

**Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Expression und Funktion der Paraoxonase-2 im Hinblick auf oxidativen
Stress im Gefäßsystem**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Vorgelegt von
Ernst Andreas Maximilian Krüger
aus Mainz**

Mainz, 2009

Tag der Promotion: 14.12.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Die medizinische Relevanz der Atherosklerose	1
1.2	Zielsetzung.....	1
2	Literaturdiskussion	3
2.1	Oxidativer Stress: Eine Ursache der Atherosklerose	3
2.2	Die Initiierung der Atherosklerose	4
2.3	ER-Stress und UPR-Signalweg	4
2.4	Die Familie der Paraoxonasen	8
2.4.1	Paraoxonase 1	8
2.4.2	Paraoxonase 2	8
2.4.3	Paraoxonase 3	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Materialien	10
3.1.1	Chemikalien.....	10
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	11
3.1.3	Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	11
3.2	Enzyme, Standards, Antikörper und radioaktive Stoffe	12
3.3	Plasmide.....	13
3.4	Bakterienstämme, Zell-Linien und Medien	14
3.5	Oligonukleotide	15
3.6	Puffer, Medien, Reagenzien und Lösungen.....	15
3.7	Geräte.....	17
3.7.1	Herstellernachweis.....	18
3.8	Allgemeine proteinbiochemische Arbeiten	19
3.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	19
3.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
3.8.3	Western blot - Immunbiologischer Nachweis von Proteinen.....	20
3.8.4	Stripping von Western blot-Membranen	21
3.9	Klonierung, Extraktion und Analytik von DNA/RNA	22
3.9.1	Klonierung eines PON2-Promoter-Fragments in das Reporter-gen-Plasmid pGL4	22
3.9.2	Plasmid DNA Präparationen	24
3.9.3	Elektrophorese von DNA in mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen	25

3.9.4	DNA-Fällung	26
3.9.5	DNA-Sequenzierung	27
3.9.6	Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen	27
3.9.7	Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR.....	27
3.9.8	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	28
3.10	Allgemeine Arbeiten mit prokaryotischen Zellen.....	28
3.10.1	Herstellung kompetenter Zellen	28
3.10.2	Transformation von Plasmiden in prokaryotische Zellen.....	28
3.11	Allgemeine Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	29
3.11.1	Kultivierung und Zellzählung eukaryotischer Zellen.....	29
3.11.2	DNA-Transfektion eukaryotischer Zellen.....	30
3.11.3	Behandlung eukaryotischer Zellen mit RNAi	30
3.11.4	Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbungen eukaryotischer Zellen	31
3.11.5	Herstellung von Gesamt-Protein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen	33
3.11.6	Inkubation eukaryotischer Zellen mit TGF- β	33
3.12	Spezielle proteinbiochemische Methoden.....	34
3.12.1	Behandlung von EA.hy 926-Zellen mit Proteinase K.....	34
3.13	Spezielle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	35
3.13.1	Messung intrazellulärer ROS-Spiegel in EA.hy 926-Zellen	35
3.13.2	PON2-Promoter Dual-Luciferase Reporter Assay	36
3.14	Durchführung statistischer Analysen	37
4	<u>Ergebnisse</u>	<u>38</u>
4.1	Lokalisation von PON2-iso1	38
4.1.1	Die subzelluläre Lokalisation von PON2 mittels direkter Fluoreszenz.....	38
4.1.2	Die subzelluläre Lokalisation von PON2 mittels biochemischer Methoden.....	41
4.2	Messung intrazellulärer ROS-Spiegel	42
4.2.1	Die Reduktion intrazellulärer ROS durch PON2 in endothelialen EA.hy 926-Zellen	43
4.2.2	Die Reduktion intrazellulärer ROS durch PON2 in primären, glatten Muskelzellen.....	44

4.2.3	PON2 schützt endotheliale EA.hy 926-Zellen vor ER-Stress begleitendem oxidativen Stress	47
4.2.4	PON2 schützt primäre, glatte Muskelzellen (SMCs) vor TGF- β1/Nox-4 generierter ROS-Produktion.....	48
4.3	Die ER-Stress induzierte Expression von PON2.....	51
4.3.2	Nachweis der PON2-Proteinexpression nach Aktivierung des UPR-Signalwegs.....	56
5	<u>Diskussion.....</u>	59
5.1	Subzelluläre Lokalisation von PON2	59
5.1.1	Beurteilung eigener Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studien	59
5.1.2	Interpretation der Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation	60
5.2	Potentielle physiologische Funktionen von PON2	61
5.2.1	Schutz vor oxidativem Stress	61
5.2.2	Interpretation der anti-oxidativen Funktion von PON2.....	62
5.2.3	Die potentielle Rolle von PON2 während ER-Stress und UPR .	63
5.2.4	Potentielle Funktionen von PON2 in weiteren Organellen	64
5.3	PON2 und Krebs	65
5.4	PON2- Neuer Gegenspieler der Atherosklerose?	66
6	<u>Zusammenfassung / Summary</u>	68
6.1	Zusammenfassung	68
6.2	Summary	69
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	70
	<u>Danksagung.....</u>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	<u>Lebenslauf</u>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Teile dieser Dissertationsarbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

- Horke S, , Witte I, Wilgenbus P, **Krueger M**, Strand D, Forstermann U Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007;115(15):2055-2064
- Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, **Krueger M**, Li H, et al., Protective effect of paraoxonase-2 against ER stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium-homeostasis. *Biochem J*. 2008;416(3):395-405

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.elegans	Caenorhabditis elegans
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	engl.: <i>double stranded ribonucleic acid</i>
DTT	Dithiotreitol
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERSEs / UPREs	engl.: <i>ER stress elements / unfolded protein response elements</i>
E. coli	Escherichia coli
et al.	lat.: <i>et alii</i>
etc.	lat.: <i>et cetera</i>
Firefly	engl.: Glühwürmchen
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GRP 78	engl.: <i>glucose regulated protein of 78 kD</i>
h	engl.: <i>hour(s)</i>
HDL-Partikel	engl.: <i>high density lipoprotein</i>
kDA	kilo Dalton
lat.	lateinisch
LDL-Partikel	engl.: <i>low density lipoprotein</i>
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
o.g.	oben genannt
(qRT-)-PCR	engl.: <i>(quantitative real time -)polymerase chain reaction</i>
RNS	engl.: <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i>
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>

RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
siRNA	engl.: <i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMC	engl.: <i>smooth muscle cells</i>
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
u.a.	unter anderem
UPR	engl.: <i>unfolded protein response</i>
5'UTR	engl.: <i>5' untranslated region</i>
uvm.	und viele(s) mehr

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Die medizinische Relevanz der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie das akute Koronarsyndrom und die durch einen Schlaganfall bedingte cerebrale Ischämie, machen mit einem Anteil von über 50% den Großteil der in der westlichen Welt bestehenden Morbidität und Mortalität aus. Bei Patienten mit oben genannten Erkrankungen lassen sich fast immer atherosklerotisch veränderte Gefäße nachweisen. Somit führt letztendlich Atherosklerose die Liste der Todesursachen in den westlichen Gesellschaften an. Die chronisch-entzündliche, progredient verlaufende Krankheit zeichnet sich durch endotheliale Dysfunktion, subendotheliale Lipid-Akkumulation und der Ausbildung komplexer atheromatöser Läsionen in der Gefäßstrombahn aus. Die Verlegung atherosklerotisch veränderter Gefäße durch eine atherosklerotische Läsion bedingt folglich einen verminderten Blutfluss. Die Einengung des Gefäßlumens lässt sich entweder auf eine Vergrößerung atherosklerotischer Plaques oder auf ein thrombembolisches Geschehen nach Ruptur einer solchen Plaque (Plaqueruptur) zurückführen. Myokardinfarkt und Schlaganfall stellen somit die klinischen Korrelate der Minderperfusion von Herz und Gehirn dar. Beide Krankheitsbilder nehmen ihren festen Platz im medizinischen Alltag ein und sind somit von immenser klinischer Relevanz.

1.2 Zielsetzung

Mittels proteinbiochemischer Methoden und in vitro Experimenten in der Zellkultur soll die Expression und subzelluläre Lokalisation von PON2 untersucht werden. Bisher durchgeführte Experimente zur Lokalisation von PON2 in Zelllinien des Darmepithels (Caco2 Zellen) und Cervixkarzinoms (HeLa) ergaben eine Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran (2, 3). In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob PON2 in Zellen des vaskulären Systems (Endothelzellen und glatten Muskelzellen) ebenfalls mit der Plasmamembran assoziiert ist oder in einer anderen Organelle nachgewiesen werden kann. Dies könnte Rückschlüsse auf potentielle Funktionen von PON2 in unterschiedlichen Zelltypen und/oder Organellen geben und ist zudem von Interesse, da die subzelluläre Lokalisation eines Proteins seine generelle Funktion bestimmt.

Da reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose spielen und auch in anderen Geweben für Störungen der Zellhomöostase verantwortlich gemacht werden können, gilt es zu ergründen, ob PON2 in der Lage ist oxidativen Stress zu reduzieren und somit der Apoptose von Zellen des Gefäßsystems entgegen zu wirken. Vor diesem Hintergrund und da sich im Laufe der Arbeit zeigte, dass PON2 in vaskulären Zellen im ER lokalisiert ist, gilt es ebenfalls zu prüfen, ob durch PON2 ER Stress reduziert werden kann. ER Stress kann in einen als UPR (*unfolded protein response*) bekannten Signalweg münden, welcher seinerseits die Apoptose einleiten kann. Da der UPR-Signalweg vom ER seinen Ausgang nimmt und neben anderen Erkrankungen auch in der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist, soll untersucht werden, inwieweit PON2 in diese Signalkaskade involviert ist.

Aufgrund der potentiellen Bedeutung eines antioxidativen Faktors wie PON2 im Gefäßsystem oder anderen Gewebearten sollen erste Einblicke in die Regulation der Expression von PON2 gewonnen werden. Zu diesem Zweck soll erstmals mittels molekularbiologischer Methoden ein Gen-Reporter-Konstrukt durch Klonierung der genomischen Promotersequenz von PON2 in einem Reporterplasmid erstellt werden. Mit einem derartig generierten PON2-Reporter-Plasmid soll anschließend die bisher unbekannte Regulation der PON2 Expression charakterisiert werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Oxidativer Stress: Eine Ursache der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung: Während Hypercholesterinämie und Dyslipoproteinämie die subendotheliale Akkumulation von Lipiden beschleunigen, spielt oxidativer Stress im Gefäßsystem eine Schlüsselrolle in der initialen Phase der Ausbildung von streifenartigen, lipidreichen Läsionen (*fatty streak lesions*) und der Progression der Atherogenese. Erste Untersuchungen zu Funktionen reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species* (ROS)) charakterisierten diese als mehr oder minder schädliches Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels. Die heutige Studienlage liefert jedoch ebenso klare Anhaltspunkte für physiologische Funktionen von ROS, beispielsweise im Rahmen regulatorischer Prozesse (4). Insgesamt werden mit der Bezeichnung ROS (bzw. RNS für reaktive Stickstoffverbindungen) mehrere verschiedene Radikalverbindungen zusammengefasst, wie z.B. Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$), Hydroxylradikal (OH^\cdot) uvm. Die einzelnen Radikale unterscheiden sich dabei in den Mechanismen ihrer Generierung, in ihrem Redoxpotential und somit ihrer Neigung andere Moleküle zu reduzieren, in ihrer Stabilität und auch in ihrer Diffusionsreichweite. Trotz der Funktion als Signalmolekül, z.B. für Superoxid, liegen ebenso klare wie zahlreiche Studien vor, die belegen, dass eine Überproduktion von ROS als kausal für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse angesehen werden muss (5). ROS werden in der Gefäßwand hauptsächlich durch NADPH-Oxidasen in Form von Superoxid (O_2^-) generiert. Lassegue und Clempus haben eine vermehrte Expression von NADPH-Oxidasen mit konsekutiv vermehrter ROS-Produktion in Diabetes mellitus-, Hypertonie- und Atherosklerose-Modellen nachgewiesen (6). Die Funktionen der innerhalb solcher Modelle generierten ROS sind vielfältig und reichen von direkten oxidativen Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen (7) bis hin zur Konversion der primär vasoprotektiven endothelialen NO-Synthase (eNOS) in die entkoppelte ROS generierende Form des Enzyms (8-10), was zu noch höheren ROS-Spiegeln im Gefäßsystem führt.

Neben der oben erwähnten vermehrten Generation von ROS durch NADPH-Oxidasen kann auch die Ineffektivität der körpereigenen antioxidativen Systeme zu erhöhten ROS-Spiegeln führen. Hierzu zählen neben den bereits bekannten antioxidativen Abwehrmechanismen der

Zelle, wie Superoxiddismutase (SOD), Thioredoxin, Glutathionperoxidase (GPX), Vitamin E oder Catalase (10), auch die Familie der Paraoxonasen.

2.2 Die Initiierung der Atherosklerose

Das durch NADPH-Oxidasen gebildete hochreaktive Superoxid begünstigt durch Reaktion zu weiteren ROS, wie z.B. dem Hydroxylradikal (OH^\cdot) oder Peroxynitrit (z.B. durch eNOS Entkopplung: $\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^\cdot$), die Entwicklung endothelialer Dysfunktion, im Sinne eines herabgesetzten Dilatationsvermögens der Gefäßmuskulatur und einer erhöhten Permeabilität für Lipidpartikel durch oxidative Schäden. Die oxidative Modifizierung der *low density lipoprotein*-(LDL-)Partikel zu oxidierten (ox)LDL-Partikeln und deren subendotheliale Akkumulation wirken als proinflammatorischer Stimulus und induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Seite des Endothels. Dies verstärkt die transendotheliale Migration von Monozyten in den subendothelialen Raum und deren Differenzierung zu Makrophagen. Die intrazelluläre Akkumulation der kontinuierlich phagozytierten oxidierten Phospholipide, auch *lipid overload* genannt, resultiert letztlich in der Apoptose der Phagozyten. Während man makroskopisch von *fatty streak lesions* spricht, lassen sich histologisch die für die Atherosklerose charakteristischen *foam cells* (Schaumzellen) als morphologisches Korrelat der mit Lipiden überladenen Makrophagen abgrenzen. Der Zerfall der apoptotischen Schaumzellen führt zu erneuter Freisetzung bereits phagozytierter ox-LDL-Partikel und begründet letztlich den Circulus vitiosus der Initiierung der Atherogenese.

2.3 ER-Stress und UPR-Signalweg

Einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose stellt die Apoptose von Makrophagen und Zellen der Gefäßwand, insbesondere des Endothels, dar. Da sich die Initiierung der Apoptose aus vielerlei verschiedenen Ursachen ergeben kann, ist die Erforschung der in der Atherogenese bedeutsamen Stimuli von entscheidender Bedeutung bei der Bekämpfung der Krankheit.

Einer der Signalwege, die im Rahmen der Atherosklerose zur Apoptose führen, ist der als ER-Stress-Signalweg oder auch *Unfolded Protein Response* (UPR) bekannte Signalweg. Der

UPR-Signalweg wird als eine durch verschiedene Formen von Zellstress aktivierte Signalkaskade beschrieben. Ziel des UPR-Signalweges ist zunächst das Überleben der Zelle durch verschiedene Prozesse sicherzustellen, oder aber, falls dies erfolglos ist, die Apoptose einzuleiten (11). Die Aktivierung des UPR-Signalweges erfolgt auf mehrere verschiedene Stimuli hin (siehe unten), von denen einer ein gestörtes Gleichgewicht der Lipidzusammensetzung des ER ist. Während die Zellmembran einen hohen Cholesterin-Anteil aufweist und sich dieser auch stark ändern kann, ist die ER Membran hingegen eher arm an Cholesterin und reagiert sehr sensibel auf Änderungen der Lipidzusammensetzung. Die Störung des Gleichgewichts beruht auf der Akkumulation freier Cholesterolmoleküle z.B. infolge eines hohen Lipidinfluxes oder einer Störung in der Veresterung von Cholesterol. Ein Teil der durch die Makrophagen phagozytierten Lipidpartikel wird in den Zellen als Baustein für Lipidmembranen verwendet. Durch Integration von Cholesterinmolekülen in die Membran des ER steigt ihr relativer Cholesterinanteil. Neben vermehrtem Einbau von Cholesterin in die ER-Membran nimmt durch die kontinuierliche Phagozytose auch der Gehalt an freiem und oxidativ verändertem Cholesterol innerhalb des ER zu. Die vermehrte Akkumulation von Lipiden im ER initiiert die Apoptose der Zellen (11). Feng et. al. konnten jedoch zeigen, dass Makrophagen durch die Aktivierung des UPR-Signalweges der durch Lipidanreicherung im ER vermittelten Apoptose entgehen konnten (12). Der UPR-Signalweg führt also nicht primär zur Apoptose der Zellen, sondern verfolgt zunächst das Ziel der Vermeidung größerer Zell-Schäden und schützt gegen pro-apoptotische Stimuli. Erst bei einer irreparablen Störung oder zu intensiven pro-apoptotischen Signalen dominiert die pro-apoptotische Komponente des UPR.

Das ER ist die Organelle der Zelle, welche vom größten Teil der zelleigenen Proteine durchflossen wird. Sämtliche an Lipide gebundenen Proteine werden im ER ebenso weiterverarbeitet wie sekretorische Proteine. Exemplarisch seien hier das Peptidhormon Insulin der β -Zellen des Pankreas oder die Antikörper der B-Lymphozyten des Immunsystems genannt. Posttranslational werden die an den Ribosomen synthetisierten Proteine im ER so modifiziert, dass sie ihre funktionelle und thermodynamisch-optimale Struktur ausbilden können. Zu diesem Zweck beinhaltet die posttranslationale Modifikation der Proteine neben der von Chaperonen unterstützten Protein-Faltung beispielsweise auch die Glykosylierung oder Ausbildung von Disulfidbrücken. Neben Chaperonen sind noch eine Vielzahl anderer Enzyme an der posttranslationalen Modifikation der Proteine beteiligt, sodass die Regulierung der ER-Homöostase einen sehr hohen Energieaufwand erfordert. Verschiedene Arten von sogenanntem ER-Stress können diese Mechanismen stören. Hierzu zählen stark erhöhte Translationsraten, Mangel an Nährstoffen, Hypoxie, Änderungen der Calciumkonzentration

oder des Redox-Potentials, Störungen im Ablauf post-translationaler Proteinmodifikationen sowie gesteigerte intrazelluläre ROS-Spiegel und Änderungen der Lipidkomposition in der ER-Membran, wie sie während der Atherogenese in Zellen des Gefäßsystems auftreten (13). Störungen der physiologischen ER-Homöostase resultieren letztlich sowohl in gestörter Translation, als auch in fehlerhafter Modifikation der Proteine. Die Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine im ER aktiviert den UPR-Signalweg, welcher sich in drei verschiedene Signalkaskaden unterteilt (14, 15). Eine schematische Übersicht der drei Signalkaskaden des UPR-Signalwegs liefert in vereinfachter Form Abbildung 1: Die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER führt zur Bindung dieser mit dem im ER lokalisierten Chaperon GRP 78 (*glucose-regulated-protein of 78 kDa*). GRP 78 ist im physiologischen Zustand mit drei verschiedenen Proteinen assoziiert. Durch die Bindung mit den akkumulierten Proteinen wird die Assoziation mit den drei Proteinen PERK (*pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*), ATF6 (*activated transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) (14) aufgehoben. Ausgehend von den drei Transmembranrezeptoren PERK, ATF6 und IRE1 wird das ER-Stress Signal in den Nukleus fortgeleitet, um eine Veränderung der Genexpression herbeizuführen: Ein Ziel ist hierbei der sofortige Translations-Stopp, um den Nachschub an ungefalteten Proteinen zu unterbinden und eine Überlastung des ER zu vermeiden und um den Chaperonen zur korrekten Faltung ungefalteter Proteine mehr Zeit zu geben. Dieser von PERK ausgehende Signalweg ist in Abbildung 1 ganz rechts dargestellt. Die Phosphorylierung von eIF2a bewirkt eine Translations-Inhibition und aktiviert den nukleären Transkriptionsfaktor ATF4. Ein weiteres Ziel stellt die vermehrte Translation von Chaperonen und Enzymen dar, die für die Degradation der akkumulierten Proteine verantwortlich sind. Dies wird unter anderem durch die von ATF6 und IRE1 ausgehenden Signalwege gewährleistet (linker und mittlerer Signalweg in Abb. 1). Im Falle des Abbaus von akkumulierten Proteinen kommt es zum retrograden Transport zurück aus dem ER, hin zum Proteasom (ERAD; *ER associated decay*). Neben der Induktion jener Proteine, welche z.B. auch Aminosäure-Transport oder die Glukose-Aufnahme beeinflussen, kommt es ebenso zur Initiation pro-apoptotischer Signalkaskaden, insbesondere primär des pro-apoptotischen CHOP Proteins. Die Effektivität dieser pro-apoptotischen Komponente des UPR hängt dabei sowohl von der zeitlichen Dauer, als auch von der Intensität der UPR-Aktivierung ab. Die Aktivierung des UPR ist somit als Versuch der Zelle zu verstehen, wieder eine physiologische posttranslationale Protein-Modifikation zu gewährleisten und die fehlerhaft gefalteten Proteine abzubauen. Ist dies nicht möglich, so überwiegen die pro-apoptotischen Stimuli und die Zelle geht in die Apoptose über.

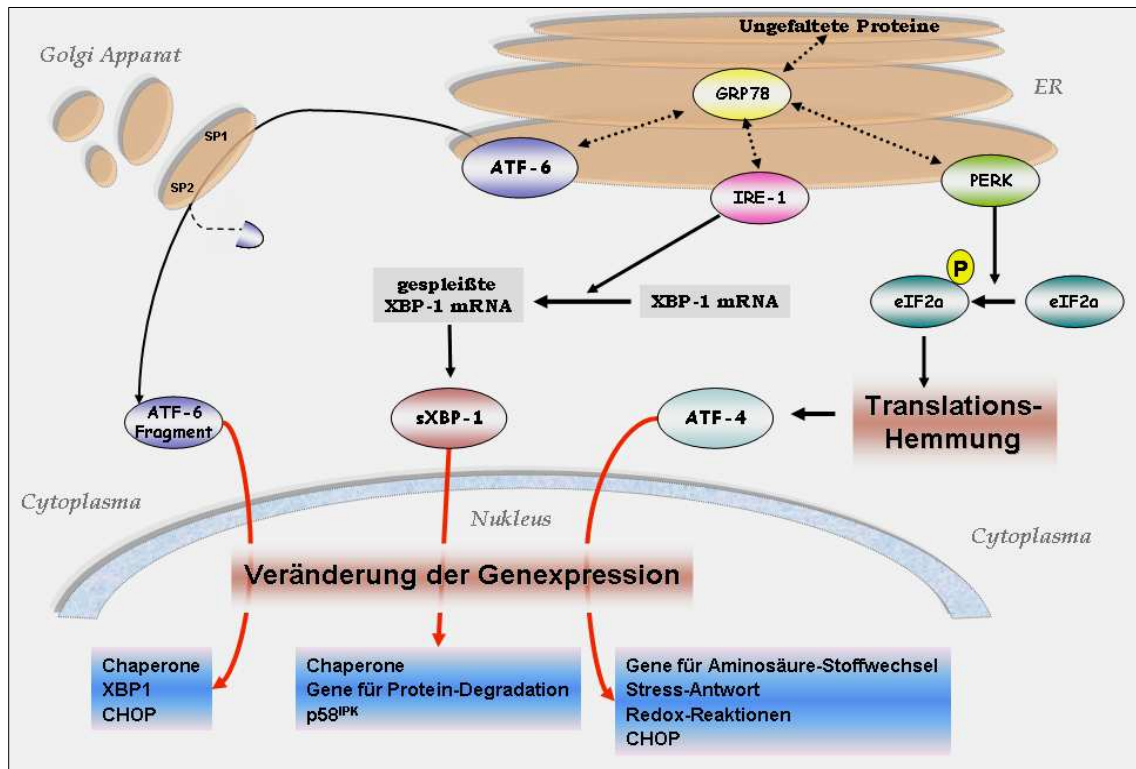


Abb.1 : Die Initiation des ER-Stress-Signalweges *unfolded protein response* (UPR). Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht des UPR-Signalwegs. Für Einzelheiten siehe Text in Kapitel 1.4. Graphik erstellt in Anlehnung an Szegezdi(1).

Neben der Entwicklung der Atherosklerose spielt der UPR-Signalweg ebenfalls eine tragende Rolle bei der Entstehung eines Diabetes mellitus (16-18). So scheint vermehrter Stress im ER von β -Zellen über eine gestörte Glukose Deregulation die Entwicklung einer Insuffizienz der β -Zellen bzw. die Apoptose der β -Zellen zu begünstigen und ist somit entscheidend für die Ausbildung eines Diabetes mellitus. Weitere Arbeiten zu diesem Thema konnten bemerkenswerte pathophysiologische Parallelen innerhalb der in den Gefäßwänden ablaufenden Inflammationsvorgängen offenbaren (19, 20).

2.4 Die Familie der Paraoxonasen

2.4.1 Paraoxonase 1

Die Familie der Paraoxonasen besteht aus drei verschiedenen Proteinen: PON1, PON2 und PON3. Die drei Proteine unterscheiden sich im strukturellen Aufbau nur wenig voneinander und ihre genetischen Informationen sind innerhalb eines Clusters auf dem menschlichen Chromosom 7 lokalisiert (21). Es besteht Interesse an PON1, weil dieses Enzym gegenüber xenobiotisch toxischen Substanzen, wie verschiedenen Organophosphaten, schützend wirkt. PON1 wird primär von Hepatozyten sekretorisch in die Blutbahn abgegeben und lässt sich als mit der HDL-Fraktion assoziiertes Plasmaprotein nachweisen. Eine protektive Funktion gegenüber Oxidation der HDL- und LDL-Fraktion konnte verifiziert werden (3, 22, 23). Während PON1 somit als ein im Serum gelöstes Enzym mit hydrolytischer Aktivität identifiziert werden konnte, sind die natürlichen Substrate der Proteinfamilie bisher unbekannt. Es scheint jedoch gesichert, dass eine Laktonase-Aktivität der PONs die natürliche enzymatische Aktivität darstellt (24).

2.4.2 Paraoxonase 2

Bei Paraoxonase-2 (PON2) handelt es sich um ein Protein mit enzymatischer Laktonase-Aktivität, welches zwar in vielen Geweben vorkommt, aber z.B. in Thymus, Fettgewebe, Auge oder Submandibulardrüse nicht exprimiert wird (25). Im Falle von PON2 ist die Laktonase-Aktivität ein natürlicher Verteidigungsmechanismus gegen human-pathogene Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, da PON2 bei der Inaktivierung essentieller, bakterieller Laktone eine dominante Rolle einnimmt (26, 27).

Unsere Gruppe zeigte, dass PON2 in charakteristischen Zellen des humanen Gefäßsystems in Form zweier glykosylierter Spleißvarianten, PON2-iso1 und PON2-iso2, exprimiert wird (28). Funktionelle Unterschiede der beiden Varianten des Proteins konnten bisher nicht identifiziert werden. Während viele Untersuchungen eine Beteiligung von PON1 und PON3 in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und Alzheimer Demenz zeigen konnten (29-32), gibt es hierzu bezüglich einer Funktion von PON2 nur wenige Daten. Genetische Polymorphismen von PON2 sind jedoch sowohl mit kardiovaskulären Erkrankungen (33-38)

und Alzheimer Demenz (39), als auch mit der Entwicklung eines Diabetes (40, 41) assoziiert. Weitere Polymorphismen gelten als prädisponierend für die Pathogenese der Erkrankungen (42-44).

Während es sich bei den in Kapitel 2.4.1 und 2.4.3 erwähnten PON1 und PON3 um die HDL-assoziierte humorale Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies handelt, stellt PON2 einen subzellulär lokalisierten Abwehrmechanismus dar, der in der Lage ist ROS zu reduzieren und so die Zellen vor oxidativer Modifikation schützen kann: Es ist belegt, dass PON2 die im Serum enthaltenen LDLs (*low-density-lipoprotein particles*) vor Oxidation schützt, dass es in HeLa-Zellen anti-oxidativ wirkt und, dass seine Expression wahrscheinlich durch oxidativen Stress kompensatorisch induziert wird (2, 45). Zusätzlich mindert PON2 vermutlich die Chemotaxis von Makrophagen (2). Die daraufhin für PON2 postulierte anti-atherogene Funktion wurde kürzlich zumindest für Maus-PON2 gezeigt (46, 47).

Die zugrunde liegenden Mechanismen, die beteiligten Signalwege, sowie eventuelle Zusammenhänge mit der enzymatischen Laktonase-Aktivität von PON2 sind jedoch unbekannt. Zudem begrenzen sich die bisherigen Arbeiten an PON2 größtenteils auf murine Makrophagen, so dass offen blieb, ob die Erkenntnisse auch für humane Gefäßzellen gleichermaßen gelten. Die Regulation der PON2 Expression ist fast vollkommen unbekannt. Es ist bisher unklar, welche Radikal-Verbindungen von PON2 reduziert werden und wie dies mechanistisch erfolgt. Zur Beurteilung der anti-atherogenen Funktion und Bedeutung von PON2 ist dies aber essentiell.

2.4.3 Paraoxonase 3

Paraoxonase 3 wird vornehmlich von Leber und Niere sezerniert und lässt sich in geringerem Maße als PON1 als ein mit der HDL-Fraktion assoziiertes Serumprotein nachweisen (48, 49). Experimente mit aus Kaninchen isolierter PON3 zeigten einen protektiven Effekt gegenüber der Oxidation von LDL-Partikeln in endothelialen Aortenzellen (50, 51). Weitere Experimente belegen jedoch, dass die protektiven Effekte von PON3 im Gegensatz zu PON1 primär auf die intrazellulär lokalisierte Proteinfraction von PON3 zurückzuführen sind (52).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

Ampicillin	Roth
Angiotensin II ₁	ABR Affinity Bio Reagents
5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlordihydro-fluoreszin diacetat (Carboxy-H ₂ DCFDA)	Molecular Probes
Cycloheximid	Sigma Alderich
4,6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon, 10µM (DMNQ)	Calbiochem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dulbecco's PBS	PAA
Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (HAT)	Gibco
HBSS	PAA
Kanamycin	Roth
8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazin-1,4(2H, 3H)dion Sodium Salz (Chemilumineszenz-Probe, L-012), Luminolderivat	Wako Pure Chemical Industries Ltd.
Na ⁺ Pyruvat	PAA
Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1)	Strathmann Biotech
Thapsigargin	Molecular Probes
Tunicamycin	Sigma

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM)	Sigma
Foetales Kälber Serum	High Clone
Genitacin (G-418)	Gibco
Glutamax	Gibco
Hank`s Balanced Salt Solution	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA
qRT-PCR 96- <i>well</i> -Platte	Peqlab
SMC-Medium	Promocell
Zellkammer LabTek II Chamber #1,5 German Coverglass System (2 Chamber)	Nalge Nunc International Corp.
Terrific-broth-Medium	Roth
Zellkulturflaschen T-75	Greiner / Sarstedt
Zellkulturplatten TC Plate 6- <i>well</i> (steril)	Cellstar / Greiner bioone
Zellkulturplatten TC Plate 24- <i>well</i> (steril)	Cellstar / Greiner bioone
Zellkulturplatten 96- <i>well</i> (steril)	Greiner bioone

3.1.3 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

BCA Protein Assay kit	Pierce
Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
DNA Blunting and Ligation kit	Fermentas
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Jetquick PCR Product Purification spin kit	Genomed
Jetstar Plasmid Preperation	Genomed
Mid Range PCR System	PeqLab Biotechnology
Nanofectin	PAA
Perfectprep, Gel Cleanup kit	Eppendorf
Perfectprep, Plasmid mini	Eppendorf
Perfect RNA, Eukaryotic mini	Eppendorf
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth

Qiaquick, Gelextraction kit	Qiagen
Qantitect qRT-PCR kit	Qiagen
RNAinfect	Qiagen
RNeasy RNA isolation kit	Qiagen
Sawady MidRange PCR system	Peqlab Biotechnology
Stealth-Select siRNA, (PON2 mRNA)	Invitrogen
Stealth RNAi Negative Control Duplexes	Invitrogen
Western lightning Chemiluminescence Reagent plus	Perkin Elmer

3.2 Enzyme, Standards, Antikörper und radioaktive Stoffe

Alle hier aufgeführten primären Antikörper richten sich gegen humane Proteine.

1 kbp DNA Leiter	Roth
100 bp DNA Leiter	Roth
Benzonase (genetically engineered Nuclease)	Novagen
CIAP Alkalische Phosphatase	Promega
Cy-3-konjugierter AffiniPure Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
ER-Tracker Red (glibenclamide BODIPY TR)	Molecular Probes
FITC-konjugierter AffiniPure Esel- α -Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
Mass Ruler DNA Ladder, low range	Fermentas Life Science
Monoklonaler α -Calnexin-Antikörper, IgG1, Klon AF18 (Maus)	ABR Affinity Bio Reagents
Monoklonaler α - α Tubulin Ab-2, Klon DM1A (Maus)	Dianova
N-Glycosidase F, recombinant	Roche
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences
Permafluor (Einbettungsmedium)	Immunotech
Peroxidase-konjugierter Kaninchen- α -Maus IgG	Sigma
Peroxidase-konjugierter Ziege- α -Kaninchen IgG	Sigma
Peroxidase-konjugierter AffiniPure Ziege- α -Maus IgG (H+L)	Dianova
Polyklonaler α -Angiotensin II ₁ N-10 Antikörper sc-1173-G (Ziege)	Santa Cruz
Polyklonaler α -Calnexin (H-70) Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz
Polyklonaler α -GRP78 C-20 Antikörper (Ziege)	Santa Cruz

Polyklonaler α -PON2-Peptidantikörper (Kaninchen)	Auftragssynthese Eurogentec, Belgium
Proteinase K	Promega
Pwo DNA Polymerase	Roche
Restriktionsenzym <i>Dpn</i> I	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>Eco</i> RV	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>Kpn</i> I	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>Nco</i> I	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>Xho</i> I	New England Biolabs
T ₄ -DNA-Ligase (PEG)	Fermentas
T ₄ -Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs
Trypsin	PAA

3.3 Plasmide

pCDNA3	Invitrogen; freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H. Kleinert, Universität Mainz
pE-GFP-N1	Clontech; freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H. Kleinert, Universität Mainz
pE-YFP-MGM	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Strand, I. Innere Med. Universität Mainz
pGl4.10[luc2] Vector	Promega
pRL-EFalpha	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H. Kleinert, Universität Mainz

Zero Blunt TOPO PCR Cloning-kit

Invitrogen

3.4 Bakterienstämme, Zell-Linien und Medien

Zur Klonierung des PON2-Promotors wurden bakterielle Kulturen des *E. coli* Stammes DH5 α benutzt. Für Untersuchungen mit eukaryotischen Zellen erfolgten die Experimente mit embryonalen aortalen Hybridzellen (EA.hy 926), die freundlicherweise von Dr. Huige Li, Universität Mainz, bereitgestellt wurden und mit glatten Muskelzellen (SMC Zellen) aus primären aortalen Koronararterien der Firma Promocell. Während es sich bei der Zelllinie EA.hy 926 um durch Kreuzung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVECs) mit Kolonkarzinomzellen (A549) entstandenen Endothelzellen handelt, sind die SMC Zellen primäre glatte Muskelzellen aus Koronararterien kaukasischer Spender. EA.hy 926 Zellen wurden bis Passage 25, SMC Zellen bis Passage 10 kultiviert und für Experimente verwendet. EA.hy 926 Zellen sind zwar immortalisiert, werden aber nur bis maximal Passage 25 kultiviert, da der endotheliale Charakter verloren geht und die Zellen zunehmend mehr den Expressions-Charakter des Kolonkarzinoms A549 annehmen. Außerdem standen in der Arbeitsgruppe zwei stabil PON2 überexprimierende Zelllinien zur Verfügung: EA.hy PON2-iso1-GFP und EA.hy PON2-iso1-HA. Wobei GFP für *green fluorescent protein* und HA für *hemagglutinin* steht. Beide wurden durch stabile Genom-Integration eines Plasmids erstellt, welches eine Cytomegalovirus-Promoter gesteuerte Überexpression des humanen PON2 Proteins bewirkt. Aufgrund eines ebenfalls im Plasmid kodierten Resistenzgens wurden diese Zell-Linien in Anwesenheit des Selektionsmarkers Geneticin/G418 kultiviert.

Als Standard Medium für die Bakterien diente das Fertigpulver Terrific-broth (TB)-Medium (siehe Kapitel 3.1.2). Zum Ansetzen wurden 50,8g TB-Medium und 4ml Glycin in 1l Wasser gelöst und bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agar Festmedien wurde LB-Agar (Luria/Miller) verwendet. Hier wurden 40g Fertigpulver in 1l Wasser gelöst und dann ebenfalls bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 35°C wurden nach Bedarf evtl. noch Antibiotika hinzugefügt, bevor die Platten dann gegossen wurden. Antibiotika wurden mit 0,1mg/ml Ampicillin bzw. 0,03mg/ml Kanamycin für die Anzucht resistenter Bakterien-Stämme eingesetzt. Flüssigmedien enthielten 0,03mg/ml Kanamycin. Die Platten wurden im Dunkeln und bei 4°C gelagert.

Das Medium für EA.hy 926 Zellen setzte sich wie folgt zusammen: 80% Dulbecco's Modified Eagles Medium, 10% fötales Kälberserum, 2% HAT, 2% Glutamax, 2% Penicillin

und Streptomycin, 2% Natriumpyruvat. (siehe auch Kapitel 3.1.1, 3.1.2 und 3.2). Fötale Kälberserum wurde vor der Verwendung zur Inaktivierung der Komplementfaktoren 30min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das fertige Medium wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt. Für die SMC Zellen wurde ein fertiges Medium (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet. Die zur Ablösung adherenter Zellen benutzte Trypsin-Lösung enthielt 0,125% Trypsin und 0,1% EDTA in 1x PBS Puffer (siehe Kapitel 3.2).

3.5 Oligonukleotide

Die DNA von A549 Zellen zur Generierung des PON-Promoters wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hartmut Kleinert, Institut für Pharmakologie Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

PON2 upstream 5S, PON2 upstream AS:

5S: GATAGAGGTACCCTTAACCCAGTGGTCCATTG

5AS: GATAGACTCGAGACCTACCTGAGTGCCAGAAGC

3.6 Puffer, Medien, Reagenzien und Lösungen

In diesem Abschnitt sind alle Puffer, Medien, Lösungen und Reagenzien aufgelistet, die in den jeweiligen Abschnitten beschrieben und benutzt wurden.

Alkalischer Lysis (ALB) Puffer	0,2N NaOH, 1% SDS
<i>Cracking</i> -Puffer	50mM Tris/HCl pH6,8, 2mM EDTA, 400mM Sucrose, 1% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol, 10µg/ml hitzeinaktivierter (10min 95°C) RNase A
DNA-Ladepuffer, 6x	1xTAE-Puffer, 0,01% Bromphenolblau, 40% Glycerin

Hanahan-Lösung I	30mM Ka-Acetat, 50mM MnCl ₂ , 10mM CaCl ₂ , 100mM KCl, 15% Glycerin
Hanahan-Lösung II	10mM MOPS, 75mM CaCl ₂ , 10mM KCl, 15% Glycerin, pH7,0
PBS-CM-Puffer	PBS-Puffer mit zusätzlich 3mM CaCl ₂ , 1mM MgCl ₂
PBS-PMSF-Puffer	PBS-Puffer mit zusätzlich 5mM PMSF (Stammlösung 250mM in Isopropanol)
PBS-Puffer	137mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH7,4
PBS-T-Puffer	PBS-Puffer mit zusätzlich 0,1% TritonX 100
RIPA-Puffer	250mM NaCl, 2mM EDTA, 200mM Tris pH7,4, 1% TritonX 100, 1% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 4% Complete Protease Inhibitor, 5mM PMSF, 0,8% Benzonase , alles gelöst in H ₂ O
SDS-Ladepuffer, 5x	0,4M Tris/HCl pH6,8, 0,5M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS
SDS-Laufpuffer, 1x	25mM Tris/HCl pH8,3, 250mM Glycin, 0,1% SDS
Stripping-Puffer	12,5% 0,5m Tris pH6,8, 2% SDS, 0,007% β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	50mM Tris pH7,4, 20mM Na-Acetat, 2mM EDTA
TBS-Puffer	10mM Tris/HCl pH7,6, 100mM NaCl, 0,18% Tween-20
TE-Puffer	10mM Tris/HCl pH7,5, 1mM EDTA
TEG-Puffer	25mM Tris/HCL pH8,0, 50mM Glucose, 10mM EDTA

Wasser	jegliches in dieser Arbeit benutzte Wasser war destilliert, durch eine Millipore-Anlage deionisiert und autoklaviert
Western Blot Anodenpuffer I	300mM Tris/HCl pH10,4, 20% Methanol
Western Blot Anodenpuffer II	25mM Tris/HCl pH10,4, 20% Methanol
Western Blot Kathodenpuffer	25mM Tris/HCl pH9,4, 40mM DL-Norleucin, 0,05% SDS

3.7 Geräte

Agarose Gelelektrophorese Kammer Easy Cast Model: B1A	OWL Scientific, Inc.
Agarose Gelelektrophorese Kammer Easy Cast Model: B2	OWL Scientific, Inc.
Centro LB960 Platten-Luminometer	Berthold Technologies
CO ₂ Inkubatoren	Heraeus Instruments
Fluostar Optima fluometer	BMG Labtechnologies
Horizontal Rotator Unimax 1010	Heidolph Instruments
i-cycler, PCR-Maschine	BioRad
Lichtmikroskop Olympus LH 50 A	Olympus
Microfuge lite Centrifuge	Beckmann
Mini-Transilluminator	BioRad
NanoDrop Maschine	PeqLab
Power Pac Basic	BioRad
Power Pac HC	BioRad
RNA/DNA-Calculator GeneQuant	Pharmacia
SDS-PAGE Kammer Model: 45-1614-i	PeqLab
Tischzentrifuge 5417 & 5417R	Eppendorf
Transblot SD semi-dry transfer cell	BioRad
Zentrifuge Avanti J-30i	Beckmann

3.7.1 Herstellernachweis

Agfa, D-50670 Köln

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg

Applied Biosystems, D-64293 Darmstadt

Beckmann Instruments GmbH, D-80807 München

BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München

Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf

Clontech, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg

Eurogentec, D-50667 Köln

Dianova, D-20148 Hamburg

Gibco BRL / Life Technologies GmbH, D-76339 Eggenstein

Greiner, D-72636 Frickenhausen

Haereus Instruments GmbH, D-63450 Hanau

Hartmann Analytics, D-38124 Braunschweig

Invitrogen, San Diego, CA, USA

MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Mo Bi Tec, Wagenstiege 5, D-37077 Göttingen

MWG-Biotech AG, D-85560 Ebersberg

New England Biolabs, D-65926 Frankfurt am Main

New Brunswick Scientific, NJ, USA

Nunc GmbH & Co.KG, Postfach 120543, D-65083 Wiesbaden

Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim

Qiagen GmbH, D-40724 Hilden

Roche, D-69112 Heidelberg

Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, D-37586 Dassel/Relliehausen

Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen

Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg

Whatman, Springfield Mill, UK

Zeiss, D-07745 Jena

3.8 Allgemeine proteinbiochemische Arbeiten

3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mittels eines *BCA-kits* (siehe 3.1.3) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode hat gegenüber derer von Bradford den Vorteil, dass ihre Messergebnisse nicht durch Detergenzien verfälscht werden. Da es sich bei PON2 um ein eher lipophiles Protein handelt und Detergenzien zur Proteinextraktion eingesetzt wurden, wurde die Bestimmung mittels *BCA-kit* durchgeführt.

Als Reaktionsgefäß diente eine *96-well*-Platte. Hierzu wurden 10µl der Proben mit 200µl Färbelösung aufgefüllt. Die Färbelösung wurde nach Herstellerangaben aus den beiden mitgelieferten Reagenzien im Verhältnis 50:1 ((v/v) Reagenz A:Reagenz B) angesetzt. Schließlich wurde die ganze Platte ca. eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und in einem Fluometer vermessen.

Parallel dazu wurde bei jeder Bestimmung eine Eichreihe aufgestellt, indem bekannte Mengen (0 bis 5µg) an BSA als Doppelwert mit demselben Reagenz versetzt wurden und ebenfalls die OD595 bestimmt wurde. Die daraus resultierenden optischen Dichten wurden graphisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, sodass der Proteingehalt der zu analysierenden Proben aus dieser Kurve errechnet wurde.

3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Originalmethode von Lämmli (53) durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Proteinlösung mit dem Detergenz SDS behandelt. Die Mehrzahl der Proteine bindet SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Weiterhin denaturiert SDS die Proteine zusammen mit den reduzierenden Agenzien DTT oder β -Mercaptoethanol und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Proteine unterscheiden sich somit nur noch in ihrer Masse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. In der SDS-PAGE wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei die Polyacrylamidmatrix als ein molekulares Sieb fungiert und die Proteine nach Stokes-Radius auftrennt.

Die SDS-Page wurde in einer der in Kapitel 3.7 beschriebenen Gelkammern durchgeführt. Die Konzentration des Trenngels betrug 12%, die des Sammelgels 5%. Als Stammlösung für beide Gele diente eine 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung. Die Endkonzentrationen im Trenngel betragen 375mM Tris/HCl pH8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,001% (v/v) TEMED und 0,001% (w/v) APS. Die Endkonzentrationen im Sammelgel betragen 125mM Tris/HCl pH6,8, 0,001% (w/v) SDS, 0,0025% (v/v) TEMED und 0,001% (w/v) APS. Als erstes wurde das Trenngel gegossen, wobei der Polymerisierungsprozess durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Nach dessen Polymerisierung erfolgte der Guß des Sammelgels unter Zugabe von 30µl Bromphenolblau zur besseren Visualisierung der Geltaschen. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/4 Vol. des Probenvolumens an 5x SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 3.6) versetzt, für 5min bei 90°C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte mit 100mA/Gel für 4h mit Kühlung oder mit 10mA/Gel für 16h.

3.8.3 Western blot - Immunbiologischer Nachweis von Proteinen

Diese Methode wurde zum Nachweis von Proteinen in Zellextrakten benutzt. Weiterhin eignete sie sich zur Quantifizierung der jeweiligen Proteinmenge eines spezifischen Proteins, welches mit einem entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurde. Somit diente sie auch zum Vergleich des PON2-Gehalts bei verschiedenen Protein-Präparationen. Bei dieser Methode handelt es sich um einen sehr sensitiven Nachweis, da endogenes PON2 beispielsweise noch in bis zu 15µg Zellextrakten nachweisbar war.

Der elektrophoretische Transfer erfolgte mit einer semi-dry-transfer Kammer von BioRad und einem diskontinuierlichen Puffersystem bestehend aus drei verschiedenen Blotting-Puffern. (siehe Kapitel 3.6) Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (siehe Kapitel 3.8.2) wurde das Gel aus der Kammer entnommen, für 15min im Kathodenpuffer äquilibriert und dann auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche vorher für 10min im Anodenpuffer II äquilibriert wurde. Das Gel auf der Membran wurde dann auf drei Lagen in Anodenpuffer I äquilibriertes Whatmanpapier gesetzt und auf die Anode der Western blot Transfer-Kammer gelegt. Schließlich wurden noch drei weitere Lagen Whatmanpapier, im gleichen Puffer wie das Gel äquilibriert und oberhalb des Gels aufgelegt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte mit einer Stromstärke von 3mA/cm² Gel-Fläche in auf 4°C vorgekühlten Transferpuffern.

Anschließend wurde die Membran mit 5% Milchpulver in TBS-Puffer (siehe Kapitel 3.6) für mind. eine Stunde blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Schütteln und bei RT oder bei Über-Nacht-Inkubationen bei 4°C und *end-over-end* Rotation. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären α -PON2 Antikörper. Dieser wurde in Blocklösung (s.o.) 1:1000 für mindestens 2h oder über Nacht eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-Puffer für je 10min folgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (siehe Kapitel 3.2) für mind. 60min. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockpuffer eingesetzt. Schließlich erfolgte nach erneutem Waschen der Membran (3 x 10min in TBS-Puffer) die Visualisierung der antikörper-detektierten Proteine durch Inkubation mit dem *Western lightning Chemiluminescent Peroxidase Solution System* (siehe Kapitel 3.1.3). Hierbei wird durch die am zweiten Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase-Aktivität das in der zugegebenen Lösung enthaltene Substrat umgesetzt und ein Chemilumineszenz Signal erzeugt, welches seinerseits durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Schwärzung des Röntgenfilms ist (in Grenzen) proportional zur Menge an umgesetztem Substrat. Damit kann eine indirekte Aussage über die auf der Membran befindliche Menge an Protein getroffen werden.

Als Ladekontrolle wurde ein immunologischer Nachweis von α -Tubulin vorgenommen. Als primärer Antikörper diente ein monoklonaler Maus- α -Tubulin 1:800 (Siehe Kapitel 3.2). Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein globuläres Protein, welches Bestandteil der Mikrotubuli ist. Man nimmt an, dass in der Regel die Bestandteile des Zytoskeletts kaum signifikanten Änderungen in der Expression unterworfen sind. Gleichgroße Mengen an Tubulin entsprechen somit gleichen Mengen an Protein insgesamt in einer Probe. Dies spiegelt sich dann auf dem Röntgenfilm in Banden gleicher Intensität wieder. Der Nachweis von anderen Proteinen erfolgte analog zu dem von PON2, bezüglich Inkubationszeiten, Waschschritten und Visualisierung der Chemilumineszenzsignale. Die Membran wurde nach Versuchsende bei 4°C in TBS mit 0,1% NaN_3 zur Vermeidung von Kontamination mit Mikroorganismen und Pilzen gelagert.

3.8.4 Stripping von Western blot-Membranen

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren, welches die Wiederverwendung einer Western blot-Membran ermöglicht, um mehrere verschiedene Proteine nachzuweisen. Hierbei

kommt es biochemisch durch das im Stripping-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol zur Ablösung der zuvor an Zielproteine gebundene Antikörper. Anschließend kann die Membran erneut blockiert und wieder verwendet werden. Abhängig von der zuvor transferierten Proteinmenge kann diese Methode etwa bis zu 5-mal durchgeführt werden.

Hierzu wurde die Membran 30min bei 50°C in vorgewärmten Stripping-Puffer (siehe Kapitel 3.6) rotierend (6 rpm) in einem Brutschrank inkubiert, 5 x 10min in TBS-Puffer gewaschen und für den nächsten Proteinnachweis (siehe Kapitel 3.8.3) eingesetzt.

3.9 Klonierung, Extraktion und Analytik von DNA/RNA

3.9.1 Klonierung eines PON2-Promoter-Fragments in das Reportergen-Plasmid pGL4

Aufgrund einer ineffektiven direkten Amplifikation des PON2 Promoter Fragmentes aus genomischer DNA, erfolgte die Klonierung durch mehrere Subklonierungen.

Zunächst wurde ein 2386 bp großes Fragment aus humaner, genomischer A549 DNA (siehe Kapitel 3.5) amplifiziert, welches der Region -2249 bis +112 des humanen PON2-Gens entspricht. Dies erfolgte in einem 25 μ l Reaktionsansatz bestehend aus 250ng genomischer DNA, 0,35mmol/l dNTPs, 0,5% DMSO, 10pmol per Oligonukleotid (5'-GATAGAGGGTACCCTTAACCCAGTGGTCCATTG-3' (KpnI-Schnittstelle unterstrichen) und 5'-GATAGACTCGAGACCTACCTGAGTGCCAGAAGC-3' (XhoI-Schnittstelle unterstrichen)), 2U DNA Polymerase und dem 1x Reaktionspuffer aus dem *Sawady MidRange PCR System* (siehe Kapitel 3.1.3) Unter Verwendung eines i-cyclers (siehe Kapitel 3.7) wurde anhand von folgendem Amplifikationsprotokoll die PCR durchgeführt: (95°C 2min)_{1x}, (95°C 40sek, 66°C (1°C Erniedrigung/Zyklus) 50sek, 68°C 3min 15sek (10sek Verlängerung/Zyklus))_{8x}, (95°C 40sek, 58°C 50sek, 68°C 4min 30sek (10sek Verlängerung/Zyklus))_{30x}, (68°C 20min)_{1x}. Als nächstes wurde das Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.9.4) und anhand des *Jetquick PCR Product Purification spin kit* (siehe Kapitel 3.1.3) nach Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Dann erfolgte die Insertion der Sequenz in das pGL4.10[luc2] Plasmid (siehe Kapitel 3.3): Hierzu wurden bei 37°C 4 μ g Plasmid mit jeweils 0,5 μ l der Restriktionsenzyme KpnI und XhoI (siehe Kapitel 3.2) und 0,5 μ l NEB 10x Puffer #1 für 4h verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgter Aufreinigung gemäß Herstellerangaben mit

dem *Perfectprep gel clean-up kit* (siehe Kapitel 3.1.3), wurde die Dephosphorylierung des Plasmids vorgenommen. Hierzu wurden 4µg Plasmid mit 1µl CIAP (siehe Kapitel 3.2) und 0,5µl 10x CIAP-Puffer für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem *Qiaquick PCR-purification kit* (Siehe Kapitel 3.1.3) aufgereinigt. Die Vorbehandlung des Plasmids mit alkalischer Phosphatase erleichterte den folgenden Ligationsschritt. Es wurden 50 ng linearisiertes pGL4.10[luc2] Plasmid und 26 bzw. 78 ng des *Inserts* (entspricht molekularen Verhältnissen von 1:1 bzw. 1:3) zusammen mit 1µl T₄-DNA-Ligase (siehe Kapitel 3.2) für 4h bei RT ligiert. Mittels dieses Plasmids erfolgte die Klonierung der Region 2249 bis -1 des PON2 Gens anhand von folgendem PCR-Protokoll: ein 25µl Reaktionsansatz enthielt 50ng *template* DNA, 0.4% DMSO, 0.4mmol/l dNTPs, 20pmol per Oligonukleotid, 5'-GATAGAGGTACCCTTAACCCAGTGGTCCATTG-3' (KpnI-Schnittstelle unterstrichen) und 5'-GATAGAGCTAGCGCCTGGCCAGCAGCTCCGTG-3' (NheI-Schnittstelle unterstrichen), 1.5U DNA Polymerase und den *1x reaction buffer* des *Sawady MidRange PCR kits* (Siehe Kapitel 3.1.3). Das Amplifikationsprotokoll für diese Reaktion lautete: (95°C 2min)_{1x}, (95°C 50sek, 52°C 50sek, 68°C 2min 20sek (10sec Verlängerung/Zyklus))_{38x}, (68°C 7min)_{1x}.

Die amplifizierte DNA wurde anhand des *Perfectprep, Gel Cleanup Kits* gelgereinigt (siehe Kapitel 3.1.3) und mittels *DNA blunting and ligation kit* (siehe Kapitel 3.1.3) nach Herstellerangaben mit dem Klenow-Enzym behandelt. Anschließend wurde die DNA gemäß dem im *Zero Blunt Cloning kit* (siehe Kapitel 3.1.3) beiliegenden Protokoll in das pCR4-TOPO Plasmid inseriert. Schließlich wurde die putative PON2 Promoter Region -2249 bis -1 aus diesem Plasmid durch vierstündigen Verdau bei 37°C von 4µg Plasmid mit jeweils 0,5µl der Restriktionsenzyme KpnI und NheI (siehe Kapitel 3.2) und 0,5µl NEB 10x Puffer #1 ausgeschnitten. Die so generierte DNA wurde dann wie oben beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und gereinigt, um dann in ein pGL4.10[luc2]-Plasmid (siehe Kapitel 3.3) inseriert zu werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst 5µg Plasmid vier Stunden bei 37°C mit jeweils 1µl KpnI und NheI unter Zugabe von 0,7µl NEB 10x Puffer #1 linearisiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung extrahiert. Nun wurde die DNA erneut, wie oben beschrieben unter Verwendung der CIAP nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Schließlich erfolgte die Ligation des linearisierten pGL4.10[luc2]-Plasmids und der putativen PON2-Promoter-Region -2249 bis -1 im Verhältnis 1:3. Dafür wurden 26ng Plasmid und 78ng Promoter vier Stunden bei Raumtemperatur unter Verwendung von 10,4µl Polyethylenglykol PEG T₄-DNA-Ligase (siehe Kapitel 3.2) ligiert. Alle Klonierungsschritte wurden mittels Sequenzierung (siehe Kapitel 3.9.5) überprüft.

3.9.2 Plasmid DNA Präparationen

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden aufgeführt, mit denen Plasmid-DNA aus bakteriellen Vorkulturen gewonnen wurden. Die Methoden kamen ihren Vor- und Nachteilen entsprechend zum Einsatz, je nach erforderlicher Qualität und Reinheit der Präparation.

3.9.2.1 Cracking – Schnelle Extraktion von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen

Unter Cracking versteht man eine schnelle, aber unsaubere Methode zur Plasmid-Präparation, welche bei der Klonierung von DNA benutzt wurde. Ziel der Methode ist die schnelle Prüfung mehrerer bakterieller Vorkulturen auf das Vorhandensein eines bestimmten Plasmids gewünschter Größe. Dazu wird zunächst aus bakteriellen Vorkulturen die Plasmid-DNA präpariert und nachfolgend in einem Agarose-Gel analysiert. Dabei erfolgt der Größenvergleich zu einem Plasmid mit bekannter Länge, wobei bei dieser Methode zu beachten ist, dass der hohe Zucker-Gehalt des benutzten Puffers die Laufeigenschaften von DNAs verändern kann.

Für das *Cracking* wurden 600µl einer Vorkultur 1min bei 20.000x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 60µl *Cracking*-Puffer (siehe Kapitel 3.6) resuspendiert. Anschließend wurde erneut für 10min bei 20.000x g zentrifugiert und 20µl des sich bildenden Überstandes zur Elektrophorese in die Taschen eines 1% Agarosegels geladen und, wie in Kapitel 2.9.4 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Methode schließt die Zellen insgesamt auf und löst die DNA heraus, so dass auf dem Gel ebenfalls die genomische DNA der Bakterien erscheint.

3.9.2.2 Rapidprep Plasmid-DNA-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden Standard-Protokolle verwendet, um zunächst relativ schnell Plasmide aus bakteriellen Vorkulturen präparieren zu können. Die Methode dauert zwar etwas länger als das Cracking (Siehe Kapitel 3.9.3), doch werden dafür die Laufeigenschaften der DNA nicht durch einen hohen Zuckergehalt, wie den des Cracking-

Puffers, verändert. Folglich kam die Methode zum Einsatz, wenn es darum ging, große Mengen an Plasmiden relativ sauber zu präparieren und dies z.B. für einen Restriktionsverdau zu verwenden. Hierfür wurden die gewonnenen Plasmide gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 3.9.5) und mit einem Plasmid gewünschter Größe verglichen.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem transformierte Bakterien (siehe Kapitel 3.10.2) auf selektiven Agarplatten über Nacht gewachsen waren, wurde am nächsten Morgen mit der Spitze einer autoklavierten Pipette eine gewachsene Bakterienkultur vorsichtig aufgenommen, in 5ml TB-Medium mit Kanamycin (siehe Kapitel 3.4) gelöst und bei 37°C über Nacht und unter Schütteln zum Wachsen belassen. Am nächsten Tag wurden 2ml der Bakterien-Über-Nacht-Kultur 30sec bei 20.000x g zentrifugiert, die Zellen mit 100µl TEG (siehe Kapitel 3.6) resuspendiert und mit 150µl frisch angesetztem ALB-Puffer (siehe Kapitel 3.6) lysiert. Nach Zugabe von 150µl 3M Natriumacetat erfolgte eine Zentrifugation (10min, 20.000x g, RT). Anschließend wurden 400µl des gebildeten Überstandes in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1ml Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (1:24 (v/v Chloroform:Isoamylalkohol) versetzt und erneut zentrifugiert (10min, 20.000x g, RT). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 800µl Ethanol (95%, -20°C) präzipitiert (30min, -20°C), dann zentrifugiert (10min, 20.000x g, 4°C) und mit je einem ml 95 und 75 prozentigem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung der DNA (ca. 5min, RT) wurde diese in 30–50µl Tris pH8,5 resuspendiert.

3.9.2.3 Plasmid-DNA-Präparation anhand gebrauchsfertiger Kits

Um einen hohen Reinheitsgrad und DNA-Gehalt zu gewährleisten, wurde bei der Plasmid-Präparation auf gebrauchsfertige Reagenziensysteme zurückgegriffen. Hierbei kam zum einen das *Jetstar Plasmid Preperation kit* (siehe Kapitel 3.1.3) und zum anderen das Perfectprep Plasmid mini kit (siehe Kapitel 3.1.3) zum Einsatz. Es wurden jeweils die Angaben des Herstellers befolgt.

3.9.3 Elektrophorese von DNA in mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese fand bei der Analyse und präparativen Isolierung von DNA Verwendung. Hierbei werden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld der Größe nach

aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose wurde der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst und lag bei 1% (für DNAs mit >1kBp und bei 2% für DNAs mit <1,5kBp). Die Größe der untersuchten DNAs wurde später durch den Vergleich mit DNA-Größenstandards (siehe Kapitel 3.2) ermittelt, welche mit der DNA aufgetrennt wurden.

Die Agarose wurde in TAE-Puffer (siehe Kapitel 3.6) gelöst, bis zum Siedepunkt erhitzt und nach kurzem Abkühlen auf ca. 60°C und nach Zugabe von 0,5µg Ethidiumbromid/ml in die Laufkammer gegossen. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, welcher bei Beleuchtung mit UV-Licht (254nm) fluoresziert und so die Position der DNA im Gel anzeigt. Nach Aushärtung der Agarose wurden die DNA-Proben mit $\frac{1}{6}$ (v/v) DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in TAE-Puffer. Zuletzt wurde die Visualisierung der interkalierten Ethidiumbromid-DNA-Komplexe durch Bestrahlung mit UV-Licht und die photographische Dokumentation durchgeführt.

Für eine präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Gel nach der Auftrennung möglichst kurz (max. 5sek) mit einer schwachen 254/366-nm Lampe beleuchtet, um Schädigungen der DNA durch starke UV-Bestrahlung zu vermeiden. Während der Beleuchtung wurde kurz die Position der jeweiligen DNA im Gel markiert und die Bande anschließend bei normaler Beleuchtung mit einem Skalpell ausgeschnitten.

3.9.4 DNA-Fällung

Mit dieser Methode ist es möglich DNA von anderen Bestandteilen einer Lösung zu trennen. Durch Zugabe von Natriumacetat entstehen Komplexe mit der DNA, die dann aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften in Ethanol unter Zentrifugation ausfallen.

Als erstes wurde der DNA-Lösung 1/10 ihres Volumens an 3M Natriumacetat pH4,5 zugefügt. Nach Zugabe des 2,5 fachen Volumens an 100% Ethanol wurde der Ansatz für 20min bei 4°C und 20.000g zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das entstandene DNA Pellet in 250µl 75% Ethanol resuspendiert und für 5min bei 4°C und 20.000g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt um einen höheren Reinheitsgrad der DNA zu erzielen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet im offenen Reaktionsgefäß 3min. getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 35µl 10mM Tris-Puffer pH8,5 resuspendiert und der DNA-Gehalt, wie unter Kapitel 3.9.9. beschrieben, bestimmt.

3.9.5 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab, Göttingen als Auftragssequenzierungen durchgeführt.

3.9.6 Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen

Um RNA aus Zellen zu extrahieren wurde das *Qiagen RNeasy RNA isolation kit* (siehe Kapitel 3.1.3) verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls verfahren. Nach der Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 3.9.8) der gewonnenen RNA wurde diese bei -20°C bzw. -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.9.7 Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR

Diese Methode kam zum Einsatz um die Transkription bestimmter Gene nachzuweisen. Die quantitative-Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhende Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren. Durch die Verwendung Fluoreszenz-markierter Sonden bietet sie zudem die Möglichkeit der Quantifizierung, da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Für die qRT-PCR wurde das *Quantitect qRT-PCR kit* (siehe Kapitel 3.1.3) verwendet. Hierfür wurden die einzelnen Reaktionsansätze auf Eis in eine 96-*well*-Platte (siehe Kapitel 3.1.2) zusammenpipettiert. In jedes einzelne *well* wurden 8,8ng RNA, 10µl Master-Mix, 0,2µl RT-Mix und 1µl entsprechender Primer pipettiert. Es wurden Primer von PON2 und NOX4 sowie von GAPDH und RNA-Polymerase IIa (Siehe Kapitel 3.5) zur Normalisierung der Werte eingesetzt. Nachdem die Reaktionsansätze pipettiert waren, wurde die Platte mit einer optisch transparenten Folie überzogen und die PCR in einem i-cycler (Siehe Kapitel 3.7) mit folgendem Protokoll gestartet: (50°C 3min, 95°C 15min)_{x1}, (95°C 30sek, 60°C 30sek, 60°C 30sek)_{x40}. Nach vollendeter PCR konnte mittels Fluoreszenzmessung die Menge an amplifizierter RNA berechnet werden.

3.9.8 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von DNA- oder RNA-Präparationen erfolgte mithilfe des NanoDrop Gerätes (siehe Kapitel 3.7). Dies zeichnet sich dadurch aus, dass nur sehr geringe Probenvolumina von ca. 1–2µl benötigt werden.

3.10 Allgemeine Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

3.10.1 Herstellung kompetenter Zellen

Durch Behandlung mit eiskaltem Kalziumchlorid wird in Bakterien ein vorübergehender Zustand der Kompetenz ausgelöst, wodurch die Zellen bei zusätzlicher Behandlung (siehe Kapitel 3.10.2) DNA aufnehmen können. Hierfür wurden *E.coli* Zellen der Stammes DH5α benutzt.

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Hanahan-Methode. Dazu wurden 100µl einer 3ml Über-Nacht-Vorkultur des entsprechenden *E.coli* Stammes in 100ml steriles Standard-I-Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis sich eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt hatte. Alle anschließenden Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis und mit vorgekühlten, sterilen Lösungen (siehe Kapitel 3.6). Nach Zentrifugation für 10min bei 4000g und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 40ml Hanahan-Lösung 1 resuspendiert und 10min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8min bei 4000g und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 4ml Hanahan-Lösung 2 resuspendiert, anschließend aliquotiert und mit etwa –70°C (Trockeneis in Ethanol abs.) schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei –70°C.

3.10.2 Transformation von Plasmiden in prokaryotische Zellen

Durch die Transformation werden Plasmide in Bakterien eingeschleust. Dies ging hier unter Verwendung der Hitzeschock-Methode von statten. Bakterielle Zellen des *E.coli* Stammes DH5α dienten zur Amplifizierung von Plasmiden. Die Herstellung der Chemokompetenz der Zellen ist im vorigen Abschnitt beschrieben.

Für die Transformation von Plasmiden in prokaryotische Zellen wurden 10ng Plasmid verwendet. Zur Transformation wurden 75µl kompetente Zellen mit dem Plasmid für 30min auf Eis (4°C) inkubiert, bevor durch einen Hitzeschock (40sek 42°C) und anschließende Inkubation für 2min bei 4°C die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen bewirkt wurde. Nach einer Zugabe von 500µl Standard-I-Nährmedium und einer 1 stündigen Inkubation bei 37°C und 400rpm wurden die Zellen für 2min mit 4000g sedimentiert, der Überstand bis auf einen Rest von 50µl abgenommen und die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert. Schließlich wurden die transformierten Zellen auf selektiven LB-Agarplatten (siehe Kapitel 3.4) ausplattiert und wuchsen über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank.

3.11 Allgemeine Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.11.1 Kultivierung und Zellzählung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung von EA.hy 926 und SMC Zellen verlief unter Verwendung der unter Kapitel 3.4 genannten Medien im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% für EA.hy 926Zellen und 5% für SMC-Zellen.

Zum Ablösen adherenter Zellen wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesogen, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und die adherenten Zellen mit Trypsin-EDTA (1ml für eine 75cm² Kulturflasche) für 5min inkubiert. Die Zugabe des Trypsins bewirkt eine Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wird durch das serum-haltige Medium gestoppt. Es wurden 10ml Medium hinzugegeben und die Suspension in ein steriles 15ml-Falcon-Röhrchen überführt, nachdem die einzelnen Zellverbände durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette aufgelöst und die Zellen somit vereinzelt wurden. Danach wurden etwa 10µl der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und insgesamt 4 Großquadrate ausgezählt. Der Durchschnittswert dieser Ergebnisse wurde mit dem Faktor 10000 multipliziert, welcher sich aus der Art der Zählkammer ergab und lieferte die Anzahl an Zellen/ml. Daraufhin wurden die Zellen entsprechend der benutzten Kulturschale und der sich anschließenden experimentellen Anforderung ausplattiert.

3.11.2 DNA-Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in 24-well Platten mit einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen ad 1000 μ l Medium ausplattiert. Hierzu wurden die Zellen wie unter Kapitel 3.11.1 geschildert abgelöst, gezählt und so ausplattiert, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von etwa 80% hatten, um die Transfektion von DNA durchführen zu können. Die oben genannten Zell-Mengen wurden mit 1 μ g DNA transfiziert, wobei Nanofectin als Transfektions-Reagenz folgendermaßen nach Protokoll des Herstellers benutzt wurde:

Es wurde 1 μ g DNA und 3,2 μ l Nanofectin in je ein getrenntes 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 μ l 150mM NaCl pipettiert und darin gelöst. Anschließend wurde die Lösung, welche das Nanofectin enthielt, in die DNA-haltige Lösung pipettiert, kurz durch Vortexen vermischt und für 15-20min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Zeitraumes bilden sich aus DNA und Nanopartikeln der Nanofectinlösung Präzipitate, die in die Zelle aufgenommen werden und die DNA durch die Zellmembran schleusen. Danach wurden die 100 μ l Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben, nachdem deren Medium vorher abgesaugt und durch 500 μ l frisches Medium ersetzt worden war. Nach 2h wurde das Medium auf 1ml/well aufgefüllt und nach insgesamt 4h durch 1ml frisches Medium ersetzt.

3.11.3 Behandlung eukaryotischer Zellen mit RNAi

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um eine Methode, bei welcher eukaryotische Zellen mit kurzen dsRNAs (siRNAs) behandelt werden, um in der Zelle eine selektive Abschaltung bestimmter Genexpressionen zu bewirken. Die Sequenz der jeweiligen siRNA bestimmt, welche RNA durch die RNAi-Behandlung reguliert wird. Die Anlagerung der siRNA an eine komplementäre mRNA induziert deren Abbau in der Zelle.

Die RNA-Interferenz ist zunächst in *C.elegans*, später in anderen Spezies entdeckt worden und existiert auch in humanen Zellen (54-57). Sie stellt einen ähnlichen Mechanismus wie das posttranskriptionelle *gene-silencing* (selektives Ausschalten bestimmter Gene) in Pflanzen und Pilzen dar (58-61).

Die natürliche Funktion der RNAi scheint dabei die Verteidigung des Genoms gegen mobile genetische Elemente, wie z.B. Viren zu sein. Dieser Vorgang wird durch kurze, 21 bis 23 nt

lange, doppel-strängige RNAs (dsRNAs) vermittelt, die den spezifischen Abbau von mRNAs mit homologen Sequenzen verursachen und ist auf das Cytoplasma beschränkt (62, 63).

Bei sämtlichen Experimenten mit siRNA wurde stets ein Teil der EA.hy 926-Zellen unbehandelt gelassen, ein Teil mit PON2-siRNA und ein Teil mit Kontroll-siRNA behandelt.

Die Kontroll-siRNAs sind nicht komplementär zu anderen bekannten Gensequenzen. Somit induzieren sie zwar die zelluläre Reaktion der RNAi, führen aber nicht zu einer spezifischen mRNA Degradation und dienen somit als unspezifische Kontroll-Reaktion.

Zwischen Applikation der siRNAs und Beginn des Experiments vergingen 3–4 Tage, da es sich während der Durchführung dieser Arbeit ergeben hatte, dass die siRNA vermittelte Degradation der PON2-mRNA zwar nach 24h erfolgte, eine Destabilisierung des PON2 Proteins aber erst nach etwa 3 bis 4 Tagen verzeichnet werden konnte.

Die Zellen wurden am Tag vor der Behandlung mit PBS gewaschen, trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden etwa $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in 1ml Medium in 24-*well*-Platten ausgesät, sodass sie am Behandlungstag ca. 60% konfluent waren.

Am Tag der Behandlung wurden die Zellen nach Kontrolle der Zelldichte folgendermaßen behandelt: Vorhandenes Medium wurde abgesaugt und durch 700µl Medium ersetzt. Danach wurden 100µl Reaktionsansatz zugefügt. Zur Herstellung des Reaktionsansatzes wurden 98µl des im Kit enthaltenen Puffers und 2µl PON2 siRNA zusammenpipettiert und kurz gevortext. Zu diesen 100µl wurden weitere 3,6µl RNAifect pipettiert und weitere 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurde der ganze Ansatz für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe des Reaktionsansatzes wurden die Zellen für 5 bis 6 Stunden im Inkubator belassen. Nach dem anschließenden Mediumwechsel war die Behandlung abgeschlossen und die Zellen konnten den Anforderungen der folgenden Experimente entsprechend weiterverarbeitet werden.

3.11.4 Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbungen eukaryotischer Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation des PON2 Proteins verfolgen zu können wurden PON2-GFP transfizierte EA.hy 926-Zellen verwendet. Dies erlaubt eine Betrachtung und Dokumentation der Lokalisation in der lebenden Zelle. Es war jedoch notwendig, bestimmte andere Strukturen in den Zellen, wie Nuklei oder andere Proteine, anzufärben. Dafür mussten die Zellen auf einem Deckglas fixiert werden. Ferner mussten die Zellen permeabilisiert

werden, damit anschließend Färbereagenzien zugegeben werden konnten, sowie primäre und sekundäre Antikörper, die gegen bestimmte zelluläre Proteine gerichtet waren. Schließlich wurden die Zellen mit dem Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert und anschließend die Lokalisation der jeweiligen Proteine und Strukturen im Mikroskop ausgewertet.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen eukaryotischer Zellen wurden die Zellen in 24-*well*-Platten, wie oben beschrieben, ausplattiert, wobei zuvor in das jeweilige *well* ein Deckgläschen eingelegt worden war. Zur späteren Detektion des PON2 Proteins wurden entweder stabil mit PON2-GFP transfizierte EA.hy 926-Zellen oder EA.hy 926-Zellen bei denen PON2 durch Behandlung mit primärem und sekundärem Antikörper sichtbar gemacht wurde, benutzt. Zur Darstellung der Nuklei wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (siehe Kapitel 3.1.1) angefärbt, der sich an die DNA anlagert und so die Zellkerne fluoreszieren lässt. Das endoplasmatische Retikulum wurde durch einen *ER tracker dye red* (siehe Kapitel 3.1.3) sichtbar gemacht. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der an bestimmte Kalium-Kanäle bindet, welche vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind und letzteres somit sichtbar macht.

Die Fixierung der Zellen erfolgte nach der folgenden Methanol-Aceton-Methode (alle Volumina = 500µl, alle Lösungen -20°C, sowie die Zellen gekühlt auf Eis): Nach Absaugen des Mediums und dreimaligem Waschen der Zellen mit 4°C kaltem PBS-Puffer folgte eine Inkubation mit Methanol für 5min und mit Aceton für 30sec. Nach Absaugen des Acetons wurden die Glasplättchen über Nacht bei -20°C gelagert. Bei allen Vorgängen verblieben die Glasplättchen in der Kulturschale. Vor der immunocytochemischen Färbung wurden die Zellen zunächst etwa 10min bei 4°C mit PBS rehydriert und anschließend zur Färbung entnommen (siehe unten).

Beim Färben kamen folgende Antikörper zum Einsatz: Als primäre Antikörper wurden α -PON2 (1:250) und Maus- α -Calnexin (1:71) verwendet. Zur Visualisierung wurden als sekundäre Antikörper Cy-3-konjugierter AffiniPure Ziege- α -Kaninchen (1:100), FITC-konjugierter AffiniPure Esel- α -Maus (1:50), sowie DAPI (1:100) benutzt (siehe Kapitel 3.2). Alle Antikörper wurden in 5-prozentigem Ziegen-Serum in PBS-Puffer auf die fixierten Zellen gegeben.

EA.hy 926-Zellen wurden, wie oben beschrieben, fixiert, die Objektträger aus der Kulturschale entnommen und bei Raumtemperatur auf Parafilm gelegt. Nun wurden die Präparate im Dunkeln mit 5-prozentigem Ziegen-Serum in PBS-T-Puffer (siehe Kapitel 3.6) geblockt und dann für 1,5h mit den primären Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T-Puffer für jeweils 10min, erfolgte die 1h Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Nach weiteren drei zehnmütigen Waschschritten war die Färbung

abgeschlossen und die Glasplättchen wurden mit 8µl Einbettungsmedium (siehe Kapitel 3.2) auf einem Objektträger fixiert und zum Trocknen und Aushärten über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Bei der Mikroskopie lebender Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen: EA.hy PON2-iso1-GFP-Zellen wurden in einer mit Glasboden versehenen Doppelkammer (siehe Kapitel 3.1.2) in einer Dichte von $1,8 \cdot 10^5$ Zellen/Kammer einen Tag vor der Färbung ausgesät. Am Tag darauf wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS) (siehe Kapitel 3.1.2) gewaschen und dann für 30min bei 37°C in vorgewärmter Färbelösung inkubiert. Diese enthielt *ER-tracker dye red* (siehe Kapitel 3.6) in einer Verdünnung von 1:1000 und DAPI in der Verdünnung 1:100. Nach Ende der Inkubation mit der Färbelösung wurde diese durch 2ml normales Medium/Kammer ersetzt und die Zellen mit einem Zeiss 510 *confocal laser scan microscope* mit UV-laser (Zeiss) analysiert. Die Bilder wurden mit einem 1,4 oil / DIC 63x Zeiss Plan-apochromat Objektiv und in Zusammenarbeit mit Dr. Dennis Strand, I. Innere Medizin, Universitätsmedizin Mainz angefertigt.

3.11.5 Herstellung von Gesamt-Protein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen

Um Gesamt-Protein-Extrakte aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Zellen wurden zweimal mit gekühltem PBS (137mmol/l NaCl, 3mmol/l KCl, 10mmol/l Na₂HPO₄, 2mmol/l KH₂PO₄, pH7.4) gewaschen und durch Zugabe von gekühltem RIPA-buffer (100mmol/l Tris-HCl pH7.4, 150mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 1% Na-deoxycholate, 1% SDS, 1mmol/l DTT, protease-inhibitor cocktail Complete) durch 20 minutiges Schütteln bei 4°C lysiert. Da das Lysat durch die freigesetzte DNA der Zellen viskös zu werden drohte, wurden 50U/ml Benzonase (siehe Kapitel 3.2) hinzugefügt, um die DNA zu zersetzen. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Lysate wie unter Kapitel 3.8.1 beschrieben.

3.11.6 Inkubation eukaryotischer Zellen mit TGF-β

Es wurden 6 *wells* SMC (siehe Kapitel 3.4) in 24-*well*-plates mit einer Dichte von $8 \cdot 10^4$ cells/ml, wie unter Kapitel 3.11.1 beschrieben, ausplattiert. Am Folgetag wurden je zwei *wells* SMC für die Dauer von jeweils 6h und 24h mit 10ng/ml TGF-β (siehe Kapitel 3.1.1) gelöst in

Zellkulturmedium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle diente eine 24h Inkubation von zwei weiteren *wells* mit reinem Zellkulturmedium unter gleichen Bedingungen. Nach Ende der Inkubation wurde die RNA der Zellen, wie unter Kapitel 3.9.6 beschrieben, gewonnen, die Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.9.8) und alle Proben auf den gleichen RNA-Gehalt eingestellt und eine qRT-PCR (siehe Kapitel 3.9.7) durchgeführt.

3.12 Spezielle proteinbiochemische Methoden

3.12.1 Behandlung von EA.hy 926-Zellen mit Proteinase K

Ziel der Behandlung von Zellen mit Proteinase K ist der enzymatische Abbau sämtlicher Proteine, welche außerhalb mit der Plasmamembran assoziiert, also extrazellulär lokalisiert sind. Dabei muss die Integrität des Zytoplasmas gewährleistet bleiben, um den Abbau intrazellulärer Proteine zu verhindern. Bei Proteinase K handelt es sich um eine Serinprotease. (Siehe Kapitel 3.1.1) Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Proteinase K Konzentrationen (25µg/ml und 75µg/ml) für jeweils 5min, 10min und 15min inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Kontrolle unbehandelt gelassen.

Es wurden konfluent mit EA.hy 926-Zellen bewachsene *6-well*-Platten benutzt. Nach Waschen der Zellen mit je 2 x 1ml PBS-CM (siehe Kapitel 3.6) erfolgte die Inkubation mit Proteinase K gelöst in 500µl PBS-CM/well in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500µl PBS mit 5mM PMSF/well hinzugefügt, um die Enzymaktivität der Proteinase K zu stoppen. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Pipettieren wurden die Zellen abgelöst und dann für eine Zentrifugation (5min, 1.200g, 4°C) in jeweils 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Das entstandene Zellpellet wurde in 500µl PBS mit 5mM PMSF resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.200g, 5min, 4°C). Danach wurden die Zellen mit 200µl RIPA-Puffer für 20min bei 4°C unter end-over-end Rotation (siehe Kapitel 3.6) lysiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Zum Herabsetzen der Viskosität erfolgte eine weitere Zentrifugation (12.400g, 20min, 4°C) und eine Überführung des gebildeten Überstandes in neue Reaktionsgefäße. Die Kontroll-Zellen wurden ebenfalls zweimal mit PBS-CM gewaschen und dann für 15min mit PBS-CMSF ohne Proteinase K inkubiert. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde mit den Kontrollzellen genauso wie mit den Proteinase K behandelten Zellen verfahren.

Nach Proteinbestimmung der Lysate (siehe Kapitel 3.8.1) erfolgte die anschließende SDS-PAGE und der Western blot (siehe Kapitel 3.8.2 und 3.8.3) unter Verwendung folgender Antikörper: α -PON2- und α -Tubulin-Antikörper (siehe Kapitel 3.8.3) sowie ein polyklonaler Kaninchen- α -Angiotensin-II₁-Rezeptor-Antikörper (1:150). Dieser richtet sich gegen den extrazellulär lokalisierten Angiotensin-II₁-Rezeptor. Als sekundärer Antikörper diente ein α -Kaninchen-Antikörper (1:5000).

3.13 Spezielle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.13.1 Messung intrazellulärer ROS-Spiegel in EA.hy 926-Zellen

Mit dieser Methode ist es möglich die Menge an ROS (Reactive Oxygen Species) in Zellen zu bestimmen. ROS-Spiegel wurden mittels Fluoreszenz und Chemilumineszenz bestimmt. Das verwendete Luminolderivat L-012 (siehe Kapitel 3.1.1) misst intrazelluläre ROS-Spiegel, doch können ggf. auch extrazelluläre ROS detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse zum Teil mit dem ROS-Reporter Carboxy-H₂DCFDA (siehe Kapitel 3.1.1) bestätigt. Diese Chemikalie wird erst durch intrazelluläre Esterasen aktiviert und reflektiert somit eindeutig intrazelluläres ROS. Zwei verschiedene Arten der Messung kamen zur Anwendung: Entweder wurde eine einzelne Messung des aktuell vorherrschenden ROS-Spiegels vorgenommen oder es wurde ein zeitabhängiger Verlauf der ROS-Spiegel dokumentiert.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Am Tag vor der Messung wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen/well in einer 96-well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 500 μ mol/l L-012 in HBSS bei 37°C für 15min vorinkubiert. Danach wurde 10 μ mol/l DMNQ (siehe Kapitel 3.1.1) oder zur Kontrolle 0,5% DMSO in Medium dazu gegeben. Nun wurde die durch ROS induzierte Chemilumineszenz alle 5min für 2h mit einem Centro LB960 Platten Luminometer (siehe Kapitel 3.7) gemessen. Alternativ wurden die Zellen 24h mit Tunicamycin (15 μ g/ml), Thapsigargin (1nM, 10nM, 30nM) oder TGF- β 1 (10ng/ml) in Medium vorinkubiert. Anschließend wurden die intrazellulären ROS-Spiegel wie oben beschrieben vermessen.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde wie folgt vorgegangen: Zellen wurden wie oben genannt, in 96-well-Platten ausgesät, gewaschen und mit Carboxy-H₂DCFDA (2.5nmol/l) bei 37°C für 30min vorinkubiert, mit HBSS gewaschen und mit den gleichen Substanzen

behandelt. Die Fluoreszenz wurde dann bei 480nm/510 nm mit einem Fluostar Optima Fluometer (siehe Kapitel 3.7) bei 37°C bestimmt.

Sollte eine ROS-Messung nach si-RNA-Behandlung durchgeführt werden, erfolgte die Behandlung mit RNAi wie unter Kapitel 3.11.3 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen aus den 24-*well*-Platten trypsinisiert, gepoolt, gezählt (siehe Kapitel 3.11.2) und dann zur Messung in einer 96-*well*-Platte neu ausgesät.

3.13.2 PON2-Promoter Dual-Luciferase Reporter Assay

Mit den hier beschriebenen Reporter-Gen-Analysen wurde die Aktivität des PON2-Promoter-Fragmentes untersucht, welches wie unter Kapitel 3.9.1 beschrieben, kloniert wurde. Ziel ist es, mögliche Regulationen des Promoters aufzudecken. Zu diesem Zweck ist im pGI4.10luc2-PON2-Promoter-Vektor (siehe Kapitel 3.9.1) die Gensequenz der *firefly-luciferase* jener des PON2-Promoter-Fragments nachgeschaltet, sodass diese Genexpression der Kontrolle des PON2-Promoters unterliegt. Endotheliale EA.hy 926-Zellen wurden mit diesem Plasmid transfiziert, mit verschiedenen Reagenzien behandelt und anschließend wurde die Enzym-Aktivität der *firefly luciferase* gemessen. Da die Transfektionseffizienz entscheidenden Einfluss auf die Signalstärke und Reproduzierbarkeit hat, wurde der Vektor pRL-EFalpha (siehe Kapitel 3.3) kotransfiziert. Dieser kodiert eine andauernde Expression der *renilla-luciferase*, sodass deren Enzymaktivität ebenfalls gemessen werden kann. Diese Aktivität ist proportional zur Transfektionseffizienz und erlaubt die Normalisierung der *firefly-luciferase* Aktivität relativ zur Menge der transfizierten Zellen.

EA.hy 926-Zellen wurden, wie unter Kapitel 3.11.1 beschrieben, mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen in 1ml Medium in 24-*well*-Platten ausgesät, um am Folgetag eine Konfluenz der Zellen von 60-80% zu erreichen. Nun erfolgte die Transfektion (siehe Kapitel 3.11.2) der Zellen mit 1µg PON2-Promoter und 50ng *renilla-luciferase* im Verhältnis (Experimenteller Vektor:Kontrollvektor) 20:1. Nach Abschluss der Transfektion erfolgte die spezifische Behandlung der Zellen mit in HBSS gelöstem DMSO (0,5%), Tunicamycin (0,1µg/ml, 0,µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml) und DMNQ (10µM). Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 1 ml HBSS gewaschen und dann je drei 24-*wells* für jeweils 1h, 2h, 4h, 6h, 8h und 16h mit den Substanzen inkubiert.

Der Reporter Assay wurde dann mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Siehe Kapitel 3.1.3) durchgeführt. Zellysate werden nacheinander mit zwei im Kit gelieferten

substrathaltigen Lösungen versetzt und deren Umsetzung erzeugt messbare Biolumineszenzsignale, welche in Relation zueinander gesetzt Aussagen über die Aktivität des Promoters erlauben.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach dessen vollständigem Absaugen mit 100µl/24-well im Kit enthaltenen *Passive Lysis Buffer* (PLB) für 15min bei Raumtemperatur unter Schütteln lysiert. Nach vorsichtigem Abtragen der Zellen durch leichtes Kratzen mit einer Pipettenspitze wurden die Lösungen in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und konnten, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, entweder bei -80°C gelagert, oder sofort ohne Stickstoffbehandlung zur Durchführung eines Reporter-Assays eingesetzt werden.

Die Messung mit je 20µl Lysat erfolgte nach Protokoll des Herstellers in einer 96-well-Platte unter Verwendung eines Centro LB960 Platten-Luminometers (siehe Kapitel 3.7) mit auf Raumtemperatur temperierten Lösungen und Lysaten, um die enzymatischen Aktivitäten der Luciferasen nicht zu beeinträchtigen. Nach beendeter Messung wurde das Injektorsystem des Luminometers gereinigt, um Reste der Lösungen zu beseitigen.

3.14 Durchführung statistischer Analysen

Zur Erstellung der in Kapitel 4 gezeigten Graphiken wurden die Programme *graph pad prism 3.00*, sowie *Clone Manager Suite 7* verwendet. Die Maxima der in den Abbildungen 4 und 5 gezeigten Graphen wurden mittels nichtlinearer Regression auf statistische Signifikanz überprüft. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der Graphen in den Abbildungen 6 und 7 erfolgte mittels 2-way ANOVA. Die Berechnungen wurden ebenfalls mit der Software *graph pad prism 3.00* durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisation von PON2-iso1

4.1.1 Die subzelluläre Lokalisation von PON2 mittels direkter Fluoreszenz

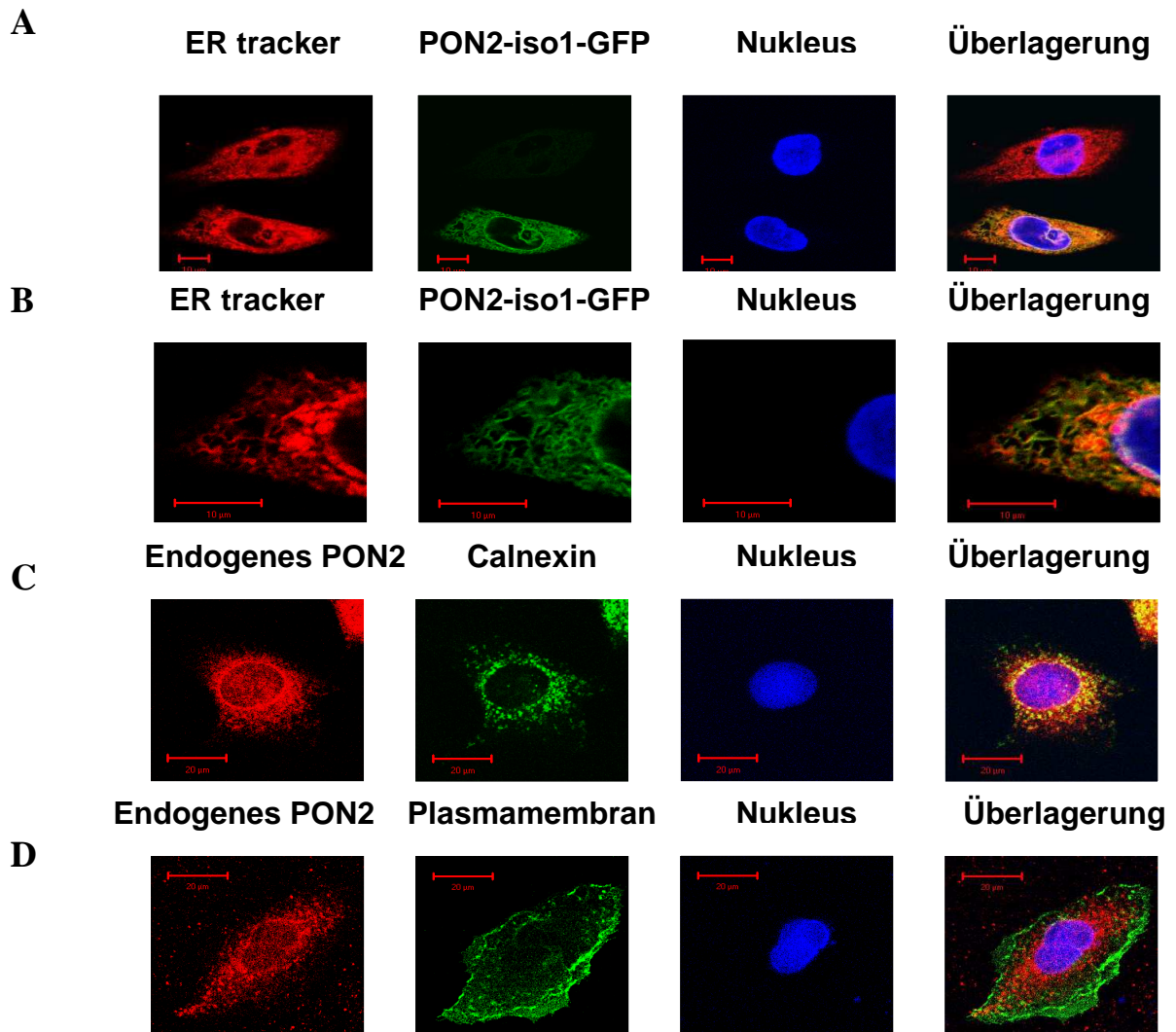
Ziel der in Kapitel 2.11.4 beschriebenen, durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen war die Analyse der subzellulären Lokalisation von PON2-iso1. Hierzu wurden mittels konfokalem Mikroskop die in Abbildung 2 gezeigten Aufnahmen von normalen EA.hy 926-Zellen und EA.hy 926-Zellen, die stabil das PON2-iso1-GFP-Konstrukt überexprimieren, angefertigt.

Wie die Abbildungen 2A und 2B zeigen, ergab die Analyse der PON2-iso1-GFP überexprimierenden EA.hy 926 Zellen schwache PON2-Signale (grün) innerhalb des Nukleoplasmas. Stärkere Signale werden perinukleär und tubulär in die Peripherie auslaufend detektiert und spiegeln die Lokalisation von PON2-iso1-GFP mit der Kernlamina und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) wider. Die Lokalisation von PON2-iso1-GFP innerhalb des ER wird in der Überlagerungsaufnahme deutlich: Nach Anfärbung des ER (rot) mit einem *ER tracker dye red* zeigt die Überlagerungsaufnahme der grünen tubulär strukturierten PON2-iso1-GFP-Signale mit den roten Signalen des ER gelbe Signale als Zeichen der fast vollständigen Kolo-kalisation von PON2-iso1-GFP mit dem ER. Die Zellkerne wurden in dieser und den folgenden Abbildungen mit DAPI blau gefärbt.

Abbildung 2C zeigt hingegen die Lokalisation von endogenem PON2-iso1 innerhalb normaler EA.hy 926-Zellen: Nach Visualisierung des primären PON2-Antikörpers mittels Cy-3-assoziiertem sekundärem Antikörper (rot) lassen sich starke PON2-Signale intra- und perinukleär nachweisen. Die intranukleären Signale sind im Vergleich zu den PON2-iso1-GFP Signalen stärker. Zur Färbung des ER wurde ein Antikörper gegen das im ER lokalisierte Chaperon Calnexin verwendet und dieser dann mit einem FITC-konjugiertem sekundären Antikörper (grün) sichtbar gemacht. Auch das endogene PON2 zeigt in der Überlagerungsaufnahme größtenteils eine Kolo-kalisation mit dem ER.

In Abbildung 2D ist nach Anfärben von endogenem PON2 mittels der o.g. Antikörper (rot) und Visualisierung der Plasmamembran (grün) durch Transfektion der Zellen mit pE-YFP-MGM in der Überlagerungsaufnahme keine Lokalisation von PON2 innerhalb der Plasmamembran zu erkennen und eine Kolo-kalisation von PON2 damit ausgeschlossen.

Abbildung 2E zeigt EA.hy 926 PON2-iso1-GFP überexprimierende Zellen die mittels *ER tracker dye red* angefärbt wurden. Anschließend wurde nur eine der zwei Fluoreszenzen (rot bzw. grün) angeregt, jedoch beide detektiert. Da je nur der angeregte Farbstoff detektiert werden konnte, belegt dies, dass es zu keinerlei Kreuzreaktionen während der Emissionen nach Anregung spezifischer Farbspektren kam. Dies dient als Kontrolle der Einstellungen am konfokalen Mikroskop.



E

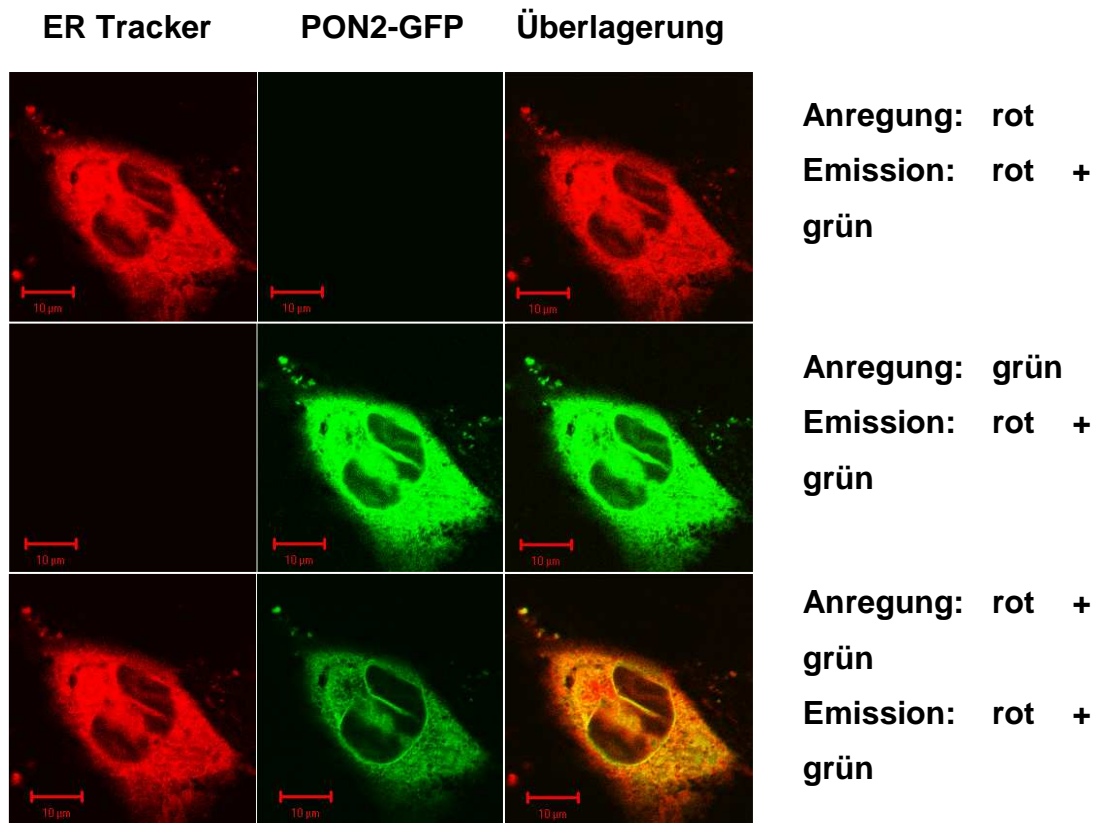


Abb.2: PON2-iso1 ist hauptsächlich perinukleär und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. A, Lebende PON2-iso1-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit *ER tracker dye red* und die Zellkerne mit DAPI gefärbt; Analyse der Zellen erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. B, Ausschnitt-Vergrößerung der unteren Zelle aus A. C, Fixierte nicht PON2-iso1 überexprimierende EA.hy 926-Zellen angefärbt mit DAPI und primären Antikörpern gegen PON2 und Calnexin; Visualisierung der primären Antikörper mit sekundären Antikörpern (gegen PON2 Cy3-konjugiert, gegen Calnexin Cy2-konjugiert). D, Nicht PON2-iso1 überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden vorübergehend mit einem für ein GFP-gekoppeltes Plasmamembran-Protein kodierendem Plasmid transfiziert und tags darauf fixiert; Endogenes PON2 und Zellkerne wurden wie in C gefärbt; Die Zellen wurden mittels konfokalem Mikroskop untersucht. Skalen = 10μm (A, B, E) und 20μm (C, D). E, Lebende PON2-iso1-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit *ER tracker dye red* gefärbt; Anschließend wurden jeweils die Farbspektren rot, grün und rot-grün angeregt und die Emission in den anderen Spektren detektiert, um Kreuzreaktionen auszuschließen.

4.1.2 Die subzelluläre Lokalisation von PON2 mittels biochemischer Methoden

Um die in Kapitel 4.1.1 vorgestellten Ergebnisse zu untermauern und eine Lokalisation von PON2 mit der Plasmamembran durch ein weiteres Experiment auszuschließen, wurden EA.hy 926-Zellen transient mit dem PON2-iso1-GFP-Konstrukt transfiziert und dann die kompletten Zellen mit Proteinase K in unterschiedlichen Konzentrationen und über verschiedene Zeiträume inkubiert. Diese Proteinase degradiert Proteine, ohne dabei die Integrität der Plasmamembran zu verletzen. Da die kompletten Zellen mit Proteinase K inkubiert wurden, wurden extrazellulär mit der Plasmamembran assoziierte Proteine degradiert, während intrazellulär lokalisierte durch die Plasmamembran vor Verdau geschützt wurden. Nach Ende der Inkubationszeiten wurde die enzymatische Aktivität der Proteinase gestoppt, Zellysate hergestellt und ein Western blot angefertigt. Hierbei wurden Antikörper gegen PON2-iso1-GFP, gegen α -Tubulin und gegen den mit der Plasmamembran assoziierten Angiotensin-II-Rezeptor verwendet.

Auf dem in Abbildung 3 gezeigten Western blot erkennt man, dass mit ansteigenden Inkubationszeiten mit zwei verschiedenen Proteinase K Konzentrationen die Angiotensin-II-Rezeptor-Banden, verglichen mit der unbehandelten Kontrollbande (Spur 1), schwächer werden. Die Abschwächung der Filmschwärzung belegt eine Abnahme der vorhandenen Proteinmenge: Der auf der Plasmamembran lokalisierte Angiotensin-II-Rezeptor wurde degradiert.

Vergleicht man die Tubulin-Banden darunter, so lässt sich hier unabhängig von Proteinase K-Konzentration und Inkubationszeit stets die gleiche Signalstärke detektieren. Dies zeigt einerseits, dass bei allen Proben die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde und dass das intrazellulär lokalisierte α -Tubulin von der Proteinase K nicht verdaut wurde.

Die untere Reihe des Western blots zeigt die detektierten PON2-GFP-Banden: Wie die Tubulin-Banden nimmt deren Menge ebenfalls nicht ab, unabhängig von Inkubationszeit oder Konzentration der Proteinase. Damit ist eine Lokalisation von PON2-GFP auf der Plasmamembran nahezu ausgeschlossen, da kein Verdau von PON2-GFP stattfand. Ebenso fällt auf, dass die Behandlung auch nicht das apparente Molekulargewicht des Proteins änderte, sodass anzunehmen ist, dass PON2-iso1-GFP vollkommen vor der Degradation durch Proteinase K geschützt war.

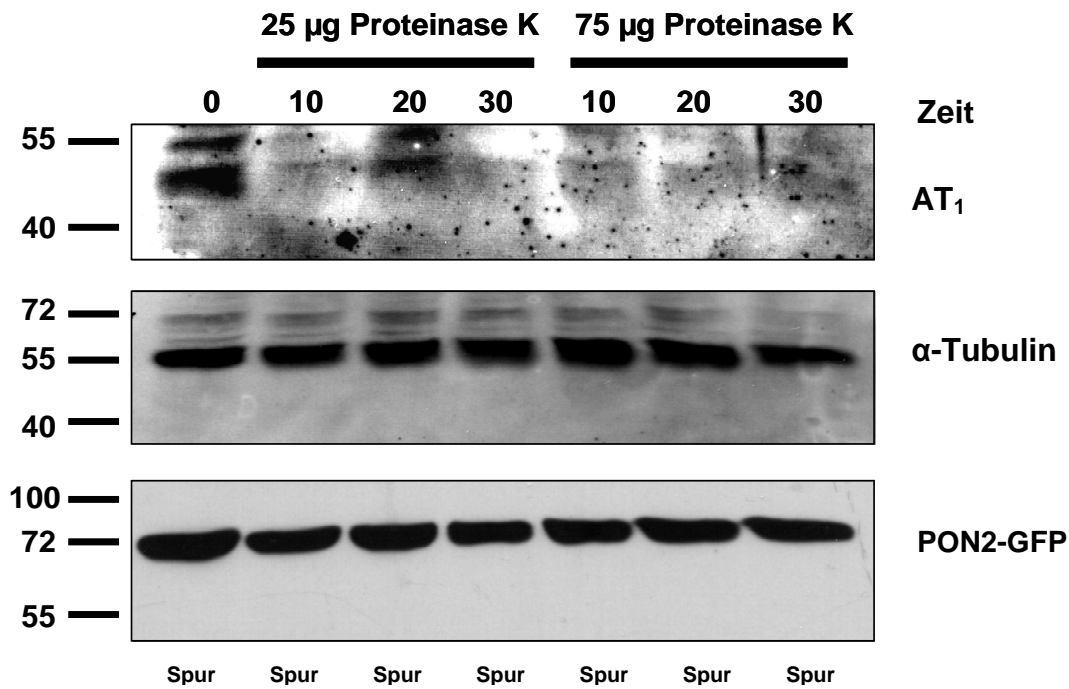


Abb.3: Biochemische Analyse bestätigt die intrazelluläre Lokalisation von PON2-iso1. PON2 ist geschützt gegen die Degradation durch extrazellulär applizierte Proteinase K. EA.hy 926-PON2-iso1-GFP-überexprimierende-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit 25 oder 75µg/ml Proteinase K für 10, 20 und 30 Minuten inkubiert. Nach Stoppen des enzymatischen Verdau wurden die Zellen lysiert und ein Western blot unter Verwendung von Antikörpern gegen Angiotensin II₁Rezeptor (AT₁), α-Tubulin und GFP angefertigt. Es wurden stets gleiche Mengen an Protein (75µg) aufgetragen. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewicht-Marker (kDa) verzeichnet.

4.2 Messung intrazellulärer ROS-Spiegel

Zur Messung intrazellulärer ROS-Spiegel wurde sowohl das Luminolderivat L-012,(64, 65) als auch der ROS-Reporter H₂DCFDA verwendet. Durch L-012 ist es möglich die intrazellulären Mengen an Superoxid und Peroxid zu bestimmen Da prinzipiell allerdings auch extrazelluläre ROS detektiert werden könnten, kam auch der ROS-Reporter H₂DCFDA zum Einsatz, da dieser erst intrazellulär durch Esterasen aktiviert wird und somit vornehmlich intrazelluläre ROS misst.

4.2.1 Die Reduktion intrazellulärer ROS durch PON2 in endothelialen EA.hy 926-Zellen

EA.hy 926-Zellen sowie die beiden PON2-iso1-überexprimierenden Zelllinien EA.hy-PON2-GFP und EA.hy-PON2-HA wurden mit der ROS-freisetzenden Substanz DMNQ (66) inkubiert und dann für zwei Stunden die intrazellulären ROS-Spiegel unter Verwendung des Luminolderivats L-012 in einem Fluometer gemessen. Bei dieser Reaktion kommt es zur ROS-induzierten Chemilumineszenz von L-012, was durch das Fluometer detektiert wird. In Abbildung 4 kann man entlang der y-Achse den prozentualen Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion in den drei verschiedenen Zelllinien gegen die Zeit auf der x-Achse ablesen. Alle drei Kurven zeigen einen annähernd sigmoidalen Verlauf. Innerhalb der ersten 15 Minuten steigen die intrazellulären ROS-Spiegel in allen drei Zelllinien noch etwa gleich stark an. Die Steigung der EA.hy 926-Kontroll-Zellen nimmt jedoch nach etwa einer halben Stunde deutlich zu und erreicht nach etwa 1,5 Stunden ihren höchsten Punkt bei einem Anstieg der ROS-Produktion von etwa 580%. Ab diesem Zeitpunkt verläuft die Kurve plateauförmig, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sich das DMNQ erschöpft hat, während ein L-012 Signal noch detektierbar ist. Die beiden PON2-überexprimierenden Zelllinien erreichen ihren Höchstwert nach 1,25 Stunden: Für die PON2-iso1-GFP Zellen liegt er bei 180% Zunahme und für die PON2-iso1-HA Zellen bei 160% Zunahme der ROS-Spiegel. Dann verlaufen auch diese beiden Kurven plateauförmig.

Damit ist die Zunahme der intrazellulären ROS-Freisetzung in den normalen EA.hy 926 Zellen etwa 400% höher verglichen mit der ROS-Zunahme in den beiden PON2-iso1 überexprimierenden Zelllinien PON2-iso1-GFP und PON2-iso1-HA. Die statistische Analyse erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die PON2-iso1 überexprimierenden Zellen zeigten statistisch signifikant niedrigere ROS-Spiegel als die Kontroll-Zellen mit $p < 0,001$.

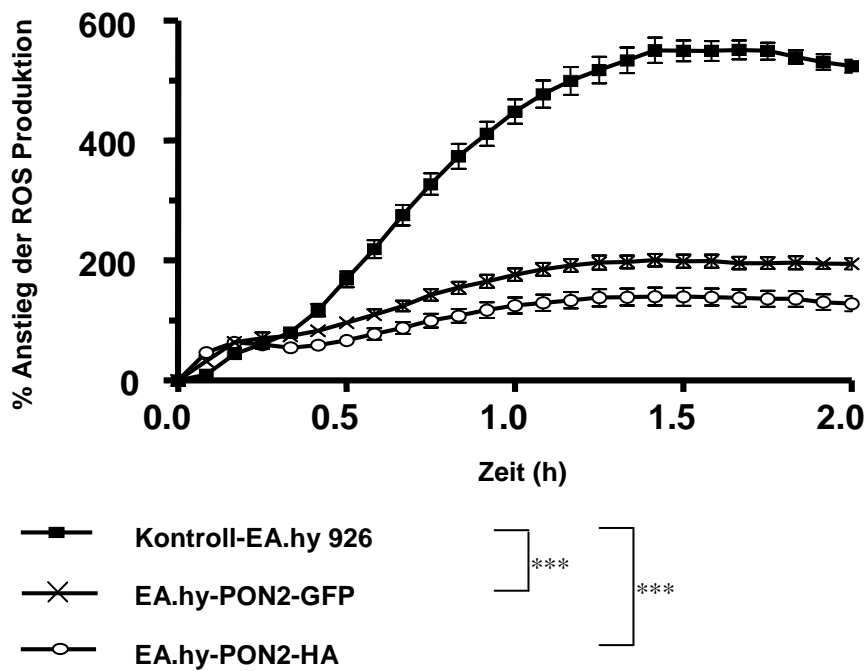


Abb.4: PON2 überexprimierende EA.hy 926-Zellen zeigen signifikant niedrigere ROS-Spiegel nach Inkubation mit DMNQ. ROS-Produktion während DMNQ Inkubation wurde in nativen und PON2-iso1-GFP/HA-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen mit L-012 detektiert. Nach Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ DMNQ wurde die ROS-Produktion im Verlauf von zwei Stunden gemessen. Jeder Punkt beinhaltet ≥ 3 individuelle Messungen (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) und wurden anhand ≥ 3 verschiedener Experimente verifiziert. Die Maximalwerte der Kurve wurden mittels nichtlinearer Regression berechnet und zeigen statistisch signifikante Unterschiede (***) ($p < 0,001$).

4.2.2 Die Reduktion intrazellulärer ROS durch PON2 in primären, glatten Muskelzellen

Bei diesem Experiment wurden SMC-Zellen verwendet um zu zeigen, ob PON2-iso1 nicht nur in Endothelzellen der Intima, sondern auch in glatten Muskelzellen der Media ROS reduziert. SMC-Zellen wurden mit unspezifischen und PON2-spezifischen siRNAs behandelt, um die intrazelluläre Menge an PON2-iso1 zu reduzieren. Ein Teil der Zellen wurde mit PON2-RNAi, ein Teil mit Kontroll-RNAi behandelt und ein Teil wurde unbehandelt gelassen. Nach drei Tagen wurde von einem Teil der Zellen ein Western blot angefertigt. Hierbei wurden Antikörper gegen PON2 und α -Tubulin verwendet. Da die Reduzierung von PON2-

iso1 nach drei Tagen am größten war, wurde der andere Teil der Zellen nach Ablauf von drei Tagen mit der ROS-freisetzenden Substanz DMNQ inkubiert. Um ausschließlich intrazelluläre ROS zu messen wurde der ROS-Reporter H₂DCFDA zur Detektion verwendet und die ROS-Spiegel für zwei Stunden vermessen.

Abbildung 5A zeigt den drei Tage nach RNAi-Behandlung durchgeführten Western blot der SMC-Zellen. Nach Verwendung von Antikörpern gegen PON2 und α -Tubulin erkennt man, dass die Menge an PON2 in den PON2-RNAi behandelten Zellen deutlich niedriger ist als in den beiden Kontroll-Behandlungen. Die Menge an α -Tubulin ist in allen drei Proben gleich groß und belegt, dass gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden (jeweils 25 μ g). Somit war die siRNA-Behandlung erfolgreich und führte folglich zu einer effektiven Reduktion der endogenen PON2-Protein-Spiegel.

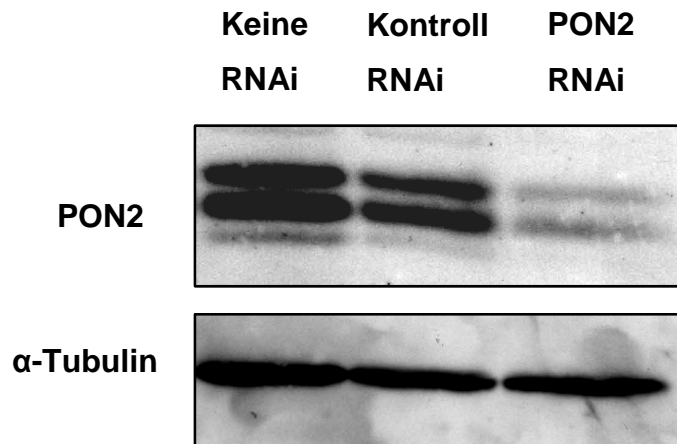
In Abbildung 5B kann man entlang der y-Achse den prozentualen Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion in den drei verschiedenen Zelllinien gegen die Zeit auf der x-Achse ablesen. Auch hier zeigen alle drei Kurven einen annähernd sigmoidalen Verlauf, doch nimmt die Steigung der Kurve der PON2-RNAi behandelten Zellen nach etwa 15min an Steilheit zu. Die Kurve der PON2-RNAi behandelten Zellen erreicht ihren Maximalwert nach etwa 1,25 Stunden bei einem Anstieg des ROS-Spiegels von ca. 900% und verläuft dann plateauförmig und annähernd parallel zur x-Achse.

Die Kurven der Kontroll-RNAi behandelten und der unbehandelten Kontroll-SMC-Zellen erreichen ihren Maximalwert ebenfalls nach etwa 1,25 Stunden, allerdings liegt dieser bei einem Anstieg der ROS-Produktion von etwa 500%. Auch die Plateauphasen der beiden Kurven verlaufen parallel zur x-Achse, allerdings bei einem y-Wert von etwa 500%.

Die Zunahme der intrazellulären ROS-Spiegel in den mit PON2-RNAi behandelten SMC-Zellen ist somit um ca. 480% höher als die der beiden Kontrollen. Dies zeigt, dass endogenes PON2-iso1 in der Lage ist die Zellen vor hohen ROS-Spiegeln zu schützen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die PON2-RNAi behandelten SMC-Zellen zeigten statistisch signifikant höhere ROS-Spiegel als die Kontroll-Zellen mit $p < 0,001$.

A



B

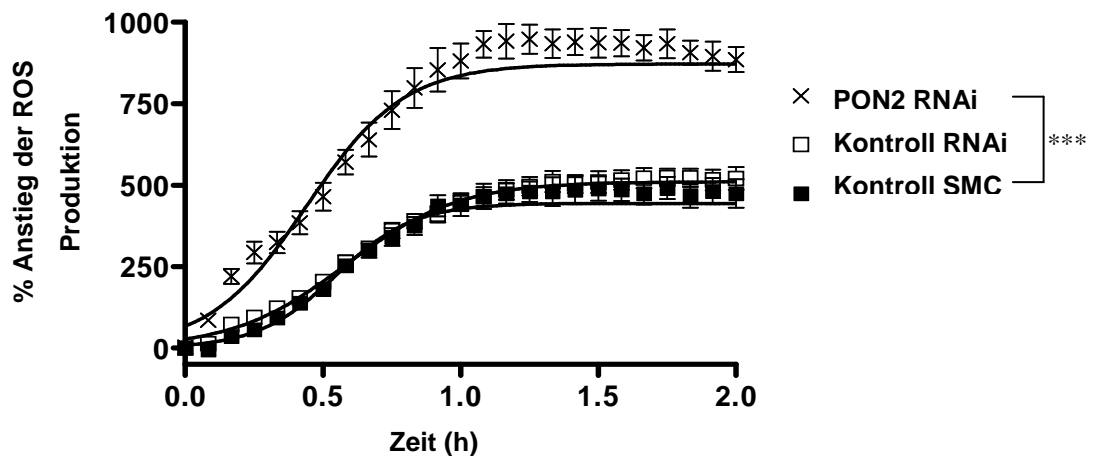


Abb.5: PON2 wird auch in Gefäßmuskelzellen exprimiert. Die Behandlung mit PON2-RNAi führt zu erhöhten ROS-Spiegeln in Abhängigkeit von DMNQ. A, SMC-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit 50nmol/l unspezifischer (Kontrolle) und PON2-spezifischer RNAi behandelt. Nach drei Tagen wurde ein Western blot mit jeweils 25 μ g Zellextrakt und Antikörpern gegen PON2 und α -Tubulin durchgeführt. B, Drei Tage nach RNAi-Behandlung wurde ein anderer Teil der behandelten Zellen mit 10 μ mol/l DMNQ inkubiert und die ROS-Spiegel mittels ROS-Reporter H₂DCFDA detektiert. Jeder Punkt beinhaltet ≥ 5 individuelle Messungen (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) und wurde in 3 unabhängigen Experimenten verifiziert. Die Maximalwerte der Kurve wurden mittels nichtlinearer Regression ermittelt und zeigen statistisch signifikante Unterschiede (***) $p < 0,001$.

4.2.3 PON2 schützt endotheliale EA.hy 926-Zellen vor ER-Stress begleitendem oxidativen Stress

EA.hy 926-Zellen, sowie die beiden PON2-iso1 überexprimierenden Zelllinien EA.hy-PON2-GFP und EA.hy-PON2-HA wurden für 24 Stunden mit DMNQ, Tunicamycin oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert und anschließend die ROS-Spiegel unter Verwendung von L-012 vermessen. Tunicamycin inhibiert den ersten Schritt der N-Glykosylierung innerhalb des ER, was die Akkumulation unglykosylierter Proteine und damit ER-Stress zur Folge hat. Dies führt zu erhöhten ROS-Spiegeln im ER.

In Abbildung 6 kann man entlang der y-Achse den prozentualen Anstieg der ROS-Produktion in den drei Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit DMSO, DMNQ und Tunicamycin ablesen. In allen drei Zelllinien liegt der Kontrollwert nach Inkubation mit DMSO bei etwa 100%. Während die nativen EA.hy Zellen nach Inkubation mit DMNQ einen ROS Anstieg um etwa 120% und nach Inkubation mit Tunicamycin sogar um 140% verzeichnen, ist die ROS produzierende Wirkung von DMNQ und Tunicamycin in den beiden PON2-iso1 überexprimierenden Zelllinien fast nicht zu beobachten. Das Experiment zeigt, dass PON2-iso1 die Zellen neben durch DMNQ produzierte ROS auch vor ER-Stress induzierten ROS schützt.

Vergleicht man innerhalb der nativen EA.hy Zellen den DMSO Wert mit dem DMNQ Wert, ergibt sich ein signifikanter Unterschied von 25% mit einem $p < 0,01$. Beim Vergleich des DMSO Wertes mit dem Wert nach Tunicamycin-Inkubation ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Anstieg der ROS-Produktion von 40% mit einem $p < 0,001$. Vergleicht man die Tunicamycin Werte der nativen EA.hy mit denen der PON2-iso1 überexprimierenden Zellen, so ergeben sich signifikante Unterschiede im prozentualen Anstieg der ROS-Produktion von 35% bei EA.hy-PON2-GFP und von 30% bei EA.hy-PON2-HA mit $p < 0,05$. Die statistische Testung der Signifikanz in den Unterschieden der Säulenhöhe erfolgte anhand von 2-way ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

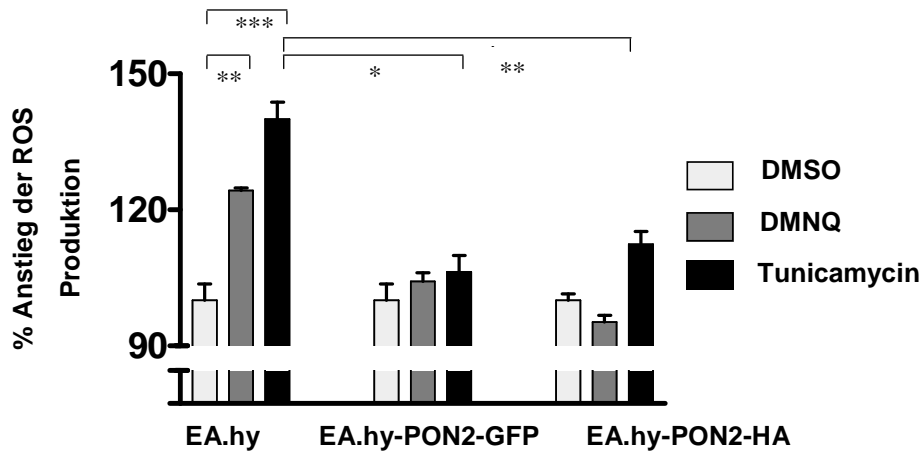


Abb.6: PON2 reduziert auch im ER generierte ROS. Native, PON2-iso1-GFP und PON2-iso1-HA überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1% DMSO (Kontrolle), 10 μ mol/l DMNQ oder 1 μ g/ml Tunicamycin inkubiert. ROS wurde anhand von L-012 gemessen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Messungen. Die Testung der statistischen Signifikanz in den Unterschieden der Säulenhöhe erfolgte mittels 2-way ANOVA (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

4.2.4 PON2 schützt primäre, glatte Muskelzellen (SMCs) vor TGF- β 1/Nox-4 generierter ROS-Produktion

In diesem Experiment wurden erneut SMC-Zellen verwendet, welche drei Tage nach RNAi-Behandlung für 24 Stunden mit TGF β 1 behandelt wurden und anschließend eine Messung der intrazellulären ROS-Spiegel durchgeführt. Es ist bekannt, dass TGF β 1 in SMC-Zellen zu einer Induktion der im ER lokalisierten NADPH-Oxidase-4 (NOX4) führt, was die Generierung von ROS im ER dieser Zellen zur Folge hat (67).

Die Behandlung der SMC-Zellen mit RNAi erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Der durchgeführte Western blot zeigt ein vergleichbares Ergebnis wie der im oben genannten Kapitel dargestellte (siehe Abb.5A). Auch bei dieser Behandlung mit PON2-spezifischer RNAi wird PON2 erfolgreich herunterreguliert.

Zunächst wurde die TGF β 1-induzierte NOX4-Expression in SMCs mittels qRT-PCR verifiziert. Hierzu wurden SMC-Zellen sowohl unbehandelt belassen, als auch für jeweils 6 und 24 Stunden mit TGF β 1 behandelt und anschließend die RNA extrahiert. Nun wurde eine

quantitative real time PCR (qRT-PCR) durchgeführt um die relative Menge an NOX4-mRNA zu ermitteln. Die für die NOX4-mRNA erzielten Amplifikationsraten wurden mit jenen für RNA-Polymerase II-mRNA normalisiert. Hierzu wurden die Expressionsraten beider mRNAs aus den jeweils gleichen RNA Präparationen bestimmt und auf einander bezogen (siehe Kapitel 3.9.7). Abbildung 7B zeigt, dass die Menge an relativer NOX4-mRNA nach 24-stündiger TGF β 1-Inkubation in den Zellen nach RNAi-Behandlung 2,5fach höher ist, als in den unbehandelten Zellen oder denen, welche nur für 6 Stunden mit TGF β 1 inkubiert wurden. Während nach sechsstündiger Inkubation noch kein Anstieg der NOX4-mRNA zu verzeichnen ist, ist der Unterschied der 24h Säule zur Säule der unbehandelten Zellen mit $p < 0,01$ signifikant und belegt dass eine Induktion der NOX4-Expression stattgefunden hat.

Abbildung 7C zeigt das Ergebnis der durchgeführten Messung intrazellulärer ROS-Spiegel nach RNAi-Behandlung von SMC-Zellen und 24stündiger Inkubation mit TGF β 1 anhand eines Säulendiagramms. Entlang der y-Achse lässt sich der prozentuale Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion ablesen, während auf der x-Achse die jeweilige Behandlung (mit/ohne siRNA) aufgetragen ist. Die unbehandelten Zellen der jeweiligen Gruppe wurden als 100% gesetzt. Nach 24 Stunden Behandlung mit TGF β 1 erkennt man in den nicht mit RNAi behandelten Zellen einen nicht signifikanten Anstieg der ROS-Produktion um 20%. In der Gruppe der mit Kontroll-RNAi behandelten SMC-Zellen beträgt der Anstieg nur etwa 10%. In der Gruppe der PON2-RNAi behandelten Zellen lässt sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären ROS-Produktion auf etwa 150% mit einem $p < 0,05$ verzeichnen.

Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die Behandlung von SMC-Zellen mit TGF β 1 zu einer erhöhten Expression von NOX4 und einer damit einhergehenden ROS-Bildung führt. Die RNAi-basierte Runterregulation des endogenen PON2-Proteins in SMCs führte zu einer signifikanten Erhöhung der ROS-Produktion und bestätigt die oben beschriebene antioxidative Funktion von PON2 in Endothelzellen.

Die statistische Analyse auf signifikante Unterschiede in den Ergebnissen wurde mittels 2-way ANOVA (* $p < 0,05$) durchgeführt.

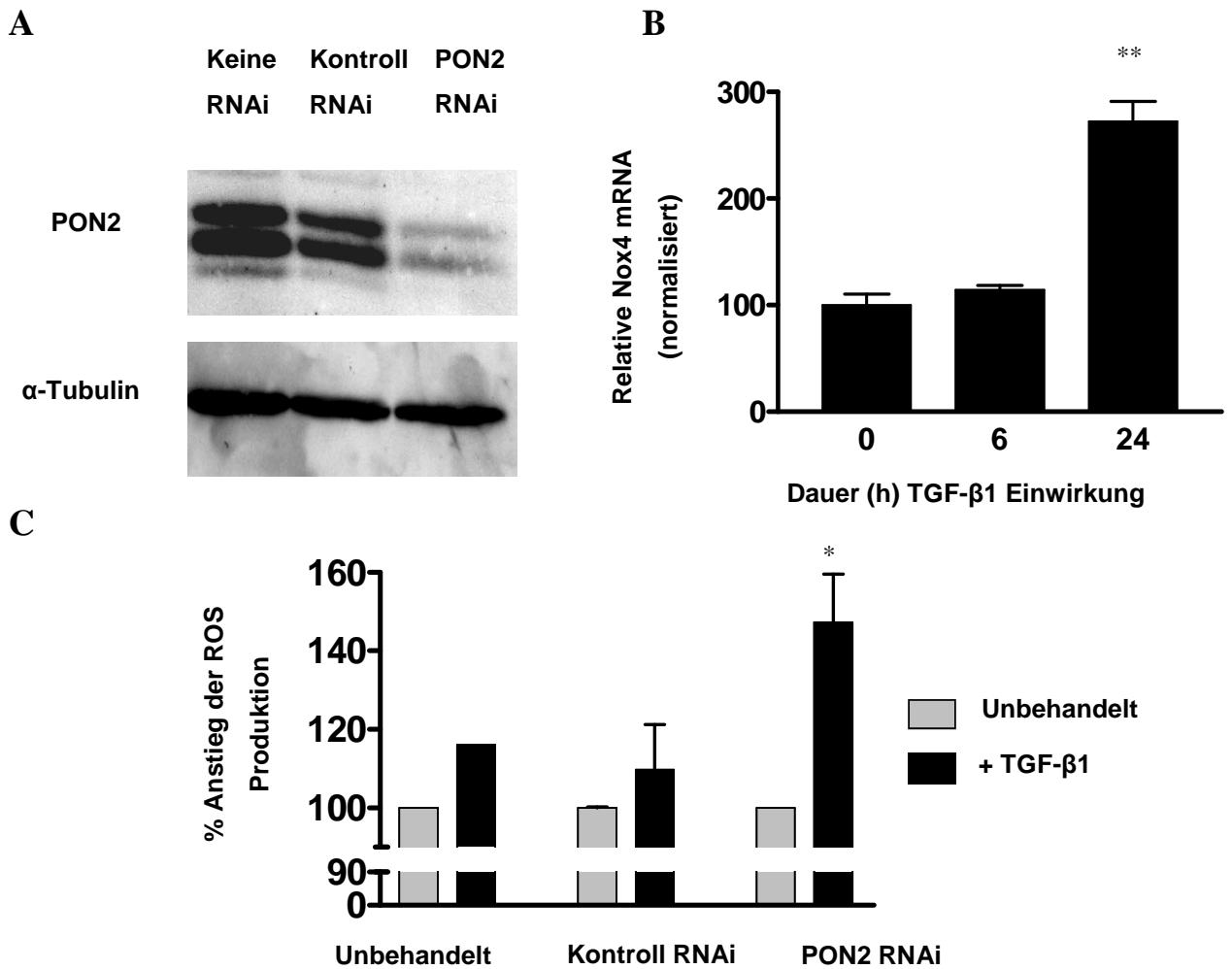


Abb.7: PON2 reduziert im ER von SMC-Zellen generierte ROS. A, SMC-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit 50nmol/l unspezifischer (Kontrolle) und PON2-spezifischer RNAi behandelt. Nach drei Tagen wurde ein Western blot mit jeweils 25 μ g Zellextrakt und Antikörpern gegen PON2 und α -Tubulin durchgeführt. B, SMC wurden mit 10ng/ml TGF β 1 für 6 und 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde eine RNA-Extraktion durchgeführt und mit der gewonnenen RNA eine qRT-PCR vorgenommen. Die Amplifikationsraten der Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat-oxidase 4 (NOX4)-mRNA wurden zu denen der RNA-Polymerase II-mRNA normalisiert, welche aus derselben Präparation gewonnen wurde. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Messungen. C, Unbehandelte SMC-Zellen und mit 50nmol/l unspezifischer Kontroll-RNAi behandelte oder PON2-spezifische RNAi behandelte SMC-Zellen wurden drei Tage nach RNAi-Behandlung für 24 Stunden mit 10ng/ml TGF β 1 inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Detektion der intrazellulären ROS-Spiegel anhand des ROS-Reporters H₂DCFDA. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Messungen. Die Testung der statistischen Signifikanz der Unterschiede in der Säulenhöhe erfolgte mittels 2-way ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

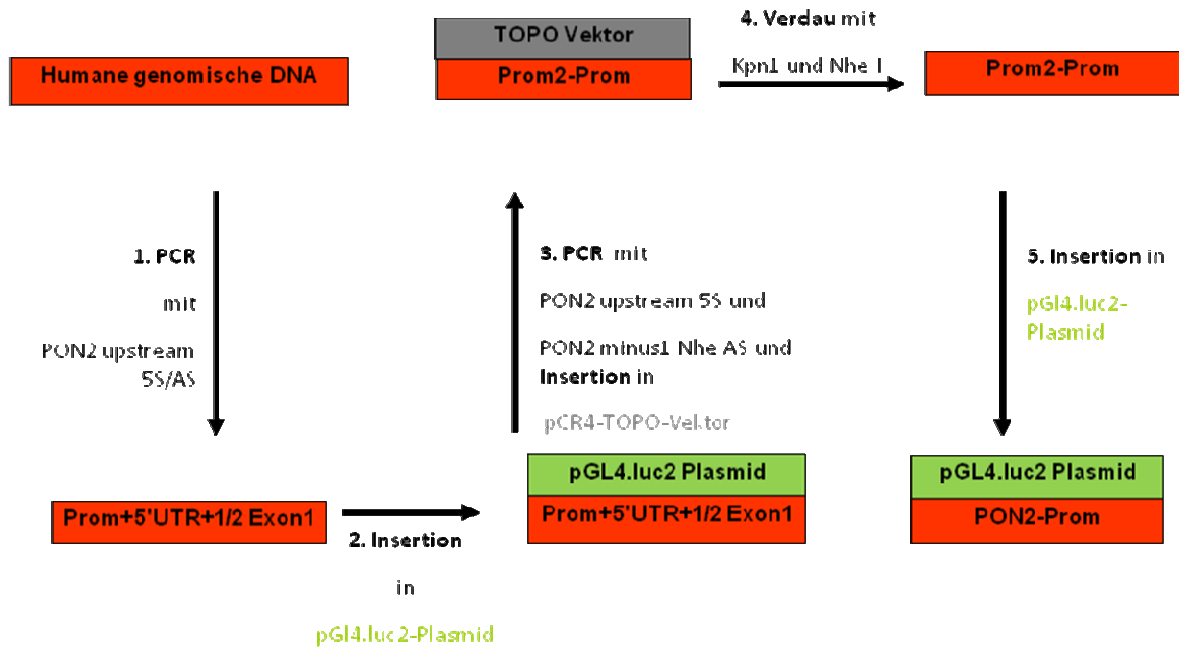
4.3 Die ER-Stress induzierte Expression von PON2

4.3.1.1 Klonierung eines 2,4kBp PON2-Promoter-Fragments in das firefly-Luziferase Reporterplasmid pGL4.10 [luc2]

Aufgrund der zuvor beschriebenen Erkenntnisse zur Lokalisation und antioxidativen Funktion von PON2 bestand die Vermutung, dass das PON2-Protein in den ER-Stress-Signalweg *unfolded protein response* (UPR) involviert sein könnte. Naheliegend war zunächst aufgrund der Reduktion ER-Stress begleitender ROS-Produktion, dass die PON2-Expression durch Aktivierung des UPR-Signalweges induziert werden könnte. Um dies zu überprüfen, sollten Gen-Reporter-Analysen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte ein PON2-Promoter-Fragment aus genomischer DNA in ein geeignetes Reporterplasmid einkloniert werden. Da sich die direkte Amplifikation des PON2-Promoter-Fragmentes aus genomischer DNA als ineffektiv herausstellte, musste die Klonierung anhand mehrerer Subklonierungsschritte durchgeführt werden.

Abbildung 8A zeigt schematisch die einzelnen Subklonierungsschritte. Das aus humaner genomischer DNA amplifizierte Konstrukt (+2249 bis +112) enthielt zunächst neben der 5'UTR noch Exon 1, sowie die Introns 1 und 2. Diese Sequenz wurde dann mittels PCR in das TOPO-Plasmid kloniert. Eine mit spezifischen Primern und dem TOPO-Vektor durchgeführte PCR generierte dann die PON2-Promoter-Sequenz (+2249 bis -1). Unter Verwendung der Restriktionsenzyme KpnI und Nhe wurde der im TOPO-Vektor enthaltene Promoter dann entweder zusammen mit der 5'UTR in das pGL4.luc.2 Plasmid inseriert, oder erst nach vorheriger Behandlung des TOPO-Vektors mit dem Restriktionsenzym Nco I in das pGL4.luc.2 Plasmid kloniert. Durch die Behandlung des Plasmids mit Nco I wurden die 5'UTR und das Exon1 entfernt. Somit standen zwei verschiedene PON2-Promoter-Konstrukte für die Messung der PON2-Promoter-Aktivität zur Verfügung: Ein Reporterplasmid mit enthaltener 5'UTR und eines ohne 5'UTR. Abbildung 8B zeigt das fertige Reporterplasmid pGL4 mit der in ihm enthaltenen PON2-Promoter-Sequenz.

A



B

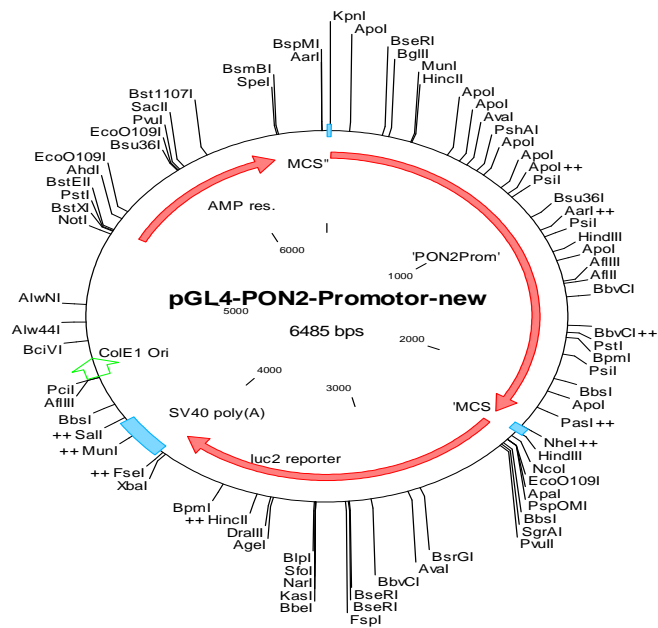


Abb.8: Generierung eines PON2-Promoter-Fragment enthaltenden Reporterplasmids.

A, Nach Amplifikation der PON2-Promoter-Region aus humaner genomischer DNA wurde diese mittels PCR in den TOPO-Vektor inseriert. Anschließend erfolgte die Klonierung in den pGL4.luc2-Vektor unter Verwendung der Restriktionsenzyme KpnI und Nhe. B, Darstellung des fertigen PON2-Promoter-enthaltenden pGL4.luc2-Plasmids. Die Abbildung zeigt das 6485 bps große Plasmid mit seinen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sowie die in ihm enthaltenden Sequenzen: Neben dem PON2-Promoter-Fragment (Position -2249 bis -1) ist die Kodierung für eine Ampicillin-Resistenz, sowie der Luziferase Reporter zu erkennen.

4.3.1.2 Messung der PON2-Promoter-Aktivität nach ER-Stress Induktion

Zur Induktion von ER-Stress wurden bei diesem Experiment EA.hy 926-Zellen mit Tunicamycin inkubiert. Die Zellen wurden im Vorfeld mit dem generierten PON2-Promoter-Plasmid sowie einem *Renilla*-Luziferase Gen enthaltendem Plasmid co-transfiziert. Letzteres dient zur Normalisierung der Transfektionseffizienz: Im PON2-Promoter-Plasmid ist das *Firefly*-Luziferase-Gen unter der Kontrolle des PON2-Promoters, so dass die nachfolgend bestimmte Luziferase-Enzym-Aktivität die PON2-Promoter-Aktivität reflektiert. Da es sich um transiente Transfektionen handelt, muss hier jedoch die Transfektionseffizienz einbezogen werden. Dies geschieht durch Bestimmung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität im gleichen Lysat, da ein Plasmid mit konstitutiv-stimulierter *Renilla*-Luziferase Expression co-transfiziert worden ist.

Während ein Teil der transfizierten Zellen mit ansteigenden Tunicamycin Konzentrationen inkubiert wurde, wurde ein anderer mit gleich bleibender Tunicamycin Konzentration für unterschiedliche Zeiten behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die Reaktion gestoppt und die Aktivität des PON2-Promoters in Form der *Firefly*-Luziferase Aktivität gemessen und normalisiert gegen *Renilla*-Luziferase Aktivität.

Das Säulendiagramm in Abbildung 9A zeigt das Ergebnis der Messung der PON2-Promoter-Aktivität in Abhängigkeit von ansteigenden Tunicamycin Konzentrationen. Entlang der y-Achse lässt sich die Induktion des PON2-Promoters ablesen. Der Höhepunkt liegt bei einer 5,5fach höheren *Firefly*-Luziferase Aktivität verglichen mit der Aktivität der *Renilla*-Luziferase und wird bei einer Tunicamycin Konzentration von 3µg/ml erreicht. Eine Steigerung der Konzentration auf 10µg/ml zeigt keinen weiteren signifikanten Anstieg. Die Aktivität des PON2 Promoters lässt sich folglich bis zu einem gewissen Maß konzentrationsabhängig von Tunicamycin steigern. Die einzelnen Säulen stellen Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Messungen dar.

In Abbildung 9B lässt sich in gleicherweise wie in Abbildung 9A die PON2 Promoter-Aktivität entlang der y-Achse ablesen. Auf der x-Achse ist die Dauer der Inkubationszeiten mit 15µg/ml Tunicamycin aufgetragen. Mit ansteigender Inkubationsdauer mit Tunicamycin lässt sich ein Anstieg in der PON2-Promoter-Aktivität verzeichnen. Nach einer Stunde entspricht der Tunicamycin Wert noch dem der unbehandelten Zellen, nach zwei Stunden steigert sich die Aktivität des PON2-Promoters auf das 1,5fache und nach sechs Stunden ist die PON2-Promoter-Aktivität signifikant um das 9fache gesteigert, verglichen mit den unbehandelten Zellen. Der Höhepunkt der PON2-Promoter-Aktivität zeigt sich nach einer Inkubationszeit von acht Stunden. Die Aktivität steigert sich auf das 11fache und ist

signifikant gegenüber dem Wert der unbehandelten Zellen und den vorher gemessenen Werten nach Tunicamycin Inkubation. Jede Säule errechnet sich aus dem Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Messungen. Somit zeigt Abbildung 9B, dass die Aktivität des PON2-Promoters mit ansteigender Expositionsdauer der Zellen gegenüber 15 μ g/ml Tunicamycin signifikant ansteigt.

Die Graphik zeigt deutlich, dass die PON2-Promoter Aktivität durch Tunicamycin induzierten ER-Stress ansteigt und PON2 auf Promoterebene durch ER-Stress induziert wird. Der Anstieg lässt sich sowohl konzentrationsabhängig als auch abhängig von der Inkubationsdauer mit einer gleich bleibenden Tunicamycin Konzentration verzeichnen.

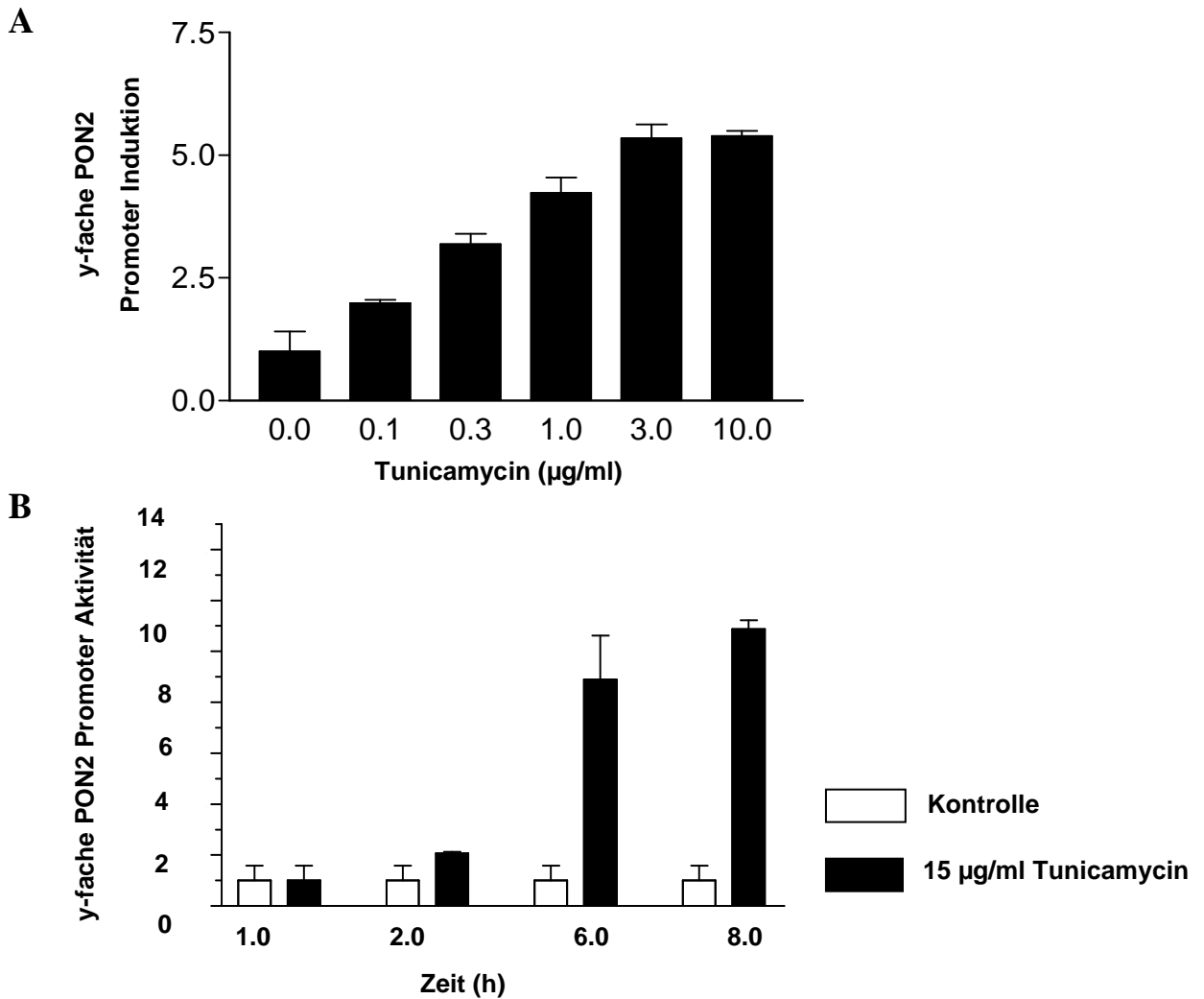


Abb.9: Zunahme der PON2-Promoter-Aktivität nach ER-Stress Induktion. EA.hy 926-Zellen wurden mit dem PON2-Promoter-Fragment (Position -2249 bis -1) enthaltendem pGI4.luc2-Plasmid transfiziert. Das Plasmid enthält ein *Firefly*-Luziferase Gen. Zur Normalisierung der Werte wurden die Zellen mit einem *Renilla*-Luziferase Gen enthaltendem Plasmid cotransfiziert. Die gemessene Aktivität der *Firefly*-Luziferase, normalisiert zur *Renilla*-Luziferase Aktivität repräsentiert die Induktion des PON2-Promoters, dargestellt als y-fache Induktion. A, Vier Stunden nach Transfektion wurde ein Teil der Zellen für 16 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von Tunicamycin behandelt. Die Säulen stellen Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Messungen dar. B, Ein anderer Teil der Zellen wurde ebenfalls vier Stunden nach Transfektion mit gleicher Tunicamycin Konzentration für ansteigende Inkubationszeiten behandelt. Die Kontroll Zellen wurden für die gesamte Zeit unbehandelt gelassen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm SEM dreier unabhängiger Messungen.

4.3.2 Nachweis der PON2-Proteinexpression nach Aktivierung des UPR-Signalwegs

Es ist bekannt, dass ER-Stress zur Aktivierung eines Signalwegs namens *Unfolded Protein Response* (UPR) führt (68). Je nach Intensität und Art der vorliegenden Störung führt der UPR-Signalweg in anti- oder pro-apoptische zelluläre Prozesse. Proteine die helfen ER-Stress zu reduzieren, werden während der UPR-Signalkaskade vermehrt exprimiert, während die Expression anderer vermindert wird oder unverändert bleibt (siehe Kapitel 2.3). Die folgenden Experimente analysieren ob der UPR-Signalweg die Expression des endogenen PON2-Proteins beeinflusst. Dies sollte die unter Kapitel 4.3.1 gewonnenen Erkenntnisse zur UPR-induzierten Stimulation der PON2-Promoter-Aktivität überprüfen.

Abbildung 10 A zeigt einen durchgeführten Western blot. Hierbei wurden EA.hy 926 Zellen entweder unbehandelt belassen, oder für unterschiedliche Zeiten mit der Chemikalie Dithiotreitol (DTT) behandelt. DTT blockiert die Ausbildung von Disulfidbrücken während der posttranslationalen Proteinmodifikation im ER, bzw. reduziert bereits bestehende SH-Brücken. Dies führt durch die Ansammlung der unmodifizierten Proteine, zu ER-Stress und Aktivierung des UPR-Signalwegs. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert und ein Western blot unter Verwendung eines PON2-Antikörpers, eines Antikörpers gegen α -Tubulin und eines Antikörpers gegen GRP78 durchgeführt. GRP78 ist die Abkürzung für *Glucose Regulated Protein of 78 kD*. Es ist ein im ER befindliches Chaperon und gleichzeitig ein Marker für ER-Stress und Aktivierung des UPR, da seine Expression nach UPR-Aktivierung induziert wird (69). Im Western blot ist zu sehen, dass mit ansteigender Dauer der DTT Inkubation die Intensität der PON2-Banden und damit die PON2-Proteinexpression, verglichen mit den unbehandelten Zellen zunimmt. Die beiden Banden repräsentieren die beiden PON2 Isoformen PON2-iso1 und PON2-iso2 (28) (siehe Kapitel 2.4.2). Bei den GRP78 Banden lässt sich ebenfalls mit Zunahme der Inkubationszeit eine Zunahme der Signalstärke verzeichnen. Die Signalintensität der α -Tubulin Banden bleibt dagegen unabhängig von der Einwirkzeit des DTT unverändert und zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

Die Zunahme der GRP78 Banden belegt die Aktivierung der UPR-Signalkaskade. Die Intensitätssteigerung der PON2 Banden belegt die Induktion der PON2-Proteinexpression durch den UPR-Signalweg. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde von dem gezeigten Western blot auch eine densitometrische Analyse angefertigt, welche ebenfalls zeigt, dass die Menge an PON2 und GRP78 ansteigen, wobei die Tubulin-Signale als Normalisierung für aufgetragene Proteinmengen dienen.

Abbildung 10B zeigt einen weiteren Western blot. EA.hy 926-Zellen wurden mit verschiedenen Chemikalien behandelt und anschließend ein Western blot in gleicher Weise, wie in Abb. 10A beschrieben, durchgeführt. In diesem Experiment wurde der UPR Signalweg durch einen anderen Mechanismus ausgelöst: Tunicamycin blockt die N-Glykosylierung von Proteinen im ER und aktiviert auf diese Weise den UPR-Signalweg.

In Spur 1 (Kontrolle) wurde das Lysat unbehandelter Zellen aufgetragen. Die PON2 Banden sowie ein schwaches GRP78 Signal ist nachweisbar. Spur 2 (Kontrolle + Glyko) zeigt ebenfalls das Lysat von nur mit Medium versetzten Zellen, bei denen jedoch die im Lysat enthaltenen Proteine durch Behandlung mit N-Glykosidase (2.5U/100µg, 4h, 37°C) deglykosyliert wurden. Da PON2 ein glykosyliertes Protein ist (28), bewirkt die Deglykosylierung eine Veränderung des Molekulargewichts, was sich in einer Positionsveränderung im Western blot äußert, da sich das apparente Molekulargewicht von PON2 erniedrigt. Dies betrifft beide PON2-Isoformen (28). GRP78 und Tubulin sind unbeeinflusst in Intensität und Molekulargewicht. Spur 3 (Tunica) zeigt das Lysat von EA.hy-926 Zellen die mit Tunicamycin behandelt wurden: Die erhöhte Signalintensität der GRP78 Expression belegt die Induktion von ER-Stress, sowie die Aktivierung des UPR-Signalwegs. Im Gegensatz dazu erscheinen im Western Blot für PON2 zwei neue Banden mit niedrigerem Molekulargewicht. Die neuen Banden zeigen dasselbe Molekulargewicht wie die deglykosylierten Banden in Spur2, da sie in gleicher Höhe lokalisiert sind. In Spur 4 (Cyclo) wurde das Lysat von mit Cycloheximid behandelten EA.hy 926-Zellen aufgetragen. Cycloheximid inhibiert die Proteintranslation und verhindert so die Neusynthese von Proteinen. Die PON2 Banden in Spur 4 gleichen den glykosylierten PON2 Banden in Spur 1, was Beleg dafür ist, dass Cycloheximid alleine keine Auswirkungen auf PON2 hat. In Spur 5 (Tunica + Cyclo) wurde das Lysat von EA.hy 926 Zellen aufgetragen, die sowohl mit Tunicamycin, als auch mit Cycloheximid behandelt wurden. Es werden nur glykosylierte PON2 Banden detektiert. Da die in Spur 3 neu erschienenen PON2 Banden durch die Cycloheximid Wirkung in Spur 5 nicht mehr detektiert werden, muss es sich bei den unteren zwei Banden in Spur 3 um neu synthetisierte PON2-Proteine (Isoformen 1&2) handeln, welche durch die Tunicamycinwirkung induziert-, jedoch gleichzeitig nicht glykosyliert werden können. Das Nichterscheinen einer GRP78 Bande ist Indiz dafür, dass das Cycloheximid die Translation inhibiert hat. Da die Signalstärke von α -Tubulin in allen Spuren gleich hoch ist, wurde auch in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen.

Die beiden Experimente zeigen, dass DTT und Tunicamycin den UPR-Signalweg durch zwei verschiedene Mechanismen auslösen. Eine Aktivierung des UPR-Signalwegs führt bei beiden Aktivierungsmechanismen zu vermehrter PON2-Proteinexpression.

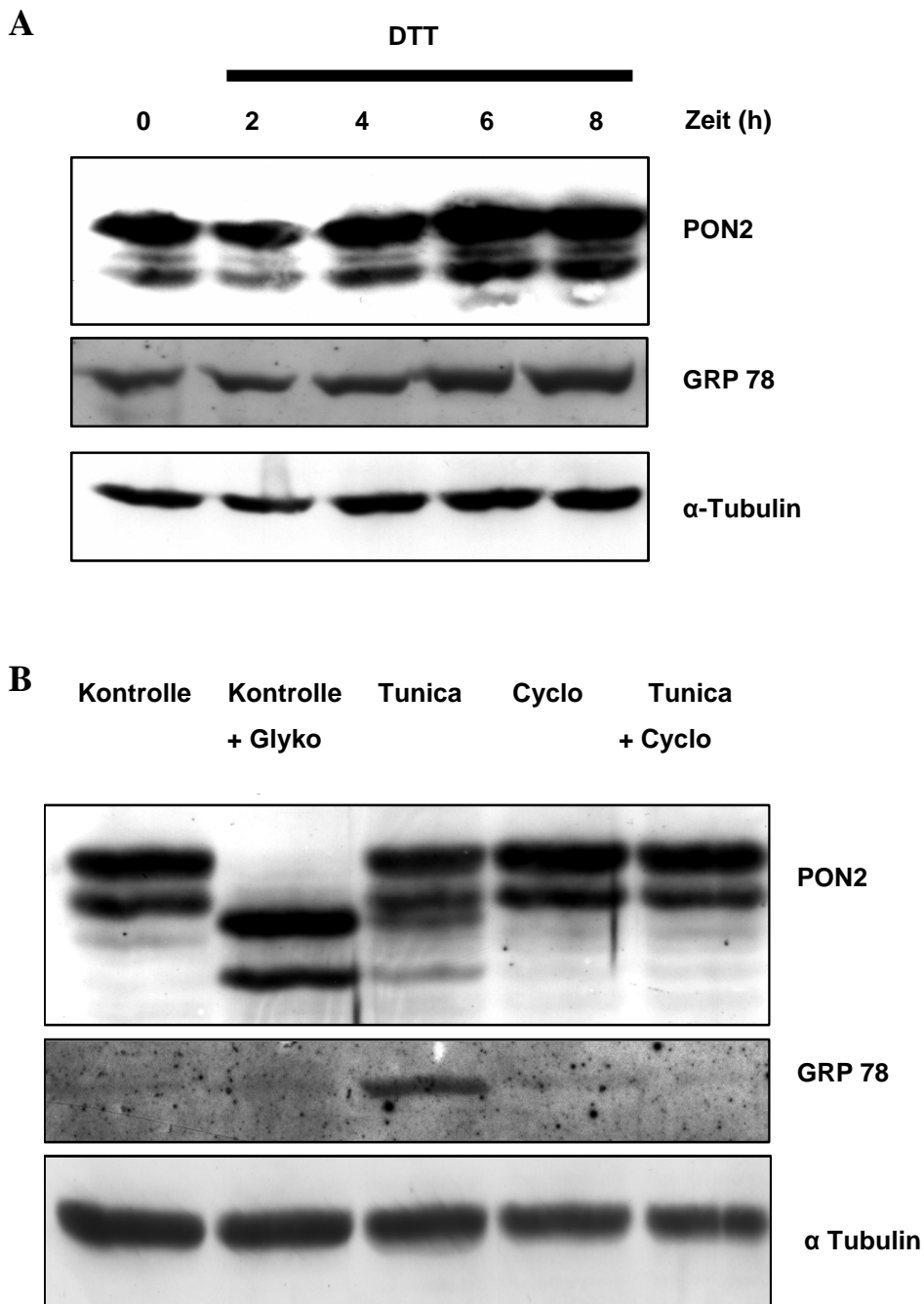


Abb.10: Anstieg der PON2-Proteinexpression durch den UPR-Signalweg. A, Der UPR-Signalweg wurde in EA.hy 926-Zellen durch Behandlung mit 2,5mmol/l DTT für 4, 8, 16 oder 24 Stunden ausgelöst. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert und jeweils 100 μ g Protein im Western blot analysiert. Hierbei wurden Antikörper gegen PON2, GRP78 und gegen α -Tubulin verwendet. B, EA.hy 926 Zellen wurden unbehandelt (Spur 1: Kontrolle) belassen, oder für 4 Stunden mit 2,5U N-Glykosidase-F (Spur 2: Kontrolle + Glyko), oder für jeweils 16 Stunden mit 10 μ g/ml Tunicamycin (Spur 3: Tunica), oder 5 μ g/ml Cycloheximid (Spur 4: Cyclo), oder mit 10 μ g/ml Tunicamycin und 5 μ g/ml Cycloheximid (Spur 5: Tunica + Cyclo) behandelt. Anschließend wurde ein Western blot in gleicher Weise wie in A beschrieben durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Subzelluläre Lokalisation von PON2

5.1.1 Beurteilung eigener Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studien

Die in Kapitel 4.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen erstmals die subzelluläre Lokalisation von endogener und überexprimierter PON2 in der Kernlamina und im ER von EA.hy 926-Zellen. Bisher wurde PON2 nur als mit der Plasmamembran assoziiert beschrieben (2, 3). Diese Ergebnisse stützen sich allerdings auf Experimente die entweder mit Caco-2- (3) oder mit HeLa-Zellen (2) durchgeführt wurden. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um epitheliale Zellen des Gastrointestinaltraktes bzw. um Zellen aus einem Cervixkarzinom, wohingegen in der vorliegenden Arbeit Zellen des vaskulären Systems, insbesondere des Endothels verwendet wurden. So könnte PON2 in Zellen des Verdauungstraktes an anderer Stelle lokalisiert sein als in vaskulären Zellen. Weiterhin ist bekannt, dass PON2 von Zellen des Darmtraktes sezerniert wird (3). Die von Shamir et al. beschriebene Lokalisation von PON2 in der Plasmamembran könnte also darauf zurückzuführen sein, dass PON2 während des Exocytoseprozesses nachgewiesen wurde, was zu der Annahme führen mag, dass Protein sei in der Plasmamembran lokalisiert. Ausserdem wurde in der von Ng et al. gewählten Methode der biochemischen Zell-Fraktionierung (2) PON2 in einer relativ undifferenzierten Fraktion nachgewiesen, welche neben der Plasmamembran auch Mitochondrien und das ER enthielt, sodass eine eindeutige Aussage zur Lokalisation von PON2 schwer fällt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stehen somit im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Gruppen. Die hier erzielten Befunde werden jedoch durch verschiedene Argumente unterstützt: (1.) sind gleiche Ergebnisse mit drei verschiedenen methodischen Ansätzen erzielt worden; (2.) wurden die hier erhobenen Befunde durch geeignete Kontrollen bestätigt; (3.) findet sich eine Übereinstimmung zwischen Lokalisation und funktioneller Relevanz des Proteins; und (4.) wurden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse derweil durch eine andere Gruppe in einer recht neuen Veröffentlichung bestätigt (70).

5.1.2 Interpretation der Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation

Es wurden mehrere unabhängige Versuche zur Lokalisation von PON2 durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation zu verifizieren: Die mittels konfokaler Mikroskopie gewonnenen Aufnahmen zeigen starke PON2 Signale innerhalb der Kernlamina und des ERs (siehe Kapitel 4.1.1). Neben lebenden PON2-iso1-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden auch native EA.hy 926 Zellen verwendet um die physiologische Lokalisation in Zellen des Gefäßsystems zu zeigen. Weiterhin wurden extrazelluläre Plasmamembran-Proteine, nicht jedoch PON2 durch die Behandlung von PON2-GFP-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Proteinase K degradiert (siehe Kapitel 4.1.2). Stünde PON2 über einen Lipidanker mit der Plasmamembran in Verbindung, so hätte die Behandlung mit Proteinase K zumindest den Verdau der extrazellulären Aminosäuresequenz des Lipidankers zur Folge, was sich im Western Blot als Änderung in der PON2 Masse (= Position der spezifischen Banden) bemerkbar machen würde. Dies ist nicht der Fall, sodass auch dieses Experiment eine Lokalisation von PON2 in EA.hy 926-Zellen mit der Plasmamembran unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Bei Betrachtung der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen fällt allerdings eine Diskrepanz bezüglich der Lokalisation in den PON2-iso1-GFP überexprimierenden Zellen und endogenem PON2 auf. Während sich die überexprimierte, GFP-gekoppelte Isoform 1 hauptsächlich als im ER lokalisiert nachweisen lässt, stellt sich das endogene PON2 zusätzlich u.a. im Nukleoplasma dar. Eine Erklärung hierfür könnte das Vorhandensein der zwei bekannten Isoformen von PON2 sein: So detektiert die indirekte Immunfluoreszenz mittels PON2-Antikörper beide Isoformen zugleich, wohingegen durch die Analyse der PON2-iso1-GFP überexprimierenden Zellen nur Isoform-1 nachgewiesen wird. Während sich PON2-iso1 vermehrt im ER befindet, könnte PON2-iso2 vornehmlich im Kern lokalisiert sein. In der Überlagerungsansicht von PON2-iso1-GFP mit dem ER zeigt sich, dass die Kolo-kalisation nicht ganz vollständig ist. Dies könnte darin begründet sein, dass PON2 neben dem ER noch in anderen von Lipidmembranen umgebenen Organellen lokalisiert ist. So wäre eine Lokalisation von PON2 innerhalb von Mitochondrien denkbar. Dieser Verdacht wird durch ein weiteres Experiment, welches in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde erhärtet: Die biochemische Zellfraktionierung mittels Dichte-Gradient-Zentrifugation zeigte das Vorkommen endogenen PON2 Proteins neben dem ER auch in jenen Fraktionen, welche Mitochondrien enthielten (28).

5.2 Potentielle physiologische Funktionen von PON2

5.2.1 Schutz vor oxidativem Stress

Die physiologische Funktion von PON2 ist genau wie der enzymatische Mechanismus bisher ungeklärt. Genetische Polymorphismen des Enzyms sind jedoch mit kardiovaskulären Erkrankungen (siehe Kapitel 2.4.2) und mikrovaskulären Komplikationen bei Diabetes mellitus identifiziert worden (40). Es ist ebenfalls bekannt, dass PON2 in HeLa-Zellen eine ROS-reduzierende Aktivität besitzt (22). Die in Kapitel 4.2 beschriebenen Ergebnisse belegen ebenfalls die Reduzierung von ROS durch PON2 in Endothelzellen und in glatten Muskelzellen. Hierbei gilt es eine genauere Differenzierung der generierten und der gemessenen ROS-Spiegel vorzunehmen, um besser unterscheiden zu können welche Radikalverbindungen durch PON2 reduziert werden können. Bei den in Kapitel 4.2 beschriebenen Experimenten ist zu beachten, dass die DMNQ-induzierte Radikalspezies hier nicht genauer bestimmt wurde, Quinone wie DMNQ jedoch sehr wahrscheinlich primär Superoxid generieren. Während der ROS-Reporter H_2DCFDA ebenfalls relativ unspezifisch verschiedene Arten reaktiver Sauerstoffspezies detektiert, werden durch die Substanz L-012 vornehmlich Superoxid, das Hydroxylradikal und Hypochlorid detektiert, Wasserstoffperoxid hingegen weniger. Eine genaue Typisierung der freigesetzten und gemessenen ROS fällt somit ebenso schwer, wie eine sichere Aussage über die Arten von ROS, vor denen PON2 die Zellen zu schützen vermag. Da die Reduktion intrazellulärer ROS sowohl bei Verwendung von L-012, als auch mit H_2DCFDA als ROS-Reporter nach Induktion von ROS durch DMNQ (siehe Abbildungen 4 bis 6) etwa gleich groß ist, scheint PON2 die Zelle zumindest vor zu hohen intrazellulären ROS-Spiegeln zu schützen. Dies steht im Einklang mit der subzellulären Lokalisation von PON2 und dem Nachweis, dass es nicht auf der Plasmamembran lokalisiert ist. Dennoch muss in Betracht gezogen werden, dass auch extrazellulär generierte ROS in die Zelle gelangen und dort durch oxidative Modifikation Schaden anrichten können. Auch solche ROS könnten durch PON2 neutralisiert werden. Unter Verwendung spezifischer ROS-Induktoren auf der einen, sowie spezifischer ROS Reporter auf der anderen Seite könnten weitere Experimente durchgeführt werden, um die Radikalverbindungen zu identifizieren, die durch PON2 reduziert werden.

Die Expression von PON2 und die Fähigkeit ROS zu reduzieren wurde jedoch nicht nur, wie in dieser Arbeit beschrieben, in EA.hy 926-Zellen und in SMC-Zellen nachgewiesen. Mittels in der Arbeitsgruppe durchgeführter Experimente konnte neben der Expression von PON2

auch eine Reduktion der ROS-Spiegel in Fibroblasten des Gefäßsystems belegt werden (28). PON2 besitzt somit in den hauptsächlichen Zelltypen des Gefäßsystems (Endothel, glatte Muskelzellen, Adventitia-Fibroblasten) eine ROS-reduzierende Aktivität. Vor dem Hintergrund der initialen Schritte in der Pathogenese der Atherosklerose scheint PON2 in Zellen des Gefäßsystems einen protektiven Effekt auf diese auszuüben: Von Endothelzellen produzierte ROS führen nach Akkumulation von LDL im subendothelialen Raum zu deren Oxidation, einem zentralen Vorgang in der Genese der Atherosklerose. Des Weiteren führt die Überproduktion von ROS zu verminderter Freisetzung von vaskulärem NO und endothelialer Dysfunktion (9). Eine Verminderung von oxidativem Stress durch PON2 während dieser Phase der Atherogenese scheint somit eine hemmende Wirkung auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques zu haben. Neben bereits etablierten Enzymen zur Abwehr von ROS (71) scheint PON2 einen bisher nicht beschriebenen zusätzlichen Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress und die Progression der Atherosklerose darzustellen. Diese These wird durch kürzlich beschriebene antiatherogene Eigenschaften des murinen PON2 Proteins in einem PON2-defizienten Apolipoprotein-E^{-/-} Maus Modell (46) untermauert.

5.2.2 Interpretation der anti-oxidativen Funktion von PON2

Ob die Reduktion vaskulärer ROS durch PON2 die physiologische Hauptfunktion des Enzyms darstellt, oder ob es sich hierbei nur um einen positiven Nebeneffekt handelt, muss genauso weiter abgeklärt werden, wie die Frage nach dem Mechanismus der ROS Reduktion. Mehrere Modelle könnten die anti-oxidative Funktion des Enzyms erklären: So könnte PON2 mit einem bisher unbekanntem oder noch nicht identifizierten Faktor in Wechselwirkung treten und über dessen Aktivierung eine Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies herbeiführen. Zur Abklärung dieser Möglichkeit könnte sich die Suche nach Interaktionspartnern von PON2 als sinnvoll erweisen. Es ist ebenfalls denkbar, dass PON2 in der Lage ist Reduktionsäquivalente zu generieren und für andere protektive Enzymsysteme bereitzustellen um durch ROS oxidierte Moleküle, wie beispielsweise Fettsäuren wieder zu reduzieren. Zudem muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass PON2 direkt ROS reduziert, wobei unklar ist, ob dies funktionell an die enzymatische Laktonase-Aktivität des Proteins gekoppelt ist. Letztere Hypothese der direkten ROS-Reduktion könnte untermauert werden durch den Befund, dass eine Mutation der Aminosäure Cystein²⁸⁴ in PON1 eine verminderte

Schutzfunktion gegenüber oxidativen LDL-Modifikationen erzielte (22). Folglich besteht die Möglichkeit, dass PON1 und auch PON2 z.B. mittels freier Sulfhydrylgruppen am Cys284 gleichermaßen über ein Reduktionsäquivalent verfügen, welches die anti-oxidative Funktion erklären könnte. Eine spezifische Deletion oder Substitution dieser Aminosäure innerhalb des PON2-Proteins und die Durchführung von Experimenten zur Überprüfung des potentiellen Verlusts der anti-oxidativen und enzymatischen Funktion könnte diese Hypothese bestätigen.

5.2.3 Die potentielle Rolle von PON2 während ER-Stress und UPR

Neben der potentiellen Schutzfunktion vor vaskulären und intrazellulär generierten ROS, kommt unter Berücksichtigung der subzellulären Lokalisation von PON2 im ER eine weitere physiologische Funktion für PON2 in Frage: Der spezifische Schutz des ER vor zu hohen ROS-Spiegeln. Erhöhte ROS-Spiegel innerhalb des ER können zur oxidativen Modifikation der im ER befindliche Proteine führen (14) und stellen letztlich ebenfalls eine Form von in Kapitel 2.3 beschriebenem ER-Stress dar. Neben der relativ unspezifisch ROS-freisetzenden Substanz DMNQ wurden in den in Kapitel 4.2 beschriebenen Experimenten mit Tunicamycin und TGF β 1 auch zwei Agenzien verwendet, welche auf unterschiedlichem indirektem Weg zu einer Erhöhung der ROS-Spiegel im ER führten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass PON2 in der Lage ist ER-Stress begleitende ROS zu reduzieren. Somit schützt PON2 die Zellen vor ER-Stress, welcher über den im Kapitel 2.3 beschriebenen *Unfolded Protein Response* zur Aktivierung von entweder proapoptischen, oder antiapoptischen Mechanismen, sowie inflammatorischen Prozessen führt. Die genauen Signalwege, die der ER-Stress vermittelten Apoptose entgegenwirken, sind bisher jedoch noch unklar. Die in Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse belegen, dass die PON2-Proteinexpression nach Tunicamycin- und DTT-induziertem ER-Stress ansteigt. Grund für den Anstieg der Proteinexpression ist die ER-Stress stimulierte PON2-Promoter-Aktivität. PON2 könnte somit mehr als eine anti-oxidative Funktion in der Zelle ausüben.

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress die PON2-Expression steigern kann (45). Somit bleibt jedoch unklar ob die Tunicamycin-induzierte Steigerung der PON2-Promoter-Aktivität auf den primären ER-Stress oder auf den sekundär entstehenden oxidativen Stress zurückzuführen ist. Dies könnte durch Experimente differenziert werden, in denen die Zellen sowohl mit ER-Stress induzierenden Agenzien, als auch mit Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E, N-acetylcystein oder anderen behandelt werden. Blicke die ER-Stress induzierte PON2-

Expression in einem solchen Experiment weiterhin gesteigert, so erschiene eine Induktion der Expression über sekundäre ROS-Verbindungen unwahrscheinlich.

Zudem wird diese Annahme dadurch unterstützt, dass Sequenzanalysen des PON2-Promoters ergaben, dass dieser ER-Stress regulative Elemente wie sogenannte ERSEs / UPRs (*er stress elements; unfolded protein response elements*) enthält (28). Derartige Elemente werden bei ER-Stress und Induktion des UPR-Signalweges aktiviert und können letztendlich zu einer gesteigerten Proteinexpression führen. Das Vorhandensein derartiger regulativer Sequenzen könnte eine ER-Stress induzierte Steigerung der PON2-Transkription nahelegen und die hier erreichten Befunde untermauern.

In der Arbeitsgruppe konnte der Nachweis erbracht werden, dass PON2 in der Lage ist die UPR-stimulierte Aktivierung von Caspase 3 zu reduzieren (28) und damit antiapoptotisch wirksam zu sein. Unklar ist, ob diese Funktion auf der enzymatischen oder anti-oxidativen PON2-Aktivität beruht. Ebenso ist ungeklärt, welches die Funktion der beiden PON2-Isoformen und deren Interaktionen innerhalb der Signalwege des UPR sind. Zwar ist belegt, dass andauernder ER-Stress pro-apoptotisch wirkt und die Caspase-3 aktiviert; jedoch sollten die zitierten Ergebnisse zur anti-apoptotischen Funktion von PON2 mit anderen methodischen Ansätzen verifiziert werden. So ließe sich kontrollieren, ob PON2 die ER-Stress vermittelte Spaltung von PARP reduziert, die DNA Degradation vermindert, Annexin-V-/PI-positive Zellen im FACSscan reduziert oder derer mehr.

5.2.4 Potentielle Funktionen von PON2 in weiteren Organellen

Wie die in Kapitel 4.3.2 abgebildete Abbildung 10B zeigt, werden nach Aktivierung des UPR mit PON2-iso1 und PON2-iso2 beide bekannten Isoformen des Enzyms neu synthetisiert. Es bleibt jedoch offen, welche Funktionen den zwei Isoformen im ER-Stress zukommen und zu welchem Zweck neues PON2-Protein synthetisiert wird. Im Hinblick auf die in Kapitel 4.1 beschriebene subzelluläre Lokalisation von PON2 stellen neben dem ER vor allem Kernlamina und Nukleoplasma zwei weitere Kompartimente dar, in denen endogenes PON2 mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der anti-oxidativen Funktion von PON2 und seiner Lokalisation im Nukleoplasma könnte angenommen werden, dass das Protein ebenso zum Schutz genomischer DNA vor oxidativen Schäden beiträgt. Die Behandlung von Endothelzellen mit und ohne PON2-Überexpression mit z.B. H₂O₂ und nachgeschalteter Bestimmung des 8-oxo-Guanin Gehaltes könnte diese

These eventuell untermauern. Bei einer schützenden Funktion von PON2 gegenüber oxidativen DNA Schäden wäre dann nach PON2-Überexpression ggf. weniger 8-oxo-Guanin zu verzeichnen, welches als Marker für oxidative DNA Schäden gilt. Darüber hinaus kann, wie oben aufgeführt eine Lokalisation von PON2 in Mitochondrien nicht ausgeschlossen werden. Es ist hinreichend bekannt, dass Mitochondrien eine hohe ROS-Produktion aufweisen und an der pro-apoptischen Signaltransduktion entscheidend beteiligt sind. Möglicherweise erfüllt PON2 auch in Mitochondrien antioxidative Aufgaben oder ist an Signalwegen beteiligt, die mit der Induktion der Apoptose in Verbindung stehen.

5.3 PON2 und Krebs

Bereits zu Beginn der Arbeit war die zytoprotektive Eigenschaft von PON2 vermutet worden und diese Erkenntnisse wurden hier zu spezifischen Fragestellungen zum vaskulären System erweitert. Eine deutlich anti-oxidative Funktion von PON2 konnte belegt werden. Zwar bleibt hier unbekannt, welche Radikal-Spezies in welcher Organelle verringert wird und wo PON2 somit anti-oxidativ wirkt, doch die daraus resultierende anti-apoptische Wirkung ist mittlerweile gezeigt worden (Horke et al.; unveröffentlicht). Zwar erscheint es auf den ersten Blick von Vorteil, über ein anti-apoptisches Prinzip das Überleben von (vaskulären) Zellen zu erreichen, doch wirft dies gleichzeitig die Frage auf, inwieweit PON2 bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielt. Ein zentrales Merkmal maligner Tumoren ist die Eigenschaft der Apoptose zu entgehen, wodurch es zur ungehinderten Vermehrung maligne entarteter Zellen kommt. Tumorzellen, welche zumindest zum Teil eine erhöhte PON2-Expression aufzeigen (72-75), könnten somit zumindest der ER-Stress vermittelten Apoptose durch den UPR Signalweg entgehen z.B. durch Verringerung des ER-Stress begleitenden oxidativen Stresses. Andererseits könnte ein gezieltes Ausschalten der Genexpression von PON2 zum Absterben derartiger Zellen führen oder die Sensitivität gegenüber pro-apoptischen (therapeutischen) Stimuli erhöhen.

Während eine erhöhte PON2-Expression im vaskulären System hilfreich ist, wäre eine PON2-bedingte Reduktion der Apoptoserate im Bereich der Onkologie maßgeblich an Tumorwachstum und Zellentartung beteiligt.

Somit bietet sich PON2 möglicherweise auch als Untersuchungsobjekt für tumorbiologische Fragestellungen an.

5.4 PON2- Neuer Gegenspieler der Atherosklerose?

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu PON2 und ihrer physiologischen Funktion geben Grund zu der Annahme, dass PON2 eine entscheidende Rolle in der Genese der Atherosklerose spielt. In diesem Sinne fungiert PON2 als ein auf subzellulärer Ebene lokalisiertes körpereigenes Enzymsystem zum Schutz vor Arteriosklerose: PON2 wurde als im ER lokalisiert nachgewiesen und ist vermutlich auch im Nukleoplasma und in Mitochondrien lokalisiert. Die durchgeführten Versuche zur physiologischen Funktion von PON2 haben zwei entscheidende Eigenschaften des Enzyms identifiziert: Zum einen eine deutliche Reduktion von oxidativem Stress durch PON2 und - möglicherweise darauf basierend- eine verminderte ER-Stress induzierte Apoptose (28) (siehe Kapitel 4). ER-Stress und ER-Stress-vermittelte Apoptose sind neben neurodegenerativen Erkrankungen und Diabetes mellitus auch an der Atherogenese beteiligt (12, 76). Die Fähigkeit von PON2 ROS zu reduzieren, wurde unabhängig von unserer Arbeitsgruppe auch von Ng (2) beschrieben. Ng et al. konnten in dieser Arbeit unter dem Einfluss von PON2 auch eine verminderte Bildung von oxLDL und eine reduzierte Attraktion von Makrophagen nachweisen, was eine deutlich anti-atherogene PON2 Funktion belegt. Möglicherweise ist PON2 in der Lage derartig veränderte Partikel direkt in ihre physiologische Form zu überführen, jedoch im Vergleich zur plasmaproteingebundenen PON1 in einem anderen Kompartiment, nämlich auf subzellulärer Ebene im ER und im Nukleoplasma. Dies würde den durch derartig veränderte Fette hervorgerufenen ER-Stress reduzieren und helfen die Zelle vor programmiertem Zelltod zu schützen.

Vor diesem Hintergrund zeigen sowohl die publizierten Daten anderer Gruppen als auch die eigenen Ergebnisse die anti-atherogenen Eigenschaften von PON2 und die potentielle Bedeutung dieses Enzyms auf: PON2 vermag die Zellen unseres Gefäßsystems vor oxidativem Stress zu schützen und senkt die Entstehung von oxLDL-Partikeln. Daraus resultiert eine verminderte Aufnahme dieser Partikel in Makrophagen und deren Umwandlung in Schaumzellen. Weiterhin senkt PON2 ER-Stress und ER-Stress-vermittelte Apoptose in Endothelzellen. Geschädigte Endothelien stellen wiederum eine Grundlage für die Bildung atheromatöser Läsionen dar. Die subzelluläre Lokalisation von PON2 und ihre nachgewiesenen ER-Stress reduzierenden Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass PON2 eine derartige Funktion auch in Makrophagen erfüllen könnte und somit der Schaumzellbildung entgegenwirkt. ER-Stress selbst induziert die Expression von PON2 und spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Genese der Atherosklerose. Die Induktion von PON2 könnte folglich als körpereigene Antwort des Körpers auf im Rahmen

der Atherogenese ablaufende pathophysiologische Vorgänge auf subzellulärer Ebene interpretiert werden. Passend zu dieser Theorie ist, dass die Expression des anti-oxidativen PON2 bei steigendem oxidativen Stress induziert wird, was als kompensatorischer Mechanismus angesehen wird (45).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente belegen die subzelluläre Lokalisation des Proteins und zeigen einen Stimulus der Induktion von PON2. Hingegen ist die genaue Funktion in Antwort auf ER-Stress, wie auch der anti-oxidative Mechanismus nicht geklärt. Der mögliche Zusammenhang mit der bekannten enzymatischen Laktonase-Aktivität konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erforscht werden. Stoltz et al. konnten jedoch aufzeigen, dass eine derartige Aktivität bei der Abwehr von *Pseudomonas aeruginosa* wichtig zu sein scheint (26).

PON2 nimmt somit nicht nur im Rahmen der Atherosklerose eine bedeutende Funktion ein, sondern auch im Hinblick auf Infektions-relevante, mikrobiologische Fragestellungen. Um jedoch das gesamte Spektrum der physiologischen Funktionen von PON2 zu ergründen, sei es nun auf dem Gebiet mikrobieller Abwehrmechanismen, der Atherosklerose, wie in dieser Arbeit, bei der Entwicklung von Alzheimer Demenz, Diabetes mellitus, oder gar der Entstehung von Krebs, werden noch viele weitere detaillierte Untersuchungen nötig sein.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Erhöhte Spiegel von oxidativem Stress bedingen Atherosklerose, eine Krankheit die über 50% aller Todesfälle in der westlichen Welt ausmacht. Es ist entscheidend Mechanismen zur Abwehr dieser Krankheit zu ergründen.

Da genetische Polymorphismen des körpereigenen Enzyms Paraoxonase 2 (PON2) mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind, wurden ihre Regulation und potentiell antioxidativen Funktionen in vaskulären Zellen analysiert. Mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden konnte ich erstmals zeigen, dass PON2 in vaskulären Zellen vornehmlich subzellulär im ER lokalisiert ist. Anhand verschiedener Experimente wurde PON2 als potenter Faktor zur Reduktion von ROS identifiziert. Erhöhte ROS-Spiegel führen zur Aktivierung eines als *unfolded protein response* (UPR) bekannten ER-Stress-Signalwegs. Dieser ist neben Atherosklerose in eine Vielzahl von Erkrankungen involviert und hat kritischen Einfluss auf das Überleben oder Absterben von Zellen. Durchgeführte Promoter-Reporter Studien bewiesen die Induktion der Protein-Expression von PON2 nach Aktivierung des UPR-Signalwegs, was als kompensatorischer Mechanismus der Zelle zur Vermeidung UPR-induzierter Apoptose verstanden werden könnte. PON2 wehrt oxidativen Stress und die UPR-induzierte Apoptose ab und ist ein protektiver Faktor vor Atherosklerose.

In einem Krebsmodell könnte PON2 aber als antiapoptotischer Faktor entscheidend am Überleben von Tumorzellen beteiligt sein. Gerade diese beiden gegensätzlichen Aspekte der antiapoptotischen Funktion des Proteins zeigen die Notwendigkeit für weitere Untersuchungen zu PON2 auf.

6.2 Summary

Elevated levels of reactive oxygen species (ROS) predispose to the development of atherosclerosis, a disease which is responsible for over 50% of morbidity and mortality in western societies. The fact that cardiovascular diseases cause a higher mortality than all cancers combined stresses the need to identify mechanisms to protect against this disease.

Because genetic polymorphisms of human paraoxonase-2 (PON2) have been associated with cardiovascular diseases, its regulation and potential antioxidative function were analyzed in this study. The analysis of the subcellular location by different techniques showed for the first time an association of PON2 mainly with the ER, mitochondria and nuclear membrane. Since enhanced levels of reactive oxygen species (ROS) are key features of atherosclerosis and other diseases, we determined PON2's effect on ROS and found that enhanced PON2 expression significantly reduced intracellular ROS levels. Elevated levels of oxidative stress lead to the activation of an ER-stress pathway, known as unfolded protein response (UPR), which is involved in many different diseases and has critical influence in survival or induction of apoptosis in cells. Our gene reporter experiments showed an increased PON2 promoter activity in response to UPR activation. This could be interpreted as a compensatory mechanism to avoid UPR-induced oxidative stress and / or apoptosis. Thus, PON2 defends vascular cells against oxidative stress and UPR-induced apoptosis and is a protective factor against atherosclerosis.

Finally, given the importance of both ROS and ER stress in diseases other than atherosclerosis, in particular cancer, there is a possibility that the antiapoptotic qualities of PON2 play a major role for the survival of tumor cells. Future studies may therefore address these two antithetic aspects of PON2's antiapoptotic function, which may be appreciated from a cardiovascular standpoint, but detrimental when considering cancer development.

7 Literaturverzeichnis

1. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*2006 Sep;7(9):880-5.
2. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*2001 Nov 30;276(48):44444-9.
3. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, et al. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med*2005 Aug 1;39(3):336-44.
4. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci*2000 Aug;57(8-9):1287-305.
5. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*2001 Nov 27;104(22):2673-8.
6. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*2003 Aug;285(2):R277-97.
7. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, et al. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett*1998 Oct 16;437(1-2):24-8.
8. Forstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur J Clin Pharmacol*2006 Feb;62(Suppl 13):5-12.
9. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*2006 Apr 4;113(13):1708-14.
10. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*2008 Jun;5(6):338-49.
11. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*2005 Dec 1;438(7068):612-21.
12. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*2003 Sep;5(9):781-92.
13. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ*2006 Mar;13(3):374-84.
14. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*2005;74:739-89.
15. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*2006 Jan 24;66(2 Suppl 1):S102-9.
16. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*2002 Dec;51 Suppl 3:S455-61.
17. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*2007 Apr;50(4):752-63.
18. Scheuner D, Kaufman RJ. The Unfolded Protein Response: A Pathway That Links Insulin Demand with β -Cell Failure and Diabetes. *Endocr Rev*2008 Apr 24.
19. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2001 May;280(5):E685-94.

20. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*1994 Apr 1;269(13):9889-97.
21. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*1996 May 1;33(3):498-507.
22. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*1998 Oct;18(10):1617-24.
23. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*1998 Apr 15;101(8):1581-90.
24. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*2005 Apr 26;44(16):6371-82.
25. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med*2008 Jul 15;45(2):146-57.
26. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusic AJ, et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*2007 Apr;292(4):L852-60.
27. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, et al. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun*2008 Jun;76(6):2512-9.
28. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*2007 Apr 17;115(15):2055-64.
29. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*2005 Aug;16(4):393-9.
30. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)*2004 Nov;107(5):435-47.
31. Erlich PM, Lunetta KL, Cupples LA, Huyck M, Green RC, Baldwin CT, et al. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*2006 Jan 1;15(1):77-85.
32. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med*2003 Dec;81(12):766-79.
33. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, et al. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet*2003 Jan;72(1):13-22.
34. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, Boda K, Marki-Zay J, Kalman J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry*2002;7(1):110-2.
35. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*2001 Feb 15;154(3):641-9.
36. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*2002 Aug;13(4):357-62.

37. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*1998 Jan;62(1):36-44.
38. Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, et al. Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease. *Clin Chim Acta*2005 Aug 16.
39. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, et al. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res*2004 Jan 5;120(2):201-4.
40. Mackness B, McElduff P, Mackness MI. The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. *J Intern Med*2005 Oct;258(4):363-8.
41. Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes. *Diabetologia*2001 Jan;44(1):104-7.
42. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*2000 Apr;149(2):435-42.
43. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Med Genet*2006;7:28.
44. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*2004 Feb 28;363(9410):689-95.
45. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med*2004 Dec 15;37(12):2052-63.
46. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, et al. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem*2006 Oct 6;281(40):29491-500.
47. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab*2006 Aug 24;89(4):368-73.
48. Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Human liver paraoxonase (PON1): subcellular distribution and characterization. *J Biochem Mol Toxicol*1998;12(1):61-9.
49. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*1993 Dec;104(1-2):129-35.
50. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*2001 Apr;21(4):542-7.
51. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, et al. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res*2007 Apr 27;100(8):1200-7.
52. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*2000 Oct 27;275(43):33435-42.

53. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*1970 Aug 15;227(5259):680-5.
54. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*1998 Feb 19;391(6669):806-11.
55. Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*1998 Dec 23;95(7):1017-26.
56. Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, De Robertis EM. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*2000 Jun 15;405(6788):757-63.
57. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*2000 Oct;127(19):4147-56.
58. Sharp PA. RNA interference--2001. *Genes Dev*2001 Mar 1;15(5):485-90.
59. Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev*1999 Jan 15;13(2):139-41.
60. Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*2000 Apr 28;101(3):235-8.
61. Sijen T, Kooter JM. Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays*2000 Jun;22(6):520-31.
62. Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna*2002 Jul;8(7):855-60.
63. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*2000 Mar 31;101(1):25-33.
64. Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, et al. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem*1999 Jun 15;271(1):53-8.
65. Sohn HY, Gloe T, Keller M, Schoenafinger K, Pohl U. Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence dye L-012. *J Vasc Res*1999 Nov-Dec;36(6):456-64.
66. Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem*1994 Oct 21;269(42):26512-7.
67. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*2006 Apr;290(4):L661-L73.
68. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*2007 Jun 13;8(7):519-29.
69. Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem*1997 Feb 14;272(7):4327-34.
70. Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med*2007 Sep 1;43(5):730-9.
71. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*2004 Oct;84(4):1381-478.
72. Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, et al. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*2006 Aug;20(8):1400-7.

73. Li Y, Tang R, Xu H, Qiu M, Chen Q, Chen J, et al. Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002 Jul;128(7):369-79.
74. Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, et al. Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res* 2002 Jun 15;62(12):3562-71.
75. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003 Oct 15;102(8):2951-9.
76. Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, et al. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol* 2005 Oct 10;171(1):61-73.

