

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

DISSERTATION

**„Charakterisierung der neuroprotektiven Hexokinase II - PEA15 Protein-
Protein Interaktion“**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Rebecca Bärwald
aus Suhl

Datum der Promotion: 06.09.2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	11
1. ABSTRACT DEUTSCH	13
2. ABSTRACT ENGLISCH	15
3. EINLEITUNG	17
3.1. Der Schlaganfall.....	17
3.1.1. Pathophysiologie.....	18
3.2. Pathomechanismus des Zelltodes.....	19
3.2.1. Apoptose.....	21
3.2.1.1. Apoptosemodulation durch die Proteine der Bcl-2-Familie.....	22
3.3. Endogene Neuroprotektion – Das Prinzip der Präkonditionierung.....	24
3.3.1. Rolle von HIF-1.....	25
3.3.1.1. HIF-1-Regulation der Energiegewinnung unter Hypoxie.....	27
3.4. Hexokinase.....	28
3.4.1. Funktion und Struktur.....	29
3.4.2. Expressionsregulation der Hexokinase II.....	29
3.4.3. Apoptosemodulation durch Hexokinase II.....	30
4. AUFGABENSTELLUNG	33

5. MATERIAL	34
5.1. Geräte	34
5.2. Zellkulturmedien und Zusätze.....	35
5.3. Medien- und Pufferzusammensetzungen	35
5.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	37
5.5. Antikörper.....	38
5.6. Kits und Gele.....	38
5.7. Bakterienstämme	39
5.8. Software und Datenbanken	39
5.9. Verbrauchsmaterialien.....	39
6. METHODEN	41
6.1. Zellkultur	41
6.1.1. HeLa-Zellkultur.....	41
6.1.1.1. Herstellung eines HeLa-Proteinvolllysates	41
6.1.2. HEK-293-Zellkultur	42
6.2. Klonierung eines DNA-Plasmids	42
6.2.1. Herstellung des Inserts	43
6.2.1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
6.2.1.2. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	44
6.2.1.3. Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	45

6.2.1.4.	Verdau des Inserts mit Restriktionsenzymen.....	46
6.2.2.	Herstellung des Vektors.....	47
6.2.2.1.	Restriktionsverdau des Vektors.....	47
6.2.2.2.	Dephosphorylierung des Vektors.....	48
6.2.3.	Ligation von Vektor und Insert.....	49
6.2.4.	Transformation des DNA-Plasmids in kompetente Bakterienzellen.....	50
6.2.5.	Präparation der Plasmid-DNA aus kompetenten E. coli	51
6.2.6.	Maxipräparation der Plasmid-DNA	51
6.2.7.	Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA.....	51
6.2.8.	Herstellung weiterer in der Arbeit verwendeter Plasmide.....	52
6.3.	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryonte Zellen.....	52
6.3.1.	Transfektion mit Elektroporation	52
6.3.2.	Transfektion mit Roti Fect Plus®.....	53
6.4.	Co-Immunpräzipitation	53
6.5.	Western Blot	55
6.6.	Duolink® II Fluorescence Assay (Proximity Ligation Assay, PLA).....	56
6.6.1.	Mikroskopie	57
6.6.2.	Blobfinder Software	59
7.	ERGEBNISSE	61
7.1.	Interaktionsdetektion mit Co-Immunpräzipitation.....	61
7.1.1.	Etablierung einer für den Western Blot geeigneten Antikörperkonzentration.....	61

7.1.2.	Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression einer mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Hexokinase II durch Transfektion von pCDNA 3.1- HKII-Sp-Venus bzw. pCAG-HKII-Venus	62
7.1.3.	Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Pea15-Proteins durch Transfektion von pCAG-Pea15-Venus	64
7.1.4.	Immunpräzipitation mittels RFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion von pCAG-Pea15-Cherry	65
7.1.5.	Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression einer mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Hexokinase II durch Transfektion mit pCAG-HKII-Venus und gleichzeitiger Überexpression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion mit pCAG-Pea15-Cherry	67
7.1.6.	Immunpräzipitation mittels RFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion mit pCAG-Pea15- Cherry und gleichzeitiger Überexpression von mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierter HKII durch Transfektion von pCAG-HKII-Venus	70
7.1.7.	Zusammenfassung der IP-Experimente	72
7.2.	Auswertung der Proximity Ligation Assays-Experimente	73
7.2.1.	Etablierung einer geeigneten Zelllinie und Transfektionsmethode.....	73
7.2.2.	Etablierung der für die Proximity Ligation Assays geeigneten Plasmidmenge	74
7.2.3.	Ergebnisse der Proximity Ligation Assays.....	74
7.2.3.1.	Interaktionen zwischen HKII und Pea15.....	77
7.2.3.2.	Interaktionen zwischen HKII_S155A/S603A und Pea15	79
7.2.3.3.	Interaktionen zwischen HKII und Pea15_S104G/S116G	80
7.2.3.4.	Interaktionen zwischen HKII und Pea15_D74A.....	81

7.2.3.5.	Zusammenfassung der PLA-Experimente	83
8.	DISKUSSION	84
8.1.	Nachweis der Interaktion zwischen HKII und Pea15 durch Co-Immünpräzipitation	84
8.1.1.	Transfektionsbedingungen	84
8.1.2.	Auswahl der Promotoren	85
8.1.3.	Limitationen der Methodik.....	86
8.1.4.	Analyse der Western-Blot-Banden	88
8.2.	Untersuchung der Interaktion in Abhängigkeit funktionell wichtiger Strukturen der Bindungspartner	90
8.2.1.	Bedeutung der katalytischen Untereinheit der Hexokinase II für die Interaktion mit Pea15	90
8.2.2.	Bedeutung funktioneller Strukturen des Pea15 für die Interaktion mit HKII	92
8.2.2.1.	Bedeutung der Phosphorylierungsmotive des Pea15-Proteins	92
8.2.2.2.	Bedeutung der ERK-Bindungsstelle innerhalb der Death Effector Domain (DED) des Pea15-Proteins	94
8.2.3.	Limitationen der Methodik.....	95
8.3.	Antiapoptotische Wirkung der Hexokinase.....	96
8.4.	Bedeutung der mitochondrialen Lokalisation der Hexokinase	97
8.5.	Interaktion der Hexokinase mit mitochondrialen Proteinen.....	100
8.6.	Ausblick.....	101
9.	ZUSAMMENFASSUNG	103

10. LITERATURVERZEICHNIS	105
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	114
LEBENS LAUF	116
PUBLIKATIONS LISTE.....	117
DANKSAGUNG.....	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	<i>Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> ; ein an der Apoptoseregulation beteiligtes Protein und Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BSS	<i>balanced salt solution</i> (ausgewogene Salzlösung)
cDNA	komplementäre DNA
DFO	Deferoxamin
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DIV	<i>Day in vitro</i> (Tag in Kultur)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escheria coli
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
HEK	Human Embryonic Kidney, Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen
HeLa	Zelllinie aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, benannt nach der Patientin, bei welcher 1951 in den USA diese Karzinomzellen isoliert werden konnten
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i> (Hypoxie-induzierbarer Faktor)
HK	Hexokinase

HKII	Hexokinase II
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Mrd	Milliarde
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i> (rot fluoreszierendes Protein)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i> (spannungsabhängiger Anionenkanal in der äußeren Mitochondrienmembran)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Zelluläre Pathophysiologie des Schlaganfalls	20
Abbildung 2:	Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose	22
Abbildung 3:	Regulation von HIF-1 durch den Eisenchelator Deferoxamin bei Normoxie	26
Abbildung 4:	Übersicht der Primersequenzen zur Klonierung	44
Abbildung 5:	Vektorkarte des Plasmids pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus	50
Abbildung 6:	Prinzip der GFP-Trap	54
Abbildung 7:	Prinzip des Proximity Ligation Assay	56
Abbildung 8:	Aufnahme eines Gesichtsfeldes	58
Abbildung 9:	Blobfinder Analyse Single Image	60
Abbildung 10:	Western Blot (pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus/GFP-Trap)	63
Abbildung 11:	Western Blot (pCAG-HKII-Venus/GFP-Trap)	63
Abbildung 12:	Western Blot (pCAG-Pea15-Venus/GFP-Trap)	64
Abbildung 13a:	Western Blot (pCAG-Pea15-Cherry/RFP-Trap)/Exposure Time 5 Minuten	66
Abbildung 13b:	Western Blot (pCAG-Pea15-Cherry/RFP-Trap)/Exposure Time 20 Minuten	67
Abbildung 14a:	Western Blot (pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry/ GFP-Trap)/Exposure Time 5 Minuten	68
Abbildung 14b:	Western Blot (pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry/ GFP-Trap)/Exposure Time 45 Minuten	69
Abbildung 15:	Western Blot (pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry/ GFP-Trap)	70
Abbildung 16:	Western Blot (pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry/ RFP-Trap)	71
Abbildung 17:	Western Blot (pCAG-Pea15-Cherry/GFP-Trap)	72

Abbildung 18:	Graphische Darstellung der Signale pro Zelle	76
Abbildung 19:	Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15	78
Abbildung 20:	Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII_S155A/603A und Pea15	80
Abbildung 21:	Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15_S104G/116G	81
Abbildung 22:	Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15_D74A	82

1. ABSTRACT DEUTSCH

Einleitung:

Der Schlaganfall gilt als eine der führenden Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland. Die insuffiziente Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glukose führt zur Aktivierung verschiedener, hoch komplexer Signalwege. Unter anderem kommt es bei Substratdeprivation zur Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose. In Studien konnte in diesem Zusammenhang die Schlüsselrolle eines Enzyms der Glykolyse, der Hexokinase II, hinsichtlich ihres protektiven Einflusses auf das Hirngewebe gezeigt werden (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die antiapoptotische Wirkung wird dabei durch einen Multiproteinkomplex der äußeren Mitochondrienmembran vermittelt. Als einer der Interaktionspartner der Hexokinase II konnte unter anderem das Protein Pea15 (*phosphoprotein Enriched in Astrocytes, 15 kDa*) erfasst werden (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der Co-Immunpräzipitation mit GFP- und RFP-Trap zum Nachweis von Proteininteraktionen. Damit sollte ein Immunpräzipitation-basiertes Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten ermöglicht und der Einfluss strukturell und funktionell wichtiger HKII- und Pea15-Domänen auf die Interaktion der beiden Proteine untersucht werden. Als Alternativmethodik wurde das *proximity ligation assay* (PLA-) basierte Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten in Zellkulturen herangezogen.

Methodik:

Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden in HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) mittels Elektroporation (Nucleofection™) überexprimiert. Dabei wurden die transfizierten Gene an Fluoreszenzproteine gekoppelt. Über den Pulldown dieser mittels GFP-beziehungsweise RFP-Trap war es möglich, die zu untersuchenden Interaktionspartner im Western Blot darzustellen.

Für die Durchführung des PLA wurden in funktionell und strukturell wichtigen HKII- und Pea15-Domänen punktmutierte Proteine in humanen embryonalen Nierenzellen überexprimiert.

Über die mit der Blobfinder-Software ausgewerteten Interaktionshäufigkeiten der Proteine in den Zellen nach Durchführung des PLA war ein Vergleich zwischen den untersuchten Mutanten und den wildtypischen Proteinen möglich.

Ergebnisse:

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis einer Interaktion von HKII und Pea15 unter Anwendung der RFP-Trap.

Schlussfolgerung:

Ein Immunpräzipitation-basiertes Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten ist auf der Grundlage der in der vorliegenden Arbeit etablierten Untersuchungsbedingungen möglich.

Hinsichtlich des PLA-basierten Screenings ist die Durchführung weiterer Experimente zur Optimierung der experimentellen Bedingungen notwendig.

2. ABSTRACT ENGLISCH

Introduction:

Stroke is one of the leading causes of death in Germany. An insufficient supply of oxygen and glucose in the cells leads to various, highly complex signal transmissions. Among other things substrate deprivation leads to the induction of programmed cell death, apoptosis. Studies in this respect have shown the key role of Hexokinase II, an enzyme in glycolysis, in the brain tissue with regard to its protective influence (Mergenthaler *et al.*, 2012). The anti-apoptotic effect is mediated by a multiprotein complex of the outer mitochondrial membrane. The protein Pea15 (phosphoprotein Enriched in Astrocytes, 15 kDa) was detected as one of the interactional partners of Hexokinase II (Mergenthaler *et al.*, 2012). The objective of this study was to establish the co-immunoprecipitation with GFP- and RFP-Trap for the detection of protein interactions. An immunoprecipitation-based screening of Hexokinase II and Pea15 mutants should exhibit the influence of structurally and functionally important HKII and Pea15 domains for the interaction of the two proteins. The proximity ligation assay-(PLA-)based screening of Hexokinase II and Pea15 mutants was used as an alternative method to investigate these interactions in cell cultures.

Methods:

Interactional partners in question were overexpressed in HeLa-cells (human epithelial cells of cervical cancer) by electroporation (Nucleofection™). The transfected genes of interest were coupled to fluorescent proteins. With the use of this method, it was possible to examine the interactional partners using GFP or RFP-Trap display in Western Blot.

Functionally and structurally important HKII- and Pea15 point-mutated protein domains were overexpressed in human embryonic kidney cells for the implementation of the PLA. After performing the PLA, Blobfinder software was used to show interaction frequencies of the proteins in the cells, a comparison between the analyzed mutants and the wild-type proteins was possible.

Results:

It was possible to detect an interaction of HKII and Pea15 using the RFP-Trap in the present work.

Conclusion:

Based on the examination conditions put forth in this paper it is feasible to do an immunoprecipitation-based screening of Hexokinase II and Pea15 mutants.

Further experiments are necessary to optimize experimental conditions to carry out the PLA- based screening.

3. EINLEITUNG

3.1. Der Schlaganfall

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation ist der Schlaganfall als ein klinisches Syndrom definiert, welches sich durch ein schnell einsetzendes fokales oder globales zerebrales Defizit bemerkbar macht und länger als 24 Stunden andauert. Dabei kann es keine andere als eine vaskuläre Ursache geben (Warlow *et al.*, 2003). Hinsichtlich dieser Genese unterscheidet man verschiedene Pathomechanismen, wobei die klinischen Symptome gleich sind. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nur anhand der Bildgebung erkennbar (González, 2006). Es sind vor allem die Makro- und Mikroangiopathien der Gefäße sowie kardiale oder arterio-arterielle Embolien, die zu einer kritischen Minderperfusion des Hirngewebes und damit zu einem Schlaganfall führen. Deutlich weniger häufig sind Hirnblutungen, die unter anderem durch Fehlfunktionen des Gerinnungssystems wie Protein-C/S-Mangel oder das Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom ausgelöst werden können (World Health Organization, 2006). So sind 15 % der Schlaganfälle nach Angaben des Erlanger Schlaganfallregisters nicht etwa die Konsequenz der mit 80 % deutlich häufiger vorkommenden zerebralen Ischämie, sondern Folge einer intrazerebralen Blutung. Daneben sind für etwa 5 % aller apoplektischen Insulte Subarachnoidalblutungen verantwortlich (Warlow *et al.*, 2003).

Betrachtet man die aktuellen Zahlen des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2012, so zeigt sich, dass die zerebrovaskulären Erkrankungen, beziehungsweise der Schlaganfall, mit einem Anteil von 6,78 % beziehungsweise 2,34 % aller in diesem Jahr Verstorbenen weiterhin führende Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland sind. Kurz hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und den bösartigen Neubildungen rangiert der Schlaganfall auf Platz drei der Todesursachenstatistik (Statistisches Bundesamt, 2013). Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ist der Schlaganfall außerdem einer der Hauptgründe längerfristiger Pflegebedürftigkeit von Patienten. Damit verursacht das Krankheitsbild einen erheblichen Anteil an Kosten des Gesundheitssystems. Die bis zum Jahr 2025 zu erwartenden direkten medizinischen Kosten für die ambulante und stationäre Behandlung sowie Rehabilitation der Schlaganfallpatienten betragen ca. 108,6 Mrd. Euro (Kolominsky-Rabas *et al.*, 2006).

Dieser prognostizierte Anstieg der Kosten korreliert eng mit dem zu erwartenden demographischen Wandel der Bevölkerung in Deutschland. Neben arterieller Hypertonie und Nikotinabusus stellt das Alter einen entscheidenden und zudem nicht zu beeinflussenden Risikofaktor des Schlaganfalls dar. So lässt sich zwischen der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung und der Zunahme der Inzidenz des Schlaganfalls ein Zusammenhang vermuten. Die so entstehenden Behandlungs- und Rehabilitationskosten stellen eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Aus diesem Grund ist eine verstärkte Prävention und verbesserte Therapie notwendig. Das Ziel derzeitiger Forschung ist es, neue Methoden einer effizienten Behandlung aufzuzeigen. Hierfür ist es notwendig, die ablaufenden Schadens- und Regenerationskaskaden besser zu charakterisieren. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse der pathophysiologischen Mechanismen sollten in Hinblick auf Schadensbegrenzung in den klinischen Alltag übertragen werden (Iadecola und Anrather, 2011).

3.1.1. Pathophysiologie

Die insuffiziente Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glukose führt zum Ablauf verschiedenster, hoch komplexer Signalwege. Dabei kommen einige wie Exzitotoxizität und Periinfarktdepolarisation innerhalb von Minuten vor. Andere wie Inflammation, Nekrose oder Apoptose hingegen treten Stunden bis Tage nach der Substratminderversorgung des Gewebes auf (Dirnagl *et al.*, 1999; Dirnagl *et al.*, 2009). Das Hirnareal, welches bei einer fokalen Ischämie zwischen dem Infarktkern und dem gesunden Hirngewebe entsteht, wird als „Penumbra“ bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein Areal, das sich durch einen noch teilweise erhaltenen Stoffwechsel auszeichnet. Dies ist die Folge eines verminderten, aber nicht komplett ausbleibenden Blutflusses in diesem Gebiet. Im Kern des ischämischen Gebiets kommt es durch den vollständigen Mangel des Energieträger-Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP) zum nekrotischen Zelluntergang innerhalb von Minuten. Der Zellschaden und die Masse der zugrunde gehenden Zellen in der Peripherie um den Infarktkern, der Penumbra, wird durch das Ausmaß der fokalen Ischämie und den Zeitpunkt der wiedereinsetzenden Perfusion bestimmt. Bleibt die Revaskularisation aus, so breitet sich der Zelluntergang weiter auf das Gebiet der Penumbra aus. Der Zelluntergang findet in diesem Bereich des relativen Energiemangels eher durch Apoptose und Entzündungsreaktionen als durch Nekrose statt (Sims und Muyderman, 2010).

Die Bereitstellung von ATP ist für das intra- und interzelluläre Gleichgewicht von essentieller Bedeutung. So verbraucht das Gehirn zur Herstellung dieses Energieträgers durch die Atmungskette etwa 20 % des gesamten Sauerstoffbedarfs des Organismus (Edvinsson und Krause, 2002). Für die Generierung und Weitergabe von Aktionspotentialen ist es notwendig, die hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration und die niedrige Natriumkonzentration aufrechtzuerhalten. Dies erfolgt mit Hilfe der Natrium-Kalium-ATPase, einer in der Zellwand sitzenden Ionenpumpe mit einem enorm hohen Energieverbrauch. Ohne Bereitstellung von ATP durch die mitochondriale Atmungskette ist dieses innerhalb von wenigen Minuten komplett verbraucht und das Überleben der Zelle akut gefährdet (Sims und Muyderman, 2010).

3.2. Pathomechanismus des Zelltodes

Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist ohne die Aktivität der ATP-verbrauchenden Natrium-Kalium-ATPase die Aufrechterhaltung des elektrischen Ladungsgradienten in der Zelle nicht mehr möglich. Über den Ausstrom von Kaliumionen in den Extrazellulärraum und den Einstrom von Natriumionen in den Intrazellulärraum kommt es zu einer Depolarisation der neuronalen Plasmamembran. Überdies kommt es durch die fehlende Funktion der Calcium-ATPase zu einem Einstrom von Calciumionen in die Zelle und zur Aktivierung calciumabhängiger exzitotoxischer Proteasen, Lipasen und DNAsen (Dirnagl *et al.*, 1999). Der dem gestörten Gleichgewicht der Ionen passiv folgende Wassereinstrom führt zur Zellschwellung und -zerstörung. Das dadurch hervorgerufene Gewebeödem verschlechtert die Perfusionsbedingungen der Infarktzone zusätzlich. Durch die Depolarisation der Zellmembran kommt es zur Ausschüttung von Neurotransmittern. So wird über natriumabhängige Transporter Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Durch den Energiemangel ist die Wiederaufnahme dieser Transmitter in die Präsynapse gestört, so dass es zur Akkumulation von Glutamat kommt. Die simultane Aktivierung von α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid-(AMPA-) und N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)Rezeptoren begünstigt den Einstrom von Na⁺- und Cl⁻-Ionen und es kommt zu einem Verlust des Ionengleichgewichts.

Es resultiert ein hoher intrazellulärer Spiegel von Calcium, Natrium und ADP. Die Aktivierung der Phospholipase A2 führt zur Produktion freier Sauerstoffradikale. Diese spielen bei der Gewebeerstörung eine zentrale Rolle und sind an den Folgeprozessen wie Inflammation und Apoptose als Triggerfaktoren maßgeblich beteiligt. Außerdem spielen sie bei der Integritätszerstörung der Zelle durch die Lyse der inneren Mitochondrienmembran und der damit verbundenen Einleitung der Apoptose eine entscheidende Rolle. Die zeitlich verzögert einsetzende Entzündung des Gewebes wird durch die Transkription verschiedener proinflammatorischer Gene induziert. So wandern unter anderem durch die Expression von Adhäsionsmolekülen Neutrophile, Monozyten und Makrophagen in das geschädigte Hirngewebe ein. Über eine Vielzahl molekularer Mechanismen kommt es zur weiteren Schädigung der Zellen des Infarktareals sowie der Penumbra. Dabei spielt sowohl die der Ischämie folgende Inflammation als auch die Apoptoseeinleitung eine zentrale Rolle (Dirnagl *et al.*, 1999).

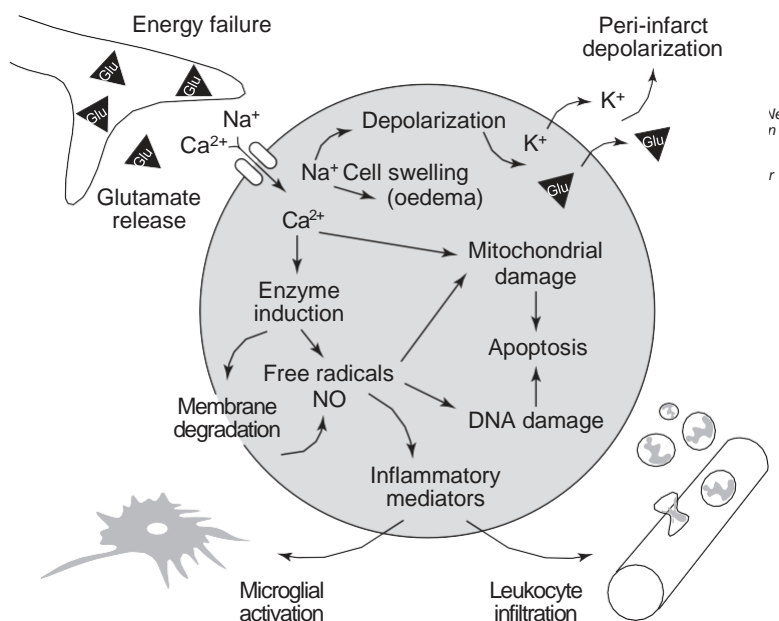


Abbildung 1: Zelluläre Pathophysiologie des Schlaganfalls. Aus Dirnagl *et al.*, 1999.

3.2.1. Apoptose

Die auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnete Apoptose umfasst einen strukturierten Ablauf von Signalkaskaden. Dies ist für die Entwicklung und das Gleichgewicht einer Zelle von enormer Bedeutung. Dabei führen sowohl physiologische als auch pathologische Signale zur Einleitung der Apoptose und zum geordneten Untergang der Zelle (Danial und Korsmeyer, 2004). In Bezug auf den Schlaganfall spielt die Apoptose vor allem im Bereich der Penumbra eine zentrale Rolle. Die Haupttriggerfaktoren der Apoptoseinduktion sind freie Sauerstoffradikale, DNA-Zerstörung, ein Ungleichgewicht der Ionen und die Aktivierung von Proteasen (Doyle *et al.*, 2008).

Bei der Einleitung der Apoptose unterscheidet man die extrinsische von der intrinsischen Initiationsphase. Beide Signalwege sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Der extrinsische Signalweg ist durch die Einleitung des Zelltodes durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor aus der Familie der sogenannten *death receptors* (Todesrezeptoren) gekennzeichnet. Diese umfasst folgende Rezeptoren: Fas/CD95, TNFR (Tumornekrosefaktorrezeptor) und TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*) - Rezeptor. Bei den möglichen Liganden aus der Tumornekrosefaktor- (TNF-) Familie handelt es sich neben TNF um FASL, LT-alpha, LT-beta, CD40L, LIGHT, RANKL und TRAIL. Diese werden infolge der Substratminderversorgung des Gewebes von Endothel-, Mikrogliazellen, Neuronen, Leukozyten und Fibroblasten als Botenstoffe ausgeschüttet (Doyle *et al.*, 2008; del Zoppo *et al.*, 2000). Die sogenannte zytoplasmatisch gelegene Todesdomäne dieser TNF-Rezeptoren ist nach Ligandenbindung in der Lage, Moleküle mit eigener Todesdomäne zu binden, wodurch sich ein sogenannter *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) bildet (Danial und Korsmeyer, 2004). Beispielsweise kommt es durch die Bindung von *Fas ligand* (FASL) an den Fas-Rezeptor zur Rekrutierung des zytoplasmatisch gelegenen Fas-associated death domain protein (FADD), welches daraufhin an die *death effector domain* der Procaspase 8 bindet. Dieser DISC sorgt anschließend für die Aktivierung weiterer Caspasen, wobei es sich um Asparat-spezifische Cystein-Proteasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) handelt. Der Vorgang führt zum vollständigen Untergang und Abbau der Zelle (Broughton *et al.*, 2009; Danial, 2007).

Der intrinsische Signalweg wird durch die Freisetzung von Cytochrom C und anderer proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytoplasma initiiert.

Den Komplex, welcher durch die Bindung von Cytochrom C an den apoptotischen Protease-Aktivierungs-faktor-1 (Apaf-1) und an die Caspase 9 entsteht, nennt man Apoptosom.

Die so über die Aktivierung der Caspase 3 in Gang gesetzte Signaltransduktion mündet ebenso wie der extrinsische Signalweg im vollständigen Untergang und Abbau der Zelle (Broughton *et al.*, 2009).

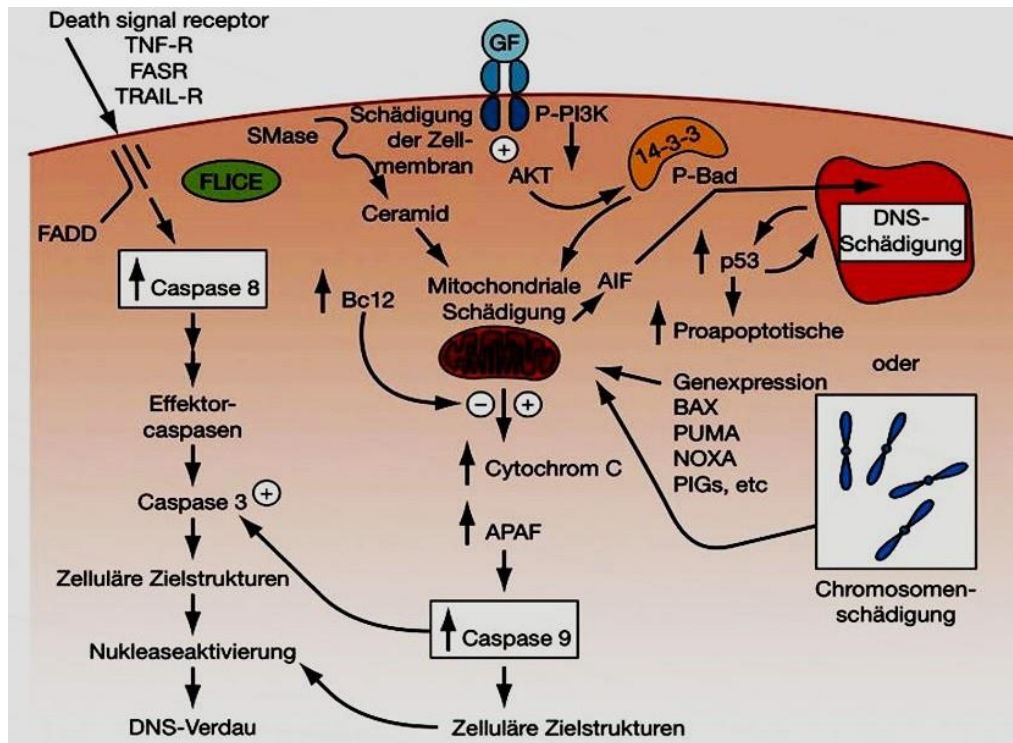


Abbildung 2: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. Aus Sausville und Longo, 2012.

3.2.1.1. Apoptosemodulation durch die Proteine der Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Familie umfasst sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirksame Proteine, welche gewisse Merkmale, BH-Domänen, hinsichtlich ihrer Proteinstruktur teilen. Dabei handelt es sich um alpha-helikale Segmente hoher Sequenzhomologie. Diese bestimmen die Struktur und Funktion des Proteins (Danial, 2007). Die antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2 und Bcl-XL besitzen Sequenzhomologien in allen 4 BH-Domänen, während die proapoptotischen Proteine wie Bax und Bak in den BH-Domänen 1–3 Sequenzhomologien aufweisen.

Daneben gibt es die proapoptotischen Proteine wie Bid, Bik und Bim, die lediglich gleiche Sequenzen innerhalb der BH-3-Domäne teilen und BH3-only-Proteine genannt werden (Shimizu *et al.*, 1999). Mit Hilfe dieser konservierten Sequenzen innerhalb der Proteinstruktur ist es den Mitgliedern der Bcl-2-Familie möglich, miteinander zu interagieren.

So können die BH-1-, BH-2- und BH-3-Domäne der antiapoptotischen Proteine eine Furche bilden, die BH-3-Domäne der proapoptotischen Proteine binden und sich somit gegenseitig beeinflussen (Danial, 2007). Über verschiedenste molekulare Mechanismen regulieren sie so den intrinsischen Signalweg der Apoptose. Innerhalb dieses Signalweges ist die Freisetzung von Cytochrom C durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ein zentraler Kontrollpunkt (Chipuk, 2006). Durch die Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax und Bak und deren Interaktion mit der Mitochondrienmembran wird die Integrität dieser zerstört. Im Falle eines Schlaganfalls zeigten Bax-Knockoutmäuse ein deutlich besseres Outcome im Vergleich zum Wildtyp. Es konnten eine reduzierte Infarktgröße und ein besserer Neuroscore nachgewiesen werden (D'Orsi *et al.*, 2015).

Hinsichtlich der ablaufenden Prozesse werden zwei Modelle diskutiert. Zum einen soll die Aktivierung und Oligomerisierung von Bak und Bax über die direkte Interaktion mit BH3-only-Proteinen erfolgen (Tait *et al.*, 2013). Zum anderen wird ein indirekter Mechanismus beschrieben, wobei die BH3-only-Proteine antiapoptotische Proteine wie Bcl-XL binden und so deren inhibierende Wirkung gegenüber Bax und Bak aufheben. So werden diese proapoptotisch wirksam und können die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiieren (Danial, 2007). Die molekularen Grundlagen dieses Vorgangs sind dabei bis heute nicht hinreichend geklärt. Einer der postulierten Vorgänge umfasst die zentrale Rolle des *voltage dependent anion channels* (VDAC) der äußeren Mitochondrienmembran. Die *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) bezeichnet einen dynamischen Multiproteinkomplex bestehend aus dem in der äußeren Mitochondrienmembran liegenden VDAC, dem in der inneren Mitochondrienmembran befindlichem Adenin-Nuklotid-Translokator (ANT) und dem Regulatorprotein Cyclophilin D. Die Schließung dieses Kanals führt zur Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom C (Robey und Hay, 2006). Über die Bindung der Proteine der Bcl-2-Familie an VDAC kommt es zur Regulation der Permeabilität der Mitochondrienmembran. So wird über die Bindung antiapoptotischer Proteine an VDAC und die damit verbundene Offenhaltung des Kanals das mitochondriale Transmembranpotential stabilisiert und die Apoptose der Zelle verhindert.

Dagegen fördert die Bindung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak an VDAC dessen Schließung und initiiert den programmierten Zelltod (Martinou und Green, 2001).

Es liegen allerdings auch Beobachtungen über die antiapoptotische Wirkung des geschlossenen VDAC vor (Azouly-Zohar *et al.*, 2004). In Hinblick auf die Stabilisierung der Membranpermeabilität über die Bindung an VDAC scheint die BH-4-Domäne, welche nur bei den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie vorkommt, eine besondere Bedeutung zu haben (Shimizu und Tsujimoto, 2000).

Neben diesem Erklärungsansatz hinsichtlich der Regulation der Membranpermeabilität durch die Bcl-2-Homologen wird noch ein anderer Mechanismus, welcher zur Freisetzung von Cytochrom C führt, diskutiert. Es wird angenommen, dass die proapoptotischen Proteine Bax und Bak in der Lage sind, selbst eine Pore in der Mitochondrienmembran zu bilden und so den Zelltod herbeizuführen (Tait *et al.*, 2013; Antonsson und Martinou, 2000).

3.3. Endogene Neuroprotektion – Das Prinzip der Präkonditionierung

Bereits Anfang der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte der sogenannte Präkonditionierungseffekt des Hirngewebes gezeigt werden (Janoff, 1964). Dieser beschreibt folgendes Phänomen: Setzt man Nervenzellen einer gewissen Substratdeprivation aus, ohne eine gewisse Schwelle zur Schädigung der Zellen zu überschreiten, so sind diese gegenüber zukünftigen länger andauernden Mangelzuständen resistenter. In Anlehnung an die hohe Morbidität und Mortalität des Schlaganfalls stellte sich bereits sehr früh die Frage nach endogenen Mechanismen des Organismus, die eine Unterbrechung oder Abschwächung der in den Zelltod führenden Signalwege möglich machen und so den Anteil an geschädigtem Gewebe möglichst gering halten. Simultan zum Einleiten der Kaskaden hinsichtlich des programmierten Zelltodes kommt es also beim Einwirken eines schädigenden Stimulus wie dem Substratmangel der Nervenzelle im Falle einer fokalen Ischämie zur Induktion protektiv wirkender Signalwege. Im Verlauf neuerer wissenschaftlicher Erkenntnisse konnte eine Einteilung in einen frühen und einen späten Präkonditionierungseffekt vorgenommen werden (Kitagawa *et al.*, 1990). So versteht man unter der frühen Präkonditionierung diejenigen Mechanismen, die schon während des Einwirkens des schädlichen Stimulus auf die Zelle einsetzen. Die daraus hervorgehende Prävention der Zellen gegenüber gleichen oder anderen Noxen hält nur Minuten bis Stunden an (Dirnagl *et al.*, 2009). Dem gegenüber steht die späte Präkonditionierung.

Hierbei setzen die Schutzmechanismen erst verzögert, 1 bis 3 Tage nach der Gewebsverletzung, ein und sind eng an die Induktion der Expression verschiedenster Gene geknüpft (Tang *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die für die Regulierung des Stoffwechsels, die Immunantwort, die Aktivität von Ionenkanälen und die Gerinnung verantwortlich sind (Dirnagl *et al.*, 2009). Die Toleranzentwicklung der Zelle wird also durch ein Zusammenspiel verschiedenster endogener Mechanismen gewährleistet.

Zur Veranschaulichung der Prozesse dient die Einteilung in drei verschiedene Ebenen innerhalb der Zelle: das Signal/sensor Module, Transducer Module und Effector Module (Dirnagl *et al.*, 2003). Hinsichtlich der Induktion einer zellulären Toleranz gibt es eine ganze Reihe von Triggerfaktoren. Neben der ischämischen Präkonditionierung, wie sie im Falle einer fokalen oder globalen Ischämie auftritt, zählen dazu unter anderem auch Hyperoxie, Entzündung und Epilepsie. Auch wenn die Gründe für Neurodegeneration voneinander abweichen, so sind die endogen ablaufenden Mechanismen als Antwort auf eine Zellschädigung doch sehr ähnlich. Die Toleranzentwicklung ist weniger von der Art des einwirkenden Stimulus als vielmehr vom Ereignis an sich abhängig (Dirnagl *et al.*, 2009).

Eine zentrale Rolle spielt die auf dem Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) beruhende Signalkaskade (Rocha, 2007).

3.3.1. Rolle von HIF-1

Bei der Regulierung der Sauerstoffhomöostase in Säugetieren spielt der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1, Hypoxie-induzierbarer Faktor-1) eine entscheidende Rolle (Semenza, 2004). Bei HIF-1 handelt es sich um ein Heterodimer, welches aus HIF-1 α - und HIF-1 β -Untereinheiten besteht. Unter hypoxischen Bedingungen reguliert HIF-1 die Transkription einer großen Anzahl von Genen, welche die Anpassung der Zellen an eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit sicherstellen (Semenza, 2007). HIF-1 kann sowohl sauerstoffabhängig als auch sauerstoffunabhängig aktiviert werden. Unter Normoxie-Bedingungen kommt es zur Hydroxylierung der Prolylreste an Position 402 und/oder 564 der HIF-1 α -Untereinheit durch die Prolylhydroxylase 2 (PHD2). Die hydroxylierten Prolylreste ermöglichen die Bindung des von Hippel-Lindau-Proteins, welches über die Interaktion mit dem Elongin C die Markierung durch die Ubiquitinase bewirkt und damit den proteosomalen Abbau der Untereinheit besiegelt.

Bleibt die Hydroxylierung aufgrund eines Sauerstoffmangels und der damit verbundenen Inhibition der PHD2 jedoch aus, so akkumuliert die Alpha-Untereinheit und dimerisiert mit der Beta-Untereinheit (Semenza, 2007). Die Bindung des nun aktiven Transkriptionsfaktors HIF-1 an die DNA bewirkt die Initiation der RNA-Synthese verschiedenster für die Verbesserung und Aufrechterhaltung der Gewebeoxygenierung bedeutender Proteine und Enzyme (Sharp und Bernaudin, 2004). So induziert HIF-1 beispielsweise die Expression von Erythropoetin (EPO) in der Niere. Die Bindung dieses Glykoproteins an den zugehörigen Rezeptor auf Erythrozyten-Vorläuferzellen sorgt für die Sicherung des Überlebens und die Differenzierung dieser Zellen (Jelkmann, 2013).

Die PHD2 benötigt Sauerstoff und Alpha-Ketoglutarat als Substrat sowie Eisen als Kofaktor. Somit kann durch den Eisenchelator Deferoxamin (DFO) eine Hypoxie vorgetäuscht werden (Berra *et al.*, 2003). Prass *et al.* konnten zeigen, dass es durch die Vortäuschung einer zellulären Hypoxie mittels DFO zur Synthese von Erythropoetin und damit zur Neuroprotektion kommt (Prass *et al.*, 2002, Prass *et al.*, 2003). Der zugrundeliegende Mechanismus ist in der Abbildung 3 vereinfacht zusammengefasst.

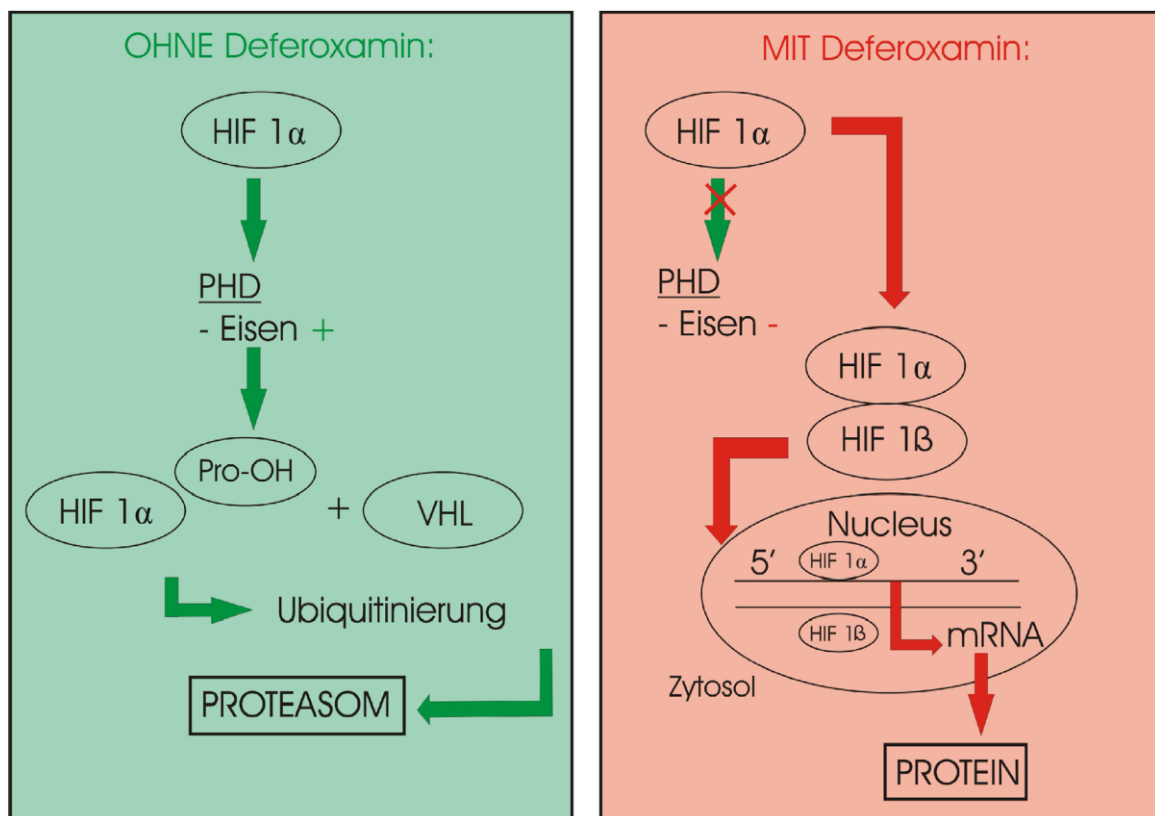


Abbildung 3: Regulation von HIF-1 durch den Eisenchelator Deferoxamin bei Normoxie.

Neben der systemischen Wirkung bei Hypoxie reguliert HIF-1 auch die lokale Verbesserung der Oxygenierung, indem es eine Vielzahl von Genen der Angiogenese transkribiert. Hierzu zählen beispielsweise der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *platelet derived growth factor* (PDGF) (Semenza, 2009b).

Neben der Anpassung der zellulären Mechanismen gegenüber eines begrenzten beziehungsweise fehlenden Angebots an Sauerstoff, beispielsweise bei der Entwicklung einer Zelle sowie bei körperlicher Anstrengung, spielt der Transkriptionsfaktor HIF-1 bei der ischämischen Toleranz durch Präkonditionierung eine zentrale Rolle (Dirnagl *et al.*, 2003). HIF-1 stellt eine Verbindung zwischen Hypoxie und Glykolyse dar und reguliert einen Großteil des Glucosestoffwechsels. Beispielsweise kontrolliert es die Expression des für die Initiation der Glykolyse verantwortlichen Enzyms, die Hexokinase (Semenza, 2004, Bernaudin *et al.*, 2002).

3.3.1.1. HIF-1-Regulation der Energiegewinnung unter Hypoxie

Für das Überleben einer Zelle und die Sicherstellung ihrer vielfältigen Funktionen innerhalb des Organismus benötigt sie Energie. Adenosintriphosphat (ATP) stellt den Energieträger der Zelle dar und wird von ihr für alle energieverbrauchenden Prozesse selbst synthetisiert. Bei der Synthese von ATP stehen der Zelle verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung, wobei die oxidative Phosphorylierung durch die mitochondriale Atmungskette eine zentrale Rolle einnimmt. Diese Form der Energiegewinnung ist eng an die Verfügbarkeit von Sauerstoff gebunden. Über vier in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Enzym-Komplexe wird durch eine Folge von Redoxreaktionen ein Protonengradient über der Membran aufgebaut, welcher der Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat dient. Eine Vielzahl von Erkrankungsumständen führen zu einer Limitation beziehungsweise zu einem vollständigen Fehlen von Sauerstoff in den Zellen. Hierzu zählen neben dem Myokardinfarkt und pulmonaler Hypertension unter anderem auch Tumorerkrankungen, Schlaganfall und Parkinson. Die Anpassung der Zelle an wechselnde Umstände ist notwendig. Zur effizienten Energiegewinnung muss eine Umstellung des Zellstoffwechsels gewährleistet werden. HIF-1 spielt hierbei als Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase die zentrale Rolle (Semenza, 2009a).

Bei Sauerstoffunterversorgung des Gewebes wird beispielsweise durch HIF-1 die Expression von Cytochrom-C-Oxidase 4-2 (COX4-2), einer Untereinheit der Cytochrom-C-Oxidase, auch Komplex IV der Atmungskette, induziert. Der Ersatz der COX4-1- durch die COX4-2-Untereinheit sowie deren Abbau durch die HIF-1-vermittelte Expression der mitochondrialen LON-Protease führen zu einer Effizienzsteigerung in der ATP-Gewinnung (Fukuda *et al.*, 2007).

Darüber hinaus kommt es durch die HIF-1-vermittelte Transkription des *pyruvate dehydrogenase kinase-1*-(PDK-1) Gens und der damit verbundenen Expression der Pyruvatdehydrogenase-1-Kinase zu einer Umstellung auf anaerobe Energiegewinnung. Durch die Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase wird die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA inhibiert und die Einschleusung dieses Substrats in den Citratzyklus zur oxidativen Energiegewinnung verhindert (Papandreou *et al.*, 2006). Die Einschränkung der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung wird durch HIF-1 kompensiert. Es greift in den Glukosestoffwechsel ein und initiiert neben der Aktivierung der Lactatdehydrogenase A die Aufnahme von Glykose in die Zelle, indem es die Expression entsprechender Transporter steigert (Semenza, 2009a). Zu Zwecken der Effizienzsteigerung der anaeroben Energiegewinnung hinsichtlich der nun vermehrt von den Zellen aufgenommenen Glukose kommt es darüber hinaus zu einer HIF-1-induzierten gesteigerten Expression glykolytischer Enzyme, darunter der Hexokinase (Iyer *et al.*, 1998; Sharp und Bernaudin 2004).

3.4. Hexokinase

Bei der Hexokinase (HK) handelt es sich um ein glukosephosphorylierendes Enzym. Dieses überträgt die Phosphatgruppe von ATP auf das sechste Kohlenstoffatom der Glukose. Dadurch kann der Einfachzucker nicht mehr aus dem Zytoplasma ins Blut zurücktransportiert werden. Darüber hinaus kann sie als Glukose-6-Phosphat zur Energiegewinnung in der Glykolyse herangezogen werden (Robey und Hay, 2006; Wilson, 2003). Damit spielt die HK für den Glukosestoffwechsel in einer Vielzahl von Säugern eine bedeutende Rolle.

Das durch die Phosphorylierung von Glukose entstandene Glukose-6-Phosphat ist dabei nicht nur zur glykolytischen Energiegewinnung notwendig, sondern dient unter anderem dem Pentosephosphatweg und der Umwandlung in die Speicherform der Glukose, dem Glykogen, als Ausgangssubstrat (Wilson, 2003).

3.4.1. Funktion und Struktur

Man unterscheidet vier verschiedene Isoformen der Hexokinase. Dabei nimmt Typ IV, auch Glukokinase genannt, bezüglich gewisser Eigenschaften eine Sonderstellung im Vergleich zu den Isoformen I–III ein. So ist dieses Isoenzym mit einem Molekulargewicht von 50 kDa deutlich kleiner als die Hexokinasen Typ I, II und III mit einem Molekulargewicht von jeweils 100 kDa. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Glukose-6-Phosphat für die Hexokinasen I–III einen starken Inhibitor darstellt und diese hinsichtlich der Glukose eine hohe Affinität aufweisen. Dagegen wird die Glukokinase keinesfalls durch Glukose-6-Phosphat gehemmt. Auch die Affinität zu Glukose ist deutlich geringer als bei den strukturähnlichen Typen I–III (Wilson, 1995; Robey und Hay 2006).

Während sich die katalytische Aktivität der vor allem im Gehirn vorherrschenden Hexokinase I und der in überwiegenderem Maße in der Lunge anzutreffenden Hexokinase III auf die Cterminale Hälfte des Proteins beschränkt, findet sie sich bei der überwiegend in den insulin sensitiven Geweben wie der Skelett- und Herzmuskulatur sowie in der im Fettgewebe vorkommenden Hexokinase II sowohl in der C- als auch in der N-terminalen Hälfte (Wilson, 2003).

3.4.2. Expressionsregulation der Hexokinase II

Bei malignen Tumorzellen wurde bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine Veränderung in der Stoffwechselaktivität nachgewiesen (Warburg *et al.*, 1927). So postulierte der Mediziner und Nobelpreisträger Otto Warburg die sogenannte „Warburg-Hypothese“ und beschreibt darin die Fähigkeit von Tumorzellen, unter normalen Sauerstoffbedingungen die ATP-Synthese durch Glykolyse zu steigern. So findet sich in Tumorzellen eine gesteigerte Expression der Hexokinase II (Mathupala *et al.*, 2006). Diese verstärkte Expression der Hexokinase II beruht dabei auf der durch Wilson 2003 beschriebenen Promotorregion. Diese kann durch verschiedenste Stimuli, unter anderem Insulin, Glukose, Wachstumsfaktoren und Hypoxie angeregt werden (Pastorino und Hoek, 2003).

Die in Bezug auf Neuroprotektion gewonnenen Erkenntnisse, dass es nach Hypoxie neuronaler Zellen zu einem Anstieg der Expression von Hexokinase II kommt (Mergenthaler *et al.*, 2012), lässt eine Hochregulation des Enzyms durch HIF 1 unter Bedingungen der Sauerstoffdeprivation vermuten und bestätigt die bereits zu einem früheren Zeitpunkt gemachten Beobachtungen (Iyer *et al.*, 1998, Bernaudin *et al.*, 2002).

3.4.3. Apoptosemodulation durch Hexokinase II

Hinsichtlich der apoptosemodulierenden Wirkung der HKII wird immer wieder die Rolle der Mitochondrien herausgestellt. Beispielweise beschreiben Pastorino *et al.* 2002 die Inhibierung eines apoptotischen Signalweges durch die Bindung der Hexokinase II an die Mitochondrienmembran, wobei dies eine Voraussetzung für den antiapoptotischen Effekt zu sein scheint (Majewski *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2008; Pastorino *et al.*, 2002). Der in der äußeren Mitochondrienmembran liegende spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC), welcher in den Isoformen VDAC 1–3 vorliegen kann, bildet dabei die Bindungsstelle. Hier können die Isoformen Typ I und II der Hexokinase mit einer 15 Aminosäuren umfassenden Sequenz, welche sich im N-Terminus der Enzyme befindet, binden (Felgner *et al.*, 1979; Fiek *et al.*, 1982; Pastorino und Hoek, 2008). Die Bindung der Hexokinase I und II an die Mitochondrienmembran unterliegt dabei einer gewissen Dynamik (Robey und Hay, 2005). Hinsichtlich der Hexokinase II wird das durch die Phosphorylierung eines an Position 473 der Aminosäuresequenz befindlichen Threonins über den Phosphatidylinositol-3-Akt-Kinase-Signalweg gesteuert (Miyamoto *et al.*, 2008). Diese Kinasefamilie ist in der Lage, die 3'-OH-Gruppe des Inositolrings von Phospholipiden der Zellmembran zu phosphorylieren. Über die dabei entstehenden second messenger wie Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat werden weitere Signalwege in Gang gesetzt. So dient PIP3 als Bindungsstelle für die Akt-Kinase/Proteinkinase B, welche durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) aktiviert wird. In dieser Form moduliert sie die Funktion einer Vielzahl verschiedenster Substrate, die in die Regulation der Zellprotektion und des -wachstums involviert sind (Fresno Vara *et al.*, 2004). Neben der Phosphorylierung der Hexokinase II und deren Bindung an VDAC der äußeren Mitochondrienmembran (Miyamoto *et al.*, 2008), werden über die Akt-Kinase proapoptische Faktoren wie Bad und Procaspase-9 inaktiviert (Kandasamy und Srivastava, 2002).

Überdies scheint die Inhibierung der Glykogen-synthase-Kinase-3-Beta (GSK3 β), deren Aktivierung Prozesse der Zellschädigung und des Zelluntergangs initiiert (Murphy, 2004), eine Rolle zu spielen. Die Phosphorylierung des an Position 51 befindlichen Threonins der Aminosäuresequenz des VDAC, die eine Bindung von HKII unmöglich macht, bleibt aus (Pastorino et al., 2005; Pastorino und Hoek 2008). Die zentrale Rolle der Bindung der Hexokinase II für die Vermittlung antiapoptotischer Effekte liegt unter anderem in der damit verbundenen Inhibition der Cytochrom-C-Freisetzung begründet (Gottlob *et al.*, 2001). Ist die Hexokinase II durch Phosphorylierung von VDAC nicht an den Kanal gebunden, so wird die Bindungsstelle durch das proapoptotische Protein Bax besetzt. Dadurch liegt Bax nicht mehr an Bcl-XL gebunden vor und kann zusammen mit Bak eine Pore in der Mitochondrienmembran erzeugen und so die Cytochrom-C-Freisetzung und den programmierten Zelltod bewirken (Pastorino *et al.*, 2002). Neben diesem Erklärungsansatz hinsichtlich des molekularen Mechanismus der Inhibition der Apoptose durch die Hexokinase II existieren noch weitere, wobei die genauen molekularen Mechanismen bis heute unklar sind. So ist die Induktion der Apoptose, die in der Arbeit von Majewski *et al.*, 2004, beschrieben wird, völlig unabhängig von den proapoptotischen Proteinen Bax und Bak und beruht allein auf der Dissoziation der HKII von den Mitochondrien. Eine weitere wichtige Verbindung zwischen der HKII und den Bcl-2-Homologen besteht darin, dass innerhalb der Proteinstruktur des Isoenzym eine BH4-Domäne identifiziert werden konnte. Neben der Bindungsstelle für proapoptotische Proteine scheint sie ähnlich wie bei Bcl-2 und Bcl-XL bei der antiapoptotischen Wirkung über die Bindung von HKII an VDAC eine Rolle zu spielen (Pastorino und Hoek 2008). In diesem Zusammenhang wird in einigen Studien neben der Bindung der HKII an VDAC das Vorkommen weiterer mitochondrialer Bindungspartner der HKII vermutet (Aflalo und Azoulay, 1998, Pastorino und Hoek, 2003).

Zum besseren Verständnis hinsichtlich der neuroprotektiven Wirkung der HKII und der damit in Verbindung stehenden molekularen Mechanismen wurde nach möglichen Interaktionspartnern der HKII im Zusammenhang mit der Regulation der Apoptose gesucht (Mergenthaler *et al.*, 2012). Dabei bediente man sich der Methode des *membran-based split-ubiquitin yeast two hybrid systems* (DualmembraneTM). Es handelt sich dabei um eine In-vivo-Methode zum Nachweis einer Proteininteraktion in Hefen (Thaminy *et al.*, 2004).

Hierbei wurden über ein an die DNA-Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors gebundenes Beuteprotein, im vorliegenden Fall Maus-Hexokinase II, dessen mögliche Interaktionspartner gefunden.

Diese an die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors gebundenen Köderproteine wurden mittels Screening einer aus einem Mausgehirn stammenden cDNABibliothek detektiert. Als einer der möglichen Interaktionspartner an der äußeren Mitochondrienmembran konnte neben VDAC so unter anderem das Protein Pea15 (*phosphoprotein Enriched in Astrocytes, 15 kDa*) erfasst werden (Mergenthaler, 2011). Dabei handelt es sich um ein 15 kDa großes zytosolisches Protein, welches in eine Vielzahl zellulärer Mechanismen wie Apoptose, Proliferation und Glukosemetabolismus involviert ist (Fiory *et al.*, 2009). Es wird ubiquitär exprimiert, liegt aber vor allem in den Zellen des Nervensystems vor (Estelles *et al.*, 1996). Es besteht aus einer N-terminalen *death effector domain* und einem C-terminalen Ende unregelmäßiger Struktur. Pea15 kann in drei unterschiedlichen Formen vorliegen: nicht phosphoryliert, mono- und bisphosphoryliert (Renault *et al.*, 2003), wobei diese Zustände durch Proteinkinase C (PKC) und Akt reguliert werden (Fiory *et al.*, 2009). Innerhalb des Zellzyklus übernimmt es so je nach vorliegendem Phosphorylierungszustand unter anderem sowohl antiapoptotische als auch (anti-)proliferative Funktionen (Renault *et al.*, 2003).

4. AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Interaktion von HKII mit Pea15-Mutanten. Als Grundlage sollten zwei verschiedene Methodiken zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen herangezogen werden. Zum einen die Co-Immunpräzipitation und zum anderen das *Proximity Ligation Assay (PLA)*. Die Methodiken sind unter Punkt 6.4 beziehungsweise 6.6 der vorliegenden Arbeit ausführlich erklärt. Die Co-Immunpräzipitation sollte dabei mit GFP- und RFP-Trap erfolgen, wobei es sich um sehr spezifische GFP-/RFP-Protein Tags bindende Proteine handelt. Auf der Grundlage der bereits bekannten HKII-Pea15-Proteininteraktion war die entsprechende Etablierung der Methodik notwendig. Ziel war die Schaffung angemessener Umgebungsbedingungen. Die Grundvoraussetzung hierfür bildete die Testung der für die GFP- beziehungsweise RFP-Trap benötigten optimalen Transfektionsbedingungen, um die optimale Expression der mit dem Fluoreszenzprotein markierten Zielgene zu erreichen. So sollte ein Immunpräzipitation-basiertes Screening von Hexokinase II- und Pea15-Punktmutanten ermöglicht werden.

Darüber hinaus sollte als Alternativmethodik das PLA-basierte Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten etabliert werden. Hierfür sollten punktmutierte Gene der Interaktionspartner HKII und Pea15-Proteine in humanen embryonalen Nierenzellen überexprimiert und anschließend dem PLA-Assay unterzogen werden. Zur Auswertung der Häufigkeit von PLA-Signalen sollte die Blobfinder-Software herangezogen werden. Grundlage hierfür war die Co-Transfektion der innerhalb der Arbeitsgruppe erstellten Plasmide pCAGPea15_S104G/S116G, pCAG-Pea15_D74A und pCAG-HKII_S155A/S603A zusammen mit dem jeweiligen wildtypischen Interaktionspartner unter optimalen Bedingungen. Zum quantitativen Vergleich der Interaktionen sollte die verwandte Zelllinie mit den Wildtypen der Interaktionspartner pCAG-HKII und pCAG-Pea15 transfiziert werden.

5. MATERIAL

5.1. Geräte

Gerät

Bakterieninkubator

Blotting-System

Elektrophoresesystem

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Kühlsysteme

Magnetrührer mit Heizplatte

Mikroskope: Leica DMIL mit Fluoreszenz

und Kamerasystem, Stereomikroskop

Mikrowelle

Nucleofector I

Photometer

Plate reader

Reinstwasseranlage

Schüttler

Spannungsquelle/Gelelektrophorese

Sterilwerkbank

ThermoCycler: Hybaid PCRexpress,

Thermocycler Trio Thermoblock

Tischschüttler

Typhoon 8600 Gelscanner

UV-Lampe

Waagen: CP225D und BL 150

Wasserbad

Zellkulturinkubator

Zentrifugen

Hersteller

Minitron, Infors AG, Bottmingen (Schweiz)

Biorad Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer
Cell, Biorad, München

Miniprotean 3 cell, Biorad, München

Lo Laboroptik, Friedrichsdorf

AEG, Frankfurt, und Liebherr, Ochsenhausen

IKA Labortechnik, Staufen

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Braun, Kronberg

Amaxa GmbH, Köln

Eppendorf, Hamburg

MRXTC Relevation, Thermo Labssystem,
Dreieich

Millipore GmbH, Schwalbach

Edmund Bühler Lab Tec, Tübingen

Sartorius AG, Göttingen

Nuaire, COTECH, Berlin

Thermo Scientific, Bonn; Biometra GmbH,
Göttingen

IKA Labortechnik, Staufen

Amersham Biosciences, Freiburg

Bioblock Scientific, Illkirch (Frankreich)

Sartorius AG, Göttingen Köttermann
GmbH, Uetze/Hänigsen Nuaire,

COTECH, Berlin

Thermo Electron, Oberhausen; Eppendorf,
Hamburg; Hettich GmbH, Tuttlingen

5.2. Zellkulturmedien und Zusätze

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM High Glucose	Gibco, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	Biochrom, Berlin
FCS (fetal calf serum) GOLD	PAA, Linz (Österreich)
L-glutamine	Biochrom, Berlin
MEM-Earle	Biochrom, Berlin
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin 10 000 IE/Streptomycin 10 000 µg/ml (Pen/Strep)	Biochrom, Berlin
PBS w/o	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysine (0,1 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Trypan Blau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin

5.3. Medien- und Pufferzusammensetzungen

<u>Medium/Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
DMEM (serumhaltig, antibiotikafrei)	DMEM (w 3,7 g/l NaHCO ₃ , w 4,5 g/l D-Glucose, w/o L-Glutamine, w/o Na-Pyruvat), 10 % FCS, 1 % L-Glutamin
Elektroporationspuffer	NaCl 192 mmol/l, KCl 9,6 mmol/l, MgCl ₂ 10 mmol/l
LB-Med/-Agar	Bacto-Tryptone 1 % (w/v), Bacto-yeast extract 0,5 % (w/v), NaCl 1 % (w/v) für Agar: + 0,75 % (w/v) Agar
Hela-Nährmedium/MEM Earle	MEM Earle (w/o L-Glutamin, 2,2 g/l NaHCO ₃), 10 % FCS GOLD, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM Na-Pyruvat, 1 % Pen/Strep

Immunpräzipitation

Dilution Buffer	10 mM Tris/Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 x Protease Inhibitor Cocktail
Lysepuffer L1	10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 15 mM DHPC, Protease- /Phosphataseinhibitoren (1:100 Stock)
Lysepuffer L2	10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 % Digitonin, Protease- /Phosphataseinhibitoren (1:100 Stock)
Wash Buffer	10 mM Tris/Cl pH 7,5, 150–500 mM NaCl 0,5 mM EDTA, 1 x Protease Inhibitor Cocktail

Western Blot

4-fach SDS Probenpuffer	200 mM Tris/HCl (pH 6,8), 8 % SDS, 0,4 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, 400 mM DTT
Ripa-Lysepuffer	50 ml dest. H ₂ O, 0,5g Natrium- Deoxycholat, 1,5 ml 5M NaCl, 0,5 ml 10 % SDS, 0,5 ml Triton-X-100, 2,5 ml 1M Tris pH 7,4
Running Buffer/1x Tris-HEPES-SDS Puffer	100 mM Tris, 100 mM HEPES, 3 mM SDS 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS,
Transfer Buffer	20 % Methanol

5.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Age I	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Ampicillin	Bioline, London (Großbritannien)
Antarctic-Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Antarctic Phosphatase Puffer	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,2-Diheptanoyl-glycero-3-phosphocholine (DHPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP-mix	Promega, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
GFP Trap_A	Chromotek GmbH, Planegg-Martinsried
Glyzin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, blocking grade	Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Not I	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Roti®-Fect PLUS	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail A&B	Roche, Mannheim
Phusion-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Phusion HF Puffer	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim

Proteinmolekulargewichtsmarker Page	Fermentas, St. Leon-Rot
Ruler	
Puffer 1	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Puffer 3	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
RFP Trap_A	Chromotek GmbH, Planegg-Martinsried
Laurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
T4-DNA-Ligase-Puffer	New England Biolabs, Ipswich (MA, USA)
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Westernblot Luminol-Reagenz: sc-2048	Santa Cruz, Santa Cruz (Kalifornien, USA)

5.5. Antikörper

Antikörper

Anti-HKII goat, polyklonal IgG, (sc-6521)
 Donkey anti-goat IgG HRP-linked (sc-2020)
 Anti-Pea15 rabbit, polyklonal IgG, #2780
 ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab from donkey

Hersteller

Santa Cruz, Santa Cruz (Kalifornien, USA)
 Santa Cruz, Santa Cruz (Kalifornien, USA)
 Cell Signalling, Danvers (Massachusetts, USA)
 GE Healthcare, Chalfont St. Giles
 (Buckinghamshire, GB)

5.6. Kits und Gele

Produkt

BCA protein assay kit, reducing agent compatible (23250)
 Duolink® PLA® Assay
 QIAGEN Endofree Maxiprep Kit
 QIAGEN Plasmid Mini Kit

Hersteller

Pierce, Bonn
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 QIAGEN, Hilden
 QIAGEN, Hilden

QIAquick Gel extraction/PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
Precise™ Proteingele	Pierce, Bonn

5.7. Bakterienstämme

Produkt

One Shot TOP 10 Competent Cells

Hersteller

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.8. Software und Datenbanken

Software

BlobFinder

ImageJ

Mendeley

Microsoft Office

PhotoScape

pubmed Datenbanken, BLAST-Programm

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Vector NTI

Adobe InDesign CS 6

Adobe Photoshop CS 6

Hersteller

Centre for Image Analysis, Uppsala, Schweden

National Institute of Health, Maryland (USA)

Mendeley Ltd., London, GB

Microsoft GmbH, München

MOOII TECH CO., LTD., Cheonan, Sinbudoong, Korea

National Center for Biotechnology Information, Berthesda, CA (USA)

Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)

Adobe Systems, Delaware (USA)

Adobe Systems, Delaware (USA)

5.9. Verbrauchsmaterialien

Produkt

Elektroporationsküvetten (seril) für Nucleofector™

Hersteller

PeqLab Biotecologie GmbH, Erlangen

Coverslips (Cover Glasses)

Kodak Biomax Light-1 X-ray Filme

Plastikwaren

PVDF-Membran

Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen

Sigma Aldrich, Taufkirchen

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Eppendorf, Hamburg

Falcon, Franklin Lakes (NJ, USA)

Nunc, Langenselbold

Millipore, Schwalbach

6. METHODEN

6.1. Zellkultur

6.1.1. HeLa-Zellkultur

Die Arbeit mit dieser Zelllinie humaner Epithelzellen eines Zervixkarzinoms erfolgte ausschließlich nach S1-Richtlinien. Zur Kultivierung der Zellen wurde auf in Stickstoff eingefrorene HeLa-Zellen des Laborbestandes zurückgegriffen. Diese wurden im Wasserbad erwärmt und anschließend in 4 ml HeLa-Nährmedium aufgenommen. Das durch Zentrifugation der Zellsuspension entstandene Pellet wurde in 1 ml frischem HeLa-Nährmedium resuspendiert und anschließend in eine mit diesem Nährmedium bestückte Zellkulturflasche pipettiert. Die Zellen wurden unter mikroskopischer Wachstumskontrolle bei 36,5 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert, ehe sie den Experimenten unterzogen wurden.

6.1.1.1. Herstellung eines HeLa-Proteinvollysates

Für die Herstellung des Proteinvollysates wurde zunächst das Nährmedium der kultivierten Zellen entfernt und diese einmal mit gekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) gespült. Daraufhin wurden die Zellen in PBS von der Unterlage des Kulturgefäßes gekratzt und für fünf Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand konnte entfernt und das zurückgebliebene Pellet in 300 µl RIPA-Puffer gelöst werden. Vor der erneuten zehnmütigen Zentrifugation der Suspension bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 14 000 Umdrehungen pro Minute wurde diese für 15 Minuten auf Eis gelagert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und war bei – 80 °C lagerbar. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Photometer mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerprotokoll. Das Prinzip der Methode der Proteinbestimmung beruht in diesem Fall auf der Bildung von Komplexen der Proteine mit Kupferionen in alkalischer Lösung, der sogenannten Biuret-Reaktion.

Zusammen mit Bicinchoninsäure bilden die reduzierten Kupferionen einen violetten Farbstoff, wobei die Farbintensität dieses im Absorptionsspektrum von 562 nm bestimmt und in Bezug zu einer mitgeführten Standardprobe mit bekannter Konzentration gesetzt wird.

6.1.2. HEK-293-Zellkultur

Die Kultivierung dieser Zellkultur menschlicher embryonaler Nierenzellen erfolgte analog der unter Abschnitt 6.1.1. beschriebenen HeLa-Zellkultur. Als Nährmedium diente das serumhaltige, jedoch antibiotikafreie DMEM. Die Haftung der Zellen wurde durch das Aufbringen von 0,5 % Poly-L-Lysin in PBS auf die Unterlage der Kulturgefäße gewährleistet, welches im Vorfeld für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen wurde.

6.2. Klonierung eines DNA-Plasmids

Ziel der Klonierung ist die Herstellung eines sogenannten Vektors, welcher der Übertragung eines gewünschten DNA-Abschnittes, auch Insert genannt, in eine Zelle dient. Das gewählte Plasmid wird dafür unter Verwendung von Restriktionsenzymen geschnitten und mit der, mit Hilfe der PCR amplifizierten und ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen, DNA-Sequenz verbunden. Das so entstandene neue Plasmid enthält nun die zu transfizierende gewünschte DNA-Sequenz und kann als Fremd-DNA in die Empfängerzelle eingeschleust werden. Ziel war die Herstellung des DNA-Plasmids pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus. Dabei handelt es sich um ein DNA-Plasmid, welches eine mit einem grün fluoreszierenden Protein markierte Hexokinase II als Insert enthält. Die mit diesem Plasmid transfizierten Zellen exprimieren diese mit dem Venus-Protein gelabelte Hexokinase II durch einen CMV Promotor und dienen damit den IP-Experimenten.

6.2.1. Herstellung des Inserts

6.2.1.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der Ziel-DNA, welche als Insert in den Vektor integriert werden sollte, erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der kleinste Mengen DNA durch die DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums vervielfältigt werden können. Der PCR-Prozess durchläuft mehrere Zyklen, die aus drei verschiedenen Arbeitsabläufen bestehen. Zunächst wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Anschließend kommt es zur Anlagerung der Primer, wobei der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt durch ein zum 5'- und zum 3'-Ende komplementäres Oligonukleotid beschränkt wird. Zum Abschluss eines Zyklus werden die fehlenden Stränge mit Nukleotiden durch die DNA-Polymerase aufgefüllt. Bei der DNA-Sequenz, welche als Insert verwendet wurde, handelt es sich um HKII-Sp-Venus. Dieses konnte aus dem Plasmid PCAG-HKII-Sp-Venus, welches von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, durch PCR mit den Primern HK2V-LP2-Not1-F und HK2V-LP2-Age1-R, gewonnen werden. Die Primer wurden anhand der Gensequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information entworfen und durch die MWG Eurofins Biotech AG hergestellt. Eine Übersicht der zur Klonierung verwendeten Primersequenzen ist in Abbildung 4 dargestellt. Folgender Reaktionsansatz wurde für die PCR verwendet:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
DNA	1 µl
H ₂ O	36,25 µl
5 x Phusion Puffer HF	10 µl
dNTPs	1 µl
Primermix (100 pmol/µl)	1,25 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
Totalvolumen	50 µl

Insgesamt wurden vier dieser Ansätze pipettiert, wobei es sich um drei Ansätze a 50µl handelte und einen Ansatz a 50µl, welcher keine DNA, sondern Wasser enthielt und somit als Negativkontrolle diente.

Zunächst wurde die DNA 1:500 mit Nuklease-freiem PCR-Wasser verdünnt. Anschließend wurde der Primermix hergestellt. Dafür wurden je 2,5 µl der Primer HK2V-LP2-Not1-F und HK2V-LP2-Age1-R in ein gemeinsames Nuklease-freies Eppendorf plastic tube pipettiert und vorsichtig gevortext. Darauffolgend wurden vier Ansätze nach dem beschriebenen Reaktionsansatz pipettiert. Die Vervollständigung der Reaktionsansätze erfolgte durch die Zugabe der DNA zu drei der vier Tubes, wobei dem vierten Tube als Negativkontrolle anstatt der Matrizen-DNA Nuklease-freies Wasser hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben in den Thermocycler überführt. Hier wurde die DNA zunächst für 30 Sekunden bei 98 °C denaturiert und somit in ihre Einzelstränge gespalten. Die anschließende Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrizen-DNA erfolgte bei 64 °C für 30 Sekunden, woraufhin die komplementären Doppelstränge bei 72 °C innerhalb einer Minute mit Hilfe der Phusion Polymerase synthetisiert werden konnten. Dieser Ablauf wurde in 34 Zyklen wiederholt und mit einem finalen Syntheseschritt bei 72 °C für fünf Minuten, welcher der endgültigen Fertigstellung der PCR-Produkte diente, beendet.

<u>Primernamen</u>	<u>Sequenz (in 5' zu 3' Orientierung)</u>
HK2V-LP2-Not1-F	ATTAGTGCGGCCGCATGATCGCCTCGCATATGATC
HK2V-LP2-Age1-R	ATTAGTACCGGTGCTAGCTTACTTGTACAGCTCG

Abbildung 4: Übersicht der Primersequenzen zur Klonierung.

6.2.1.2. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung und Identifikation geladener DNA – Fragmente nach der Anzahl ihrer Basenpaare, verwendet man das Verfahren der Gelelektrophorese.

Das Trennprinzip beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren bei basischem pH-Wert negativ geladen sind und damit, beim Erzeugen eines elektrischen Feldes durch das Anlegen einer Spannung, zur Anode, wandern.

Die Verwendung der Agarosegelelektrophorese ist bei der Auftrennung von Fragmenten bis zu 20 kB Länge die einfachste und effektivste Methode. Aufgrund der siebartigen Struktur der Agarose durchlaufen kleine DNA-Fragmente das Gel wesentlich schneller als große, wobei die Bestimmung der Größe durch das Mitführen eines DNA-Längenstandards möglich ist. Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels, wurden zunächst 1 g Agarosepulver und 100ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und bis zur vollständigen Lösung der Agarose in einer Mikrowelle bei 250 W erhitzt. Der anschließenden Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, welches der Sichtbarmachung der DNA unter UV-Beleuchtung im Agarosegel dient, folgte das Gießen der Lösung in die Gelkammer, die bereits durch das Einsetzen des Gelkammes zu einem früheren Zeitpunkt vorbereitet wurde. Nach vollständiger Abkühlung wurde der Gelkamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt, wobei es komplett mit 1 x TBE-Puffer bedeckt wurde. Die Vorbereitung der aufzutragenden Proben erfolgte durch das Poolen der drei PCR- Amplifikate und die Zugabe von 15 µl m Orange-Farbstoff. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls mit 5 µl m Orange-Farbstoff versehen. Die zwei so gewonnenen Proben wurden neben dem als DNA-Längenstandard dienlichem 2Log DNA-Ladder der Firma New England Biolabs in die Geltaschen pipettiert und für etwa 30 Minuten einem elektrischen Feld ausgesetzt, welches durch das Anlegen einer Spannung von 100 V an die Elektrophoreskammer erzeugt wurde. Anschließend konnte die Produktbande mit einer Größe von 3511 Basenpaaren unter dem UV- Licht erkannt und aus dem Gel geschnitten werden. Die zur weiteren Verwendung der PCR- Produkte erfolgte Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel ist unter 6.2.1.3. beschrieben.

6.2.1.3. Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die Isolation und Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte unter Zuhilfenahme des *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen. Zur Durchführung wurde sich an das vom Hersteller angegebene Protokoll gehalten. Das Prinzip beruht auf der Bindung der DNA an eine Silica-Membran und Elution von Salzen, Puffern, Agarose, Enzymen und anderer Verunreinigungen.

6.2.1.4. Verdau des Inserts mit Restriktionsenzymen

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Not	2 μ l
10xBSA	5 μ l
Puffer 3 NEB	5 μ l
PCR-Produkt	38 μ l
Totalvolumen	50 μl

Zur Erzeugung komplementärer Enden an Vektor und Insert ist es notwendig, beide mit demselben Restriktionsenzymen zu schneiden, so dass eine spätere Integration der Ziel-DNA in den Vektor möglich ist. Der Verdau des PCR-Produktes erfolgte nach folgendem Protokoll: zunächst erfolgte der Verdau mit dem Restriktionsenzym Not1 der Firma New England Biolabs. Hierfür wurde der beschriebene Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Das Prinzip der Methode ist dem in Abschnitt 6.2.1.3. beschriebenen gleich. Nach der Reinigung des bereits ein Mal geschnittenen PCR-Produktes erfolgte der Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz verwandt:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Age I	2 μ l
10xBSA	5 μ l
Puffer 1 NEB	5 μ l
Eluat	38 μ l
Totalvolumen	50 μl

Auch dieser Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym Age I der Firma New England Biolabs wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt.

6.2.2. Herstellung des Vektors

6.2.2.1. Restriktionsverdau des Vektors

Um komplementäre Enden zu schaffen, wird der Ausgangsvektor pCDNA3.1, welcher zu Beginn der Arbeit bereits vorlag und von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wie das Insert. Hierzu wurde zunächst folgender Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
DNA	5µl
10xBSA	5µl
Puffer 1 NEB	5µl
Age I	2µl
H ₂ O	33µl
Totalvolumen	50 µl

Nach Aufreinigung des Vektors mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen erfolgte der Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym bei 37 °C für eine Stunde:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Eluat	38µl
10xBSA	5µl
Puffer 3 NEB	5µl
Not 1	2µl
Totalvolumen	50 µl

Der Vektor wurde daraufhin erneut mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt.

6.2.2.2. Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors ist sinnvoll, um eine erneute Re-Ligation dieser Genfähre zu vermeiden. Unter Verwendung der Antarctic Phosphatase von New England Biolabs war es möglich, den Vektor mit dem Insert zu ligieren, ohne den Vektor nochmals unter Verwendung einer SDS-Page aufzureinigen. Es wurde folgender Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Eluat	43µl
Antarctic Phosphatase Puffer NEB	5µl
Antarctic Phosphatase NEB	2µl
Totalvolumen	50 µl

6.2.3. Ligation von Vektor und Insert

Nach Überprüfung des Vektors und Inserts mittels Gelelektrophorese anhand des mitgeführten DNA-Längenstandards in Form des *Smart Ladder* der Firma Eurogentec erfolgte die Ligation von Vektor und Insert nach folgendem Protokoll:

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Vektor	2µl
Insert	10µl
T4-DNA-Ligase NEB	1µl
T4-DNA-Ligase Puffer NEB	2µl
H ₂ O	5µl
Totalvolumen	20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in *One Shot® Top 10 chemically competent e. coli* transformiert. Die Vektorkarte des Plasmids pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus ist in Abbildung 5 dargestellt.

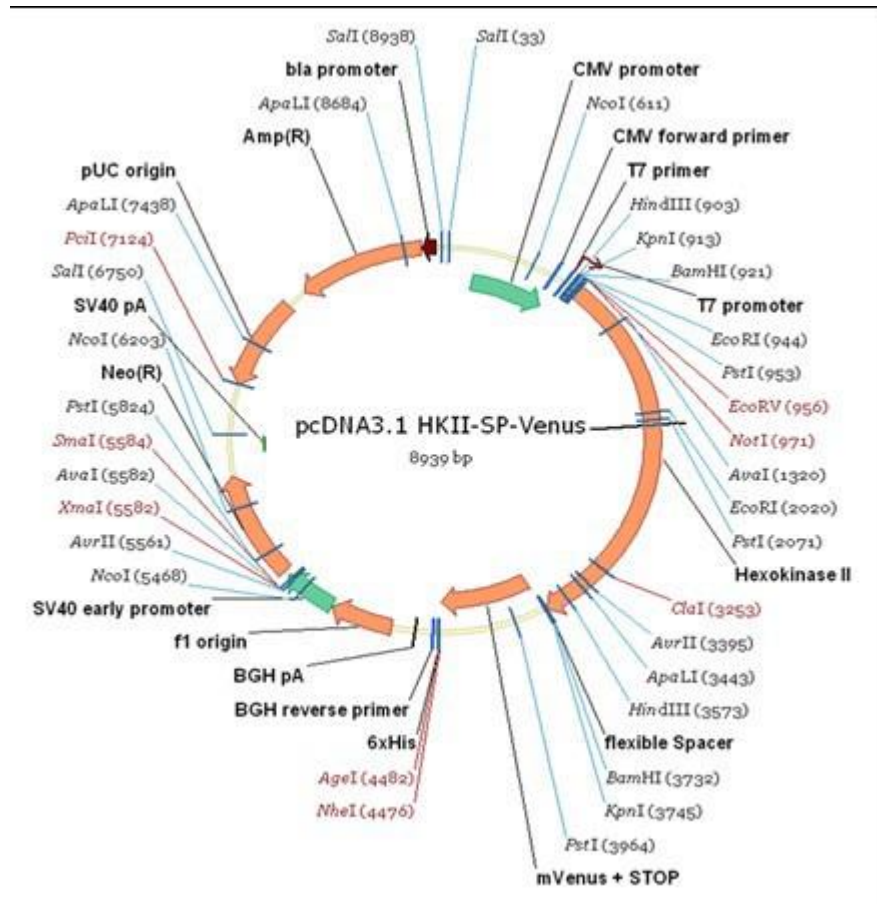


Abbildung 5: Vektorkarte des Plasmids pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus (Vector NTI Software)

6.2.4. Transformation des DNA-Plasmids in kompetente Bakterienzellen

Über das Einbringen des neu entstandenen DNA-Plasmids in kompetente Bakterienzellen ist dessen Vermehrung möglich. Hierfür wurde der Ligationsansatz in *One Shot® Top 10 chemically competent e. coli* der Firma Invitrogen transformiert. Die Prozedur wurde nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Selektion der Bakterienzellen, die das Vektor-Insert-Konstrukt aufgenommen hatten, wurde durch den mit Antibiotikum versetzten Agar-Wachstumsnährboden gewährleistet. So besitzt das konstruierte Plasmid eine Ampicillin-Resistenz, die das Wachstum auf die Plasmid-DNA-tragenden Bakterienzellen begrenzte.

6.2.5. Präparation der Plasmid-DNA aus kompetenten *E. coli*

Zur weiteren Nutzung der DNA-Plasmide wurden diese aus kompetenten *Escheria-coli*-Zellen präpariert, wobei das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen dienlich war. Mit dem Vorgehen nach den Angaben des Herstellers konnte so das gewünschte DNA-Plasmid aus den kompetenten Bakterienzellen gelöst werden. Es erfolgte ein erneuter Kontrollverdau des Vektor-Insert-Konstruktes mit den verwandten Restriktionsendonukleasen Age I und Not I und die Visualisierung des geschnittenen DNA-Plasmids mittels Gelelektrophorese. Der angesprochene Kontrollverdau wurde dabei analog des Restriktionsverdaus des Vektors durchgeführt, der unter 6.2.2.1. beschrieben ist.

6.2.6. Maxipräparation der Plasmid-DNA

Zur Erhöhung der Zahl der Plasmid-DNA-Kopien wurde die unter 6.2.5. beschriebene Minipräparation für 12 Stunden bei 37 °C in mit Ampicillin versetztem LB-Medium inkubiert. Die erneute Isolation der Plasmid-Kopien erfolgte mit dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen. Dem Herstellerprotokoll folgend wurde das DNA-Pellet in 200 µl TE Puffer aufgenommen und anschließend einem erneuten Kontrollverdau mittels der verwandten Restriktionsendonukleasen unterzogen. Die Visualisierung erfolgte durch die Gelelektrophorese.

6.2.7. Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 2 µl DNA mit 198 µl nukleasefreiem Wasser pipettiert und die optische Dichte der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Photometer gemessen. Für die Doppelstrang-DNA ergibt sich aus einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm eine Konzentration von 50 µg/ml. Handelt es sich um eine Einzelstrang-DNA liegt der Wert bei 30 µg/ml. Die Bestimmung der Ratio der gemessenen Dichten bei 260 nm und 280 nm detektiert die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen. Diese Relation sollte den Wert von 1,9 nicht überschreiten.

6.2.8. Herstellung weiterer in der Arbeit verwendeter Plasmide

Die weiteren zur Transfektion verwendeten Plasmide pCAG-HKII, pCAG-Pea15, pCAG-HKII-Venus, pCAG-Pea15-Venus, pCAG-Pea15-Cherry, pCAG-HKII_S155A/S603A, pCAG-Pea15_D74A und pCAG-Pea15_S104G/S116G wurden unter Verwendung standardisierter Protokolle (Sambrook und Russel, 2001; Müllhardt, 2003) innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellt und lagen bei Beginn der Arbeit in einer arbeitsgruppeninternen Plasmid-Datenbank vor.

Als Leervektor für die Herstellung der Plasmide diente dabei pCAG-MCSn1, welcher durch das Entfernen der LacZ-Sequenz aus pDRIVE-CAG (Invivogen) und das anschließende Einfügen der durch PCR-Amplifikation von pEGFP-N1 (Clontech) gewonnenen multiple cloning site entstand (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Die Klonierung der Plasmidvarianten pCAG-Pea15_D74A, pCAG-Pea15_S104G/S116G und pCAG-HKII_S155A/S603A erfolgte unter Nutzung des Cold Spring Harbor Protokolls von Vallejo *et al.*, 2008, mit Hilfe ortsgebundener Mutagenese. Damit das Insert die gewünschte Punktmutation trägt, wurden hinsichtlich der PCR-Amplifikation spezielle Primer entworfen (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die verwendeten Plasmide wurden durch die Firmen SMB Dr. M. Meixner, Berlin, und AGOWA, Berlin, sequenziert (Mergenthaler, 2011).

6.3. Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryonte Zellen

Zur Erlangung einer für die entsprechenden Experimente und Methoden ausreichenden Transfektionsrate wurden zwei unterschiedliche Transfektionstechniken getestet. Mittels mikroskopischer Kontrolle der Vitalität und der Transfektionsrate wurden daraufhin für die entsprechenden Zelllinien und Folgeexperimente die in 6.3.1. und 6.3.2. beschriebenen Techniken angewandt.

6.3.1. Transfektion mit Elektroporation

Die HeLa-Zellen wurden als Grundlage für die Immunpräzipitation mit Hilfe der *Amaxa® Nucleofector® technology* der Firma Lonza transfiziert.

Dies erfolgte unter Verzicht des Amaxa™ Kit nach dem im Folgendem beschriebenen, innerhalb der Arbeitsgruppe modifizierten Protokoll (Mergenthaler, 2011). Nach Abnahme des Zellmediums und einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese zunächst für maximal fünf Minuten unter Zugabe von EDTA Trypsin bei 37 °C inkubiert. Die von den Kulturschalen gelösten Zellen konnten dann in Medium aufgenommen und in die Zentrifuge überführt werden, in der sie für fünf Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. Nach Wiederaufnahme des Zellpellets in Kulturmedium wurde die genaue Zellzahl durch manuelle Auszählung mittels Zählkammer ermittelt. Transfiziert wurden pro Ansatz jeweils 1 Million Zellen.

Unter Zugabe von je 100 µl Elektroporationspuffer pro 1 Million Zellen sowie je 1 µg der zu transfizierenden Vektor-DNA wurden die Zellen in einer Küvette in den Elektroporator überführt. Unter Eingabe des zellspezifischen Programms (HeLa-Zellen: I-013) konnte die Transfektion gestartet werden. Es erfolgte die sofortige Zugabe von 500 µl Zellmedium nach Beendigung der Transfektion mit anschließender Aussaat der Zellen und Inkubation bei 37 °C.

6.3.2. Transfektion mit Roti Fect Plus®

Die Co-Transfektion der HEK-Zellen mit den DNA-Vektoren in Vorbereitung auf die PLA Assays erfolgte mit Hilfe von Roti Fect Plus® von Carl Roth. Hierfür wurden zunächst die Stocklösungen der Nukleinsäuren sowie des Transfektionsreagenzes auf Raumtemperatur gebracht und sanft aufgewirbelt. Sowohl die entsprechende DNA als auch das Transfektionsreagenz wurden daraufhin in einer vorgegebenen Menge des serum- und antibiotikafreien Mediums aufgenommen. Anschließend erfolgten die Vereinigung beider Lösungen und die Inkubation der Mischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dieser Nukleinsäure-Lipid-Komplex umgehend auf die in 500 µl serumhaltigem, aber antibiotikafreiem Medium kultivierten Zellen gegeben und nach Schwenken der Kulturschale mit diesen für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

6.4. Co-Immunpräzipitation

Zum Nachweis der zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktionen wurde die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) angewandt.

Dabei handelt es sich um eine molekularbiologische Methodik, bei der es durch einen an ein festes Substrat gekoppelten Antikörper zu einer Fällung eines Proteins samt seiner Interaktionspartner aus einer Zellsuspension kommt. Zur Untersuchung einer Interaktion zwischen der Hexokinase II und Pea15 fand die GFP- beziehungsweise die RFP-Trap Anwendung. Durch einen an Agarosekügelchen gebundenen Antikörper gegen das grün fluoreszierende Protein GFP, beziehungsweise das rot fluoreszierende Protein DsRed (RFP), ist es möglich, das an ein solches Fluoreszenzprotein gebundene Protein und dessen Interaktionspartner aus einer Zellsuspension herauszulösen und nachzuweisen. Das Prinzip der GFP-Trap ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

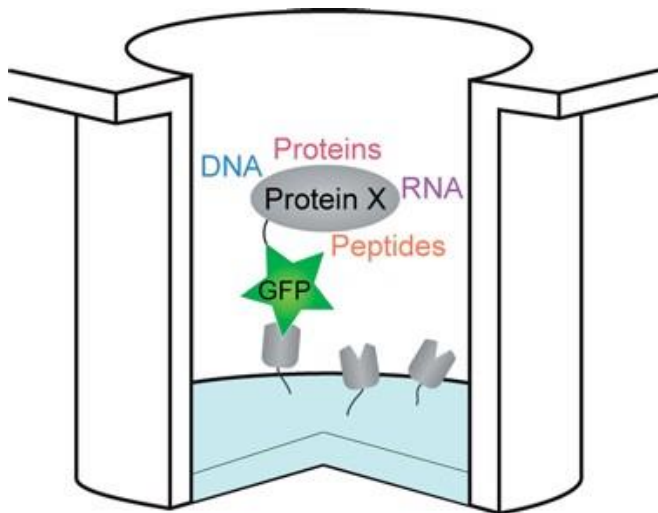


Abbildung 6: Prinzip der GFP-Trap. Aus Chromotek,2013.

Für die Durchführung einer Co-Immunpräzipitation war die (Co-)Transfektion von 1×10^7 beziehungsweise 2×10^7 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden notwendig. Die mittels Nucleofection™ transfizierten Zellen wurden nach Abnahme des Mediums zunächst mit $4 \text{ }^\circ\text{C}$ kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, anschließend von den Kulturschalen gekratzt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das bei der darauffolgenden Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde nach Zugabe von $220 \text{ } \mu\text{l}$ Lysepuffer L1 oder L2 für 45 Minuten auf Eis inkubiert.

Der durch erneute Zentrifugation gewonnene Überstand wurde mit 500 µl Dilution-Puffer aufgefüllt, so dass das nun vorliegende Zelllysate zu einem kleinen Teil von 50 µl als Input-Probe für die Detektion im Western Blot aufbewahrt und der übrig gebliebene große Teil mit den vorbereiteten Antikörpern in Form von GFP-Trap beziehungsweise RFP-Trap Beads für 2 Stunden bei 4 °C mit Hilfe eines end-over-end mixings inkubiert werden konnte. Die folgende Zentrifugation führte zu einem Absetzen der Antigen-Antikörper-Komplexe am Boden des Mikroreaktionsgefäßes, so dass der Überstand als non Bound-Probe für den Western Blot genutzt wurde. Nach zweimaligem Waschen der an die GFP-Trap Beads gekoppelten Komplexe mit Dilution-Puffer wurden diese in 2 x Natriumdodecyl-sulfat-Sample-Puffer aufgenommen. Durch anschließendes Erhitzen der Suspension auf 95 °C wurden die Immunkomplexe von den Beads gelöst, so dass der nach Zentrifugation gewonnene Überstand die zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktionen enthalten sollte und im Western Blot als Bound-Probe verwendet wurde.

6.5. Western Blot

Die Detektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte mit Hilfe eines Western Blots. Hierfür wurden die in SDS-Sample-Puffer aufgenommenen Immunkomplexe zunächst durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und anschließend auf ein Gradientengel von PIERCE aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von konstanten 95 Volt kam es in einem Zeitraum von 60 Minuten zu einer Auftrennung der Proteine nach der Kettenlänge und damit proportional zur Molekülmasse. Die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) erfolgte mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren unter Anlegen einer Spannung von 15 Volt über 2 Stunden. Als Transferpuffer diente Tris-Glycin-Puffer pH 8.3 mit 20 % Methanol. Die zunächst in Methanol und anschließend in Tris-Glycin-Puffer gequollene PVDF-Membran wurde auf Transferpuffer getränktes Filterpapier in die Blotkammer überführt. Darüber wurde das Gel gelegt, welches erneut mit Tris-Glycin-Puffer durchtränktem Filterpapier bedeckt wurde. Es folgte das Waschen der Membran durch TBS-T sowie das Blocken der Membran in 5 %-iger Milch zur Vermeidung unspezifischer Banden durch Anlagerung des Milchproteins an freie Proteinbindungsstellen der Membran. Die anschließende Bindung spezifischer Primärantikörper an die passenden Proteinbanden erfolgte durch die Inkubation der Membran in mit Antikörper verdünnter Blocking Solution bei 4 °C über Nacht.

Der für die Detektion der Proteine notwendige Sekundärantikörper, welcher gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtet ist, wurde ebenfalls in Blocking Solution verdünnt. Nach erneutem Abwaschen der Membran mittels TBST wurde der Sekundärantikörper mit dieser für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden konnte durch die Behandlung der Membran mit Luminolreagenz und Übertragung auf Filmpapier erreicht werden. Die Zuordnung der Banden zu den spezifisch zu untersuchenden Proteinen erfolgte über deren Kettenlänge, welche durch den mitgeführten Proteinmarker *Pager Ruler™ Prestained Protein Ladder* von Fermentas bestimmt werden konnte.

6.6. Duolink® II Fluorescence Assay (Proximity Ligation Assay, PLA)

Hierbei handelt sich um eine weitere Methode zur Detektion einer Protein-Protein-Interaktion. Das Prinzip besteht in einer durch räumliche Nähe der Proteine initiierten Amplifikation fluoreszenzgelabelter Oligonukleotide. Dadurch ist es möglich, jede einzelne Interaktion als leuchtendes punktförmiges Signal im Mikroskop zu erkennen. Das Prinzip des PLA ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Grundlage der Detektion einer Protein-Protein-Interaktion bilden Primärantikörper unterschiedlicher Spezies, welche die Ziel-Antigene von Interesse binden. Die PLA-Sonden, welche an die Primärantikörper binden können, sind Spezies-spezifisch und überdies mit einem kurzen DNA-Strang verbunden. Befinden sich die beiden PLA-Sonden in unmittelbarer Nähe zueinander, sind diese in der Lage, durch die Zugabe zweier weiterer kreisbildender DNA-Oligonukleotide zu interagieren. Die Zugabe einer Amplifikationslösung, unter anderem bestehend aus fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, führt zusammen mit der ebenfalls hinzugefügten Polymerase zu einer Vervielfältigung der Nukleotide nach dem Rolling-Circle-Prinzip. Daraus resultiert eine hohe Fluoreszenzkonzentration, wobei im Mikroskop jedes Amplifikationsmolekül als punktförmig leuchtendes Signal sichtbar wird.

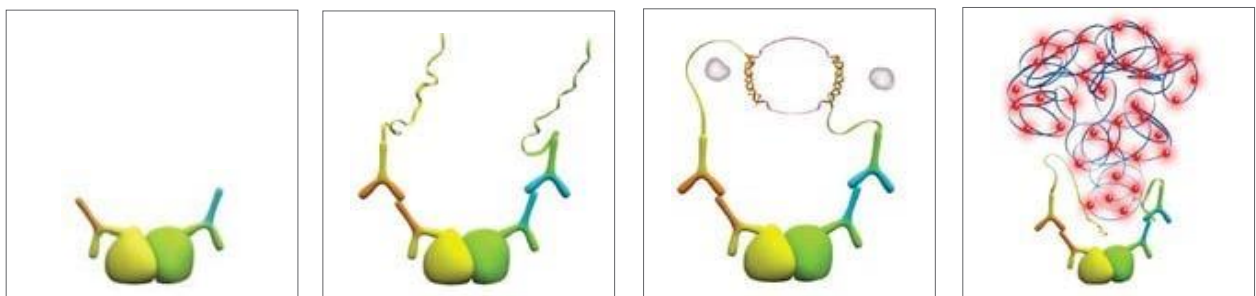


Abbildung 7: Prinzip des Proximity Ligation Assay. Aus Sigma-Aldrich, 2013.

Die mit den transfizierten Zellen kultivierten Coverslips wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) durch zehnmütige Schüttelinkubation bei Raumtemperatur fixiert. Es erfolgte eine weitere Spülung mit PBS und die Überführung der Coverslips auf einen Parafilm, welcher durch ein mit destilliertem Wasser angefeuchtetes Filterpapier unterlegt wurde. Die Permeabilisation der Zellen erfolgte durch die zehnmütige Schüttelinkubation der Coverslips mit je 75 μ l 0,2-prozentigem Triton. Nach darauffolgendem fünfmaligem Waschen der Coverslips mit PBS wurden diese mit Duolink® II Blocking Solution benetzt und bei 37 °C für eine halbe Stunde inkubiert. Die anschließende Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Hierfür wurden die entsprechenden Antikörper in Duolink®II Antibody Diluent verdünnt und jeder Coverslip mit je 75 μ l dieser Lösung versehen. Die Verdünnung des Hexokinase-II-Antikörpers erfolgte 1:50, während der Pea15-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 angewendet wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Coverslips je zwei mal fünf Minuten mittels Wash Buffer A gewaschen und mit den zu den Primärantikörpern kompatiblen und mit einem DNA-Strang versehenen PLA-Proben für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Hierfür wurden je 8 μ l der PLAProbe Minus und der PLA-Probe Plus mit 24 μ l Antibody Diluent vermischt und auf die Coverslips pipettiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift für zwei mal fünf Minuten mit Wash Buffer A. Darauf wurden die Coverslips mit jeweils 40 μ l Ligase Solution für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Befinden sich die beiden zu untersuchenden Proteine nun in enger Nachbarschaft zueinander, so kommt es zu einer Ligation der beiden DNA-Stränge der PLA-Proben. Zur Detektion diente die anschließende Zugabe von 40 μ l Amplification Stock je Coverslip, nachdem diese erneut zwei mal zwei Minuten in Wash Buffer A geschwenkt wurden. Nach einer Inkubationszeit der Coverslips mit dem Amplification Stock für 100 Minuten bei 37 °C wurden die Coverslips erneut, diesmal mit Wash Buffer B, für zwei mal zehn Minuten gereinigt und anschließend mittels Mounting Medium auf Objektträgern fixiert.

6.6.1. Mikroskopie

Die Anfertigung der für die Auswertung benötigten Aufnahmen erfolgte mit dem Leica DMIL-Mikroskop mit Fluoreszenz- und Kamerasystem.

Unter Verwendung des HCX PL APO 40.0x0.85 DRY-Objektivs wurden pro Versuchsansatz mindestens fünf geeignete Gesichtsfelder unter gleichbleibenden Bedingungen aufgenommen und für die Auswertung mittels Blobfinder Software herangezogen. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Aufnahme eines Gesichtsfeldes.

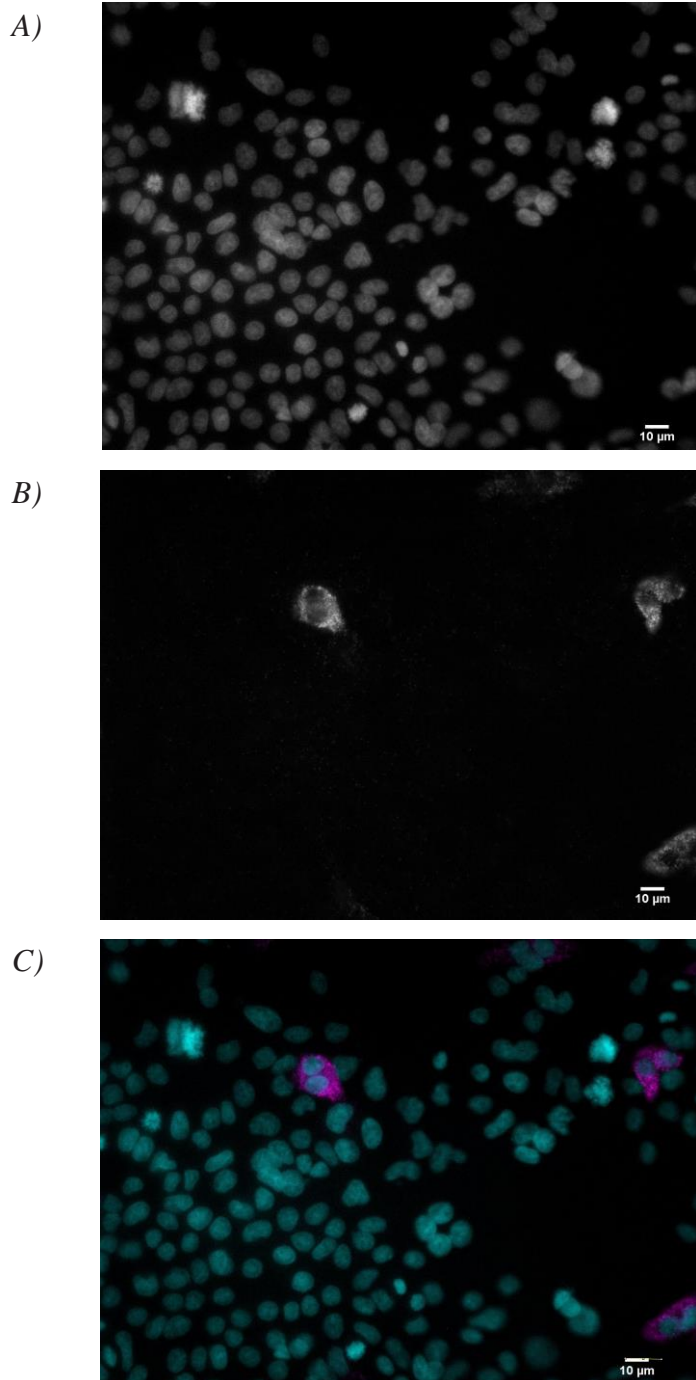


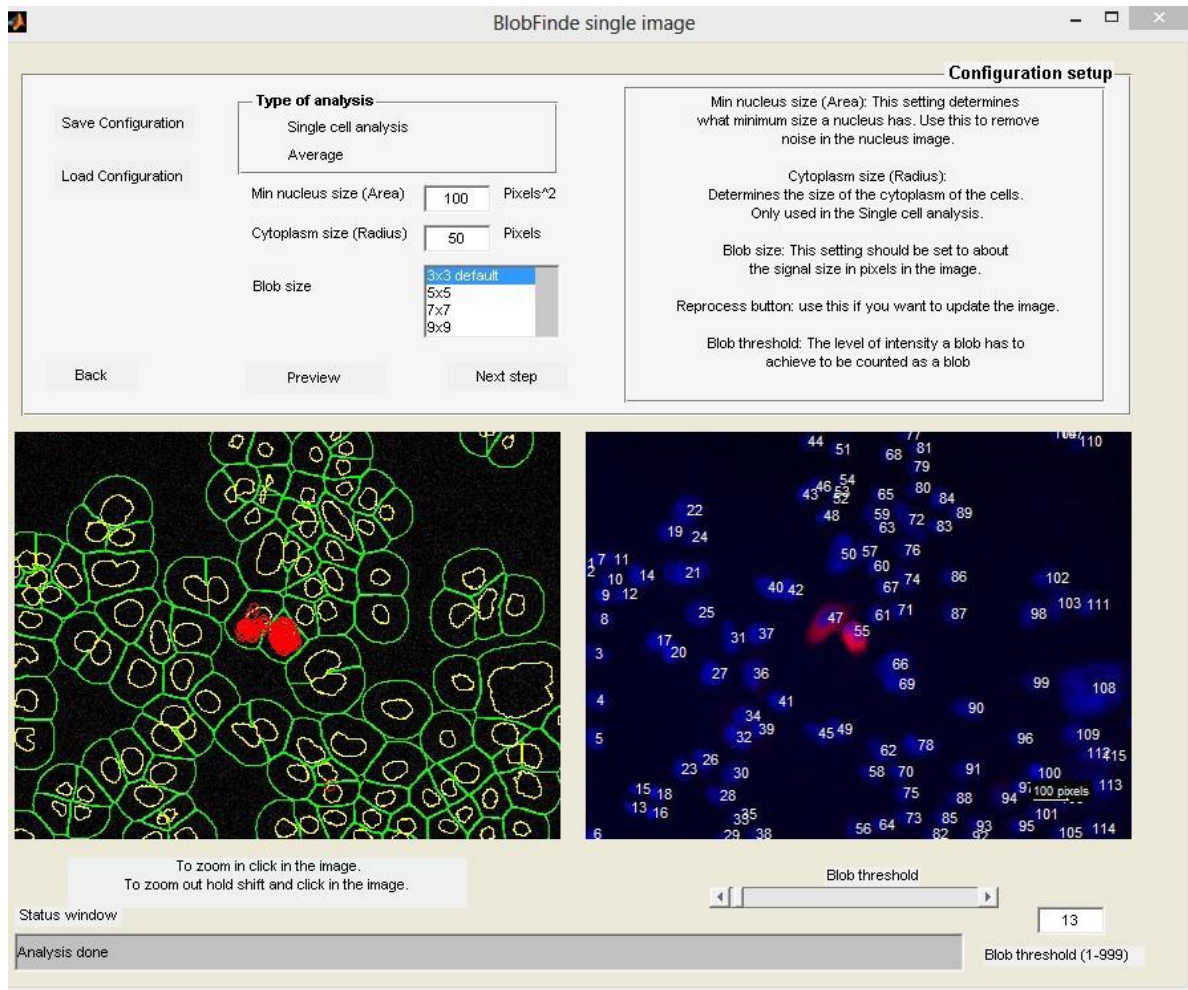
Abbildung 8: Aufnahme eines Gesichtsfeldes.

HEK 293 co-transfiziert mit pCAG-HKII und pCAG-Pea15 (Wildtyp). (a) nucleus channel in Schwarz-Weiß. (b) signal channel in Schwarz-Weiß. (c) Überlagerte Darstellung (overlay) nucleus channel (Cyan) und signal channel (Magenta). Ein Signal repräsentiert eine Interaktion der Proteine.

6.6.2. Blobfinder Software

Die Auswertung des PLA erfolgte mit Hilfe der Blobfinder Software. Diese ist in der Lage, die einzelnen Zellen des jeweiligen Gesichtsfeldes zu zählen und diesen die dazugehörigen punktförmigen Signale, welche eine Protein-Protein-Interaktion anzeigen, zuzuordnen. Somit konnte die Anzahl der Interaktionen pro Zelle detektiert werden. Die mit dem Mikroskop gemachten Aufnahmen wurden in die Blobfinder Software importiert. Hierfür war es notwendig, die 16-bit großen tif-Dateien des Mikroskops in 8-bit tif-Dateien umzuwandeln. Dies erfolgte mit der ImageJ Software. Nach Festlegung eines nucleus channels (Zellen des jeweiligen Gesichtsfeldes) und eines signal channels (Blobs, welche die Interaktionen der Proteine widerspiegeln) wurde ein Schwellenwert festgelegt. Dies dient der Erkennung spezifischer und der Herausnahme unspezifischer punktförmiger Signale durch die Software. So wird eine Verfälschung des Ergebnisses durch das Mitzählen unspezifischer Hintergrundsignale minimiert (Allalou und Wählby, 2009). Aufgrund der hohen Varianz dieses Schwellenwertes zwischen den einzelnen Fotos und der geringen Anzahl an für die Auswertung geeigneten Bildern der verschiedenen Gesichtsfelder erfolgte die Analyse unter Einstellung eines Schwellenwertes für jedes einzelne Foto. Diese festgelegten Schwellenwerte variieren dabei von 10 bis 63 zwischen den ausgewerteten Fotos. Die Software konnte nun alle Zellen des Gesichtsfeldes und die dazugehörigen eine Protein-Protein-Interaktion darstellenden Signale auszählen. Die Ergebnisse der Auszählungen der einzelnen Versuchsansätze wurden daraufhin in einer Excel-Tabelle gelistet und statistisch ausgewertet. Abbildung 9 zeigt die verwendete Software-Maske.

A)



B)

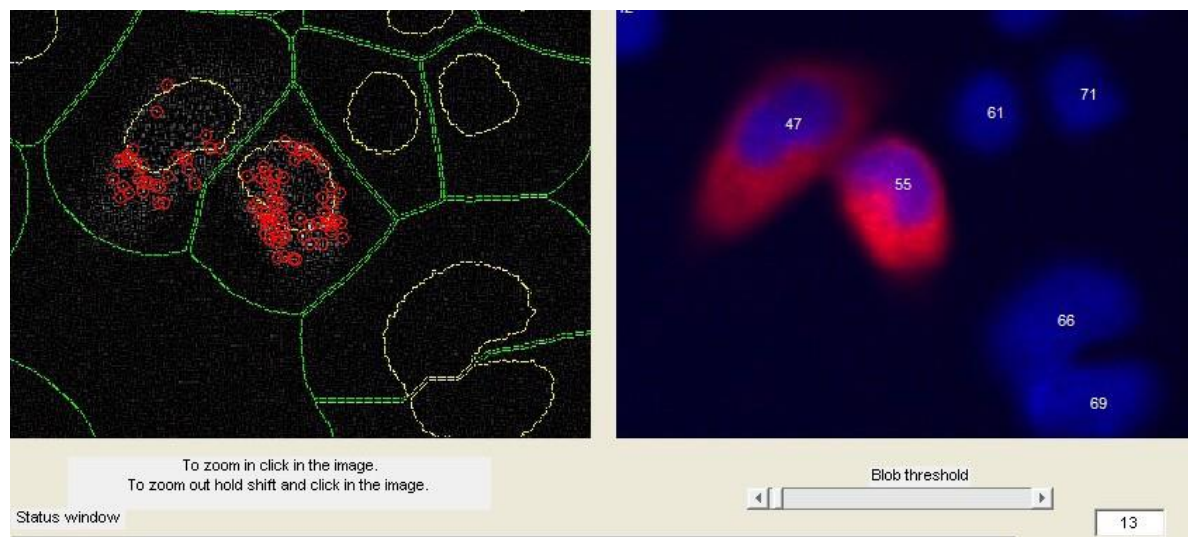


Abbildung 9: Blobfinder Analyse Single Image.

(a) Pea15-Mutante: transfizierte HEK-Zellen, Plasmide: pCAG HKII + pCAG Pea15_D74A, Abbild eines Gesichtsfeldes, eingestellter Schwellenwert: 13, Zellen 47 und 55 zeigen Signale einer Protein-Protein-Interaktion. (b) vergrößerter Ausschnitt der Zellen 47 und 55 aus Blobfinde Analyse Single Image.

7. ERGEBNISSE

7.1. Interaktionsdetektion mit Co-Immunpräzipitation

Ziel war die Etablierung der Methodik der Co-Immunpräzipitation mit GFP- beziehungsweise RFP-Trap zur Untersuchung der Proteininteraktion zwischen Hexokinase II und Pea15. Es war notwendig, die zu untersuchenden Interaktionsproteine in den Zellen zu exprimieren. Um die Interaktion mit GFP- beziehungsweise RFP-Trap nachzuweisen, wurde der entsprechende Wildtyp HKII oder Pea15 mit einem grünen beziehungsweise roten Fluoreszenzprotein markiert. Die Visualisierung der Interaktion erfolgte mittels Western Blot. Durch den an Agarosekügelchen der GFP- beziehungsweise RFP-Beads gebundenen Antikörper gegen das grün beziehungsweise rot fluoreszierende Protein ist das „Herausfischen“ des an dieses Fluoreszenzprotein gebundenen Proteins und dessen möglichen Interaktionspartner aus der Zellsuspension möglich. Die Transfektion der HeLa-Zellen erfolgte mittels Elektroporation nach dem unter 6.3.1 beschriebenen Protokoll der Amaxa® Nucleofector® Technology der Firma Lonza. Für jede IP waren mindestens 1×10^7 Zellen notwendig, die mit einer Plasmidmenge von $2 \mu\text{g}$ DNA pro 1×10^6 Zellen (co-) transfiziert wurden.

7.1.1. Etablierung einer für den Western Blot geeigneten Antikörperkonzentration

Für die Detektion der Proteine HKII und Pea15 und die Erzeugung sauberer Banden im Western Blot war es notwendig, eine geeignete Konzentration der Primär- und Sekundärantikörper zu ermitteln. Dies erfolgte durch die Testung verschiedener Antikörperkonzentrationen an HeLa-Proteinvolllysat. Es stellten sich folgende Primär- und Sekundärantikörper in den dazugehörigen Konzentrationen als geeignet heraus:

Primärantikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Konzentration</u>
HXK II Antibody (C-14): sc-6521 santa cruz	1:200
PEA-15 Antibody #2780 cell signaling	1:1000

Sekundärantikörper

donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 santa cruz	1:5000
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) GE Healthcare	1:5000

7.1.2. Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression einer mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Hexokinase II durch Transfektion von pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus bzw. pCAG-HKII-Venus

Zur Detektion der Interaktion zwischen der Hexokinase II und Pea15 erfolgte zunächst die GFP-Trap 24 Stunden nach Transfektion der HeLa-Zellen mit dem Plasmid pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus. Die im Vorfeld etablierten Antikörperkonzentrationen wurden angewandt. Der in der Abbildung 10 gezeigte Blot veranschaulicht das Ergebnis. So ließen sich sowohl in der *Input*- als auch in der *non-Bound*-Probe deutliche Banden im Bereich von 100 kDa erkennen. Dies entspricht dem Molekulargewicht der endogenen Hexokinase. Auch die das Pea15-Protein detektierenden Banden bei 15 kDa waren in der *Input*- und *non-Bound*-Probe schwach sichtbar. Zum NachweiseinerInteraktionderProteineistesnotwendig,sowohldasmitdemFluoreszenzprotein markierte Hexokinase-II-Protein als auch Pea15 in der Bound-Probe im Western Blot nachweisen zu können. In der *Bound*-Fraktion wurde keine sichtbar. Die gesuchte Pea15-Bande, die eine Interaktion der beiden Proteine angezeigt hätte, konnte in sechs in dieser Art durchgeführten Versuchsansätzen nicht nachgewiesen werden.

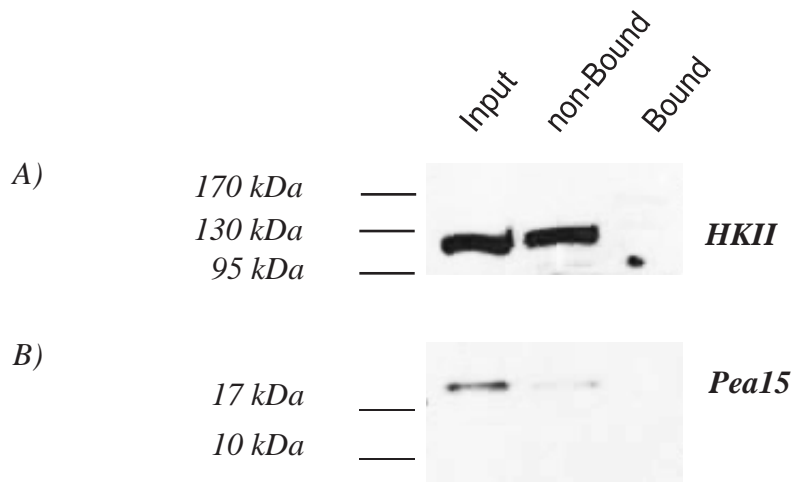


Abbildung 10: Western Blot; Exposure Time 15 Minuten. Input 30 μ l, non Bound 30 μ l, Bound 40 μ l, 10 Mio HeLa-Zellen transfiziert mit **pCDNA3.1-HKII-Sp-Venus, IP 24 h nach Transfektion: GFP-Trap**; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

Die mit pCAG-HKII-Venus transfizierten HeLa-Zellen zeigten im Western Blot keine Expression von HKII-Venus und somit auch keinen *Pulldown* des Proteins durch GFP-Trap. Ein Nachweis einer Proteininteraktion war so nicht möglich. Ein repräsentativer Blot von drei so durchgeführten Experimenten ist in der Abbildung 11 gezeigt.

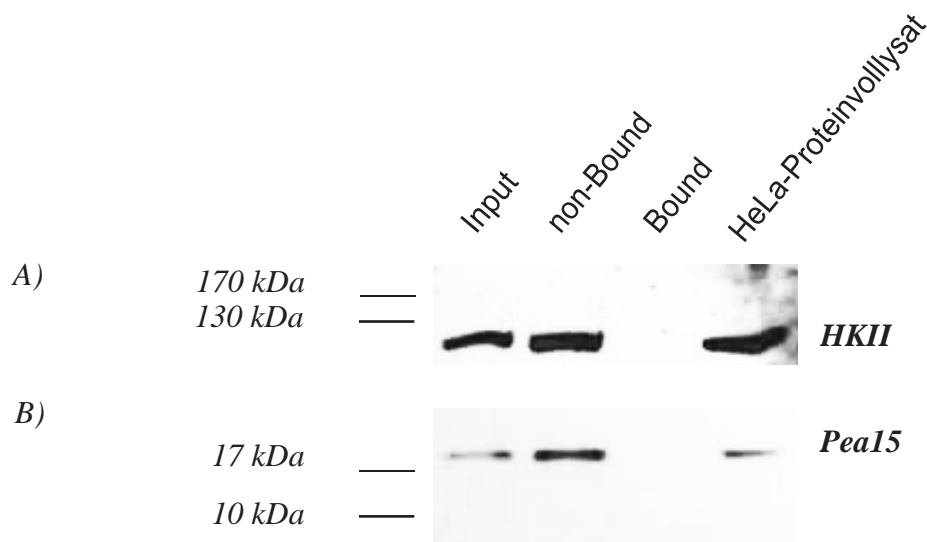


Abbildung 11: Western Blot; Exposure Time 15 Minuten. Input 30 μ l, non Bound 30 μ l, Bound 40 μ l, 10 Mio. HeLa Zellen transfiziert mit **pCAG-HKII-Venus, IP 24h nach Transfektion: GFP-Trap**; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: Pea15: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.1.3. Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Pea15-Proteins durch Transfektion von pCAG-Pea15-Venus

Der Nachweis der Interaktion sollte in diesem Fall mit Hilfe der Durchführung der Immunpräzipitation 24 Stunden nach Transfektion der HeLa-Zellen mit dem Plasmid pCAG-Pea15-Venus erfolgen. Durch den Nachweis von Pea15-Venus und Hexokinase II im Western Blot hätte somit über das Binden des mit Venus markierten Pea15 samt Interaktionspartner durch die GFP-Trap eine Interaktion der beiden Proteine in der *Bound*-Probe detektiert werden können. Allerdings zeigten sich die für die Hexokinase II sprechenden Banden bei 100 kDa nur in der *Input*- und *non-Bound*-Probe, so dass auch auf diesem Wege, trotz des *Pulldowns* von Pea15-Venus bei 55 kDa kein Nachweis der Interaktion der beiden Proteine erbracht werden konnte (Abbildung 12).

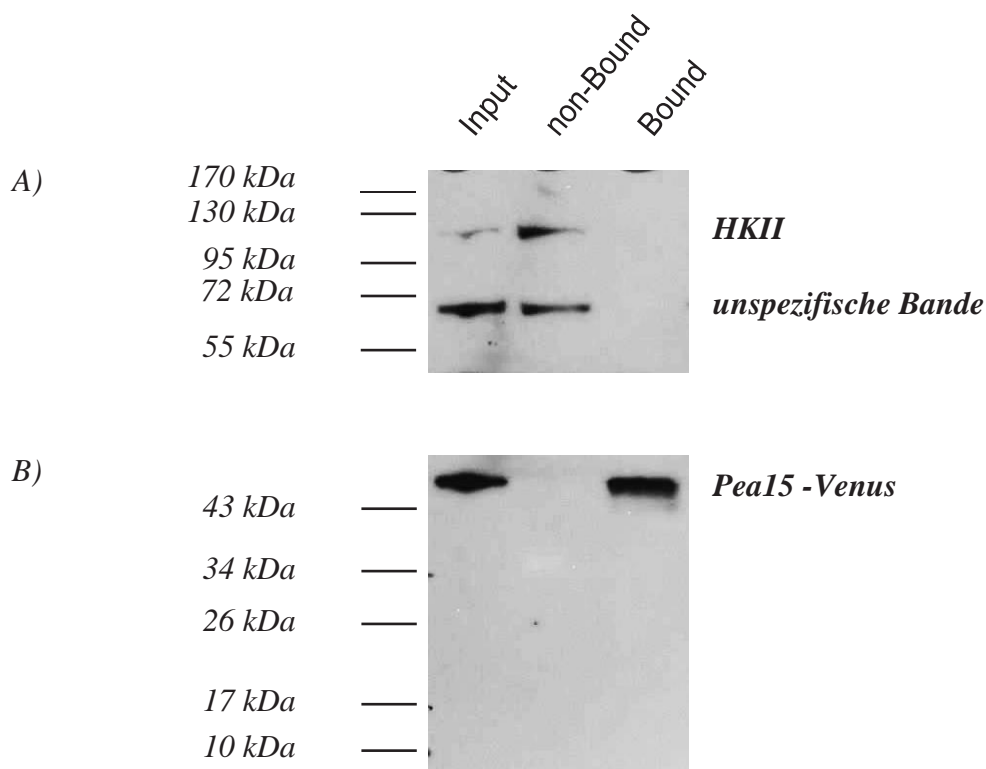


Abbildung 12: Western Blot; Exposure Time 20 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen transfiziert mit pCAG-Pea15-Venus, IP 24 h nach Transfektion: GFP-Trap; A:I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.1.4. Immunpräzipitation mittels RFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion von pCAG-Pea15-Cherry

Nach den bisher gescheiterten Nachweisen einer Interaktion sollte nun die Bindung des transfizierten Pea15-Cherry durch RFP-Trap erfolgen.

Dieser gleicht dem GFP-Trap in der Ausführung und unterscheidet sich lediglich durch den an die Agarosebeads gebundenen Antikörper, welcher anstatt gegen GFP gegen RFP gerichtet ist. Die Immunpräzipitation mittels RFP-Trap nach Transfektion der HeLa-Zellen mit dem DNA-Plasmid pCAG-Pea15-Cherry erfolgte nach 24-stündiger Inkubation der Zellen. Den Blot des so insgesamt nur einmal durchgeführten Experimentes zeigt Abbildung 13a und 13b.

Es ließen sich sowohl in der *Input*- als auch in der *non-Bound*-Fraktion eine Bande bei circa 130 kDa mittels Western Blot detektieren. Im Bereich der endogenen HKII bei 100 kDa lässt sich in Abbildung 13b mit längerer *Exposure Time* ebenfalls ein schwaches Signal in *Input*- und *non-Bound*-Probe erkennen. Zudem konnte der Pulldown von Pea15-Cherry durch die Bande bei etwa 55 kDa in der *Bound*-Probe nachgewiesen werden. Ein Nachweis einer Interaktion von HKII und Pea15 konnte im vorliegenden Versuchsansatz nicht erbracht werden.

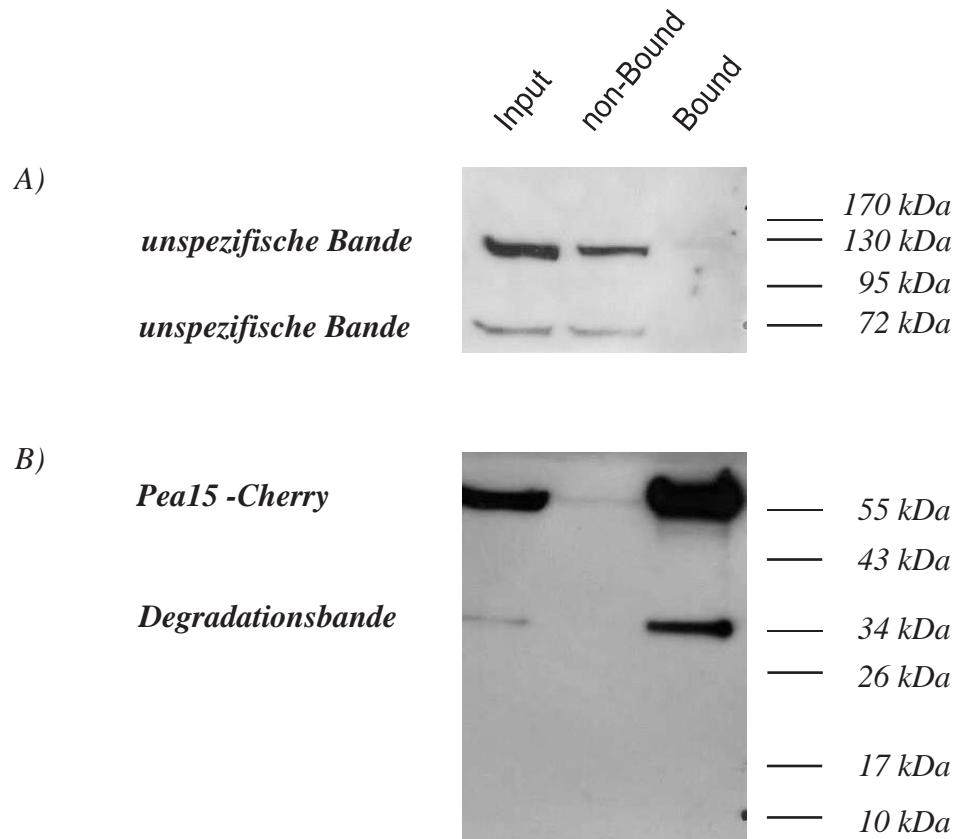


Abbildung 13a: Western Blot; Exposure Time 5 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, 10 Mio.

HeLa-Zellen transfiziert mit **pCAG-Pea15-Cherry, IP 24 h nach Transfektion: RFP-Trap**

A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000 B: I.AK:

Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

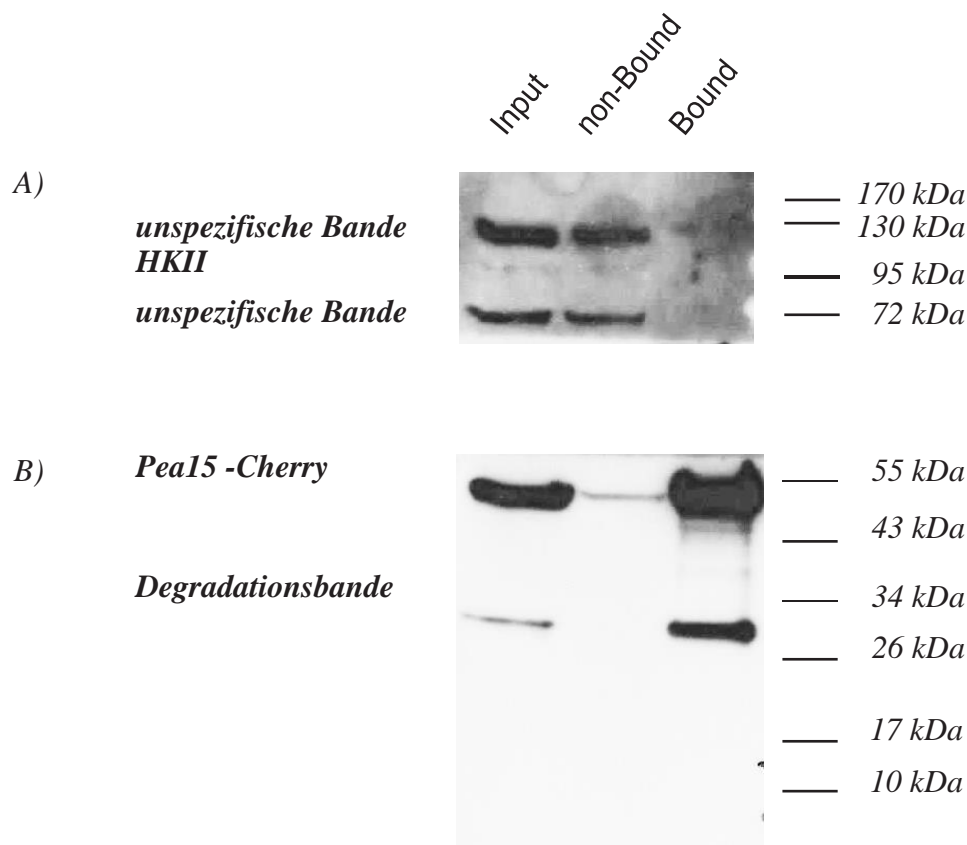


Abbildung 13b: Western Blot; Exposure Time 20 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen transfiziert mit **pCAG-Pea15-Cherry, IP 24 h nach Transfektion: RFP-Trap**
A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000 B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.1.5. Immunpräzipitation mittels GFP-Trap nach Expression einer mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierten Hexokinase II durch Transfektion mit pCAG-HKII-Venus und gleichzeitiger Überexpression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion mit pCAG-Pea15-Cherry

Der Überlegung, dass sich das nachzuweisende Pea15 bei alleiniger Überexpression der HKII mengenmäßig unterhalb einer Nachweisgrenze befinden könnte, folgend, wurden die HeLa-Zellen mit pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry co-transfiziert, um die Expression des Interaktionspartners zu verstärken. Nach mikroskopischer Kontrolle des Transfektionserfolges mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die IP 36 Stunden nach Transfektion durch GFP-Trap durchgeführt. Das durch die Transfektion vermehrt vorliegende Pea15-Cherry sollte über die Bindung der HKII-Venus an die GFP-Antikörper nachgewiesen werden.

Der entsprechende Western Blot ist in Abbildung 14a gezeigt. In der *Input*- und in der *non-Bound*- Probe ließ sich jeweils eine Bande bei etwa 130 kDa, sowie eine im Bereich von Pea15-Cherry bei etwa 55 kDa nachweisen. Zusätzlich wurde eine Bande bei 72 kDa sichtbar. In der *Bound*-Probe zeigte sich zwar eine Bande bei etwa 55 kDa, jedoch keine im Größenbereich von HKII-Venus bei 130 kDa. Somit ist der *Pulldown* von HKII-Venus durch die GFP-Trap gescheitert. Im mitgeführten HeLa-Proteinvolllysat lassen sich ebenfalls deutliche Banden im Bereich von 130 kDa und 72 kDa erkennen.

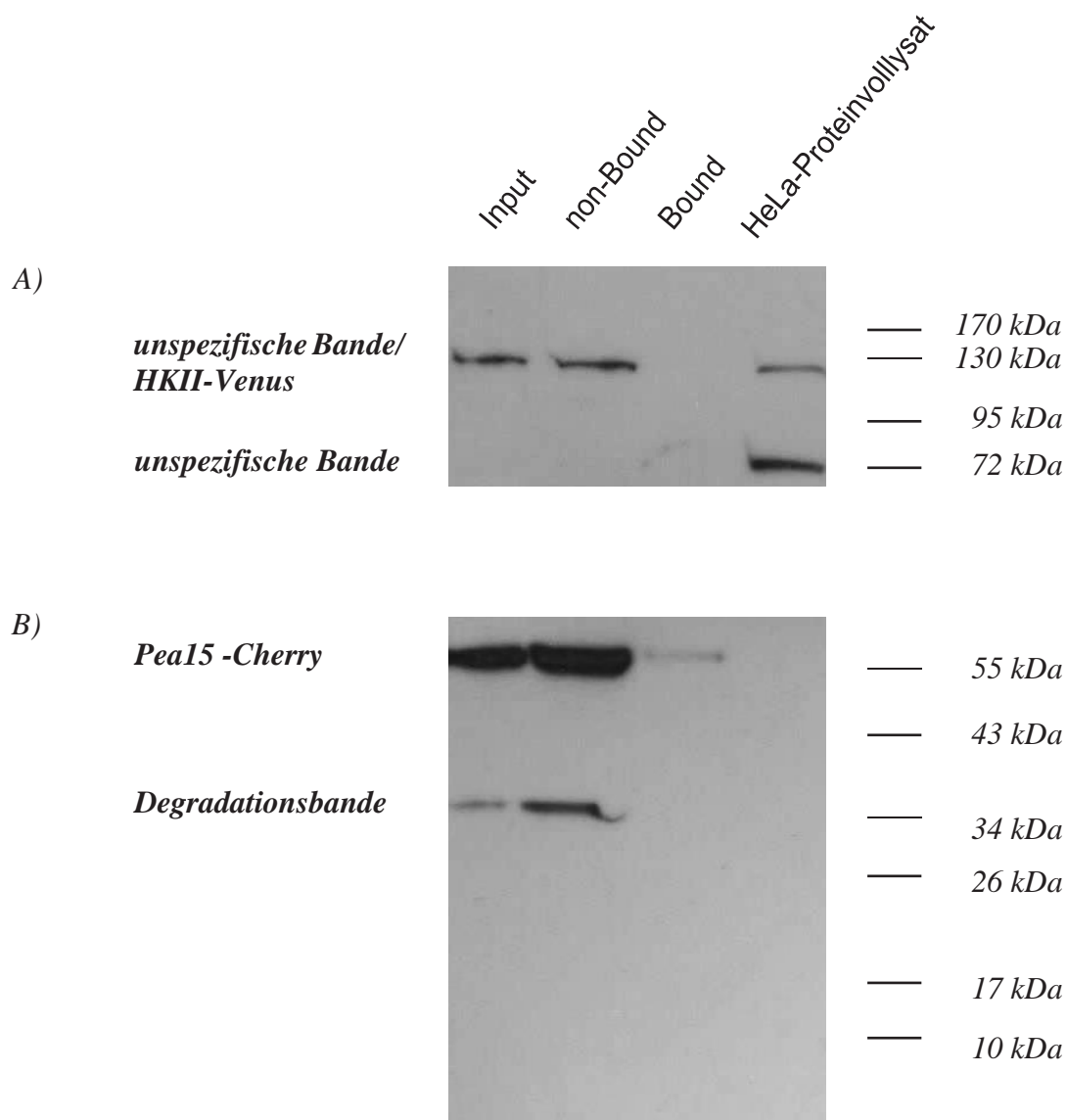


Abbildung 14a: Western Blot; Exposure Time 5 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, HeLa-Proteinvolllysat 30 μ g in 50 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen co-transfiziert mit **pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry, IP 36 Stunden nach Transfektion: GFP-Trap**; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

Bei Verlängerung der *Exposure Time* in Abbildung 14b wird in Input- und non-Bound-Probe, sowie dem HeLa-Proteinvolllysat eine zusätzliche Bande im Größenbereich der endogenen HKII bei 100 kDa sichtbar.

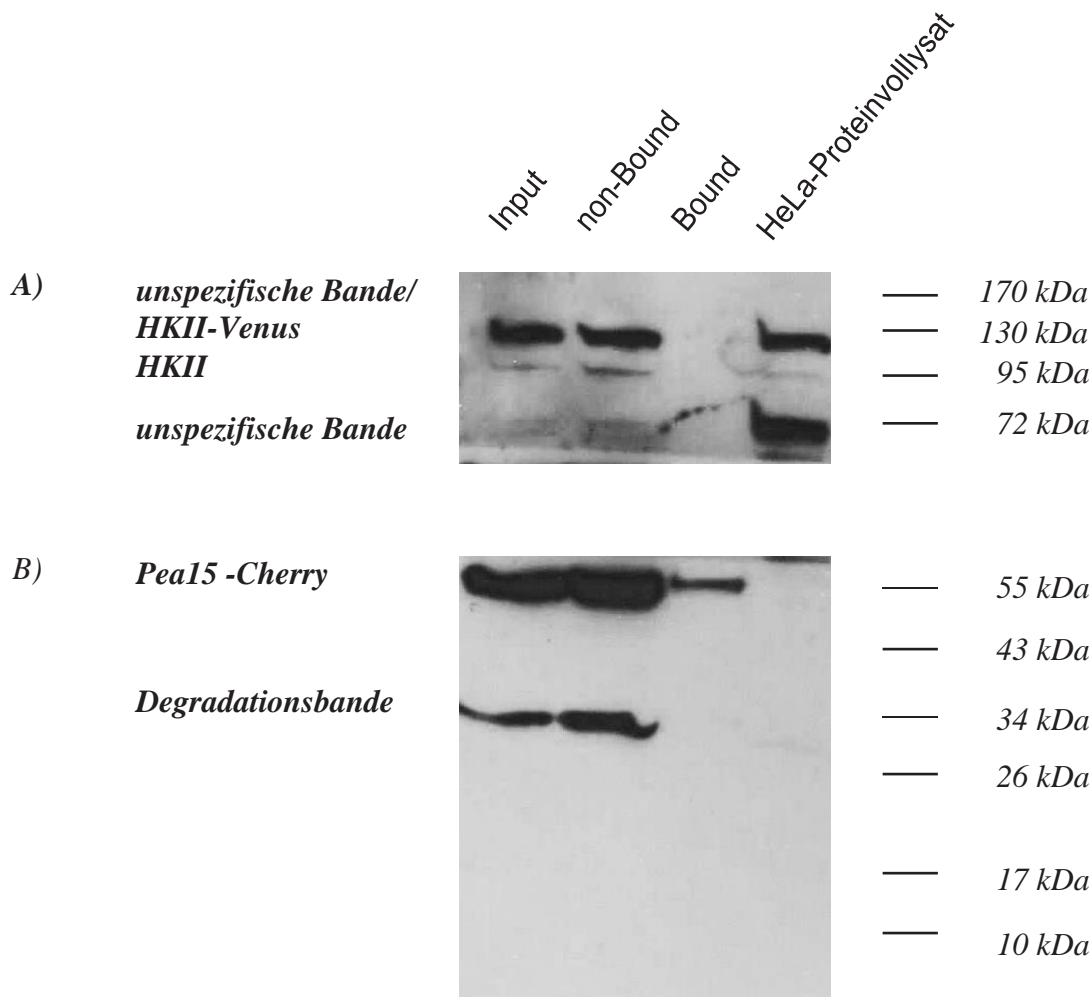


Abbildung 14b: Western Blot; Exposure Time 45 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, HeLa-Proteinvolllysat 30, μ g in 50 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen co-transfiziert mit **pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry, IP 36 Stunden nach Transfektion: GFP-Trap**; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

Ein ähnliches Bild zeigt sich im zweiten dieser Art durchgeführten Versuch. Auch hier wurden die HeLa-Zellen mit mit pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry co-transfiziert. Die anschließende Durchführung der GFP-Trap erfolgte allerdings schon 24 Stunden nach Transfektion. Der entsprechende Western Blot ist in Abbildung 15 dargestellt. Ein *Pulldown* von HKII-Venus ist in der *Bound*-Fraktion nicht erkennbar, allerdings zeigt sich auch hier eine schwache Bande bei 55 kDa.

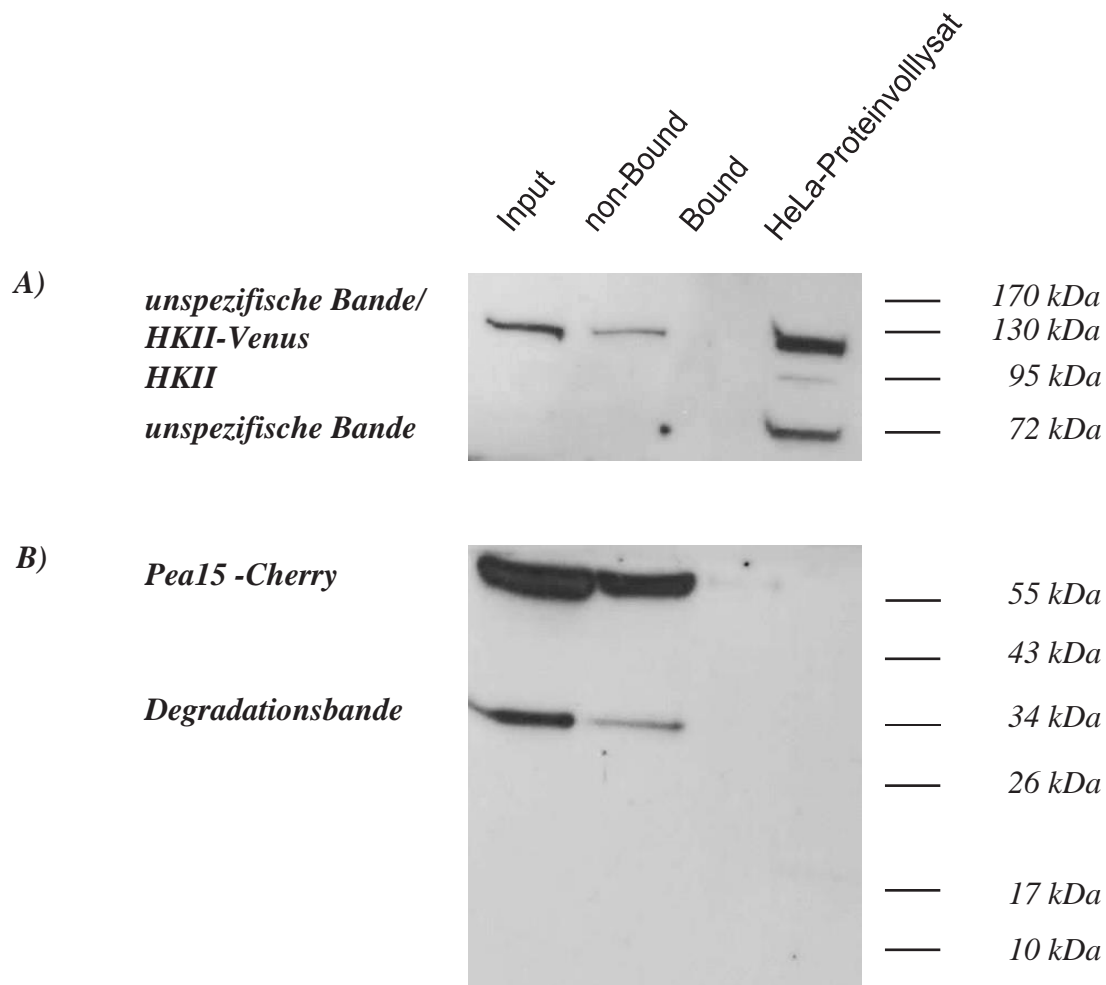


Abbildung 15: Western Blot; Exposure Time 20 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, HeLa-Proteinvolllysat 30 μ g in 50 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen co-transfiziert mit **pCAG-HKII-Venus** und **pCAG-Pea15-Cherry**, IP 24 Stunden nach Transfektion: **GFP-Trap**; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.1.6. Immunpräzipitation mittels RFP-Trap nach Expression eines mit dem Fluoreszenzprotein mCherry markierten Pea15 durch Transfektion mit pCAG-Pea15-Cherry und gleichzeitiger Überexpression von mit dem Fluoreszenzprotein mVenus markierter HKII durch Transfektion von pCAG-HKII-Venus

Ein weiterer Versuch der Detektion der Interaktion erfolgte durch die Co-Transfektion von 2×10^7 HeLa-Zellen mit den Plasmiden pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry.

Zur weiteren Verbesserung der Versuchsbedingungen wurde bei der dem Blot in Abbildung 16 zugrundeliegenden Immunpräzipitation der Lysepuffer L2 angewandt (die Zusammensetzung ist dem Abschnitt „Material“ der vorliegenden Arbeit zu entnehmen). Durch das Hinzufügen von Digitonin sollte eine verbesserte Lyse der Zellmembran erreicht werden.

Diesmal zeigte sich sowohl in der *Input*-, der *non-Bound*-, als auch in der *Bound*-Fraktion eine für die transfizierte HKII-Venus sprechende Bande bei 130 kDa. Die Bande im Größenbereich des Pea15-Cherry bei etwa 55 kDa spricht für einen 100-prozentigen *Pulldown* in der Bound-Probe durch die RFP-Trap. Das endogene Pea15 ist in der *Input*- und in der *non-Bound*-Probe mit der Bande bei circa 17 kDa repräsentiert. Damit ist mit diesem Versuchsansatz der Nachweis einer Interaktion von Pea15 und HKII erbracht.

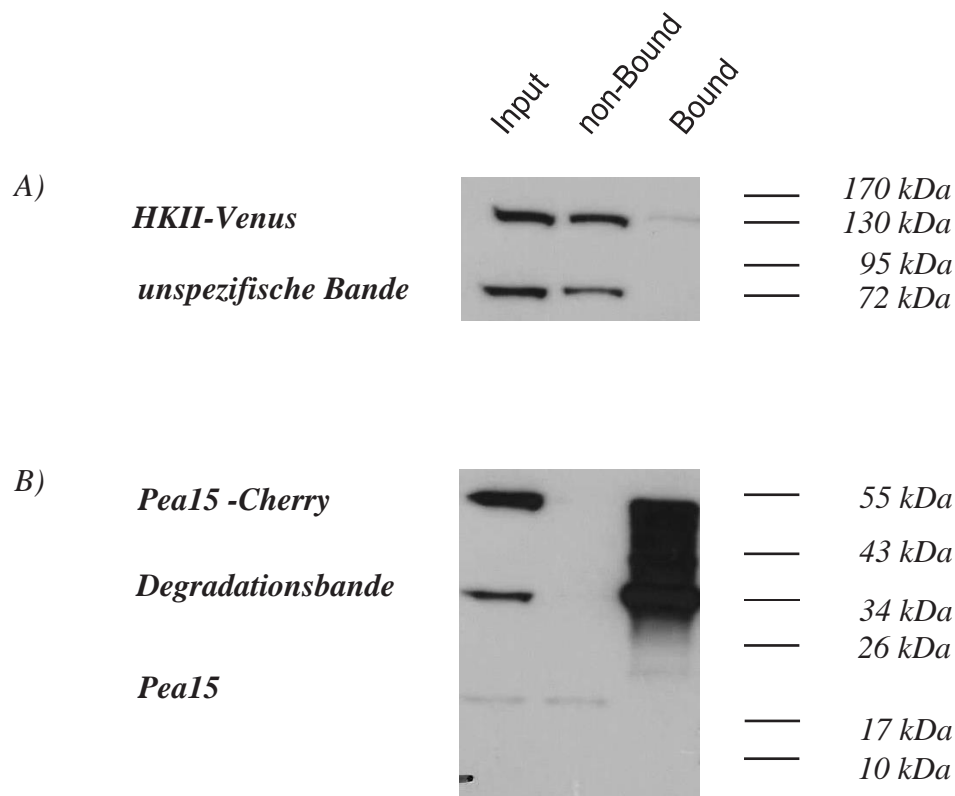


Abbildung 16: Western Blot; Exposure Time 15 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, 20 Mio. HeLa-Zellen co-transfiziert mit pCAG-HKII-Venus und pCAG-Pea15-Cherry, IP 48 Stunden nach Transfektion: RFP Trap, Anwendung von Lysepuffer L2; A: I.AK: Anti-HKII C14 sc 6521 1:200; II.AK: donkey anti got IgG HRP sc 2020 1:5000; B: I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.1.7. Zusammenfassung der IP-Experimente

In Zusammenschau aller in der vorliegenden Arbeit durchgeführten IP-Experimente konnte in dem unter Abbildung 16 gezeigten Blot der Nachweis einer Interaktion zwischen HKII und Pea15 unter Verwendung der RFP-Trap erbracht werden. Bei gleichzeitiger Überexpression von HKII und Pea15 wurde eine gegebenenfalls mögliche unspezifische Bindung des Cherry-Proteins an den GFP-Antikörper getestet. Dafür wurden erneut HeLa-Zellen mit pCAG-Pea15-Cherry transfiziert. Durch den fehlenden Nachweis von Pea15 in der Bound-Probe der mittels GFP-Trap durchgeführten IP konnte eine unspezifische Bindung des Pea15-Cherry-Proteins an die mit GFP-Antikörpern versehenen Agarosekügelchen ausgeschlossen werden. (Abbildung 17).

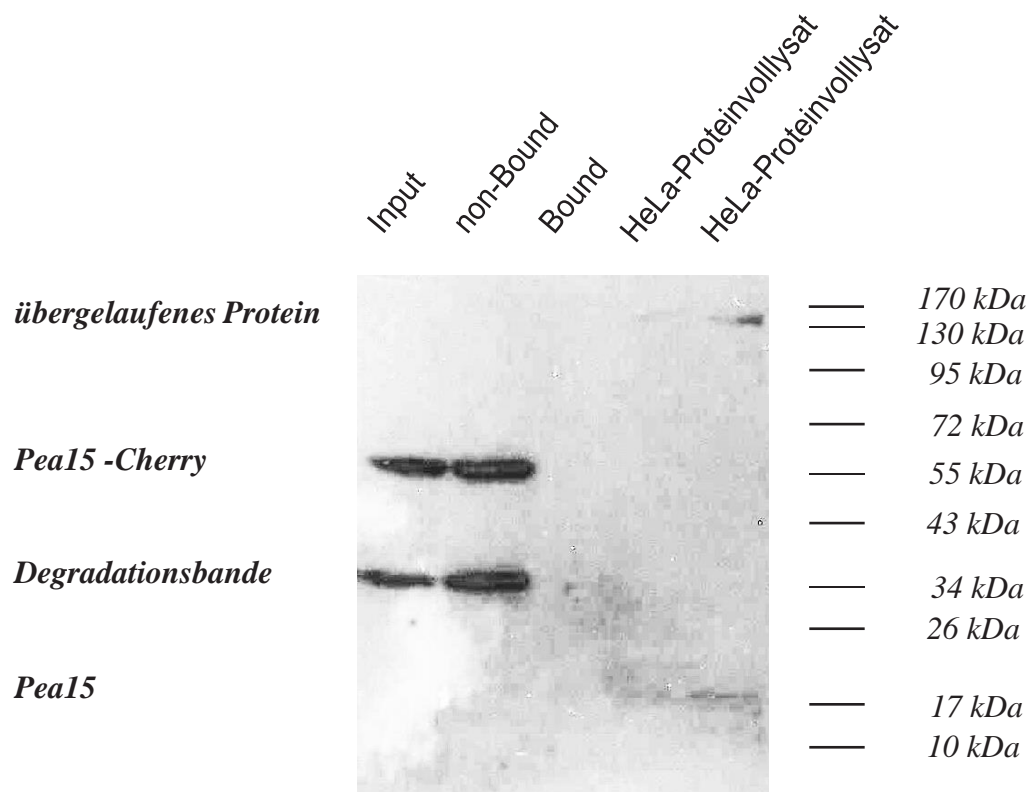


Abbildung 17: Western Blot; Exposure Time 40 Minuten. Input 20 μ l, non Bound 20 μ l, Bound 35 μ l, HeLa-Proteinvollysat 30 μ g in 50 μ l, 10 Mio. HeLa-Zellen transfiziert mit **pCAG-Pea15-Cherry, IP 24 Stunden nach Transfektion: GFP Trap**; I.AK: Anti-Pea15 Cell Signaling 2780S 1:1000; II.AK: Anti Rabbit (ECL Anti Rabbit IgG) 1:5000

7.2. Auswertung der Proximity Ligation Assays-Experimente

Nach erfolgreichem Nachweis einer Interaktion zwischen Pea15 und HKII unter Verwendung der RFP-Trap sollte die Bindung hinsichtlich ihrer Häufigkeit bei Veränderung bekannter funktionell wichtiger Strukturen der Interaktionspartner untersucht werden. Ziel war die Etablierung einer Alternativmethodik zum Screening von HKII- und Pea15-Mutanten. Aus den gewonnenen Daten sollten sich Hypothesen bezüglich der Bedeutung einzelner funktioneller Strukturen der Interaktionspartner auf die Bindung ergeben.

Untersucht wurden die folgenden Mutationen: HKII_S155A/S603A, Pea15_S104G/S116G und Pea15_D74A. Dabei wurden diese zusammen mit dem jeweiligen Wildtyp des Interaktionspartners in die entsprechenden Zellen co-transfiziert. Die daraus gewonnenen Daten konnten später für den Vergleich zu den mit den Wildtypen beider Proteine co-transfizierten Zellen herangezogen werden.

7.2.1. Etablierung einer geeigneten Zelllinie und Transfektionsmethode

In Vorbereitung auf die Untersuchung der Proteininteraktion zwischen Pea15 und HKII wurden die Wildtypen der beiden Proteine sowohl in embryonale menschliche Nierenzellen (HEK-293) als auch in menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Hela) mittels RotiFect Plus® co-transfiziert. Dabei sollte die Grundvoraussetzung für die Durchführung des PLA-Assays, die ausreichende Vitalität der Zellen nach chemischer Transfektion, getestet und die entsprechend günstigere Zelllinie für die Durchführung der Versuche etabliert werden. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde aufgrund des optischen Unterschieds in der Vitalität der Zellen zugunsten der HEK-293-Zellen entschieden. Damit war diese Zelllinie für die folgenden Versuche dienlich.

Überdies wurden die beiden bereits unter 6.3.1. und 6.3.2. beschriebenen Transfektionsmethoden hinsichtlich für die Experimente ausreichender Transfektionsraten in den entsprechenden Zelllinien getestet. Dabei erwies sich die Transfektion der HEK-293-Zellen mittels RotiFect Plus® als die günstigste.

7.2.2. Etablierung der für die Proximity Ligation Assays geeigneten Plasmidmenge

Neben der Auswahl einer geeigneten Zelllinie spielte auch die Wahl der zu transfizierenden Plasmidmenge eine entscheidende Rolle. Hierfür wurden die Plasmide pCAG-GFP und pCAG-mOrange/pCAG-GFP jeweils zu 0,5 µg und 1 µg DNA auf eine Million Zellen transfiziert beziehungsweise co-transfiziert. Durch eine anschließende fluoreszenzmikroskopische Kontrolle konnte die Transfektionseffizienz erfasst werden. Dabei stellte sich die zu transfizierende Plasmidmenge von 1 µg DNA auf 1×10^6 HEK-Zellen als geeignet heraus. Es konnte eine Transfektionseffizienz von etwa 30 % der Zellen erreicht werden.

7.2.3. Ergebnisse der Proximity Ligation Assays

Die ausgezählten Interaktionen wurden zunächst mithilfe einer Excel-Tabelle sortiert und anschließend graphisch präsentiert. Dafür wurde zunächst eine Einteilung hinsichtlich der Anzahl der PLA Signale pro Zelle vorgenommen. So wurden die ausgezählten Zellen mit ihren dazugehörigen Signalen in folgenden Gruppen zusammengefasst:

1. Anzahl der Zellen mit 0 PLA-Signalen
2. Anzahl der Zellen mit 1–2 PLA-Signalen
3. Anzahl der Zellen mit 3–5 PLA-Signalen
4. Anzahl der Zellen mit 6–10 PLA-Signalen
5. Anzahl der Zellen mit 11–20 PLA-Signalen
6. Anzahl der Zellen mit 21–50 PLA-Signalen
7. Anzahl der Zellen mit 51–100 PLA-Signalen
8. Anzahl der Zellen mit mehr als 100 PLA-Signalen

Die Visualisierung dieser Zuordnung erfolgte mit Hilfe von Histogrammen, welche den jeweiligen Untersuchungen zugeordnet und in der Abbildung 18 (a)–(d) dargestellt sind. Die Signale pro Zelle sind eine Addition der Signale des Zytoplasmas und des Zellkerns. Die Grundlage für die Auswertung bildet jeweils ein durchgeführtes Experiment.

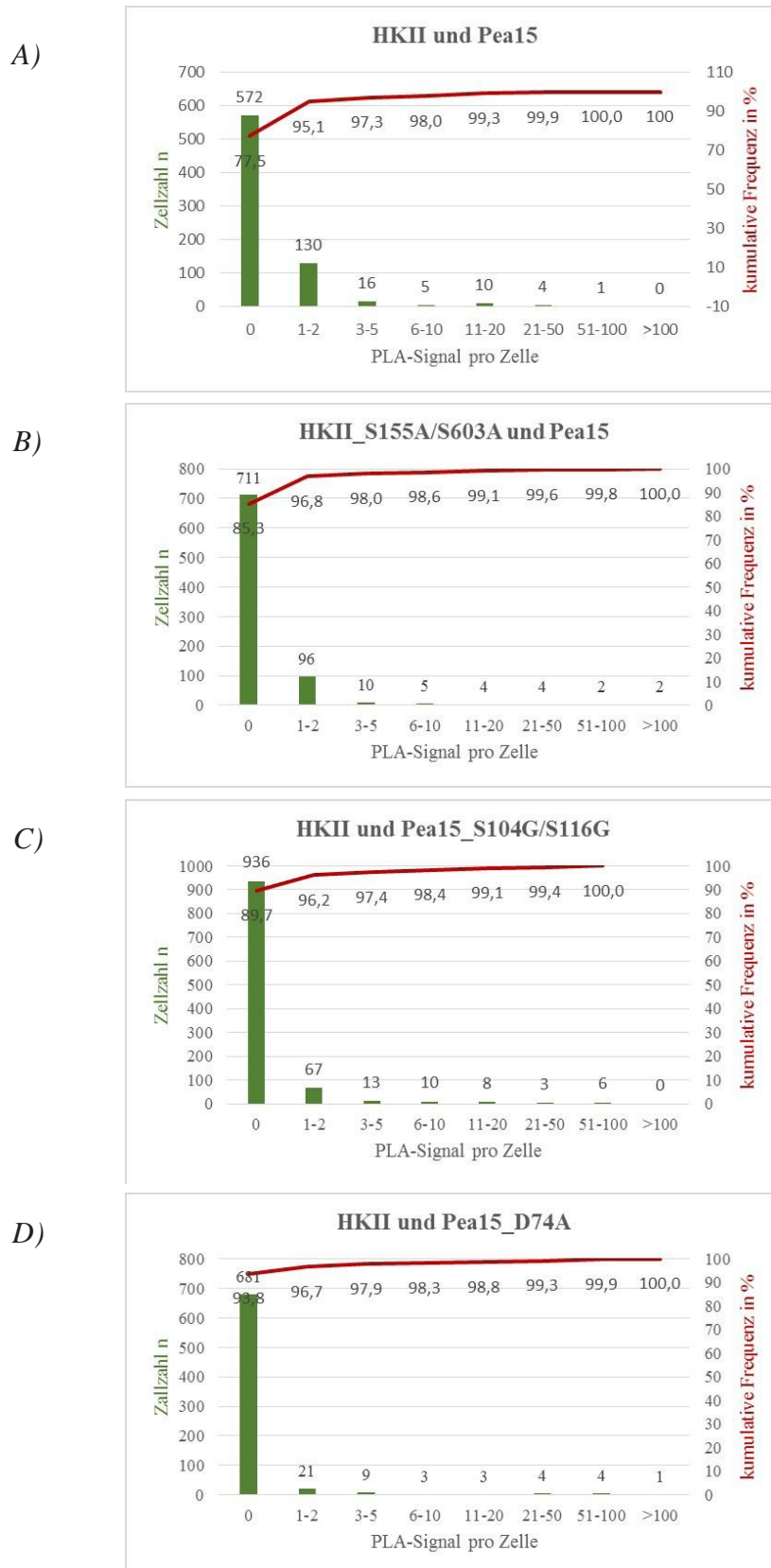


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Signale pro Zelle.

(a) HKII und Pea15; MW: $0,84 \pm 4,60$ (b) HKII_S155A/603A und Pea15; MW: $1,07 \pm 10,68$

(c) HKII und Pea15_S104G/116G; MW: $0,80 \pm 5,84$ und

(d) HKII und Pea15_D74A; MW: $0,84 \pm 6,59$

Zur besseren Vergleichbarkeit der Signale pro Zelle zwischen den mit den Mutanten der Proteine transfizierten Zellen zu den mit den Plasmiden wildtypischer Proteine transfizierten Zellen wurde die kumulative Frequenz der Signale berechnet. Diese gibt an wie viel Prozent der Zellen gemessen an der Gesamtanzahl der Zellen bis zur angegebenen Signalfrequenz eingeschlossen sind. Damit werden alle Zellen zusammengefasst die entweder die angegebene Signalfrequenz oder weniger Signale aufweisen. Durch die lineare Visualisierung dieser kumulativen Frequenz innerhalb des Diagrammes ist es möglich, über die Steigung der abgebildeten Geraden eine Aussage über die Zunahme der Quantität der Signale zu treffen. Auf den ersten Blick lassen sich dabei keine Unterschiede zwischen den Versuchen erkennen. Der angegebene Mittelwert beschreibt, wie viel PLA-Signal jede einzelne Zelle des Versuches aufweist. Dabei lässt sich erkennen, dass der Mittelwert mit 1,07 PLA-Signalen pro Zelle bei dem untersuchten Mutanten HKII-S155A/603 A etwas höher als bei den Vergleichsgruppen liegt. Hier liegt der Mittelwert bei 0,80 und 0,84 PLA-Signalen pro Zelle. Die Standardabweichungen sind aufgrund der Größe des Wertes bei inhomogener Grundgesamtheit graphisch nicht dargestellt.

Um die Anzahl der unspezifischen Signale eines PLA subtrahieren zu können und so nur die spezifischen Interaktionen zu detektieren, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe eine Negativkontrolle erstellt. Diese beinhaltet mit den Wildtypen der Proteine transfizierte HEK-Zellen, die dem Protokoll eines PLA unter Weglassen des Antikörpers gegen das zweite Protein (Pea15) unterzogen wurden. Anschließend wurden die Signale pro Zelle durch die Software ausgezählt. Es konnte ermittelt werden, dass es sich bei den Zellen mit bis zu zwei Signalen pro Zelle um solche mit unspezifischen Signalen handelt. In der Auswertung repräsentieren die Zellen mit drei und mehr Signalen diejenigen Zellen, die eine spezifische Proteininteraktion aufweisen.

7.2.3.1. Interaktionen zwischen HKII und Pea15

Die Auswertung der Softwareauszählung bezüglich der Interaktionshäufigkeiten der Wildtyp-Formen der Proteine Pea15 und HKII ergibt die folgenden Werte.

Von insgesamt 738 gezählten Zellen konnten bei 36 Zellen drei oder mehr Signale ermittelt werden. Damit ergibt sich ein prozentualer Anteil von 4,88 % der Zellen mit spezifischen Signalen zwischen Pea15 und HKII an der abgebildeten Gesamtzellzahl.

Daraus folgend zeigen mehr als 95 % [n = 702] der Zellen zwei oder weniger Signale.

Davon haben 572 Zellen gar kein Signal und bilden mit 77,5 % die größte Gruppe an der Gesamtzellzahl.

Betrachtet man die 36 Zellen, die mit drei oder mehr Signalen eine spezifische Interaktion der beiden Proteine aufweisen, so finden sich davon 16 und damit fast die Hälfte der Zellen, die nicht mehr als fünf Signale zeigen. Die zweitgrößte Gruppe innerhalb der 36 Zellen mit drei oder mehr Signalen bilden die zehn Zellen mit 11–20 Interaktionen pro Zelle. Damit ergibt sich ein Anteil von 1,4 % an der Gesamtzellzahl und 27,8 %, betrachtet man nur die Zellen, die eine spezifische Interaktion zeigen. Die isolierte Betrachtung der Zellen, die eine spezifische Interaktion von HKII und Pea15 zeigen, ist in der graphischen Auswertung in Abbildung 19 zu sehen. Keine der abgebildeten Zellen zeigt mehr als 100 Signale. Lediglich eine Zelle mit mehr als 51 Signalen konnte nachgewiesen werden. Unter Herausnahme der Zellen, die keine oder unspezifische Signale zeigen, konnte ein Mittelwert von 12,72 Signalen pro Zelle ermittelt werden, wobei die Standardabweichung bei 16,963 liegt. Unter Einbeziehung der Zellen, die kein Signal aufweisen, errechnet sich ein Mittelwert von 0,75 Signalen pro Zelle und eine Standardabweichung von 5,06.

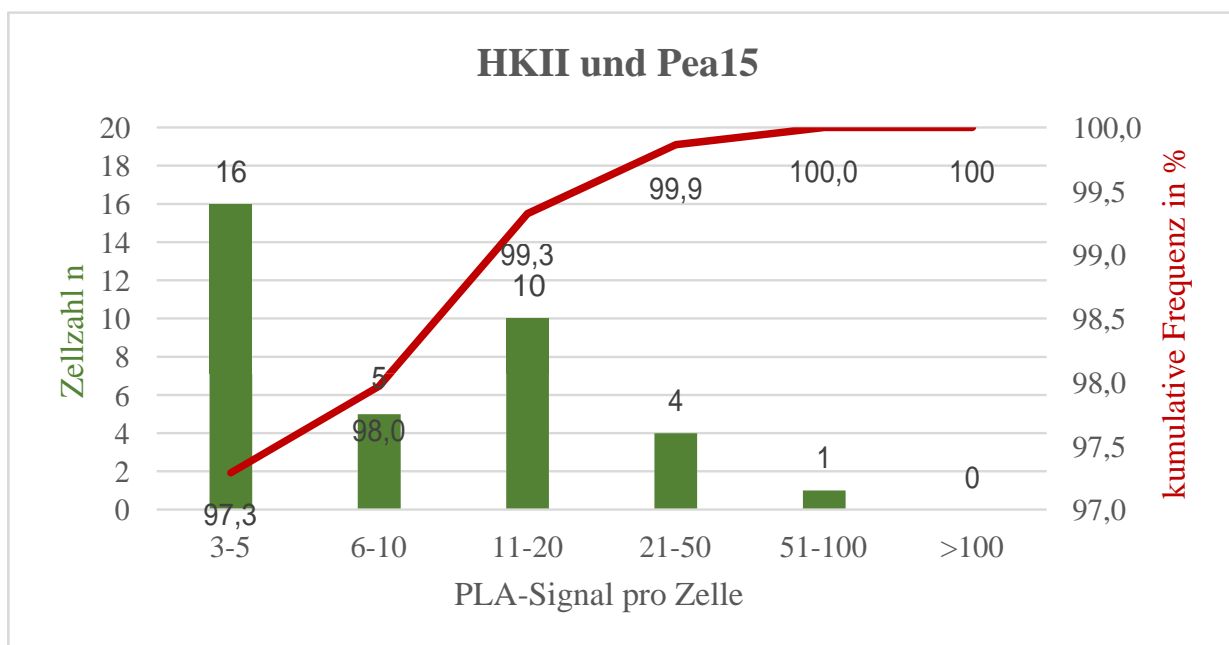


Abbildung 19: Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15. Isolierte Betrachtung der Zellen mit spezifischen Interaktionen, wobei mehr als 95% der Zellen weniger als 3 PLA-Signale und damit unspezifische Interaktionen aufweisen: MW: 12,72 ± 16,963.

7.2.3.2. Interaktionen zwischen HKII_S155A/S603A und Pea15

Die Untersuchung der Interaktionen zwischen der HKII_S155A/S603A-Doppelmutante, einer katalytisch-inaktiven Variante des Proteins, und dem wildtypischen Pea15-Protein ergibt die im Nachfolgenden genannten Ergebnisse.

Bei einer Gesamtzahl von 834 gezählten Zellen konnten bei 27 Zellen drei oder mehr Signale durch die Software erkannt werden. Damit ergibt sich ein prozentualer Anteil von 3,24 % der Zellen mit spezifischen Interaktionen zwischen Pea15 und HKII bezogen auf die Gesamtzellzahl. Somit sind bei mehr als 96 % [n = 807] der Zellen zwei oder weniger Signale zu ermitteln. Von diesen Zellen wiesen 711 gar kein Signal auf und bilden mit 85,3 % die größte Gruppe an der Gesamtzellzahl. Insgesamt zeigen nur 27 Zellen drei oder mehr Signale. Diese isolierte Betrachtung ist in Abbildung 20 dargestellt. Hier konnten bei zehn Zellen nicht mehr als fünf Signale ermittelt werden. Diese Gruppe von Zellen bildet somit einen Anteil von 1,2 % an der Gesamtzellzahl und 37 %, betrachtet man nur die Zellen, die eine spezifische Interaktion zeigen. Zwei der abgebildeten Zellen zeigen mehr als 100 Signale und weitere zwei Zellen weisen mehr als 51 Signale pro Zelle auf. Insgesamt ist unter Herausnahme der Zellen, die keine oder unspezifische Signale zeigen, ein Mittelwert von 28,85 zu ermitteln, wobei die Standardabweichung bei 53,08 liegt. Bezieht man die Zellen, die kein Signal aufweisen, in die Berechnung mit ein, so ergibt sich ein Mittelwert von 1,06 Signalen pro Zelle und eine Standardabweichung von 11,38.

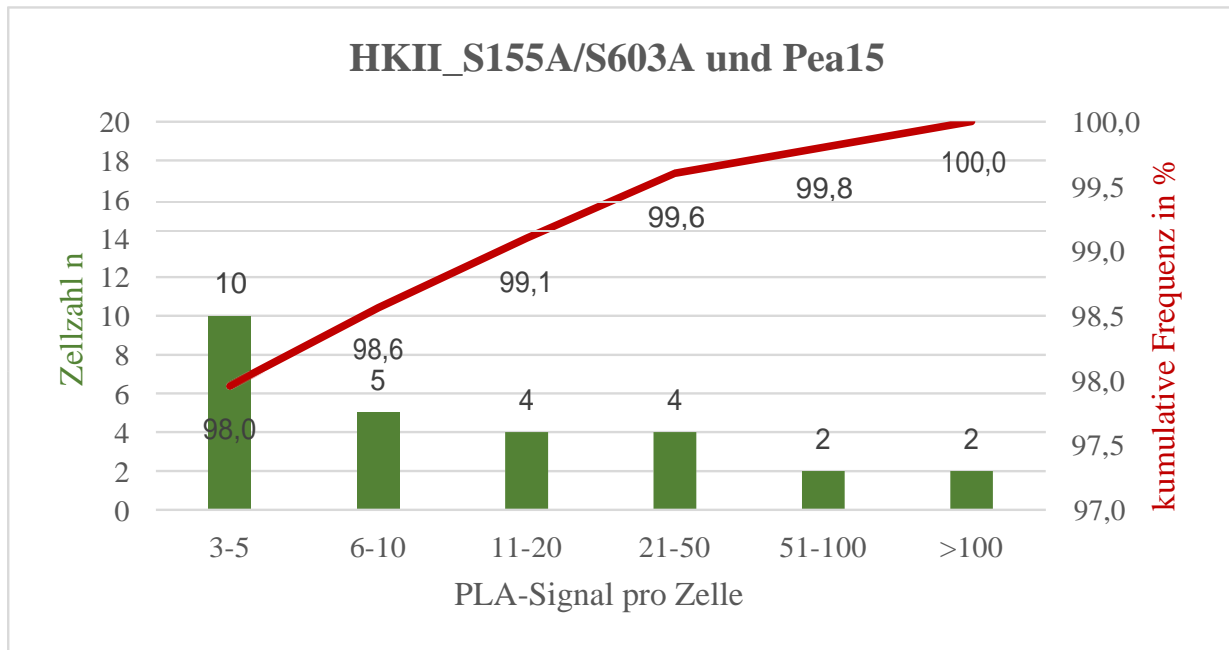


Abbildung 20: Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII_S155A/603A und Pea15. Isolierte Betrachtung der Zellen mit spezifischen Interaktionen, wobei mehr als 96% der Zellen weniger als 3 PLA-Signale und damit unspezifische Interaktionen aufweisen: MW: $28,85 \pm 53,08$.

7.2.3.3. Interaktionen zwischen HKII und Pea15_S104G/S116G

Bei der Betrachtung der Interaktionshäufigkeiten zwischen dem Wildtyp-Protein der Hexokinase II und der Pea15-Doppelmutante mit inaktivierten Phosphorylierungsmotiven des Proteins wurden die im Folgenden erläuterten Werte ermittelt.

Von insgesamt 1043 gezählten Zellen konnten bei 40 Zellen drei oder mehr Signale ermittelt werden. Der prozentuale Anteil der Zellen mit spezifischen Interaktionen zwischen Pea15 und HKII an der abgebildeten Gesamtzellzahl beträgt somit 3,84 %. Schlussfolgernd konnten bei mehr als 96 % der Zellen [n = 1003] zwei oder weniger Signale durch die Software ermittelt werden. 936 Zellen zeigen gar kein Signal und bilden mit 89,7 % den größten Anteil an der Gesamtzellzahl. Von den 40 Zellen, die mit drei oder mehr Signalen eine spezifische Interaktion der Proteine erkennen lassen, zeigen 13 Zellen nicht mehr als fünf PLA-Signale pro Zelle. Somit lässt sich ein Anteil dieser Zellgruppe von 1,2 % an der abgebildeten Gesamtzellzahl und 32,5 %, betrachtet man nur die Zellen, die eine spezifische Interaktion zeigen, ermitteln.

Damit bildet diese Zellgruppedengrößen Anteil unter den Zellen mit spezifischer Proteininteraktion zwischen HKII und Pea15_S104G/S116G. Keine der abgebildeten Zellen zeigt mehr als 100 Signale, aber sechs Zellen lassen mehr als 51 punktförmige Interaktionen erkennen.

Die isolierte graphische Darstellung der Zellen mit spezifischen Signalen ist in Abbildung 21 gezeigt. Insgesamt wurde nach Herausnahme der Zellen, die keine oder unspezifische Signale zeigen, ein Mittelwert von 18,95 ermittelt. Die Standardabweichung beträgt 23,64. Unter Einbeziehung der Zellen, die kein Signal zeigen, und unter Herausnahme der Zellen mit unspezifischen Signalen ergeben sich ein Mittelwert von 0,78 und eine Standardabweichung von 6,04.

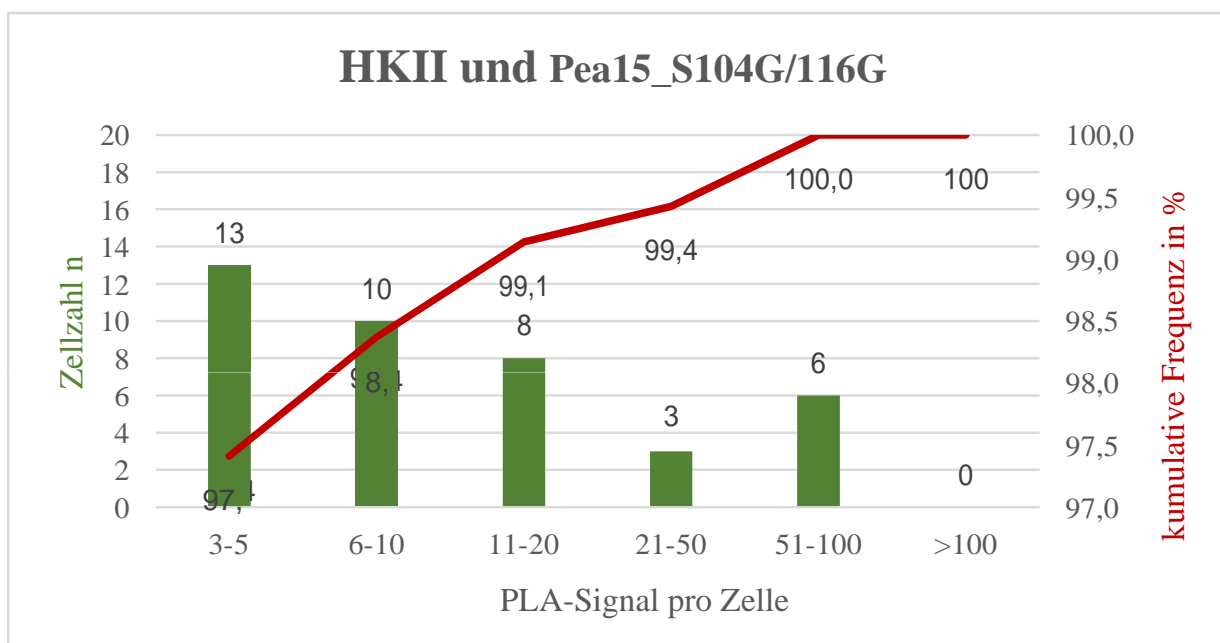


Abbildung 21: Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15_S104G/116G. Isolierte Betrachtung der Zellen mit spezifischen Interaktionen, wobei mehr als 96% der Zellen weniger als 3 PLA-Signale und damit unspezifische Interaktionen aufweisen: MW: 18,95 ± 23,64.

7.2.3.4. Interaktionen zwischen HKII und Pea15_D74A

Die Softwareauszählung bezüglich der Interaktionshäufigkeiten der Wildtyp-Form der Hexokinase II und der innerhalb der *Death effector domain* (DED) inaktivierten Pea15_D74A-Mutante ergibt die folgenden Ergebnisse.

Von insgesamt 726 gezählten Zellen konnten 24 Zellen mit drei oder mehr Signalen ermittelt werden. Es ergibt sich ein prozentualer Anteil von 3,31 % der Zellen mit spezifischen Interaktionen zwischen Pea15 und HKII an der ausgezählten Gesamtzellzahl. Die isolierte graphische Auswertung dieser Zellen ist der Abbildung 22 zu entnehmen. Damit zeigt ein prozentualer Anteil von mehr als 96 % der Zellen [n = 702] zwei oder weniger Signale.

Bei 681 Zellen wurde gar kein Signal durch die Software erkannt. Betrachtet man die 24 Zellen, die mit drei oder mehr Signalen eine spezifische Interaktion der Proteine aufweisen, so zeigen neun Zellen nicht mehr als fünf PLA-Signale pro Zelle. Damit ergibt sich bei diesen Zellen ein Anteil von 1,2 % an der Gesamtzellzahl und 37,5 %, betrachtet man nur die Zellen, die eine spezifische Interaktion zeigen. Eine der abgebildeten Zellen zeigt mehr als 100 Signale. Vier Zellen mit mehr als 51 punktförmigen Interaktionen konnten nachgewiesen werden. Unter Herausnahme der Zellen mit unspezifischen oder fehlenden Signalen ergibt sich ein Mittelwert von 24,42. Die Standardabweichung beträgt 27,67. Unter Einbeziehung der Zellen, die kein Signal aufweisen, errechnet sich ein Mittelwert von 0,83 Signalen pro Zelle und eine Standardabweichung von 6,68.

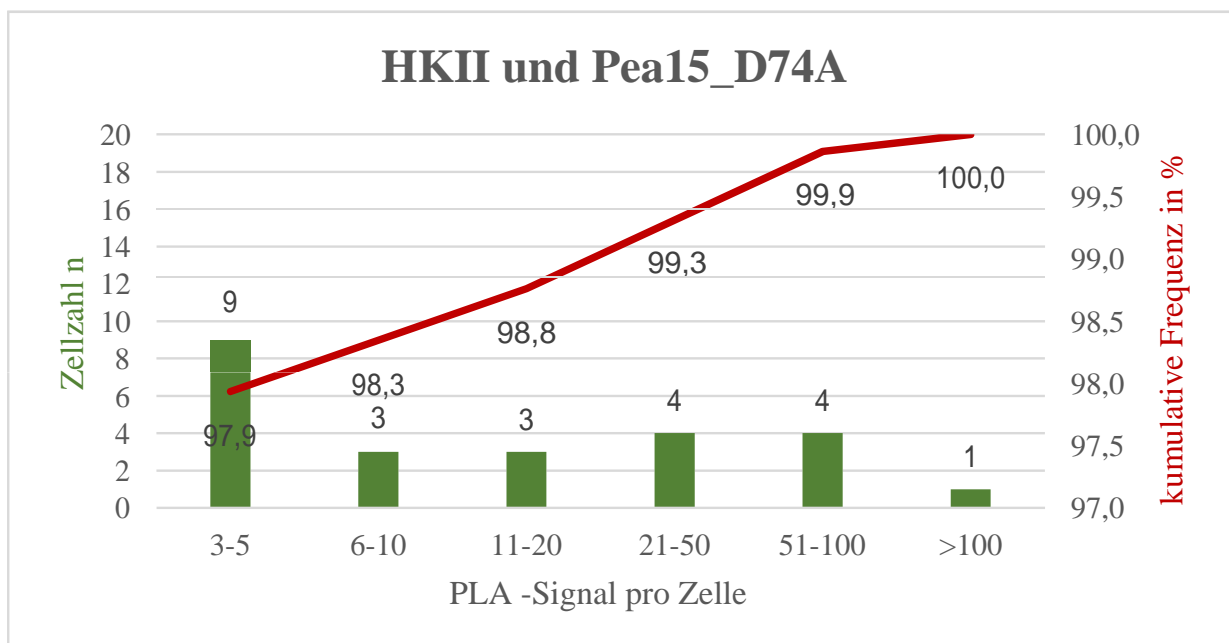


Abbildung 22: Graphische Auswertung der durch PLA nachgewiesenen Proteininteraktionen zwischen HKII und Pea15_D74A. Isolierte Betrachtung der Zellen mit spezifischen Interaktionen, wobei mehr als 96% der Zellen weniger als 3 PLA-Signale und damit unspezifische Interaktionen aufweisen: MW: $24,42 \pm 27,67$.

7.2.3.5. Zusammenfassung der PLA-Experimente

Betrachtet man die Auszählung, so fällt auf, dass die größte Anzahl der Zellen in allen 4 Versuchsansätzen keinerlei PLA-Signal zeigt. So zeigen jeweils mindestens 95 % aller untersuchten Zellen 2 oder weniger Signale und weisen somit keine spezifischen Interaktionen zwischen HKII und Pea15 auf. Die hier verglichenen einzelnen Experimente weisen keine Unterschiede in der Signalfrequenz auf.

8. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die bekannte Interaktion zwischen HKII und Pea15 (Mergenthaler *et al.*, 2012) weiterführend analysiert werden. Ziel war es, die Co-Immunpräzipitation mit GFP- beziehungsweise RFP-Trap zu etablieren. Damit sollte ein Immunpräzipitation-basiertes Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten ermöglicht werden. Eventuell vorhandene Unterschiede in der Interaktion der Proteine bei ortsgebundener molekularer Veränderung in funktionell wichtigen Abschnitten der Aminosäuresequenz von HKII oder Pea15 sollten herausgestellt werden. Als Alternativmethodik sollte das PLA-basierte Screening von Hexokinase II- und Pea15-Mutanten herangezogen werden.

8.1. Nachweis der Interaktion zwischen HKII und Pea15 durch Co-Immunpräzipitation

Der Nachweis einer Interaktion der beiden Proteine gelang in der vorliegenden Arbeit durch das Präzipitieren des an Pea15 gekoppelten Cherry-Proteins mit an Agarosekügelchen gebundenem Antikörper gegen DsRed.

8.1.1. Transfektionsbedingungen

Für die Untersuchung der Fragestellung erfolgte die Transfektion der HeLa-Zellen durch Elektroporation mit Hilfe der Amaxa® Nucleofector® technology der Firma Lonza. Dabei können die Transfektionsbedingungen zellspezifisch gewählt werden. Über die Programme des Nucleofectors® sind auf verschiedenen Zelltypen abgestimmte elektrische Impulse zur Erlangung einer ausreichenden Transfektionsrate festgelegt. Durch die Benutzung eines innerhalb der Arbeitsgruppe erprobten und für die verwendete Zelllinie mit einer hohen Transfektionseffizienz gekennzeichneten Elektroporationspuffers konnte eine für die anstehenden Versuche ausreichend hohe Transfektionsrate erzielt werden. Allerdings wurde die in Neuronen durch Verwendung dieser Methodik gezeigte Transfektionsrate von 60 % an DIV 1 in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht (Mergenthaler, 2011).

Über die an die transfizierten Gene gekoppelten Fluoreszenzproteine eGFP und DsRed konnte die Transfektionseffizienz mittels optischer Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Es kann von einer annähernd identischen Expression des Zielgens ausgegangen werden. Die fluoreszenzmikroskopische Kontrolle erfolgte spätestens 48 Stunden nach Transfektion und unmittelbar vor der Durchführung des IP-Protokolls. Die Auswahl des Zeitpunktes erklärt sich unter anderem durch die gemachten Beobachtungen hinsichtlich des Abbaus des grünen Fluoreszenzproteins eGFP. Sowohl Corish *et al.* als auch Matz *et al.* beschreiben eine geringe Halbwertszeit und einen gesteigerten Abbau von eGFP (Corish und Tyler-Smith, 1999; Matz *et al.*, 1999). Da die Expression des Fluoreszenzproteins für die nachfolgenden IP-Versuche mittels GFP-Trap von außerordentlicher Bedeutung war, wurden die Zeitpunkte für die beschriebenen Versuche mit 24, 36 und 48 Stunden nach Elektroporation möglichst früh gewählt.

Das Verhalten der Expression der Fluoreszenzproteine über die Zeit wurde aufgrund fehlender Relevanz für die Fragestellung nicht weiter untersucht.

8.1.2. Auswahl der Promotoren

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Expression der Zielgene zwei unterschiedliche, ubiquitär exprimierende Promotoren verwendet. Die hinsichtlich des verwendeten CMVPromotors des pCDNA 3.1-Vektors über die Zeit abnehmende Expression des Zielgens (Fitzsimons *et al.*, 2002) spielt in der vorliegenden Arbeit bei Durchführung der IP spätestens 48 Stunden nach Transfektion keine Rolle.

Die in der Literatur postulierte stärkere Expression der mit einem CAG-eGFP-Plasmid transfizierten Kulturen im Vergleich zur Verwendung eines CMV-eGFP-Plasmids (Kawabata *et al.*, 2004) führte zur zusätzlichen Nutzung und Testung dieses Promotors. Es handelt sich dabei um eine Kombination aus CMV enhancer und chicken β -actin, welcher eine starke Expression von Genen in verschiedenen Zelltypen ermöglicht (Niwa *et al.*, 1991). Die ausreichende Expression der zu untersuchenden Proteine stellt die Grundvoraussetzung für die Durchführung der Co-Immunopräzipitation mittels GFP- beziehungsweise RFP-Trap dar. Die anfänglich vergleichbar hohe Zielgen-Expression durch CAG- und CMV-Promotoren (Xu *et al.*, 2001) rechtfertigt die Nutzung dieser für die IP-Experimente der vorliegenden Arbeit.

8.13. Limitationen der Methodik

Betrachtet man den Nachweis von Proteininteraktionen mit der Co-Immunpräzipitation, weist diese Methodik doch eine ganze Reihe von Limitationen auf. So handelt es sich um die Untersuchung der Interaktion zwischen HKII und Pea15 in nicht lebenden Zellen. Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methodik ist zwar der Nachweis erbracht, dass Pea15 und HKII in der Lage sind, miteinander zu interagieren, die Dynamik dieser Interaktion wird dabei nicht berücksichtigt.

Beispielsweise kann der bereits bekannte Kompartimentenwechsel der HKII bei Zellstress (Pastorino *et al.*, 2002; Kim und Dang, 2005) mittels Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden. Durch die Zerstörung der Zellmembran und mögliche Konformationsänderung der Proteine nach Aufbrechen der zu untersuchenden Zellen *in vitro*, ist nicht sicher, ob es sich bei der nachgewiesenen Interaktion nicht um eine solche handelt, die zwar im Versuch mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden kann, in vitalen Zellen allerdings gar nicht vorkommt. So wäre es denkbar, dass nach Zerstörung der Zellstruktur die Interaktion von Proteinen detektiert werden kann, die beispielsweise nicht im selben Zellorganell vorkommen und so *in vivo* niemals interagieren würden. Um ein falsch-positives Ergebnis in der Co-Immunpräzipitation in der vorliegenden Arbeit zu minimieren wurden mit 1,2-Diheptanoylglycerol-3-phosphocholine (DHPC) und Digitonin möglichst solche Lysedetergenzien verwandt, die wenig mit den zu untersuchenden Bindungspartnern interagieren und in die physiologischen und pathophysiologischen Zustände der Zelle möglichst wenig eingreifen (Mergenthaler *et al.*, 2012). Dennoch ist es notwendig, den Nachweis der Interaktion zwischen HKII und Pea15 zusätzlich in lebenden Zellen zu erbringen. Dieses erfolgte mittels *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM) und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Durch die Übertragung der Energie des an HKII gekoppelten angeregten Fluoreszenzfarbstoffs mCerulean auf ein an Pea15 gebundenes mVenus-Fluoreszenzprotein konnte so eine Interaktion der beiden Proteine in lebenden Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die mitochondriale Lokalisation des Pea15 in primären Kortexneuronen gezeigt werden. Diese Erkenntnisse stützen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der detektierten Interaktion von Pea15 mit der Hexokinase II.

Ein weiterer zentraler Aspekt, der zu falsch positiven Ergebnissen bezüglich der Interaktion der beiden Proteine führen kann, ist die Tatsache, dass es unspezifische Bindungen der Proteine an die Antikörper oder auch direkt an die Agarosekügelchen (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008) geben könnte. So wären Proteine nachweisbar, die nur zufällig und vollkommen unspezifisch binden und damit eine Proteininteraktion vortäuschen würden.

Obwohl Trinkle-Mulcahy *et al.* bereits eine ganze Reihe unspezifischer Bindungen von Proteinen an die Agarosekügelchen detektieren konnten, sind in Hinblick auf die vorliegende Arbeit die im Folgenden aufgeführten Kontrollversuche zum Ausschluss falsch-positiv detektierter Interaktionen notwendig.

Durch die Verwendung der GFP- beziehungsweise RFP-Trap der Firma Chromotek wurde die mögliche Anzahl unspezifischer Bindungsstellen an den Antikörper minimiert. Dies liegt darin begründet, dass eine gerade einmal 16 kDa große Domäne zur Antigenbindung genutzt wird (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2008). Dennoch wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt zu wenig Kontrollen hinsichtlich des Ausschlusses nicht spezifischer Bindungen gemacht. Um ungewollte Interaktionen der Proteine mit den Agarosekügelchen auszuschließen, wäre es sinnvoll gewesen, die verwendeten Proben zusätzlich mit antikörperfreien Beads zu inkubieren. Der Ausschluss unspezifischer Bindungen erfolgte in der vorliegenden Arbeit lediglich hinsichtlich der Bindung von mCherry an die GFP-Trap-Beads. Eine ungewollte Interaktion des Venus-Proteins mit der RFP-Trap wurde hingegen nicht ausgeschlossen. Dies wäre notwendig gewesen, um die in Abbildung 16 gezeigte Interaktion zu bestätigen.

Die Grundlage der gezeigten Ergebnisse bilden jeweils einzelne Experimente. Zur weiterführenden Charakterisierung ist mindestens die Reproduktion des erbrachten Nachweises der HKII-Pea15-Interaktion mit der RFP-Trap notwendig.

Insgesamt muss festgestellt werden, dass es sich bei der Immunpräzipitation um eine äußerst störanfällige und technisch anspruchsvolle Methodik handelt, die neben den falsch-positiven auch eine ganze Reihe falsch-negativer Ergebnisse zu Tage fördert. So ist es beispielsweise möglich, über kleinste Abweichungen der Umgebungs- und Pufferbedingungen vorhandene Interaktionen zu zerstören und damit nicht mehr nachweisen zu können. Die enorm vielen aneinandergereihten Arbeitsschritte erschweren die Fehlerquellensuche.

8.14. Analyse der Western-Blot-Banden

Der in der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung des Western Blots nach Co-Immunpräzipitation, erbrachte Nachweis einer Proteininteraktion zwischen HKII und Pea15 muss kritisch betrachtet werden. Grundlage des Nachweises bildet ein Experiment, so dass eine Reproduktion des Ergebnisses nicht stattgefunden hat.

Im vorgefertigten Gradientengel liegt die Bande für Pea15-Cherry in den Abbildungen 13a/b, 14a/b, 15, 16 und 17 bei 55 kDa und nicht bei seinem Molekulargewicht von 43 kDa. Pea15-Venus befindet sich bei etwa 50 kDa. Hinzu kommt das Auftreten unspezifischer Banden durch die verwendeten Antikörper.

Bei den in Abbildung 13a/b, 14a/b, 15 und 16 gezeigten Banden im Bereich von 34 kDa handelt es sich am ehesten um Degradationsbanden. Zudem liegt eine durch den polyklonalen HKII-Antikörper verursachte unspezifische Bindung bei 72 kDa vor. Diese in den Abbildungen 12a/b, 13a/b, 14a/b, 15 und 16 dargestellte Bande ist in allen Versuchen mit diesem Antikörper innerhalb der Arbeitsgruppe nachweisbar.

Der in Abbildung 10 dargestellte Blot zeigt im Größenbereich der endogenen HKII lediglich eine Bande in der *Input*- und *non-Bound*-Probe bei 100 kDa. Eine weitere Bande in *Input*- und *Bound*-Probe, welche die transfizierte HKII-Venus detektieren würde, ist nicht zu finden. Trotz optischer Kontrolle der Transfektionsrate, ist es möglich, dass die Überexpression des Proteins HKII-Venus für die Durchführung einer erfolgreichen GFP-Trap nicht ausreichend war. Somit konnte auch kein Nachweis einer Interaktion erbracht werden.

Auch der in Abbildung 11 dargestellte Blot zeigt die endogene HKII bei 100 kDa in der *Input*- und *non-Bound*-Fraktion. In der *Bound*-Probe ist kein *Pulldown* der transfizierten HKII-Venus durch die GFP-Trap erfolgt. Bei fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle des Transfektionserfolges kann es sich auch um eine fehlerhafte Durchführung der Co-Immunpräzipitation handeln, wobei sich die Fehlerquellen nicht im Einzelnen nachvollziehen lassen.

In dem in Abbildung 13a und b gezeigten Blot lassen sich sowohl jeweils in der *Input*- als auch in der *non-Bound*-Fraktion eine Bande im Bereich von 130 kDa nachweisen. Im zugrundeliegenden Versuchsansatz wurde keine mit einem Fluoreszenzprotein markierte Hexokinase transfiziert, die in diesem Größenbereich laufen würde.

Die im Bereich von 55 kDa detektierte Bande in Abbildung 13a/b spricht für einen erfolgreichen *Pulldown* von Pea15-Cherry durch die RFP-Trap. Im in Abbildung 14 a/b und 15 mitgeführten HeLa-Proteinvolllysat wird ebenfalls eine Bande bei 130 kDa sichtbar, so dass es sich um eine unspezifische Bande handeln muss. In den Experimenten ab Abbildung 13a/b erfolgte ein Wechsel der Charge des Sekundärantikörpers *donkey anti got IgG*. Die Bande bei 130 kDa wird somit am ehesten durch diesen Sekundärantikörper verursacht. Dafür spricht auch, dass sich eine solche Bande im in Abbildung 11 gezeigten HeLa-Proteinvolllysat nicht detektieren lässt. Dieser Annahme folgend ist eine Unterscheidung zwischen HKII-Venus und unspezifischer Bande in den Abbildungen 14a/b, 15 und 16 nicht möglich. Bei der in den Blots der Abbildungen 13 bis 17 vorkommenden Bande zwischen 26 kDa und 34 kDa handelt es sich um Markerprotein.

In der *Bound*-Probe der Abbildungen 14a/b und 15 wird eine Bande im Bereich von Pea15-Cherry sichtbar. In den zugrundeliegenden Experimenten wurde jedoch die GFP-Trap angewandt. Das Ergebnis im Blot legt die Vermutung nahe, dass GFP-Trap unspezifisch rotes Fluoreszenzprotein binden könnte. Dies wird mit Abbildung 17 widerlegt. Die Testung einer unspezifischen Bindung von Pea15-Cherry an die mit GFP-Antikörpern versehenen Agarosekügelchen erfolgte allerdings nur mit einem Experiment. Auch eine unspezifische Bande im Bereich von 55 kDa durch den verwendeten Antikörper zeigt sich in den mitgeführten HeLa-Proteinvolllysaten nicht. Eine mögliche Erklärung wäre die versehentliche Verwendung der RFP- statt der GFP-Trap, so dass in den besprochenen Blots der Abbildungen 14a/b und 15 lediglich ein erfolgreicher „*Pulldown*“ zu sehen ist.

Da unter Verwendung der GFP- beziehungsweise RFP-Trap die sonst häufig im Western Blot der IP-Proben ermittelten leichten und schweren Ketten der Antikörper keine Rolle spielen, könnte es sich bei den Banden im Bereich von 55 kDa in den Abbildungen 13 bis 16 auch um ein zusätzlich detektiertes Protein handeln. Da der verwendete Antikörper das Pea15 an Position 60 der Aminosäuresequenz und damit innerhalb der *death-effector domain* (DED) des Proteins bindet, ist es also gut möglich, dass dieser Antikörper ein Protein mit einer ebensolchen DED detektiert. Es wäre also denkbar, dass parallel zu Pea15 ein anderes Protein, wie beispielsweise die Caspase 10, mit diesem Antikörper detektiert werden könnte. Auf der Grundlage dieser möglichen Erklärung könnte dieses Protein also zusätzlich zu HKII und Pea15 Teil eines Proteinkomplexes sein oder unspezifisch an die GFP- beziehungsweise RFP-Trap binden.

Ein weiterer Einflussfaktor könnte die Größe der untersuchten Proteine sein. So ist es vorstellbar, dass sich das mit etwa 130 kDa deutlich größere HKII-Venus leichter von den Beads waschen lässt als das 43 kDa messende Pea15-Cherry. Sollte dies so sein, dann wäre der Pulldown von Pea15 erfolgreicher als der mit HKII. Diese Vermutung lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht repräsentativ belegen.

Der in Abbildung 16 erbrachte Nachweis der Interaktion zwischen HKII und Pea15 ist kritisch zu betrachten. Es fehlen die entsprechend notwendigen weiterführenden Nachweise bezüglich unspezifischer Bindungen der Proteine. Es ist möglich, dass die Proteine selber an die verwendeten Beads oder die GFP- beziehungsweise RFP-Antikörper binden.

8.2. Untersuchung der Interaktion in Abhängigkeit funktionell wichtiger Strukturen der Bindungspartner

Die Untersuchung der quantitativen Unterschiede in der Interaktion der beiden Proteine erfolgte mittels PLA. Dafür wurden zunächst Gene, welche für den Wildtyp des jeweiligen Proteins codieren, sowie durch ortsgebundene Mutagenese veränderte Gene der Proteine in eine menschliche Nierenzelllinie co-transfiziert.

Dabei wurden drei verschiedene strukturelle Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Proteine hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Bindung zum jeweiligen Wildtyp des Interaktionspartners untersucht. Zum Vergleich wurde die Interaktionshäufigkeit der wildtypischen Formen beider Proteine herangezogen.

8.2.1. Bedeutung der katalytischen Untereinheit der Hexokinase II für die Interaktion mit Pea15

Um die Bedeutung der katalytischen Aktivität der Hexokinase II für das Bindungsverhalten des Proteins an Pea15 zu untersuchen, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe eine katalytisch-inaktive Hexokinase II-Doppelmutante (HKII_S155A/S603A) geschaffen (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die im C- und N-Terminus befindlichen funktionellen Abschnitte des Proteins wurden durch ortsgebundene Mutagenese inaktiviert (Tsai und Wilson, 1996). Hierfür wurde sowohl an Position 155 als auch an Position 603 der Aminosäuresequenz Serin durch Alanin ersetzt.

Die in experimentellen Tests dargestellte 90 %ige Reduktion der glykolytischen Aktivität des Enzyms nach Ausschaltung beider funktioneller Abschnitte (Tsai und Wilson, 1996) scheint auch in Hinblick auf die antiapoptotische Wirkung der Hexokinase eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei Glukoseverfügbarkeit die katalytische Aktivität der Hexokinase II für die Vermittlung antiapoptotischer Effekte der Zelle essentiell ist. Bei Glukosedepriivation trägt diese eher zur Apoptoseeinleitung bei (Mergenthaler *et al.*, 2012). In Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte zunächst eine Veränderung in der Bindungshäufigkeit zwischen Pea15 und HKII_S155A/S603A im Vergleich zu den wildtypischen Proteinen festgestellt werden. So ist der Anteil der Zellen mit spezifischen Bindungen in Relation zur Gesamtanzahl der Zellen etwas geringer.

Dies lässt zunächst einen negativen Einfluss der inaktivierten-katalytischen Strukturen der Hexokinase II auf die Interaktion des Proteins mit Pea15 vermuten. Allerdings liegen bei der Interaktion der HKII-Doppelmutante mit Pea15 insgesamt mehr Bindungspaare der Zellen mit spezifischen Signalen vor.

Der geringe Anteil der Zellen mit nachgewiesenen Interaktionen könnte auf eine variierende Transfektionsrate zwischen den Versuchen zurückgeführt werden.

Der Annahme folgend, dass alle effektiv mit HKII_S155A/S603A und Pea15 co-transfizierten Zellen spezifische Signale zeigen und die Expression der Proteine innerhalb der Zellen exakt dieselbe ist wie bei den mit den Wildtypen der Proteine transfizierten, würde die Veränderung in der Aminosäurestruktur der Hexokinase II eine erhöhte Bindungsaffinität zu Pea15 nach sich ziehen. Schlussfolgernd wäre ein abschwächender Einfluss auf die Interaktion von HKII und Pea15 durch die katalytische Aktivität des glykolytischen Enzyms zu vermuten.

Sowohl die genaue Lokalisation der Bindungsstelle der Proteine als auch die molekularen Mechanismen sind dabei unbekannt.

Der modulierende Effekt von Glukose auf die Bindung der Proteine konnte bereits gezeigt werden. Unter Glukosedepriivation kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Interaktion (Mergenthaler *et al.*, 2012). Demnach würde sich die Ausschaltung der katalytischen Strukturen der Hexokinase bei Glukoseverfügbarkeit eher negativ auf die Bindungsaffinität zwischen den Interaktionspartnern auswirken. Hierfür spricht auch, dass mit der HKII-Doppelmutante transfizierte Zellen bei Glukosedepriivation von der katalytisch-inaktiven Untereinheit profitieren und ein höheres Überleben zeigen (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Es wird vermutet, dass die katalytischen Untereinheiten des Proteins als eine Art Glukosesensor fungieren, die im Falle einer Hypoxie zur Intensivierung der glykolytischen Stoffwechselaktivität führen. Ein signifikanter Unterschied in den Interaktionshäufigkeiten der HKII-Doppelmutante mit Pea15 im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden. Dies ist unter anderem durch die geringe Anzahl der Ergebnissen zugrundeliegender Versuche bedingt.

8.2.2. Bedeutung funktioneller Strukturen des Pea15 für die Interaktion mit HKII

8.2.2.1. Bedeutung der Phosphorylierungsmotive des Pea15-Proteins

Hinsichtlich der Bedeutung der spezifischen Phosphorylierungsmotive des Pea15 für die Interaktion mit HKII wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Pea15_S104G/S116G-Doppelmutante generiert. Die im C-Terminus befindlichen funktionellen Abschnitte des Proteins (Böck et al., 2010) wurden jeweils durch den Austausch des Serins an Position 104 und 116 der Aminosäuresequenz durch Glycin inaktiviert (Mergenthaler *et al.*, 2012).

Im Zusammenhang mit diesen beiden funktionell-strukturellen Abschnitten des Proteins sind in der Literatur zwei die Proliferations- und Apoptosevorgänge der Zelle regulierende Aufgaben des Proteins beschrieben. Durch die Phosphorylierung des Serins an Position 104 der Aminosäuresequenz durch die Proteinkinase C ist die Bindung von Pea15 an die ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*)/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) nicht möglich. Damit wird die ERK-abhängige Transkription proliferativer Gene gefördert (Formstecher *et al.*, 2001).

Darüber hinaus wird über das ERK-Signal der mitochondriale Fas-vermittelte Signalweg der Apoptose entweder durch Inaktivierung von Bad oder durch Stabilisierung von Bcl-2 abgeschwächt (Peacock *et al.*, 2009). Es ist bekannt, dass es hinsichtlich der Fas-assoziierten Apoptose zwei unterschiedliche Signalwege in verschiedenen Zellen gibt. Typ-I- und Typ-II Zellen unterscheiden sich dabei durch die Menge an durch den Fas-Rezeptor rekrutiertem FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) und Caspase 8 sowie durch die damit verbundene Einbeziehung der Mitochondrien in den Apoptosemechanismus.

Bei Typ-I-Zellen spielt die Einbeziehung der Mitochondrien, und damit des intrinsischen Signalweges, durch die Verfügbarkeit eines potenten Fas-assoziierten extrinsischen Weges keine große Rolle. Die Apoptose in Typ-II-Zellen ist infolge eines nicht ausreichend starken extrinsischen Signalweges und Bildung eines zu schwachen DISC (*death-inducing signaling complex*) unter Einbeziehung proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie an den mitochondrialen Signalweg gekoppelt (Scaffidi *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung an Position 116 der Aminosäuresequenz des Proteins erfolgt durch die CamKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) oder Akt-Kinase und fördert die Bindung von Pea15 an FADD. Dabei inhibiert es dessen apoptotischen Effekt als Teil des DISC und verhindert die Caspasenrekrutierung (Trencia *et al.*, 2003). Somit kann ein regulatorischer Einfluss des Proteins sowohl auf den intrinsischen als auch auf den extrinsischen Signalweg der Apoptose herausgestellt werden (Fiory *et al.*, 2009). Interessanterweise kann Pea15 seine antiapoptotische Wirkung nur in der bisphosphorylierten Form entfalten. Ist Serin 104 unphosphoryliert, so liegt das Protein gebunden an ERK/MAPK vor, so dass es für die Bindung an FADD nicht frei ist, selbst wenn Serin an Position 116 phosphoryliert ist (Renganathan *et al.*, 2005). Darüber hinaus könnte das an Position 104 unphosphorylierte Pea15 den Fas-vermittelten mitochondrialen Apoptoseweg bei fehlender Transkription der ERK-abhängigen Gene und der damit verbundenen antiapoptotischen Effekte nicht inhibieren. Über dieses Abhängigkeitsverhältnis könnten die Signalwege unter anderem miteinander verknüpft sein. Die genaue Regulierung dieser untereinander ist bisher nicht verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun beide Phosphorylierungsmotive des Proteins ausgeschaltet, um deren Einfluss auf die Bindung von Pea15 an HKII zu untersuchen. In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die HKII-Wildtyp-Überexpression in PEA-15-Knock-Out-Mausneuronen zu keinem Schutz vor Hypoxie-induziertem Zelltod führt (Mergenthaler *et al.*, 2012). Damit kann von einer synergistischen Vermittlung protektiver Mechanismen ausgegangen werden.

Die postulierte antiapoptotische Wirkung der Hexokinase II ist unter anderem in der Inhibition der Cytochrom-C-Freisetzung, einem Schlüsselmechanismus des intrinsischen Signalweges der Apoptose, begründet (Gottlob *et al.*, 2001). Zudem ist der beschriebene protektive Effekt von Pea15 hinsichtlich des ex- und intrinsischen Signalweges der Apoptose von der Phosphorylierung des Proteins abhängig (Estelles *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2001; Fiory *et al.*, 2009).

Schlussfolgernd könnte der synergistischen Zelltodprävention ein von der Phosphorylierung des Pea15 abhängiger, bisher nicht bekannter mitochondrialer Mechanismus zugrunde liegen.

Diese Annahme wird durch den innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigten Kompartimentenwechsel von Pea15 unterstützt. So konnte in Immunoblotanalysen eine zusätzliche mitochondriale Lokalisation des bisher als rein zytosolisch geltenden Proteins in primären Kortexneuronen detektiert werden (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die durch die Interaktion von HKII und Pea15 vermittelten apoptoseinhibierenden Mechanismen sind bisher nicht bekannt. Bei Verlust des protektiven Potentials durch das Ausschalten der dafür verantwortlichen funktionellen Strukturen des Pea15 lässt sich eine Abschwächung oder das vollständige Fehlen der Bindung an HKII und damit ein Verlust der zelltodprotektiven Eigenschaften des Verbundes vermuten. Unter der Annahme, dass die erzielten Transfektionsraten in allen gemachten Versuchen identisch sind, weisen die gewonnenen Daten auf eine erhöhte Interaktionshäufigkeit der Pea15-Doppelmutanten mit HKII gegenüber den wildtypischen Proteinen hin. Dennoch sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Unterschiede nicht signifikant und treten eher zufällig auf.

8.2.2.2. Bedeutung der ERK-Bindungsstelle innerhalb der Death Effector Domain (DED) des Pea15-Proteins

Um die Bedeutung der *Death Effector Domain* (DED) des Pea15 für das Bindungsverhalten des Proteins an HKII genauer zu charakterisieren, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe der Mutant Pea15_D74A geschaffen. Dabei handelt es sich um eine an Position 74 der DED des Proteins befindliche Asparaginsäure, welche gegen Alanin mittels ortsgebundener Mutagenese ausgetauscht ist. Hill *et al.*, 2002, konnten zeigen, dass es sich dabei um eine im N-terminalen Abschnitt des Proteins befindliche Bindungsstelle der ERK-Kinase handelt.

Wird diese Bindungsstelle inaktiviert, ist die inhibierende Wirkung von Pea15 auf die nukleäre Akkumulation der Kinase aufgehoben und die ERK-abhängige Transkription proliferativer Gene gesteigert (Formstecher *et al.*, 2001). Überdies kommt es zur bereits angesprochenen ERK vermittelten Regulation des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose (Peacock *et al.*, 2009). Damit spielt sie also eine zentrale Rolle bei der Vermittlung antiapoptotischer Mechanismen.

Geht man nur von den mit der Veränderung dieser Proteinstruktur einhergehenden protektiven Mechanismen des Pea15 aus, so könnte man eine damit verbundene Verstärkung der Bindung zu HKII vermuten. Dennoch ist die Bindungsstelle zwischen den beiden untersuchten Interaktionspartnern völlig unbekannt.

Es wäre demnach auch möglich, dass die Veränderung dieser Struktur die Bindung an HKII verhindert. In den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeichnet sich hinsichtlich dieser Pea15-Mutante eine verstärkte Bindungsaffinität zu HKII ab.

Zur Bestätigung eines signifikanten Unterschiedes zu den Wildtyp-Proteine sind weitere Experimente dieser Art notwendig.

8.2.3. Limitationen der Methodik

Die mittels PLA gewonnenen Ergebnisse zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der Interaktionspartner HKII und Pea15 bei Veränderung funktionell wichtiger Strukturen der Proteine eignen sich für die abschließende Beantwortung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellung nicht. Dies hat mehrere Gründe.

Mit der verwandten Methodik kann lediglich eine Co-Lokalisation der Proteine nachgewiesen werden. Die PLA-Proben sind bei einem Proteinabstand von < 40 nm in der Lage, miteinander zu interagieren, so dass es durchaus denkbar ist, dass es auch bei zufällig nebeneinanderliegenden Proteinen zum Nachweis eines PLA-Signales kommt.

Dennoch lassen sich in Verbindung mit den vorhandenen *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*-(FLIM-)Daten (Mergenthaler *et al.*, 2012) aus Änderungen im PLA-Signal Rückschlüsse auf Veränderungen im Komplex ziehen. Um genauere Aussagen hinsichtlich der Bedeutung der einzelnen Proteinstrukturen auf die Interaktion der Proteine zu treffen, muss die genaue Bindungsstelle zwischen HKII und Pea15 lokalisiert werden.

Durch die Ermittlung zu einer Bindung untereinander prinzipiell geeigneter Strukturen der Proteine könnte über die Veränderung dieser mittels ortsgebundener Mutagenese die genaue Lokalisation detektiert werden. Dafür geeignete Methoden stellen die *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM) und der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) dar. Damit können Proteinabstände von 10 nm erkannt werden (Sun *et al.*, 2012), so dass falsch-positive Ergebnisse hinsichtlich einer Interaktion durch Co-Lokalisation der Proteine ausgeschlossen werden können.

Durch die Verwendung des CAG-Promotors, der eine starke Expression von Genen in verschiedenen Zelltypen ermöglicht (Niwa *et al.*, 1991), sollte ein deutlich über das endogene Maß hinausgehendes Vorkommen der Proteine in den Zellen geschaffen werden.

Mit dieser Vorgehensweise wird aber auch wahrscheinlicher, dass die untersuchten Interaktionspartner zufällig nebeneinander in der Zelle liegen und über das PLA-Signal eine Interaktion anzeigen.

Die Durchführung eines PLA ohne Überexpression der Interaktionspartner könnte die endogene Interaktionshäufigkeit der Proteine aufzeigen. Für die Untersuchung der beschriebenen Mutanten ist eine Transfektion der Zellen unumgänglich. Ziel ist es also, denjenigen Promotor zu finden, der eine möglichst endogene Situation simuliert, um falsch-positive Interaktionen durch die Überexpression der Proteine zu vermeiden. Darüber hinaus sollten Zellen genutzt werden, welche die Proteine stabil exprimieren. Die ermittelten Unterschiede könnten demnach auf der Grundlage verschiedener Transfektionsraten zwischen den verwandten Plasmiden entstanden sein.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich, trotz Verwendung eines CAG-Promotors, insgesamt eher wenig PLA-Signal nachweisen. Grund dafür könnte eine suboptimale Transfektionsrate in den verwendeten HEK-Zellen sein. Eine weitere Verbesserung der Transfektionsbedingungen ist notwendig. Zudem müssen die gezeigten Ergebnisse reproduziert werden. Eine statistische Auswertung ist auf der Grundlage einzelner miteinander verglichener Experimente nicht möglich.

8.3. Antiapoptotische Wirkung der Hexokinase

Den in der vorliegenden Arbeit gemachten Untersuchungen geht die Erkenntnis über die antiapoptotische Wirkung der Hexokinase voraus. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte die HIF-1-induzierte Expression der Hexokinase II in neuronalen Zellen gezeigt werden. Mit Hilfe eines in vitro-Schadensmodells wurde die antiapoptotische Wirkung dieses glykolytischen Enzyms in primären Kortexneuronen der Ratte untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen eindeutig schützenden Effekt der Hexokinase II bei Vorliegen einer kombinierten Sauerstoff- und Glukose-deprivation (OGD, *oxygen and glucose deprivation*) sowie einen isolierten Sauerstoffmangel (OD, *oxygen deprivation*). Dagegen scheint die Hexokinase II keinerlei zellprotektive Wirkung bei Auftreten einer isolierten Glukosedeprievation (GD, *glucose deprivation*) zu vermitteln (Mergenthaler *et al.*, 2012). Diese durch die Hexokinase II vermittelte Protektion wird in einer Vielzahl weiterer Studien postuliert, wobei die genauen durch die Hexokinase II vermittelten intrazellulären Mechanismen dieses antiapoptotischen Effekts nicht vollständig geklärt sind (Sun *et al.*, 2008; Gall *et al.*, 2011).

Immer wieder wird die Rolle der Mitochondrien im Zusammenhang mit dem protektiven Charakter der Hexokinase II herausgestellt.

Man geht bisher von einer Inhibierung der Cytochrom-C-Freisetzung durch die Bindung der Hexokinase II an die Mitochondrienmembran aus. Dabei wird der intrinsische Apoptoseweg blockiert und die mitochondriale Integrität aufrechterhalten (Smeele *et al.*, 2011; Mathupala *et al.*, 2006). Bisher sind weder die ablaufende Signalkaskade hinsichtlich der mitochondrialen Assoziation noch die HKII-vermittelten neuroprotektiven molekularen Mechanismen geklärt. Zudem bleibt unklar, warum es hinsichtlich der isolierten Glukosedepriivation keinerlei HKvermittelte Zellprotektion gibt, bei kombinierter Sauerstoff- und Glukosedepriivation allerdings schon (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die Abhängigkeit der antiapoptotischen Wirkung der Hexokinase von der Verfügbarkeit von Glukose kann somit nicht uneingeschränkt angenommen werden (Sun *et al.*, 2008). Es ist durchaus denkbar, dass die Regulierung der Schadensantwort unter kombinierter Sauerstoff- und Glukosedepriivation einem anderen Mechanismus folgt, als es bei der isolierten Glukosedepriivation der Fall ist.

8.4. Bedeutung der mitochondrialen Lokalisation der Hexokinase

Schon in früheren Arbeiten mit neuronalen Zellen aus Küken zeigte sich eine Translokation der Hexokinase an die Mitochondrien in Folge eines ischämischen Stimulus. Es konnte schon damals ein Zusammenhang zwischen diesem Kompartimentenwechsel und der apoptoseregulierenden Wirkung der Hexokinase hergestellt werden (Knull *et al.*, 1973). Auch aktuelle Arbeiten beschreiben die mitochondriale Assoziation der Hexokinase als Voraussetzung für die Vermittlung antiapoptotischer Effekte (Gall *et al.*, 2011; Majewski *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2008; Pastorino *et al.*, 2002; Kim und Dang 2005). Fest steht, dass die mitochondriale Lokalisationssequenz der Hexokinase II entscheidend für die Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung des Proteins ist (Sun *et al.*, 2008). In einer entsprechenden Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte in einem *in vitro*-Schadensmodell gezeigt werden, dass eine Veränderung der N-terminalen Lokalisationssequenz der Hexokinase einen negativen Einfluss auf die Zelltodprotektion hat (Mergenthaler *et al.*, 2012). Die funktionell wichtige Lokalisationssequenz des HKII-Gens wurde hierfür mittels ortsgebundener Mutagenese verändert.

Die mit diesen HKII-Expressionsvektoren transfizierten primären Kortexneuronen der Ratte waren gegenüber dem hypoxisch bedingten Zelltod schutzlos, so dass eine funktionale N-terminale Lokalisationssequenz für die Vermittlung antiapoptotischer Effekte durch die Hexokinase II nötig ist (Mergenthaler *et al.*, 2012).

In Kardiomyozyten konnte die Inhibierung der *mitochondrial permeability transition pore* Öffnung (mPTP) durch mitochondriale Lokalisation der Hexokinase II gezeigt werden (Gürel *et al.*, 2009; Zuubier *et al.*, 2005). Die mPTP bezeichnet einen dynamischen Multiproteinkomplex bestehend aus dem in der äußeren Mitochondrienmembran liegenden spannungsabhängigem Anionenkanal (VDAC), dem in der inneren Mitochondrienmembran befindlichem Adenin-Nuklotid-Translokator (ANT) und dem Regulatorprotein Cyclophilin D (Sims und Muyderman, 2010; Tsujimoto und Shimizu, 2007). Oxidativer Stress führt unter anderem zur kalzium-getriggerten Formation des Kanals und sorgt durch spezifische Modulation dessen über die Öffnung des Kanals zur Freisetzung von Cytochrom C und damit zum Zelltod (Martinou und Green, 2001; Shoshan-Barmatz und Gincel 2003). Im Umkehrschluss führen demnach Inhibitoren der Öffnung von mPTP zum Erhalt der Zelle. VDAC spielt als Strukturkomponente des mPTP auch als Interaktionspartner apoptoseregulierender Proteine der Bcl-2 Familie sowie der Hexokinase eine zentrale Rolle (Halestrap *et al.*, 2002). Dabei wird ein enger Zusammenhang zwischen der Zelltodregulation durch Modulierung von VDAC und durch mPTP vermutet.

So ist die Bindung des phosphorylierenden Enzyms Hexokinase II an VDAC der äußeren Mitochondrienmembran möglich (Oudard *et al.*, 2004). Der darüber vermittelte antiapoptotische Effekt wurde in einer Vielzahl von Studien bereits sehr früh beschrieben und zum Teil kontrovers diskutiert (Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; Linden *et al.*, 1982; Fiek *et al.*, 1982). Derzeit existieren hinsichtlich der über die HKII-VDAC-Bindung vermittelten Zellprotektion zwei gegensätzliche Hypothesen, wobei es um den apoptoseinhibierenden Öffnungszustand des Kanals geht. Während Robey und Hay 2006 von einem HKII-vermittelten geöffneten Zustand des Kanals ausgehen, beschreiben Azouly-Zohar *et al.* 2004 den geschlossenen VDAC als den anti-apoptotisch wirksamen Öffnungszustand des Kanals.

Dabei rückt ein weiterer möglicher Mechanismus der Vermittlung des antiapoptotischen Effekts in den Mittelpunkt. Durch die Interaktion der HKII mit dem VDAC der Mitochondrienmembran kommt es zu einer Inhibierung der Oligomerisation proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak. Dadurch wird die Freisetzung von Cytochrom C verhindert (Pastorino *et al.*, 2002, Robey und Hay 2006).

Es lässt sich also durchaus eine gemeinsame Bindungsstelle von HKII und den proapoptotischen Proteinen Bax und Bak an der äußeren Mitochondrienmembran vermuten.

Ein anderer, unabhängig von Bax/Bak ablaufender Mechanismus wurde durch Majewski *et al.* 2004 postuliert. Demnach wird die Apoptose über eine erhöhte Verfügbarkeit von zytosolischem ADP reguliert. Durch die an VDAC gebundene Hexokinase kommt es zu einem gesteigerten Wasserstoffionenfluss über den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) und damit zur Anregung des F1F0-ATP-Synthase-Komplexes und zur Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials. Es ist bekannt, dass ANT den Austausch von ADP gegen ATP vermittelt und so die Bereitstellung des Energieträgers im Zytosol sicherstellt. Überdies bildet dieses Protein zusammen mit VDAC die Kontaktstelle zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran und ist in diesem Zusammenhang an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt (Crompton *et al.*, 2002). Die mitochondriale Dissoziation der Hexokinase hat einen zelltodinitiiierenden Effekt und führt zu einer Hyperpolarisation (Majewski *et al.*, 2004) und zur Ruptur der Mitochondrienmembran mit anschließender Ausschüttung proapoptotischer Proteine (Vander Heiden *et al.*, 1999). Über die mitochondriale Assoziation der Hexokinase verbraucht diese das aus der oxidativen Phosphorylierung stammende ATP. Damit wird der ADP/ATP-Austausch zwischen den Kompartimenten, sowie die Membranintegrität sichergestellt (Vander Heiden *et al.*, 1999).

Bei der der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung der Hexokinase II sowie der mitochondrialen Assoziation des Enzyms handelt es sich um einen bisher unverstandenen komplexen Mechanismus. Dennoch konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass die mitochondriale Assoziation des Proteins in verschiedenen Zellen eine zentrale Rolle spielt (Pastorino *et al.*, 2002; Bryson *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008; Mergenthaler *et al.*, 2012). Diese Aussage wird durch die Kenntnis über die von der HK-VDAC-Bindung abhängige Resistenz von Tumorzellen gegenüber zelltodinitiiierenden Stimuli gestützt. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen VDAC und der Hexokinase in malignen Zellen zu deren Überlebensvorteil führt. Zum einen kam es dadurch zum Erhalt der Integrität der Mitochondrienmembran und zum anderen zu einem gesteigerten Metabolismus durch Glykolyse (Galluzzi *et al.*, 2008; Mathupala *et al.*, 2009). Im Laufe der Zeit konnten eine ganze Reihe die Bindung der Interaktionspartner VDAC und HK modulierende Faktoren detektiert werden. Die Glucose-6-Phosphat-Konzentration stellt das Reaktionsprodukt der Hexokinase dar und bewirkt bei erhöhtem Vorkommen eine Dissoziation dieser von den Mitochondrien (Wilson, 1995).

Daneben wird die Bindung des Enzyms an den Anionenkanal über Proteinkinasen reguliert.

Pastorino *et al.*, 2005, konnte herausstellen, dass der Phosphorylierungszustand des VDAC einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Hexokinase hat. Wird der Kanal durch die Glykogensynthase-Kinase 3 Beta (GSK3 β) phosphoryliert, so ist die Bindung der Hexokinase nicht möglich. Unterbleibt diese Phosphorylierung des Kanals durch Inhibierung der GSK3 β durch die Akt-Kinase (Murphy, 2004), so können die apoptoseinhibierenden Effekte der Hexokinase über die Bindung an VDAC vermittelt werden. Neben dieser eher indirekten Beeinflussung, führt die Aktivierung der Akt-Kinase über eine direkte Phosphorylierung der Hexokinase zur Bindung derer an VDAC und die Vermittlung zelltodprotektiver Prozesse. In der Aminosäuresequenz der Hexokinase II befindet sich ein für die Phosphorylierung durch die Akt-Kinase spezifischer Abschnitt (Miyamoto *et al.*, 2008).

Weder über die Methodik der Co-IP noch über den PLA kann die Lokalisation der interagierenden Proteine detektiert werden. Durch Veränderungen in der Bindungsaffinität der Proteine bei Veränderung funktioneller und struktureller Domänen der Proteine lassen sich jedoch entsprechende Rückschlüsse ziehen.

8.5. Interaktion der Hexokinase mit mitochondrialen Proteinen

Es besteht die Annahme, dass der gewebeschützende Effekt nicht nur durch die Interaktion der Hexokinase II mit VDAC vermittelt wird. Vielmehr kommt es zu einer Wechselwirkung mit weiteren Interaktionspartnern des Enzyms. Diese mitochondrialen Proteine fungieren in einem Multiproteinkomplex mit der Hexokinase II (Aflalo und Azoulay, 1998; Pastorino und Hoek, 2008).

Die Interaktion zwischen Hexokinase II und Pea15 konnte durch Mergenthaler *et al.*, 2012 etabliert werden. Die weiterführende Charakterisierung kann weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel der Proteine zum Schutz von Hirngewebe im Falle eines Schlaganfalls hervorbringen. Über das Verständnis der ablaufenden Pathomechanismen ist es möglich die Entwicklung protektiver Therapien zu begünstigen.

8.6. Ausblick

Hinsichtlich der hohen Morbidität und Mortalität der Schlaganfall-Patienten wurde schon früh versucht, vorhandene endogene zelluläre Schutzmechanismen zu verstehen und für die Protektion von Hirngewebe zu nutzen. Ziel ist es, das Ausmaß der Substratminderversorgung des Gehirns möglichst gering zu halten. In Anlehnung an die postulierte Tatsache, dass eine kurzzeitige ischämische Attacke des Gehirns vor Ablauf eines Hirninfarktes das Gewebe vor größerem Gewebsuntergang bewahren kann, konnte das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung bereits sehr früh gezeigt werden (Janoff, 1964). Weih *et al.*, 1999 zeigte in einer klinischen Studie, dass Patienten mit einer anamnestisch nachvollzogenen transienten ischämischen Attacke (TIA) bei Auftreten eines ischämischen Insults im identischen vaskulären Versorgungsgebiet ein besseres klinisches Outcome hinsichtlich der Schwere neurologischer Defizite und Genesung aufzeigten als die Patienten in der Vergleichsgruppe ohne vorangegangene TIA. Dabei versteht man unter einer TIA im klinischen Sprachgebrauch eine Durchblutungsstörung des Gehirns ohne die Entstehung eines strukturellen Schadens des Gewebes. Die dabei auftretende neurologische Symptomatik ist innerhalb von 24 Stunden komplett reversibel. Über die Auslösung endogener protektiver Signalkaskaden sorgt dies für einen Überlebensvorteil der Zellen bei Auftreten eines nachfolgenden ischämischen Schlaganfalls (Wegener *et al.*, 2004).

Diese ischämische Toleranz des Hirngewebes, welche als Folge der ischämischen Präkonditionierung gilt, lässt sich in zwei Phasen unterteilen: In eine schnelle Phase, in welcher der Auslöser innerhalb von Minuten eine Schutzfunktion hervorruft (Perez-Pinzon *et al.*, 1997), und eine verzögerte Phase, bei der sich protektive Mechanismen durch die Induktion einer De-novo-Synthese von Proteinen über mehrere Stunden bis Tage entwickeln (Kitagawa *et al.*, 1990). Der Schutz des Hirngewebes beruht dabei auf einem Zusammenspiel verschiedenster Signalkaskaden. Über die Aktivierung sauerstoffsensitiver Enzyme kommt es beispielsweise im Falle einer Hypoxie zu einer Transkription einer ganzen Reihe von Genen. Dies führt zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes. Dabei konnte in einer Vielzahl von Studien die Schlüsselrolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 gezeigt werden (Ruscher *et al.*, 2002; Prass *et al.*, 2002). Zum einen sorgt er für die Umstellung der Energiegewinnung der Zelle unter hypoxischen Bedingungen. Zum anderen kontrolliert er die Expression des für die Initiation der Glykolyse verantwortlichen Enzyms, die Hexokinase (Semenza, 2004, Bernaudin *et al.*, 2002).

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass es sich bei der Apoptoseregulation durch die Hexokinase um einen komplexen Mechanismus handelt. Neben der weiteren Charakterisierung der Interaktion des glykolytischen Proteins mit Pea15 könnten Untersuchungen hinsichtlich weiterer HKII-Bindungspartner Aufschlüsse über die molekularen Mechanismen der zellschützenden Funktion liefern. Über die gewonnenen Erkenntnisse wäre die Entwicklung neuer Therapiestrategien möglich. Ziel ist es, das Outcome der Schlaganfallpatienten deutlich zu verbessern und die damit verbundenen Rehabilitationskosten zu senken.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Grundlage der bereits bekannten Interaktion von Hexokinase II und dem Pea15-Protein sollte die Co-Immunpräzipitation mit GFP- und RFP-Trap zur Analyse der Interaktion von HKII mit Pea15 Mutanten etabliert werden. Durch experimentelle Testung angemessener Umgebungsbedingungen für die angewandte Methodik sollten die Grundvoraussetzungen für ein Immunpräzipitation-basiertes Screening von HKII- und Pea15-Mutanten geschaffen werden.

Neben der katalytischen Aktivität der Hexokinase II innerhalb des Glukosestoffwechsels wird diesem glykolytischen Isoenzym eine zentrale Stellung hinsichtlich der Apoptoseregulation zugeschrieben. Zur Bestätigung der Interaktion zwischen HKII und Pea15 wurden die Proteine zunächst in Zellen humaner Epithelzellen eines Zervixkarzinoms überexprimiert. Hierzu diente ein innerhalb der Arbeitsgruppe etablierter und auf Elektroporation (Nucleofection™) basierender Kotransfektionsansatz. Es bestand die Notwendigkeit der Testung der für diese verwandte Zelllinie optimalen Transfektionsbedingungen. Über die Kopplung der transfizierten *genes of interest* an Fluoreszenzproteine war es möglich, über den *Pulldown* dieser mittels GFP- beziehungsweise RFP-Trap die zu untersuchenden Interaktionspartner im Western Blot darzustellen. Der Nachweis einer Interaktion von HKII und Pea15 unter Anwendung der RFP-Trap gelang in der vorliegenden Arbeit.

Als Alternativmethodik zur GFP- beziehungsweise RFP-Trap sollte das PLA-Assay-basierte Screening von HKII- und Pea15-Mutanten etabliert werden. Hierfür wurden in funktionell und strukturell wichtigen HKII- und Pea15-Domänen punktmutierte Proteine in humanen embryonalen Nierenzellen überexprimiert. Anschließend wurden diese Zellen dem PLA-Assay unterzogen. Über die mittels Fluoreszenzmikroskop und Blobfinder-Software messbaren Interaktionshäufigkeiten der Proteine in den Zellen war ein Vergleich zwischen den untersuchten Mutanten und den Wildtyp-Proteinen möglich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen punktmutierten und Wildtyp-Proteinen. Dennoch ist ein Einfluss strukturell und funktionell wichtiger HKII- und Pea15-Domänen auf die Interaktion der beiden Proteine denkbar. Dies wird durch innerhalb der Arbeitsgruppe gewonnene Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung funktionell wichtiger Strukturen der HKII für die antiapoptotische Wirkung bestärkt.

Über die verbesserte Kenntnis molekularer Mechanismen innerhalb der Apoptoseregulation ist es möglich, neue Wirkstoffe für die Therapie verschiedenster durch Gewebsuntergang gekennzeichneter Erkrankungen zu generieren.

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Aflalo, C. & Azoulay, H. Binding of rat brain hexokinase to recombinant yeast mitochondria: effect of environmental factors and the source of porin. *J Bioenerg Biomembr* **1998**; 30: 245–255.
- Allalou, A. & Wählby, C. BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Comput. Methods Programs Biomed* **2009**; 94: 58–65.
- Antonsson, B. & Martinou, J. MINIREVIEW The Bcl-2 Protein Family. *Exp Cell Res* **2000**; 57: 50–57.
- Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S. & Shoshan-Barmatz, V. In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondriamediated apoptotic cell death. *Biochem J* **2004**; 355: 347–355.
- Bernaudin, M., Tang, Y., Reilly, M., Petit, E. & Sharp, F. R. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* **2002**; 277: 39728–39738.
- Berra, E., Benizri, E., Volmat, Â. & Ginouve, A. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 alpha in normoxia. *EMBO J* **2003**; 22: 4082–4090.
- Böck, B. C. The PEA-15 protein regulates autophagy via activation of JNK. *J Biol Chem* **2010**; 285: 21644–21654.
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **2009**; 40: e331–339.
- Bryson, J. M., Coy, P. E., Gottlob, K., Hay, N. & Robey, R. B. Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death. *J Biol Chem* **2002**; 277: 11392–11400.
- Chipuk, J. E. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* **2006**; 13: 1396–1402.
- Chromotek – GFP-Trap®. Product Brochure, **2013**.
- Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* **1999**; 12: 1035–1040.
- Crompton, M., Barksby, E., Johnson, N. & Capano, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **2002**; 84: 143–152.

- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points Review. *Cell* **2004**; 116: 205–219.
- Danial, N. N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* **2007**; 13: 7254–7263.
- del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J. M., Iadecola, C., Wang, X. & Feuerstein, G.Z. Inflammation and stroke: Putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathology* **2000**; 10: 95–112.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **1999**; 22: 391–397.
- Dirnagl, U., Simon, R. P. & Hallenbeck, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* **2003**; 26, 248–254.
- Dirnagl, U., Becker, K. & Meisel, A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* **2009**; 8: 398–412.
- D'Orsi, B., Kilbride, S. M., Chen, G., Perez Alvarez, S., Bonner, H. P., Pfeiffer, S., Plesnila, N., Engel, T., Henshall, D. C., Düssmann, H. & Prehn, J. H. M.Bax regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurosci* **2015**; 35: 1706–1722.
- Doyle, K. P., Simon, R. P. & Stenzel-poore, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **2008**; 55: 310–318.
- Edvinsson, L. & Krause, D. N. (eds.). Cerebral blood flow and metabolism. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, **2002**, 43–67.
- Estellés, A., Yokoyama, M., Nothias, F., Vincenti, J. D., Glowinski, J., Vernieri, P. & Chneiweiss, H. The Major Astrocytic Phosphoprotein PEA-15 Is Encoded by Two mRNAs Conserved on Their Full Length in Mouse and Human. *J Biol Chem* **1996**; 271: 14800–14806.
- Estellés, A., Charlton, C. A. & Blau, H. M. The phosphoprotein protein PEA-15 inhibits Fas- but increases TNF-R1-mediated caspase-8 activity and apoptosis. *Dev Biol* **1999**; 216: 16–28.
- Felgner, P. L., Messer, J. L. & Wilson, J. E. Purification of a hexokinase-binding protein from the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **1979**; 254: 4946–4949.
- Fiek, C., Benz, R., Roos, N. & Brdiczka, D. Evidence for identity between the hexokinasebinding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1982**; 688: 429–440.
- 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: 592–601.

- Fitzsimons, H. L., Bland, R. J. & During, M. J. Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* **2002**; 28: 227–236.
- Formstecher, E., Ramos, J. W., Fauquet, M., Calderwood, D. A., Hsieh, J. C., Canton, B., Nguyen, X. T., Barnier, J. V., Camonis, J., Ginsberg, M. H. & Chneiweiss, H. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* **2001**; 1: 239–250.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. & Gonzalez-Baron, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **2004**; 30: 193–204.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L. & Dang, C. V. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* **2007**; 4: 111–122.
- Gall, J. M., Wong, V., Pimental, D., Havasi, A., Wang, Z., Pastorino, J. G., Bonegio, R., Schwartz, J. H. & Borkan, S. C. Hexokinase regulates Bax-mediated mitochondrial membrane injury following ischemic stress. *Kidney Int* **2011**; 79: 1207–1216.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Tajeddine, N. & Kroemer, G. Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene* **2008**; 27: 4633–4635.
- González, R. G. Imaging-Guided Acute Ischemic Stroke Therapy: From “Time Is Brain” to “Physiology Is Brain”. *AJNR Am J Neuroradiol* **2006**; 27: 728–735.
- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, B. & 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: 1406–1418.
- Gürel, E., Smeele, K. M., Eerbeek, O., Koeman, A., Demirci, C., Hollmann, M. W. & Zuurbier, C. J. Ischemic preconditioning affects hexokinase activity and HKII in different subcellular compartments throughout cardiac ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* **2009**; 106: 1909–1916.
- Halestrap, A. P., McStay, G. P. & Clarke, S. J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **2002**; 84: 153–166.
- Hao, C., Beguinot, F., Condorelli, G., Trencia, A., van Meir, E. G., Yong, V. W., Parney, I. F., Roa, W. H. & Petruk, K. C. Induction and Intracellular Regulation of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Mediated Apoptosis in Human Malignant Glioma Cells. *Cancer Res* **2001**; 61: 1162–1170.
- Hill, J. M., Vaidyanathan, H., Ramos, J. W., Ginsberg, M. H. & Werner, M. H. Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *EMBO J* **2002**; 21: 6494–6504.

- Iadecola C. & Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci* **2011**; 14: 1363–1368.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y. & Semenza, G. L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* **1998**; 12: 149–162.
- Janoff, A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock: effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesth Clin* **1964**; 2: 251–269.
- Jelkmann, W. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother* **2013**; 40: 302–309.
- Kandasamy, K. & Srivastava, R. K. Role of the Phosphatidylinositol 3' -Kinase / PTEN / Akt Kinase Pathway in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* **2002**; 62: 4929–4937.
- Kawabata, I., Umeda, T. & Kazuhiro, Y. Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. *Neuroreport* **2004**; 15: 971–975.
- Kim, J.-W. & Dang, C. V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* **2005**; 30: 142–150.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Kimura, K., Mikoshiba, K. & Kamada, T. 'Ischemictolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* **1990**; 528: 21–24.
- Knull, H. R., Taylor, W. F. & Wells, W. W. Effects of Energy Metabolism on in Vivo Distribution of Hexokinase in Brain Effects of Energy Metabolism on in Viva Distribution of Hexokinase in Brain. *J Biol Chem* **1973**; 248: 5414–5417.
- Kolominsky - Rabas, P. L., Heuschmann, P. U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundörfer, B., Schöffski, O. & Krobot, K. J. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* **2006**; 37:1179–1183.
- Linden, M., Gellerfors, P. & Nelson, B.D. Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. *FEBS Lett* **1982**; 141: 189–192.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P. E., Skeen, J. E., Gottlob, K., Chandel, N. S., Thompson, C. B., Robey, R. B. & Hay, N. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **2004**; 16: 819–830.

- Martinou, J. & Green, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**; 2: 63–67.
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **2006**; 25: 4777–4786.
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. 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.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol* **1999**; 17: 969–973.
- Mergenthaler, P. Hexokinase II-vermittelte Hypoxietoleranz und endogene Neuroprotektion. Klinik für Neurologie, Berlin – Charité Universitätsmedizin Berlin, **2011**.
- Mergenthaler, P., Kahl, A., Kamitz, A., van Laake, V., Stohlmann, K., Thomsen, S., Klawitter, H., Przesdzing, I., Neeb, L., Freyer, D., Priller, J., Collins, T. J., Megow, D., Dirnagl, U., Andrews, D. W. & Meisel, A. Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA15) form a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**; 109: 1518–1523.
- Miyamoto, S., Murphy, A. N. & Brown, J. H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* **2008**; 15: 521–529.
- Mülhardt, C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics: 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.
- Murphy, E. Inhibit GSK-3 β or there's heartbreak dead ahead. *J Clin Invest* **2004**; 113: 1526–1528.
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **1991**; 108: 193–199.
- Oudard, S., Miccoli, L., Beurdeley-Thomas, A. & Dutrillaux, B. Homophilic anchorage of brainhexokinase to mitochondria-porins revealed by specific-peptide antibody cross recognition. *Bull Cancer* **2004**; 91: 1–15.
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **2006**; 3: 187–197.
- Pastorino, J. G., Shulga, N. & Hoek, J. B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **2002**; 277: 7610–7618.

- Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Cur Med Chem* **2003**;10: 1535–1551.
- Pastorino, J. G. & Hoek, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* **2008**; 40: 171–182.
- Peacock, J. W., Palmer, J., Fink, D., Ip, S., Pietras, E. M., Mui, A. L.-F., Chung, S. W., Gleave, M. E., Cox, M. E., Parsons, R., Peter, M. E. & Ong, C. J. PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15. *Mol Cell Biol* **2009**; 29: 1222–1234.
- Pérez-Pinzón, M. A., Xu, G. P., Dietrich, W. D., Rosenthal, M. & Sick, T. J. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **1997**; 17: 175–182.
- Prass, K., Ruscher, K., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Priller, J., Scharff, A., Dirnagl, U. & Meisel, A. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**; 22: 520–525.
- Prass, K., Scharff, A., Ruscher, K., Löwl, D., Muselmann, C., Victorov, I., Kapinya, K., Dirnagl, U. & Meisel, A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* **2003**; 34: 1981–1986.
- Renault, F., Formstecher, E., Callebaut, I., Junier, M.-P. & Chneiweiss, H. The multifunctional protein PEA-15 is involved in the control of apoptosis and cell cycle in astrocytes. *Biochem Pharmacol* **2003**; 66: 1581–1588.
- Renganathan, H., Vaidyanathan, H., Knapinska, A. & Ramos, J. W. Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* **2005**; 735: 729–735.
- Robey, R. B. & Hay, N. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria. *Cell Cycle* **2005**; 4: 654–658.
- Robey, R. B. & Hay, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **2006**; 25: 4683–4696.
- Rocha, S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* **2007**; 32: 389–397.
- Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B., Priller, J., Dirnagl, U. & Meisel, A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* **2002**; 22: 10291–10301.

- Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3rd edn Cold Spring Harbor, USA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **2001**.
- Sausville, E. A. & Longo, D. L. Grundlagen der Malignombehandlung: Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie und biologische Therapien. 737–760. Aus: *Harrisons Innere Medizin*, 18. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag GmbH, **2012**.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. - M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **1998**; 17: 1675–1687.
- Semenza, G. L. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing Control of Oxygen-Regulated Gene. *Physiology (Bethesda)* **2004**; 19: 176–182.
- Semenza, G. L. Life with Oxygen. *Science* **2007**; 318: 62–64.
- Semenza, G. L. REVIEWS Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* **2009a**; 24: 97–106.
- Semenza, G. L. Regulation of Vascularization by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Ann N Y Acad Sci* **2009b**; 1177: 2–8.
- Sharp, F. R. & Bernaudin, M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* **2004**; 5: 437–448.
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **1999**; 66: 1–5.
- Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2000**; 97: 577–582.
- Shoshan-Barmatz, V. & Gincel, D. The Voltage-Dependent Anion Channel. *Cell Biochem Biophys* **2003**; 39: 279–292. Sigma Aldrich. Duolink® In Situ – Fluorescence. User Guide, **2013**.
- Sims, N. R. & Muyderman, H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta* **2010**; 1802: 80–91.
- Smeele, K. M. A., Southworth, R., Wu, R., Xie, C., Nederlof, R., Warley, A., Nelson, J. K., van Horsen, P., van den Wijngaard, J. P., Heikkinen, S., Laakso, M., Koeman, A., Siebes, M., Eerbeek, O., Akar, F. G., Ardehali, H., Hollmann, M. W. & Zuurbier C. J. Disruption of hexokinase II-mitochondrial binding blocks ischemic preconditioning and causes rapid cardiac necrosis. *Circ Res* **2011**; 108: 1165–1169.

- Statistisches-Bundesamt (Wiesbaden). Todesursachen in Deutschland 2012, **2013**.
- Sun, L., Shukair, S., Naik, T. J., Moazed, F. & Ardehali, H. Glucose Phosphorylation and Mitochondrial Binding Are Required for the Protective Effects of Hexokinases I and II. *Mol Cell Biol* **2008**; 28: 1007–1017.
- Sun, Y., Hays, N. M., Periasamy, A., Davidson, M. W. & Day, R. N. Monitoring Protein Interactions in Living Cells with Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Imaging Spectrosc Anal Living Cells Opt Spectrosc Tech* **2012**; 504: 371–391(Elsevier Inc.).
- Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**; 5.
- Tang, Y., Pacary, E., Fréret, T., Divoux, D., Petit, E., Schumann-Bard, P. & Bernaudin, M. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol Dis* **2006**; 21:18–28.
- Thaminy, S., Miller, J. & Stagljar I. The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* **2004**; 261: 297–312.
- Trencia, A., Perfetti, A., Cassese, A., Vigliotta, G., Miele, C., Oriente, F., Santopietro, S., Giacco, F., Condorelli, G., Formisano, P. & Beguinot, F. Protein Kinase B/Akt Binds and Phosphorylates PED/PEA-15, Stabilizing Its Antiapoptotic Action. *Mol Cell Biol* **2003**; 23: 4511–4521.
- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H. & Lamond, A. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* **2008**; 183: 223–239.
- Tsai, H. J. & Wilson, J. E. Functional organization of mammalian hexokinases: both N- and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites. *Arch Biochem Biophys* **1996**; 329: 17–23.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* **2007**; 12: 835–840.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. & Thompson, C. B. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* **1999**; 3: 159–167.
- Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **1927**; 8: 519–530.
- Warlow, C., Sudlow, C., Dennis, M., Wardlaw, J. & Sandercock, P. Stroke. *Lancet* **2003**; 362: 1211–1224.

- Wegener, S., Gottschalk, B., Jovanovic, V., Knab, R., Fiebach, J. B., Schellinger, P. D., Kucinski, T., Jungehülsing, G. J., Brunecker, P., Müller, B., Banasik, A., Amberger, N., Wernecke, K. D., Siebler, M., Röther, J., Villringer, A. & Weih, M. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* **2004**; 35: 616–621.
- Weih, M., Kallenberg, K., Bergk, A., Dirnagl, U., Harms, L., Wernecke, K. D. & Einhäupl, K. M. Attenuated Stroke Severity After Prodromal TIA: A Role for Ischemic Tolerance in the Brain? *Stroke* **1999**; 30: 1851–1854.
- Wilson, J. E. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **1995**; 126: 65–198.
- Wilson, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **2003**; 206: 2049–2057.
- World Health Organization. Neurological disorders: Public health challenges **2006**; Chapter 3: S. 151–163..
- Xu, Z. –L., Mizuguchia, H., Ishii-Watabea, A., Uchidaa, E., Mayumib, T. & Hayakawaa, T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* **2001**; 272: 149–156.
- Zuurbier, C. J., Eerbeek, O. & Meijer, A. J. Ischemic preconditioning, insulin, and morphine all cause hexokinase redistribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**; 289: 496–499.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Rebecca Bärwald, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der neuroprotektiven Hexokinase II-Pea15 Protein-Protein Interaktion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

(Rebecca Bärwald)

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Rebecca Bärwald hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Konferenzbeitrag 1:

Rebecca Bärwald, Claudia Muselmann, Andreas Meisel und Philipp Mergenthaler:

Characterization of a Hexokinase II-centered multiprotein complex mediating neuroprotection
Berlin Neuroscience Forum BNF 2010 vom 10.06. bis 11.06.2010 in Liebenwalde Posterpräsentation am 10.06.2010

Beitrag im Einzelnen:

Erstellung und Präsentation des Posters, Durchführung des gezeigten IP- Experimentes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Konferenzbeitrag 1:

Rebecca Bärwald, Claudia Muselmann, Andreas Meisel und Philipp Mergenthaler:

Characterization of a Hexokinase II-centered multiprotein complex mediating neuroprotection
Berlin Neuroscience Forum BNF 2010 vom 10.06 bis 11.06.2010 in Liebenwalde
Posterpräsentation am 10.06.2010

DANKSAGUNG

Insbesondere danke ich Herrn Dr. med. Philipp Mergenthaler für die Überlassung des Themas und die geduldige und kompetente Betreuung der Arbeit. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen, nachhaltigen Diskussionen und kritischen sowie konstruktiven Anmerkungen bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Meisel für die Gewährung des wissenschaftlichen Freiraumes innerhalb seiner Arbeitsgruppe.

Für die kompetente und freundliche Einführung in die Arbeitsmethoden der Zellkultur möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda recht herzlich bedanken.

Bei Frau Katharina Stohlmann möchte ich mich für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und die stets gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ebenso danke ich Frau Kristin Wendland für ihre Geduld und Hilfe bei experimentellen Problemen und ihren unterstützenden Beistand.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der experimentellen Neurologie, insbesondere meiner Arbeitsgruppe, für die warmherzige Aufnahme und die stets kollegiale Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank auch für die freundlichen und humorvollen Gespräche.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit möchte ich mich bei Frau Dr. med. Janine Grüning bedanken.

Frau Carolin Gaube danke ich für die geduldige Hilfe beim Layout der Arbeit. Vielen Dank für deine Freundschaft.

Außerdem möchte ich ganz herzlich Frau Cornelia Goldstein und Frau Alma Hartung für ihre Hilfen und Anmerkungen danken.

Meinem Ehemann Herrn Dennis Bärwald danke ich für die immer fortwährende Unterstützung und Ermutigungen für das Erreichen meiner Ziele.

Schließlich danke ich meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern für das Interesse an meiner Arbeit und ihre Liebe und Geduld. Danke, dass ihr immer für mich da seid.