transfektion und Kultivierung geerntet. Alle Arbeitsschritte nach Entnahme der Zellkulturplatten aus dem Inkubator wurden auf Eis durchgeführt. Das Medium wurde von den Platten entfernt, die adhären Zellen mit PBS gespült und mittels Zellschaber von den Zellkulturplatten gelöst. Zum Abschaben wurden pro Vertiefung 100 μl PBS eingesetzt und die entstandene Zellsuspension in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Zur Entfernung des PBS-Puffers wurden die Neurone bei 720 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 200 μl Ripa-Puffer resuspendiert. Dem Ripa-Puffer wurden zuvor Protease-Inhibitoren zugesetzt. Zur Prozessierung der Zellyse folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die anschließende Zentrifugation wurde bei 14.000 rpm für 10 Minuten und 4°C durchgeführt. Der flüssige Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Entnahme von 10 μl Proteinlysate für die Proteinbestimmung wurden die Proben entweder bei -80°C gelagert oder für den Western-Blot aufgearbeitet.

2.2.4.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Die Bestimmungsmethode basiert auf der Biuret-Reaktion, einer Bildung von Komplexen zwischen Proteinen und Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) in alkalischer Lösung. Die Cu^{2+} -Ionen werden dabei reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff. Die Gesamtproteinmenge wird durch die Intensität des Farbumschlages von grün zu violett im Absorptionsspektrum von 562 nm bestimmt. Als Referenz diente ein BSA-Standard in bekannter Konzentration. Für die Proteinbestimmung wurden jeweils 10 μl Proteinlysate verwendet und 1:10 in Ripa-Puffer verdünnt. Es wurden Doppelbestimmungen der Proben durchgeführt.

2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte nach dem Molekulargewicht mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Es wurden 1mm dicke Precise™ Proteingele der Firma Pierce mit einem 4-20%igen oder 8-16%igen Gradienten verwendet. Die Gele wurden in die Elek-

trophorese-Kammer eingespannt und die Kammer mit 1 x Tris-HEPES-SDS-Laufpuffer befüllt. Vor Auftragung der Proteinproben wurden die Taschen mit dem Laufpuffer gespült, um vorhandene Gelreste zu entfernen. Die Proteinproben wurden mit vierfach SDS-Probenpuffer im Verhältnis von 4:1 versetzt und anschließend im Heizblock bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Zur Aufhebung der Disulfidbrücken enthielt der SDS-Probenpuffer β -Mercaptoethanol. Es wurden 40 μ l Probe pro Geltasche mit einer Hamilton-Pipette aufgetragen und das Proteingemisch für eine Stunde bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Proteinmolekulargewichtsmarker diente Page-Ruler der Firma Fermentas. Sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer gelegt.

2.2.4.4. Durchführung der Western Blot-Analyse

Bei der Western Blot-Analyse wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) übertragen. Als Blotkammer wurde eine Halbtrockenzelle gewählt und Tris-Glycin Puffer pH 8.3 mit 20% Methanol diente als Transferpuffer. Da trockene PVDF-Membranen nicht durch wässrige Lösungen benetzt werden können, musste die Membran vor Gebrauch 5 Minuten in Methanol quellen. Zusätzlich wurde die Membran mit Tris-Glycin Puffer angefeuchtet. Auf drei Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier wurde nun die PVDF-Membran gelegt und darüber blasenfrei das Gel gebettet. Auf das Gel wurden wiederum drei Lagen durchfeuchtetes Filterpapier gelegt, die Kammer verschlossen und für zwei Stunden eine Spannung von 15 Volt angelegt.

Anschließend wurde die PVDF-Membran mit 5%-iger, entfetteter Milch in TBS-Tween bei Raumtemperatur eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Durch die Milch wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran abgesättigt, sodass später weniger unspezifische Bänder auf dem fertigen Blotfilm sichtbar waren. Darauf folgend wurde die Blotmembran mit dem anti-Antigen-Antikörper (1. AK) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Ungebundene anti-Antigen-Antikörper wurden durch anschließendes Waschen der Membran mit TBS-Tween für dreimal 10 Minuten entfernt. Die Membran wurde nun für weitere 2 Stunden mit dem 2. Antikörper (2. AK) bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut für zweimal 10 Minuten mit TBS-Tween und als letztes einmal mit TBS gewaschen. Da es sich bei dem zweiten Antikörper um einen peroxidasemarkierten Antikörper handelte, konnte dieser nach Auftragung von ECL-Lösung die Oxidation von Luminol katalysieren und damit eine Chemilumineszenz auslösen. Für eine PVDF-Membran wurden jeweils 4 ml

ECL-Lösung in einer Konzentration von 1:1 der Lösung A und B eingesetzt. Die Membran wurde für 2 Minuten mit dem Detektionsreagenz inkubiert und anschließend in Plastikfolie eingeschlagen. Die entstandene Lumineszenz wurde durch Belichtung eines Films für 30 Sekunden bis 15 Minuten mit der Membran detektiert bzw. mit Hilfe einer Western Blot-Kamera entwickelt.

Als Proteinladekontrolle wurde die Membran zusätzlich mit einem Antikörper gegen β -Actin, einem in Eukaryoten ubiquitär vorkommenden Protein des Zytoskeletts, inkubiert.

Spezifität	Molekulargewicht	Herkunft	Konzentration	Firma
Anti-HKII	100 kDa	Ziege	1:200	Santa Cruz
Anti- β -Actin	42 kDa	Ziege	1:1000	Santa Cruz
Anti-Ziege		Affe	1:5000	Santa Cruz

Tabelle 7: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot.

2.2.5. Statistische Auswertung

Nach Errechnung der Ratio aus grün und orange fluoreszierenden Zellen für die einzelnen OGD-Experimente, wurden die Mittelwerte der Ratio Zahlenwerte separat für alle Transfektionszustände prä und post OGD ermittelt. Dies war notwendig, um später unabhängige Werte miteinander vergleichen zu können. In die Statistik ging folglich nur ein prä und post OGD Zahlenwert je Transfektionszustand und OGD-Experiment ein. Die statistische Analyse der Zellkulturexperimente erfolgte mit Hilfe der PASW 18 Software. Die metrische Verteilung der Daten wurde durch eine explorative Datenanalyse überprüft. Eine Schiefe unter ± 1 wurde als symmetrisch betrachtet. Weiterhin wurde mit Hilfe des Lilliefors und Shapiro-Wilk Tests (modifizierte Kolmogorov-Smirnov-Tests) die Normalverteilung der Daten überprüft. Zur graphischen Darstellung wurden Box-Whiskers-Plots erstellt. Die obere und untere Begrenzung der Box entsprechen definitionsgemäß der 75. und 25. Perzentile, wobei der Median zusätzlich innerhalb der Box gekennzeichnet ist. Die 5. und 95. Perzentile wurden durch Whiskers, Ausreißer als Kreise und Extremwerte als Rauten markiert.

Bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde eine one-way ANOVA (one-way analysis of variance) mit dem Duncan-Test als posthoc Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ durch *, beziehungsweise $p < 0,01$ durch ** gekennzeichnet. Die durchgeführte Anzahl an Experimenten (n) und p-Werte sind in den jeweiligen Abbildungen der Box-Whiskers-Plots angegeben.

3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konzentrieren sich auf die funktionelle Charakterisierung der molekularen Mechanismen der Hexokinase II (HKII) vermittelten Protektion im Gehirn. Die Fragestellung basiert auf zuvor in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten, welche unter hypoxischen Bedingungen einen schützenden Effekt der HKII-Überexpression in der neuronalen Zellkultur zeigten (Mergenthaler *et al.*, 2012). Zur Untersuchung der protektiven Eigenschaften der HKII wurden mit Hilfe von ortsgebundener Mutagenese bekannte, strukturell und regulatorisch wichtige Domänen innerhalb der HKII verändert und in einem *in vitro* Schadensmodell der zerebralen Ischämie auf ihre Funktionalität getestet. Zum Expressionsnachweis der HKII Mutanten wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

3.1. *Bedeutung der mitochondrialen Lokalisation der HKII für die Vermittlung von Neuroprotektion*

Um den Einfluss der mitochondrialen Lokalisation der HKII im Rahmen der Neuroprotektion zu untersuchen, wurde eine mitochondriale Lokalisationssequenz defiziente HKII Mutante (HKII_Del21AS) generiert und im kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivationsmodell auf ihre zellschützenden Eigenschaften getestet (Sun *et al.*, 2008).

In 10 unabhängigen OGD-Experimenten konnte eine komplette Aufhebung des HKII-vermittelten Zellschutzes bei der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante gezeigt werden. Dieser negative Effekt der trunkierten HKII Variante auf das Neuronenüberleben ist im Box-Whiskers-Plot (Abb. 17) sowohl vor als auch nach der OGD durch eine Ratio < 1 dargestellt. Das Vorhandensein von mehr orange fluoreszierenden Kontrollzellen im Vergleich zu den grün fluoreszierenden Zellen macht deutlich, dass die Kotransfektion aus eGFP und der HKII Mutante einen schädigenden Effekt auf die Neurone ausübt. Die destruktive Wirkung der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Variante zeigt sich insbesondere gegenüber der HKII Wildtyp transfizierten Neuronenkultur, da hier das Mengenverhältnis im prä und post OGD-Zustand zu Gunsten der HKII kotransfizierten, grün fluoreszierenden Zellen verschoben ist (Ratio > 1). Die Zunahme der HKII Wildtyp transfizierten grün fluoreszierenden Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten orangenen Zellen im post OGD-Zustand zeigt, dass der HKII-vermittelte protektive Effekt nach Hypoxieexposition verstärkt wird. Der neuronale Überlebensvorteil der HKII Wildtyp Überexpression ist auch gegenüber der einfach eGFP transfizierten Kontrolle mit gleichen Mengenverhältnissen zwischen grünen und orange-

nen Neuronen (Ratio = 1) im Box-Whiskers-Plot sichtbar. Die Kotransfektion aus antiapoptotischen Bcl-x_L und eGFP fungiert als Positivkontrolle und stellt erwartungsgemäß ein Überlebensvorteil der grün fluoreszierenden Neurone im Vergleich zur internen, einfach m-orange transfizierten Kontrollpopulation dar, wobei der protektive Effekt im post OGD-Zustand zunimmt (Ratio > 1).

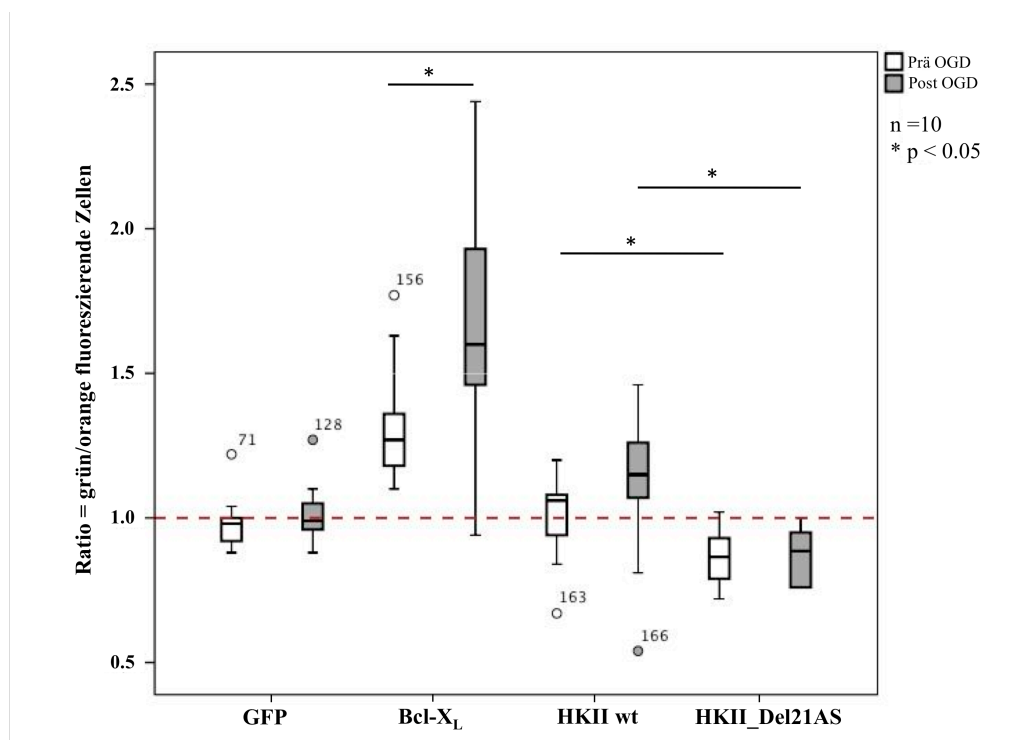


Abbildung 17: Box-Whiskers-Plot der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante (HKII_Del21AS). In der multivariaten Analyse ist eine Aufhebung der zellschützenden Hexokinase II (HKII) Effekte und zugleich eine schädigende Wirkung bei der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante (HKII_Del21AS) vor und nach der kombinierten Sauerstoff und Glukose-Deprivation (OGD) nachweisbar (Ratio < 1). Dieser negative Effekt der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Variante wird insbesondere gegenüber der HKII Wildtyp Transfektion und der Negativkontrolle mit eGFP einfach transfizierten Zellen deutlich. Dementsprechend stellt sich die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur mit einem protektiven Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle nach OGD dar (Ratio > 1). Die Positivkontrolle mit eGFP und Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen zeigt vor und nach der OGD eine neuroprotektive Wirkung auf die Zellen (Ratio > 1).

3.2. *Bedeutung der Akt-Phosphorylierung der HKII für die Vermittlung von Neuroprotektion*

Neben der strukturellen Notwendigkeit einer mitochondrialen Signalsequenz sind für den mitochondrialen Kompartimentwechsel der HKII und der damit assoziierten Neuroprotektion zusätzlich regulatorische Mechanismen von Bedeutung. Insbesondere die Aktivierung des Phosphati-

dylinositol-3-Kinase/Akt-Signalwegs (PI3K/Akt) wird über eine damit einhergehende Phosphorylierung des HKII Proteins als ein potenter Stimulus für die mitochondriale Bindung der HKII angesehen. Um die zellschützende Wirkung der Akt-Phosphorylierung der HKII zu untersuchen, wurden basierend auf Miyamoto *et al.*, 2008 zwei HKII Mutanten konstruiert. Die im Akt-Phosphorylierungsmotif zugrunde liegende Konsensussequenz **RXRXXS/T** beinhaltet ein Threonin an Position 473. Diese Aminosäure stellt eine hochkonservierte Aminosäure innerhalb der Hexokinasesequenz von Mensch, Ratte und Maus dar und wird für die Akt-phosphorylierungsspezifischen Eigenschaften der HKII verantwortlich gemacht (Miyamoto *et al.*, 2008).

3.2.1. Akt-Phosphorylierungsdefiziente HKII Mutante verfügt über keine neuroprotektiven Eigenschaften

Bei der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante (HKII_T473A) wurde die Aminosäure Threonin an Position 473 der Hexokinase II Sequenz durch Alanin ersetzt, da diese keine Zielstruktur der Akt-Kinase darstellt.

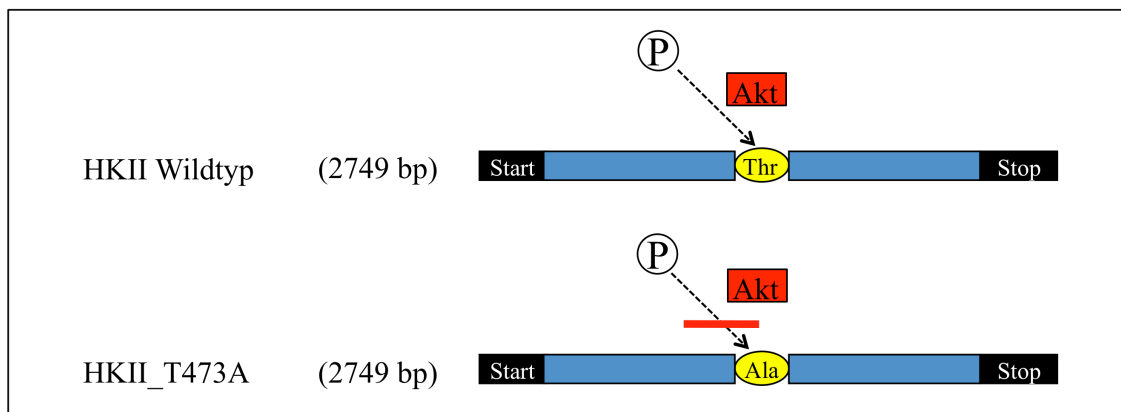


Abbildung 18: Darstellung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante (HKII_T473A). Die Aminosäure Threonin im Akt-Phosphorylierungsmotif der Hexokinase II (HKII) wurde durch Alanin ersetzt und stellt folglich keine Zielstruktur der Akt-Kinase dar.

In 10 unabhängigen OGD-Experimenten zeigte sich bei der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante eine Aufhebung der HKII-vermittelten Neuroprotektion. Dieser zellschädigende Effekt der ausgeschalteten Akt-Phosphorylierungstelle ist im Box-Whiskers-Plot (Abb. 19) sowohl vor als auch nach der OGD durch das Vorhandensein von mehr orange fluoreszierenden Kontrollzellen im Vergleich zu den mit der HKII Mutante und dem Fluoreszenzprotein eGFP kotransfizierten grünen Zellen sichtbar (Ratio < 1). Im Gegensatz dazu zeigt sich die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur mit einem zu Gunsten der grün fluoreszierenden Zellen ver-

schobenen Neuronenverhältnis (Ratio > 1). Die relative Zunahme der kotransfizierten grünen Zellen im Vergleich zu den einfach transfizierten Kontrollzellen im post OGD-Zustand impliziert eine Verstärkung der HKII Wildtyp vermittelten Protektion nach Hypoxie. Der neuronale Überlebensvorteil der HKII Wildtyp Überexpression und die zellschädigende Wirkung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante werden in der Box-Plot Darstellung besonders im Vergleich zur einfach eGFP transfizierten Kontrolle mit gleichen Mengenverhältnissen zwischen grün und orangenen Neuronen (Ratio = 1) deutlich. Bei der Positivkontrolle mit Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen ist das Zahlenverhältnis zu Gunsten der grün fluoreszierenden Zellen verschoben, wobei die protektive Wirkung von Bcl-x_L durch die OGD verstärkt wird (Ratio > 1).

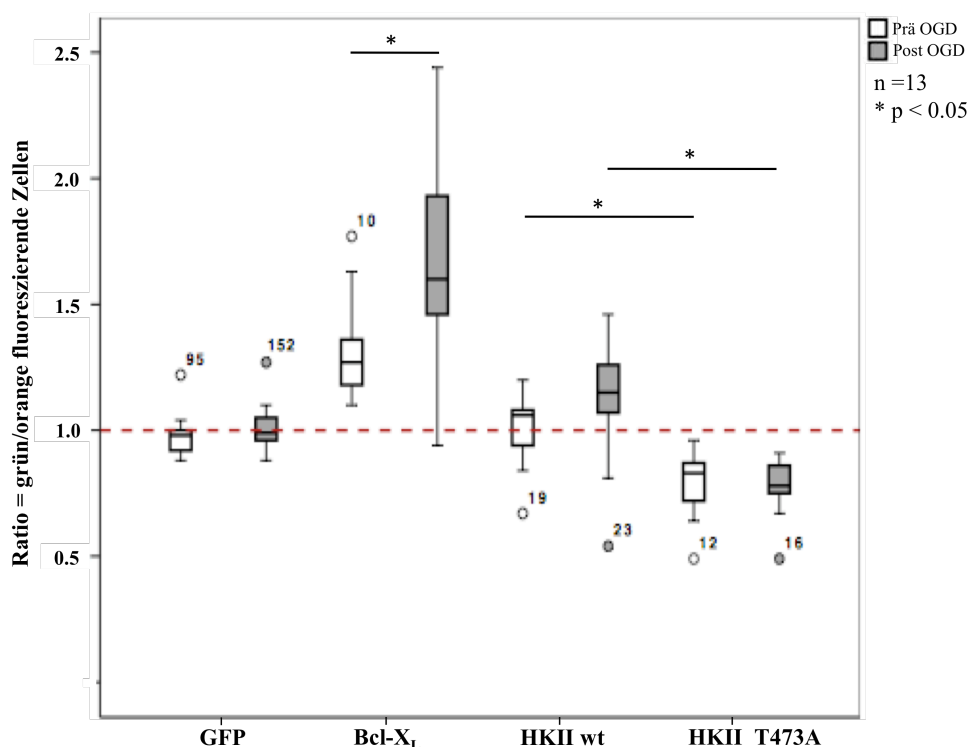


Abbildung 19: Box-Whiskers-Plot der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante (HKII_T473A).

In der multivariaten Analyse ist sowohl eine Aufhebung der zellschützenden Effekte als auch eine schädigende Wirkung der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante vor und nach der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (OGD) nachweisbar (Ratio < 1). Dieser negative Effekt der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Variante wird insbesondere gegenüber der HKII Wildtyp Transfektion und der Negativkontrolle mit eGFP einfach transfizierten Zellen deutlich. So stellt sich die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur mit einem protektiven Effekt (Ratio > 1) im Vergleich zur Negativkontrolle (Ratio = 1) nach OGD dar. Die Positivkontrolle mit eGFP und Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen zeigt prä und post OGD eine neuroprotektive Wirkung auf die Zellen (Ratio > 1).

3.2.2. Phosphomimetische HKII Mutante verfügt über neuroprotektive Eigenschaften

Um die Bedeutung der Akt-bedingten HKII-Phosphorylierung in der neuronalen Zellkultur besser charakterisieren zu können, wurde zusätzlich eine Akt-Phosphomimetische HKII-Mutante generiert. Basierend auf Miyamoto *et al.*, 2008 wurde mittels ortsgebundener Mutagenese ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Aspartat an Position 473 bewirkt, was folglich eine Threonin-Phosphorylierung im HKII Protein imitierte (Abb. 20).

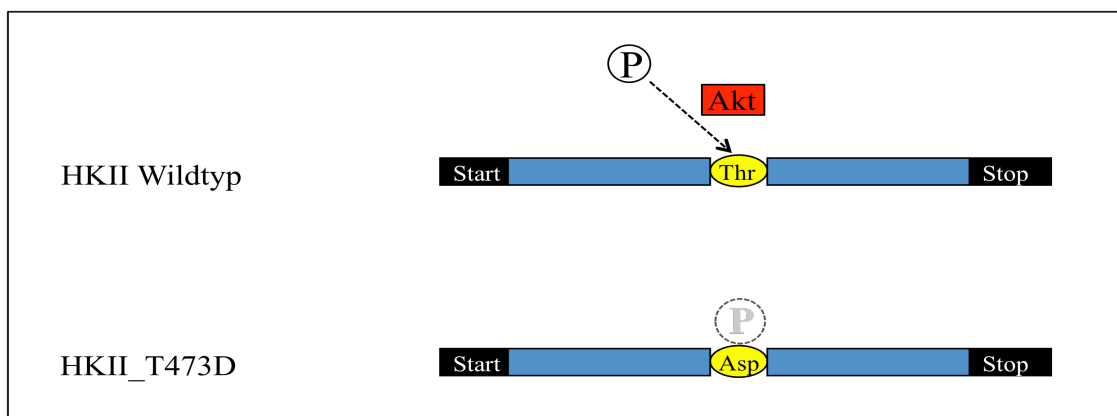


Abbildung 20: Darstellung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D). Die Aminosäure Threonin im Akt-Phosphorylierungsmotif der Hexokinase II (HKII) wurde durch Aspartat ersetzt und bewirkt eine scheinbare Phosphorylierung der HKII.

Bei Testung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D) in 11 unabhängigen Zellkulturexperimenten war eine protektive Wirkung der Mutante auf die neuronale Zellvitalität zu beobachten. Dieser zellschützende Effekt der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante ist im Box-Whiskers-Plot (Abb. 21) durch das Vorhandensein von mehr, mit der HKII Variante und dem Fluoreszenzprotein eGFP kotransfizierten grünen Zellen im Vergleich zu den orange fluoreszierenden Kontrollzellen innerhalb der Neuronenkultur sichtbar (Ratio > 1). Im Gegensatz zur HKII Wildtyp transfizierten Neuronenkultur unterliegt die Akt-Phosphomimetische HKII Mutante keiner relativen Zunahme der kotransfizierten, grünen Zellen im Vergleich zu den einfach transfizierten Kontrollzellen im post OGD-Zustand. Dies impliziert, dass die neuroprotektive Wirkung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante nicht durch eine Hypoxieexposition der Zellen verstärkt werden kann. Der neuronale Überlebensvorteil der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante und der HKII Wildtyp Überexpression wird in der Box-Plot Darstellung, insbesondere im Vergleich zur einfach eGFP transfizierten Kontrolle, mit gleichen Mengenverhältnissen zwischen grün und orangenen Neuronen (Ratio = 1) verdeutlicht. Die Kotransfektion aus antiapoptotischen Bcl-x_L und eGFP fungiert als Positivkontrolle und hat einen schützenden Ein-

fluss auf das Überleben der grün fluoreszierenden Neurone im Vergleich zur internen einfach m-orange transfizierten Kontrollpopulation (Ratio > 1). Der zellschützende Effekt von Bcl-x_L wird im post OGD-Zustand verstärkt, dargestellt durch eine Zunahme der Ratio zwischen grün und orange fluoreszierenden Zellen.

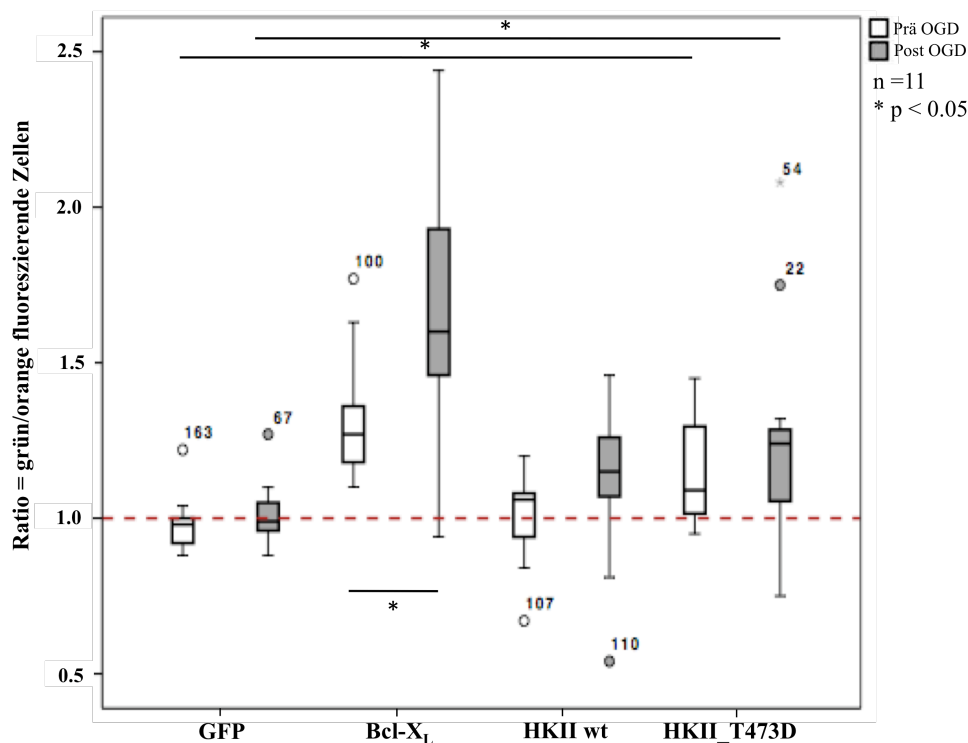


Abbildung 21: Box-Whiskers-Plot der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D).

In der multivariaten Analyse ist eine zellschützende Wirkung der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante (HKII_T473D) vor und nach der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (OGD) nachweisbar (Ratio > 1). Der neuroprotektive Effekt der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante wird durch die OGD nicht verstärkt. Die positive Wirkung der Akt-Phosphomimetischen HKII Variante wird insbesondere gegenüber der Negativkontrolle mit eGFP einfach transfizierten Zellen deutlich (Ratio = 1). Die antiapoptotische Potenz der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante übertrifft die des HKII Wildtyp Expressionsvektors im prä OGD Zustand. Die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur stellt sich mit einem protektiven Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle nach OGD dar (Ratio > 1). Die Positivkontrolle mit eGFP und Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen zeigt vor und nach OGD eine neuroprotektive Wirkung auf die Zellen (Ratio > 1).

3.3. Bedeutung der putativen HKII-BH-4 Domäne für die Vermittlung von Neuroprotektion

Im Rahmen der mechanistischen Klärung der neuroprotektiven Wirkung der HKII wurde von Pastorino und Hoek, 2003 eine antiapoptotische BH-4 Domäne im C-Terminus der HKII postuliert. Die Autoren stützen ihre These auf deskriptive Daten, welche durch eine vergleichende

Strukturanalyse zwischen antiapoptotischen Bcl-2 Vertretern und der HKII erhoben worden sind. Der durchgeführte Sequenzvergleich ergab eine BH-4 homologe Region der HKII im Bereich der Aminosäuren 753-773 (Abb. 22).

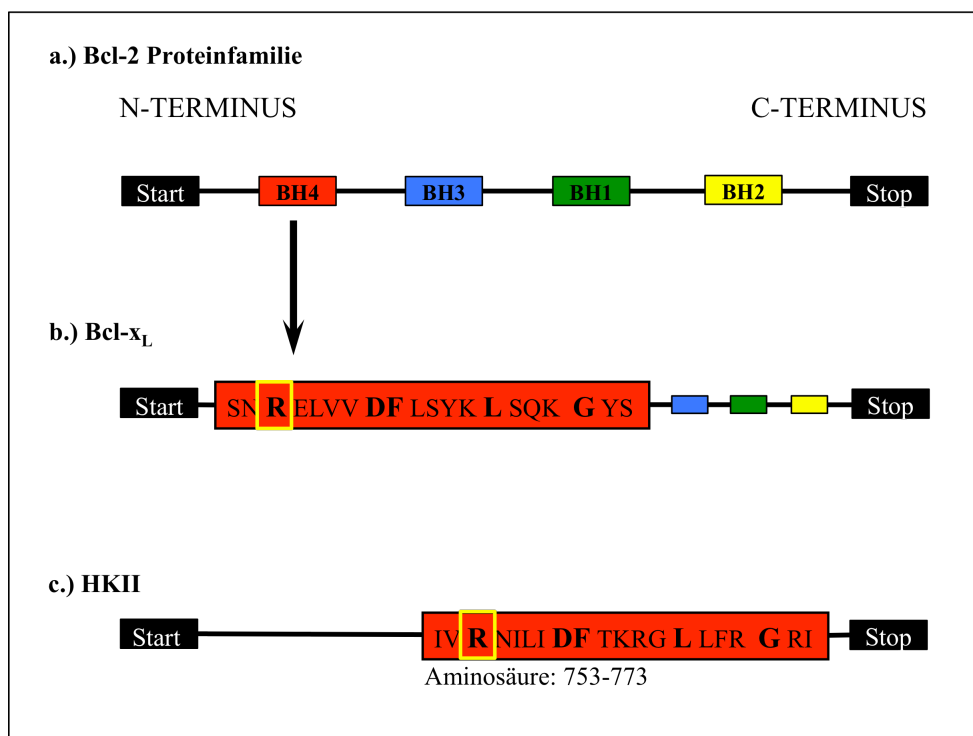


Abbildung 22: Darstellung der HKII-BH-4 Domäne defiziente Mutante (HKII_R755Q). a.) Charakteristische BH Domänen Anordnung innerhalb der Bcl-2 Familie. b.) BH-4 Domäne von Bcl-x_L. c.) putative HKII-BH-4 Domäne mit Markierung von Aminosäure-Homologien und Einrahmung der Mutationsstelle.

Um die Funktionalität der postulierten HKII-BH-4 Domäne experimentell zu untersuchen, wurde basierend auf den Überlegungen von Pastorino und Hoek eine HKII-BH-4 Domäne defiziente Mutante (HKII_R755Q) mittels ortsgebundener Mutagenese generiert. Für die Mutation wurde die Aminosäure Arginin an Position 755 der HKII Sequenz ausgewählt, da sie nicht nur eine strukturelle Übereinstimmung zum stark protektiven Protein Bcl-x_L ist, sondern auch eine hochkonservierte Aminosäure unter den anderen antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2 Familie darstellt. Durch Punktmutation wurde die Aminosäure Arginin zu Glutamin verändert und anschließend auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften getestet.

In 11 unabhängigen OGD-Experimenten zeigte sich bei der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante (HKII_R755Q) eine vollständige Aufhebung der HKII-vermittelten Neuroprotektion. Dieser zellschädigende Effekt der HKII Mutante ist im Box-Whiskers-Plot (Abb. 23) vor und nach OGD durch das Vorhandensein von mehr orange fluoreszierenden Kontrollzellen im Vergleich zu den mit der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante und dem Fluoreszenzprotein eGFP kotransfizierten grünen Zellen sichtbar (Ratio < 1). Im Gegensatz dazu stellte sich die

HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur mit einem zu Gunsten der grün fluoreszierenden Zellen verschobenen Neuronenverhältnis dar (Ratio > 1). Die relative Zunahme der kotransfizierten grünen Zellen im Vergleich zu den einfach transfizierten Kontrollzellen im post OGD-Zustand impliziert, dass der protektive Effekt der HKII Wildtyp Transfektion nach Hypoxieexposition der Zellen verstärkt wird. Der neuronale Überlebensvorteil der HKII Wildtyp Überexpression und die zellschädigende Wirkung der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante werden in der Box-Plot Darstellung, insbesondere im Vergleich zur einfach eGFP transfizierten Kontrolle mit gleichen Mengenverhältnissen zwischen grün und orangenen Neuronen (Ratio = 1), verdeutlicht. Bei der Positivkontrolle mit Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen ist das Zahlenverhältnis erwartungsgemäß zu Gunsten der grün fluoreszierenden Zellen verschoben (Ratio > 1). Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-x_L verstärkt sich nach OGD.

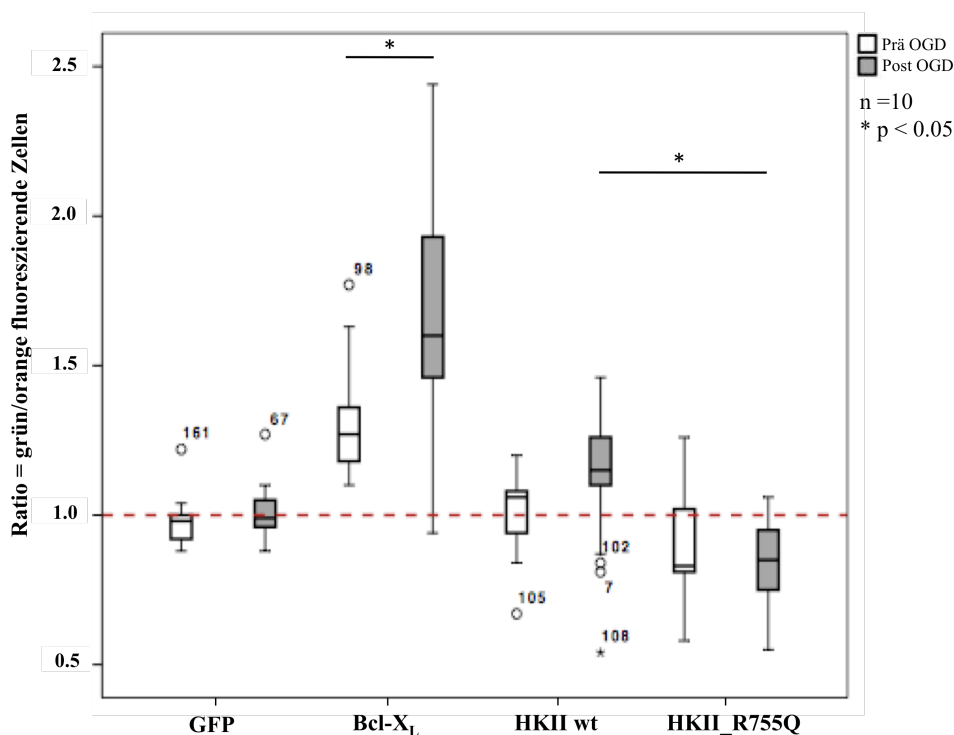


Abbildung 23: Box-Whiskers-Plot der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante (HKII_R755Q).

In der multivariaten Analyse ist eine Aufhebung der zellschützenden Effekte und schädigende Wirkung der HKII-BH-4 Domäne defizienten Mutante vor und nach kombinierter Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (OGD) nachweisbar (Ratio < 1). Dieser negative Effekt der HKII Variante wird insbesondere gegenüber der HKII Wildtyp Transfektion und der Negativkontrolle mit eGFP einfach transfizierten Zellen deutlich und verstärkt sich nach OGD. Die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur stellt sich mit einem protektiven Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle nach OGD dar (Ratio > 1). Die Positivkontrolle mit eGFP und Bcl-x_L kotransfizierten Neuronen zeigt vor und nach OGD eine neuroprotektive Wirkung (Ratio > 1).

3.4. Bedeutung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante für die Vermittlung der Neuroprotektion

Um den Einfluss des Glukosemetabolismus und damit der katalytischen Aktivität auf die neuroprotektiven Eigenschaften der HKII zu testen, wurde eine katalytisch-inaktive Hexokinase II Doppelmutante (HKII_S155A/S603A) generiert. Dazu wurden die in der Literatur beschriebenen C-terminal (S603) und N-terminal (S155) lokalisierten, funktionellen Zentren des HKII Proteins mittels ortsgebundener Mutagenese ausgeschaltet (Tsai und Wilson, 1996). In beiden Fällen wurde Serin durch Alanin ersetzt (S155A und S603A) was gemäß Tsai und Wilson im Einzelfall zu einer 60% reduzierten und in der Doppelmutante zu einer 90% reduzierten katalytischen Aktivität der HKII führt. Zur Charakterisierung der funktionellen Bedeutung des Substrats Glukose für die HKII-vermittelte Neuroprotektion wurden die mit der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante transfizierten Neuronenkulturen in parallelen Experimenten einer reinen Sauerstoff-Deprivation (OD, Abb. 24) oder einer reinen Glukose-Deprivation (GD, Abb. 25) ausgesetzt. Die Zellkulturexperimente mit der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante wurden von Dr. med. Philipp Mergenthaler durchgeführt und mir die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Im Gegensatz zur HKII Wildtyp Überexpression zeigte die katalytisch-inaktive HKII Doppelmutante eine Aufhebung der zellschützenden Wirkung in den OD-Experimenten. Dieser destruktive Effekt der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante ist im Box-Whiskers-Plot (Abb. 24) vor und nach OD durch das Vorhandensein von mehr orange fluoreszierenden Kontrollzellen im Vergleich zu den mit der HKII Doppelmutante und dem Fluoreszenzprotein eGFP kotransfizierten grünen Zellen sichtbar (Ratio < 1). Die HKII Wildtyp transfizierte Kultur zeigte ein zu Gunsten der grün fluoreszierenden Zellen verschobenes Neuronenverhältnis (Ratio > 1). Dieser positive Einfluss der HKII Wildtyp Überexpression auf das Zellüberleben wurde durch die OD verstärkt und ist im Box-Plot durch eine weitere relative Zunahme der kotransfizierten grünen Zellen im post OD-Zustand dargestellt.

Die katalytisch-inaktive HKII Doppelmutante hatte unter GD-Bedingungen einen positiven Effekt auf das Neuronenüberleben, was im Box-Whiskers-Blot (Abb. 25) durch eine relative Zunahme der Ratio im post GD-Zustand dargestellt wird (Ratio > 1). Im Gegensatz dazu wurde der neuronale Schutz der HKII Wildtyp transfizierten Zellen nicht nur aufgehoben, sondern es zeigte sich ein destruktiver Effekt der eGFP und HKII Wildtyp Kotransfektion auf die Neuronenkultur nach GD (Ratio < 1). Die Negativkontrolle aus einfach transfizierten eGFP beziehungsweise m-

orange Neuronen hatte weder in der OD noch in der GD einen Einfluss auf das Zellüberleben und stellte sich konstant mit einer Ratio von 1 dar.

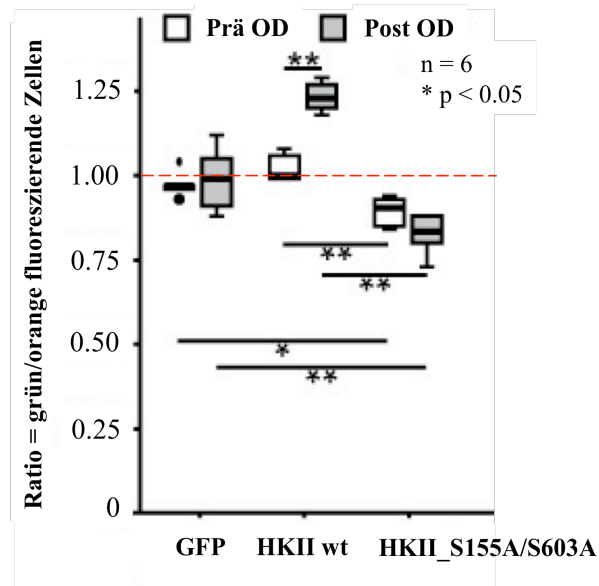


Abbildung 24: Box-Whiskers-Plot der OD-Experimente der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante (HKII_S155A/S603A). Die multivariate Analyse zeigt in 6 unabhängigen Experimenten eine Aufhebung der neuroprotektiven Effekte sowie eine zellschädigende Wirkung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante vor und nach reiner Sauerstoff-Deprivation (OD). Dieser destruktive Effekt der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante wird insbesondere gegenüber der protektiv wirkenden HKII Wildtyp (HKII wt) Transfektion deutlich. Es stellt sich ein signifikanter Unterschied für den Vergleich der Kontrollpopulation (GFP) (Ratio = 1) mit den Neuronen der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante transfizierten Neuronenpopulation (Ratio < 1) und der HKII Wildtyp transfizierten Zellen (Ratio > 1) nach OD dar. Die Zellkulturexperimente zur katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante wurden von Dr. med. Philipp Mergenthaler durchgeführt. Abbildung modifiziert aus Mergenthaler *et al.*, 2012.

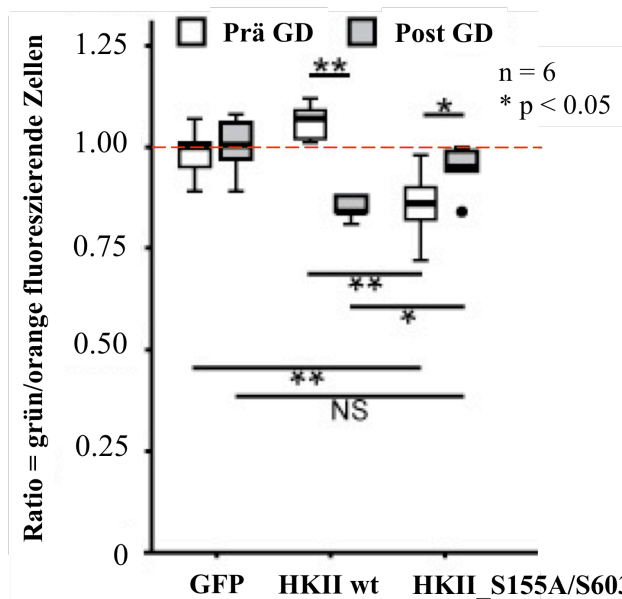


Abbildung 25: Box-Whiskers-Plot der GD-Experimente der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante (HKII_S155A/S603A). Die multivariate Analyse zeigt in 6 unabhängigen Experimenten einen zellschützenden Effekt der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante auf das Neuronenüberleben nach reiner Glukose-Deprivation (GD) (Ratio > 1). Diese positive Wirkung der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante wird insbesondere gegenüber der HKII Wildtyp (HKII wt) Transfektion im post GD Zustand deutlich. Des Weiteren stellt sich ein signifikanter Unterschied für den Vergleich der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante transfizierten Zellen mit den Neuronen der HKII Wildtyp Transfektion vor der GD dar. So verschiebt sich der protektive Effekt der HKII Wildtyp Überexpression im prä GD-Zustand (Ratio > 1) zu einem zelldestruktiven Effekt im post GD-Zustand (Ratio < 1), während die katalytisch-inaktive HKII Doppelmutante eine schützende Wirkung auf die transfizierten Neurone ausbildet (Ratio > 1). Die Zellkulturexperimente zur katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante wurden von Dr. med. Philipp Mergenthaler durchgeführt. Abbildung modifiziert aus Mergenthaler *et al.*, 2012.

3.5. Proteinnachweis des HKII Expressionsvektors im Western Blot

Zum Expressionsnachweis des HKII Vektors in primären Kortexneuronen wurden zwei Western Blot-Analysen aus Zelllysaten erstellt. Der HKII Antikörper wurde zusätzlich in einem Skelettmuskellysat der Ratte getestet, da dieses über eine hohe endogene HKII Expression verfügt. Unbehandelte sowie transfizierte Neurone wurden mit dem HKII Antikörper inkubiert. Das HKII Protein hat ein Molekulargewicht von 100 kDa. Es wurden Gesamtproteinmengen von 40 µg im Western Blot Abb. 26 a.) bzw. 20 µg im Western Blot Abb. 26 b.) aufgetragen.

In der Auswertung präsentierte sich beim Skelettmuskellysat („SM unbehandelt“) und in den unbehandelten primären Kortexneuron („CTX unbehandelt“) eine Bande bei 100 kDa. Die Proteinbande beim Skelettmuskellysat war im Vergleich zu den unbehandelten Kortexneuronen stärker ausgeprägt. Die gleiche Bande zeigte sich auch in der mit dem grünen Fluoreszenzprotein

eGFP („*CTX transfiziert, eGFP*“) transfizierten Neuronenkultur. Bei den HKII Wildtyp („*CTX transfiziert, HKII wt*“) transfizierten sowie bei der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante („*CTX transfiziert, HKII_S155A/S603A*“) transfizierten Neuronen zeigte sich kurz unterhalb der 100 kDa Bande eine zusätzliche Bande. In der HKII-Venus Fusionsprotein („*CTX transfiziert, HKII-Venus FP*“) transfizierten Neuronenkultur stellte sich oberhalb der 100 kDa Bande eine zusätzliche Bande bei 130 kDa dar. Das Fluoreszenzprotein Venus hat ein Molekulargewicht von 28 kDa und das HKII-Venus Fusionsprotein ist folglich 130 kDa groß.

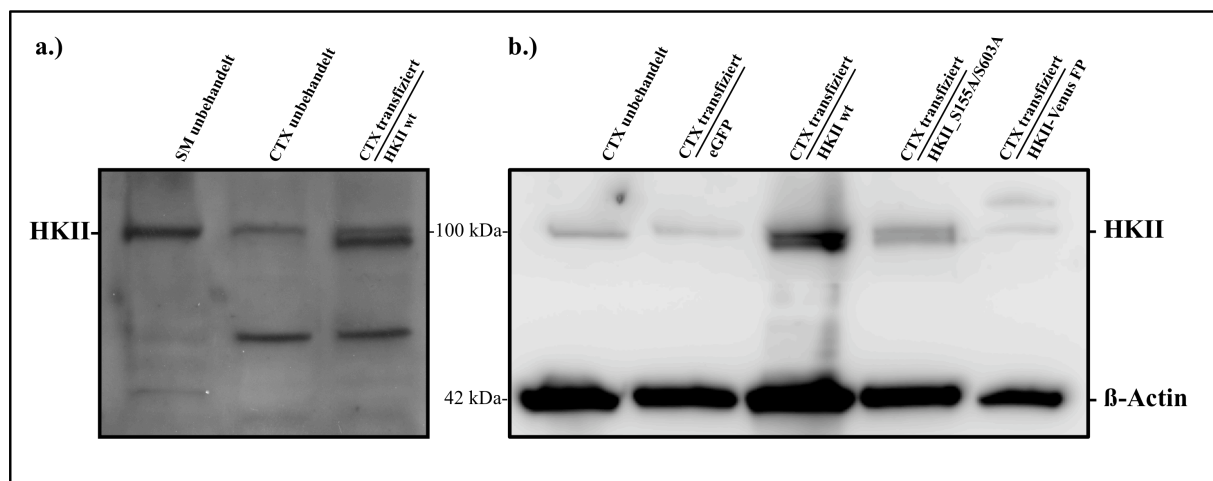


Abbildung 26: a.) und b.) HKII Western Blot-Analysen aus Skelettmuskel und Kortexneuronen der Ratte.

Beim Skelettmuskellysate („*SM unbehandelt*“) und in den unbehandelten primären Kortexneuron („*CTX unbehandelt*“) zeigte sich eine HKII Bande bei 100 kDa. Die Proteinbande beim Skelettmuskellysate ist im Vergleich zu den unbehandelten Kortexneuronen stärker ausgeprägt. Die gleiche endogene HKII Bande stellt sich auch in der mit dem grünen Fluoreszenzprotein eGFP („*CTX transfiziert, eGFP*“) transfizierten Neuronenkultur dar. Bei den HKII Wildtyp („*CTX transfiziert, HKII wt*“) transfizierten Neuronen sowie bei der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante („*CTX transfiziert, HKII_S155A/S603A*“) transfizierten Zellen präsentierte sich kurz unterhalb der endogenen HKII Bande eine zusätzliche Bande. In der HKII-Venus Fusionsprotein („*CTX transfiziert, HKII-Venus FP*“) transfizierten Neuronenkultur stellte sich oberhalb der 100 kDa HKII Bande eine zusätzliche Bande bei 130 kDa dar. Das Fluoreszenzprotein Venus hat ein Molekulargewicht von 28 kDa.

3.6. Proteinnachweis der HKII-Mutanten im Western Blot

Um die Proteinexpression der transfizierten HKII Mutanten auf Proteinebene sicherzustellen, wurde eine Western Blot-Analyse mit den einzelnen HKII Varianten angefertigt. Es wurden Zelllysate aus transfizierten Kortexneuronenpopulationen mit der mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_Mito*“) der Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_P-*“), der Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_P+*“) und der BH4 Domäne defi-

zienten HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_BH-4*“) hergestellt und im Rahmen des Proteinnachweises mit einem HKII Antikörper inkubiert. Der Proteinnachweis der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante („*CTX transfiziert, HKII_S155A/S603A*“) ist in Abb. 26 b.) dargestellt. Zur Transfektionskontrolle wurden primäre Neurone mit dem Fluoreszenzprotein eGFP transfiziert („*CTX transfiziert, eGFP*“). Die Transfektion des HKII Wildtyp Vektors („*CTX transfiziert, HKII wt*“) diente als Kontrolle der Proteinexpression. Die eGFP transfizierten Neurone stellten sich in der Western Blot-Analyse mit einer Einzelbande bei 100 kDa dar. Die HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur, sowie alle aufgetragenen HKII Mutanten, zeigten kurz unterhalb der 100 kDa Bande eine zusätzliche Proteinbande. Die vergleichbare Darstellung der HKII Mutanten und der HKII Wildtyp Neuronenkultur im Western Blot sprechen für eine Proteinexpression der jeweiligen HKII Plasmid-DNA.

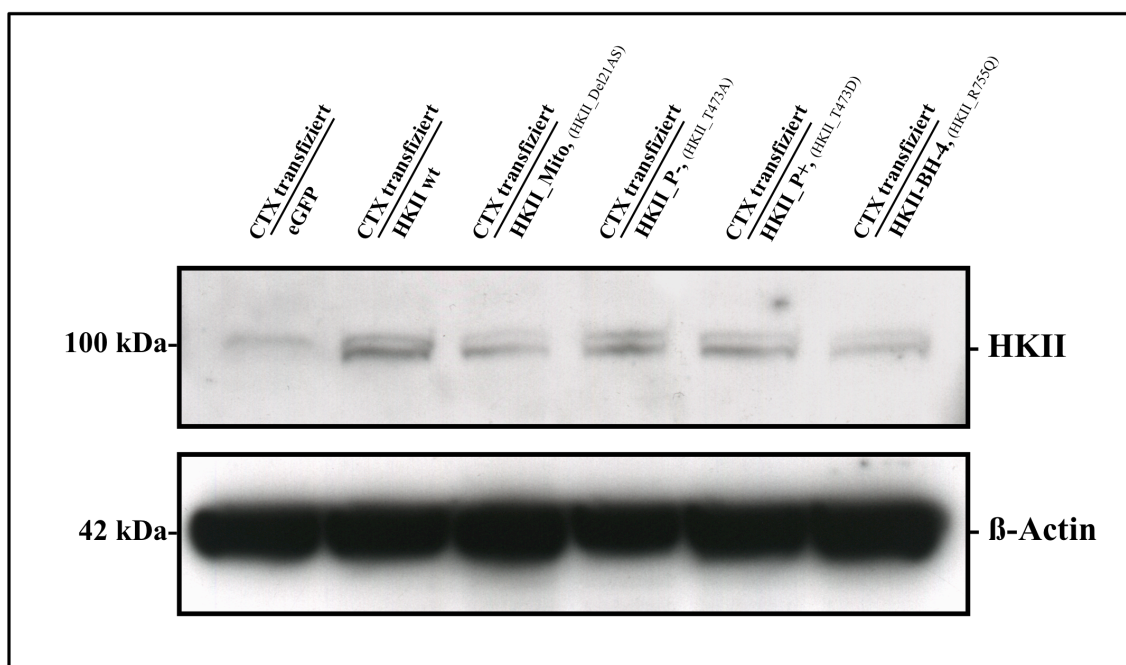


Abbildung 27: Hexokinase II Western Blot aus primären Kortexneuronen der Ratte.

Zum Expressionsnachweis der Hexokinase II (HKII) Mutanten auf Proteinebene wurden die mitochondriale Lokalisationssequenz defiziente HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_Mito*“), die Akt-Phosphorylierungsdefiziente HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_P-*“), die Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_P+*“) und die BH4 Domäne defiziente HKII Mutante („*CTX transfiziert, HKII_BH-4*“) in primäre Kortexneurone transfiziert und die Zelllysate im Western Blot mit einem HKII Antikörper analysiert. Zur Kontrolle der Transfektion wurden eGFP transfizierten Neurone („*CTX transfiziert, eGFP*“) genutzt. Eine HKII Wildtyp transfizierte Neuronenkultur („*CTX transfiziert, HKII wt*“) diente als Positivkontrolle. Die eGFP transfizierten Neurone zeigten eine endogene HKII Bande bei 100 kDa. In den HKII Wildtyp transfizierten Neuronen, sowie in den Transfektionszuständen der einzelnen HKII Mutanten, stellte sich kurz unterhalb der endogenen HKII Bande eine zusätzlich Proteinbande dar.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der HKII vermittelten Neuroprotektion in einem *in vitro* Schadensmodell der zerebralen Ischämie untersucht. Es liegen eindeutige Hinweise über die antiapoptotische Potenz mitochondrialer Hexokinasen in verschiedenen Geweben vor, jedoch ist weder die ablaufende intrazelluläre Signalkaskade zur mitochondrialen Assoziation, noch der verantwortliche molekulare Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung der HKII bekannt. Auf Grund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von bekannten, funktionell und regulatorisch wichtigen Domänen innerhalb des HKII Gens im Hinblick auf ihre apoptoseinhibierende Funktion experimentell charakterisiert. Der Fokus lag auf der funktionellen Testung von HKII genspezifischen Domänen, die zum einen für die mitochondriale Lokalisation des glykolytischen Enzyms wichtig sind und zum anderen für den damit in Verbindung stehenden Zellschutz eine essentielle Rolle übernehmen könnten.

Neben der N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssequenz des HKII Gens, wurde das Akt-Kinase Phosphorylierungsmotif der HKII auf seine apoptoseregulatorische und antiapoptotische Relevanz unter ischämischen Bedingungen getestet (Sun *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2007). Zudem wurde die Funktionalität der von Pastorino und Hoek, 2003 postulierten HKII-BH-4 Domäne untersucht und die Abhängigkeit zwischen der katalytischen Aktivität der HKII und dem von ihr vermittelten Schutz vor Hypoxie-induziertem, neuronalen Zelltod charakterisiert.

Zur Adressierung dieser Fragestellungen wurden mittels ortsgebundener Mutagenese funktionell wichtige Domänen des HKII Gens verändert, die HKII Expressionsvektoren in primäre Kortexneurone transfiziert und anschließend auf ihre protektiven Eigenschaften getestet. Die Experimente wurden ausschließlich in der neuronalen Primärkultur mit kombinierter Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (*oxygen and glucose deprivation, OGD*) bzw. reiner Sauerstoff-Deprivation (*oxygen deprivation, OD*) oder reiner Glukose-Deprivation (*glucose deprivation, GD*) als schädigenden Stimulus durchgeführt. Zum Proteinnachweis der HKII Expressionsvektoren wurden Western Blot-Analysen angefertigt. Die HKII Varianten stellten sich mit einer Doppelbande bei 100 kDa dar, welche einen Größenunterschied zwischen der endogenen HKII und den exogen transfizierten HKII Vektoren vermuten lässt. Die obere Bande entspricht der endogenen HKII Expression, während die untere Proteinbande den transfizierten HKII Kontrukten zugeordnet werden konnte. Der Größenunterschied zwischen den beiden HKII Banden von ungefähr 2 kDa könnte möglicherweise durch das Fehlen von spezifischen posttranslationalen Mo-

difikationen, wie beispielsweise Glykosylierungen bei der durch Transfektion induzierten HKII Bande bedingt sein.

In der zusammenfassenden Analyse der OGD-Experimente zeigte sich eine zellschützende Wirkung der HKII, welche von der mitochondrialen Bindung sowie von der katalytischen Aktivität des glykolytischen Enzyms abhängig ist. Zusätzlich konnte ein antiapoptotischer Effekt und eine apoptose-modulierende Funktion der HKII-Akt-Phosphorylierung in der primären Neuronenkultur beobachtet werden. Es bestätigte sich die Funktionalität der postulierten HKII-BH-4 Domäne im Rahmen der Neuroprotektion. Der HKII-vermittelte Zellschutz ist damit multifaktoriell bedingt und unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen, was möglicherweise durch die besondere Stellung der HKII als Verknüpfungspunkt von Zellmetabolismus und Apoptoseregulation erklärt werden kann.

4.1. Hexokinase und der antiapoptotische Effekt der Glykolyse

Der Hexokinase Proteinfamilie kommt klassischerweise eine wichtige Bedeutung im Energiestoffwechsel der Zellen von Säugetieren zu, denn als Schlüsselenzyme übernehmen sie die erste Reaktion im Glukosemetabolismus und sind aufgrund der allgemeinen Verfügbarkeit von Glukose, im Stoffwechsel aller Lebewesen anzutreffen (Cardenas *et al.*, 1998). Des Weiteren gibt es eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung der mitochondrialen Hexokinase Isoenzyme I und II an der Modifizierung von apoptotischen Signalen mit Verschiebung der zellulären Antwort von Zelltod zu Zellüberleben (Siehe Kapitel 1.7.1.4.).

In einer früheren Arbeit unserer Gruppe wurde ein möglicher HKII-vermittelter Zellschutz in primären Kortexneuronen der Ratte mit Hilfe eines *in vitro* Schadensmodells untersucht (Mergenthaler *et al.*, 2012). Als schädigende Stimuli wurden hierbei sowohl die kombinierte Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (*oxygen and glucose deprivation, OGD*) als auch die isolierte Sauerstoff-Deprivation (*oxygen deprivation, OD*) und Glukose-Deprivation (*glucose deprivation, GD*) eingesetzt. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich ein deutlich protektiver Effekt der HKII auf das Überleben der neuronalen Kultur bei OGD oder OD induziertem Zelltod. Jedoch war keine zellschützende Wirkung in den GD-Versuchen nachweisbar, was eine Glukoseabhängigkeit der HKII-vermittelten, neuronalen Prozesse vermuten lässt.

Grundsätzlich betrachtet, stellt der Glukosemetabolismus eine wichtige Voraussetzung für das Überleben und Wachstum von Zellen und Organismen dar. Passend dazu, demonstrierte Sun *et*

al., 2008 in einer humanen Nierenzelllinie (*Human Embryonic Kidney cells*, HEK Zellen), dass die antiapoptotischen Effekte der mtHK an die Verfügbarkeit von Glukose gekoppelt sind. Zusätzlich konnte eine durch Glukose-Deprivation bedingte Verminderung der mitochondrialen HK-Aktivität nachgewiesen werden, wobei die Dissoziation der HKII mit einer Aufhebung der antiapoptotischen Potenz des glykolytischen Proteins einhergeht (Majewski *et al.*, 2004b).

Aus diesem Kontext ergibt sich nun allerdings die Frage, warum die HKII Überexpression ausgerechnet in der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation eine Protektion bewirkt, während sie in der isolierten Glukose-Deprivation einen negativen Effekt auf die Zellvitalität ausübt. In Anbetracht der Tatsache, dass Neurone ihren Energiebedarf fast ausschließlich durch das Substrat Glukose decken und über keine nennenswerten Glykogenspeicher verfügen, sind sie auf eine kontinuierliche Glukosezufuhr angewiesen. In dem angewandten OGD-Modell hingegen, wurde standardisiert das glukosehaltige Kulturmedium entfernt und mögliche Rückstände sorgfältig ausgewaschen, sodass eine residuale Glukosebereitstellung ausgeschlossen werden konnte. Es erscheint vielmehr wahrscheinlich, dass die neuroprotektiven Effekte der HKII in der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation anderen Funktionsmechanismen als im isolierten Glukoseentzug zu Grunde liegen.

Diese Vermutung konnte durch die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung der HKII bei Inaktivierung der katalytischen Aktivität des Enzyms in reiner OD und GD bestätigt werden. Die Ausschaltung der katalytisch-aktiven Zentren im N- und C-Terminus des HKII Gens (HKII_S155A/S603A) reduziert nach experimentellen Untersuchungen von Tsai und Wilson, 1996 die glykolytische Aktivität des Proteins um 90%. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine von der Glukoseverfügbarkeit abhängige, antiapoptotische Wirkung der katalytischen HKII-Aktivität. Dementsprechend ist bei Vorhandensein des Substrats Glukose die katalytische Aktivität der HKII für die Vermittlung der neuroprotektiven Eigenschaften essentiell, wohingegen die Zellen bei einer Glukose-Deprivation von einer Inaktivierung der katalytischen HKII-Aktivität profitieren. Die Ergebnisse der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante sprechen für eine zusätzliche Funktion der katalytischen HKII Zentren im Rahmen der Apoptoseregulation. Möglicherweise fungieren die katalytisch-aktiven HKII Domänen als eine Art intrazelluläre Glukosesensoren, welche unter hypoxischen Bedingungen die glykolytische Stoffwechselfunktion der HKII intensivieren und darüber zur Inhibition von Apoptose beitragen, während sie bei Aglykämie und einer damit verbundenen Verhinderung ihrer katalytischen Aktivität Apoptose induzieren. Diese Überlegung erklärt jedoch nicht den neuronalen Überlebensvorteil einer HKII Überexpression bei kombinierter Sauerstoff- und Glukose Deprivation. Vermutlich unterliegt die Schadensantwort in diesem Fall anderen molekularen Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit

wurde diese Problematik nicht weiter untersucht.

4.2. Apoptose-regulatorische Eigenschaften der mitochondrialen HK

Bereits von Knull *et al.*, 1973 konnte ein mitochondrialer Kompartimentwechsel der Hexokinase unter kurzen Ischämiephasen in Hühnerneuronen beobachtet werden, wobei die zwei Stunden umfassende mitochondriale Hexokinasebindung identisch mit dem protektiven Zeitfenster der klassischen Präkonditionierung war. Auf Grund der zeitlichen Korrelation räumte man dem glykolytischen Enzym schon damals eine mit der intrazellulären Translokation in Verbindung stehende apoptose-regulatorische Funktion ein.

Die protektive Wirkung der mitochondrial gebundenen Hexokinase wurde mittlerweile von verschiedenen Gruppen in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben untersucht, wobei insbesondere den Isoenzymen I und II eine antiapoptotische Potenz zugeschrieben wurde (Gall *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2008; Robey und Hay, 2006; Pastorino und Hoek, 2003). Insgesamt wird von einer HKI- und HKII-vermittelten Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität und Antagonisierung der proapoptotischen Cytochrom C Ausschüttung ausgegangen (Smeele *et al.*, 2011; Mathupala *et al.*, 2006). Allerdings sind weder die verantwortlichen funktionell-regulatorischen Strukturen der mitochondrialen HK-Assoziation noch der molekulare Mechanismus der Apoptoseinhibition eindeutig definiert worden.

Die hydrophobe N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz der Hexokinase I und II ist für die reversible Assoziation der Hexokinase mit der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich und wird außerdem als Voraussetzung für die antiapoptotischen Eigenschaften des Proteins diskutiert (Sun *et al.*, 2008; Robey und Hay, 2006). Die Wichtigkeit der mitochondrialen Signalstruktur der HKII konnte auch in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der neuronalen Zelltodinhibierung bestätigt werden. So war die Überexpression einer mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Variante unfähig hypoxisch bedingten Zelltod in einer primären Neuronenkultur zu unterdrücken. Aus den erhobenen Daten ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die HKII einen funktionalen N-Terminus für die mitochondriale Assoziation benötigt und über eine Wechselwirkung mit mitochondrialen Proteinen die zellschützenden Effekte vermittelt. Kürzlich konnte in einer Studie von Smeele *et al.*, 2011 gezeigt werden, dass die Bindung der HKII an die mitochondriale Membran nicht nur eine wichtige Rolle im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung zukommt, sondern auch entscheidend zur normalen kardialen Funktion beiträgt. Demnach ist ein basales Vorhandensein der HKII-Bindung notwendig, um das mito-

chondriale Membranpotential auch unter physiologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten (Smeele *et al.*, 2011).

Ein Erklärungsansatz basiert in diesem Zusammenhang auf einer strukturellen Überlegung, in welcher die HK über die Interaktion mit dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) am Mitochondrium bindet und darüber die Akkumulation und Oligomerisation von proapoptotischen Proteinen, wie beispielsweise Bax/Bak an der äußeren Mitochondrienmembran verhindert (Gall *et al.*, 2011; Robey und Hay, 2006; Pastorino *et al.*, 2002). Folglich wird die durch Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom C durch die mtHK potent blockiert. *In vitro* Experimente an isolierten und funktionsfähigen Mitochondrien zeigten entsprechende Ergebnisse (Pastorino *et al.*, 2002). So führte die mitochondriale Bindung von rekombinanter HKII zu einer wirksamen Unterdrückung einer Bax-Bindung (rekombinant) und einer damit in Verbindung stehenden Cytochrom C Ausschüttung. Konträr dazu bewirkte die forcierte Dissoziation der HKII einen gegenteiligen Effekt (Pastorino *et al.*, 2002). Auch die ektope zelluläre Expression von aktiven Formen der HK Isoformen I und II demonstrierten eine beeinträchtigte Fähigkeit von aktiviertem Bid (tBid) (Majewski *et al.*, 2004b) und Bax (Pastorino *et al.*, 2002) zur Apoptoseinduktion. Insgesamt betrachtet, liegt die Vermutung nahe, dass Bax- und Bak-Oligomere mit der HKI-II um eine gemeinsame Bindungsstelle an der äußeren Mitochondrienmembran konkurrieren.

Im Gegensatz dazu wurde auch ein Bax-/Bak-unabhängiger Mechanismus der Zelltodregulation mit Beteiligung mitochondrial gebundener Hexokinase beschrieben (Majewski *et al.*, 2004a). In Bax- und Bak-defizienten Zellen führte die mitochondriale Dissoziation von HK zu einer Kalzium-unabhängigen Induktion von Apoptose. Im Regelfall resultiert die Cytochrom C Freisetzung aus einer Kalzium-getriggerten MPTP-Formation mit nachfolgender Schwellung der mitochondrialen Matrix und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran (Desagher und Martinou, 2000). Im alternativen Modell der Apoptoseregulation ruft die mitochondrial lokalisierte und mit VDAC assoziierte HK eine erhöhte zytosolische ADP-Konzentration (ADP ist ein Produkt der HK Reaktion) hervor, welche den Ionenfluss durch den Adenin-Nukleotid Translokator (ANT) anregt und die Aktivität des F_1F_0 -ATP-Synthase-Komplexes stimuliert. Es resultiert eine durch den Wasserstoff-Ionengradienten bedingte Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials. Über eine verminderte Produktion von mitochondrial generierten, reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) wird die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten und der oxidative Zellschaden reduziert (da-Silva *et al.*, 2004). Die Dissoziation der mtHK hat einen negativen Effekt auf die Zellvitalität, denn die damit assoziierten pathologischen Veränderungen, wie beispielsweise die Hyperpolarisation und Remodelierung der Mitochondrienmembran (Ma-

jewski *et al.*, 2004a), induzieren nachweislich die Ruptur der mitochondrialen Membran mit nachfolgender nicht-selektiver Freisetzung von proapoptotischen Proteinen (Vander Heiden *et al.*, 1999). Die Sicherstellung des mitochondrialen Stoffaustauschs wie z.B. ADP/ATP ist in diesem Kontext ein möglicherweise wichtiger Mechanismus der zellulären Apoptoseprävention (Vander Heiden *et al.*, 1999). Zusätzlich löst der bevorzugte Gebrauch von mitochondrial generiertem ATP durch die mtHK eine intensiviertere Kopplung von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse aus, welcher unter ischämischen Bedingungen eine schützende Funktion auf die Ausbildung einer starken Zellazidose ausüben könnte (Wilson, 1995).

Die Bindung an die äußere Mitochondrienmembran verschafft der HK I und HKII einen privilegierten und direkten Zugriff auf mitochondrial generiertes ATP und steht im Verdacht dem Protein weitere funktionelle Vorteile zu verleihen. Basierend auf Kristallisationsexperimenten wird vermutet, dass die mitochondriale Assoziation der HKI in einer speziellen Tetramerform erfolgt, die zum einen eine Erhöhung der katalytischen Aktivität und zum anderen die Reduzierung der produktinduzierten Rückkopplungshemmung im Vergleich zur monomeren, im Zytosol lokalisierten HKI bewirkt (Mulichak *et al.*, 1998; Wilson, 1995; Xie und Wilson, 1990). Wird jedoch eine G-6-P abhängige Rückkopplungshemmung erreicht, induziert diese vermutlich eine Konformationsänderung innerhalb der mitochondrialen HK mit einer anschließenden Dissoziation des Enzyms von VDAC und der äußeren Mitochondrienmembran. In Hinblick auf die deutliche Sequenzhomologie zwischen der HKI und HKII ist es naheliegend, dass auch die HKII in einer Tetramerstruktur an die mitochondriale Membran bindet und so ihre antiapoptotische Funktion vermittelt (Wilson, 1995; Xie und Wilson, 1990).

Vor kurzem wurde auch eine mögliche Beziehung zwischen der subzellulären Lokalisation und der metabolischen Funktion der HK Isoformen in chinesischen Hamster-Ovarialzellen (*Chinese Hamster Ovary cells*, CHO-Zellen) experimentell untersucht (John *et al.*, 2011). Es zeigte sich, dass die mitochondriale Position der HK insbesondere mit einer zielgerichteten Verstoffwechslung des Reaktionsprodukts G-6-P in der Glykolyse einhergeht (katabole Funktion), während die zytosolische Lokalisation des Enzyms bevorzugt mit der Regulierung des Glykogenaufbaus assoziiert ist (anabole Funktion). Im Gegensatz zur HKI, die vornehmlich mitochondrial vorkommt und glykolytisch aktiv ist, scheint die HKII aufgrund ihrer dynamisch regulierten Distribution eine duale Rolle zu spielen. So demonstrierten die experimentellen Daten von John *et al.*, 2011, dass die HKII bei zytosolischem Vorkommen bevorzugt G-6-P als Substrat der Glykogenspeicherung, beziehungsweise dem Pentosephosphatweg zuführt, währenddessen sie bei mitochon-

drialer Bindung die Glykolyse und oxidative Phosphorylierung als Metabolisierungsweg des G-6-P präferiert. Die extrazelluläre Glukosekonzentration hatte bei diesen Experimenten keinen Einfluss auf die mitochondriale HKI-Bindung. So verblieb das mit einem gelben Fluoreszenzprotein (*yellow fluorescent protein*, YFP) markierte HKI-Fusionsprotein konstant in seiner mitochondrialen Lokalisation. Demgegenüber zeigte sich die subzelluläre Distribution des HKII-YFP Proteins sehr sensitiv gegenüber einer wechselnden extrazellulären Glukosekonzentration (John *et al.*, 2011). Der Großteil der HKII befand sich bei Glukosepräsenz am Mitochondrium und sobald die extrazelluläre Glukose entfernt wurde, konnte ein Wechsel der HKII innerhalb von 8-10 Minuten ins zytosolische Kompartiment beobachtet werden. Die HKII-Distribution zwischen Zytosol und Mitochondrium kann demnach als glukoseresponsiv, reversibel und dynamisch eingestuft werden, während die HKI fest an die mitochondriale Membran bindet und keiner glukoseabhängigen Kompartimentverschiebung unterliegt (John *et al.*, 2011). Die Ergebnisse aus den Hamster-Ovarialzellen lassen sich auf Grund der fehlenden Glykogenspeicher im Gehirn nicht ohne Weiteres auf Neuronen übertragen. Welche Bedeutung diese Ergebnisse im Rahmen der HKII-vermittelten Neuroprotektion haben, lässt sich derzeit nur spekulieren.

4.2.1. Interaktion mitochondrialer Hexokinase mit PEA-15 und VDAC

Für die mitochondriale Assoziation der HKII ist nicht nur die Existenz eines funktionellen N-Terminus von Bedeutung, sondern auch eine mögliche Wechselwirkung mit mitochondrial lokalisierten Proteinen. Die einzigen derzeit bestätigten Interaktionspartner der mtHK sind PEA-15 (*phosphoprotein enriched in astrocytes*) (Mergenthaler *et al.*, 2012) und der spannungsabhängige Anionenkanal VDAC (Pastorino und Hoek, 2008).

Bei PEA-15 handelt es sich um ein in unterschiedlichen Geweben verbreitet exprimiertes Phosphoprotein, welches primär als Substrat der Proteinkinase C in Astrozyten beschrieben worden ist (Danziger *et al.*, 1995). Ähnlich wie die HKII, ist auch PEA-15 in zelluläre Prozesse wie der Regulation von Apoptose (Kitsberg *et al.*, 1999), der Onkogenese (Eckert *et al.*, 2008) oder dem Glukosemetabolismus (Fiory *et al.*, 2009) involviert. Passend dazu ist auch die Expressionssteigerung von PEA-15 ein wichtiges Charakteristikum für viele maligne Tumore (Fiory *et al.*, 2009). PEA-15 wurde von unserer Arbeitsgruppe als ein direkter Interaktionspartner der HKII identifiziert (Mergenthaler *et al.*, 2012). Mit Hilfe eines membran-basierten Split-Ubiquitin Two-Hybrid Systems (DUALmembrane™) wurde eine Mausgehirn c-DNA Bibliothek auf potentielle Interaktionspartner der HKII an der äußeren Mitochondrienmembran untersucht, wobei PEA-15 als putativer Interaktionspartner durch Ko-Immunopräzipitation und Fluoreszenz-

Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bestätigt werden konnte (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die Ergebnisse zeigen eine direkte Interaktion der endogenen HKII mit PEA-15 in primären Kortexneuronen unter physiologischen Bedingungen. Außerdem konnte eine synergistisch protektive Wirkung bei Überexpression beider Proteine in neuronale Zellen beobachtet werden, während eine HKII Wildtyp Überexpression in PEA-15 Knock-Out-Mausneuronen zu keinem Schutz vor Hypoxie-induziertem Zelltod (OGD) führte (Mergenthaler *et al.*, 2012). Zusammenfassend kommt der HKII-PEA-15-Interaktion eine wichtige Bedeutung im Rahmen der HKII-vermittelten Neuroprotektion zu, wobei die Verfügbarkeit von Glukose einen modulierenden Einfluss auf die Wechselwirkung der Proteine ausübt. Dies wird durch eine signifikante Reduktion der Protein-Protein Interaktion bei isolierter Glukose-Deprivation deutlich. Die Glukoseabhängigkeit der Interaktion unterstützt die Vermutung, dass die katalytischen Zentren der HKII als eine Art Glukosesensor fungieren und bei intrazellulärer Glukosedepletion über eine Verhinderung ihrer katalytischen Aktivität Apoptose induzieren.

Obwohl PEA-15 bisher als ein rein zytosolisches Protein beschrieben worden ist, konnte durch Immunoblotanalysen unserer Arbeitsgruppe eine zusätzliche mitochondriale Lokalisation in primären Kortexneuronen nachgewiesen werden (Mergenthaler *et al.*, 2012). Auf Grund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass auch die Interaktion der beiden Proteine an der äußeren Mitochondrienmembran stattfindet und möglicherweise innerhalb eines größeren Multiproteinkomplexes die antiapoptotischen Effekte unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen vermittelt.

Neben einer Interaktion zwischen PEA-15 und HKII gibt es auch eindeutige Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen mtHKII und VDAC. Die in der äußeren Mitochondrienmembran stark exprimierte VDAC Isoform 1 stellt den meist frequentierten Kanal für den Austausch von Metaboliten und Ionen zwischen dem Mitochondrium und anderen Zellkompartimenten dar (Pastorino und Hoek, 2008). Die VDAC-Aktivität soll via Interaktion mit assoziierten Proteinen reguliert werden, wobei insbesondere apoptose-modifizierenden Proteinen aus der Bcl-2 Familie (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Tsujimoto und Shimizu *et al.*, 2000) und zytosolischen Proteinen wie der HKI und HKII eine wichtige Bedeutung zukommt. In diesem Zusammenhang wird auch über eine Interaktion mit intramitochondrialen Proteinen, wie beispielsweise dem Adenin-Nukleotid Translokator in der inneren Mitochondrienmembran spekuliert (Halestrap und Brennerb, 2003). Die Bildung von Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran soll zur Formation des MPTP-Komplexes beitragen (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Crompton *et al.*, 2002).

Im Rahmen der Apoptoseregulation geht man davon aus, dass die gebundene HK den Öffnungszustand des VDAC gezielt moduliert und darüber ihre antiapoptotischen Effekte vermittelt (Pastorino und Hoek, 2008; Robey und Hay, 2006). Aktuell werden zur Wirkungsweise der HK-VDAC-Bindung zwei gegensätzliche Hypothesen diskutiert, wobei die eine den geöffneten (Robey und Hay, 2006) und die andere den geschlossenen (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004) Kanalzustand zur Erhaltung der mitochondrialen Integrität favorisiert.

Die HKII-vermittelte Stabilisierung des geöffneten Kanalzustandes steht im Verdacht einen geordneten Ionen- und Metabolitenaustausch zwischen dem mitochondrialen und zytosolischen Kompartiment sicherzustellen und so zur Aufrechterhaltung der Zellvitalität beizutragen. Eine Trennung der HK-VDAC-Bindung ist in diesem mechanistischen Erklärungsansatz mit einer sofortigen Schließung von VDAC und einem nachfolgenden Zusammenbruch des Zellmetabolismus verbunden (Robey und Hay, 2006). Unterstützt wird die Hypothese durch die experimentellen Daten von Vander Heiden *et al.*, 1999, welcher eine Störung des mitochondrialen ATP/ADP-Austauschs einem früh einsetzenden Effekt des programmierten Zelltodes zuordnete.

Im Gegensatz dazu vermuten andere Arbeitsgruppen eine den geschlossenen Anionenkanalzustand stabilisierende Funktion der HK-VDAC-Bindung (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010; Azoulay-Zohar *et al.*, 2004). Plausibel erscheint dies in Anbetracht der Tatsache, dass alle proapoptotischen Proteine, die vom Mitochondrium ins Zytoplasma ausgeschüttet werden im intermembranösen Spalt lokalisiert sind und für deren Freisetzung nur die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran moduliert werden muss (Halestrap *et al.*, 2002; Tsujimoto und Shimizu, 2002). Daran anknüpfend konnte kürzlich von Keinan und Shoshan-Barmatz, 2010 ein Zusammenhang zwischen einer VDAC1 Überexpression und einer nachfolgenden VDAC-Oligomerisation mit Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem intermembranösen Spalt gezeigt werden. Unterstützt werden diese Daten in Hinblick auf die molekulare Größe der VDAC-Pore mit 2.5-3.0 nm, welche zwar suffizient für den Durchtritt von kleinen Molekülen wie Nukleotiden ist, jedoch die Freisetzung gefalteter Proteine wie Cytochrom C unmöglich macht (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2008). Demzufolge könnte die Oligomerbildung von VDAC1 zu einer Öffnung des Kanals beitragen, welcher über die Freisetzung von Cytochrom C die Induktion von Apoptose forciert.

Insgesamt ist die mitochondriale Bindung der Hexokinase als sehr komplex anzusehen, wobei die Mehrzahl der fundamentalen Determinanten und strukturellen Grundlagen derzeit nur unvollständig verstanden sind (Robey, 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen einen antiapoptotischen Effekt der HKII bei mitochondrialer Lokalisation. Die in der Literatur postulierte Bindung an VDAC soll auch für die Immortalisierung von Tumorzellen verantwortlich sein (Mathupala *et al.*, 2009). In malignen Zellen führt die HK-Interaktion mit VDAC sowohl zu einer charakteristischen Hochregulierung der Glykolyse, als auch zu einem Schutz vor einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit einer daraus resultierenden Zelltodinhibierung (Mathupala *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2008). Folglich stellt die HK-VDAC-Bindung einen denkbar attraktiven Angriffspunkt von neuen Chemotherapeutika in der Tumorthherapie dar. In präklinischen Studien wurde bereits gezeigt, dass das Phytohormon Methyljasmonat selektiv in der Lage ist, die HK-VDAC-Interaktion zu unterbrechen und eine HK-Dissoziation vom Mitochondrium zu bewirken (Glodin *et al.*, 2008). Jedoch bleibt abzuwarten, ob die pharmakologische Potenz des pflanzlichen Hormons für eine therapeutische Anwendung im menschlichen Körper geeignet ist, da es bisher nur an isolierten Proteinen oder aufgereinigten Mitochondrien im Rahmen von *in vitro* Experimenten getestet wurde (Galluzzi *et al.*, 2008).

4.3. Hexokinaserregulation durch Akt-Kinase

Es wurden bereits verschiedene, die HK-VDAC-Interaktion beeinflussende Faktoren identifiziert. Wie in Kapitel 4.2. beschrieben, führen hohe Konzentrationen des Reaktionsprodukts G-6-P durch Konformationsänderung im Protein zu einer Lösung der Hexokinasebindung (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Wilson, 1995). Zudem gibt es Hinweise, dass Proteinkinasen eine regulatorische Wirkung auf die HKI- bzw. HKII-VDAC-Bindung ausüben.

Der Akt-Signalweg (Akt) ist ein in Säugetierzellen vorhandener hoch konservierter Signalweg, welcher imstande ist verschiedene apoptotische Stimuli zu antagonisieren und die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten (Majewski *et al.*, 2004a). Eine Grundvoraussetzung für diesen Effekt ist die Anwesenheit von einer zu phosphorylierenden Hexose (Gottlob *et al.*, 2001). Die Daten von Gottlob *et al.*, 2001 zeigen, dass die Aktivierung der onkogenen Proteinkinase Akt nicht nur zu einer Apoptosehemmung beiträgt, sondern auch eine apoptose-assoziierte Lösung der mitochondrialen Hexokinasebindung antagonisiert. Diese Beobachtung impliziert, dass der aktivierten Akt-Kinase eine unterstützende Funktion bei der Aufrechterhaltung der HK-Mitochondriumbindung zukommt (Elstrom *et al.*, 2004), sodass die mtHK-Assoziation über Akt reguliert vor einer drohenden Cytochrom C Ausschüttung schützt.

Andere experimentelle Untersuchungen zu dieser Thematik favorisieren einen vielmehr direkten Effekt der Akt-Aktivierung auf die HK-VDAC-Bindung (Miyamoto *et al.*, 2008). In der HKII Sequenz ein spezifisches Akt-Phosphorylierungsmotif beschrieben, welches der Akt-Kinase die Möglichkeit bietet, den HKII-Phosphorylierungsstatus zu modifizieren und möglicherweise darüber eine zellschützende Wirkung zu vermitteln (Miyamoto *et al.*, 2008). In Kardiomyozyten induzierte die Aktivierung von Akt eine Wechselwirkung zwischen Akt und HKII mit einer nachfolgenden Phosphorylierung der HK an Position 473. Die Phosphorylierung von HKII geht mit einer mitochondrialen Bindung des Enzyms einher und trägt zum antiapoptotischen Effekt von Akt im Rahmen der Ischämie bei (Miyamoto *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen einen direkten Einfluss von Akt im Hinblick auf die HKII-vermittelte Protektion. In der primären Neuronenkultur führte die Überexpression einer Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Variante zu einer Aufhebung der neuroprotektiven Wirkung des Proteins. Im Gegensatz dazu zeigte die Akt-Phosphomimetische HKII Mutante eine stärkere zellschützende Potenz als die HKII Wildtyp Transfektion.

Zusätzlich reguliert Akt die mitochondriale Bindung der HKII über eine Ausschaltung der Glykogensynthase Kinase 3 beta (GSK3 β)-Aktivität und einer damit verbundenen Inhibierung der VDAC1 Phosphorylierung (Pastorino *et al.*, 2005). Die GSK3 β ist eine multifunktionelle Proteinkinase, die in eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Regulation von Zellmetabolismus und Apoptose involviert ist (Cohen und Frame, 2001). Wie Akt interagiert auch die GSK3 β mit mitochondrialen Proteinen, jedoch ist die Aktivierung der GSK3 β mit einem störenden Einfluss auf die mitochondriale Funktion und die zelluläre Integrität assoziiert (Murphy *et al.*, 2004). Die Unterdrückung der GSK3 β -Aktivierung entspricht einem wichtigen Bestandteil von verschiedenen protektiv wirksamen Mechanismen sowohl in neuronalen Zellen (Perez *et al.*, 2003) als auch in Kardiomyozyten (Pastorino und Hoek, 2008). Es wird vermutet, dass ein Teil der neuroprotektiven Effekte der GSK3 β -Hemmung aus einer damit einhergehenden Induktion und mitochondrialen Akkumulation der HKII resultiert (Gimenez-Cassina *et al.*, 2009). Ein Knock-Down der HKII Expression führte, wie die forcierte Dissoziation der mtHKII in neuronalen Zellen, zu einer signifikanten Verminderung der durch die GSK3 β -Inhibition vermittelten Protektion. Im Gegensatz zur HKII unterlag die Expression oder subzelluläre Lokalisation der HKI keinen wesentlichen Veränderungen (Gimenez-Cassina *et al.*, 2009). Bei Vorhandensein von mtHK sind auch in anderen Zelltypen und Geweben ähnliche funktionell-regulatorische Mechanismen denkbar.

4.4. Mitochondriale Hexokinasen als Bindeglied zwischen Zellmetabolismus und Apoptoseregulation

Es wurde gezeigt, dass mitochondrial assoziierte Hexokinasen in unterschiedlichen Zellsystemen vor Apoptose schützen (Miyamoto *et al.*, 2004a; Miyamoto *et al.*, 2004b; Pastorino *et al.*, 2002; Bryson *et al.*, 2002; Robey, 2002). Der zugrundeliegende Mechanismus der Protektion ist nicht vollständig verstanden, aber es existieren wie im Kapitel 4.2. beschrieben verschiedene Erklärungsansätze zu der Problematik. Insbesondere die Assoziation an VDAC scheint in diesem Kontext eine zentrale Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen VDAC und mtHKII eine wichtige Rolle in der Integration von Glykolyse und mitochondrialem Energiemetabolismus spielt und einen Überlebensvorteil für verschiedene Zelltypen inklusive Tumorzellen bietet (Pastorino und Hoeck, 2003).

Die mitochondriale Bindung erlaubt der HK einen direkten Zugriff auf mitochondrial generiertes ATP, was bedingt durch die enzymatische Funktion des Proteins zu einer deutlichen Steigerung der aeroben Glykolyse führt. Der aerobe Metabolismus von Glukose liefert eine Zahl unterschiedlicher Stoffwechselprodukte, welche in biosynthetischen Reaktionen im Rahmen der Fettsäuresynthese, DNA-Replikation oder Proteinbiosynthese eingesetzt werden können. Die mtHK vermittelte Produktion von G-6-P unterstützt zusätzlich die Synthese von NADPH und anderen biochemischen Reaktionsprodukten, welche maßgeblich zur Abwehr von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) beitragen (Bustamante *et al.*, 1981). Durch den konstanten ATP/ADP-Austauschmechanismus ist die mtHK in der Lage eine Verringerung des Membranpotentials zu bewirken und so direkt die mitochondriale ROS-Produktion zu reduzieren (da-Silva *et al.*, 2004).

Es ist bekannt, dass 1-2% des konsumierten Sauerstoffs innerhalb der Atmungskette zu ROS generiert werden und ein Ungleichgewicht zwischen mitochondrialer ROS-Produktion und Antioxidanzien zu oxidativem Stress mit Apoptose, Inflammation und der möglichen Auslösung von neurodegenerativen Erkrankungen führt (da-Silva *et al.*, 2004). Da sich die physiologische Rate der ROS-Produktion umgekehrt proportional zu der zytosolischen ADP-Konzentration verhält (Cadenas und Davies, 2000), ist die mtHK durch bevorzugten Verbrauch von mitochondrial generiertem ATP und einer damit verbundenen Reduzierung des Membranpotentials imstande, diesen Prozess zu kontrollieren und die ROS-Formation zu reduzieren (da-Silva *et al.*, 2004). Diese Wechselwirkung bringt die mtHK in eine Schlüsselposition in der Integration von Ener-

giemetabolismus mit der mitochondrialen ROS-Produktion und Apoptoseregulation (Pastorino und Hoeck, 2003).

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen HKII und dem Phosphoprotein PEA-15 (Mergenthaler *et al.*, 2012). Da beide Proteine im Glukosemetabolismus sowie in der Apoptoseregulation funktionell involviert sind, glukoseabhängig miteinander interagieren und darüber synergistisch protektive Effekte vermitteln, wird wiederholt die wechselseitige Beziehung dieser fundamentalen Zellfunktionen deutlich. Die Verfügbarkeit des Substrats Glukose spielt nicht nur eine essentielle Rolle bei der HKII-PEA-15-Interaktion, sondern demonstriert gleichzeitig die Notwendigkeit eines ausgeglichenen Zellstoffwechsels im Rahmen der Apoptoseregulation unter Normoxie. Möglicherweise fungiert die Interaktion zwischen HKII und PEA-15 in einem mitochondrial lokalisierten Multiproteinkomplex als wichtige Entscheidungsinstanz innerhalb der Regulation des programmierten Zelltodes (Mergenthaler *et al.*, 2012). So ist eine von der Glukoseverfügbarkeit abhängige Apoptoseinduktion unter isolierter Glukose-Deprivation beziehungsweise Apoptoseunterdrückung unter kombinierter Sauerstoff- und Glukose-Deprivation denkbar.

Insgesamt legt die Glukoseabhängigkeit dieser Effekte eine wichtige adaptive Rolle des Glukosemetabolismus und speziell der mtHK-Aktivität im Rahmen der Erhaltung der Zellhomöostase nahe. Die enge Beziehung zwischen der antiapoptotischen Potenz der HKII und dem Glukosestoffwechsel wird auch am Beispiel des veränderten Zellmetabolismus im Rahmen der Tumorgenese deutlich. In schlecht differenzierten, malignen Tumoren ist die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit oft mit einer stark gesteigerten Glykolyse assoziiert. Dazu passend ist auch die Aktivität der HK in vielen Tumoren oft bis auf das 10-fache im Vergleich zu normal differenzierten Zellen gesteigert (Pastorino und Hoek, 2003), wofür insbesondere die enzymatische Expressionsinduktion des Isoenzym II verantwortlich ist (Pedersen *et al.*, 2008). Durch eine mitochondriale HKII-Bindung ist in den malignen Zellen die HKII-Affinität für Glukose erhöht, die Inhibition durch das Reaktionsprodukt G-6-P aufgehoben und ein direkter Zugriff des Enzyms auf mitochondrial generiertes ATP sichergestellt (Petersen, 2008). Diese intrazellulären stoffwechselregulatorischen Veränderungen mit einer Schlüsselbeteiligung der HKII führen unter Normoxie zu einer signifikanten Steigerung der Glykolyse und werden unter dem Begriff des Warburg-Effekts zusammengefasst. Der geschilderte Pathomechanismus führt insgesamt zu einer potenten Inhibierung von Apoptose mit einer nachfolgenden Immortalisierung der Tumorzellen (Mathupala *et al.*, 2009). Interessanterweise besitzen die entdifferenzierten Zellen zudem

eine optimale Anpassungsfähigkeit an eine verminderte Sauerstoffzufuhr. Ein plausibler Erklärungsansatz für dieses Phänomen ist die Existenz eines HIF-1 Bindungselements innerhalb des HKII Promoters, welcher es der Zelle ermöglicht sich an reduzierte Sauerstoffbedingungen zu adaptieren und die zelluläre Integrität aufrechtzuerhalten. Basierend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe stellt innerhalb der HK Familie nur die HKII ein experimentell bestätigtes HIF-1 Zielgen dar (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Die antiapoptotische Wirkung der HKII ist nicht nur auf transformierte Zellen beschränkt, sondern auch in gesunden Zellen im Rahmen von oxidativem Stress oder akuten Sauerstoffmangelzuständen zu beobachten (Gürel *et al.*, 2009; Da-Silva *et al.*, 2004; Bryson *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des HKII-vermittelten Zellschutzes sind unter hypoxischen Bedingungen kongruent zu den experimentellen Daten anderer Arbeitsgruppen in anderen Zellsystemen (Robey, 2011; Gürel *et al.*, 2009; Majewski *et al.*, 2004a; Majewski *et al.*, 2004b). Zusätzlich zu der neuronalen Primärkultur konnte auch in Kardiomyozyten (Miyamoto *et al.*, 2007; Zuubier *et al.*, 2005), einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK 293) (Sun *et al.*, 2008), Rat1a-Fibroblasen (Majewski *et al.*, 2004a; Majewski *et al.*, 2004b) und renalen Epithelzellen (Gall *et al.*, 2011) analoge antiapoptotische Effekte nachgewiesen werden. Aufgrund der vergleichbaren Beobachtungen kann möglicherweise von einem universell relevanten, die HKII involvierenden antiapoptotischen Mechanismus ausgegangen werden. Die Kenntnis der ablaufenden intrazellulären Signalkaskaden wäre dann nicht nur bei einem Schlaganfall von therapeutischer Relevanz, sondern auch bei anderen ischämisch bedingten Erkrankungen, wie beispielsweise einem Myokardinfarkt vorteilhaft.

4.5. Bedeutung einer putativen BH-4 Domäne der Hexokinase II

Die hydrophobe N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz der HK stellt die strukturelle Voraussetzung für die Assoziation des Proteins in die äußere Mitochondrienmembran dar. Durch eine Interaktion mit einer oder mehreren Transmembrandomänen von VDAC1 ist die Domäne maßgeblich an der Vermittlung der zellschützenden Effekte des glykolytischen Enzyms beteiligt (Pastorino und Hoek, 2008; Xie und Wilson, 1988). Demgegenüber sind die HK Isoformen III und IV (Glukokinase) durch Fehlen der N-terminalen Domäne unfähig, direkt an die mitochondriale Membran zu binden und darüber eine antiapoptotische Wirkung zu generieren.

Da die Effizienz der mitochondrialen Hexokinasebindung im wesentlichen von der Proteinkonformation der HK bestimmt wird, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass auch andere Regionen der HK diese Interaktion mit beeinflussen. Demnach könnten besonders der mitochon-

drialen Membran dicht anliegende Proteinstrukturen eine stabilisierende Wirkung auf die HK-VDAC-Beziehung ausüben (Hashimoto und Wilson, 2000). Alternativ könnte die bindungsassoziierte Konformationsänderung der HK auch zu einer Vorzugsposition von potentiell apoptose-modifizierenden HK Domänen führen, was eine direkte Wechselwirkung mit proapoptotischen Molekülen wie Bax und trunkiertem Bid (tBid) ermöglicht. Wie in Kapitel 1.6.1. beschrieben, besitzen antiapoptotische Bcl-2 Proteine eine derartige Strukturdomäne (BH-4), über welche sie in der Lage sind proapoptotische Moleküle zu binden, um einen Apoptosestimulus suffizient zu unterdrücken. Interessanterweise wurde von Pastorino und Hoek, 2003 im Rahmen einer Übersichtsarbeit eine solche BH-4 Region im C-Terminus des HKII Proteins postuliert. Mittels multipler Strukturanalysen wurde eine 25%-ige Übereinstimmung der HK-Aminosäurestruktur mit der N-terminal lokalisierten BH-4 Domäne anderer Bcl-2 Proteine gefunden. Die sequenzielle Ähnlichkeit der HKII Region ist somit wesentlich größer, als die zwischen den antiapoptotischen Vertretern Bcl-x_L und Bcl-w.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Funktionalität einer putativen HKII-BH-4 Domäne getestet. Der negative Effekt der mutierten HKII Region könnte für die Existenz mindestens einer weiteren, die mitochondriale Bindung unterstützenden, HK Domäne sprechen (Pastorino und Hoek, 2003). Jedoch lässt sich über die spezifische Bedeutung der BH-4 Strukturhomologie, im Sinne einer ausschließlich stabilisierenden oder einer mit der Mitochondrienmembran direkt interagierenden Aufgabe nur spekulieren. Im Falle von Bcl-x_L ist eine essentielle Rolle der BH-4 Domäne bei der VDAC-Inhibierung beschrieben (Maila und Wagner, 2007). Die mtHK steht auch im Verdacht einen hemmenden Einfluss auf die VDAC-Konduktivität ausüben (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004). In der Arbeit von Malia und Wagner, 2007 wurde eine durch die VDAC-Bcl-x_L-Interaktion ausgelöste Verschiebung des Oligomerisationsequilibriums von einem prädominant oligomeren zu einem vorzugsweise monomeren Zustand von VDAC nachgewiesen. Im Kontrast dazu führt die Hexokinasebindung zu einer oligomeren Formation der VDAC-Struktur. Diese konträren Beobachtungen suggerieren zum einen die Unfähigkeit, dass beide antiapoptotischen Proteine gleichzeitig an VDAC binden können und zum anderen schließt es die Möglichkeit aus, dass beide Proteine über identische molekulare Mechanismen ihre zellschützende Wirkung vermitteln. Teilweise könnte dies durch die unterschiedliche Lokalisation der BH-4 Domänen innerhalb der Proteine erklärt werden. Während sich die BH-4 Domäne bei den antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2 Familie streng im N-Terminus befindet, ist sie bei der HKII C-terminal lokalisiert (Abb. 22). Um eine eindeutige Aussage über die Funktionalität der putativen HKII-BH-4 Domäne treffen zu können, sind jedoch weitere Experimente notwendig. Insbesondere der Austausch der HKII-BH-4 Domäne mit der BH-4 Region von Bcl-x_L könnte zur besse-

ren Charakterisierung der antiapoptotischen Potenz der HKII-BH-4 Domäne beitragen. Interessant wäre auch die Fragestellung, ob sich noch weitere BH Domänen innerhalb der HKII Struktur befinden und in wieweit die HKII damit in die Familie der Bcl-2 Familie eingeordnet werden kann.

4.6. *Ausblick*

Neben der strukturellen Notwendigkeit einer funktionellen HKII-mitochondrialen Lokalisationssequenz und katalytischen HKII-Aktivität sind für die antiapoptotische Wirkung des glykolytischen Enzyms auch das Akt-Phosphorylierungsmotif der HKII und die antiapoptotische HKII-BH-4 Domäne von essentieller Bedeutung. In Zusammenschau der Zellkulturexperimente kann von einer komplexen Regulation der HKII-vermittelten Neuroprotektion ausgegangen werden. Um die molekularen Mechanismen der HKII-abhängigen Regulation des neuronalen Zelltodes besser charakterisieren zu können, sind weitere funktionelle Testungen erforderlich. Unter Berücksichtigung fehlender neuronaler Glykogenspeicher ist insbesondere die Entschlüsselung der neuroprotektiven Wirkung der HKII bei kombinierter Sauerstoff- und Glukose-Deprivation interessant. Zusätzlich sollte der Unterschied zur reinen Glukose-Deprivation mit einem negativen Effekt der HKII Überexpression geklärt werden. Neue Erkenntnisse zur zellschützenden Funktionsweise der HKII könnte die Identifizierung von weiteren HKII-Bindungspartnern erbringen. Das Verständnis der regulatorischen Funktion der HKII als Schnittstelle zwischen Glukosemetabolismus und Apoptoseregulation ist dabei über die zerebrale Ischämie hinaus von biologischer Relevanz. Möglicherweise könnten die Erkenntnisse zur Therapieoptimierung bei anderen ischämisch oder durch oxidativen Stress induzierten Erkrankungen wie neurodegenerativen- oder Tumorerkrankungen beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die molekularen Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung der Hexokinase II in einem *in vitro* Modell der zerebralen Ischämie zu untersuchen. Klassischerweise gehört die Hexokinase II (HKII) zu den vier Hexokinase Isoenzymen, die den ersten obligatorischen Schritt im Glukosestoffwechsel von Säugetieren katalysieren. Neben ihrer zentralen Rolle im Energiemetabolismus kommt der HKII eine funktionelle Bedeutung innerhalb der Apoptoseregulation zu.

Zur Charakterisierung der neuroprotektiven Eigenschaften der HKII wurden Expressionsvektoren mit Punktmutationen in bereits bekannte, funktionell und strukturell wichtige HKII Domänen generiert, in eine primäre Neuronenkultur transfiziert und im Rahmen der kombinierten Sauerstoff- und Glukose-Deprivation (*OGD*) beziehungsweise reinen Sauerstoff-Deprivation (*OD*) oder Glukose-Deprivation (*GD*) auf ihre antiapoptotischen Effekte getestet.

Die Ergebnisse demonstrieren die essentielle Bedeutung der mitochondrialen HKII-Bindung für die Vermittlung des neuronalen Zellschutzes im *OGD*-Modell, dargestellt durch die Aufhebung der protektiven Effekte bei Überexpression einer mitochondrialen Lokalisationssequenz defizienten HKII Mutante. Durch funktionelle Testung einer Akt-Phosphorylierungsdefizienten HKII Mutante und Akt-Phosphomimetischen HKII Mutante konnte eine apoptose-regulatorische Wirkung des HKII-Akt-Phosphorylierungsmotifs unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Der negative Effekt der HKII-BH-4 Domäne inaktivierten Mutante auf das Neuronenüberleben bestätigt die Funktionalität einer im C-Terminus des HKII Proteins postulierten HKII-BH-4 Domäne. In Zellkulturexperimenten mit einer katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante zeigte sich eine Glukoseabhängigkeit der antiapoptotischen Eigenschaften der HKII. Die katalytische Aktivität der HKII ist maßgeblich an der zellschützenden Wirkung des glykolytischen Enzyms beteiligt und macht die HKII zu einem interessanten Verknüpfungspunkt zwischen Zellmetabolismus und Apoptoseregulation.

Durch die strukturell-funktionelle Charakterisierung der HKII-vermittelten Neuroprotektion erschließt sich ein besseres Verständnis der ablaufenden molekularen Mechanismen innerhalb der Apoptoseregulation. Diese Erkenntnisse bieten einen gezielteren Ansatz für die Identifizierung und Entwicklung von neuen Wirkstofftargets zur Therapie von neurodegenerativen- und Tumorerkrankungen. Da die HK neben ihrer ubiquitären Expression eine allgemein große Bedeutung für den Glukosemetabolismus in Säugetierzellen hat, könnten die nachgewiesenen funktionell-wichtigen HKII Domänen auch über neuronale Zellen hinaus relevant sein und beispielsweise zur Therapieoptimierung bei einem Myokardinfarkt beitragen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams HP, del Zoppa G, Alberts MJ, et al.. For the American Heart Association, American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke. *Stroke* **2007**;38:1655-1711.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **1998**;281:1322-26.
- Ahmad A, Ahmad S, Schneider BK, Allen CB, Chang LY, White CW. Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**;283:573-84.
- Ardehali H, Printz RL, Whitesell RR, May JM, Granner DK. Functional interaction between the N- and C-terminal halves of human hexokinase II. *J Biol Chem* **1999**;274:1586-89.
- Ardehali H, Yano Y, Printz RL, et al. Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH₂- and COOH-terminal halves. *J Biol Chem* **1996**;271:1849-52.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria mediated apoptotic cell death. *Biochem J* **2004**;377:347-55.
- Bustamante E, Morris HP, Pederson PL. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* **1981**;256:8699-704.
- Caplan LA Clinical Approach. Butterworth Heinemann. Caplan's Stroke;**2000**.

- Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* **1998**;1401:242-64.
- Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**;2:769-76.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **2002**;84:143-52.
- Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* **2005**;30:559-65.
- Danziger N, Yokoyama M, Jay T, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H. Cellular expression, developmental regulation, and phylogenetic conservation of PEA-15, the astrocytic major phosphoprotein and protein kinase C substrate. *J Neurochem* **1995**;64:1016-25.
- Da-Silva WS, Gomez-Puyou A, Gomez-Puyou MT, et al. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem* **2004**;279:39846-55.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) Leitlinien **2008**; Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. (Last accessed May 22, 2010 at http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/LL2008/II08kap_023.pdf).
- Desagher S, Martinou J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **2000**;10:369-77.
- Diederichs C, Mühlenbruch K, Lincke HO, Heuschmann PU, Ritter MA, Berger K. Predictors of dependency on nursing care after stroke: results from the Dortmund and Münster stroke registry. *Dtsch Arztebl Int* **2011**;36:592-99.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **1999**;22:391-7.

-
- Dirnagl U and Meisel A. Endogenous neuroprotection: Mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology* **2008**;55:334-44.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Neuropharmacology – Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage. *Neuropharmacology* **2008**;55:310-18.
- Eckert A, Böck BC, Tagscherer KE, et al. The PEA-15/PED protein protects glioblastoma cells from glucose deprivation-induced apoptosis via the ERK/MAP kinase pathway. *Oncogene* **2008**;27:1155-66.
- Edvinsson L, Krause DN. Lippincott Williams and Wilkins *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**.
- European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee and ESO Writing Committee: Guidelines for the Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack. *Cerebrovasc Dis* **2008**;25:457-507.
- Fiory F, Formisano P, Perruolo G, Beguinot F. Frontiers: PED/PEA-15, a multifunctional protein controlling cell survival and glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**;297:E592-601.
- Galluzzi L, Kepp O, Tajeddine N, Kroemer G. Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene* **2008**;27:4633-5.
- Gimenez Cassina A, Lim F, Cerrato T, Palomo GM, Diaz-Nido J. Mitochondrial Hexokinase II Promotes Neuronal Survival and Acts Downstream of Glycogen Synthase Kinase-3. *J Biol Chem* **2009**;284:3001-11.
- Gilmore RM, Stead LG. The role of hyperglycemia in acute ischemic stroke. *Neurocrit Care* **2006**;5:153-8.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* **2001**;15:1406-18.

-
- Günster C: Schlaganfallversorgung in Deutschland – Inzidenz, Wiederaufnahme, Mortalität und Pflegerisiko im Spiegel von Routinedaten. In: Günster C, Klose J, Schmacke N (eds.): Versorgungsreport **2011** – Schwerpunkt: Chronische Erkrankungen, Schattauer, Stuttgart.
- Gürel E, Smeele KM, Eerbeek O, et al. Ischemic preconditioning affects hexokinase activity and HKII in different subcellular compartments throughout cardiac ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* **2009**;106:1909-16.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* **2008**;359:1317-29.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* **2007**;1767:1007-31.
- Halestrap AP, Brennerb C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* **2003**;10:1507-27.
- Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* **2000**;28:170-7.
- Hashimoto M, Wilson JE. Membrane potential-dependent conformational changes in mitochondrially bound hexokinase of brain. *Arch Biochem Biophys* **2000**;384:163-73.
- Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, et al. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* **2010**;37:333-40.
- Hossini AM, Eberle J. Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol* **2008**;76:1612-9.
- Huang DC, Adams JM, Cory S. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* **1998**; 17:1029-39.

-
- Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci* **2011**;14:1363-8.
- Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock: effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesth Clin* **1964**;2:251-9.
- Ju KL, Manley NC, Sapolsky RM. Anti-apoptotic therapy with a TAT fusion protein protects against excitotoxic insults in vitro and in vivo. *Exp Neurol* **2007**;210:602-7.
- Kemp PJ and Peers C. Oxygen sensing by ion channels. *Essays Biochem.* **2007**;43:77-90.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* **1990**;528:21-4.
- Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, et al. Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF-alpha-induced apoptosis. *J Neurosci* **1999**;19:8244-51.
- Knecht S, Hesse S, Oster P. Rehabilitation after stroke. *Dtsch Arztebl Int* **2011**;36:600-6.
- Leung AWC, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* **2008**;1777:946-52.
- Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J. Cereb Blood Flow Metab* **2002**;22:431-43.
- Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, et al. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **2004a**;16:819-30.
- Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol*

Cell Biol **2004b**;24:730-40.

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* **2009**;19:17-24.

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **2006**;25:4777-86.

Mergenthaler P, Kahl A, Kamitz A, et al. Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) form a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**;109(5):1518-23.

Mergenthaler P. Hexokinase II-vermittelte Hypoxietoleranz und endogene Neuroprotektion. Klinik für Neurologie, Berlin – Charité Universitätsmedizin Berlin, **2011**.

Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* **2008**;15:521-9.

Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* **2000**;54:2089-94.

Mumenthaler M und Mattle H. Neurologie: 12. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2008**.

Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics: 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.

Mulichak AM, Wilson JE, Padmanabhan K, Garavito RM. The structure of mammalian hexokinase-1. *Nat Struct Biol* **1998**;5:555-60.

Murphy E. Inhibit GSK-3beta or there's heartbreak dead ahead. *J Clin Invest* **2004**;113:1526-8.

-
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **1986**;74:1124-36.
- Neeb L. Genexpressionsanalyse der Induktion von HIF-1-Zielgenen durch Präkonditionierung im Gehirn *in vivo* und *in vitro*. Klinik für Neurologie, Berlin – Charité Universitätsmedizin Berlin, **2006**.
- Nishimura M, Sugino T, Nozaki K, et al. Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**;23:1052-9.
- Pastorino JG and Hoek JB (2003). Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* **10**, 1535-51.
- Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* **2005**; 65:10545-54.
- Pastorino JG and Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **2008**;40:171-82.
- Pederson PL. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the Warburg effect“ in cancer. *J Bioenerg Biomembr* **2008**;40:123-6.
- Perez M, Rojo AI, Wandosell F, Diaz-Nido J, Avila J. Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J* **2003**; 372:129-136.
- Quinn TJ and Lees KR. Hyperglycaemia in Acute Stroke – To Treat or Not to Treat. *Cerebrovasc Dis* **2009**;27:148-55.
- Robey RB and Hay N. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria. *Cell Cycle* **2005**;4:654-8.

-
- Robey RB and Hay N. Mitochondrial hexokinases: novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **2006**;25:4683-96.
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J. Neurosci.* **2002**;22:10291-301.
- Sambrook J and Russel DW. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd edn Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2001**.
- Semenza GL. Regulation of metabolism by Hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2011**.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* **2007**; cm8.
- Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* **2000**;106:809-12.
- Shoshan-Barmatz V and Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* **2003**;39:279-92.
- Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**;97:3100-5.
- Sims NR und Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta* **2010**;1802:80-91.
- Sitzer M, Foerch C, Neumann-Haefelin T, et al. Transient ischaemic attack preceding anterior circulation infarction is independently associated with favourable outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2004**;75:659-60.

-
- Smeele KM, Southworth R, Wu R, et al. Disruption of Hexokinase II mitochondrial binding blocks ischemic preconditioning and causes rapid cardiac necrosis. *Circ Res* **2011**; 108:1165-9.
- Sugioka R, Shimizu S, Funatsu T, et al. BH4-domain peptide from Bcl-x_L exerts antiapoptotic activity *in vivo*. *Oncogene* **2003**;22:8432-40.
- Sun L, Shukair S, Naik T J, Moazed F, Ardehali H. Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of Hexokinase I and II. *Mol Cell Biol* **2008**;28:1007-17.
- Tsai HJ and Wilson JE. Functional Organization of mammalian hexokinases: both N- and C-terminal halves of the rat type II Isozyme possess catalytical sites. *Arch Biochem Biophys* **1996**; 329:17-23.
- Tsujimoto Y and Shimizu S. Role of mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* **2007**;12:835-40.
- Tsujimoto Y and Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* **2000**;7:1174-81.
- Vallejo AN, Pogulis RJ, Pease LR. PCR mutagenesis by overlap extension and gene SOE. *CSH Protoc* **2008**;4861.
- Van der Heiden MG, Chandel NS, and Schumacker PT. Bcl-x_L prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* **1999**;3:159-167.
- Vogt AM, Poolman M, Ackermann C, et al. Regulation of glycolytic flux in ischemic preconditioning: a study employing metabolic control analysis. *J Biol Chem* **2002**;277:24411-19.
- Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, et al. Thrombolysis with alteplase 3-4.5h after acute stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* **2008**;372:1303-9.

- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* **2004**;35:616-21.
- Weih M, Kallenberg K, Bergk A, et al. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* **1999**;30:1851-4.
- Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **2003**;206:2049-57.
- Wilson JE. Homologous and heterologous interactions between hexokinase and mitochondrial porin: evolutionary implications. *J Bioenerg Biomembr* **1997**;29:97-102.
- Wilson JE. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **1995**;126:65-198.
- Wilson JE. On the existence of a nucleotide-binding regulatory site on brain hexokinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1978**;82:745-749.
- Xie G and Wilson JE. Tetrameric structure of mitochondrially bound rat brain hexokinase: a crosslinking study. *Arch Biochem Biophys* **1990**;276:285-293.
- Xie G and Wilson JE. Rat brain hexokinase: the hydrophobic N-terminus of the mitochondrially bound enzyme is inserted in the lipid bilayer. *Arch Biochem Biophys* **1988**;276:803-810.
- Youle RJ and Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**;9:47-59.
- Zurbier CJ, Eerbeek O, Meijer AJ. Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**;289:H496-499.
- Zurbier CJ, Eerbeek O, Goedhart PT, et al. Inhibition of the pentose phosphate pathway decreases ischemia-reperfusion induced CK release in the heart. *Cardiovasc Res* **2004**;62:145-53.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Meisel für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, vor allem aber für seine freundschaftliche Unterstützung und wissenschaftliche Förderung. Er war ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mein Interesse an der neurologischen Forschung auch über diese Arbeit hinausgehend wecken konnte. Herzlichen Dank auch für die kritischen, äußerst konstruktiven und wertvollen inhaltlichen Anmerkungen bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl, Leiter des Instituts für Experimentelle Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für interessante wissenschaftliche Diskussionen und Ratschläge bedanken.

Für die sehr geduldige und kompetente Einführung in die Arbeitsmethoden und Modelle der Zellkultur sowie für ihre technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda herzlich bedanken.

Frau Claudia Muselmann möchte ich insbesondere für die hervorragende und umfassende Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und Laborbuchführung danken.

Herrn Dr. rer. nat. Dirk Megow danke ich für seine Expertise bei der Beantwortung von biochemischen Fragestellungen. Besonders erwähnt seien, die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung der Western Blot-Analysen.

Schließlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie und insbesondere meiner Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, wissenschaftliche Diskussionen und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank geht dabei an Ferah Yildirim, Hanne Schaffert, Sascha Wecker, Katharina Stohlmann, Odilo Engel, Sophie Schweizer, Anne Kamitz, Heike Lerch, Ana Oliveira Ferreira, Jochen Müller und Stefanie Märtsch. Für die Zusammenarbeit innerhalb des HKII-Projekts möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Philipp Mergenthaler bedanken.

Bei Christoph Wernicke und Hanne Schaffert möchte ich mich für die geduldige und kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie die inhaltlichen Anregungen bedanken. Herzlichen Dank für Eu-

re Freundschaft und jeden anderen wertvollen, unterstützenden Beistand.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit und ihre fortwährende Unterstützung.

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

PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten

Mergenthaler P, Kahl A, Kamitz A, Van Laak V, Stohlmann K, Thomsen S, Klawitter H, Przesdzing I, Neeb L, Freyer D, Priller J, Collins TJ, Megow D, Dirnagl U, Andrews DW, Meisel A (2012). Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15) from a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**;109(5):1518-23.

Gruber C, Kahl A, Lebenheim L, Kowski A, Dittgen A, Veh RW. Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci Lett* **2007**;427:165-70.

Konferenzbeiträge

Kahl A, Mergenthaler P, Freyer D, Megow D, Dirnagl U and Meisel A (2011). Hexokinase II – A novel mediator of energy metabolism and cell survival. European Students Conference, Berlin. ESC-ID: 119.

Kahl A, Freyer D, Megow D, van Laak V, Dirnagl U, Meisel A, Mergenthaler P (2009). Hexokinase II – A novel mediator of energy metabolism and cell survival. Society for Neuroscience, Chicago, USA. Poster Board Number J5.

Kahl A, Mergenthaler P, Freyer D, Megow D, Dirnagl U, Meisel A (2008). A functional characterization of Hexokinase II. Society for Neuroscience, Washington, DC, USA. Poster Board Number AA8.

Kahl A, Mergenthaler P, Freyer D, Megow D, Dirnagl U, Meisel A (2008). Hexokinase II mediated survival – Characterization of apoptosis-modulating pathways. European Students Conference, Berlin, Germany. ESC-ID: 154.

Auszeichnungen

ESC Research Award (3. Platz) bei der European Students Conference 2011, Berlin.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Erklärung

Ich, Anja Kahl geboren am 02.12.1982, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation zu dem Thema: *Molekulare Mechanismen der glukoseabhängigen Regulation des neuronalen Zelltodes durch die Hexokinase II* selbst angefertigt 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. Die Zellkulturexperimente der katalytisch-inaktiven HKII Doppelmutante (Kapitel 3.4.) wurden von Herrn Dr. med. Philipp Mergenthaler durchgeführt und mir die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Anja Kahl

Berlin, 31. März 2012