

Die Regulation des Enzyms Paraoxonase-2 sowie dessen Einfluss auf die Hämatopoese

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Biologie

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Julianna Amort
geb. am 12.04.1979 in Karlsruhe
Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22. August 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	17
1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen	17
1.1.1 Paraoxonase-1 (PON1)	18
1.1.2 Paraoxonase-2 (PON2)	19
1.1.3 Paraoxonase-3 (PON3)	22
1.2 Die Rolle von PON2 in der Tumorbilogie	23
1.3 Das hämatopoetische System	26
1.4 Die biomedizinische Relevanz eines konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells („PON2 ^{+/+} “)	28
1.5 Ziele der Arbeit	29
2 Material	31
2.1. Chemikalien	31
2.2. Verbrauchsmaterialien	32
2.3. Laborgeräte	32
2.4. Reagenzien und Kits	33
2.5. Enzyme	34
2.6. Antikörper	34
2.7. Sekundärantikörper	35
2.8. Plasmide	35
2.9. Oligonukleotide	36
2.9.1 Oligonukleotidsequenzen für die Synthese der PON2-Promotor-Region	36
2.9.2 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des 7,5 kb PON2-Promoters	36
2.9.3 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des Gene-Targeting-Vektors	36

2.9.4	Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des dnFLAGTCF4	37
2.9.5	Oligonukleotidsequenzen für die Genotypisierung von transgenen Mäusen	37
2.9.6	Oligonukleotidsequenzen für die ChIP-Analysen	37
2.9.7	Oligonukleotidsequenzen für die quantitativen real-time RT-PCR Analysen	38
2.10	Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien	38
2.11	Zelllinien und Medien für die Zellkultur	41
2.11.1	Zelllinien	41
2.11.2	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	41
2.12	Bakterien	42
2.13.	Versuchstiere	42
3	Methoden	44
3.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	44
3.1.1	Kultivierung humaner Zellen	44
3.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen	44
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Ausplattierung eukaryoter Zellen	45
3.1.4	Transiente Transfektion von Plasmiden in humane Zellen	45
3.1.5	Transiente Transfektion von siRNA in humanen Zellen	45
3.1.6	Reporter-Gen-Analysen zur Bestimmung der PON2-Promoter-Aktivität	46
3.1.7	Die Expression von PON2 unter hypoxischen Bedingungen	47
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	47
3.2.1	Klonierung und Extraktion von DNA	47
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	51
3.2.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
3.2.4	Phenol-Chloroformextraktion mit anschließender Isopropanolpräzipitation	51
3.2.5	Generierung einer biotinylierten PON2-Promoter-DNA-Sequenz zur Isolierung von Promoter-bindenden Proteinen	52
3.2.6	Affinitätsreinigung PON2-Promoter-bindender Proteine	52
3.2.7	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	53
3.2.8	Extraktion der Gesamtzell-RNA aus eukaryoten Zellen	56
3.2.9	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	56
3.2.10	cDNA-Synthese mittels Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	56
3.2.11	Quantitative real-time-RT-PCR (qRT-PCR)	57
3.2.12	Identifizierung PON2 regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor knock-down Analyse	57
3.2.13	Expression von PON2 in karzinogenem Lungengewebe	58
3.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	58
3.3.1	Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryoten Zellen	58
3.3.2	Fraktionierung von Zytoplasmaextrakt und Nuklei aus eukaryotischen Zellen	58
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	59
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
3.3.5	Proteinfärbung durch Coomassie Blue	60
3.3.6	Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen	60

3.4	Bioinformatische Methoden - in silico Analyse der PON2-Promoter-Sequenz	61
3.5	Vergleichende Analyse des hämatopoetischen Systems von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp C57BL/6J-Mäusen	62
3.5.1	Isolierung von Zellen aus Knochenmark, Milz und Thymus von Mäusen	62
3.5.2	Durchflusszytometrie zur quantitativen Differenzierung und Charakterisierung der verschiedenen Zellsubpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen	63
3.6	Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2 ^{+/+})	65
3.6.1	Kultivierung pluripotenter Stammzellen der Maus	65
3.6.2	Kryokonservierung und Auftauen pluripotenter Stammzellen	65
3.6.3	Bestimmung der Zellzahl und Ausplattierung MEF- und ES-Zellen	66
3.6.4	Klonierung des Gene-Targeting-Vektors	66
3.6.5	Stabile Transfektion des Gene-Targeting-Vektors R26-CAGs-mPON2-HA-IRES-EGFP in pluripotente Stammzellen der Maus mittels Elektroporation	69
3.6.6	Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen	69
3.6.7	Southern Blot-Analyse	70
3.6.8	Radioaktive Markierung und Hybridisierung	70
3.6.9	Genotypisierung von transgenen Mäusen	71
3.6.10	Herstellung und Haltung transgener Mausstämme	72
3.7	Statistik	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Affinitätsreinigung PON2-Promoter-bindender Zellkernproteine	73
4.2	Bioinformatische Methoden - in silico-Analyse der PON2-Promoter-Sequenz	77
4.3	Identifizierung PON2-regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor knock-down Analyse	79
4.4	Annexin A2 hat keinen Effekt auf die Regulation der PON2-Expression	81
4.5	Das mRNA-bindende Protein AUF-1 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt	81
4.6	Hypoxie und der durch Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 steigern nicht die Expression des PON2-Proteins	83
4.7	Die Regulation der PON2-Expression in verschiedenen Leukämiezelllinien	85
4.7.1	Die Tyrosinkinase Bcr / Abl hat keinen Effekt auf die Regulation der PON2-Expression	85
4.7.2	Die Tyrosinkinase Flt3 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt	86
4.7.3	Die Expression von PON2 in verschiedenen AML-Zelllinien	87
4.7.4	Imatinib-restistente Leukämiezelllinien weisen eine gesteigerte PON2-Expression auf	88
4.8	Die Regulation der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562	88

4.8.1	Die PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 wird weder durch Imatinib noch ERK induziert	88
4.8.2	GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562	91
4.8.3	Die durch GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression wird durch LEF-1, aber nicht TCF1 und TCF4 reguliert	95
4.8.4	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) zur Identifizierung von LEF-1 als PON2-Promoter-bindendes Protein	97
4.8.5	Das rekombinante Protein Wnt3a aktiviert nicht die LEF-1-Aktivität	100
4.8.6	FoxO1 und insbesondere FoxO4 führen zu einer Reduktion der endogenen PON2-Expression	102
4.8.7	Der PI3K / Akt-Signalweges ist an der Regulation der PON2-Expression beteiligt	103
4.9	Die Untersuchung der PON2-Expression in karzinogenem Lungengewebe	104
4.10	Vergleichende Analyse des hämatopoetischen Systems von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp C57BL/6J-Mäusen	106
4.10.1	Durchflusszytometrie-Analysen pluripotenter Zellen aus dem Knochenmark	106
4.10.2	Durchflusszytometrie-Analysen differenzierender Knochenmarkszellen aus PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen	108
4.10.3	Durchflusszytometrie-Analyse der aus der Milz isolierten Zellen aus PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen	110
4.10.4	Durchflusszytometrie-Analyse der aus dem Thymus isolierten Zellen aus PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen	113
4.10.5	Analyse des peripheren Blutes von PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen	115
4.11	Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2 ^{+/+})	119
4.11.1	Aufbau des Gene-Targeting-Vektors	119
4.11.2	Homologe Rekombination in ES-Zellen	120
4.11.3	Cre-induzierbare Expression von GFP in auf homologe Rekombination getesteten ES-Zellklonen	122
4.11.4	Injektionen und Genotypisierung der Chimären	122
5	Diskussion	124
5.1	Methoden zur Identifizierung PON2-Promoter-bindender Proteine	124
5.2	Das mRNA-bindende Protein AUF-1 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt	125
5.3	Hypoxie und der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 α steigern nicht die Expression des PON2-Proteins	126
5.4	Die Regulation der PON2-Expression in Leukämiezellen	127
5.5	Die Regulation der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562	130
5.5.1	Die PON2-Proteinexpression in K562-Zellen wird nicht durch das Chemotherapeutikum Imatinib oder die Kinase ERK reguliert	130
5.5.2	Die durch GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression in K562-Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor LEF-1 reguliert	131

5.6	Modell zur Regulation der Expression des humanen Enzyms PON2 in der Leukämiezelllinie K562	134
5.7	Die PON2-Expression ist in Lungentumoren nicht gesteigert	138
5.8	Analyse des hämatopoetischen Systems von PON2 ^{-/-} -Mäusen	139
5.9	Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2 ^{+/+})	143
6	Zusammenfassung	145
7	Literatur	146
8	Publikationen	157
9	Danksagung	159
10	Lebenslauf	160
11	Eidesstattliche Erklärung	161

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Übersicht über das hämatopoetische System.	26
Abbildung 2: Schematische Darstellung des für PON2-HA kodierenden Bereichs aus dem <i>Gene-Targeting</i> -Vektor.	67
Abbildung 3: <i>In silico</i> -Analyse PON2-Promoter-bindender Proteine.	78
Abbildung 4: Bestimmung PON2 regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor <i>knock-down</i> Analyse.	80
Abbildung 5: Das RNA-bindenden Protein AUF-1 steigert nicht die PON2-mRNA-Expression.	82
Abbildung 6: Ein <i>knock-down</i> aller Isoformen des RNA-bindenden Proteins AUF-1 steigert nicht die PON2-mRNA-Expression.	83
Abbildung 7: Hypoxie steigert nicht die Expression der PON2-mRNA.	84
Abbildung 8: Weder Hypoxie noch der durch Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1 α steigern die PON2-Proteinexpression.	84
Abbildung 9: Die Bcr / Abl-Expression hat keinen Einfluss auf die PON2-Proteinexpression	86
Abbildung 10: Die Tandem-Duplikation des Flt3-Gens führt nicht zur Steigerung der PON2-Expression.	87
Abbildung 11: PON2-Proteinexpression in humanen AML- und Adenokarzinomzelllinien.	87
Abbildung 12: Die PON2-mRNA-Expression ist in Imatinib-resistenten CML-Zelllinien stark gesteigert.	88
Abbildung 13: Imatinib besitzt keinen direkten Effekt auf die PON2-Expression.	89
Abbildung 14: Die Kinase ERK hat keinen Effekt auf die Regulation der Expression des PON2-Proteins.	90
Abbildung 15: Die gleichzeitige Behandlung mit Imatinib und dem ERK-Inhibitor PD 98059 hat keinen Effekt auf die PON2-Proteinexpression.	90
Abbildung 16: Die durch Valproinsäure vermittelte Inhibierung von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Expression die PON2-Expression.	92
Abbildung 17: Die durch SB 216763 hervorgerufene Inhibition von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der LEF-1-Induktion.	93
Abbildung 18: Die durch SB 216763 hervorgerufene Inhibition der Kinase GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Promoter-Aktivität.	94

Abbildung 19: Die durch SB 216763 vermittelte Inhibition von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Expression.	95
Abbildung 20: LEF-1 steigert die GSK-3 β -vermittelte PON2-Promoter-Aktivität.	97
Abbildung 21: Ergebnis der ChIP-Analyse.	99
Abbildung 22: Wiederholung der PCR mit spezifischen Primern für Zielgene des Wnt / β -Catenin-Signalweges.	100
Abbildung 23: Das humane rekombinante Protein Wnt3a steigert nicht die Induktion von LEF-1.	101
Abbildung 24: Das murine rekombinante Protein Wnt3a steigert nicht die Induktion von LEF-1.	101
Abbildung 25: Die Transkriptionsfaktoren FoxO1 und FoxO4 hemmen die PON2-Promoter-Aktivität.	103
Abbildung 26: Der PI3K-Inhibitor LY 294002 inhibiert die PON2-Expression.	104
Abbildung 27: Bestimmung der PON2-mRNA-Expression in karzinogenem Lungengewebe.	106
Abbildung 28: Befunde von pluripotenten Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen aus Knochenmarksanalysen von Wildtyp- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	107
Abbildung 29: Befunde von Zellen aus der myeloischen Reihe aus Knochenmarksanalysen von Wildtyp- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	108
Abbildung 30: Befunde der Zellen aus Subpopulationen der Knochenmarksanalyse von Wildtyp- und PON2 ^{-/-} -Mäusen.	110
Abbildung 31: Splenomegalie bei weiblichen PON2 ^{-/-} -Mäusen.	111
Abbildung 32: Das durchschnittliche Milzgewicht von PON2 ^{-/-} -Mäusen ist signifikant erhöht im Vergleich zu C57Bl6/J-Mäusen.	111
Abbildung 33: Befunde der differenzierten Zellen der myeloischen Reihe aus der Milz von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.	112
Abbildung 34: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus der Milz von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.	113
Abbildung 35: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus dem Thymus von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.	114
Abbildung 36: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus dem Thymus von PON2 ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.	115
Abbildung 37: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen.	116
Abbildung 38: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen.	117

Abbildung 39: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen.	117
Abbildung 40: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2 ^{-/-} - und C57Bl/6-Mäusen.	118
Abbildung 41: Homologe und Cre-vermittelte Rekombination des <i>Gene-Targeting</i> -Vektors in den ROSA26-Lokus.	120
Abbildung 42: Ereignisse nach erfolgreicher homologer Rekombination in den ROSA26-Lokus.	121
Abbildung 43: Southern Blot-Analyse.	121
Abbildung 44: <i>Dot-Plot</i> .	122
Abbildung 45: Schematische Darstellung des Wnt / β -Catenin-Signalweges.	132
Abbildung 46: Schematische Darstellung einer möglichen Regulation von PON2 durch ROS und die Signalwege Wnt / β -Catenin, PI3K / Akt, JNK und die Transkriptionsfaktorfamilie FoxO.	135
Abbildung 47: Schematische Darstellung eines <i>Gen-Targetings</i> durch homologe Rekombination vermittelt durch die Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen.	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 verwendete Zelllinien.	41
Tabelle 2 gibt einen Überblick über die jeweils ausplattierten Zellmengen bezugnehmend auf die zu erreichende Konfluenz am Versuchstag.	45
Tabelle 3 Pipetierschema für die SDS-PAGE-Gele.	59
Tabelle 4 Antikörper für FACS-Färbungen.	63
Tabelle 5 Für <i>Lineage</i> -Negative-Selektion verwendetet Antikörper.	64
Tabelle 6 gibt einen Überblick über die jeweils ausplattierten Zellmengen bezugnehmend auf die zu erreichende Konfluenz am Versuchstag.	66
Tabelle 7 Ergebnisse der MS-Analyse selektiv PON2-Promoter-bindender Zellkernproteine.	74
Tabelle 8 Ergebnisse der LC / MS-Analyse selektiv an den PON2-Promoter-bindender Zellkernproteine.	75
Tabelle 9 Übersicht über die Antikörper-Kombinationen, die zur Differenzierung der zellulären Subpopulationen in den Durchflusszytometrie-Analysen angewendet wurden.	109

Abkürzungsverzeichnis

3OC12	N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunoprecipitation
CHOP	<i>C/EBP homologous protein 10</i>
CLP	<i>common lymphocyte progenitor</i>
cm	Zentimeter
CML	chronisch myeloischen Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitors</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-regulated-kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und die Übrigen)
ETC	<i>electron transport chain</i>

F	Farad
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
<i>firefly</i>	Glühwürmchen
FoxO	Klasse O der <i>forkhead-box</i> Transkriptionsfaktoren
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP bzw. EGFP	(<i>enhanced</i>) grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>granulocyte / macrophage progenitor</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDL	<i>high density lipoprotein particle</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)
HSC	<i>hematopoetic stem cells</i>
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminaler Kinase
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC / MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrikopplung
LEF-1	<i>lymphoid enhancer factor 1</i>
LDL	<i>low density lipoprotein particles</i>
LT	<i>long-term</i>
M	Mol
mA	Milliampere
MEP	<i>megakaryocyte / erythrocyte progenitor</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>

MS	Massenspektrometrie
n	nano
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
o.g.	oben genannt
oxLDL	<i>oxidized low density lipoprotein particles</i>
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> RT-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygene species</i>
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SOD	Superoxid-Dismutase
ST	<i>short-term</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

vs.

versus

Wnt

wingless

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Die Proteinfamilie der Paraoxonase-Enzyme (PON-Enzyme) besteht aus den Mitgliedern PON1, PON2 und PON3¹. Alle humanen PON-Gene sind in einem Cluster auf Chromosom 7q21.3-22.1 lokalisiert und besitzen eine Größe von ~40 kDa^{1, 2}. Die Mitglieder der PON-Familie weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf mRNA und Proteinebene auf und sind in Säugetieren stark konserviert^{1, 3}. In Lokalisation, enzymatischer Aktivität und Regulation unterscheiden sich die Proteine voneinander. PON1 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, dort sekretiert und zirkuliert im Serum assoziiert an *high density lipoprotein particles* (HDL). Im Gegensatz dazu wurde PON3 entgegen früherer Annahmen als intrazelluläres Enzym nachgewiesen³⁻¹⁰. Es scheint jedoch, dass die PON3 Lokalisation mit der Spezies variiert⁵. PON2 ist ein ausschließlich intrazelluläres, ubiquitär exprimiertes Protein^{10, 11}. Nur in Caco-2-Zellen wurde bisher eine Sekretion von PON2 ins Darmlumen gezeigt⁶. Es ist jedoch unbekannt, ob dies *in vivo* ebenso auftritt und was die Funktion der PON2-Sekretion sein könnte, sowie in welcher Form PON2 dann vorläge, da es sich nicht um ein frei-lösliches Protein handelt.

Der Name der Enzymfamilie entstand durch die Fähigkeit von PON1 das Organophosphat Paraoxon, einen Metaboliten des Insektizids Parathion, zu hydrolysieren^{12, 13}. Im Gegensatz dazu weisen PON2 keine und PON3 nur eine zu vernachlässigende Paraoxonase-Aktivität auf¹⁴, weshalb der Name „Paraoxonasen“ eher die Ähnlichkeit der Proteine reflektiert als deren enzymatische Aktivität. Gemeinsam ist allen PON-Proteinen, dass sie über eine Arylesterase- und Lactonase-Aktivität verfügen^{14, 15}. Die Lactonase-Aktivität ist bei allen Mitgliedern der PON-Proteinfamilie am stärksten ausgeprägt und ist als die wichtigste enzymatische Aktivität anzusehen. Bisher sind endogene Substrate der PON-Proteine unbekannt, aber es sind typische Aktivitäten beschrieben, welche charakteristisch sind für die drei Enzyme¹⁴⁻¹⁶. In unabhängigen Studien wurde anhand von Mausmodellen gezeigt, dass alle Mitglieder der PON-Enzymfamilie anti-atherogene Eigenschaften besitzen¹⁷⁻²⁰. Die Grundlage für diese protektive Funktion ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht die Lactonase-Aktivität, sondern die Fähigkeit oxidativen Stress signifikant zu reduzieren²¹⁻²³.

1.1.1 Paraoxonase-1 (PON1)

PON1 wird ausschließlich in der Leber exprimiert, an HDL-Partikel assoziiert ins Serum abgegeben und gelangt so in die Blutbahn. PON1 verfügt als einziges Mitglied der PON-Enzymfamilie über die Fähigkeit Organophosphate zu hydrolysieren^{12, 13}. Daneben besitzt PON1 eine Arylesterase-Aktivität und eine bei allen PON-Proteinen sehr stark ausgeprägte Laktonase-Aktivität, die die Hauptenzymaktivität aller PON-Mitglieder darstellt¹⁴. Endogene Substrate sind bisher unbekannt.

Die anti-oxidative wie anti-atherogene Eigenschaft von PON1 ist sehr gut erforscht. So inhibiert PON1 *in vitro* die Oxidation von *low density lipoprotein particles* (LDL) durch die Reduzierung von oxidativem Stress²⁴⁻²⁶. Dies scheint eine der wichtigsten Funktionen von PON1 darzustellen, da oxLDL ein bedeutender Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen ist. Die Verminderung an oxLDL reduziert die Bildung von Schaumzellen, eines der ersten Anzeichen und grundlegenden Ereignisse bei der Atherogenese. Weitere Studien belegen, dass das an HDL-Partikel gebundene PON1 in der Lage ist sowohl HDL als auch LDL vor Lipidperoxidation zu schützen, indem es oxidierte Cholesterolester und Phospholipide in den oxidierten Lipoproteinen degradiert^{7, 26-30}. Anhand von PON1^{-/-}-Mäuse wurde gezeigt, dass PON1 für den protektiven Effekt von HDL gegen die Oxidation von LDL verantwortlich ist. PON1 *knock-out* Mäuse wiesen zudem ein erhöhtes Arteriosklerose-Risiko auf^{17, 31}. Dagegen waren PON1-überexprimierende Mäuse deutlich vor Arteriosklerose geschützt¹⁸. Klinische Studien zeigten schließlich, dass ein niedriger PON1 Gehalt im Serum, mit einem erhöhten Arteriosklerose-Risiko einhergeht^{32, 33}, wobei eine Metastudie keine Assoziation zwischen PON1 oder PON2-Genotypen und koronaren Herzkrankheiten fand³⁴.

Polymorphismen von PON1 sind mit einer ganzen Reihe von Erkrankungen assoziiert. Demnach werden PON1-Polymorphismen mit kardiovaskulären Erkrankungen, *Diabetes mellitus* und neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson assoziiert³⁵. Allerdings wird dies in der Literatur kontrovers diskutiert, da z. T. auch gegensätzliche Befunde erhoben wurden. Ein Beispiel hierfür ist der Bezug von PON1 zum Gerinnungshemmer Clopidogrel: während eine Studie in renommierter Fachzeitschrift³⁶ zeigte, dass PON1-Polymorphismen den Metabolismus und somit die Wirkung von Clopidogrel beeinflussen, wurde dies in vielen anderen Studien nicht belegt; statt PON1 scheint jedoch Cyp2C19 für den beobachteten Effekt verantwortlich zu sein³⁷⁻⁴². Insgesamt ergibt sich, dass in der Literatur keine starken Hinweise für eine Assoziation von PON-Polymorphismen mit kardiovaskulären Erkrankungen zu finden sind.

1.1.2 Paraoxonase-2 (PON2)

PON2 wurde wesentlich später als PON1 entdeckt, doch zeigen phylogenetische Untersuchungen, dass PON2 evolutionär gesehen älter ist als die beiden anderen Mitglieder der PON-Proteinfamilie. Man geht davon aus, dass sich PON1 und PON3 durch Genduplikationen aus PON2 gebildet haben⁴³. PON2 wird ubiquitär und ausschließlich intrazellulär exprimiert¹¹. In Gefäßzellen des humanen kardiovaskulären Systems ist PON2 im endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien lokalisiert. Daneben wurde es auch im periplasmatischen Raum sowie dem Nukleoplasma gefunden²³. Das humane PON2 wird in zwei Isoformen exprimiert²³. Die beiden glykosylierten Isoformen PON2-iso1 (42 kDa) und PON2-iso2 (38 kDa) entstehen durch zwei unterschiedliche Spleißvarianten der PON2-mRNA. Einhergehend mit vier Proteinvarianten finden sich verschiedene PON2 mRNA Sequenzen in Datenbank-Einträgen; experimentell haben Mochizuki et al.² verschiedene mRNA-Spleißvarianten nachgewiesen und Horke et al.²³ beschrieben zwei Proteinisoformen. Völlig unklar ist bisher, ob sich die beiden Isoformen in ihrer Expression, Lokalisation und Funktion unterscheiden. Darüber hinaus gibt es zwei weitere Proteinvarianten, welche sich vermutlich durch die Länge des N-Terminus unterscheiden.

Im Gegensatz zu PON1 ist PON2 nicht in der Lage Organophosphate zu hydrolysieren. Neben einer geringen Arylesterase-Aktivität stellt die starke Laktonase-Aktivität die wichtigste enzymatische Aktivität von PON2 dar¹⁴. Natürliche Substrate von PON2 sind unbekannt, jedoch verfügt PON2 über die Fähigkeit, das N-3-Oxododecanyl-Homoserinlaktone (3OC12) zu hydrolysieren^{15, 44}. Dieses Lakton ist ein Schlüsselmolekül in der bakteriellen Kommunikation, dem sogenannten „*quorum sensing*“ bei *Pseudomonas aeruginosa*. Das Gram-negative Bakterium gilt als nosokomialer Keim und infiziert besonders häufig AIDS-Erkrankte, immunsupprimierte Patienten, solche mit Cystischer Fibrose oder Pneumonien. Eine Infektion mit *P. aeruginosa* kann zu schweren Komplikationen auch im Hinblick auf die Primärerkrankung bis hin zum Tod führen. *P. aeruginosa* Infektionen sind mit Antibiotika behandelbar (Piperacillin (β -Lactam-Antibiotikum), Cephalosporinen, Aminoglykosiden, Fluorchinolonen, oder Carbapeneme), jedoch entwickeln sich häufig schwere Infektionen in deren Verlauf diese Bakterien bestimmte Schutzmechanismen entwickeln. Die Sekretion des 3OC12 und anderen Signalmolekülen führt zur Bildung eines Biofilms und ist essentieller Bestandteil der bakteriellen Zell-Zell-Kommunikation. Innerhalb dieses Biofilms besteht ein Schutz gegen Antibiotika. Die gebildeten Signalmoleküle wie 3OC12 und Pyocyanin bestimmen zudem die Virulenz des Bakteriums. PON2 hydrolysiert das Homoserinlaktone 3OC12 und reduziert den durch Pyocyanin-induzierten oxidativen Stress⁴⁵. Ferner verhindert PON2 die durch Pyocyanin ausgelöste NF- κ B-Aktivierung und eine sich anschließende Freisetzung von IL-8⁴⁵. Aus Untersuchungen mit PON2^{-/-}-Mäusen

ging hervor, dass diese wesentlich sensitiver gegenüber *P. aeruginosa* Infektionen sind als Wildtyp-Mäuse^{44, 46}. Damit ist PON2 ein wichtiges anti-oxidatives und anti-inflammatorisches Enzym sowie Teil der angeborenen Immunität gegen *P. aeruginosa* Infektionen. Es ist jedoch zu beachten, dass bei fortgeschrittener Erkrankung PON2 allein wahrscheinlich keinen dauerhaften Schutz gegen *P. aeruginosa* Infektionen bieten kann. Hohe lokale Konzentrationen an 3OC12 sorgen für einen zytosolischen Ca^{2+} -Influx was mit einer Inaktivierung der PON2-Laktonase-Aktivität sowie einem PON2-Proteinabbau einhergeht und schließlich zur Apoptose führt^{45, 47}.

Es gibt zwei natürlich vorkommende PON2-Polymorphismen (A148G und S311C). Je nach Genotyp werden die Polymorphismen an Stelle 311 mit kardiovaskulären Erkrankungen (S/C 311)^{48, 49}, mikrovaskulären Komplikationen und Nephropathie bei *Diabetes mellitus*-Patienten (C/S 311)^{50, 51} und Morbus Alzheimer (C/S 311)^{52, 53} assoziiert. Eine Meta-Analyse zeigte allerdings, dass der Polymorphismus an Stelle 311 nicht mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann³⁴. Unklar ist, welchen Effekt der Polymorphismus an Stelle 311 in Bezug auf die Laktonase-Aktivität besitzt, die eine Schlüsselrolle bei *P. aeruginosa* Infektionen spielt. Stolz et al. weisen darauf hin, dass der Polymorphismus S311C mit einer geminderten Laktonase-Aktivität einhergeht⁵⁴. Demgegenüber zeigten Altenhöfer et al., dass dieser Polymorphismus die Laktonase-Aktivität nicht beeinträchtigt²². Der Polymorphismus G148A ist mit erhöhten Plasmaglukose-, erhöhten Plasma-HDL- und niedrigeren Plasma-LDL-Mengen assoziiert⁵⁵⁻⁵⁷.

Die anti-atherogene Eigenschaft von PON2 ist auf die Reduzierung von oxidativem Stress, in Form von *reactive oxygen species* (ROS), insbesondere von O_2^- zurückzuführen²¹⁻²³. Unter ROS (bzw. RNS – *reactive nitrogen species*) werden verschiedene Radikalverbindungen, wie z. B. Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit (ONOO^-) oder das Hydroxylradikal (OH^\cdot) zusammengefasst. Insgesamt resultiert aus der Reduzierung von ROS ein geringeres Vorkommen oxidativ modifizierter Moleküle. Hierzu zählen die Minderung von oxidativen DNA-Schäden, Lipidoxidationen oder Proteinoxidationen und –nitrierungen. Somit ist PON2 neben der Superoxid-Dismutase (SOD), der Katalase, der Glutathion-Peroxidase und anderen anti-oxidativen Systemen ein neu-beschriebenes und wichtiges anti-oxidatives Enzym. Obwohl PON2 ein intrazelluläres Enzym ist, scheint dessen Effekt auch extrazelluläre Reaktionen zu beeinflussen, denn eine Überexpression in der Cervix-Karzinomzelllinie HeLa bewirkte eine verminderte Oxidation des im Medium zugesetzten LDLs¹¹. Shiner et al zeigten, dass PON2 kompensatorisch bei oxidativem Stress induziert wird²¹. Ferner führte eine Überexpression von PON2 in HeLa-Zellen zu einer verminderten Chemotaxis von Makrophagen¹¹. Die aufgrund dieser Daten postulierte anti-atherogene Funktion von PON2 wurde anhand eines $\text{PON2}^{-/-}$ -Mausmodells untermauert^{19, 58}. $\text{PON2}^{-/-}$ -Mäuse entwickelten deutlich größere arteriosklerotische Läsionen als Mäuse mit einer

normalen PON2-Expression. Interessanterweise wurde dies beobachtet, obwohl die PON2-defizienten Mäuse einen unveränderten C57Bl/6J Hintergrund hatten, also keinen ApoE oder LDL-Rezeptor *knock-out* aufwiesen. Im Umkehrschluss wurde bei einer adenoviralen Überexpression des humanen PON2 in ApoE-*knock-out*-Mäusen festgestellt, dass PON2 den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen sowie das anti-oxidative und anti-inflammatorische Potential von HDL steigerte; dies verringerte insgesamt die Arteriosklerose⁵⁸. Des Weiteren zeigte eine Überexpression von PON2 in vaskulären Zellen, dass PON2 intrazellulär entstehende ROS reduziert²³. PON2 weist somit in Zellen des kardiovaskulären Systems eine anti-oxidative Funktion auf. Unbekannt ist jedoch wie die durch oxidativen Stress hervorgerufene Steigerung der PON2-Expression zu Stande kommt. Shiner et al. postulierten, dass dies durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und AP-1 reguliert wird⁵⁹. Direkte Bindungsstudien wurden allerdings nicht durchgeführt und diese Erkenntnisse beruhen ausschließlich auf der Verwendung einzelner pharmakologischer Inhibitoren.

Neben der anti-oxidativen Funktion in humanen Gefäßwandzellen zeigten Horke et al., dass die Transkription der PON2-Expression durch ER-Stress gesteigert wird²³. ER-Stress und oxidativer Stress sind bei einer Vielzahl von pathophysiologischen Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs beteiligt. Aufgrund der zentralen Position des ER in der Zelle wirkt sich dies entscheidend auf die Physiologie und das Überleben der Zelle aus. Kommt es in der Zelle aufgrund von erhöhten ROS-Mengen, einem Ungleichgewicht in der Ca²⁺-Homöostase, Hypoxie, Hypo-/Hyperglykämie oder einem Mangel an Aminosäuren wird der sogenannte ER-Stress ausgelöst⁶⁰. Die aus diesen Faktoren entstehende Akkumulation un- bzw. fehlgefalteter Proteine im ER löst den *unfolded protein response* (UPR) Signalweg aus. Die Aktivierung des UPR hat primär zum Ziel, das Überleben der Zelle zu sichern, indem z. B. verschiedene Chaperone induziert und die Proteintranslation gestoppt wird, um so die Homöostase des ER wiederherzustellen. Kann der ER-Stress-induzierende Stimulus nicht behoben werden ist der UPR-Signalweg in der Lage, die Apoptose der Zelle einzuleiten⁶⁰. PON2 kann vor ER-Stress-induzierter Apoptose schützen, indem es die Aktivierung der c-Jun-Kinase (JNK) verringert und so die Induktion des pro-apoptotischen CHOP-Proteins reduziert⁶¹. Des Weiteren reduziert PON2 die Freisetzung von mitochondrialem O₂⁻²². Das O₂⁻ entsteht auch unter physiologischen Bedingungen durch die Übertragung von Elektronen der mitochondrialen Atmungskette auf molekularen Sauerstoff; hierbei dient O₂⁻ als regulierender Transmitter. Werden erhöhte Mengen an O₂⁻ freigesetzt, kann dies die Apoptose auslösen, indem O₂⁻ zunächst enzymatisch durch die mitochondriale SOD2 oder spontan zu H₂O₂ dismutiert wird. H₂O₂ wiederum ist Substrat für Cytochrom C, welches das in der inneren Mitochondrienmembran befindliche Membranlipid Cardiolipin peroxidiert. Dadurch kommt es zu einer Cytochrom C-Freisetzung in deren Anschluss die Apoptose durch eine Caspase-3-Aktivierung eingeleitet

wird. PON2 ist aufgrund einer Wechselwirkung mit dem Coenzym Q10 in der inneren Mitochondrienmembran im Stande, die Cardiolipin-Peroxidation und damit die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien zu verhindern⁶¹, welches die molekulare Basis der anti-apoptischen Funktion von PON2 (und PON3; siehe unten) darstellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PON2 in den Mitochondrien und gegebenenfalls auch im ER ROS reduziert und so die Zelle vor der Apoptose schützt. Aufgrund dieser Funktion erscheint es sinnvoll, die PON2-Expression im Rahmen bestimmter Erkrankungen pharmakologisch zu verändern um entweder weniger Apoptose (z.B. bei Arteriosklerose) bzw. mehr Apoptose (z.B. bei Tumorerkrankungen) im Zielgewebe zu induzieren. Um PON2 therapeutisch nutzen zu können, muss jedoch erforscht werden, durch welche molekularen Mechanismen und Signalwege PON2 reguliert wird. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit (siehe 1.5).

1.1.3 Paraoxonase-3 (PON3)

PON3 ist ein intrazelluläres Protein, das in der Leber und in geringen Mengen in der Niere exprimiert wird. In früheren Studien wurde angenommen, dass PON3 genau wie PON1 im Serum an HDL-Partikel assoziiert ist. *In vitro* schützte aus Kaninchen isoliertes PON3 LDL vor Oxidation⁶². Dieser Effekt wurde auch in Endothelzellen aus der Aorta beobachtet⁹. Anhand dieser Ergebnisse wurden PON3, genau wie PON1 und PON2, anti-oxidative und anti-atherogene Eigenschaften zugesprochen. Verwunderlich ist jedoch, dass nur 5% des in der Leber exprimierten PON3 in die Blutbahn abgegeben werden. Im Vergleich dazu sind es bei PON1 80%⁵. Dies lässt darauf schließen, dass PON3 seine protektiven Effekte intrazellulär ausübt. Bestätigt wurde dies durch die Arbeiten von Shih et al.^{4,5}, die belegten, dass humanes PON3 nicht HDL-assoziiert vorlag, sondern primär intrazellulär wirkte. In welchen Zellen PON3 im Gefäßsystem exprimiert wird, ist momentan unklar. Bisher gibt es zwei Studien, welche die Expression von PON3 in Zellen des kardiovaskulären Systems analysierten. Marsillach et al. fanden bei immunohistochemischen Untersuchungen murines PON3 in Makrophagen und der Gefäßwand¹⁰, wohingegen Schweikert et al. die Expression von humanem PON3 weder in Makrophagen und endothelialen Zellen noch in glatten Muskelzellen nachweisen konnten⁶³. In der Maus überexprimiertes humanes PON3 fand sich jedoch in vaskulären Zellen⁴. Damit übereinstimmend wurde bei human-PON3-überexprimierenden Mäusen ein vermindertes Auftreten von Arteriosklerose und Adipositas, verbunden mit gesenkten Leptinspiegeln im Blut festgestellt⁴. Im Gegensatz zur Maus bleibt es beim Menschen allerdings unklar, ob PON3 eine anti-atherogene Rolle einnehmen kann, falls es wie durch Schweikert et al. *in vitro* gezeigt, nicht in vaskulären Zellen exprimiert würde⁶³.

PON3 besitzt wie die beiden anderen Mitglieder der PON-Proteinfamilie eine Laktonase-Aktivität, die die Hauptenzymaktivität darstellt. Im Gegensatz zu PON2 hydrolysiert PON3 das Homoserinlaktone 3OC12 eher gering, weist jedoch eine hohe Substratspezifität für Lavostatin auf^{14, 45}. Zudem schützt PON3 ebenso wie PON2 vor Pyocyanin-induziertem oxidativen Stress, verhindert die durch Pyocyanin ausgelöste Aktivierung von NF- κ B und die damit einhergehende Freisetzung von IL-8⁴⁵. Eine 3OC12-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung führte wie auch bei PON2 zum Abbau des PON3-Proteins. Die Ergebnisse zeigen, dass PON2 und PON3 als Teil der angeborenen Immunität als Schutz gegen *P. aeruginosa* Infektionen angesehen werden können.

Intrazellulär ist PON3 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert⁶³. Die Fähigkeit O_2^- zu reduzieren und vor Apoptose zu schützen erfolgt dabei über den gleichen Mechanismus wie bei PON2 (siehe 1.1.2). Neueste Studien zeigten zudem, dass die Expression von PON3 in verschiedenen Tumoren gesteigert ist⁶³. Genau wie PON2 schützt PON3 Tumorzellen vor der Apoptose.

1.2 Die Rolle von PON2 in der Tumorbilogie

In westlichen Industriestaaten ist Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste, bei unter 50-jährigen sogar die häufigste Todesursache. Anhand dieser Tatsache wird deutlich, dass es bei einer Vielzahl von Tumoren keine oder nur lebensverlängernde Therapiemöglichkeiten gibt. Grund dafür ist, dass es in Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen zum Überleben der Tumorzelle kommt. Neben exogenen Faktoren wie UV-Licht und anderen karzinogenen Umwelteinflüssen gelten besonders acht endogene Faktoren als Auslöser der Tumorentstehung⁶⁴. Dazu gehören die Aufrechterhaltung der Proliferation durch Wachstumsfaktoren und die Steigerung der Aktivierung von wachstumsfördernden Signalwegen wie Ras / Raf / MEK / ERK oder PI3K / Akt^{65, 66}. Darüber hinaus wird die Expression von Tumorsuppressoren wie p53 inhibiert⁶⁴. Ferner entgehen Tumorzellen der Apoptose durch ein Ungleichgewicht in der Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen^{64, 67}. Des Weiteren können Tumorzellen durch eine Aktivierung der DNA-Telomerase replikativ unsterblich werden⁶⁴. Um den wachsenden Nährstoffbedarf eines Tumors stillen zu können, werden verschiedene Gene aktiviert, die die Angiogenese (wie *vascular endothelial growth factor* = VEGF) und damit die Versorgung des Tumors unterstützen⁶⁴. Ferner werden verschiedene Signalwege induziert, die eine Invasion und Metastasierung anderer Zellen und Gewebe initiieren⁶⁴. Viele Tumorzellen stellen zudem ihren Energiemetabolismus von aerob auf anaerob um, um einerseits die Glykolyse in der Zelle zu steigern und damit Signalwege zu aktivieren, die zu mehr Wachstum der Tumorzelle führen (z. B. Ras / Raf / MEK / ERK und PI3K / Akt)⁶⁴. Andererseits werden durch die Hypoxie Transkriptionsfaktoren (wie Hypoxie-induzierter Faktor-1 α = HIF-1 α)

aktiviert, die wiederum die Angiogenese fördern^{64, 68, 69}. Und schlussendlich modifizieren einige Krebszellen jene Signalwege, welche die Interaktion mit Komponenten des Immunsystems steuern, wodurch die Krebszelle der Immunüberwachung entgehen kann⁶⁴.

Einige dieser Mechanismen führen zu einer verstärkten ROS-Akkumulation und einer erhöhten Inflammation. Dazu gehören die Aufrechterhaltung der Proliferation, Aktivierung der Angiogenese, Zelltodresistenz und die Änderung des Energiestoffwechsels. Durch hohe ROS-Konzentrationen werden erhebliche Schäden an der DNA, die zudem zu einer Genominstabilität führen können, verursacht. Dies ermöglicht die Entstehung von Mutationen und Chromosomentranslokationen oder -deletionen. Darüber hinaus kommt es bei der Tumorentstehung oft zu einem Mangel bzw. zu einer Inaktivierung an anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Systemen. So führen erhöhte Mengen an ROS zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Genen und Signalwegen die am Wachstum, der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt sind. Andererseits ist ROS auch ein Produkt, das die Seneszenz oder die Apoptose fördern kann, was wiederum einer Krebsentstehung entgegenwirkt⁷⁰. Demzufolge ist die Bildung von ROS als kritischer Regulator zwischen dem Überleben der Zelle und ihrem Tod zu sehen⁷¹.

Unter physiologischen Bedingungen kann die Zelle durch verschiedene anti-oxidative Enzyme wie die SOD2, die Katalase, das Thioredoxin-System oder die Glutathion-Peroxidase eine Akkumulation von ROS verhindern und die Zelle vor oxidativen Schäden schützen. In diesem Zusammenhang muss auch das ubiquitär exprimierte Enzym PON2 genannt werden, da PON2 ein wichtiges Enzym für die Zelle darstellt, um sich vor ROS-assoziierten Schäden und dadurch induzierten apoptotischen Signalwegen zu schützen (siehe 1.1.2). Als Therapiemaßnahme bei kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes oder neurodegenerativen Erkrankungen, die durch ROS und chronische Entzündungsreaktionen verursacht werden, könnte eine Steigerung der PON2-Expression der jeweiligen Erkrankung bzw. dem Zelltod entgegen wirken. Experimentell ist wenig über PON2-regulatorische Signalwege bekannt, daher ist ungewiss, wie sich eine Erhöhung der PON2-Expression auf andere Gewebe oder einen Organismus auswirken würde, sofern eine systemische Steigerung der PON2-Expression erzielt würde. In diesem Zusammenhang weisen unabhängige Microarray-Analysen auf eine Assoziation von PON2 mit verschiedenen Krebserkrankungen hin. In Leberkarzinomen, Prostatakarzinomen und in T-Zellleukämievirus Typ I-infizierten T-Lymphozyten wurden gesteigerte PON2-Expressionen nachgewiesen⁷²⁻⁷⁴. Zudem war PON2 in Patienten mit pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie (ALL) überexprimiert und wurde ferner mit einer schlechten Prognose bei diesen Patienten assoziiert^{75, 76}. Eine weitere Studie zeigte, dass eine erhöhte PON2-Expression mit einer Imatinib-Resistenz bei chronisch myeloischen Leukämiepatienten (CML) assoziiert wurde⁷⁷. Anhand dieser Daten belegten Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass die Expression

von PON2 in vielen Tumoren gesteigert war ⁶¹. Die PON2-Proteinexpression ist beispielsweise in Pankreas-, Leber-, Nieren- und Lungentumoren moderat, in Thymustumoren und Non-Hodgkin-Lymphomen dagegen um das 10-fache erhöht ⁷⁸. Übereinstimmend damit zeigten cDNA-Analysen von Tumorgeweben eine 2 – 4-fache Erhöhung der PON2-Expression in Blasen-, Leber- und Nierentumoren sowie in Tumoren des lymphatischen Gewebes und des Uterus. Dagegen war die Expression von PON2 in Testis-, Prostata- und Pankreastumoren nur leicht erhöht. PON2 scheint zudem nicht in allen Tumoren überexprimiert zu sein. In Ösophagus-, Magen-, Ovar- und Cervixkarzinomen wurde keine Erhöhung der PON2-Expression festgestellt. Weiterführende Analysen zeigten, dass eine Überexpression von PON2 in Tumorzellen die Resistenz gegenüber verschiedener Chemotherapeutika, wie beispielsweise Imatinib (Glivec[®]), steigerte ⁶¹. Dieses Ergebnis wird ferner von den Microarray-Analysen untermauert, wonach eine gesteigerte PON2-Expression sowohl mit einer Imatinib-Resistenz bei CML-Patienten als auch mit einer schlechten Prognose bei pädiatrischer ALL assoziiert ist ^{76, 77}. Interessanterweise löste der Verlust des PON2-Proteins in verschiedenen Tumorzellen eine spontane Apoptose aus, was die pro-onkogene Funktion von PON2 weiter unterstreicht ⁶¹.

Durch welche regulatorischen Mechanismen es zu einer gesteigerten Expression von PON2 in verschiedenen Tumoren kommt ist bisher unbekannt. Eine mögliche Erklärung wäre die z.B. im Prostataadenokarzinom oder papillar-renalen Nierenzellkarzinom vorkommende Amplifikation des Chromosom 7 ⁷³, auf welchem das PON-Cluster kodiert ist ². Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die gesteigerte Expression von PON2 durch verschiedene Signalwege, die in direktem Zusammenhang mit ROS und Krebs stehen, in der Regulation von PON2 involviert sind. Beispiele für solche Signalwege und Transkriptionsfaktoren sind PI3K / Akt, Wnt / β -Catenin, HIF-1 α , Ras / Raf / MEK / ERK, PPAR γ , AP-1, Nrf2 oder NF- κ B ⁷¹. Frühere Studien zeigten bereits, dass die PON2-Expression durch oxidativen Stress, PI3K / PDGFR, PPAR γ , AP-1 und aktivierte NADPH-Oxidase gesteigert wird ^{21, 79, 80}. In Makrophagen induziert der Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren (uPA) eine gesteigerte PON2-Expression ^{80, 81}, wobei uPA seinerseits mit einer Vielzahl von Tumoren assoziiert ist ⁸².

Um PON2 als therapeutisches Ziel bei Erkrankungen wie Arteriosklerose, Diabetes, *P. aeruginosa* Infektionen und Krebs einzusetzen, müssen die regulatorischen Mechanismen, die zu einer gesteigerten oder reduzierten PON2-Expression führen, erforscht werden. Ein Ziel wäre die PON2-Expression durch die Aktivierung oder Inhibition bestimmter Signalwege so beeinflussen zu können, dass man Gewebe und Zell-spezifisch die PON2-Expression je nach Erkrankung beeinflussen könnte.

1.3 Das hämatopoetische System

Als Hämatopoese wird die gesamte Zellbildung des Blutes bezeichnet und umfasst die gesamte Erythropoese, Thrombopoese und Lymphopoese. Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht über die Hierarchie des hämatopoetischen Systems mit allen hauptsächlich beteiligten Zellarten.

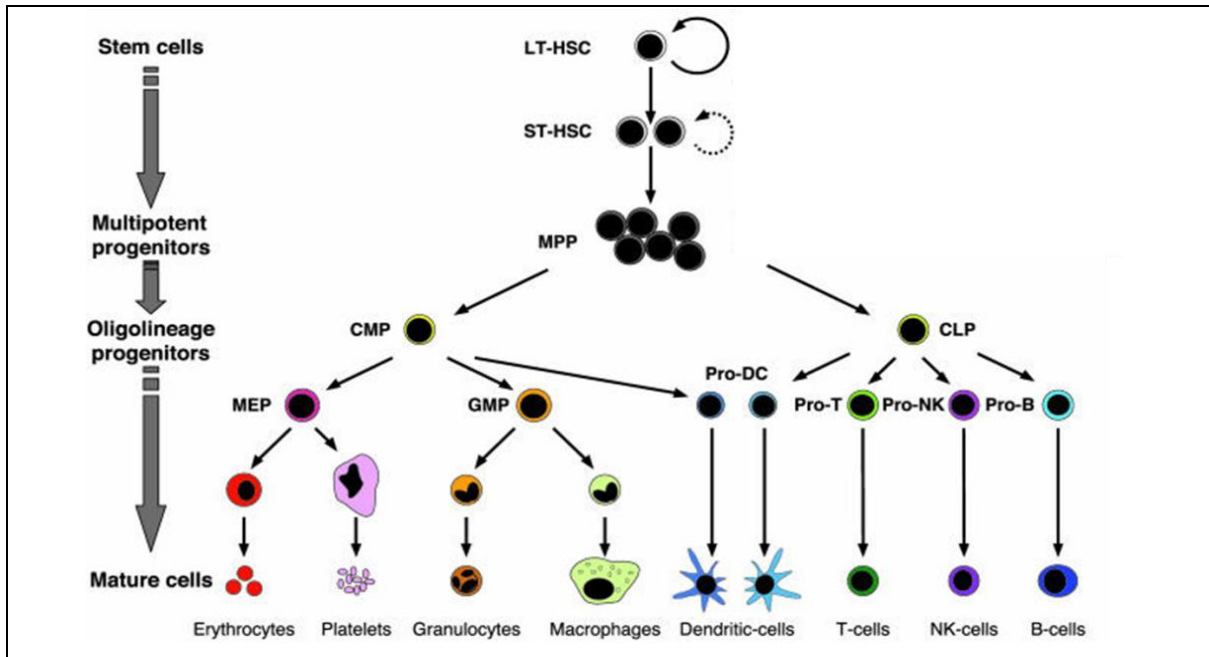


Abbildung 1: Schematischer Übersicht über das hämatopoetische System; Dargestellt ist die Entwicklung der im Text beschriebenen Blutzelllinien, ausgehend von den Stammzellen bis zu den reifen Blutzellen. LT-HSC, *long-term* hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC, *short-term* hämatopoetische Stammzelle; MPP, multipotente Vorläuferzelle (*multipotent progenitors*); CMP, gesamte myeloide Vorläufer (*common myeloid progenitors*); CLP, gesamte lymphoide Vorläufer (*common lymphocyte progenitors*); MEP, Megakaryozyten- und Erythrozytenvorläufer (*megakaryocyte / erythrocyte progenitors*); GMP, Granulozyten- und Monozyten-/Makrophagenvorläufer (*granulocyte / macrophage progenitors*). Übernommen und modifiziert nach ⁸³.

Im Erwachsenenalter findet die Hämatopoese in der Regel primär im Knochenmark ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells* - HSCs) statt. Charakteristische Merkmale der HSCs sind ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre Pluripotenz, d.h. sie können in alle bekannten Blutzelllinien der myeloischen und lymphatischen Reihe ausdifferenzieren ⁸³. Die HSCs werden weiter unterteilt in *long-term* (LT-) und *short-term* (ST-) HSCs. LT-HSCs sind Zellen, die dazu in der Lage sind, sich immer wieder selbst zu erneuern. Demgegenüber sind ST-HSCs nur für einen begrenzten Zeitraum (~ acht Wochen) zur Selbsterneuerung fähig – innerhalb dieser Zeit differenzieren sie entweder aus oder gehen in die Apoptose ⁸⁴. ST-HSCs reifen zu multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) heran, die bereits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben ⁸⁵. Die Fähigkeit von HSCs zur Selbsterneuerung zeigt sich experimentell darin, dass sie nach Transplantation in Mäusen, deren Knochenmark mittels Bestrahlung zerstört wurde, die gesamte Hämatopoese neu initiieren ⁸⁶.

MPPs differenzieren entweder zu *common lymphoid progenitors* (CLPs) oder *common myeloid progenitors* (CMPs) heran. CLPs reifen als Vorläufer der lymphatischen Reihe zu T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen (NK) ⁸⁷. CMPs wiederum bilden eine Population myeloischer Vorläuferzellen aus denen sowohl die Vorläufer der Granulozyten und Monozyten / Makrophagen (GMPs) als auch die der Megakaryozyten und Erythrozyten (MEPs) hervorgehen ⁸⁸. Interessanterweise können sowohl CLPs als auch CMPs zu dendritischen Zellen ausdifferenzieren ^{89, 90}. Alle Zellen des hämatopoetischen Systems exprimieren spezifische Oberflächenantigene oder zeichnen sich durch linientypische Zelleigenschaften aus ⁸³. Anhand der spezifischen Oberflächenmoleküle können die einzelnen Zellpopulationen mit Hilfe von Antikörpern voneinander unterschieden werden.

Hämatopoetische Stammzellen befinden sich zum Großteil in einem ruhenden Zustand, der G₀-Phase des Zellzyklus. In dieser Phase sind sie metabolisch wenig aktiv und fast vollständig resistent gegenüber Zytokinen. Allerdings sind HSCs sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen. Besonders anfällig sind sie für Stimulationen bzw. Schädigungen durch oxidativen Stress (ROS) ⁹¹. Die Ursachen der ROS-Entstehung können dabei vielfältig sein. ROS kann vermehrt gebildet werden durch den Einfluss von äußeren Faktoren oder durch einen Überschuss an ROS-produzierenden Enzymen. Zudem führt ein Mangel an antioxidativen Enzymen zu einer vermehrten ROS-Akkumulation. Ein Anstieg an ROS ändert die Quieszenz der HSCs, stimuliert die Proliferation und Differenzierung und führt zu vermehrten DNA-Schäden ⁹¹. Dies kann zu Mutationen und einer Genominstabilität führen. Werden hämatopoetische Stammzellen durch ROS geschädigt, können Anämien verursacht werden, die zu malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems führen können ^{92, 93}. Anhand von verschiedenen Mausmodelle kam es durch den *knock-out* von anti-oxidativen Proteinen, wie z. B. SOD2 und 3, Peroxiredoxin-I, -II, -III oder Gluthation-Peroxidase-IV zu schweren Schäden im hämatopoetischen System, die durch einen massiven Anstieg an ROS verursacht wurde ⁹¹. Ferner ist eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die das Redoxgleichgewicht durch die Expression von (anti-) oxidativen Enzymen im Rahmen der Hämatopoese beeinflussen, an der Zelldifferenzierung aktiv beteiligt. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Transkriptionsfaktoren der Klasse O der *forkhead-box* (FoxO) Familie. FoxO-Transkriptionsfaktoren werden insbesondere bei oxidativem Stress aktiviert. Dadurch wird die Transkription verschiedener Gene initiiert, die einen Zellzyklusarrest auslösen, verschiedene Reparatursysteme aktivieren oder die Apoptose einleiten können ⁹⁴. Demzufolge gelten FoxO-Transkriptionsfaktoren als protektiv im Hinblick auf die Hämatopoese. Übereinstimmend wurde gezeigt, dass Erythrozyten von FoxO3^{-/-}-Mäusen erhöhte ROS-Mengen aufwiesen ⁹⁵. Zudem zeigten sie erhebliche oxidative Schäden und eine verringerte Lebensrate. Ferner sind FoxO-Transkriptionsfaktoren Substrate des PI3K / Akt-Signalweges, der in vielen Tumoren überaktiviert vorliegt und inhibierend auf FoxO-

Transkriptionsfaktoren wirkt⁹⁶. Ein weiterer Signalweg, der in die Differenzierung und Regulation von HSCs eingebunden ist, ist der Wnt / β -Catenin-Signalweg. Dieser reguliert zum einen die Selbsterneuerung von HSCs, zum anderen ist er essentiell am Überleben leukämischer Stammzellen in chronischer und akut myeloischer Leukämie (CML / AML) beteiligt⁹⁷⁻⁹⁹.

Die Regulation sowie die Rolle des anti-oxidativen und anti-apoptischen Enzyms PON2 ist bislang im Rahmen der Hämatopoese nahezu unbekannt. Im Hinblick auf die protektiven Funktionen bei Erkrankungen wie Diabetes oder Arteriosklerose sowie die pro-onkogenen Eigenschaften des Enzyms ist dies jedoch von besonderem Interesse. Um PON2 als therapeutisches Ziel einsetzen zu können, ist die Erforschung der molekularen regulatorischen Mechanismen auch innerhalb der Hämatopoese von großer Bedeutung.

1.4 Die biomedizinische Relevanz eines konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells („PON2^{+/+}“)

Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass sich eine Überexpression von PON2 protektiv bei Erkrankungen wie Arteriosklerose, Diabetes und neurodegenerativen Erkrankungen auswirkt. Darüber hinaus ist PON2 Bestandteil der angeborenen Immunität bei *P. aeruginosa* Infektionen. Auf der anderen Seite belegen neueste Studien, dass PON2 eine pro-onkogene Funktion in der Tumorbilogie einnimmt, indem es in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt und vor einer Chemotherapeutika-induzierten Apoptose schützt. Die protektiven wie pro-onkogenen Funktionen des Enzyms sind dabei aller Wahrscheinlichkeit nach in seiner anti-oxidativen Funktion begründet.

Ein Nachteil ist, dass fast alle bisherigen Ergebnisse überwiegend auf Zellkultur-Analysen basieren. Um die Überexpression von PON2 als therapeutisches Ziel bei verschiedenen Erkrankungen untersuchen zu können, wäre daher ein konditionales *in vivo* Modell zur PON2-Überexpression von besonderer Bedeutung. Mit Hilfe des Cre / *loxP*-Systems wäre eine induzierbare und spezifische Überexpression von PON2 in den unterschiedlichsten Geweben oder Zellen möglich. Anhand eines solchen Modells könnte z. B. die protektive Funktion von PON2 im Gefäßsystem analysiert werden. Daraus ergibt sich auch ein Vorteil gegenüber dem bereits vorhandenen PON2^{-/-}-Modell. Gerade bei Redox-abhängigen Signalwegen ist nicht unbedingt davon auszugehen, dass der Verlust eines Gens und dessen Funktion (*loss of function*) gleichbedeutend ist mit einer Aktivität des Gens und seiner Funktion (*gain of function*). Zudem könnten die erhaltenen Ergebnisse Hinweise liefern, ob eine Überexpression im Gefäßsystem eventuell eine Tumorentstehung fördern würde. Der gleiche Ansatz könnte mit einer spezifischen Überexpression von PON2 in der Lunge Aufschluss darüber geben, inwieweit PON2 tatsächlich dazu befähigt wäre vor *P.*

aeruginosa Infektionen zu schützen oder das Risiko einer Tumorbildung erhöht. Da PON2 mit vielen Leukämien assoziiert wird, wäre zudem eine Überexpression im hämatopoetischen System von besonderem Interesse für die Tumorbilogie, im Hinblick auf die Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Ein solches Modell würde eine Fülle von Möglichkeiten bieten mehr über die durch PON2 hervorgerufenen Effekte zu erfahren, um diese gezielt bei verschiedenen Erkrankungen einsetzen zu können.

1.5 Ziele der Arbeit

Einige Studien belegen, dass PON2 eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie einzunehmen scheint (siehe 1.2). PON2 bietet verschiedenen Tumoren dabei einen Schutz vor einer Chemotherapeutika-induzierten Apoptose. Demgegenüber sind die regulatorischen Mechanismen, die zu einer Überexpression des PON2-Proteins in Tumoren führen gänzlich unerforscht. Zudem weiß man nicht, wieso einige Tumore eine stärkere andere eine schwächere endogene Expression von PON2 aufweisen. Sicher ist, dass eine Überexpression von PON2 die Apoptose bestimmter Zellen reduziert, wobei dies wahrscheinlich in der Fähigkeit von PON2, oxidativen Stress zu reduzieren, begründet ist. Aus dieser Funktion ergibt sich, dass es sinnvoll wäre, die Expression von PON2 in bestimmten Tumoren zu reduzieren. Mitunter könnte so auch die Resistenz gegen Chemotherapeutika gemindert und deren Effektivität verbessert werden. Einige Analysen zeigten jedoch, dass Tumore PON2 verschieden stark exprimieren und ein *knock-out* nicht zwangsläufig die Apoptose auslöst. Eine Vielzahl an Studien belegt zudem, dass reduzierte PON2-Level zur Arteriosklerose führen, wohingegen eine Überexpression einen Schutz vor Arteriosklerose bietet. Des Weiteren ist PON2 mit neurodegenerativen Erkrankungen und Diabetes assoziiert. Daher wäre ein systemischer *knock-out* wahrscheinlich kontraproduktiv. Außerdem wurde PON2 als ein wichtiges Enzym bei der angeborenen Immunität bei *P. aeruginosa* Infektionen identifiziert. Ein *knock-down* von PON2 könnte jedoch die bakterielle Infektionsrate erhöhen. Aufgrund dieser protektiven und pro-onkogenen Effekte von PON2 ist es von besonderem Interesse, die Regulation des humanen Enzyms PON2 zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher zum einen PON2-Promoter-bindende Proteine und Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die möglicherweise die Expression des PON2-Proteins regulieren. Zum anderen soll die Wirkung ausgewählter und neu identifizierter Faktoren auf die PON2-Expression in unterschiedlichen Tumor-Zellmodellen untersucht werden. Identifizierte Signalwege, die zu einer Inhibition oder Aktivierung der PON2-Expression führen, könnten so bei der Entwicklung neuer Strategien in der Tumorbilogie führen. Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass die PON2-Expression besonders in

Leukämien gesteigert ist. In diesem Zusammenhang soll anhand des hämatopoetischen Systems von PON2-defizienten Mäusen untersucht werden, welche Kompartimente des blutbildenden Systems von PON2 beeinflusst werden. Um zukünftig eine gezielte Überexpression von PON2 als therapeutisches Ziel bei verschiedenen Erkrankungen erforschen zu können, soll zudem mit Hilfe des Cre / *loxP*-Systems ein induzierbares konditionales PON2-Überexpressions-Mausmodell generiert werden. Dadurch ist es möglich, eine spezifische PON2-Überexpression in ausgewählten Zellen oder Organen zu erreichen.

2 Material

2.1. Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden durch die Firma Roth, Merck bzw. Sigma erhalten.

BSA	Sigma
³² P-dCTP	Perkin Elmer
DEPC	Roth
DL-Norleucin	Sigma
DMSO	Roth
Dulbecco's PBS, steril	Gibco
FCS	PAA
FCS (EF und ES)	Biochrom
Formaldehyd, 37 %	Roth
G418 Sulphat, 50mg/ml	PAA
Glutamax, 100x	Gibco
HALT Proteaseinhibitor, 100x	Pierce
HAT, 50x	Gibco
Hühner Serum	Gibco
Imatinib	Cayman Chemical
Isofluoran	Abbot
L-Glutamin, 100x	Gibco
LIF	freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. S. Wörtge (AG Prof. A. Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Gewonnen wurde das Zytokin aus dem Überstand der CHO Zelllinie 8 / 24 720 LIF.
Methanol	Roth
Mitomycin C	Sigma
Na-Pyruvat	PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x	Gibco

PD 98059	Calbiochem
Penicillin / Streptomycin, 100x	PAA
Pentobarbital	Serva
PMSF, 100x	Sigma
SB 216763	Sigma
Trypsin / EDTA, 10x	PAA

2.2. Verbrauchsmaterialien

24-well-Platten	Greiner
96-well-Platten	Greiner
96-well-Platten, weiß	Greiner
3 cm ² -Platten	Nunc
10 cm ² -Platten	Nunc
Amersham Hybond N+ Membran	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Microvette® 500 K3E	Sarstedt
Entwickler- und Fixierlösung	Kodak
MS Biomax Film	Kodak
Polystyrol Rundboden-Röhrchen, 5ml	BD Falcon
Polystyrol Rundboden-Röhrchen, 5ml mit in der Kappe integriertem Zellsieb	BD Falcon
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare
Protran Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman
Reaktionsgefäße (0,2, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturflaschen steril mit Filterdeckel (75 cm ² , 150 cm ²)	Greiner
Zellsieb, 100 µm	BD Falcon

2.3. Laborgeräte

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
ChemiDoc XRS imaging system mit QuantityOne 4.6.7 Software	BioRad

CO ₂ Inkubator CO-150	New Brunswick Scientific
FACSCanto II™	BD Biosciences
Fluostar Optima Fluometer	BMG Labtechnologies
Gelelektrophoresekammer, Perfect-Blue	Peqlab Biotechnologies
Doppelgelsystem L	
Gene Pulser	BioRad
Gene Pulser Cuvette (0,4 cm, gap 50)	BioRad
HEMAVET 950FS	DREW Scientific Inc
iCycler	BioRad
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Nanodrop	Peqlab Biotechnologies
Szintillationszähler	Tricarb 2000 CA, United Technologies Packard, Downers Grove, USA
Thermomixer compact	Eppendorf
Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell	BioRad
Vibracell Ultraschallgerät	Sonics & Materials
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge J2-MC mit Rotor JA 25.50	Beckmann

2.4. Reagenzien und Kits

Amersham Illustra MicroSpin G-50 Columns	GE Healthcare
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
Attractene Transfection Reagent	Qiagen
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Biology on Array, Cancer TF siRNA System	SA Biosciences
DNA Blunting and Ligation Kit	Fermentas
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems
Lachstestis DNA	Sigma
GeneJET™ PCR Purification Kit	Fermentas
Nanofektin™	PAA
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologies
Protein G	Kierkegaard Perry Lab
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
SAINT-RED siRNA/RNAi-Delivery System	Synvolux Therapeutics

TAKARA Ladderman Labeling Kit	Takara
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer

2.5. Enzyme

Go-Taq® DNA Polymerase	Promega
100 bp-DNA-Leiter	Roth
1 kbp-DNA-Leiter	Roth
1 kbp DNA-Leiter plus	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Leiter	Fermentas
Proteinase K	Sigma
RNase A	Sigma
SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix	Sigma
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq DNA Polymerase Recombinant Kit	Invitrogen

Restriktionsenzyme wurden entweder von New England Biolabs oder von MBI / Fermentas bezogen.

2.6. Antikörper

Alle Antikörper wurden gemäß der entsprechenden Herstellerempfehlung in 5%igem Milchpulver oder in 5%igem BSA in 1 x TBS mit 0,18% Tween verwendet.

monoklonaler α -human-Tubulin (1:2000)	Dianova
monoklonaler α -human-GAPDH (1:5000)	Santa Cruz
monoklonaler α -human-LEF-1 (1:1000)	Cell Signaling
monoklonaler α -human- β -Catenin (1:1000)	Cell Signaling
monoclonaler α -human-HIF-1 (1:1000)	BD Biosciences
polyklonaler α -human-Lamin (goat; 1:1000)	Santa Cruz
polyklonaler α -human-PON2 (rabbit; 1:2000)	Auftragssynthese ausgeführt durch Eurogentec

Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die im Western Blot eingesetzten Verdünnungen der aufgeführten Antikörper, ausgehend von einer Proteinbeladung von >15 μ g Protein/Spur.

Die für die Differenzierung und Charakterisierung der verschiedenen Subfraktionen hämatopoetischer Vorläuferzellen verwendeten Antikörper wurden alle von der Firma BD

bezogen und sind dem Abschnitt 3.5.2 „Durchflusszytometrie zur Differenzierung und Charakterisierung der verschiedenen Subfraktionen hämatopoetischer Vorläuferzellen“ zu entnehmen.

2.7. Sekundärantikörper

anti-mouse IgG aus dem Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (1:20000)	Sigma
anti-rabbit IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5000)	Sigma
anti-rabbit IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5000)	Cell Signaling

2.8. Plasmide

pcDNA3HA	Invitrogen; freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Kleinert (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)
pcDNA3.1/Zeo(+)-FLAGhdnTCF4	Dieses Plasmid wurde durch Prof. R. Grosschedl (MPI für Immunologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Prof. Dr. R. Grosschedl, s.o.
pcDNA3.1/Zeo(+)-hdnTCF1	Prof. Dr. R. Grosschedl, s.o.
pGL4.10[luc2]	Promega
pGL4-PON2-Promotor	Dieses Plasmid wurde durch Dr. S. Horke (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) kloniert und zur Verfügung gestellt.
pGL4-PON2-Promoter-XL	J. Amort
pGK-Cre	Dieses Plasmid wurde durch Dr. S. Wörtge (AG Prof. A. Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.
pEGFP-C1	Clontech
pEGFP-C1-dnLEF-1	J. Amort
pEGFP-C1-dnTCF1	J. Amort

pEGFP-C1-dnTCF4	J. Amort
pEGFP-N1	Clontech
pEGFP-N1-PON2	Dr. S. Horke, s.o.
pμEΔ56 (LEF-1-HA)	Prof. Dr. R. Grosschedl, s.o.
7-LEF-fos-luc	Prof. Dr. R. Grosschedl, s.o.
R26-CAGs-IRES-EGFP	Dieses Plasmid wurde von Dr. T. Wunderlich (Institut für Genetik, Köln) kloniert und von Dr. S. Wörtge (s. o.) freundlichst zur Verfügung gestellt.
R26-CAGs-mPON2-HA-IRES-EGFP	J. Amort
pCMV-Sport6	Ima Genes

2.9. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

2.9.1 Oligonukleotidsequenzen für die Synthese der PON2-Promotor-Region

Der *sense*-Oligonukleotidprimer ist am 5'-Ende mit einem biotinylierten Spacer versehen.

BIOpGL4SEQfwd-sense: 5'-AAGTGCAGGTGCCAGAAC-3'

PON2-m1-Nhe-antisense: 5'-GATAGAGCTAGCGCCTGGCCAGCAGCTCCGTG-3'

Luc2rep-Cterm-antisense: 5'-GAATCTCGCGGATCTTGC-3'

2.9.2 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des 7,5 kb PON2-Promoters

P2PromXL-1-sense: 5'-GAGAGGTACCTGTGTGTAGTGAGAGGCAATAGTTC-3'

P2PromXL-1-antisense: 5'-GAGAGCTAGCCACCTACCTGAGTGCCAGAAG-3'

2.9.3 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des Gene-Targeting-Vektors

Sport6 Hind3 P2 sense: 5'-GAGAAAGCTTATGGGCCGGATGGTGGCTCTGAG-3'

Sport6 EcoR1 P2 antisense: 5'-GAGAGAATTCGAGTTCACAGTACAAGGCTTTC-3'

pCDNA3HA Asc1 P2 sense: 5'-GAGAGGCGCGCCATGGGCCGGATGGTGGCTCTGAG-3'

pCDNA3HA Asc1 P2 antisense: 5'-GAGAGGCGCGCCGAGTTCACAGTACAAGGCTTTC-3'
ROSA-Seq-sense: 5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGG-3'
ROSA-Seq-antisense: 5'-AAGCGGCTTCGGCCAGTAAC-3'
PON2-iso1-only-antisense: 5'-GGGTGGTTTACAACAAAGAG-3'

2.9.4 Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung des dnFLAGTCF4

dnTCF4-Xho-sense:

5'-GAGACTCGAGCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAAAGGATCC-3'

dnTCF4-KpnI-antisense:

5'-GAGAGGTACCTTAGGCCCGTTGGGACAGAGGGCGGAGGCCTTGTGG-3'

2.9.5 Oligonukleotidsequenzen für die Genotypisierung von transgenen Mäusen

ROSA-FA sense: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'

ROSA-RA antisense: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

SpliAc antisense: 5'-CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG-3'

2.9.6 Oligonukleotidsequenzen für die ChIP-Analysen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Mit dem Primerpaar 1 wurde die Sequenzstelle -7205 bis -7090 innerhalb der PON2-Promotersequenz untersucht.

sense-Primer: 5'-GTTTCGGGTGGGTTGTTTGAA-3'

antisense-Primer: 5'-CTGGCCCTGGTCTTTGTCC-3'

Mit dem Primerpaar 2 wurde die Sequenzstelle -6539 bis -6310 innerhalb der PON2-Promotersequenz untersucht.

sense-Primer: 5'-TTAAATACCGAAAACCATTAG-3'

antisense-Primer: 5'-CATGCCCAGCCTCTAT-3'

Mit dem Primerpaar 3 wurde die Sequenzstelle -3467 bis -3194 innerhalb der PON2-Promotersequenz untersucht.

sense-Primer: 5'-CGAACTCCCTGTACATA-3'

antisense-Primer: 5'-AATACAAGCCCAAATCTTTTA-3'

Mit dem Primerpaar 4 wurde die Sequenzstelle -2605 bis -2430 innerhalb der PON2-Promotersequenz untersucht.

sense-Primer: 5'-CATAGAGTTCAGCCCATCAA-3'

antisense-Primer: 5'-CCCCATGAGACCCAAGC-3'

Mit dem Primerpaar 5 wurde die Sequenzstelle -1781 bis -1628 innerhalb der PON2-Promotersequenz untersucht.

sense-Primer: 5'-CCTTCTCAATATCCCCAGAGC-3'

antisense-Primer: 5'-TGGTGGCGGTCAGAGTCT-3'

2.9.7 Oligonukleotidsequenzen für die quantitativen *real-time* RT-PCR Analysen

Mit Ausnahme der Primer für das Gen PON2 (Sigma) und DNA-Polymerase 2a (Applied Biosystems) wurden die Oligonukleotidprimer und *TaqMan*-Sonden für die quantitative *real-time* RT-PCR-Analysen von MWG-Biotech bezogen. Alle Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als *Quencher* markiert.

GAPDH sense: 5'-CAACAGCCTCAAGATCATCAGC-3'

GAPDH antisense: 5'-TGGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

GAPDH Sonde: 5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC-3'

mATPSy6 sense: 5'-CAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAA-3'

mATPSy6 antisense: 5'-GGCCAGGGCTATTGGTTGAA-3'

mATPSy6 Sonde: 5'-CCCTAGCCCACTTCTTACCACAA-3'

PON2 sense: 5'-TCGTGTATGACCCGAACAATCC-3'

PON2 antisense: 5'-AACTGTAGTCACTGTAGGCTTCTC-3'

PON2 Sonde: 5'-TCGTGAGAGGTTCTCCGCATCCAGA-3'

Die Sequenzen der Primer für das Gen DNA-Polymerase 2° sind unbekannt, da es sich hierbei um so genannte *pre-design*, *guaranteed primer* handelt, bei deren Bestellung die Sequenz nicht bekanntgegeben wird.

2.10 Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien

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

Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl pH 10.4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl pH 10.4, 20% Methanol
Bindungspuffer für DNA Affinitätsfällung, 2x	20 mM HEPES pH 7.9, 10% Glycerol, 50 nM KCl, 0,2 mM EDTA,

	1,5 mM MgCl ₂ , 20 µM ZnCl ₂ , 1 mM DTT, 0,25% Triton X-100
Bindungs- und Waschpuffer (B+W), 2x	10 mM TrisHCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl
Coomassie-Roti-Blue, 5x	Roth
Coomassie-Färbelösung, 1x	60 ml Wasser, 20 ml Methanol, 20 ml Roti-Blue 5x Lösung
Coomassie-Fixierlösung	79 ml Wasser, 1 ml o-Phosphorsäure 85%, 20 ml Methanol
Coomassie-Waschlösung	25 ml Methanol, 75 ml Wasser
Denaturierungspuffer Gel (Southern Blot)	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Denaturierungspuffer Membran (Southern Blot)	0,4 M NaOH
Depurinierungspuffer Gel (Southern Blot)	0,25 M HCl
DNA-Ladepuffer, 6x	30% Glycerin in H ₂ O, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
Erythrozytenlysispuffer	Qiagen
ES Lysis Buffer	20 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8, 0,5% Sarcosyl
Gelatine, 2%	Sigma
Glycin-Lösung (ChIP)	0,125 M Glycin
Hybridisierungspuffer (Southern Blot)	0,5 M Natriumphosphat Puffer pH 7.2, 7% SDS, 10 mM EDTA
IP-Puffer (ChIP)	1 M Tris/HCl pH 8, 0,5 M EDTA, 20% SDS, 10% Natriumdesoxycholat, 1 M LiCl, ddH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM TrisHCl pH 9.4, 40 mM DL-Norleucin, 0,05% SDS
LB-Agar-Platten	40 g LB-Agar, 1000 ml ddH ₂ O
LB-Agar-Platten mit Kanamycin	LB-Agarplatten, 30 µg/ml Kanamycin
LB-Agar-Platten mit Ampicillin	LB-Agarplatten, 10 µg/ml Ampicillin
LiCl-Puffer (ChIP)	5 M LiCl, 10% NP40, 10% Natriumdesoxycholat, 0,5 M TrisHCl pH 8, 0,5 M EDTA, ddH ₂ O
Lysispuffer (ChIP)	0,1 M Pipes pH 8, 1 M KCl, 10% NP40, ddH ₂ O
Lysispuffer 3	200 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH

Material

	7.4, 2% Triton X-100, 1 mM DTT, 1x Proteaseinhibitor
Neutralisierungspuffer Gel (Southern Blot)	1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7.2
Neutralisierungspuffer Membran (Southern Blot)	0,2 M Tris/HCl pH 7,5, 1 x SSC
Proteaseinhibitor, 100x	Pierce
RIPA-Puffer (ChIP)	0,5 M Tris/HCl pH 8, 0,5 M EDTA, 250 mM EGTA, 20% SDS, 10% Natriumdesoxycholat, 5 M NaCl, 1% Triton X-100, ddH ₂ O
TAE, 20x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0,18% Tween
TB-Medium	50,8 g Terrific Broth-Trockenmedium, 4 ml Glycerin, ad 1 L H ₂ O
TBS, 1x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0,18% Tween
SDS-Ladepuffer, 5x	250 mM Tris/HCl pH 6.8, 0,5 M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS, 0,2% Bromphenolblau + 1/20 Vol β-Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer, 5x	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
STE-Puffer	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 10% SDS, 0,5 M EDTA, ddH ₂ O
SSC, 20 x	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat pH 7
Salmon testis DNA	Sigma
Ultraschallpuffer (ChIP)	1 M Tris/HCl pH 8, 0,5 M EDTA, 20% SDS, 10% Natriumdesoxycholat, ddH ₂ O
Waschpuffer 1 (Southern Blot)	2 x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 2 (Southern Blot)	0,2 x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 3 (Southern Blot)	0,1 x SSC, 0,1% SDS
Wasser	ddH ₂ O

2.11 Zelllinien und Medien für die Zellkultur

2.11.1 Zelllinien

Tabelle 1 verwendete Zelllinien.

Zellen	Beschreibung	Quelle / Hersteller
EA.hy 926	Humane, endotheliale, immortalisierte Hybridzelllinie aus HUVEC und A549-Zellen	Bereitgestellt von Dr. S. Horke / bezogen durch ATCC / LGC Standards
A549	Humane Lungen-Adenokarzinom Zelllinie	Bereitgestellt von Dr. S. Horke
K562	Humane Bcr / Abl positive chronisch myeloische Leukämie Zelllinie	Bereitgestellt von Prof. Dr. T. Kindler (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)
MEFs	Primäre murine Fibroblasten (MEFs)	Bereitgestellt von Dr. S. Wörtge (AG Prof. A. Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)
V6.5	Murine pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	Bereitgestellt von Dr. S. Wörtge, (s.o.) / bezogen durch Open Biosystems, Huntsville, USA

2.11.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Das Medium für die eukaryotischen Zellen setzt sich wie folgt zusammen:

DMEM-Vollmedium für EA.hy 926-Zellen

500 ml *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (1000 mg/l Glukose), 10% FCS, 10 ml HAT, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin

DMEM-Vollmedium für A549-Zellen

500 ml *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (1000 mg/l Glukose), 5% FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Na-

RPMI 1640-Vollmedium für K562-Zellen	Pyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin 500 ml RPMI 1640, 10% FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin
DMEM-Vollmedium für MEF-Zellen	500 ml <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (4500 mg/l Glukose), 10% FCS, 6 ml Nicht-essentielle Aminosäuren, 6 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin
DMEM-Vollmedium für murine pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	500 ml <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (4500 mg/l Glukose), 10% FCS, 6 ml Nicht-essentielle Aminosäuren, 6 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 1000 U/ml LIF, 600 µl β-Mercaptoethanol

Den stabil überexprimierenden murinen embryonalen Stammzellen wurde 200 µg/ml G418 zum Medium zugegeben.

2.12 Bakterien

E. coli-DH5α

New England Biolabs

2.13 Versuchstiere

Haltung und Zucht von Versuchstieren wurden durch Mitarbeiter der zentralen Versuchstiereinrichtung ZVTE Mainz sichergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachfolgenden Versuchstiere benutzt:

- C57BL/6J Wildtyp Mäuse; dieser Inzuchtstamm wurde über die ZVTE der Universität Mainz bezogen.
- PON2^{-/-} Mäuse; dieser Stamm hat einen C57BL/6J genetischen Hintergrund und exprimiert nahezu kein PON2 Protein aufgrund der Insertion einer Neo / β-Gal Expressionskassette im genomischen Leseraster des murinen PON2 Gens¹⁹. Dieser Stamm wurde von Prof. Dr. S.T. Reddy (Department of Medicine / Department of Molecular and Medical Pharmacology, University of California, Los Angeles, California, 90095, U.S.A.) zur Verfügung gestellt und über Prof. Dr. B. Fuhrmann (Technion Faculty of Medicine / Rambam Medical Center, Haifa, Israel)

in die ZVTE Mainz importiert. Die Genotypisierung erfolgte wie durch Ng et al. beschrieben.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Die folgenden Arbeiten wurden alle unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder steril erworbene Substanzen verwendet.

3.1.1 Kultivierung humaner Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und dem jeweiligen Vollmedium (siehe 2.11.2) kultiviert. Zudem erhielten EA.hy 926-Zellen eine 10% CO₂-, A549-Zellen und K562-Zellen eine 5% CO₂-Begasung. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie subkultiviert. Dies erfolgte bei der Suspensionszelllinie K562 durch die Abnahme des Mediums, kurzes Aufschütteln der Zellen und anschließende Aufnahme in frischem Vollmedium. Bei den adhärennten Zelllinien EA.hy 926 und A549 wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch eine dreiminütige Inkubation mit 1%iger Trypsinlösung im Brutschrank enzymatisch vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Durch die Zugabe von frischem, Serum-haltigen Vollmedium wurde die Reaktion aufgrund der Trypsin-inhibierenden Faktoren im Serum gestoppt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Erhaltung jeder Stammkultur wieder in eine Kulturflasche zurückgegeben, während die restlichen Zellen gemäß den Versuchsbedingungen in andere Kulturgefäße verteilt wurden.

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die konfluenten Zellen wie oben beschrieben (siehe 3.1.1) aus der Kulturflasche abgelöst, in frischem Vollmedium aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 900 x g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in Vollmedium, das zusätzlich 10% DMSO enthielt, wieder aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Kryo-Röhrchen überführt, bei -80°C eingefroren und zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurde das Kryo-Reaktionsgefäß direkt aus dem Stickstoff in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und sofort in frischem Vollmedium aufgenommen. Um DMSO

vollständig aus dem Medium zu entfernen, wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation (900 x g) pelletiert, in frischem Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Ausplattierung eukaryoter Zellen

A549- und EA.hy 926-Zellen wurden am Tag vor dem jeweiligen Experiment in definierten Mengen und Kulturgefäßen ausplattiert. K562-Zellen wurden am Tag des jeweiligen Experimentes ausplattiert. Dazu wurden die Zellen wie in 3.1.1 beschrieben zunächst vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die durch Zugabe von Medium erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 ml-Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Von der erhaltenen Suspension wurden 10 µl auf eine Neubauerkammer gegeben und vier Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde mit 10000 multipliziert und so die Zellzahl / ml erhalten.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die jeweils ausplattierten Zellmengen bezugnehmend auf die zu erreichende Konfluenz am Versuchstag.

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturgefäß</u>	<u>Konfluenz</u>	<u>Zellzahl</u>
EA.hy 926	24-well-Platte	50 %	5×10^4
		80 %	8×10^4
A549	24-well-Platte	50 %	5×10^4
		80 %	8×10^4
K562	24-well-Platte	50 %	1×10^5
		80 %	2×10^5

3.1.4 Transiente Transfektion von Plasmiden in humane Zellen

Eine Transfektion beschreibt das Einbringen von DNA in eine eukaryotische Zelle. Dabei können auch mehrere Plasmide gleichzeitig in eine Zelle transfiziert werden.

K562-Zellen wurden für eine Konfluenz von 80% ausplattiert (2×10^5) und anschließend mit dem Transfektionsreagenz Nanofektin™ nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurden pro 24-well für 1 µg DNA 3,2 µl Nanofektinreagenz verwendet.

3.1.5 Transiente Transfektion von siRNA in humanen Zellen

Um Funktion und Wirkung von Proteinen experimentell zu überprüfen, werden diese entweder artifiziell überexprimiert oder die Expression des endogenen Proteins wird molekularbiologisch unterbunden. Für letzteren Ansatz wird z.B. die Methode der RNA-

Interferenz benutzt, bei der mithilfe von transfizierten siRNAs die Genexpression selektiv verhindert wird. Dabei handelt es sich bei siRNAs um 21–25 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs, die an komplementäre mRNA-Sequenzen binden. Dies verursacht den Abbau dieser spezifischen mRNAs und führt somit zu einer Stummschaltung entsprechender Gen-Expressionen.

Hierzu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 50% (siehe 3.1.3) mit dem siRNA-Transfektionsreagenz SAINT-RED nach Angaben des Herstellers in einer 24- oder 96-*well*-Platte transient transfiziert. Die eingesetzte siRNA hatte eine Endkonzentration von 70 nM.

3.1.6 Reporter-Gen-Analysen zur Bestimmung der PON2-Promoter-Aktivität

Die Luziferase ist ein in humanen Zellen nicht exprimiertes Protein. Aus diesem Grund eignet sie sich, um die Aktivität eines Promoters zu messen, welcher so kloniert wurde, dass die Expression des *firefly*-Luziferase-Gens unter seiner Kontrolle steht. Dadurch wird in Abhängigkeit von der Promoteraktivität das *firefly*-Luziferase-Gen transkribiert, dessen enzymatische Aktivität im Gesamt-Zelllysat proportional zu seiner Expressionsrate ist. Durch die Zugabe eines Substrates und dessen spezifische Umsetzung wird ein Lichtsignal erzeugt, welches proportional zur *firefly*-Luziferase-Expression und damit proportional zur Promoteraktivität ist; dies wird mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

Da es sich um transiente Transfektionen handelt, muss die stark variierende Transfektionseffizienz einbezogen werden. Hierzu wird in jedem Experiment eine Ko-Transfektion mit einem Plasmid durchgeführt, welches eine konstitutive *Renilla*-Luziferase-Expression bewirkt. Dieses Enzym hat eine andere Substratspezifität und kann so von jener der *firefly*-Luziferase unterschieden werden. Schlussendlich zeigt die *Renilla*-Luziferase-Aktivität die Transfektionseffizienz an, wohingegen die *firefly*-Luziferase-Aktivität die Promoter-Aktivität wiedergibt. Für die Bestimmung der Aktivitäten wurde das *Dual-Luciferase*[™] Reporter-gen System von Promega verwendet.

Die Zellen wurden wie in 3.1.3 beschrieben ausplattiert mit dem pGL4-PON2-Promoter-Plasmid transfiziert, welches ein 2307 bp oder ein 7549 bp langes PON2-Promoter-Fragment enthält (siehe 3.2.1.7). Parallel wurde ein Plasmid transfiziert, das eine konstitutive *Renilla*-Luziferase exprimiert. Der zu untersuchende Vektor und der Kontrollvektor wurden in einem Verhältnis 20:1 transfiziert (siehe 3.1.4). Je nach Versuchsbedingungen wurden noch weitere Vektoren in die Zellen transfiziert (siehe Ergebnisteil). Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit unterschiedlichen Substanzen für acht bis 48 Stunden behandelt (siehe Ergebnisteil). Anschließend wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 100 µl 1 x *passive lysis buffer* lysiert und für

15 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurden 10 µl Zellysate in eine weiße 96-well-Platte pipettiert und gemäß Herstellerangaben vermessen.

3.1.7 Die Expression von PON2 unter hypoxischen Bedingungen

Für die Analyse der PON2-Expression unter hypoxischen Bedingungen wurden A549- (3×10^5 Zellen) und EA.hy 926-Zellen (4×10^5 Zellen) in 3 cm Kulturschalen ausgesät und unter normalen Sauerstoffbedingungen (20% O₂) oder für 4, 8, 16 und 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) kultiviert. Anschließend wurden RNA- und Proteinlysate angefertigt und die PON2-Expression mittels qRT-PCR (siehe 3.2.11) und Western Blot-Analyse (siehe 3.3.6) bestimmt.

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Klonierung und Extraktion von DNA

3.2.1.1 Restriktion von DNA

Mit der Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde Plasmid-DNA geschnitten. Diese Enzyme erkennen eine spezifische palindromische Basenpaarsequenz und schneiden doppelsträngige DNA mit überhängenden oder glatten Enden. Restriktionen dienen der Charakterisierung von Plasmid-DNA und der Präparation von DNA-Fragmenten für Klonierungen. Beim analytischen Verdau wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Enzym nach Angaben des Herstellers für ein bis drei Stunden bei 37°C inkubiert. Bei präparativen Restriktionen wurden 10 µg DNA eingesetzt. Anschließend wurde die restringierte DNA zur Überprüfung und Charakterisierung auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.2).

3.2.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurde die Phosphatgruppe am 5'-Ende mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (CIAP) abgespalten. Das Verfahren wurde bei DNA-Fragmenten nicht angewendet, da zumindest eine Phosphatgruppe für eine anschließende Ligation notwendig ist. Die Dephosphorylierung erfolgte im direkten Anschluss an den Restriktionsverdau nach Angaben des Herstellers. Typischerweise wurden hierzu im analytischen Maßstab 1 µg restringierte Plasmid DNA mit 1 µl CIAP (10U) in 1x CIAP Reaktionspuffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.1.3 Ligation von DNA

Für Ligationen von geschnittener Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurde 40 ng linearisiertes Plasmid mit der entsprechenden Menge des Fragments entsprechend den molekularen Verhältnissen von 1:1, 1:3 und 1:5 zusammen mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 10x Ligationspuffer in einem 10 µl Ansatz für vier Stunden bei Raumtemperatur ligiert.

3.2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 4 - 10 µl des Ligationsansatzes (siehe 3.2.1.3) mit 50 µl kompetenten DH5 α -Bakterien zunächst 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte im Anschluss durch Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Zur Expression der Antibiotika-Resistenzfaktoren wurden 400 µl TB-Medium zugefügt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für eine Minute bei 2000 x g abzentrifugiert, in 100 µl TB-Medium resuspendiert und auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen.

3.2.1.5 Plasmid-DNA-Präparation

Um DNA aus Bakterienklonen zu gewinnen wurde diese je nach gewünschter Menge aus einer 5 ml Bakterienkultur (DNA-Minipräparation) oder aus einer 50 ml Bakterienkultur (DNA-Midipräparation) präpariert. Minipräparationen wurden mit dem peqGOLD PlasmidMiniprep-Kit I (Peqlab), Midipräparationen HiPure Plasmid Filter Midiprep-Kit (Invitrogen) jeweils entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde in sterilem destilliertem Wasser resuspendiert.

3.2.1.6 Klonierungen der dominant-negativen (dn) Plasmide für Lef1, TCF1 und TCF4

Die dominant-negativen Plasmide pE μ Δ 56, pcDNA3.1/Zeo(+)-hdnTCF1 und pcDNA3.1/Zeo(+)-FLAGhdnTCF4 wurden von Prof. Dr. R. Grosschedl (Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

pE μ Δ 56	enthält die dn Mutation der humanen LEF-1 cDNA-Sequenz
pcDNA3.1/Zeo(+)-hdnTCF1	enthält die dn Mutation der humanen TCF1 cDNA-Sequenz
pcDNA3.1/Zeo(+)-FLAGhdnTCF4	enthält die dn Mutation der humanen TCF4 cDNA-Sequenz mit einem N-terminalen FLAG-Taq

Die cDNAs für dnLEF-1, dnTCF1 und dnTCF4 wurden in einen pEGFP-C1-Vektor umkloniert, um GFP-Fusionsproteine zu erzeugen. Das pE μ Δ 56-Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Eco*RI verdaut. Die so erhaltene cDNA für dnLEF-1 wurde gereinigt (siehe 3.2.3) und in das mit *Bgl*II und *Eco*RI linearisierte pEGFP-C1-Plasmid ligiert (siehe 3.2.1.3). Die Klonierung der dnTCF1-Sequenz aus dem Ursprungsvektor erfolgte über den Restriktionsverdau mit *Kpn*I und *Apa*I. Nach anschließender Reinigung des Fragments (siehe 3.2.3) wurde dieses in das mit *Kpn*I und *Apa*I linearisierte pEGFP-C1-Plasmid ligiert (siehe 3.2.1.3). Die cDNA für FLAGdnTCF4 wurde zunächst aus dem Ursprungsvektor über den Restriktionsverdau mit *Nhe*I und *Apa*I erhalten. Nach anschließender Reinigung wurde das Fragment in den mit *Nhe*I und *Apa*I linearisierten Zwischenvektor pEGFP-N1 ligiert. Aus dem Zwischenvektor wurde die Sequenz mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Zudem wurde durch die PCR N-terminal eine *Xho*I-Schnittstelle und C-terminal eine *Kpn*I-Schnittstelle in die Sequenz eingefügt. Nach erfolgter Reinigung des PCR-Amplifikats erfolgte abschließend die Ligation des PCR-Amplifikats in das mit *Xho*I und *Kpn*I linearisierte pEGFP-C1-Plasmid (siehe 3.2.3 und 3.2.1.3). Die eingefügten Schnittstellen sind in der angegebenen Primersequenz unterstrichen. Im Anschluss an die Klonierung wurden alle neu erhaltenen Vektoren auf ihre Richtigkeit hin untersucht, indem zum einen die jeweilige cDNA aus dem pEGFP-C1-Plasmid wieder restringiert wurde. Zum anderen wurden K562-Zellen wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit den Vektoren transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot-Analyse (siehe 3.3.6) überprüft.

dnTCF4-Xho-sense:

5´GAGACTCGAGCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAAAGGATCC-3´

dnTCF4-KpnI-antisense:

5´-GAGAGGTACCTTAGGCCCCGTTGGGACAGAGGGCGGAGGCCTTGTGG

<u>Reaktionsansatz (25 μl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>		
5 x Puffer	5 μ l	95°C	2 min	1x
dNTPs (10 nM)	0,9 μ l	95°C	30 sec	} 35x
sense-Primer (10 pM)	2 μ l	55°C	30 sec	
antisense-Primer (10 pM)	2 μ l	72°C	1 min 30 sec	
Taq (5 U/ μ l)	0,5 μ l	72°C	10 min	1x
Wasser	15,6 μ l	4°C	∞	
DNA	500 ng			

3.2.1.7 Klonierung eines 7,5 kb langen PON2-Promoter-Fragments

Zur Analyse der transkriptionellen Regulation der PON2-Expression wurde ein etwa 7,5 kb langes genomisches Fragment des endogenen humanen PON2-Promoters kloniert. Als

Ausgangsmaterial diente genomische DNA aus EA.hy 926-Zellen (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Horke), woraus der 7,5 kb lange PON2-Promoter amplifiziert wurde. Das Fragment entspricht der Region - 7343 bis + 114 des humanen PON2-Gens. Für die PCR-basierte Amplifikation des PON2-Promoters wurde das *Roche Expand Long Range dNTP PCR Kit* verwendet. Mit den für die PCR verwendeten Primern wurde zudem N-terminal eine *KpnI*-Schnittstelle und C-terminal eine *NheI*-Schnittstelle eingefügt, um nachfolgend die Insertion der amplifizierten DNA Sequenz in das Reporterplasmid pGL4.10[luc2] zu ermöglichen. Die eingefügten Schnittstellen sind in der angegebenen Primersequenz unterstrichen.

P2PromXL-1-sense: 5´-GAGAGGTACCTGTGTGTAGTGAGAGGCAATAGTTC-´3

P2PromXL-1-antisense: 5´-GAGAGCTAGCCACCTACCTGAGTGCCAGAAG-´3

<u>Reaktionsansatz (50 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>		
5 x Puffer	10 µl	92°C	2 min	1x
dNTPs (10 nM)	2,5 µl	92°C	10 sec	} 10x
sense-Primer (10 pM)	1,5 µl	65°C	15 sec (-1°C/Zyklus)	
antisense-Primer (10 pM)	1,5 µl	68°C	7 min 45 sec	
DMSO	3 µl	92°C	10 sec	} 25
Wasser	25,5 µl	55°C	15 sec	
enzyme blend	0,7 µl	68°C	7 min 55 sec (+ 22 sec/Zyklus)	
gDNA	500 ng	68°C	7 min	1x
		4°C	∞	

Im Anschluss an die PCR wurde das 7,5 kb lange Promoter-Fragment zuerst in einen Zwischenvektor (pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor) kloniert bevor es in den eigentlichen Expressionsvektor (pGL4.10[luc2]) eingebracht wurde. Für die Extraktion aus einem 1%igen Agarosegel und die Klonierung in den pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor wurde das TOPO[®] XL PCR Cloning Kit von Invitrogen verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Die abschließende Klonierung in den Expressionsvektor pGL4.10[luc2] erfolgte mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *NheI*.

3.2.1.8 Sequenzierung klonierter DNA

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

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese kann man DNA-Fragmente der Größe nach trennen. Die Agarose besitzt eine Siebstruktur, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten, d. h. kleinere Fragmente durchlaufen das Agarosegel schneller als große. Es wurden 0,8 – 2%ige Gele verwendet die eine Auftrennung von 0,1 – 25 kb ermöglichen. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der Agarose wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Der Agarose wurde der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden zusammen mit einem 6 x DNA-Ladepuffer versetzt, aufgetragen und eine Spannung von 25 - 100 V angelegt. Nach ausreichender Auftrennung der Proben wurden die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente bestimmter Größe spezifisch zu isolieren, wurde die entsprechende DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um Schädigungen der DNA zu vermeiden wurde eine niedrige UV-Intensität gewählt und die UV-Exposition möglichst kurz gehalten. Die enthaltene DNA wurde mit dem *QIAquick – Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück eluiert und in 30 - 50 µl DEPC*H₂O aufgenommen.

3.2.4 Phenol-Chloroformextraktion mit anschließender Isopropanol- präzipitation

Um Salze oder andere störende Substanzen aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden die DNA-Lösungen zuerst mit einer Phenol-Chloroformextraktion gereinigt, mit Isopropanol präzipitiert und anschließend in Wasser aufgenommen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gut gemischt und fünf Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige DNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzt, gemischt und für fünf Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert. Um eventuell noch vorhandene Phenolreste vollständig aus der DNA-haltigen Lösung zu entfernen, wurde abschließend das gleiche Volumen Chloroform zur DNA-haltigen Lösung hinzugegeben, gemischt und für fünf Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert. Dann wurde die obere DNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,9 Vol% Isopropanol 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet 20 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert, zwei Mal in

70%igem Ethanol gewaschen, 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in DEPC*H₂O aufgenommen.

3.2.5 Generierung einer biotinylierten PON2-Promoter-DNA-Sequenz zur Isolierung von Promoter-bindenden Proteinen

In diesem Versuchsansatz wurde eine terminal-biotinylierte DNA mittels PCR generiert, welche entweder die PON2-Promoter-Sequenz hatte oder einer unspezifischen Vektor-Kontroll-DNA entsprach. Hiermit wurden anschließend Promoter-bindende Proteine isoliert (siehe 3.2.6).

Als Template-DNA dienten die Plasmide pGL4-PON2-Promoter (Gesamtgröße 6,5 kbp) und pGL4.10[luc2] (Gesamtgröße 4,2 kbp). Als *sense*-Primer wurde das biotinylierte Oligonukleotid BOpGL4SEQfwd verwendet. In den *antisense*-Primern unterschied sich die Reaktion, um einerseits ein PON2-Promoter-Fragment zu amplifizieren (Größe 2307 bp), sowie andererseits ein DNA Produkt vergleichbarer Größe (1740 bp) ohne PON2-Promoter zu erhalten. Die *antisense*-Primer besaßen keine Biotinylierung.

BOpGL4SEQfwd-sense: 5'-AAGTGCAGGTGCCAGAAC-3'

PON2-m1-Nhe-antisense: 5'-GATAGAGCTAGCGCCTGGCCAGCAGCTCCGTG-3'

Luc2rep-Cterm-antisense: 5'-GAATCTCGCGGATCTTGC-3'

<u>Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>		
5 x Puffer	5 µl	95 °C	2 min	1 x
dNTPs (10 nM)	0,9 µl	95 °C	45 sec	} 35 x
<i>sense</i> -Primer (20 pM)	1 µl	50 °C	45 sec	
<i>antisense</i> -Primer (20 pM)	1 µl	72 °C	3 min (+ 5 sec/Zyklus)	
Taq (5 U/µl)	0,5 µl	72 °C	10 min	1 x
DNA (50 ng/µl)	2 µl	4 °C	∞	
Wasser	14,1 µl			

3.2.6 Affinitätsreinigung PON2-Promoter-bindender Proteine

Die nachfolgend beschriebene Methode dient der Anreicherung spezifisch PON2-Promoter-bindender Proteine aus dem komplexen Proteingemisch eines Nukleus-Extrakts. Bei den für diesen Versuch eingesetzten *Dynabeads® M-280 Streptavidin* handelt es sich um Metallkügelchen (Durchmesser: 2,8 µm) die mit Streptavidin, einem Protein, das von *Streptomyces avidinii* stammt, ummantelt sind. Streptavidin hat die Eigenschaft, mit hoher Affinität Biotinmoleküle an sich zu binden. Wie oben beschrieben (siehe 3.2.5) wurden der PON2-Promoter (Region -2249 bis +112 des humanen PON2-Gens) und ein Produkt mit

vergleichbarer Größe (Kontroll-DNA) als biotinylierte DNA-Sequenz amplifiziert und konnten somit an die Streptavidin-beschichteten Beads gebunden werden. Die eingesetzte Menge an Beads ergab sich aus der DNA-Menge in pmol, die man aus folgender Gleichung errechnen kann:

$$\text{DNA [pmol]} = \text{DNA-Masse (pg)} / (660 \text{ (g/mol)} \times \text{Anzahl der Basenpaare})$$

Die biotinylierten PCR-Amplifikate (PON2-Promoter = 3,6 µg; Kontroll-DNA = 2,7 µg) wurden zunächst mit den Beads (jeweils 48 µl) für 45–90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal in 96 µl 1 x B+W-Puffer (siehe 2.10) gewaschen.

Dann wurden die Beads mit assoziierter DNA zusammen mit dem Kernextrakt (für MS- und LC / MS-Analysen 100 µg; für Western Blot-Analysen 20 µg) für zwei Stunden in 1 x Bindungs-Puffer (siehe 2.10) auf Eis inkubiert. Dadurch konnten Kernproteine an die PON2-Promoter- bzw. Kontroll-DNA binden. Im Anschluss daran wurden die Beads mit Hilfe eines Magneten von Proteinen selektiv getrennt, die nicht an die Promoter-Region gebunden haben. Der Überstand wurde abgenommen, die Beads dreimal in 200 µl 1 x Bindungs-Puffer gewaschen und abschließend in 100 µl 5 x SDS-Ladepuffer (siehe 2.10) aufgenommen. Um die Proteine von den Beads trennen zu können, wurden sie zuvor für fünf Minuten bei 90°C erhitzt. Dabei wurden gleichzeitig die Proteine denaturiert. Dann wurden die Proteine zusammen mit Bindungsüberständen und Waschfraktionen auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch eine Coomassie-Färbung (siehe 2.10) sichtbar gemacht. Durch einen Vergleich der Proteinbanden, welche mit der PON2-Promoter-DNA nicht jedoch mit der Kontroll-DNA präzipitiert werden konnten, ist es möglich, PON2-Promoter-bindende Proteine zu identifizieren.

3.2.7 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIPs) werden Interaktionen zwischen Proteinen und DNA untersucht. So können u. a. Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und bestimmten DNA-Sequenzen sowie Regulationsmechanismen analysiert werden. Mit dieser Methode sollte einerseits verifiziert werden, dass LEF-1 als ein PON2-regulierender Transkriptionsfaktor agiert, indem er an den PON2-Promoter bindet; andererseits sollte durch diese Methode die exakte Bindungsstelle identifiziert werden.

Für eine ChIP-Analyse blieben K562-Zellen entweder unbehandelt oder wurden 24 Stunden mit dem GSK-3β-Inhibitor SB 216763 (25 µM) behandelt. Am nächsten Tag wurden 2×10^8 Zellen zunächst zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen und sieben Minuten in Serum-freien RPMI 1640 Medium mit 1% Formaldehyd auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Inkubation mit Formaldehyd werden bestehende Protein-DNA-Interaktionen durch

kovalentes *Crosslinken* fixiert. Die Zellen wurden anschließend bei 900 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer 0,125 M Glycin-Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler behandelt. Anschließend wurden die Zellen zwei weitere Male mit 1 x PBS gewaschen, bevor sie in 1 ml Lysispuffer (siehe 2.10) aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit einem Homogenisierer mechanisch aufgebrochen und für zehn Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellkernpellet in 350 µl Ultraschall-Puffer (siehe 2.10) aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellkerne für 3 x 20 Sekunden und 25% Leistung mit einem Ultraschallgerät vollständig aufgebrochen. Zwischen den Ultraschallpulsen wurden die Zellkerne für 30 Sekunden auf Eis gelagert, um eine Überhitzung der Proben zu verhindern. Die DNA wurde somit mechanisch in kurze und gleichförmige Fragmente (500 bp-1000 bp) geteilt. Überprüft wurde dies, indem die Fragmente auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurden (siehe 3.2.2). Danach wurden Zellreste für zwölf Minuten bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA-Konzentration im Nanodrop vermessen. Anschließend wurden sowohl die Protein G-Agarose (pro Fraktion wurden 40 µl Protein G-Agarose eingesetzt) als auch das Chromatin gereinigt. Dazu wurde die Protein G-Agarose zwei Mal mit IP-Puffer (siehe 2.10) gewaschen und dann mit 1 µg/µl *Salmon testis* DNA, 1 µg/µl BSA in 100 µl IP-Puffer über Nacht in einer *end-over-end* Rotation bei 4°C behandelt. Zeitgleich wurden je 100 µg Chromatin zusammen mit 40 µl Protein G-Agarose in 200-300 µl IP-Puffer in einer *end-over-end* Rotation bei 4°C für zwei Stunden gereinigt. Anschließend wurden jeweils 100 µg Chromatin mit 8 µg des jeweiligen Antikörpers in 200-300 µl IP-Puffer über Nacht in einer *end-over-end* Rotation bei 4°C inkubiert.

monoklonaler α-human-LEF-1	Cell Signaling
monoklonaler α-human-β-Catenin	Cell Signaling
monoklonaler α-human-β-Catenin	Sigma
monoklonaler α-human-β-Catenin	Transduction Laboratories
polyklonaler α-human-NFY	Genespin
Control IgG rabbit	Santa Cruz
Control IgG mouse	Santa Cruz

Am folgenden Tag wurde die gereinigte Protein G-Agarose für zwei Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert, in IP-Puffer aufgenommen und zu gleichen Teilen in sieben Reaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurden die verschiedenen Antikörper / Chromatin Fraktionen auf die Protein G-Agarose gegeben und in einer *end-over-end* Rotation bei 4°C inkubiert. Nach vier Stunden wurden die einzelnen Fraktionen für zwei Minuten bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand der IgG-Fraktion wurde als Ausgangsmaterial aufbewahrt. Die

Agarosepellets wurden anschließend fünf Mal in je 600 µl RIPA-Puffer (siehe 2.10) gewaschen. Dabei erfolgte der erste Waschschrift für 15 Minuten in einer *end-over-end* Rotation bei 4°C. Alle nachfolgenden Waschschrift wurden durch vorsichtiges Entfernen der Waschlösung und Wiederaufnahme in RIPA-Puffer durchgeführt. Dann wurden die Fraktionen jeweils einmal in 600 µl LiCl-Puffer (siehe 2.10) und 1 x TE-Puffer (siehe 2.10) gewaschen, bevor das Pellet in 100 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen wurde. Über Nacht wurden die einzelnen Fraktionen und das Ausgangsmaterial mit jeweils 10 µg RNase A bei 65°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde den Proben jeweils 20 µg Proteinase K zugesetzt und diese für drei Stunden bei 50°C verdaut. Abschließend wurden die Proben mit dem *GeneJET™ PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 60 µl DEPC*H₂O aufgenommen.

Für die sich anschließenden PCRs wurden verschiedene Primerpaare designt (siehe 2.9.6). Diese wurden so gewählt, dass sie an vorhergesagte LEF-1 Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz binden konnten. Als unspezifische Kontrolle für unspezifisch co-präzipitierte DNA dienten die GAPDH- sowie SAT-Primerpaare. Das NFY-Primerpaar diente der Feststellung einer erfolgreichen CHIP-Analyse und ist folglich als Positivkontrolle anzusehen. Für die PCRs wurde das *Taq DNA Polymerase Recombinant Kit* von Invitrogen verwendet.

Reaktionsansatz (20 µl)

10 x Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
<i>sense</i> -Primer (300 nM)	0,25 µl
<i>antisense</i> -Primer (300 nM)	0,25 µl
MgCl ₂	0,8 µl
Taq (5U/µl)	0,1 µl
Wasser	15,2 µl
DNA	1 µl

Reaktionsprofil für die Primerpaare 2, 5, GAPDH, NFY und SAT

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 30x
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
12°C	∞	

Reaktionsprofil für die Primerpaare 1, 3 und 4

94°C	2 min	} 30x
94°C	30 sec	
68°C	1 min	
72°C	2 min	
12°C	∞	

3.2.8 Extraktion der Gesamtzell-RNA aus eukaryoten Zellen

Für die Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das *peqGOLD Total RNA Kit* verwendet. Dabei wurde grundsätzlich nach Angaben des Herstellers verfahren. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.9 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm am Nanodrop. Das Verhältnis von Extinktion der Probe bei 260 nm zu 280 nm (Ratio) entspricht dabei der Reinheit der Nukleinsäureproben und zeigt die Verunreinigung durch Protein-Rückstände aus der Präparation an. Dabei sollte das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} nicht unter 1,8 liegen.

3.2.10 cDNA-Synthese mittels Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Das Enzym Reverse-Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Mit ihrer Hilfe wird RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Diese dient als Ausgangsmaterial für die quantitative *real-time-RT-PCR* (siehe 3.2.11). Alle RT-PCRs wurden mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei dem verwendeten Primermix handelt es sich um einen *random-primer-mix*.

<u>Reaktionsansatz (20 µl):</u>		<u>Reaktionsprofil:</u>	
10 x PCR Puffer	2 µl	25°C	10 min
dNTPs (10 nM)	0,8 µl	37°C	2 h
10 x Primermix	2 µl	85°C	5 sec
RNA-freies Wasser	6,7 µl	4°C	∞
Reverse Transkriptase	0,5 µl		
RNA (10 ng / µl)	8 µl		

3.2.11 Quantitative *real-time*-RT-PCR (qRT-PCR)

Um aus einer Gesamtzell-RNA eine spezifische mRNA zu quantifizieren, macht man sich die Methode der quantitativen *real-time* RT-PCR zu nutze. Dabei erfolgt die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge durch die Verwendung sequenzspezifischer *TaqMan*-Sonden (siehe 2.9.8). Dieses System besteht aus drei Primern, von denen die jeweils äußeren üblichen PCR-Primern entsprechen, wohingegen die mittlere Sonde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) am 5'-Ende und mit einem sogenannten *Quencher* (z. B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)) am 3'-Ende markiert ist. Solange die Sonde an die komplementäre cRNA gebunden und intakt ist, wird durch die räumliche Nähe von Fluoreszenzmarkierung und *Quencher* keine Fluoreszenz abgegeben. Während der Elongationsphase der PCR werden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase Fluoreszenzfarbstoff und *Quencher* abgetrennt und entfernen sich räumlich voneinander. Erst jetzt wird eine Fluoreszenz emittiert und durch einen Detektor gemessen. Das entstehende Signal ist dabei direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA bzw. mRNA. Zur Quantifizierung wird die Expressionsrate der spezifischen Probe zunächst mittels $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode normalisiert gegen die Expressionsrate einer konstitutiv exprimierten mRNA (z. B. Glycerin-aldehyd-3-phosphat; GAPDH) aus derselben Probe. Anschließend erfolgt die Berechnung einer geänderten Expression durch den relativen Vergleich von behandelten und unbehandelten Proben.

<u>Reaktionsansatz (20 µl):</u>		<u>Reaktionsprofil:</u>		
2 x Puffer	10 µl	95°C	1 min	1 x
dNTPs (10 nM)	0,4 µl	95°C	1 min	} 45 x
sense-Primer (10 pM)	2 µl	95°C	30 sec	
antisense-Primer (10 pM)	2 µl	60°C	1 min	
<i>TaqMan</i> -Sonde (10 pM)	2 µl	4°C	∞	
Taq	0,5 µl			
RNA-freies Wasser	1,1 µl			
cDNA	2 µl			

3.2.12 Identifizierung PON2-regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse

Die Regulation der Expression des humanen Enzyms PON2 wurde u. a. anhand einer Analyse durchgeführt, in der 80 bekannte Transkriptionsfaktoren durch siRNA ausgeschaltet wurden (*Biology-on-Array, Cancer TF siRNA System; SABiosciences / Qiagen*). Bei dieser Analyse war die lyophilisierte siRNA der verschiedenen Transkriptionsfaktoren auf einer 96-

well-Platte aufgetragen. Die Menge / *well* der auf die 96-*well*-Platte aufgetragenen siRNA wurde vom Hersteller nicht angegeben. Je *well* wurden 15000 K562-Zellen auf die Platte ausgesät. Mit Hilfe des siRNA Transfektionsreagenzes SAINT-RED wurde die siRNA der verschiedenen Transkriptionsfaktoren nach Herstellerangaben im 96-*well*-Format transient transfiziert. Nach drei Tagen wurde die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert und die Expression der PON2-mRNA mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 3.2.11). Normalisiert wurde gegen GAPDH, mitochondriale ATP-Synthase 6 (mATPSy 6) und DNA-Polymerase 2.

3.2.13 Expression von PON2 in karzinogenem Lungengewebe

Für die Untersuchung der PON2-Expression in karzinogenem Lungengewebe wurde gesundes und karzinogenes Lungengewebe von 24 Patienten untersucht. Die auf einer 96-*well*-Platte (*TissueScan matched Lung Cancer Panel-IV* (Origene, Rockville, MD, USA, <http://www.origene.com/qPCR/Tissue-qPCR-Arrays.aspx>) aufgetragenen cDNAs wurden direkt für die Bestimmung der PON2-Expression in einer qRT-PCR mit dem SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Normalisiert wurde gegen GAPDH. Die Auswertung erfolgte nach Einteilung der unterschiedlichen Krebsstadien, Alter und Geschlecht.

3.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

3.3.1 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryoten Zellen

Zur Präparation von Proteinextrakten aus eukaryoten Zellen wurde das Zellkultur-Medium mit einer Pasteur-Pipette abgesogen und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden je 24-*well* 100 µl Lysispuffer 3 (siehe 2.10) zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze vom Boden der Platte mechanisch abgelöst und die erhaltene Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch eine Inkubation von 20 Minuten bei 4°C werden die Zellen durch das im Lysispuffer enthaltene Detergenz aufgeschlossen. Die Lysate wurden danach für 30 min bei 12000 x g und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 3.3.3) bestimmt.

3.3.2 Fraktionierung von Zytoplasmaextrakt und Nuklei aus eukaryotischen Zellen

Die Trennung von Zytoplasmaextrakt und Kernextrakt wurde mit dem NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Der BCA-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung. Das Protein bildet dabei mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Durch die Reduktion des Komplexes zu Cu^+ -Ionen entsteht mit Bicinchonininsäure (BCA) ein violetter Farbkomplex, dessen Adsorption bei 562 nm in einem Fluometer gemessen wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Eichung und als Vergleichsproben dienten Proteinlösungen mit bekannter Konzentration.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden durch eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis*) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wird eine Proteinlösung mit dem Detergenz SDS behandelt. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse-Ladungsverhältnis. Zudem werden die Proteine durch SDS und die reduzierenden Agenzien DDT und β -Mercaptoethanol denaturiert und somit Protein-Proteinwechselwirkungen unterbunden. Durch dieses Verfahren werden Proteine über gebundenes SDS proportional zu ihrer Masse negativ geladen, so dass diese in einer SDS-PAGE als negativ geladene SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. Die Polyacrylamidmatrix fungiert dabei als molekulares Sieb und trennt die Proteine nach dem Stokes-Radius auf.

Es wurden vertikale Elektrophoresekammern verwendet. Die abgedichteten Glasplatten wurden zu zwei Dritteln mit der vorbereiteten 12%igen Trenngelmischung gefüllt und direkt im Anschluss mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu vermeiden. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, das mit Bromphenolblau versetzte 5%ige Sammelgel zwischen die Platten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Bromphenolblau diente der besseren Erkennbarkeit der Taschen.

Tabelle 3 Pipetierschema für die SDS-PAGE-Gele.

<u>12%iges Trenngel</u>	<u>5%iges Sammelgel</u>	
8,25 ml	4,4 ml	H ₂ O
10 ml	1,34 ml	30% Bisacrylamid
6,25 ml	---	1,5 M Tris, pH 8.8
---	2 ml	0,5 M Tris, pH 6.8
0,25 ml	0,08 ml	10%iges SDS
0,25 ml	0,08 ml	10%iges APS
0,025 ml	0,01 ml	TEMED

Die Glasplatten wurden schließlich in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer (siehe 2.10) befüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer (siehe 2.10) versetzt, für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Eine Geltasche wurde mit einem Proteinmarker (siehe 2.4) versehen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 9 mA / Gel über Nacht.

3.3.5 Proteinfärbung durch Coomassie Blue

Mithilfe der Coomassie-Färbung werden Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht. Dabei färbt der Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff unspezifisch Proteine durch Anlagerung an basische Seitenketten der Aminosäuren.

Nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 3.3.4) wurde das Gel zunächst für 60 min in Coomassie-Fixierlösung (siehe 2.10) inkubiert. Anschließend wurde das Gel über Nacht auf einem Schüttler in die Coomassie-Färbelösung (siehe 2.10) gelegt und am nächsten Tag unter mehrmaligem Wechsel der Coomassie-Waschlösung (siehe 2.10) entfärbt. Dabei blieben die gefärbten Proteinbanden erhalten und konnten so mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt werden. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden zur Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie durch Herrn PD Dr. F. Buck ans Institut für Klinische Chemie des Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf geschickt.

3.3.6 Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen

Ein Western Blot bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Membran zum immunologischen Nachweis durch entsprechende Antikörper. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgt dabei durch ein zum Polyacrylamidgel senkrecht gerichtetes, elektrisches Feld. So wandern die Proteine aus dem Gel und bleiben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der PVDF-Membran haften.

Nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 3.3.4) der Proteine wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und für zehn Minuten in Kathodenpuffer (siehe 2.10) equilibriert. Gleichzeitig wurde die PVDF-Membran nach Angaben des Herstellers zuerst in Methanol aktiviert und dann für zehn Minuten in Anodenpuffer II equilibriert. Dann wurden je drei Blatt Whatmanpapier in Anodenpuffer I & II (siehe 2.10) equilibriert und zusammen mit der PVDF-Membran in ein Semidry-Blotsystem eingespannt. Das in Kathodenpuffer equilibrierte Gel wurde direkt auf die PVDF-Membran gelegt und mit vier in Kathodenpuffer getränkten

Whatmanpapieren abgedeckt. Der Transfer erfolgte bei 3 mA / cm² Membranfläche, in der Regel für ca. 21 Minuten zum Nachweis von Proteinen mit einer Größe von ca. 42 kDa.

Vor der Inkubation des Blots mit den Antikörpern wurden die unbesetzten Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran mit 5%igem Milchpulver in 1 x TBS für eine Stunde abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Im Anschluss wurde ein primärer Antikörper (siehe 2.6) auf die Membran gegeben und bei 4°C und einer *end-over-end-rotation* über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in 1 x TBS + 0,18% Tween gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe 2.7) inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x TBS + 0,18% Tween wurden die Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten (*horseradish peroxidase*, HRPO) Antigen-Antikörper-Komplexe durch eine einminütige Inkubation mit der *Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus* Lösung (siehe 2.4) visualisiert. Dabei katalysiert die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase die Oxidation von Luminol, welches in der oben genannten Reagenzlösung enthalten ist. Dies führt zu einer Lichtemission, deren Visualisierung durch Belichtung eines Röntgenfilms oder im digitalen Chemi-Doc-Detektionssystem (Biorad) erfolgt. Letzteres erlaubt eine genaue Quantifizierung der Signale über einen hohen Intensitätsbereich und erfasst >50-fache Unterschiede in Bandenintensitäten.

3.4 Bioinformatische Methoden - *in silico* Analyse der PON2-Promoter-Sequenz

Durch eine computerunterstützte Analyse (*in silico*) können biochemische Prozesse in lebenden Organismen am Computer nachgestellt werden. Für die Untersuchung der Regulation der Expression des humanen Enzyms PON2 wurde daher die PON2-Promoter-Sequenz in Matrizen verschiedener Computerprogramme eingegeben, um eine bioinformatische Vorhersage zu erzielen, welche Transkriptionsfaktoren an den Promoter binden würden. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die Bedingungen für die Sequenzanalyse so stringent wie möglich gehalten wurden. Zusätzlich wurde untersucht, wie konserviert die PON2-Promoter-Sequenz zwischen verschiedenen Spezies ist. Diese Analyse wurde von Pieter De Bleser in Kooperation mit dem VIB in Gent, Belgien durchgeführt. Hierfür wurde die PON2-Promoter-Sequenz mit 44 Spezies auf Konservierung verglichen. Für die Sequenzanalyse wurden die folgenden Programme genutzt:

ECR Browser: <http://ecrbrowser.dcode.org>

NIH Promoter Scan: <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>

Transfec database: <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfec>

Contra V2: <http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/contrav2/index.php>

3.5 Vergleichende Analyse des hämatopoetischen Systems von $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp C57BL/6J-Mäusen

3.5.1 Isolierung von Zellen aus Knochenmark, Milz und Thymus von Mäusen

Für die Untersuchung des hämatopoetischen Systems von $PON2^{-/-}$ -Mäusen (C57Bl6/J-Hintergrund) wurden Zellen aus Knochenmark, Thymus und Milz von $PON2^{-/-}$ -Mäusen und C57Bl6/J-Mäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.5.2) charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine Entnahme von Geweben unter Narkose mit anschließender Tötung nach §6 Abs. 1 Nr. 4 TierSchG und somit nicht um einen Tierversuch, sondern lediglich um ein anzeigepflichtiges Verfahren. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran kurzzeitig leicht betäubt. Anschließend wurde ihnen eine tief narkotisierende / nahezu letale Dosis Pentobarbital (0,8 ml 1%iges Pentobarbital in 1 x PBS) *i. p.* injiziert. Nachdem die tiefe Narkotisierung sichergestellt worden ist, wurde der Maus 1 ml Blut *intra cardial* entnommen und zur späteren labormedizinischen Blutanalyse durch ein HEMAVET-Gerät in ein mit EDTA ausgekleidetes Reaktionsgefäß (Microvette® 500 K3E) überführt. Danach wurde das Tier durch Entnahme des Herzens getötet. Anschließend wurden Milz und Thymus entnommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit ca. 4 ml PBS überführt und auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurden die Organe mechanisch durch ein Zellsieb gedrückt, um die Zellen zu vereinzeln. Nachfolgend wurden Erythrozyten durch eine fünfminütige Lyse und anschließende Zentrifugation (1500 x g; 5 min) aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellen wurden für weitere Behandlungen in PBS auf Eis gelagert. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Hinterläufe der Tiere benutzt und die Knochen vollständig frei präpariert. Dicht am Hüftgelenk wurde das Bein abgetrennt und Femur und Tibia auf Höhe des Knies getrennt. Vom Knie ausgehend wurde eine mit Medium (RPMI 1640 / 2% FCS) gefüllte 2 ml Spritze mit einer 23G (Durchmesser = 0,6 x 25 mm) Kanüle in die Knochenmarkskanäle von Femur und Tibia eingeführt und die darin befindlichen Zellen mechanisch ausgeschwemmt. Die Knochenmarkszellen wurden in diesem Medium bei 4°C zwischengelagert, bis die Erythrozyten lysiert wurden (wie oben für Milz und Thymus beschrieben). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.1.3). Dann wurden die Zellen entweder in RPMI 1640 / 2% FCS in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen / ml für weitere Behandlungen auf Eis gelagert, oder in 1 ml RPMI 1640 mit 20% FCS in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C bis zur späteren Analyse gelagert.

3.5.2 Durchflusszytometrie zur quantitativen Differenzierung und Charakterisierung der verschiedenen Zellsubpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen

Die verschiedenen Subfraktionen hämatopoetischer Vorläuferzellen sind durch unterschiedliche Antigenexpressionen charakterisiert. Anhand dieser Antigenexpressionen wurden die hämatopoetischen Zellen unterschieden und mittels FACS quantitativ analysiert.

Die die aus den Organen Thymus und Milz erhaltenen Zellen wurden ohne vorheriges Zählen gleichmäßig für die Färbungen aufgeteilt. Für die Knochenmarksfärbungen wurden jeweils 3×10^6 Zellen verwendet, die restlichen Zellen wurden für spätere Färbungen aufbewahrt. Die Zellen wurden in 1 x PBS für eine Stunde bei 4°C mit jeweils 1 µl des jeweiligen Antikörpers (Tabelle 4) inkubiert.

Tabelle 4 Antikörper für FACS-Färbungen.

<u>FACS-Färbung</u>	<u>Knochenmark</u>	<u>Milz</u>	<u>Thymus</u>
1	Gr1-PE / CD11b-APC / c-kit-PerCPCy5.5	Gr1-PE / CD11b-APC / c-kit-PerCPCy5.5	B220-APC / CD3-PE
2	B220-APC / CD3-PE	B220-APC / CD3-PE	CD4-APC / CD8-PE
3	Ter119-APC / CD71-PE	Ter119-APC / CD71-PE	
4		B220-APC / CD19-PE	

In der Zwischenzeit wurden die restlichen hämatopoetischen Progenitorzellen durch verschiedene Färbungen für die sich anschließende FACS-Analyse weiter unterteilt. Dabei macht man sich zu nutze, dass hämatopoetische Progenitorzellen den Oberflächenmarker CD34 (CD = cluster of differentiation) exprimieren. Anhand dieser CD34-Expression können Vorläuferzellen und reife Blutzellen voneinander unterschieden werden. Das Antigenprofil hämatopoetischer Zellen verändert sich mit zunehmender Differenzierung. Um die frühen Vorläuferzellen von differenzierten, reifen Vorläuferzellen zu unterscheiden, wurden „Lineage-Marker“ (Lin) verwendet, eine Kombination aus zellspezifischen Differenzierungs-Antigenen. Diese Differenzierungsantigene wurden von weiter differenzierten Vorläuferzellen wie GMPs, MEPs und CLPs und ausgereiften Blutzellen, nicht jedoch von frühen hämatopoetischen Vorläufer- oder Stammzellen exprimiert. Durch eine *Lineage*-Negativ-Selektion wurden so frühe hämatopoetische Vorläuferzellen isoliert. In Tabelle 5 sind die Antikörper, die für die *Lineage*-Negativ-Selektion verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 5 Für *Lineage-Negative-Selektion* verwendetet Antikörper.

<u>Antikörper</u>	<u>eingesetzte Antikörpermenge / 1 x 10⁸ Zellen / ml</u>
CD3 Biotin	7,5 µg
CD4 Biotin	1,25 µg
CD8 Biotin	2,5 µg
CD5 Biotin	5 µg
B220 Biotin	2,5 µg
Gr1 Biotin	2 µg
Ter119 Biotin	2,5 µg
Nur für HSC / CMP / GMP / MEP-Analyse	
CD127 Biotin	5 µg
Nur für HSC / CLP-Analyse	
CD11b Biotin	2 µg

Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (1500 x g, 5 min) und mit 1 x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für die LSK / GMP / CMP / MEP-Analyse 30 Minuten mit 0,8 µg Streptavidin-APC-Cy7 inkubiert, mit 1 x PBS gewaschen für zehn Minuten mit Rattenserum (200 µl / 70 Millionen Zellen) behandelt. Anschließend wurde diese Fraktion in vier Fraktionen aufgeteilt (jede ~50-100 Millionen Zellen) und wie folgt bei 4°C für 30 Minuten in einer *end-over-end* Rotation behandelt:

Fraktion 1	0,5 µg Sca1-PECy7
Fraktion 2	0,4 µg ckit-APC
Fraktion 3	1 µg CD16 / 32-PE
Fraktion 4	0,5 µg CD34-FITC

Die Zellen für die HSC / CLP-Analyse wurden ebenfalls 30 Minuten auf Eis mit 0,8 µg Streptavidin-APC-Cy7 behandelt, abzentrifugiert (1500 x g, 5 min), mit 1 x PBS gewaschen und zehn Minuten mit Rattenserum (200 µl / 70 Millionen Zellen) behandelt. Anschließend wurde diese Fraktion in vier Fraktionen aufgeteilt (jede ~50-100 Millionen Zellen) und wie folgt bei 4°C für 30 Minuten in einer *end-over-end* Rotation behandelt:

Fraktion 1	0,5 µg Sca1-PECy7
Fraktion 2	0,4 µg ckit-APC
Fraktion 3	0,5 µg CD135-PE
Fraktion 4	0,5 µg CD150-FITC

Abschließend wurden alle gefärbten Zellen in 1 x PBS gewaschen, in 1 x PBS / 2% FCS aufgenommen und im FACS quantitativ analysiert.

3.6 Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2^{+/+})

3.6.1 Kultivierung pluripotenter Stammzellen der Maus

Pluripotente Stammzellen der Maus (ES-Zellen) wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 10% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Vollmedium (siehe 2.11.2) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte entweder auf mit Gelatine (0,1%) beschichteten Kulturgefäßen oder auf primären murinen Fibroblasten (MEF-Zellen), welche durch Mitomycin C Behandlung mitotisch inaktiviert wurden. Sobald die ES-Zellen konfluent waren, wurden sie subkultiviert. Dazu wurde zunächst das Medium durch frisches Vollmedium ausgetauscht, nach zwei Stunden abgenommen und die Zellen mit 1 x PBS (ohne Ca²⁺ / Mg²⁺) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch eine dreiminütige Inkubation mit 1%iger Trypsinlösung / 1% Hühner-Serum im Brutschrank enzymatisch vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Durch die Zugabe von frischem Serum-haltigem Vollmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die ES-Zellen wurden danach durch eine Pasteurpipette, deren Öffnung mechanisch verkleinert (*fire-polished*) wurde, vereinzelt, bevor sie in andere Kulturgefäße ausgesät wurden.

3.6.2 Kryokonservierung und Auftauen pluripotenter Stammzellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die konfluenten Zellen wie oben beschrieben aus dem Kulturgefäß abgelöst, in frischem Vollmedium aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 900 x g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in Medium, das zusätzlich 40% FCS und 20% DMSO enthielt, wieder aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Kryo-Röhrchen überführt, bei -80°C eingefroren und zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurde das Kryo-Reaktionsgefäß direkt aus dem Stickstoff in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und sofort in frischem Vollmedium aufgenommen. Um DMSO vollständig aus dem Medium zu entfernen, wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation (900 x g) pelletiert, in frischem Vollmedium aufgenommen und in eine 10 cm Zellkulturplatte ausplattiert.

3.6.3 Bestimmung der Zellzahl und Ausplattierung MEF- und ES-Zellen

MEF-Zellen wurden am Tag vor dem jeweiligen Experiment in definierten Mengen und Kulturgefäßen ausplattiert. ES-Zellen wurden am Tag des jeweiligen Experimentes ausplattiert. Dazu wurden die Zellen wie in 3.6.3 beschrieben zunächst vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die durch Zugabe von Medium erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 ml-Pipette (MEF-Zellen) oder mit einer *fire-polished* Pasteurpipette (ES-Zellen) wurden die Zellen vereinzelt. Von der erhaltenen Suspension wurden 10 µl auf eine Neubauerkammer gegeben und vier Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde mit 10000 multipliziert und so die Zellzahl / ml erhalten.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die jeweils ausplattierten Zellmengen.

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturgefäß</u>	<u>Zellzahl</u>
MEF	10 cm ² Platte	4 x 10 ⁵
ES	10 cm ² Platte	4 x 10 ⁵

3.6.4 Klonierung des *Gene-Targeting*-Vektors

Im Zuge des Vorhabens eine transgene Maus zu erstellen, welche eine induzierbare Überexpression des murinen PON2-Gens *in vivo* ermöglicht, wurde zunächst ein entsprechender *Gene-Targeting*-Vektor erstellt. Dieser wird anschließend in das Genom muriner ES Zellen integriert und zwar in den *ROSA26*-Locus, einem ursprünglichen *Gene-Trapping* Locus auf Chromosom 6, welcher eine moderate Überexpression in jeglichen Geweben der Maus ermöglicht¹⁰⁰. Die ES-Klone mit stabiler und verifizierter Integration des Vektors werden schließlich in murine Blastozysten injiziert und hierüber transgene Mäuse generiert.

Der *ROSA26 Gene-Targeting*-Vektor R26-CAGs-IRES-EGFP wurde von Dr. S. Wörtge (AG Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe von Zwischenvektoren wurde ein Vektor mit *ROSA26*-Locus *targeting* Sequenz erstellt, welcher eine induzierbare Überexpression von Hämagglutinin(HA)-gekoppeltem murinen PON2 ermöglicht. Der vollständige *Gene-Targeting*-Vektor enthält nach der Klonierung einen CAGs-Promoter, eine Neomycin-Stopp-Kassette die von zwei *loxP*-Elementen (*locus of crossover*) mit derselben Orientierung begrenzt wird, das murine HA-gekoppelte PON2, eine IRES-Sequenz sowie ein Gen für eGFP (Abbildung 2). Die *loxP*-Elemente bestehen aus einer asymmetrisch gerichteten Kernregion (8 bp) und zwei flankierenden palindromen Wiederholungen (13 bp). Unter Verwendung der

sequenzspezifischen Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 katalysiert dieses Enzym ein Rekombinationsereignis zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen, den *loxP*-Elementen. In Abhängigkeit der Orientierung der *loxP*-Elemente zueinander führt ein Rekombinationsereignis zur Deletion oder Insertion des *loxP*-flankierenden DNA-Fragments. Im vorliegenden Fall führt ein Rekombinationsereignis durch eine Cre-Rekombinase katalysiert zur Deletion der Neomycin-Stopp-Kassette.

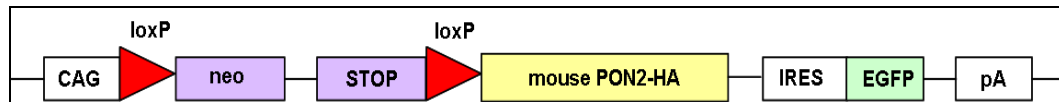


Abbildung 2: Schematische Darstellung des für PON2-HA kodierenden Bereichs aus dem *Gene-Targeting*-Vektor. Erläuterungen siehe Text.

Die Sequenz für das murine PON2-Gen wurde mittels PCR aus dem pCMV-Sport6-Plasmid amplifiziert. Gleichzeitig wurden mit Hilfe der verwendeten Primer Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *EcoRI* eingebracht. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind in der angegebenen Primersequenz unterstrichen.

Sport6_Hind3_P2_sense: 5'-GAGAAAGCTTATGGGCCGGATGGTGGCTCTGAG-3'

Sport6_EcoR1_P2_antisense: 5'-GAGAGAATTCGAGTTCACAGTACAAGGCTTTC-3'

<u>Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>		
5 x Puffer	5 µl	95°C	2 min	1x
dNTPs (10 nM)	0,9 µl	95°C	30 sec	} 35x
sense-Primer (10 pM)	2 µl	55°C	30 sec	
antisense-Primer (10 pM)	2 µl	72°C	1 min 30 sec	
Taq (5 U/µl)	0,5 µl	72°C	10 min	1x
Wasser	15,6 µl	4°C	∞	
DNA	500 ng			

Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.2). Danach wurde das cDNA-Amplifikat für das murine PON2 mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe 3.2.3). Das PCR-Amplifikat wurde anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HindIII* und *EcoRI* in den pcDNA3HA-Vektor kloniert. Durch diesen Schritt wurde ein PON2-HA Fusionsprotein erzeugt, um in späteren Analysen zwischen endogenem PON2 und überexprimiertem PON2 (=PON2-HA) differenzieren zu können. Aus diesem Vektor wurde mittels PCR die Sequenz für das murine HA-gekoppelte PON2 amplifiziert, um diese schließlich mittels Restriktionsverdau in den Zielvektor einbringen zu können. Hierzu wurde über die benutzten Primer N- und C-terminal eine *Ascl*-Restriktionsschnittstelle eingebracht. Die Restriktionsschnittstellen sind in der angegebenen Primersequenz unterstrichen.

pCDNA3HA Asc1 P2 sense: 5'-GAGAGGCGCGCCATGGGCCGGATGGTGGCTCTGAG-3'

pCDNA3HA Asc1 P2 antisense: 5'-GAGAGGCGCGCCGAGTTCACAGTACAAGGCTTTC-3'

<u>Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>			
5 x Puffer	5 µl	95°C	2 min		1x
dNTPs (10 nM)	0,9 µl	95°C	30 sec	}	35x
sense-Primer (10 pM)	2 µl	55°C	30 sec		
antisense-Primer (10 pM)	2 µl	72°C	1 min 30 sec (+5 sec/Zyklus)		
Taq (5 U/µl)	0,5 µl	72°C	10 min		1x
Wasser	15,6 µl	4°C	∞		
DNA	500 ng				

Die abschließende Klonierung in den Expressionsvektor R26-CAGs-IRES-EGFP erfolgte mit dem Restriktionsenzym *AscI* (Kapitelverweise: Restriktionsverdau siehe 3.2.1.1; Amplifikataufreinigung siehe 3.2.3; Ligation siehe 3.2.1.3). Da das mPON2-HA-PCR-Fragment über nur eine einzige Restriktionsschnittstelle in den *ROSA26*-Vektor kloniert wurde, wurde mit Hilfe von PCR-Analysen festgestellt, wie oft das Fragment in den Vektor eingebracht wurde und ob es sich in der richtigen Orientierung im Vektor befand. Die Sequenzen für das Primerpaar 1 (*ROSA-Seq-sense* und *ROSA-Seq-antisense*) liegen außerhalb der Sequenz des eingebrachten PCR-Fragments. So konnte anhand der Amplifikatgröße festgestellt werden wie oft das PCR-Fragment in den Vektor eingebracht wurde. Die Sequenz für den Primer *PON2-iso1-only-antisense* befindet sich innerhalb der eingebrachten mPON2-HA-Sequenz. Zusammen mit dem Primer *ROSA-Seq-sense* gab er Aufschluss darüber, ob sich das Fragment in der richtigen Orientierung befand.

ROSA-Seq-sense: 5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGG-3'

ROSA-Seq-antisense: 5'-AAGCGGCTTCGGCCAGTAAC-3'

PON2-iso1-only-antisense: 5'-GGGTGGTTTACAACAAAGAG-3'

<u>Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>			
5 x Puffer	5 µl	95°C	2 min		1x
dNTPs (10 nM)	0,9 µl	95°C	30 sec	}	30x
sense-Primer (10 pM)	2 µl	55°C	30 sec		
antisense-Primer (10 pM)	2 µl	72°C	2 min 30 sec		
Taq (5 U/µl)	0,5 µl	72°C	10 min		1x
Wasser	15,6 µl	4°C	∞		
DNA	500 ng				

Schlussendlich wurde mittels Agarosegel und PCR geprüft, ob der Vektor das Insert in richtiger Orientierung und Anzahl enthält. In späteren FACS-Analysen wurde sichergestellt, dass die Expression einer Cre-Rekombinase mittels Exzision der Neomycin-Stopp-Kassette

zur Aktivierung der PON2-HA und eGFP Expression in stabil-integrierten ES-Zellen führt (in Kooperation mit Dr. S. Wörtge, AG Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz).

3.6.5 Stabile Transfektion des *Gene-Targeting*-Vektors R26-CAGs-mPON2-HA-IRES-EGFP in pluripotente Stammzellen der Maus mittels Elektroporation

Für eine stabile Transfektion wurde der *Gene-Targeting*-Vektor R26-CAGs-mPON2-HA-IRES-EGFP (3.6.4) mit dem Restriktionsenzym *Ascl* linearisiert und nach Phenol-Chloroformextraktion und anschließender Isopropanolpräzipitation (siehe 3.2.4) in 50 µl 1 x PBS aufgenommen. Für die Elektroporation wurden 1 x 10⁷ ES-Zellen in 800 µl 1 x PBS-Lösung aufgenommen und mit ~40 µg des linearisierten *Gene-Targeting*-Vektors in einer Elektroporationsküvette gemischt. Anschließend wurde das ES-Zellen / DNA-Gemisch für zehn Minuten auf Eis gekühlt. Dann wurden die Zellen bei 500 µF und 240 V bei Raumtemperatur elektroporiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in frischem Vollmedium für ES-Zellen auf MEF-Zellen ausplattiert.

Die Selektion zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellklonen erfolgte für 8-10 Tage mittels Vollmedium für ES-Zellen, dem das Antibiotikum G418 zugesetzt wurde. Der transfizierte *Gene-Targeting*-Vektor kodiert unter anderem für ein Resistenzgen gegen das Selektionsantibiotikum, so dass Wildtyp-Klone ohne integrierten *Gene-Targeting*-Vektor im Selektionsmedium absterben. Resistente Zellklone wurden durch „picken“ isoliert und zur Expansion auf 96-*well*-Platten überführt. Mittels Southern Blot-Analyse (siehe 3.6.7) wurden die selektionierten ES-Zellklone auf Integration des *Gene-Targeting*-Vektors überprüft.

3.6.6 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen wurden die selektionierten ES-Zellklone mit 50 µl Lysispuffer für ES-Zellen (siehe 2.10) je *well* bei 56°C in einer 96-*well*-Platte über Nacht verdaut. Am nächsten Tag ließ man die Platte zunächst auf Zimmertemperatur abkühlen. Dann wurde die Proben bei 500 x g abzentrifugiert, mit 200 µl / *well* 100%igem Ethanol versetzt und für ein bis zwei Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Platte auf ein Papiertuch umgedreht, so dass die gesamte Flüssigkeit vom Tuch aufgesogen wurde. Anschließend wurden die Proben zwei Mal für je zehn Minuten mit 70%igem Ethanol gewaschen. Abschließend wurde die genomische DNA bei 25 – 56°C für 10 – 20 Minuten getrocknet. Direkt im Anschluss wurde die genomische DNA für die nachfolgende Southern Blot-Analyse wie in 3.6.7 beschrieben mit *EcoRI* verdaut.

3.6.7 Southern Blot-Analyse

Ziel einer Southern Blot-Analyse ist es, spezifische DNA-Fragmente im Genom von z.B. Stammzellen oder Geweben nachzuweisen; hierzu wird genomische DNA isoliert (siehe 3.6.6), mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.2), auf einer Membran fixiert und mit spezifischen, radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert (siehe 3.6.8). Für eine Southern Blot-Analyse wurde die wie in 3.6.6 beschriebene isolierte genomische DNA aus ES-Zellen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (100 U/μl) bei 37°C für 16 Stunden in einer 96-well-Platte verdaut. Der Restriktionsansatz (30 – 50 μl) enthielt zudem RNase A (10 U/μl), Spermidin (1 M) und DTT (1 M). Am folgenden Tag wurde dem Restriktionsansatz 6 x Ficoll-Probenpuffer zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und bei 25 V über Nacht aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde das Gel zuerst für fünf bis zehn Minuten in Depurinatlösung (0,5 M HCl), dann für 30 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und schließlich für weitere 30 Minuten in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 1 M TrisHCl, pH 7,2) inkubiert.

Eine Nylonmembran und sechs Whatmanpapiere wurden in Gelgröße zugeschnitten. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurde das Gel auf eine Whatmanpapierbrücke und drei Whatmanpapiere, getränkt in 10 x SSC gelegt. Auf das Gel wurde die Nylonmembran, getränkt in 10 x SSC, platziert. Es folgten ein in 10 x SSC getränktes Whatmanpapier und zwei trockene Whatmanpapiere. Auf die Blot-Apparatur wurden mehrere Lagen trockenes Filterpapier und ein 500 g schweres Gewicht gelegt. Die Whatmanpapierbrücke hatte stets Kontakt zu einer 10 x SSC-Lösung. Nach dem Transfer über Nacht wurde die Nylonmembran nacheinander für je eine Minute in 0,4 M NaOH und 0,2 M TrisHCl, pH 7,5 / 1 x SSC inkubiert. Anschließend wurde die Membran zum Fixieren der DNA für zwei Stunden bei 80°C inkubiert.

3.6.8 Radioaktive Markierung und Hybridisierung

Mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde kann man einen in ES-Zellen durch Elektroporation eingebrachten *Gene-Targeting*-Vektor, der durch homologe Rekombination in das Genom aufgenommen wurde, spezifisch nachweisen. Dieses Verfahren schließt sich an den oben beschriebenen Southern Blot (siehe 3.6.6) direkt an.

Die Southern Blot Nylonmembran wurde in 2 x SSC getränkt und in einem Hybridisierungsröhrchen zusammen mit 40 ml Hybridisierungspuffer (siehe 2.10) für vier Stunden bei 65°C in einem Hybridisierungsöfen inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 30 ng „Orkin-Sonde“ mit dem *TAKARA Ladderman Labeling Kit* mit 5 μl des Radionukleotids ³²P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol, 50 μCi) nach Angaben des Herstellers radioaktiv

markiert. Die 1000 bp lange DNA-Sonde wurde aus dem „Orkin-Plasmid“ (kloniert von Dr. T. Wunderlich und freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. S. Wörtge) durch den Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI und anschließende Aufreinigung über ein Agarosegel (siehe 3.2.2) erhalten. Die Sonde hybridisiert vor dem 5´-Bereich des ersten Exons im *ROSA26*-Lokus. Nach zwei Stunden wurden nicht eingebaute Nukleotide über *Amersham Illustra MicroSpin* G-50 Säulchen nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Anschließend wurde die markierte Sonde für drei Minuten bei 95°C und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Für die Hybridisierung wurde die markierte Sonde zusammen mit 10 ml frischem Hybridisierungspuffer auf die Nylonmembran gegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran je 30 Minuten mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 und gegebenenfalls weitere 30 min mit Waschpuffer 3 bei 65°C gewaschen (siehe 2.10). Zwischen den Waschschritten wurde mit einem Szintillationszähler getestet wie viel Radioaktivität sich noch auf der Membran befindet. Die Membran wurde solange gewaschen bis die Radioaktivität maximal 70 cps betrug. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und in einer Biomax-Kassette mit einem Kodak MS Biomax Film belegt, welcher über Nacht bei -80°C exponiert wurde. Am nächsten Tag erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms.

3.6.9 Genotypisierung von transgenen Mäusen

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurden Biopsien von Mausschwanzspitzen in STE-Puffer (siehe 3.2.4) mit Proteinase K (0,5 µg/µl) bei 55°C für 16 Stunden inkubiert. Die DNA wurde durch eine Phenol-Chloroformextraktion mit anschließender Isopropanolpräzipitation (siehe 3.2.4) gereinigt und in 300 µl DEPC*H₂O aufgenommen. Anschließend wurden 1,5 µl DNA in einer PCR eingesetzt und später die DNA-Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt (3.2.2). Für die PCR-Analyse wurden zwei verschiedenen Primerpaare verwendet. Primerpaar 1 (*ROSA-FA-sense* und *ROSA-RA-antisense*) erkennt dabei ein 624 bp langes Fragment in der Wildtyp-Sequenz des *ROSA26*-Lokus. Wurde hingegen durch homologe Rekombination ein *Gene-Targeting*-Produkt in den *ROSA26*-Lokus integriert, so würde sich die Länge des Amplifikats entsprechend stark erhöhen, jedoch aufgrund der kurz gewählten Elongationszeit kein Produkt amplifiziert. Mit dem zweiten Primerpaar (*ROSA-FA-sense* und *SpliAc-antisense*) wird ein 242 bp langes Fragment amplifiziert, jedoch nur wenn eine homologe Rekombination im *ROSA26*-Lokus stattgefunden hat, da der *SpliAc-antisense* Primer nur mit dem integrierten Vektor hybridisiert. Anhand der erhaltenen PCR-Fragmente konnte somit entschieden werden, welche der in der PCR getesteten Mäuse den *Gene-Targeting*-Vektor genomisch integriert hatte.

<u>Reaktionsansatz (25 µl)</u>		<u>Reaktionsprofil</u>		
5x Puffer	5 µl	94°C	5 min	1 x
dNTPs (10 nM)	0,9 µl	94°C	30 sec	} 35 x
sense-Primer (10 pM)	2 µl	58°C	40 sec	
antisense-Primer (10 pM)	2 µl	72°C	1 min	
DMSO	1,5 µl	4°C	∞	
Taq (5 U/µl)	0,3 µl			
Wasser	13,6 µl			
DNA	1,5 µl			

ROSA-FA-sense: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'

ROSA-RA-antisense: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

SpliAc-antisense: 5'-CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG-3'

3.6.10 Herstellung und Haltung transgener Mausstämme

Die Injektionen von ES-Zellklonen in Blastozysten von dreieinhalb Tage alten C57Bl6/J Mäusen wurde von der ZVTE der Universitätsmedizin Mainz der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von Elena Wiese durchgeführt. Es wurden hierbei je 15 bis 20 ES-Zellen in Mausblastozysten injiziert. Jeweils acht bis zehn Blastozysten wurden in scheinchwangere C57Bl6/J Weibchen transplantiert. Die chimären Nachkommen sowie die folgende Generation wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der ZVTE gehalten.

3.7 Statistik

Zur Erstellung der in Kapitel 4 gezeigten Graphiken wurden die Programme *GraphPad Prism 5* und *QuantityOne 4.6.7* (Biorad) verwendet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der übrigen Graphen erfolgte mittels *One-way*, *Two-way* ANOVA oder t-Test. Die Berechnungen wurden ebenfalls mit der Software *GraphPad Prism 5* durchgeführt. Adobe Photoshop CS5 wurde für die Bildbearbeitung der Blots verwendet, wobei falls notwendig, nur Helligkeit und / oder Kontrast simultan für alle Bereiche eines Blots geändert wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Affinitätsreinigung *PON2*-Promoter-bindender Zellkernproteine

Bisher ist wenig bekannt über die Regulation der Expression des humanen Enzyms *PON2*. Mit Hilfe einer Affinitätsreinigung *PON2*-Promoter-bindender Zellkernproteine wurde untersucht, welche Proteine und Transkriptionsfaktoren an die *PON2*-Promoter-Sequenz binden. In nachfolgenden Analysen wurde schließlich der Effekt ausgewählter Proteine auf die *PON2*-Expression bestimmt.

Die Identifizierung der *PON2*-Promoter-bindenden Proteine erfolgte durch MS- und LC / MS-Analysen in Kooperation mit Herrn PD Dr. F. Buck vom Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf. Dazu wurde die *PON2*-Promoter-Sequenz mittels PCR aus einem Reporterplasmid amplifiziert, wobei der Reaktionsansatz einen Biotin-markierten Primer enthielt (siehe 3.2.5). Das Amplifikat wurde anschließend gereinigt, an Streptavidin-gekoppelte Beads gebunden und mit Kernextrakten inkubiert (siehe 3.2.6), um die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen. Anschließend wurden unspezifische Bindungspartner durch mehrere Waschschriffe entfernt und somit *PON2*-Promoter-bindende Proteine angereichert. Parallel wurde dieser Ansatz mit einer ähnlich langen DNA ohne Promoter-Sequenz durchgeführt (Kontroll-DNA). Schließlich wurden die an die jeweiligen DNAs gebundenen Proteine in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen identifiziert. Einerseits wurden die Proteine von den Beads gelöst (siehe 3.2.6), per SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.3.4), und Coomassie-gefärbt (siehe 3.3.5). Die mit Promoter-DNA aber nicht mit Kontroll-DNA erscheinenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Die Ergebnisse der MS-Analyse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Ergebnisse der MS-Analyse selektiv PON2-Promoter-bindender Zellkernproteine.

<u>Proteinname</u>	<u>Protein-ID</u>	<u>Anmerkung / Signalweg</u>
GAPDH	P04406	Glykolyse, Huntington Krankheit
transformer-2-homologue protein	Q13595	RNA-bindendes Protein
40S ribosomal subunit SA	P14206	Extrazelluläres Matrix-Glykoprotein; Zelladhäsion, Zell-Differenzierung, Zell-Migration, Neuritenwachstum und Metastasierung
Vimentin	P08670	Intermediär-Filamentprotein; cytoskelettale Prozesse; LDL Transport; Zell-Migration / -Adhäsion
Annexin A2	P07355	Transfer- / Carrierprotein
Interleukin enhancer-binding factor 2	Q12905	Co-Transkriptionsfaktor; Apoptose; Zellzyklus; Immunsystem
Septin-2	Q15019	Parkinson
Zinc finger protein 662	Q6Z527	Glykosyltransferase; Kohlenhydratstoffwechsel, Proteinstoffwechsel
NONO	Q15233	RNA-bindendes Protein
TF2H1	Q13888	Transkriptionsfaktor
Splicing factor U2AF	P26368	RNA-bindendes Protein
Nuclear protein 60	Q49A26	Dehydrogenase
PARP1	P09874	Chromatin-assoziiertes Enzym, Differenzierung, Proliferation, Tumortransformation, <i>Diabetes mellitus</i> Typ I,
5`3`exoribonuclease 2	P09936	DNA-Replikation
Splicing factor 3B subunit 1	O75533	RNA-bindendes Protein
Myb-binding protein 1A	Q9BQG0	Transkriptionsfaktor; Zellzyklus
Poly(rC)-binding protein 1	Q15365	RNA-bindendes Protein
Nucleolysin	Q01085	RNA- und DNA-bindendes Protein; DNA-Replikation; Ribonucleoproteinkomplex

Alternativ zu diesem Ansatz wurden die komplexen Proteingemische direkt mittels LC / MS analysiert, also ohne SDS-PAGE, Färbung und Ausschneiden von Proteinbanden. Die Kontroll-DNA liefert auch hier die „falsch-positiven“ Proteine. Die Verwendung beider Methoden ist vorteilhaft, weil im erstgenannten Aufbau prinzipiell nicht alle Proteine mit

Coomassie angefärbt werden können und dies zudem substantielle Mengen an Proteinen erfordert – der LC / MS-Ansatz ergibt folglich eine höhere Sensitivität. Andererseits können die LC / MS-Signale durch kaum auszuschließende Verunreinigungen (wie z. B. Keratine, Nukleine, hnRNPs, Histone, Detergenzien usw.) überlagert werden. Die Ergebnisse der LC / MS-Analyse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Ergebnisse der LC / MS-Analyse selektiv an den PON2-Promoter-bindender Zellkernproteine.

<u>Proteinname</u>	<u>Protein-ID</u>	<u>Anmerkung / Signalweg</u>
Nucleolin	P19338	nukleäres Phosphoprotein; Synthese und Reifung von Ribosomen
Lamin	Q14739	membrangebundenes Protein; verankert Lamina und Heterochromatin an Membran
HMG A1	P17096	Transkription; Replikation; Rekombination; DNA-Reparatur
HMG A2	P52926	Transkription; Replikation; Rekombination; DNA-Reparatur
TFAM	Q00059	mitochondrialer Transkriptionsfaktor; Replikation
Actin	P68133	Alzheimer; Cadherin-, Integrin- und Wnt-Signalweg; Inflammation; Huntington Krankheit, Cytoskelet-Regulation durch Rho GTPase, Nicotin Acetylcholin Rezeptor Signalweg
PARP	P09874	FAS-Signalweg
Nucleophosmin	P06748	Mutationen dieses Gens sind assoziiert mit AML; Regulation des ARF/p53-Signalweges
Mt-SSB	Q04837	mitochondriale Biogenese; Genomstabilität
DNA-Topoisomerase I	P11387	DNA-Replikation
HOX-3B	P31274	Transkriptionsfaktor; Morphogenese
Insulin gene enhancer protein ISL-2	Q96A47	Transkriptionsfaktor; Neuronenentwicklung
Cadherin EGF LAG	Q9NYQ7	Cadherin- und Wnt-Signalweg
Myosin-1	P12882	Inflammation, Wnt-Signalweg, Cytoskelet-Regulation durch Rho GTPase,

		Nicotin Acetylcholin Rezeptor Signalweg
Myosin-2	Q9UKX2	Inflammation, Wnt-Signalweg, Cytoskelet-Regulation durch Rho GTPase, Nicotin Acetylcholin Rezeptor Signalweg
Myosin-4	Q9Y623	Inflammation, Wnt-Signalweg, Cytoskelet-Regulation durch Rho GTPase, Nicotin Acetylcholin Rezeptor Signalweg
Myosin-8	P13535	Inflammation, Wnt-Signalweg, Cytoskelet-Regulation durch Rho GTPase, Nicotin Acetylcholin Rezeptor Signalweg
Voltage-dependent T-type Ca ²⁺ -channel α 1H	O95180	Neurotransmitter-Sekretion, synaptische Transmission, Zell-Zell-Kommunikation
Myb-binding protein 1A	Q9BQG0	Transkriptionsfaktor, Zellzyklus
NASP	P49321	intrazellulärer Proteintransport, Zellzyklus
Moesin	P26038	Zell-Zellkommunikation
KAP1	Q13263	Co-Transkriptionsfaktor, Zellzyklus
DNA-binding protein A	P16989	Transkription-regulierender Faktor
PABP3	Q9H361	mRNA-prozessierender Faktor, beteiligt an Entwicklung von Ektoderm und Nervensystem
MUM1-like protein 1	Q5H9M0	Mutationen werden mit verschiedenen Tumoren assoziiert
EH domain-containing protein 2	Q9NZN4	Endocytose, Neurotransmitter-Sekretion, Zell-Zell-Kommunikation
GTP-binding nuclear protein RAN	P62826	Zellzyklus, intrazellulärer Transport, Signaltransduktion
PP-1B	P62140	Signaltransduktion, Mitose, Meiose, Apoptose, Sress-Antwort
Apoptosis inhibitor 5	Q9BZZ5	bewahrt Zelle vor Apoptose bei Wachstumsfaktor-Mangel
TAR DNA-binding protein 43	Q13148	Unterdrückt HIV-1 Transkription,

		Signaltransduktion, beteiligt an Entwicklung von Ektoderm und Nervensystem
PON3	Q15166	schützt vor Arteriosklerose und <i>P. aeruginosa</i> Infektionen, in vielen Tumoren gesteigerte Expression, schützt vor Behandlung mit Chemotherapeutika
Pre-mRNA –splicing factor SF2	Q07955	Pre-mRNA-Splicing
Microsomal GST-3	O14880	beteiligt an Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	P55036	Zellzyklus, Ubiquitin-Proteosom-Signalweg
Minor capsid protein L2	P27234	Papillomavirus
Ubiquitin	P62988	ATP-abhängige, non-lysosomale, intrazelluläre Proteindegradation, Alzheimer, Down-Syndrom
60S ribosomal protein L22	P35268	Ribosomales Protein, bindet spezifisch an Epstein-Barr Virus kodierende RNA
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Q93008	Inhibierung des Proteins führt zum Absterben von CML-Zellen, Turner-Syndrom
AUF-1	Q14103	RNA-bindendes Protein, mRNA-Stabilität

Des Weiteren wurden in beiden massenspektrometrischen Analysen eine Vielzahl von hnRNPs und Histonen, die hier nicht weiter aufgeführt wurden, identifiziert. Ebenso wurden viele Proteine gefunden, welche primär RNA statt DNA binden, aufgrund der inhärenten Affinität zu Nukleinsäuren jedoch in diesem Ansatz ebenfalls präzipitieren.

4.2 Bioinformatische Methoden - *in silico*-Analyse der PON2-Promoter-Sequenz

In ersten massenspektrometrischen Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.1) wurden bereits eine Vielzahl PON2-Promoter-bindender Proteine identifiziert, von denen einige experimentell untersucht wurden (dies betrifft mehr Proteine als im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und genannt worden sind). In einem zweiten Versuchsansatz wurden mit Hilfe einer *in silico* Analyse weitere mögliche PON2-regulierende Transkriptionsfaktoren bestimmt.

Durch eine *in silico* Untersuchung ist es möglich biochemische Prozesse am Computer nachzustellen. Im vorliegenden Fall wurde diese Form der Analyse genutzt, um mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz zu identifizieren. Dazu wurde die PON2-Promoter-Sequenz in verschiedenen Matrizen unterschiedlicher Computerprogramme geladen (siehe 3.4) und so eine Vielzahl von Transkriptionsfaktorbindungsstellen detektiert. Des Weiteren wurden konservierte Bindungsstellen charakterisiert. In Abbildung 3 sind Transkriptionsfaktoren aufgelistet, die durch drei verschiedene Computerprogramme vorhergesagt wurden und zumindest *in silico* an die PON2-Promoter-Sequenz binden würden.

Zudem wurden einige Transkriptionsfaktoren von zwei verschiedenen Computerprogrammen vorhergesagt, so dass eine gewisse Übereinstimmung in den Vorhersagen abzuleiten war. In nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, wie einige dieser Transkriptionsfaktoren die Regulation und Expression des PON2-Proteins beeinflussen.

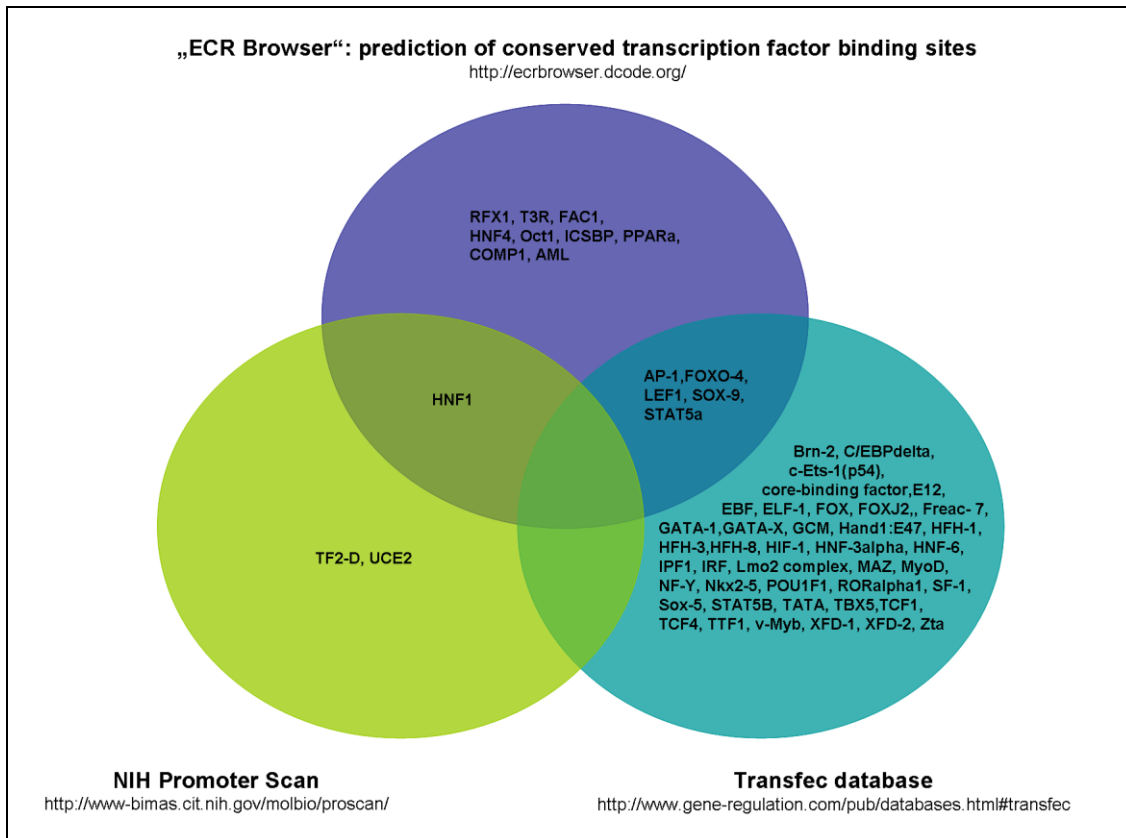


Abbildung 3: *In silico*-Analyse PON2-Promoter-bindender Proteine. Die PON2-Promoter-Sequenz wurde anhand ihrer Sequenz auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit Hilfe von drei verschiedenen Softwares / Algorithmen analysiert. Dargestellt sind die von den Programmen vorhergesagten Transkriptionsfaktoren. Zudem wurden z. T. dieselben Transkriptionsfaktoren von zwei verschiedenen Programmen prognostiziert (angegeben in den Schnittmengen der jeweiligen Kreise).

4.3 Identifizierung PON2-regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor knock-down Analyse

Witte et al. zeigten, dass die PON2-Expression in verschiedenen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe gesteigert ist, insbesondere in Leukämien⁶¹. Zudem gibt es aus der Literatur Hinweise, wonach die PON2-Expression in Bcr / Abl-positiven und akut lymphatischen Leukämien (ALL) stark erhöht ist⁷⁵. Eine andere Studie zeigte, dass PON2 bei pädiatrischen ALL-Patienten überexprimiert wird und mit einer schlechten Prognose auch bezüglich des Therapieerfolges assoziiert ist⁷⁶. Ähnliches gilt für die chronisch myeloische Leukämie (CML) mit Bcr / Abl-Expression („Philadelphia-Chromosom“), welche mit Imatinib (Glivec®) behandelt werden kann. Ein häufig auftretendes Problem stellt jedoch die Resistenz gegen das Chemotherapeutikum dar, dies scheint ebenso mit der PON2-Expression zu korrelieren⁷⁷. In einem dritten Versuchsansatz wurde daher verstärkt nach Transkriptionsfaktoren gesucht, die mit der Hämatopoese und Leukämien assoziiert sind. Dazu wurden in K562-Zellen, einer humanen Bcr / Abl-positiven chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie, mehr als 70 relevante Transkriptionsfaktoren in einer Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse mit Hilfe spezifischer siRNAs einzeln herunterreguliert (siehe 3.2.12). Nach drei Tagen wurde die Gesamtzell-RNA der jeweiligen Proben isoliert und die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analyse (siehe 3.2.11) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

Positive Regulatoren der PON2-mRNA-Expression sind jene Transkriptionsfaktoren, welche nach dem jeweiligen *knock-down* zu einer negativen PON2-mRNA-Expression führten. Im Gegensatz dazu führte der siRNA-vermittelte *knock-down* negativer Regulatoren der PON2-mRNA folglich zu einer positiven PON2-mRNA-Expression.

Die graphische Darstellung zeigt, dass eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren positive Regulatoren der PON2-mRNA-Expression sind, wohingegen nur wenige Transkriptionsfaktoren die PON2-mRNA-Expression negativ beeinflussen. Besonders stark scheint die PON2-mRNA-Expression in der Leukämiezelllinie K562 durch die positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren TBX21, VDR, Mitglieder der STAT-Proteinfamilie (STAT1, 3, 5A, 5B), PAX3, KLF5 und GATA3 beeinflusst zu werden. Des Weiteren wird die PON2-mRNA-Expression durch Mitglieder der LEF-1 / TCF-Familie bestimmt. Dabei fällt auf, dass LEF-1 als positiver Regulator und TCF4 (Synonym TCF7L2) als negativer Regulator der PON2-Expression fungieren. Die Mitglieder dieser Familie wurden zudem in der computerbasierenden *in silico* Analyse als mögliche Bindeproteine (Transkriptionsfaktoren) des PON2-Promoters vorhergesagt. In Abschnitt 4.8.3 wird der Effekt der Transkriptionsfaktoren LEF-1, TCF1 und TCF4 auf die PON2-Expression detailliert untersucht.

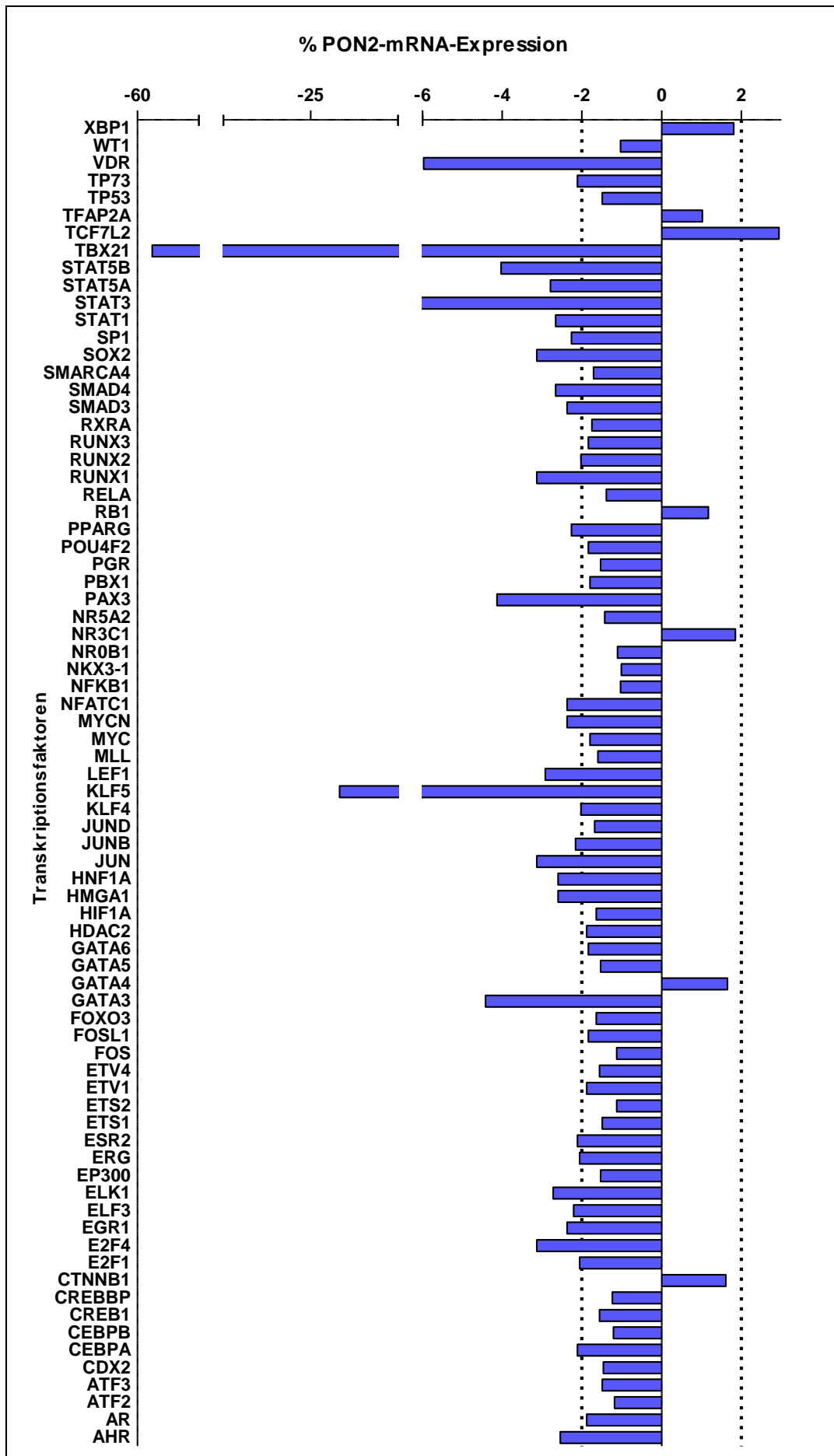


Abbildung 4: Bestimmung PON2 regulierender Transkriptionsfaktoren mittels Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse. >70 Transkriptionsfaktoren wurden in K562-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Anschließend wurde die Expression der PON2-mRNA durch eine qRT-PCR ermittelt. Die Expressionslevel von PON2 wurden gegen jene von GAPDH, mATPSy6 und DNA-Polymerase 2a derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Dargestellt ist ein Experiment.

4.4 Annexin A2 hat keinen Effekt auf die Regulation der PON2-Expression

In der vorangegangenen Diplomarbeit (J. Amort; FB Biologie, Universität Mainz; August 2008) innerhalb der Arbeitsgruppe wurde bereits Annexin A2, nicht jedoch Vimentin, als PON2-Promoter-bindendes Protein charakterisiert. Annexin A2 ist ein Protein, das an Zellwachstum und Signaltransduktionen innerhalb der Zelle beteiligt ist. Theoretisch zeigt Annexin A2 folgende zwei Bezüge zu PON2 auf: Annexin A2 dient als spezifischer Rezeptor für das Bakterium *P. aeruginosa*¹⁰¹, während PON2 in der Lage ist, den durch das Bakterium gebildeten Virulenzfaktor 3OC12 zu hydrolysieren; somit spielt PON2 in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle als Schutzmechanismus gegen eine *P. aeruginosa*-Infektion^{14, 15, 44}. Des Weiteren fungiert Annexin A2 als Rezeptor für den Urokinase-Plasminogen-Aktivator uPA¹⁰², welches in Makrophagen die PON2-Expression steigert⁸¹. Aus diesen Gründen wurde der Effekt von Annexin A2 auf die PON2-Expression untersucht.

Die Befunde aus der vorangegangenen Diplomarbeit belegten, dass Annexin A2 im Bereich -165 bis -404 vor dem Transkriptionsstartpunkt an die PON2-Promoter-Sequenz bindet. Des Weiteren wurde der Einfluss des Proteins Annexin A2 auf die PON2-Expression mit Hilfe von siRNA-Experimenten untersucht. Dazu wurden EA.hy 926-Zellen zunächst mit einer spezifischen Annexin A2-siRNA behandelt. Anschließend wurde die PON2-Promoter-Aktivität, PON2-mRNA und PON2-Proteinexpression untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass der *knock-down* von Annexin A2 weder einen Einfluss auf die Aktivität des PON2-Promoters, noch auf die PON2-mRNA-Expression oder die PON2-Proteinexpression hat. Auch ein uPA-vermittelter Effekt auf die PON2-Promoter-Aktivität und Proteinexpression wurde in EA.hy 926-Zellen ausgeschlossen. Folglich reguliert Annexin A2 nicht die PON2 Expression, zumindest nicht in endothelialen Zellen.

4.5 Das mRNA-bindende Protein AUF-1 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt

Das Protein AUF-1 wurde in den o.g. MS-Analysen als Bindeprotein identifiziert, wird ubiquitär exprimiert und ist an Prozessen wie pre-mRNA-*Splicing* und mRNA-Bindung beteiligt¹⁰³. Obwohl AUF-1 als hnRNP hauptsächlich mit RNAs wechselwirkt, wurde dies im

Hinblick auf eine potentielle Regulation der PON2-Expression in die Analysen eingeschlossen, da bisher noch kein mRNA-regulierender Faktor bekannt war. Mittels qRT-PCR (siehe 3.2.11) wurde für diese Analysen die PON2-mRNA-Expression bestimmt in DLD-1-Zellen, die entweder die AUF-1-Isoformen p37, p40, p42 oder p45 überexprimierten. Als Kontrolle dienten GFP-überexprimierende DLD-1-Zellen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt und belegen, dass keine der vier verschiedenen überexprimierenden AUF-1-Isoformen einen Effekt auf die PON2-mRNA-Expression hatte.

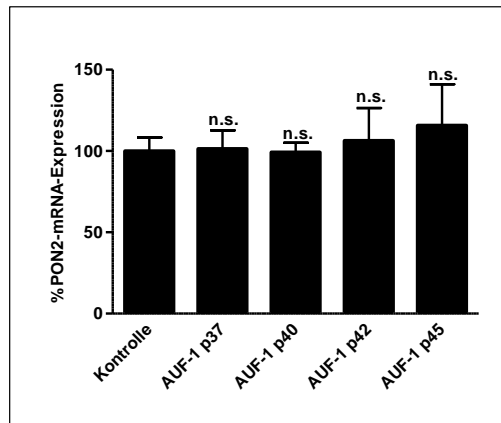


Abbildung 5: Das RNA-bindende Protein AUF-1 hat keinen Einfluss auf die PON2-mRNA-Expression. Es wurde Gesamtzell-RNA aus vier AUF-1-überexprimierenden DLD-1-Zelllinien und einer DLD-1-Zelllinie, die GFP überexprimiert (Kontrolle), isoliert. Anschließend wurde die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel wurden nach Normalisierung gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*).

Nachfolgend wurde untersucht, wie sich ein *knock-down* aller vier Isoformen auf die PON2-Expression auswirkt. Dazu wurden DLD-1-Zellen mit einer Kontroll-siRNA oder einer AUF-1-siRNA behandelt, die sich spezifisch gegen alle vier AUF-1-Isoformen richtete. Nach zwei Tagen wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Der erfolgreiche *knock-down* aller AUF-1-Isoformen wurde durch eine Western Blot-Analyse gegen GAPDH bestätigt. Abbildung 6 zeigt, dass auch ein Fehlen des AUF-1-Proteins keine Änderung der PON2-mRNA-Level bewirkte, so dass AUF-1 vermutlich nicht als PON2-regulierender Faktor fungiert.

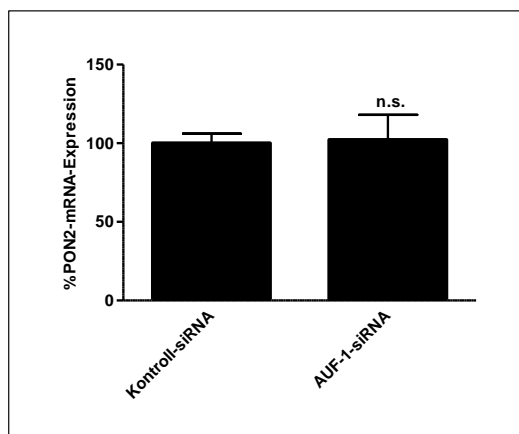


Abbildung 6: Ein *knock-down* aller Isoformen des RNA-bindenden Proteins AUF-1 ändert nicht die PON2-mRNA-Expression. DLD-1-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer AUF-1-siRNA, die sich spezifisch gegen alle vier AUF-1-Isoformen richtet, behandelt und nach zwei Tagen lysiert. Anschließend wurde die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionslevel wurden nach Normalisierung gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*).

4.6 Hypoxie und der durch Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 α steigern nicht die Expression des PON2-Proteins

In den nachfolgenden Versuchen wurde der Effekt des durch die *in silico* Analyse gefundenen Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α) auf die PON2-Expression untersucht. HIF-1 α vermittelt bei Sauerstoffmangel die Glukoseaufnahme, das Zellwachstum und die Apoptose und ist somit ein wesentlicher Bestandteil im Sauerstoffsignalweg der Zelle. Es gibt jedoch Hinweise aus der Literatur, wonach HIF-1 α als positiver Regulator im Tumorwachstum beschrieben wird⁶⁹. Die Hemmung von HIF-1 α führt zur Unterdrückung des Tumorwachstums. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass in einer Vielzahl von Tumoren die HIF-1 α -Expression gesteigert ist und dies gleichzeitig mit einer schlechten Prognose assoziiert ist⁶⁸. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α fördert nicht nur die Angiogenese und das Wachstum, sondern auch die Metastasierung und Differenzierung des Tumors⁶⁹. Eine HIF-1 α -stimulierte PON2-Expression könnte den Tumor vor zuviel ROS und pro-apoptotischer Stimulation schützen und sich auf die Angiogenese auswirken, welche ebenfalls durch PON2 moduliert wird (Horke; unveröffentlicht).

Um den Effekt des Transkriptionsfaktors HIF-1 α auf die PON2-Expression zu analysieren wurden EA.hy 926- und A549-Zellen für 4, 8, 16 oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) oder unter normalen Sauerstoffbedingungen (20% O₂; Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und sowohl die Gesamtzell-RNA als auch die Gesamtzellproteine isoliert. Die PON2-Expression wurde anschließend durch eine qRT-PCR (Abbildung 7 A und B) oder eine Western Blot-Analyse (Abbildung 8 A und B) bestimmt.

Abbildung 7 A und B zeigen, dass sich die PON2-mRNA-Expression in beiden Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle auch nach 24 Stunden nicht ändert.

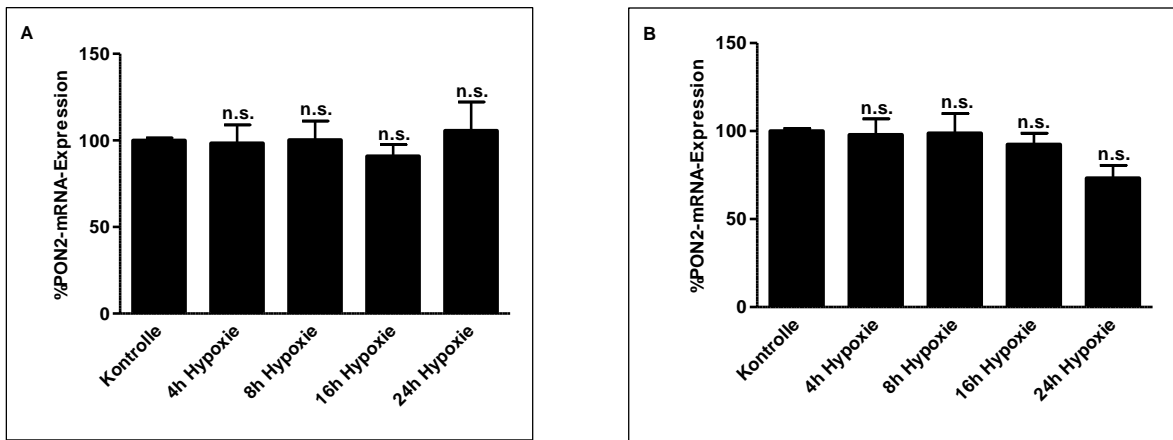


Abbildung 7: Hypoxie steigert nicht die Expression der PON2-mRNA. EA.hy 926-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden 4, 8, 16 oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) oder normalen Sauerstoffbedingungen (20% O₂; Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurde die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (n.s.: p>0,05 vs. Kontrolle; One-way-ANOVA).

Auch auf Proteinebene ist in beiden Zelllinien keine Veränderung der PON2-Expression feststellbar (Abbildung 8 A und B). Allerdings konnte in beiden Zelllinien bereits nach vier Stunden eine gesteigerte HIF-1α-Proteinexpression nachgewiesen werden, die im Verlauf des Versuches immer weiter abnahm.

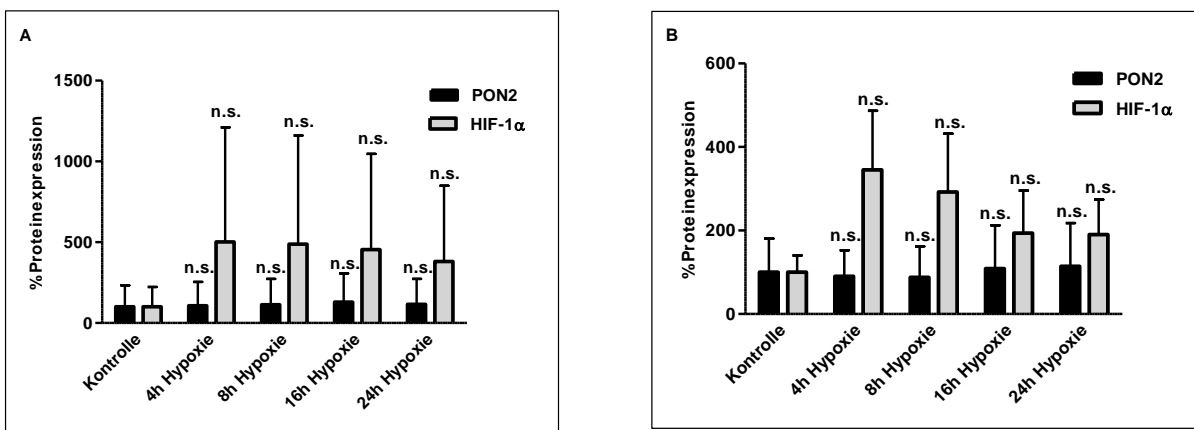


Abbildung 8: Weder Hypoxie noch der durch Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1α steigern die PON2-Proteinexpression. EA.hy 926-Zellen (A) oder A549-Zellen (B) wurden 4, 8, 16 oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) oder normalen Sauerstoffbedingungen (20% O₂; Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurde die PON2- und HIF-1α-Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die Expressionslevel wurden gegen die α-Tubulin-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (n.s.: p>0,05 vs. jeweilige Kontrolle; One-way-ANOVA).

4.7 Die Regulation der PON2-Expression in verschiedenen Leukämiezelllinien

Das humane Enzym PON2 besitzt neben seiner Schutzfunktion vor Arteriosklerose einen anti-apoptotischen Effekt; nach derzeitigem Stand der Forschung basieren beide Effekte auf der anti-oxidativen Wirkung von PON2^{23, 61}. Zudem wurde eine Überexpression des PON2-Proteins in vielen Tumoren gefunden, insbesondere in Leukämien. Des Weiteren resultierte die Steigerung der PON2-Expression *in vitro* in einem Schutz vor verschiedenen Chemotherapeutika und es wurde gezeigt, dass der *knock-down* in Tumorzellen zu einer spontanen Apoptose in diesen Zellen führt⁶¹. Ergänzend dazu zeigten Microarray-Daten eine gesteigerte PON2-Expression in Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML)⁷⁷. Zudem ist PON2 mit einer Imatinib-Resistenz bei diesen Patienten assoziiert⁷⁷. Um die Rolle von PON2 in Leukämien besser zu verstehen, wurde untersucht, ob verschiedene in Leukämien deregulierte Signalwege die PON2-Expression beeinflussen.

4.7.1 Die Tyrosinkinase Bcr / Abl hat keinen Effekt auf die Regulation der PON2-Expression

Bei 90% der CML-, 30-25% der ALL- und 5% der AML-Patienten findet sich das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“, welches aus der chromosomalen Translokation t(9;22)(q34;q11) hervorgeht und unter anderem zur Fusion der *bcr* und *abl* Gene führt¹⁰⁴. Hieraus entsteht das Bcr / Abl Fusionsprotein, welches eine dauer-aktive Rezeptor-Tyrosin-Kinase und Grundlage der malignen Transformation ist. Diese Kinase ist das molekulare Ziel des Wirkstoffs Imatinib. Aufgrund der Assoziation von PON2 mit diesen Leukämieformen^{75, 77} ist es daher möglich, dass die Bcr / Abl-Kinase indirekt die PON2-Expression moduliert.

In einer Kooperation mit Prof. T. Cotter (Biosciences Institute University College Cork, Irland) wurde untersucht, wie sich das „Philadelphia-Chromosom“ auf die PON2-Expression auswirkt. Die in jenem Labor etablierten murinen TonB-Zellen besitzen ein integriertes Bcr / Abl-Fusionsplasmid, das bei der Zugabe von Doxorubicin ins Medium zu einer Bcr / Abl-Expression in diesen Zellen führt. Abbildung 9 zeigt, dass unbehandelte TonB-Zellen keine Bcr / Abl-Expression aufweisen. Werden die Zellen jedoch für 48 Stunden mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin (1 µg/µl) behandelt, wird das Fusionsprotein Bcr / Abl in den Zellen exprimiert. Die endogene Abl-Expression (c-Abl) verändert sich dabei nicht. Anschließend wurde die PON2-Expression in unbehandelten und Doxorubicin behandelten TonB-Zellen analysiert. Wie im Western Blot zu erkennen ist, zeigte sich keine Bcr / Abl-induzierte Änderung der PON2-Expression.

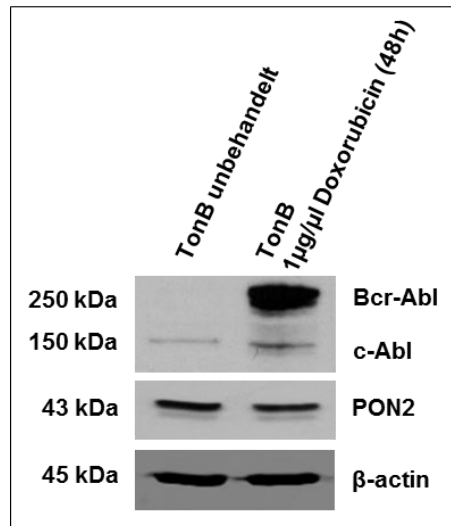


Abbildung 9: Die Bcr / Abl-Expression hat keinen Einfluss auf die PON2-Proteinexpression. Murine, transgene TonB-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 48h mit 1 µg/ml Doxorubicin behandelt. Anschließend wurden Lysate mittels Western Blot analysiert. Doxorubicin induziert die Bcr / Abl-Expression, verändert jedoch nicht die endogene c-Abl- und PON2-Proteinexpression in murinen TonB-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.7.2 Die Tyrosinkinase Flt3 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt

Bei ca. 30% der AML-Patienten ist eine Mutation des *FMS-like* Tyrosinkinase 3 (Flt3) Gens zu beobachten, was zusätzlich mit einer schlechten Prognose verbunden ist ¹⁰⁵. Flt3 ist ein Mitglied der Klasse 3 Rezeptor-Tyrosinkinase Familie und wird in hämatopoetischen Progenitorzellen (Vorläuferzellen) exprimiert ¹⁰⁶.

Der Effekt des Flt3-Gens auf die PON2-Proteinexpression wurden ebenfalls in Kooperation mit Prof. T. Cotter in den murinen Il-3-abhängigen myeloischen Zelllinien 32D Flt3-WT (ohne Flt3-Mutation) und 32D Flt3-ITD (mit einer internen Tandem-Duplikation des Flt3-Gens) untersucht. Zum Vergleich wurde die PON2-Proteinexpression in der Leber und in der murinen Monocyten-Makrophagen-Leukämiezelllinie RAW analysiert. Von allen Zellen wurden SDS-Lysate angefertigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, ändert die Mutation des Flt3-Gens nicht die PON2-Expression in 32D-Zellen. Erwartungsgemäß zeigen Monozyten und insbesondere Leberextrakte eine prominente PON2-Expression.

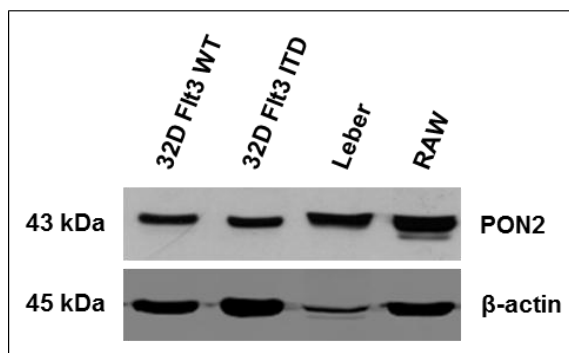


Abbildung 10: Die Tandem-Duplikation des Flt3-Gens führt nicht zur Steigerung der PON2-Expression. Es wurden Proteingeesamtzelllysate von 32D-Wiltyzellen (WT), 32D-Zellen mit einer internen Flt3-Tandemduplikation (ITD), murinen Leberzellen und Monozyten (RAW) angefertigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die PON2-Proteinexpression im Western Blot bestimmt. Die interne Tandem-Duplikation des Flt3-Gens ändert nicht die Expression des PON2-Proteins. Erwartungsgemäß ist die PON2-Expression in Leberzellen und Monozyten hoch. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.7.3 Die Expression von PON2 in verschiedenen AML-Zelllinien

In diesem Abschnitt wurde die PON2-Expression in humanen AML-Zelllinien untersucht (Abbildung 11). Für diesen Versuch wurden Proteinzelllysate der AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13, HL-60 und THP-1 angefertigt. Aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Adenokarzinomzelllinie A549 PON2 sehr stark exprimiert und dass ein *knock-down* des Proteins eine spontane Apoptose in diesen Zellen auslöste⁶¹. Proteinzelllysate dieser Zelllinie wurden zum Vergleich analysiert. In keiner der untersuchten AML-Zelllinien wurde eine ähnlich starke Expression des PON2-Proteins wie in A549-Zellen gefunden. Im Gegensatz zu MV4-11- und Molm-13-Zellen scheinen THP-1-Zellen eventuell etwas mehr PON2 zu exprimieren, dagegen exprimieren HL-60-Zellen fast gar kein endogenes PON2. Um die PON2-Expression der Zelllinien quantitativ zu analysieren, müssten sie jedoch gegen eine physiologische Blutprobe verglichen werden.

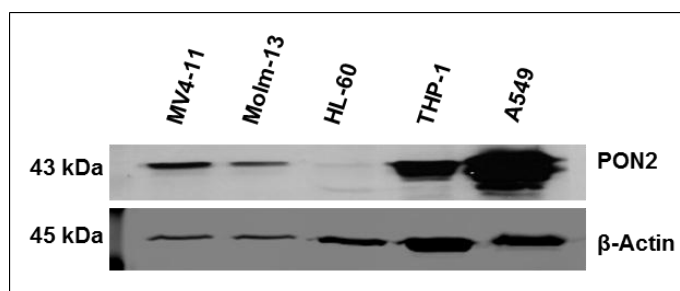


Abbildung 11: PON2-Proteinexpression in humanen AML- und Adenokarzinomzelllinien. Gezeigt ist die PON2-Proteinexpression in den humanen AML-Zelllinien MV4-11, Molm-13, HL-60 und THP-1 und der humanen Adenokarzinomzelllinie A549. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.7.4 Imatinib-restistente Leukämiezelllinien weisen eine gesteigerte PON2-Expression auf

Aufgrund der oben beschriebenen Rolle von PON2 im Hinblick auf Leukämien und Imatinib-Resistenz wurde überprüft, ob die PON2-Expression in leukämischen Zelllinien mit einer Imatinib-Empfindlichkeit negativ korrelierte. Hierzu wurde in Imatinib-sensitiven und -resistenten Leukämie-Zelllinien die endogene PON2-Expression bestimmt. Dazu wurden Gesamtzell-RNA-Lysate der humanen CML-Zelllinien Lama-S, Lama-R, KCL-S und KCL-R angefertigt. Ein „S“ impliziert, dass die betreffende Zelllinie sensitiv gegen die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Imatinib ist, wohingegen „R“ eine erhebliche Resistenz gegen das Chemotherapeutikum anzeigt. Die PON2-mRNA-Expression wurde durch eine qRT-PCR-Analyse bestimmt und die PON2-mRNA-Expression der jeweiligen sensitiven Zelllinie als Normalwert angenommen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Es fällt auf, dass die PON2-mRNA-Expression in beiden Imatinib-resistenten CML-Zelllinien massiv gesteigert ist. Lama-R-Zellen weisen eine ~4fache und KCL-R-Zellen sogar eine 7-fache Steigerung der PON2-mRNA-Expression auf.

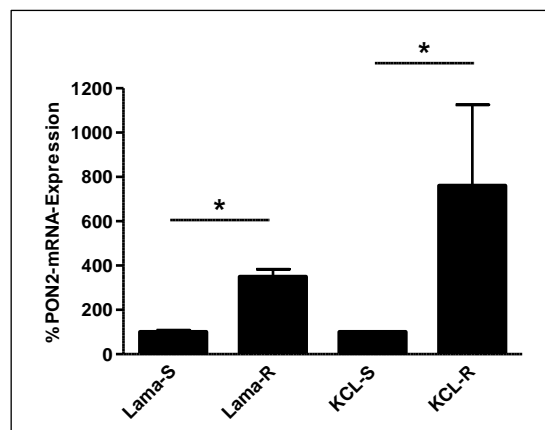


Abbildung 12: Die PON2-mRNA-Expression ist in Imatinib-resistenten CML-Zelllinien stark gesteigert. Es wurden Gesamtzell-RNA-Lysate von Lama-S, Lama-R, KCL-S und KCL-R-Zellen angefertigt und anschließend die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (*:<0,05; One-way-ANOVA).

4.8 Die Regulation der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562

4.8.1 Die PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 wird weder durch Imatinib noch ERK induziert

Aus der Literatur ist bekannt, dass PON2 mit einer Imatinib-Resistenz bei CML-Patienten assoziiert ist ⁷⁷. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.4, dass die PON2-

Expression in Imatinib-resistenten Leukämiezelllinien gesteigert ist. Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob die Behandlung mit Imatinib in nicht für die Zelle apoptotischen Konzentrationen zu einer gesteigerten PON2-Expression führt und die Zellen sich so vor dem Chemotherapeutikum schützen können. Vorarbeiten ergaben, dass die CML-Zelllinie K562 Imatinib bis zu einer Konzentration von 0,3 μM für wenige Tage toleriert, wohingegen 0,5 – 1 μM eine bereits nach 24h letale Konzentration darstellte. Deshalb wurden K562-Zellen unbehandelt belassen oder für ein bis drei Tage mit 0,3 μM Imatinib behandelt, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. Im Anschluss daran wurde die PON2-Proteinexpression durch eine Western Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 13). Am zweiten und dritten Tag der Behandlung ist die PON2-Proteinexpression zwar leicht reduziert, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant.

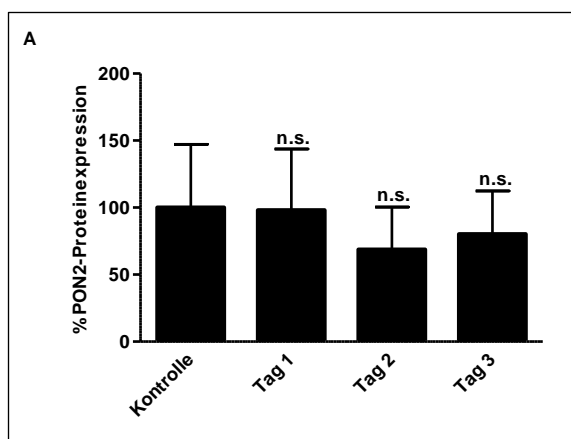


Abbildung 13: Imatinib besitzt keinen direkten Effekt auf die PON2-Expression. K562-Zellen wurden mit 0,3 μM Imatinib behandelt oder blieben unbehandelt. Nach 1 – 3 Tagen wurden die Zellen lysiert, die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die Expressionslevel wurden gegen die α -Tubulin-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von fünf unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *Two-way*-ANOVA).

Zudem wurde der Effekt der *extracellular-regulated-kinase* ERK auf die PON2-Expression untersucht (Abbildung 14). Mehrere Studien zeigten, dass eine gesteigerte ERK-Expression in ungefähr 30% aller Krebsarten vorliegt¹⁰⁷. Des Weiteren gibt es Hinweise wonach eine erhöhte Expression von ERK mit einer Imatinib-Resistenz in Verbindung gebracht wurde¹⁰⁸. Ferner wurde eine uPA-induzierte Steigerung der PON2-Expression in Makrophagen durch die Kinase ERK vermittelt⁸¹.

Um den Effekt von ERK auf die PON2-Expression in K562-Zellen zu analysieren, wurden die Zellen für drei Tage mit 10 μM ERK-Inhibitor PD 98059 behandelt. Dabei wurde der Inhibitor jeden Tag in frischem Vollmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die PON2-Expression im Western Blot analysiert (Abbildung 14). Die graphische Zusammenfassung von mehreren Experimenten zeigt, dass die PON2-Proteinexpression an allen drei Tagen der Behandlung unverändert bleibt.

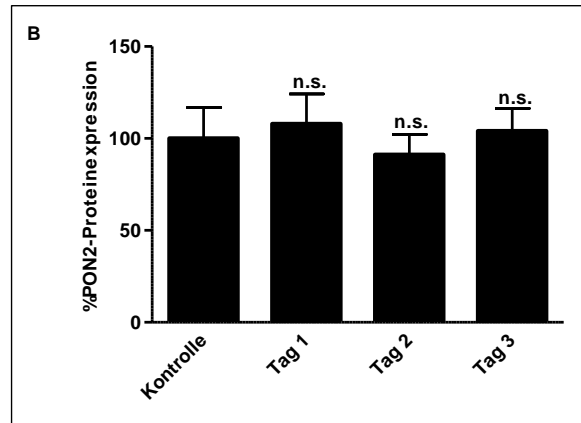


Abbildung 14: Die Kinase ERK hat keinen Effekt auf die Regulation der Expression des PON2-Proteins. K562-Zellen wurden 10 μ M ERK-Inhibitor PD 98059 behandelt oder blieben unbehandelt. Nach 1 – 3 Tagen wurden die Zellen lysiert, die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die Expressionslevel wurden gegen die α -Tubulin-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von 13 unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *Two-way-ANOVA*).

Ergänzend wurde eine Doppelbehandlung mit Imatinib und dem ERK-Inhibitor PD 98059 durchgeführt. Dazu wurden K562-Zellen für drei Tage mit 0,3 μ M Imatinib und 10 μ M ERK-Inhibitor behandelt. Das Chemotherapeutikum und der Inhibitor wurden jeden Tag in frischem Vollmedium angesetzt und auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression durch eine Western Blot-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Auch eine Doppelbehandlung mit Imatinib und dem ERK-Inhibitor PD 98059 beeinflussten die PON2-Proteinexpression nicht. Zwar ist eine Zunahme der PON2-Proteinexpression am dritten Tag zu verzeichnen, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant.

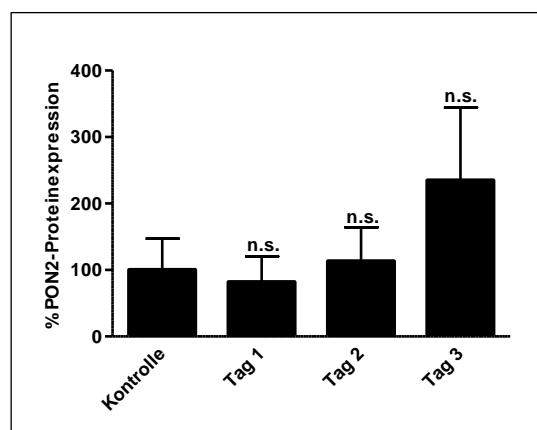


Abbildung 15: Die gleichzeitige Behandlung mit Imatinib und dem ERK-Inhibitor PD 98059 hat keinen Effekt auf die PON2-Proteinexpression. K562-Zellen wurden für drei Tage mit 0,3 μ M Imatinib und 10 μ M ERK-Inhibitor (PD 98059) behandelt. Anschließend wurde die Expression des PON2-Proteins mittels Western Blot analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die α -Tubulin-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *Two-way-ANOVA*).

4.8.2 GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562

Sowohl die Ergebnisse der *in silico*-Analyse (siehe 4.2) als auch die des Transkriptionsfaktor *knock-down* Experiments (siehe 4.3) implizierten eine Regulation der PON2-Expression durch die Transkriptionsfaktoren der LEF-1 / TCF-Familie. Die *knock-down* Analyse zeigte an, dass LEF-1 die PON2-mRNA-Expression positiv reguliert, wohingegen TCF4 diese negativ beeinflusst. Des Weiteren wurden mit Hilfe der *in silico*-Analysen (siehe 4.2) mehrere potentielle LEF-1-Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz identifiziert.

Die Familie der Transkriptionsfaktoren LEF-1 / TCF sind im Wnt / β -Catenin Signalweg involviert ¹⁰⁹. Mutationen in Faktoren dieses Signalweges werden oft in verschiedenen Krebsarten gefunden ¹⁰⁹. So führen Mutationen, die den Wnt / β -Catenin Signalweg aktivieren, zu einer Inhibition der Kinase GSK-3 β und dadurch zu einer Stabilisierung von β -Catenin. Dies führt dazu, dass β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und in den Kern transloziert, was wiederum zu einer verstärkten Transkription verschiedener Gene führt. Des Weiteren ist bekannt, dass die PON2-Expression in vielen Tumorarten gesteigert ist ⁶¹. In den nachfolgenden Experimenten sollte deshalb die Rolle der LEF-1 / TCF-Familie in der Regulation der PON2-Expression untersucht werden.

In einem ersten Experiment wurde analysiert, ob eine Hemmung der Kinase GSK-3 β zu einer Steigerung der PON2-Expression führt. Dazu wurden K562-Zellen für 16, 24 und 48 Stunden mit dem GSK-3 β -Inhibitor Valproinsäure (1 mM) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Der Inhibitor wurde dabei täglich erneuert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Gesamtzell-RNA extrahiert und die PON2-mRNA-Expression durch eine qRT-PCR bestimmt. Die Behandlung mit Valproinsäure führte bereits nach 48 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der PON2-mRNA-Expression (Abbildung 16 A). Nach analogem Protokoll wurde anschließend der Effekt von Valproinsäure auf die PON2-Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. In Abbildung 16 B ist die PON2-Proteinexpression graphisch dargestellt und zeigt nach drei Tagen eine Verdoppelung der PON2-Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle).

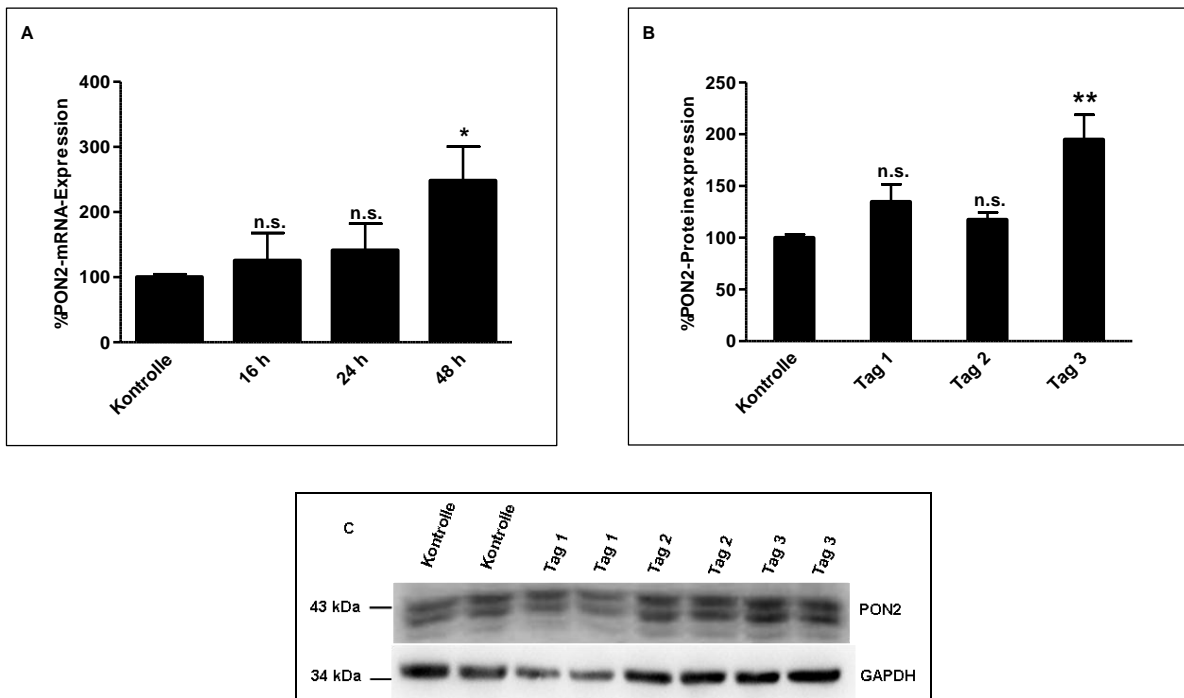


Abbildung 16: Die durch Valproinsäure vermittelte Inhibierung von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Expression. A) K562-Zellen wurden mit Valproinsäure (1 mM) für 16, 24 und 48 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *Two-way-ANOVA*); B) K562-Zellen wurden mit Valproinsäure (1 mM) für 1 bis 3 Tage behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression durch eine Western Blot-Analyse analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. (**: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *Two-way-ANOVA*); C) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot.

Ein wesentlicher Nachteil des GSK-3 β -Inhibitors Valproinsäure ist, dass dieser eher unspezifisch ist und nicht nur eine Hemmung der Kinase GSK-3 β bewirkt, sondern weitere zelluläre Signalwege moduliert. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen der als spezifisch geltende GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 verwendet.

Um zunächst eine Stimulation des Wnt-Signalweges bzw. der LEF-1 Aktivität durch SB216763 zu verifizieren, wurden K562-Zellen in einem Vorversuch mit einem LEF-1-Reporter-Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für ein *firefly*-Luziferase Gen unter der Kontrolle eines LEF-1 Minimal-Promoters. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 oder 24 Stunden mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die *firefly*-Luziferase Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt (Abbildung 17).

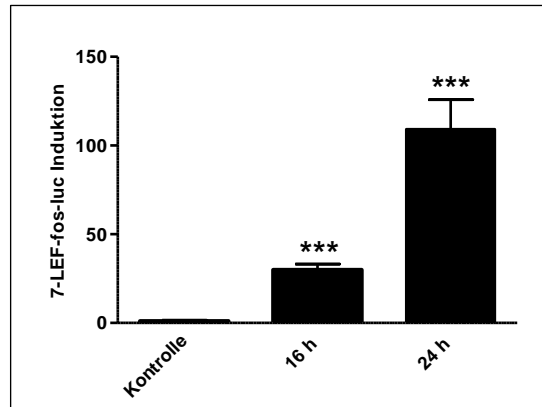


Abbildung 17: Die durch SB 216763 hervorgerufene Inhibition von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der LEF-1-Induktion. K562-Zellen wurden mit dem 7-LEF-fos-luc Reporterplasmid transient transfiziert und für 16 oder 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die *firefly*-Luziferase Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt, normalisiert und graphisch dargestellt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (***: $p < 0,001$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*).

Bereits nach 16 Stunden zeigte sich eine ca. 20-fache Induktion der LEF-1-Aktivität durch SB216763, welche nach 24 Stunden auf das etwa 110-fache anstieg. Nachfolgend wurde untersucht, wie sich eine Hemmung von GSK-3 β auf die PON2-Promoter-Aktivität auswirkt, um eine transkriptionelle Regulation der PON2-Expression durch GSK-3 β -modulierte Signalwege zu überprüfen. Hierfür wurden K562-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, in welchen das *firefly*-Luziferase Gen unter der Kontrolle eines 7,5 kb oder 2,4 kb langen PON2-Promoter-Fragments stand. Nach vier Stunden wurden die Zellen für ein oder zwei Tage mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M; täglich frisch zugesetzt) behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt. Abbildung 18 A zeigt, dass die Hemmung von GSK-3 β zu einer transkriptionellen Stimulation des 7,5 kb langen PON2-Promoters führt. Die Aktivität steigt um das 3- (nach 24 Stunden) bzw. 12fache (nach 48 Stunden). Auch die Aktivität des kürzeren PON2-Promoter-Fragments ist signifikant erhöht, nämlich um das 4-fache nach 24 Stunden bzw. 7-fache nach 48 Stunden (Abbildung 18 B).

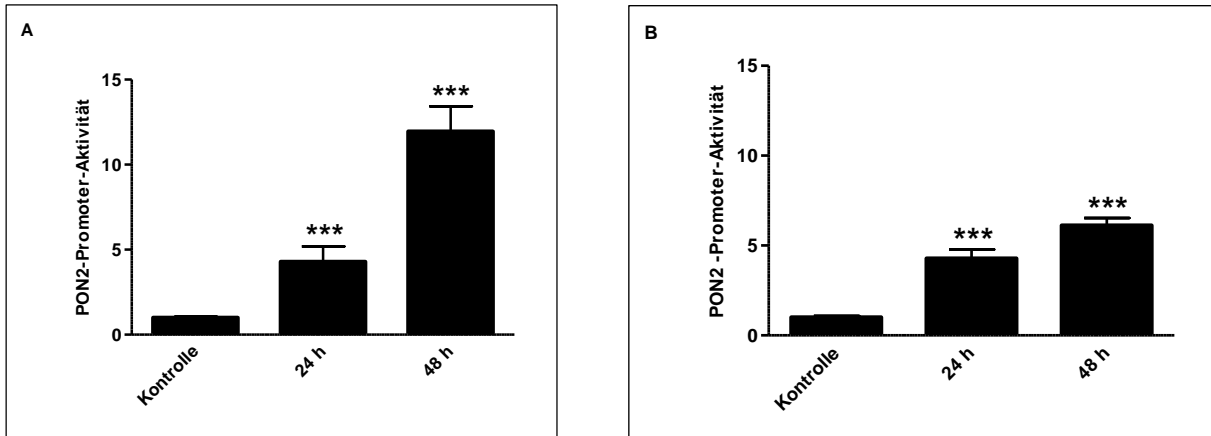


Abbildung 18: Die durch SB 216763 hervorgerufene Inhibition der Kinase GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Promoter-Aktivität. A) K562-Zellen wurden mit einem 7,5 kb langen PON2-Promoter-Fragment transfiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen für 24 und 48 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ m) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt, normalisiert und graphisch dargestellt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten. (***: $p < 0,001$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*); B) Experiment analog zu jenem in A), jedoch unter Verwendung eines 2,4 kb langen PON2 Promoter Fragmentes. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (***: $p < 0,001$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*).

Ferner wurde untersucht wie sich eine Hemmung von GSK-3 β auf die mRNA- und Proteinexpression des humanen Enzyms PON2 in der CML-Zelllinie K562 auswirkt. Für die Untersuchung der PON2-mRNA-Expression nach GSK-3 β -Inhibition wurden K562-Zellen für 16 und 24 Stunden mit 25 μ M GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die PON2-mRNA-Expression durch eine qRT-PCR analysiert. Die in Abbildung 19 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die PON2-mRNA-Expression bereits nach 24 Stunden signifikant auf das 2-fache der endogenen PON2-mRNA-Expression stieg. Für die Untersuchung der PON2-Proteinexpression wurden K562-Zellen für ein bis drei Tage mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M; täglich frisch zugesetzt) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die PON2-Proteinlevel wurden anschließend mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 19 B). Nach drei Tagen zeigte sich eine 2,5-fache Steigerung der PON2-Proteinmenge in K562-Zellen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Hemmung von GSK-3 β zu einer Steigerung der Aktivität des PON2-Promoters, der PON2-mRNA- und PON2-Proteinexpression führt.

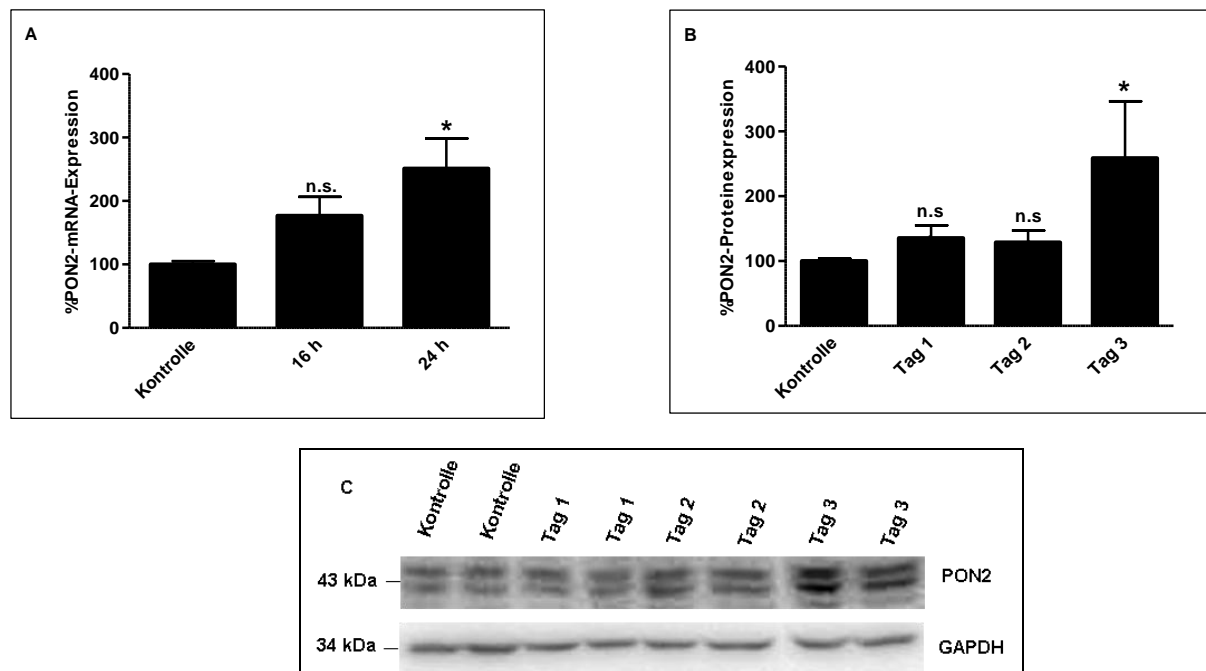


Abbildung 19: Die durch SB 216763 vermittelte Inhibition von GSK-3 β führt zu einer Steigerung der PON2-Expression. A) K562-Zellen wurden für 16 und 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 behandelt (25 μ M) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die PON2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*); B) K562-Zellen wurden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) für 1 bis 3 Tage behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression durch eine Western Blot-Analyse analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way-ANOVA*); C) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot.

4.8.3 Die durch GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression wird durch LEF-1, aber nicht TCF1 und TCF4 reguliert

Im vorherigen Abschnitt wurde festgestellt, dass die Inhibition der Tyrosinkinase GSK-3 β zur Steigerung der PON2-Expression führt. Um zu analysieren, welches Mitglied der LEF-1 / TCF-Familie die Transkription von PON2 vermittelt, wurden dominant negative (dn) Mutationen der Transkriptionsfaktoren LEF-1, TCF-1 und TCF-4 verwendet. Die Familie der LEF-1 / TCF-Transkriptionsfaktoren ist durch die hochkonservierte N-terminale β -Catenin-Bindungsstelle gekennzeichnet. Diese Bindungsstelle ist essentiell für deren Funktion im Wnt / β -Catenin Signalweg¹⁰⁹, denn nur durch die Bindung von β -Catenin an die LEF-1 / TCF-Transkriptionsfaktoren ist eine Aktivierung der Transkription verschiedener Gene möglich, da β -Catenin als Aktivator und nicht als eigenständiger Transkriptionsfaktor im engeren Sinne fungiert. Den dn-Mutationen fehlt eben jene N-terminale β -Catenin-Bindungsstelle, so dass diese zwar die Ziel-Promoter-DNA binden können, jedoch aufgrund der mangelnden Interaktion mit β -Catenin nicht in der Lage sind die GSK-3 β -induzierte Transkription zu initiieren.

Zunächst wurde die Funktionalität der dn-Mutationen überprüft durch Verwendung eines Reporterplasmids, welches die Aktivierung von LEF-1 dokumentiert. Hierzu wurden K562-Zellen mit einem LEF-1-Reporter-Plasmid („7-Lef-fos-luc“) transfiziert oder blieben untransfiziert (Kontrolle). Zusätzlich wurde entweder ein GFP-Plasmid, ein dnLEF-1-GFP-Plasmid oder kein weiteres Plasmid eingebracht. Nach vier Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die LEF-1-Aktivität analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 A graphisch dargestellt. Die Inhibition von GSK-3 β mit SB 216763 führte erwartungsgemäß zu einer starken Induktion der LEF-1-Aktivität. Dieses wurde durch die Expression der dnLEF-1-Mutation signifikant verringert (um ca. 90%). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontroll-Reaktion (GFP) keinen solchen Effekt. Dieses Ergebnis dokumentiert die Effektivität und Funktionalität der Expression der dnLEF1-Mutation. Im Anschluss wurde untersucht, ob die dn-Mutationen von LEF-1, TCF1 und TCF4 die GSK-3 β -induzierte Steigerung der PON2 Expression inhibieren. Dazu wurden K562-Zellen mit dem 7,5 kb-PON2-Promoter-Plasmid transfiziert und zusätzlich entweder mit Plasmiden zur Expression von GFP, dnLEF-1, dnTCF1 oder dnTCF4. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Nach weiteren 24 Stunden wurde die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt. Die in Abbildung 20 B graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen eine Steigerung der PON2-Promoter-Aktivität durch SB 216763, welche weder durch co-Expression von GFP noch von dnTCF1 verändert wurde. Im Gegensatz hierzu führte die co-Expression von dnLEF1 zu einer geringeren Induktion, wohingegen dnTCF4 diese noch steigerte. Daraus folgt, dass der Transkriptionsfaktor LEF-1 die PON2-Expression positiv beeinflusst, wohingegen der Transkriptionsfaktor TCF4 die PON2-Expression negativ reguliert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit jenem aus der Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse (siehe 4.3). TCF1 scheint ohne Funktion im Hinblick auf den untersuchten Signalweg. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression durch LEF-1 induziert wird.

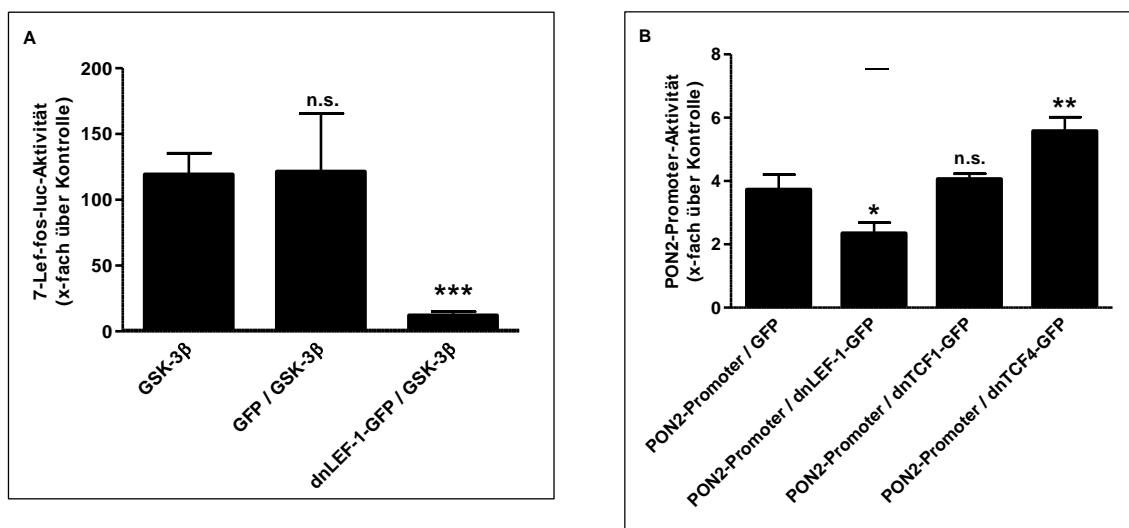


Abbildung 20: LEF-1 steigert die GSK-3 β -vermittelte PON2-Promoter-Aktivität. A) K562-Zellen wurden mit dem 7-LEF-fos-luc-Plasmid, GFP und / oder dnLEF-1-GFP-Plasmid transfiziert oder blieben untransfiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dann wurde die LEF1-Aktivität bestimmt und graphisch dargestellt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ vs. GSK-3 β ; *One-way-ANOVA*); B) K562-Zellen wurden transfiziert mit einem 7,5 kb langen PON2-Promoter-Reporter-Konstrukt und / oder Plasmiden kodierend für GFP, dnLEF-1-GFP, dnTCF1-GFP oder dnTCF4-GFP oder blieben untransfiziert (Kontrolle). Nach 4 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 behandelt (25 μ M) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt und graphisch dargestellt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; n.s.: $p > 0,05$ vs. PON2-Promoter / GFP; *One-way-ANOVA*).

4.8.4 Chromoatin-Immunopräzipitation (ChIP) zur Identifizierung von LEF-1 als PON2-Promoter-bindendes Protein

Im vorherigen Abschnitt wurde LEF-1 als ein die PON2-Expression steigernder Transkriptionsfaktor charakterisiert. Die Bindung von LEF-1 an den PON2-Promoter wurde jedoch direkt nicht gezeigt und die potentielle Bindestelle war bisher unbekannt. Um die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen Proteinen an eine bestimmte DNA-Sequenz nachzuweisen, macht man sich sogenannte ChIP-Analysen zu Nutze. Im Folgenden wurde versucht, durch eine ChIP-Analyse die Bindung von LEF-1 an die PON2-Promoter-Sequenz nachzuweisen. Dazu wurde wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben Chromatin aus K562-Zellen isoliert und entweder mit einem LEF-1-Antikörper, IgG *rabbit*-Antikörper (Negativkontrolle) oder einem NFY-Antikörper (Positivkontrolle) inkubiert und im Anschluss mit einer Protein G Behandlung angereichert. Anschließend wurden die durch die jeweiligen Antikörper angereicherten Chromatinfragmente in einer PCR analysiert. Die für die PCR verwendeten Primer schlossen dabei mehrere vorhergesagte und konservierte LEF-1-Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz ein. Durch diesen Ansatz wurde die

Bindung des Transkriptionsfaktor LEF-1 an den PON2-Promoter nicht nachgewiesen, da durch den LEF-1-Antikörper keine PON2-Promoter-Sequenzabschnitte angereichert wurden. Da es möglich war, dass der LEF-1-Antikörper nicht in der Lage war die gesuchten Sequenzabschnitte innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz zu detektieren, wurden K562-Zellen in einem weiteren Versuch zuerst 24 Stunden mit dem spezifischen GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 (25 μ M) behandelt. Das Ziel dieser Behandlung war die β -Catenin Konzentration in den Zellen zu steigern. Anschließend wurden drei Chromatinfractionen mit unterschiedlichen β -Catenin-Antikörpern (2x α -*rabbit*, 1x α -*mouse*) inkubiert, um eine Bindung von LEF-1 an die PON2-Promoter-Sequenz über β -Catenin nachzuweisen. Die anderen Chromatinfractionen wurden mit α -IgG *rabbit*, α -IgG *mouse*, α -NFY und α -LEF-1 inkubiert. Eine Fraktion wurde als Ausgangsmaterial in der Analyse verwendet. Anschließend wurden die durch die jeweiligen Antikörper angereicherten Chromatinfragmente in einer PCR analysiert. Das Ergebnis der ChIP-Analyse ist in Abbildung 21 dargestellt.

Die Primerpaare 1 bis 5 schließen hochkonservierte LEF-1-Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz ein. Als Negativkontrolle für unspezifisch co-präzipitierte DNA dienen die GAPDH- sowie SAT-Primerpaare. Das entstehende Amplifikat des in der PCR verwendeten NFY-Primerpaars (Positivkontrolle) zeigt, dass die ChIP-Analyse technisch erfolgreich durchgeführt wurde. Des Weiteren scheint sich in der PCR eine Anreicherung von Primerpaar 3 und evtl. 5 in den mit den beiden *rabbit* β -Catenin-Antikörpern (Cell Signaling und Sigma) behandelten Fraktionen zu zeigen. Jedoch weisen die Primerpaare der Negativkontrollen darauf hin, dass von der Vergleichsfraktion (mit *rabbit* IgG-Antikörper behandelt) etwas weniger Material in die PCR eingesetzt wurde, im Gegensatz zu den mit den *rabbit* β -Catenin-Antikörpern behandelten Fraktionen. Deshalb ist davon auszugehen, dass es sich um keine Anreicherung handelt. Die Fraktionen, die mit dem *mouse* β -Catenin-Antikörper (BD Transduction Laboratories) bzw. mit dem LEF-1-Antikörper behandelt wurden, zeigten keine Anreicherung der getesteten LEF-1-Bindungsstellen.

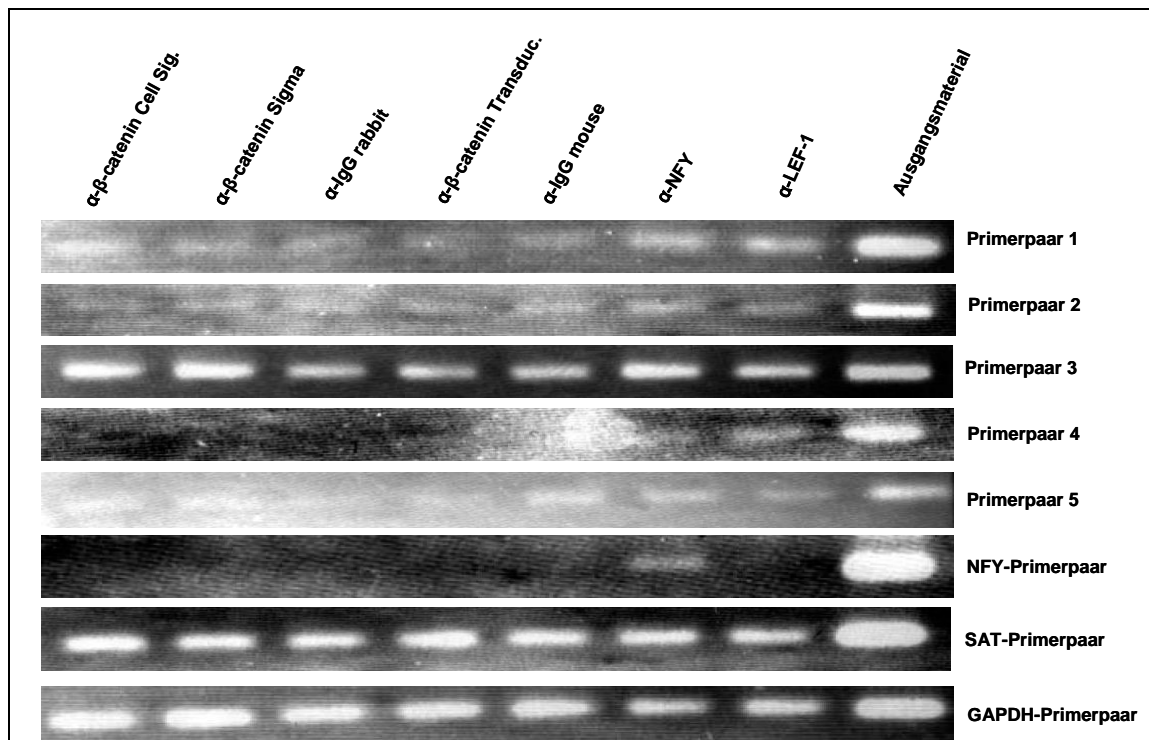


Abbildung 21: Ergebnis der ChIP-Analyse. Für die Analyse wurden 3 verschiedene β -Catenin Antikörper, ein NFY-Antikörper (Positivkontrolle) und ein LEF-1-Antikörper verwendet. Die jeweiligen Fraktionen (*rabbit* oder *mouse*) sind mit dem jeweiligen dazu passenden IgG-Antikörper (*rabbit* oder *mouse*) zu vergleichen. Als Negativkontrolle für unspezifische co-präzipitierte DNA dienten GAPDH- und SAT-Primerpaare. Das entstehende Amplifikat des in der PCR verwendeten NFY-Primerpaars (Positivkontrolle) zeigt die technische erfolgreiche Durchführung der ChIP-Analyse. Die PCRs mit spezifischen Primern, die 5 hochkonservierte LEF-1-Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz einschließen, zeigen keine Anreicherung von LEF-1-Bindungsstellen durch die verwendeten β -Catenin oder LEF-1-Antikörper innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Um nachzuweisen, dass die vorherige Behandlung von K562-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB216763 die Transkription von Zielgenen des Wnt / β -Catenin-Signalweges steigert, wurde die PCR mit spezifischen Primerpaaren für Wnt / β -Catenin-Zielgenen wiederholt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 22 gezeigt. Es ist hinlänglich bekannt, dass die für die ChIP Analyse eingesetzten Antikörper unterschiedlich gut geeignet sind, die Transkriptionsfaktor-DNA Komplexe zu fällen und, dass sich neben qualitativen auch quantitative Unterschiede zeigen. Die hier für die ChIP-Analyse benutzten β -Catenin-Antikörper sind geeignet, verschiedene Zielgene des Wnt / β -Catenin-Signalweges anzureichern. So gelingt es z.B. mit dem *rabbit* β -Catenin-Antikörper von Cell Signaling, die Zielgene TNC und BIRC5 anzureichern. Der *rabbit* β -Catenin-Antikörper von Sigma detektiert die Zielgene AXIN2, BIRC5, TNC und SP5, wohingegen der *mouse* β -Catenin-Antikörper von BD Transduction Laboratories nur das Zielgen BIRC5 anreichert.

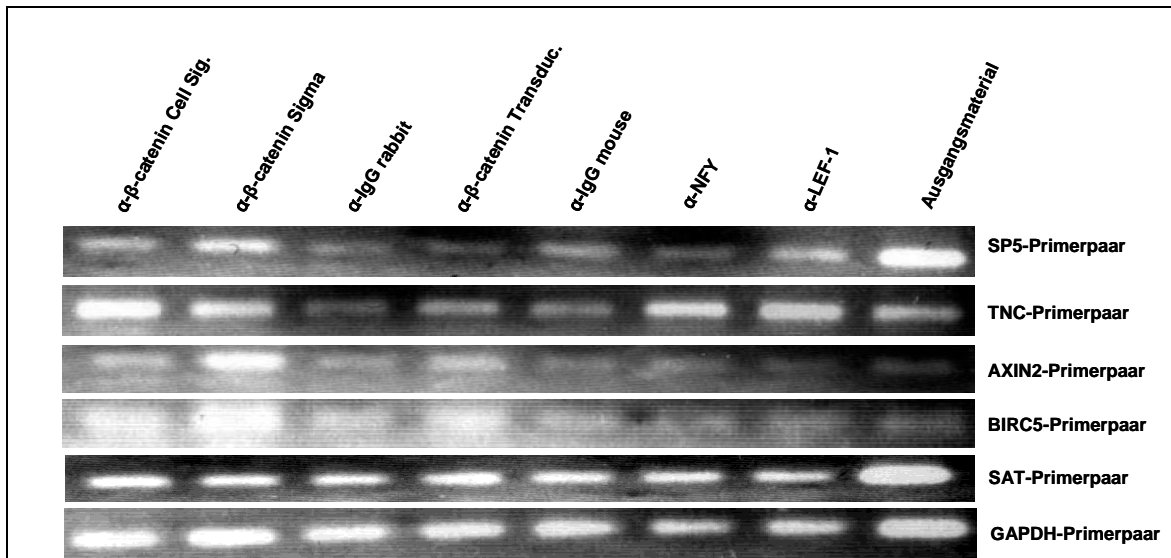


Abbildung 22: Wiederholung der PCR mit spezifischen Primern für Zielgene des Wnt / β -Catenin-Signalweges. Für die Analyse wurden 3 verschiedene β -Catenin Antikörper, ein NFY-Antikörper (Positivkontrolle) und ein LEF-1-Antikörper verwendet. Die jeweiligen Fraktionen (*rabbit* oder *mouse*) sind mit dem jeweiligen dazu passenden IgG-Antikörper (*rabbit* oder *mouse*) zu vergleichen. Als Negativkontrolle für unspezifische co-präzipitierte DNA dienen GAPDH- und SAT-Primerpaare. Die PCR mit spezifischen Primern, für Zielgene des Wnt / β -Catenin-Signalweges zeigt eine Anreicherung von Wnt / β -Catenin-Zielgenen durch die verwendeten β -Catenin und LEF-1-Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.8.5 Das rekombinante Protein Wnt3a aktiviert nicht die LEF-1-Aktivität

Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass die Inhibierung der Kinase GSK-3 β zu einer transkriptionellen Stimulation der PON2-Expression führt. Aktiviert wird die Transkription der PON2-Expression durch den Transkriptionsfaktor LEF-1. Prinzipiell ist die Kinase GSK-3 β in gleich zwei Signalwegen, Wnt / β -Catenin und PI3K / Akt involviert. Beide Signalwege fördern, wenn sie überschießend aktiviert werden, die Tumorgenese. Um zu untersuchen, ob der Wnt / β -Catenin-Signalweg an der transkriptionellen Aktivierung von PON2 beteiligt ist, wurden K562-Zellen mit einem LEF-1-Reporter-Plasmid transient transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50, 100 oder 400 ng / ml des humanen rekombinanten Proteins Wnt3a behandelt oder bleiben unbehandelt. Anschließend wurde die *firefly*-Luziferase Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt. Das humane rekombinante Protein Wnt3a aktivierte nicht die LEF-1-Induktion.

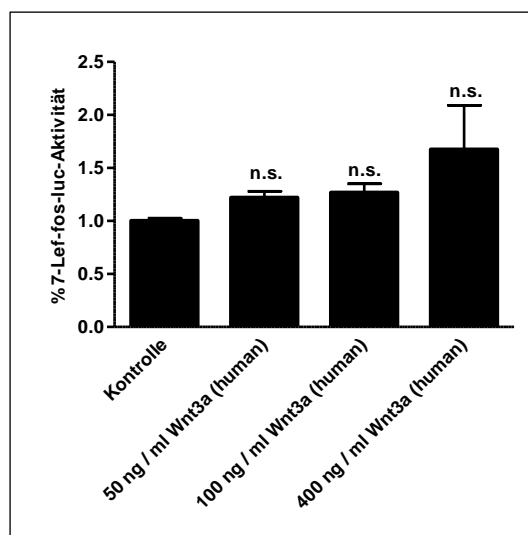


Abbildung 23: Das humane rekombinante Protein Wnt3a steigert nicht die Induktion von LEF-1. K562-Zellen wurden mit dem 7-LEF-fos-luc-Plasmid transient transfiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit 50, 100 oder 400 ng / ml des humanen rekombinanten Proteins Wnt3a für 24 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die *firefly*-Luziferase Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way*-ANOVA).

In einem zweiten Experiment wurden K562-Zellen mit einem LEF-1-Reporter-Plasmid transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50 und 100 ng / ml mit dem murinen rekombinanten Protein Wnt3a, das mit dem humanen Rezeptor kreuzreagiert, behandelt. Dann wurde die *firefly*-Luziferase-Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt. Auch das murine rekombinante Wnt3a-Protein aktivierte nicht die LEF-1-Induktion.

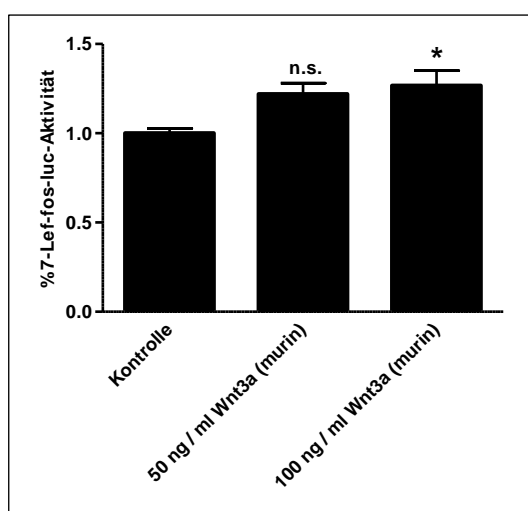


Abbildung 24: Das murine rekombinante Protein Wnt3a steigert nicht die Induktion von LEF-1. K562-Zellen wurden mit dem 7-LEF-fos-luc-Plasmid transient transfiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit 50 und 100 ng / ml des murinen rekombinanten Proteins Wnt3a für 24 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurde die *firefly*-Luziferase Aktivität als Maß der LEF-1-Induktion bestimmt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way*-ANOVA).

4.8.6 FoxO1 und insbesondere FoxO4 führen zu einer Reduktion der endogenen PON2-Expression

Die Klasse O der *forkhead box* (FoxO-) Transkriptionsfaktoren werden in Säugetieren ubiquitär exprimiert. Sie sind beteiligt an vielen zellulären und physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, Apoptose, Stressantwort, Langlebigkeit, Krebs und der Regulation des Zellzykluses und dem Metabolismus. Daraus ergibt sich die Rolle der FoxOs in der Tumorsuppression, auch weil FoxOs Ziele des PI3K / Akt Signalweges sind (ein in Tumoren oft überaktivierter, proliferativer Signalweg ⁹⁶). Die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren, hervorgerufen durch die Serine-Threonin Kinase Akt, hemmt die ansonsten durch FoxOs vermittelte Transkription von pro-apoptotischen Proteinen ⁹⁶. Dies wiederum führt zum Überleben der (Tumor-) Zellen und somit zum gesteigerten Tumorwachstum. Umgekehrt führt eine Überexpression der FoxO-Transkriptionsfaktoren zu einer Hemmung des Tumorwachstums *in vitro* und zu einer Verkleinerung der Tumorgröße *in vivo* (gezeigt für Brustkrebs ⁹⁶). Auch wenn die Rolle der FoxOs unstrittig ist, so sind doch nur wenige der FoxO-regulierten Gene bekannt und diese Regulation variiert gegebenenfalls mit der FoxO-Variante. PON2 scheint ein möglicher Kandidat für eine Regulation durch FoxOs, da es anti-apoptotisch wirkt und zumindest *in vitro* essentiell ist für das Überleben einiger Tumorzellen ⁶¹. Außerdem wurde zumindest FoxO4 von zwei unabhängigen Programmen als ein an den PON2-Promoter bindender Transkriptionsfaktor vorhergesagt (siehe Abbildung 3). Es ist demnach vorstellbar, dass PON2 in Tumorzellen durch den PI3K / Akt-Signalweg und die daraus resultierende Inhibition der FoxO-Transkriptionsfaktoren positiv reguliert wird und so die Tumorzelle vor der Apoptose bewahrt.

Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren FoxO1 und FoxO4 auf die PON2-Expression zu untersuchen, wurden diese überexprimiert und die PON2-Promoter-Aktivität analysiert. Hierzu wurden K562-Zellen mit dem bereits zuvor verwendeten 7,5 kb-PON2-Promoter-Reporter-Plasmid transfiziert. Zudem wurde durch eine Transfektion entweder ein GFP-Plasmid (Kontrolle), ein FoxO1-GFP-Plasmid oder ein FoxO4-FLAG-Plasmid in die Zellen eingebracht. Nach 24 Stunden wurde die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt und in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Aus Abbildung 25 geht hervor, dass die PON2-Promoter-Aktivität durch FoxO1 zwar abnimmt, jedoch war dies statistisch nicht signifikant. Der Transkriptionsfaktor FoxO4 jedoch reduziert die PON2-Promoter-Aktivität signifikant um fast 50%. Folglich ist FoxO4 ein negativer Regulator der PON2 Expression, zumindest in K562 Zellen.

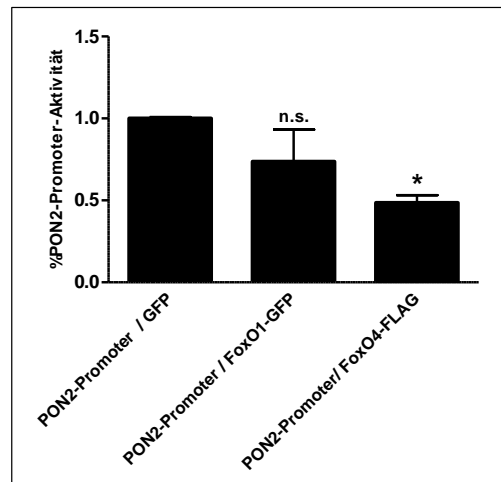


Abbildung 25: Die Transkriptionsfaktoren FoxO1 und FoxO4 hemmen die PON2-Promoter-Aktivität. K562-Zellen wurden mit einem 7,5 kb langen PON2-Promoter-Reporter-Plasmid und / oder mit Plasmiden zur Expression von GFP, FoxO1-GFP oder FoxO4-FLAG transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die PON2-Promoter-Aktivität bestimmt und graphisch dargestellt. Diese Werte wurden normalisiert gegen ein co-transfiziertes Plasmid mit einer konstitutiven Renilla-Luziferase-Expression. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$ vs. PON2-Promoter / GFP; *One-way-ANOVA*).

4.8.7 Der PI3K / Akt-Signalweges ist an der Regulation der PON2-Expression beteiligt

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Tyrosinkinase GSK-3 β sowohl in den Wnt / β -Catenin- als auch den PI3K / Akt-Signalweg involviert. In einem weiteren Experiment wurde daher überprüft, ob der PI3K / Akt-Signalweg an der Aktivierung der PON2-Expression beteiligt ist. Dazu wurden K562-Zellen für 24 Stunden entweder mit 1 μ M Wortmannin, 5 μ M LY 294002 behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die PON2-Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Bei den Substanzen Wortmannin und LY 294002 handelt es sich um spezifische PI3K-Inhibitoren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Die Inhibition des Signalweges durch LY 294002 führt zu einer 50%igen Reduktion der PON2-Expression. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin zeigt zwar ebenfalls eine leichte Reduktion der PON2-Expression jedoch ist diese nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass der PI3K / Akt-Signalweg an der der Regulation der PON2-Expression beteiligt ist.

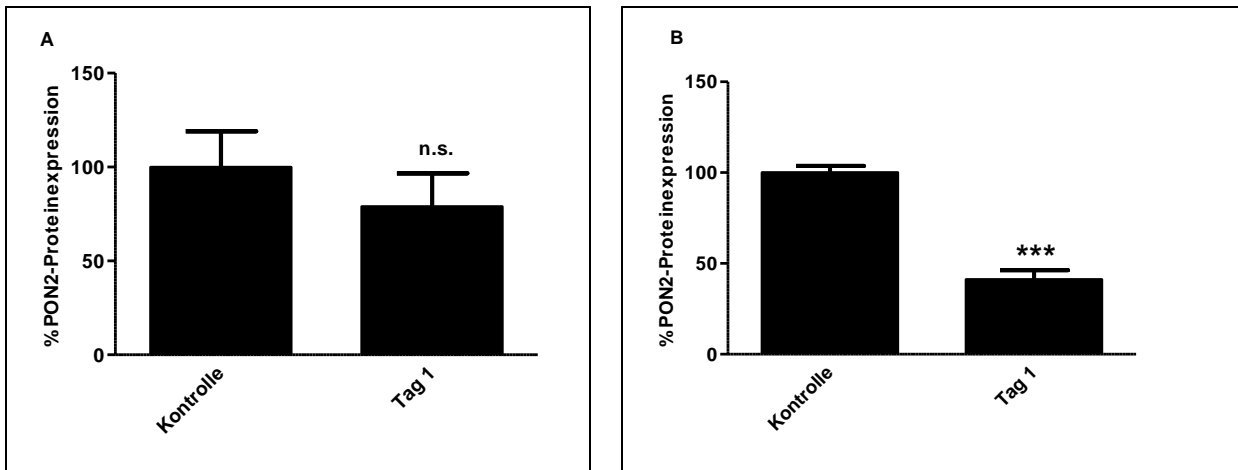


Abbildung 26: Der PI3K-Inhibitor LY 294002 inhibiert die PON2-Expression. K562-Zellen wurden mit 1 µM Wortmannin (A) oder 5 µM LY 294002 (B) für 24 Stunden behandelt oder blieben unbehandelt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die PON2-Proteinexpression durch eine Western Blot-Analyse analysiert. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-Proteinexpression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. (***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Kontrolle; *One-way*-ANOVA).

4.9 Die Untersuchung der PON2-Expression in karzinogenem Lungengewebe

Witte et al. zeigten erstmals, dass eine erhöhte PON2-Expression in einer Vielzahl von Tumoren vorliegt⁶¹, unter anderem in Lungentumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe. Zudem wurde festgestellt, dass eine Überexpression des PON2-Proteins verschiedene Tumorzellen vor Apoptose und somit vor der Behandlung mit Chemotherapeutika schützt. Des Weiteren wurde zumindest in Leukämien eine GSK-3 β -vermittelte Regulation von PON2 festgestellt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es Unterschiede in der PON2-Expression in unterschiedlichen Lungentumoren gibt. Des Weiteren wurde bestimmt, ob es eine direkte Assoziation zwischen der in karzinogenem Lungengewebe analysierten PON2-Expression und dem Alter der Patienten oder dem Krankheitsstadium gibt.

Dazu wurde die PON2-mRNA-Expression anhand einer Probensammlung bestehend aus dem Lungengewebe von 24 Patienten bestimmt. Es wurde stets gesundes Lungengewebe mit karzinogenem Lungengewebe desselben Patienten verglichen und daraus die PON2-mRNA-Expression bestimmt. Nachfolgend (Abbildung 27) sind die Ergebnisse dieser Analyse graphisch zusammengefasst.

Anhand der Patientendaten wurde zunächst eine Unterteilung der verschiedenen Lungentumorformen vorgenommen (Abbildung 27 A). Dabei fiel auf, dass die PON2-mRNA-Expression in großzelligen Lungentumoren tendenziell herunterreguliert ist, während sie in den anderen untersuchten Lungentumoren unverändert blieb oder tendenziell erhöht war (kleinzelliges Lungenkarzinom). Anschließend wurde die PON2-mRNA-Expression in den

verschiedenen Krankheitsstadien untersucht (Abbildung 27 B). Die Einteilung in die unterschiedlichen Erkrankungsstadien (Stadium I – III) zeigt eine Zunahme in der PON2-mRNA-Expression. So ist die PON2-mRNA-Expression zu Beginn der Erkrankung (Stadium I) erniedrigt, steigt aber im weiteren Krankheitsverlauf (Stadium II – III) etwas an. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der PON2-mRNA-Expression im analysierten Lungengewebe vorliegt. Hierzu wurde anhand der Patientendaten eine Einteilung in verschiedene Altersgruppen vorgenommen (Abbildung 27 C). In der vorliegenden Untersuchung wurde kein Unterschied in der PON2-mRNA-Expression innerhalb der verschiedenen Altersgruppen festgestellt. Entgegen den Befunden aus anderen Tumoren ⁷⁸ scheint die PON2-Expression in Lungentumoren gemäß dieser Analyse nicht dereguliert zu sein.

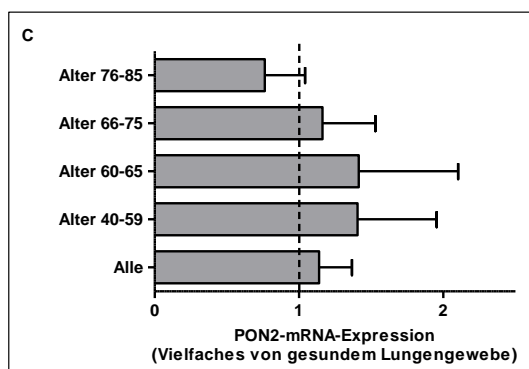
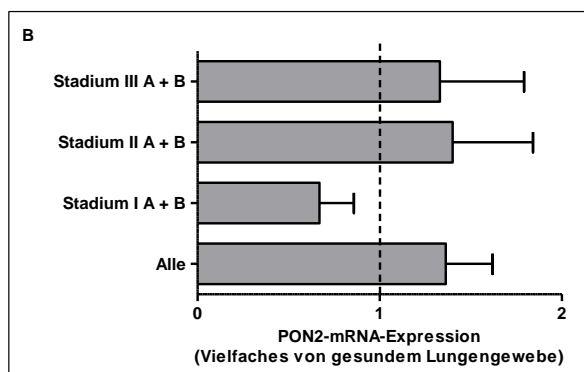
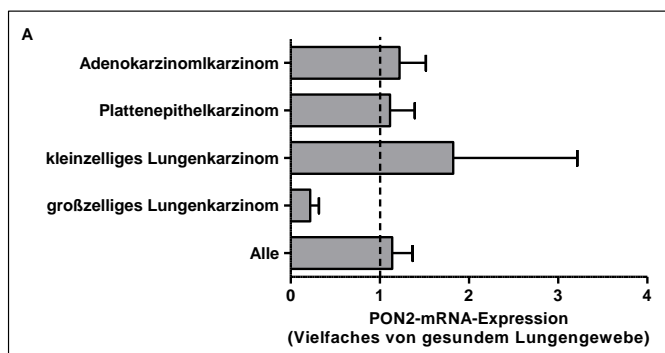


Abbildung 27: Bestimmung der PON2-mRNA-Expression in karzinogenem Lungengewebe. Es wurde mittels qRT-PCR die PON2-mRNA-Expression in karzinogenem Lungengewebe von 24 Patienten untersucht. Als Referenz diente jeweils gesundes Gewebe vom selben Patienten. Die Expressionslevel wurden gegen die GAPDH-mRNA-Expression derselben Probe normalisiert und graphisch dargestellt.

4.10 Vergleichende Analyse des hämatopoetischen Systems von $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp C57BL/6J-Mäusen

Microarray-Daten verschiedener Forschergruppen belegen eine Assoziation des PON2-Proteins mit verschiedenen Tumoren^{72, 73, 75-77}. Aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe geht hervor, dass PON2 anti-apoptotisch wirkt, die endogene PON2-Expression in mehreren Tumorproben deutlich gesteigert ist und eine Überexpression von PON2 verschiedene Tumorzellen vor der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose schützt. Im Gegensatz dazu verursachte ein *knock-down* von PON2 eine spontane Apoptose in diesen Tumorzelllinien, was für eine pro-onkogene Funktion des PON2-Enzyms spricht^{61, 23, 110}. In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor LEF-1 die PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 vermittelt durch die Kinase GSK-3 β steigert. Diese Kinase ist in die Signalwege Wnt / β -Catenin und PI3K / Akt involviert. Eine gesteigerte Aktivierung beider Signalwege hervorgerufen durch Mutationen führt zur Entstehung und Proliferation von Tumoren. Eine Beteiligung des PI3K / Akt-Signalweges an der Regulation der PON2-Expression wurde in Abschnitt 4.8.8 bereits gezeigt. Diese Ergebnisse deuten auf eine eventuelle Rolle von PON2 in der (malignen) Hämatopoese hin. Bisher ist jedoch die Rolle von PON2 im blut-bildenden System völlig unbekannt, daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es in $PON2^{-/-}$ -Mäusen zu Änderungen in diesem System kommt. Dazu wurden alle Zell-(sub)Populationen aus Knochenmark, Thymus und Milz mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zudem wurden die Parameter des peripheren Blutes durch ein HEMAVET-Gerät labormedizinisch untersucht (siehe 3.5.1).

4.10.1 Durchflusszytometrie-Analysen pluripotenter Zellen aus dem Knochenmark

Die Hämatopoese bezeichnet die Bildung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSCs) (siehe Einleitung Abbildung 1). Diese Zellen kommen primär im Knochenmark vor, besitzen die einzigartige Fähigkeit der Selbsterneuerung und können sich sowohl in die myeloische als auch lymphatische Reihe der Blutzellen differenzieren. Mit zunehmender Differenzierung verlieren die Zellen ihre Pluripotenz sowie die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Die Zellen werden im Verlauf ihrer Entwicklung auf bestimmte hämatopoetische Zelllinien determiniert. So entstehen linienspezifische Progenitorzellen (Vorläuferzellen), die durch spezifische Oberflächenantigene unterschieden

werden können. Alle Zell-(sub)Populationen aus dem Knochenmark von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6J-Mäusen wurden wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben isoliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie wie in Abschnitt 3.5.2 quantitativ analysiert.

Zunächst werden die Ergebnisse für drei aus dem Knochenmark isolierte Zelltypen dargestellt: lang-Zeit repopulierende hämatopoetische Stammzellen (*long-term hematopoietic stem cells*; LT-HSCs), kurz-Zeit repopulierende hämatopoetische Stammzellen (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSCs) und multipotente Progenitorzellen (MPPs). In Abbildung 28 sind die prozentualen Unterschiede dieser Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen für beide Mausstämmen graphisch dargestellt. Auffällig ist, dass $PON2^{-/-}$ -Mäuse prozentual über mehr LT-HSCs verfügen als die Wildtyp-Mäuse (Abbildung 28 A). Dabei ist zu beachten, dass als LT-HSCs nur die Stammzellen bezeichnet werden, die über einen Zeitraum von ca. sechs Monaten eine Donorhämatopoese aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu unterstützen die ST-HSC die hämatopoetische Rekonstitution über vier Wochen bis drei Monate. Bei der Analyse der prozentualen Anzahl von ST-HSCs zwischen $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen wurde kein Unterschied festgestellt (Abbildung 28 B). Des Weiteren war die prozentuale Verteilung von MPP-Zellen im untersuchten Knochenmark zwischen beiden Mausstämmen gleich (Abbildung 28 C). MPPs haben im Gegensatz zu den HSCs ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren, können jedoch noch in Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihen ausdifferenzieren.

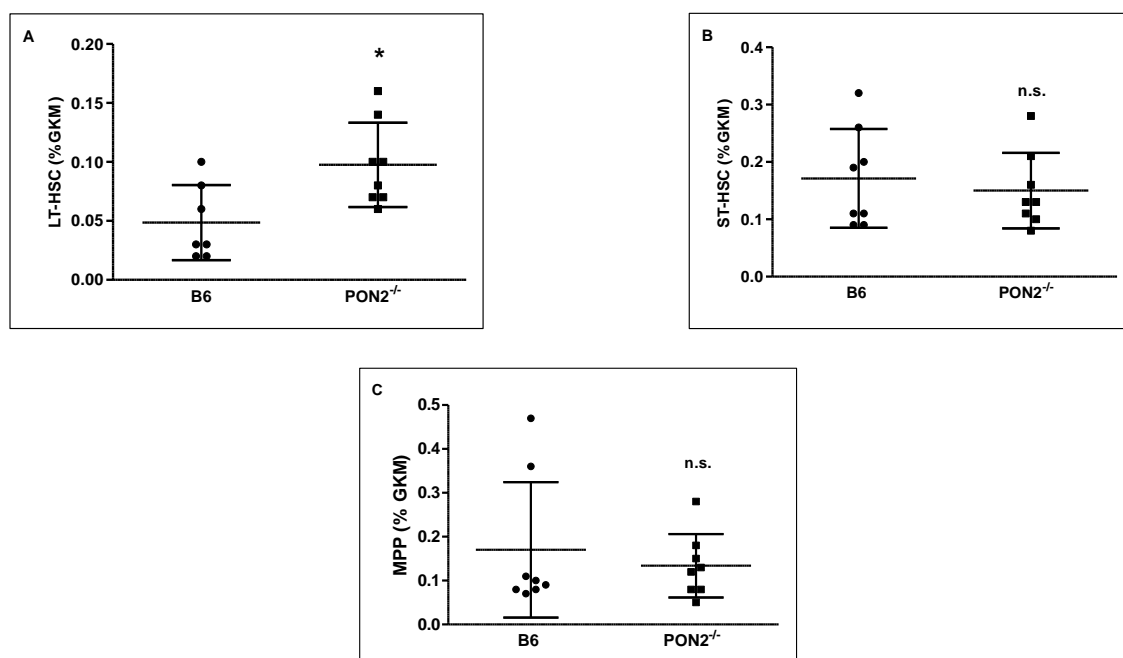


Abbildung 28: Befunde von pluripotenten Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen aus Knochenmarksanalysen von Wildtyp- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Das Knochenmark von Wildtyp (B6) und $PON2^{-/-}$ -Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an LT-HSCs (A), ST-HSCs (B) und MPPs (C) wurde relativ zur Gesamtknochenmark (GKM)-Zellmenge angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 8 Tieren / Gruppe. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

Die in Abbildung 29 A graphisch dargestellte Untersuchung der myeloischen Reihe zeigt, dass es keine statistisch signifikanten Auffälligkeiten zwischen Wildtyp- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen gibt. Jedoch wiesen die Vorläufer der Granulozyten und Monozyten / Makrophagen (GMPs) signifikante Unterschiede auf (Abbildung 29 B). So ist die prozentuale Anzahl dieser Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen in $PON2^{-/-}$ -Mäusen signifikant erhöht, die der Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläufer (MEPs) dagegen nicht (Abbildung 29 C).

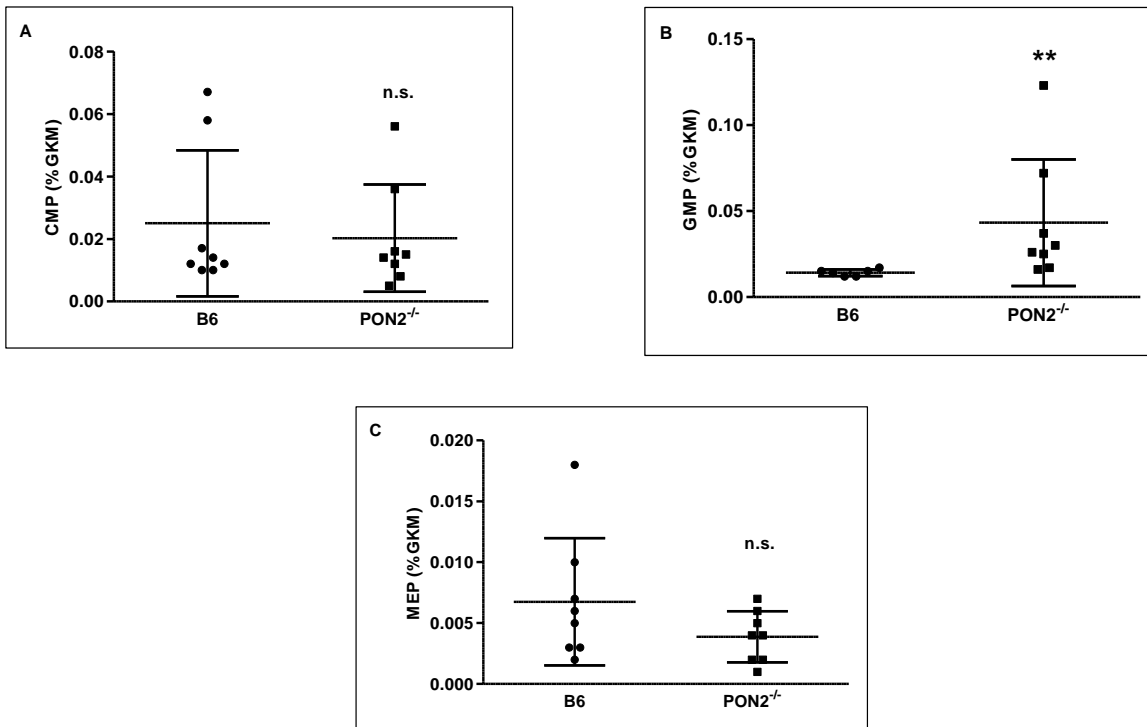


Abbildung 29: Befunde von Zellen aus der myeloischen Reihe aus Knochenmarksanalysen von Wildtyp- und $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Das Knochenmark von Wildtyp (B6) und $PON2^{-/-}$ -Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an CMPs(A), GMPs (B); MEPs (C) wurde relativ zur Gesamtknochenmark (GKM)-Zellmenge angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 8 Tieren / Gruppe. (**: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test)-

4.10.2 Durchflusszytometrie-Analysen differenzierender Knochenmarkszellen aus $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen

Der prozentuale Vergleich zwischen Zellen, die nicht durch die *Lineage*-Negativ-Selektion (siehe 3.5.2) abgetrennt wurden, ist in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Diese Zellen können durch die für die jeweilige Zelllinie spezifischen Oberflächenantigene unterschieden werden. Eine Übersicht über die Antikörper-Kombinationen, die für die Differenzierung der verschiedenen Subpopulationen in den Durchflusszytometrie-Analysen zur Anwendung kamen, ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 Übersicht über die Antikörper-Kombinationen, die zur Differenzierung der zellulären Subpopulationen in den Durchflusszytometrie-Analysen angewendet wurden. Hierbei bedeutet „+“, dass der entsprechende Marker durch die Zellpopulation charakteristischerweise exprimiert wird, „-“ das Gegenteil.

<u>Subpopulation</u>	<u>Antikörper</u>
differenzierte myeloische Zellen	Gr1 ⁺ / CD11b ⁺
myeloische Vorläuferzellen	ckit ⁺ / Gr1 ⁻ / CD11b ⁻
frühe B-Zellen	B220 ⁺ / CD3 ⁻
T-Vorläuferzellen	B220 ⁻ / CD3 ⁺
Erythrozyten-Vorläuferzellen	Ter119 ⁺ / CD71 ⁺
proliferierende Zellen	Ter119 ⁻ / CD71 ⁺
differenzierte Erythrozyten	Ter119 ⁺ / CD71 ⁻
reifende B-Zellen	B220 ⁺ / CD19 ⁺
gereifte B-Zellen	B220 ⁻ / CD19 ⁺
B- und T-Vorläuferzellen	B220 ⁺ / CD3 ⁺
T-Zellen	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
frühe T-Zellen	CD4 ⁻ / CD8 ⁻
T-Helferzellen	CD4 ⁺ / CD8 ⁻
zytotoxische T-Zellen	CD4 ⁻ / CD8 ⁺

In Abbildung 30 ist die prozentuale Verteilung, bezogen auf die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen der bereits weiter ausdifferenzierten Zellen des Knochenmarks graphisch dargestellt. Diese Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Hinblick auf differenzierte myeloische Zellen (Abbildung 30 A), myeloische Vorläuferzellen (Abbildung 30 B), Erythrozyten-Vorläuferzellen (Abbildung 30 C), proliferierende Zellen (Abbildung 30 D), sowie den frühen B-Zellen (Abbildung 30 E) und T-Vorläuferzellen (Abbildung 30 F) der lymphatischen Reihe.

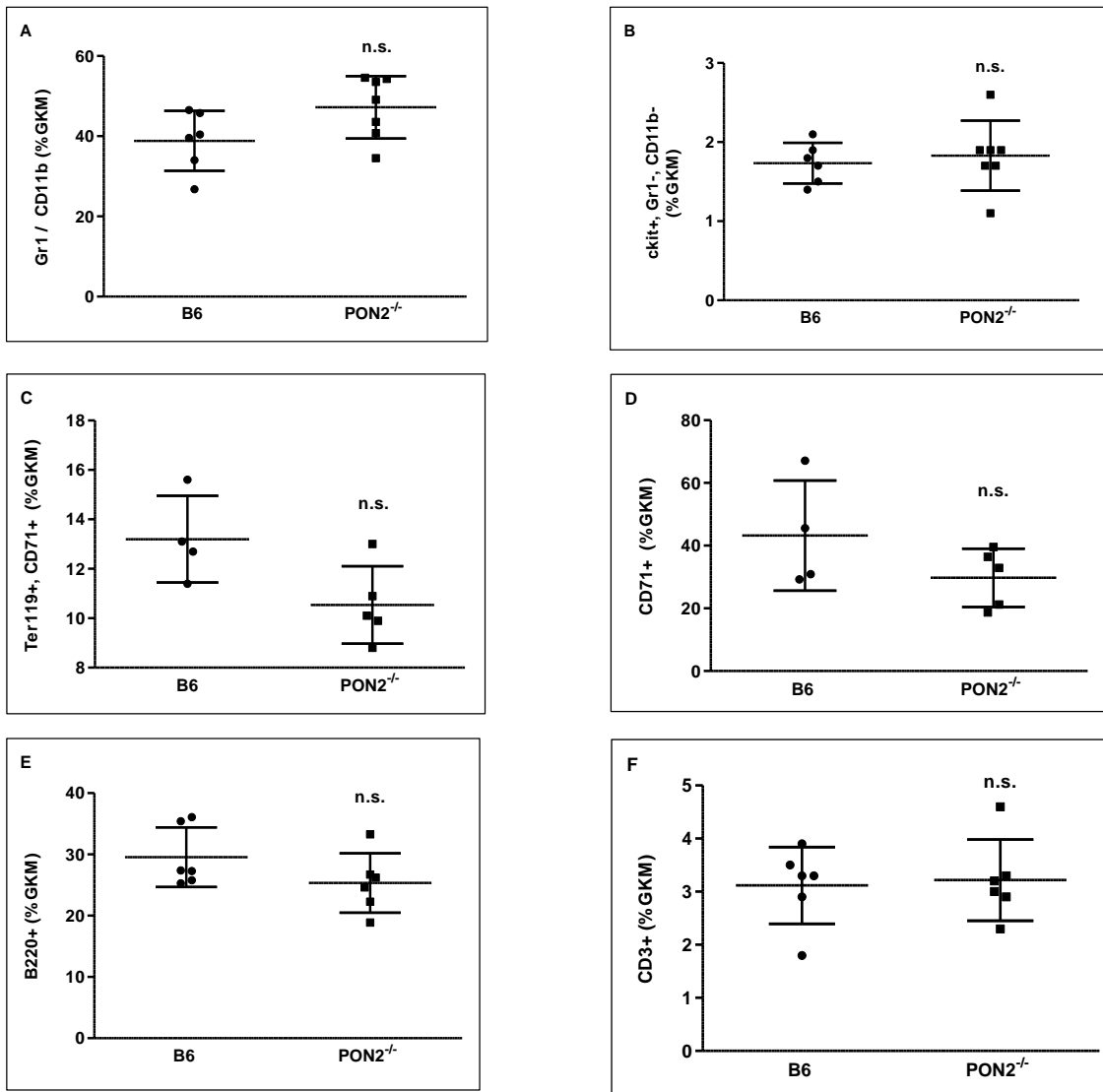


Abbildung 30: Befunde der Zellen aus Subpopulationen der Knochenmarksanalyse von Wildtyp- und PON2^{-/-}-Mäusen. Das Knochenmark von Wildtyp (B6) und PON2^{-/-}-Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an differenzierten myeloischen Zellen (A), myeloische Vorläuferzellen (B), Erythrozyten-Vorläuferzellen (C) Proliferierende Zellen (D) frühen B-Zellen (E) T-Zell-Vorläuferzellen (F) wurde relativ zur Gesamtknochenmark (GKM)-Zellmenge angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 6 Tieren / Gruppe. (n.s.: p>0,05; t-Test).

4.10.3 Durchflusszytometrie-Analyse der aus der Milz isolierten Zellen aus PON2^{-/-}- und C57Bl/6-Mäusen

Neben Zellen aus dem Knochenmark wurden zudem alle Zell-(sub) Populationen aus der Milz quantitativ mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Milz, die zum lymphatischen System gehört, bildet Erythrozyten und schließt die Entwicklung von Lymphozyten und Monozyten ab. Im Erwachsenenalter ist die Milz normalerweise nicht mehr an der Hämatopoese beteiligt, eine Ausnahme bildet die hämolytische Krise. Dabei kann es zu einer Splenomegalie (Vergrößerung) der Milz kommen. Eine Splenomegalie der Milz wurde in zwölf Monate alten PON2-knock-out-Weibchen beobachtet (Abbildung 31). Die Unterschiede

zwischen $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren waren dabei signifikant. Die Milz eines C57Bl/6-Weibchens wiegt zwischen 100 und 150 mg, die eines zwölf Monate alten $PON2^{-/-}$ -Weibchens liegen im Schnitt bei 400 mg (siehe Abbildung 32). Zudem zeigten die Milzen dieser Weibchen eine auffällige Marmorierung des Milzgewebes.

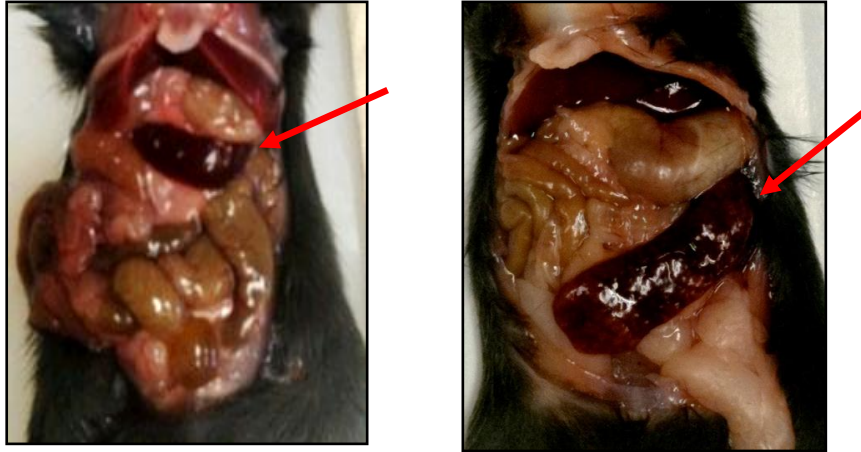


Abbildung 31: Splenomegalie bei weiblichen $PON2^{-/-}$ -Mäusen. Rechts ist eine weibliche Wildtyp-Maus und links eine weibliche $PON2^{-/-}$ -Maus gezeigt (beide 12 Monate alt). Die Lage der Milz ist in beiden Fällen durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Deutlich ist zu erkennen, dass die Milz der $PON2^{-/-}$ -Maus stark vergrößert und marmoriert ist im Vergleich zur Milz der Wildtyp-Maus.

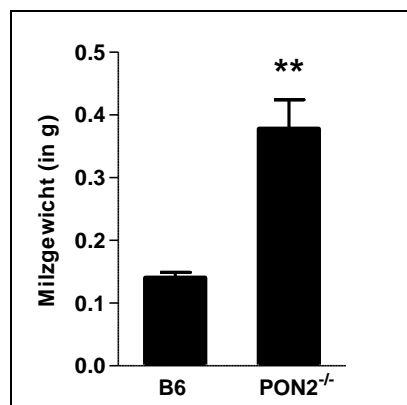


Abbildung 32: Das durchschnittliche Milzgewicht von $PON2^{-/-}$ -Mäusen ist signifikant erhöht im Vergleich zu C57Bl6/J-Mäusen. Für die Analyse wurde das Gewicht der Milzen von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl6/J-Mäusen bestimmt und statistisch verglichen. (**: $p < 0,005$ vs. C57Bl6/J-Mäusen; *One-way-ANOVA*).

In den Abbildungen 33 und 34 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen der aus der Milz isolierten Zellen graphisch dargestellt. Abbildung 33 zeigt die Analysen von $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen im Hinblick auf die differenzierten Zellen der myeloischen Reihe. Diese sind bei allen analysierten Zelltypen, wie differenzierten myeloischen Zellen (Abbildung 33 A), myeloischen Vorläuferzellen (Abbildung 33 B), Erythrozyten-Vorläuferzellen (Abbildung 33 C), proliferierenden Zellen (Abbildung 33 D) und differenzierten Erythrozyten (Abbildung 33 E) nicht signifikant unterschiedlich.

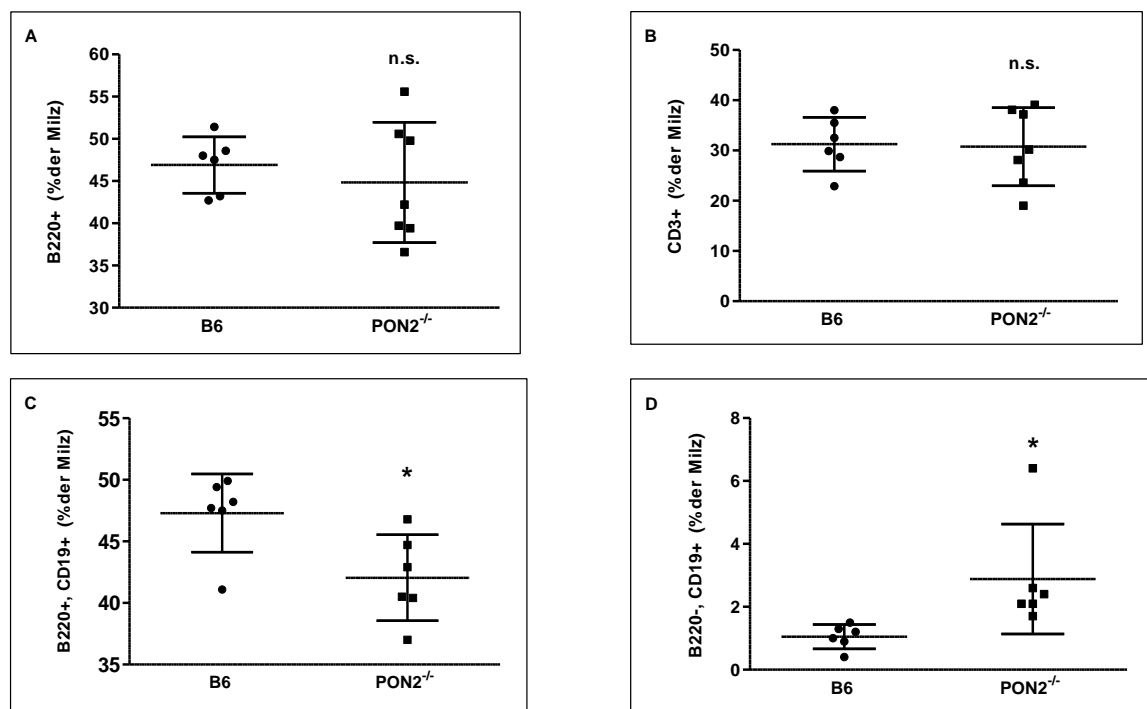


Abbildung 34: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus der Milz von $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen. Die Milz von Wildtyp (B6) und $PON2^{-/-}$ -Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an frühen B-Zellen (A), T-Vorläuferzellen (B), reifen B-Zellen (C), noch mehr ausdifferenzierten B-Zellen (D) wurde relativ zur Gesamtzahl der analysierten Milzzellen angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 6 Tieren / Gruppe. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

4.10.4 Durchflusszytometrie-Analyse der aus dem Thymus isolierten Zellen aus $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen

Die Funktion des Thymus ist es, die Entwicklung der aus dem Knochenmark stammenden und über die Blutbahn eingewanderten Vorläufer der T-Lymphozyten abzuschließen. Bei einer Leukämie kann auch der Thymus als Bestandteil des lymphatischen Systems durch abnormal veränderte Zellen des hämatopoetischen Systems infiltriert werden, so dass seine Funktion beeinträchtigt wird. Aufgrund dieser besonderen Funktion des Thymus in der Reifung von T-Lymphozyten wurde dieses lymphatische Organ ebenfalls in die Analysen aufgenommen. Für diese Analyse wurden alle Zell-(sub) Populationen aus dem Thymus von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben isoliert, mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 9, Abschnitt 4.10.2) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert.

Die Analyse der im Thymus befindlichen Zellen des hämatopoetischen Systems ist in den Abbildungen 35 und 36 graphisch dargestellt. Die prozentuale Verteilung der durch die Durchflusszytometrie untersuchten Zellen des Thymus zeigt in B- und T-Vorläuferzellen (Abbildung 35 A) keine Unterschiede bei $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen. Auch eine weitere

Oberflächenantigenfärbung von B- (Abbildung 35 B) und T-Vorläuferzellen (Abbildung 35 C) konnte keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen aufdecken.

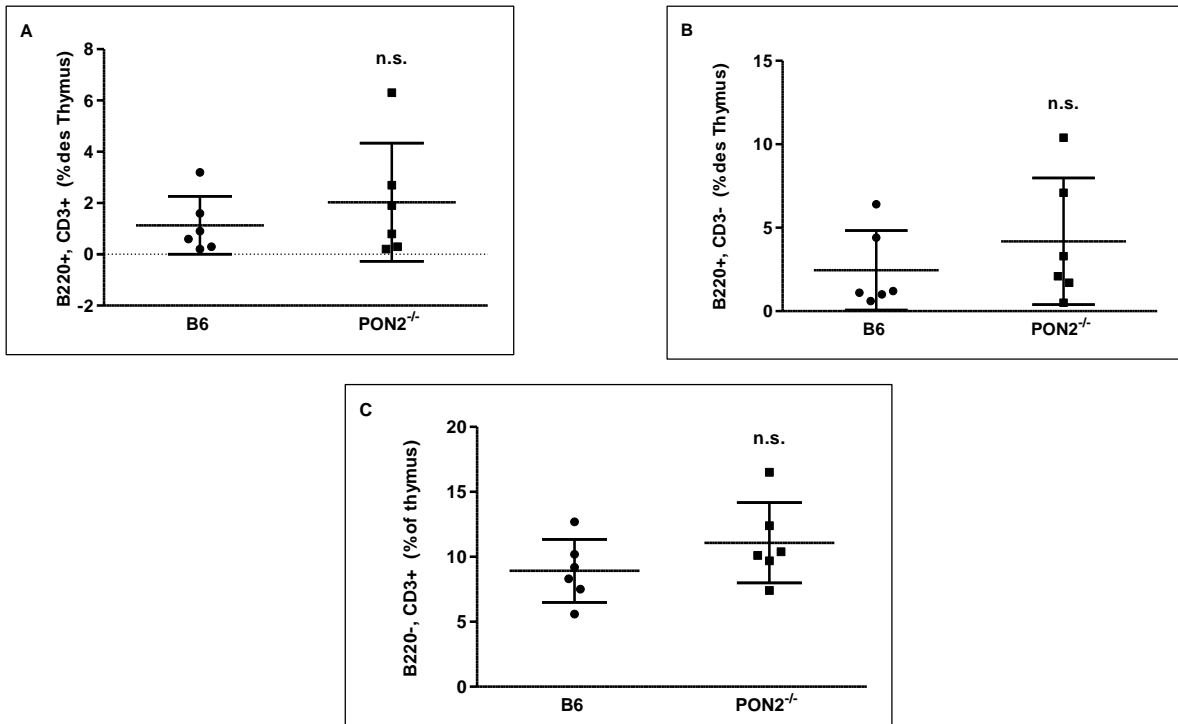


Abbildung 35: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus dem Thymus von PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Der Thymus von Wildtyp (B6) und PON2^{-/-}-Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an B- und T-Vorläuferzellen (A), frühen B-Zellen (B) und T-Vorläuferzellen (C) wurde relativ zur Gesamtzahl der analysierten Thymuszellen angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 6 Tieren / Gruppe. (n.s.: p>0,05; t-Test).

Die Analyse der T-Zellen zeigt, dass es keine prozentualen Unterschiede bei den T-Zellen (Abbildung 36 A) und frühen T-Zellen (Abbildung 36 B) zwischen den beiden untersuchten Mausstämmen gibt. Jedoch sind die T-Helferzellen in PON2^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu denen in C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (Abbildung 36 C). Die Analyse der zytotoxischen T-Zellen zeigt wiederum keinen Unterschied auf (Abbildung 36 D).

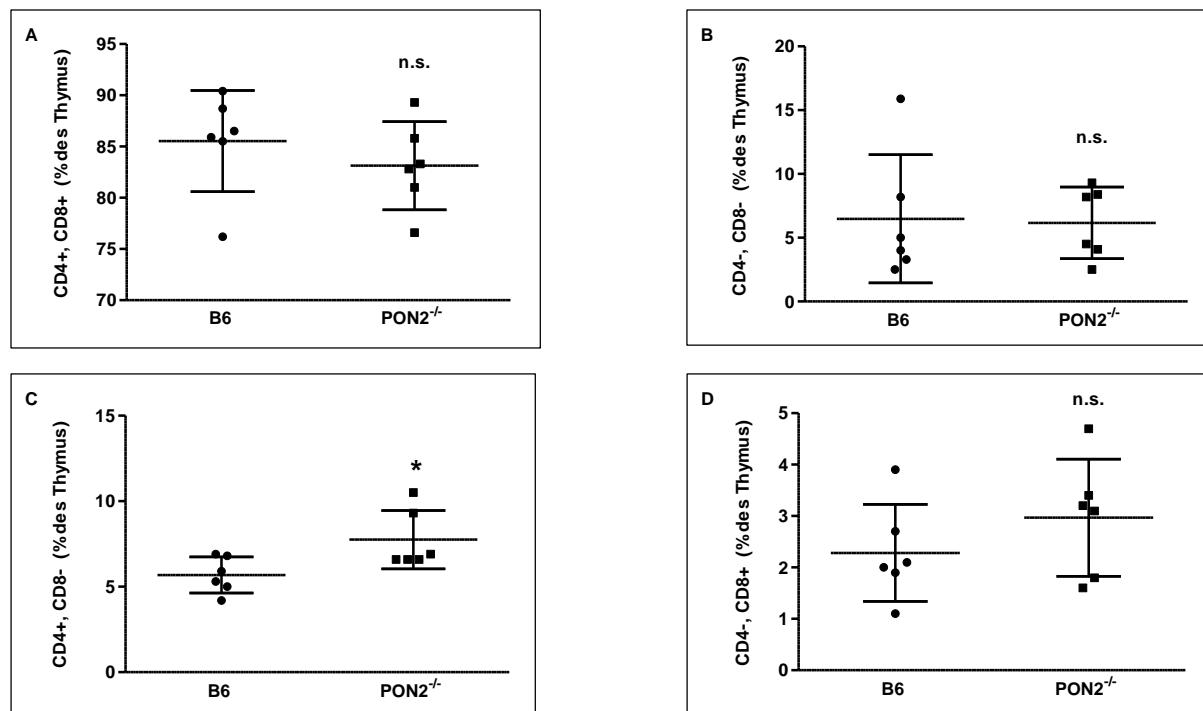


Abbildung 36: Befunde der differenzierten Zellen der lymphatischen Reihe aus dem Thymus von $PON2^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen. Der Thymus von Wildtyp (B6) und $PON2^{-/-}$ -Mäusen wurde präpariert, die darin enthaltenen Zellen isoliert, gezählt, mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine versehen und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Der Gehalt an T-Zellen (A), T-Helferzellen (C) und zytotoxischen T-Zellen (D) wurde relativ zur Gesamtzahl der analysierten Milzzellen angegeben. Gezeigt ist eine Analyse von jeweils 6 Tieren / Gruppe. (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

4.10.5 Analyse des peripheren Blutes von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen

Um den Einfluss von PON2 im peripheren Blut zu untersuchen wurden das Blut von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen quantitativ analysiert. Für die Analyse wurde wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben Blut *intra cardinal* entnommen und in ein mit EDTA-beschichtetes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Blut in einem HEMAVET-Gerät labormedizinisch untersucht.

Die quantitative Analyse der Erythrozyten im peripheren Blut von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen ergab einige Auffälligkeiten. Die Anzahl an Erythrozyten (Abbildung 37 A) zeigte keine signifikanten Änderungen zwischen den Mausstämmen, jedoch war der Hämatokrit-Wert bei den *knock-out*-Tieren signifikant erhöht und außerhalb des Normbereiches (Abbildung 37 B). Der Hämatokrit gibt die zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes an. Dieser ist primär von der Konzentration der Erythrozyten abhängig, da diese ungefähr 99% der zellulären Bestandteile des Blutes ausmachen.

Des Weiteren wurde das mittlere Zellvolumen und der mittlere Hämoglobingehalt der Erythrozyten bestimmt. Wie aus Abbildung 37 C hervorgeht war die Größe der Erythrozyten in $PON2^{-/-}$ -Mäusen signifikant erhöht, jedoch lagen die Werte im Vergleich zu C57Bl/6-

Mäusen innerhalb des Normbereiches. Der mittlere Hämoglobingehalt der Erythrozyten unterschied sich in beiden Mausstämmen nicht voneinander, allerdings lagen die Werte beider Spezies außerhalb des Normbereiches (Abbildung 37 D).

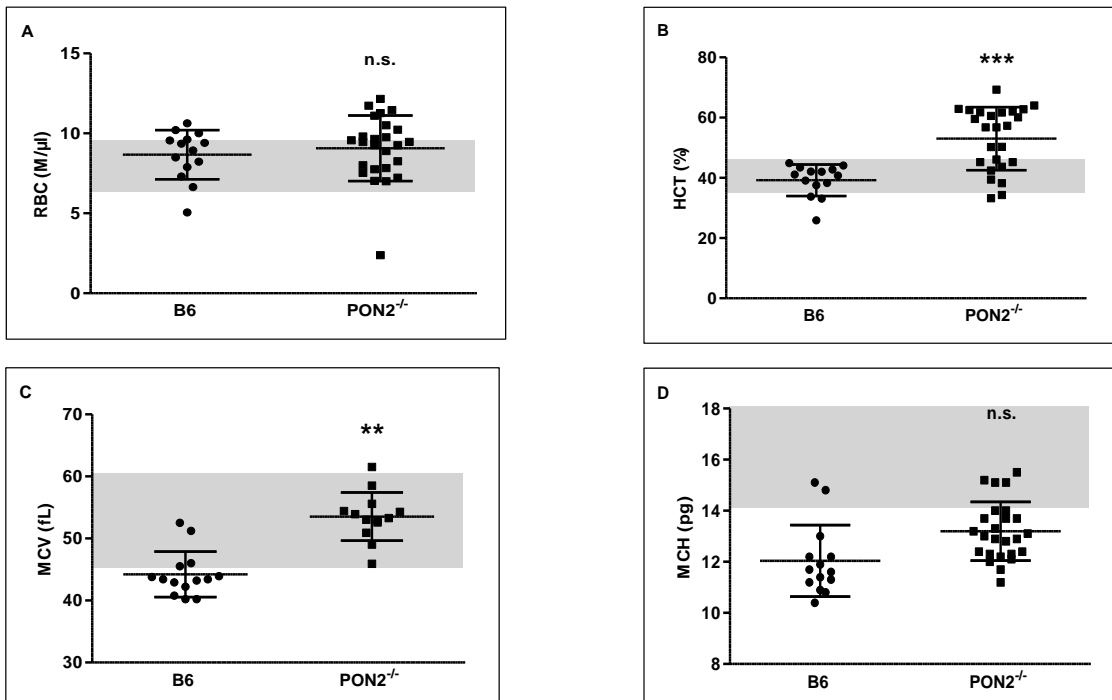


Abbildung 37: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen. Den genannten Mausstämmen wurde Blut entnommen und mittels eines HEMAVET-Gerätes labormedizinisch untersucht. A) Erythrozytenanzahl (*red blood cell count*; RBC); B) Hematokrit-Wert (*hematocrit*; HCT); C) mittleres Zellvolumen der Erythrozyten (*mean cellular volume*; MCV); D) mittlerer Hämoglobingehalt der Erythrozyten (*mean cellular hemoglobin*; MCH); der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Normbereich des jeweils analysierten Wertes; (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

Die weitere Analyse der Erythrozyten ergab, dass die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten in $PON2^{-/-}$ -Mäusen signifikant erniedrigt war verglichen mit denen in Wildtyp-Tieren (Abbildung 38 A). Auffällig war zudem, dass der Wert bei beiden Stämmen unterhalb des Normbereichs lag. Ebenfalls keine Unterschiede gab es bei zwei weiteren Parametern, nämlich dem Hämoglobingehalt und der Verteilungsbreite der Erythrozyten (*red cell distribution width*, RDW; Abb. 38 B+C). Letzterer Wert gibt an, ob die Erythrozyten sehr unterschiedlich groß sind (erhöhtes RDW) oder ob sie alle ungefähr gleich groß sind (normales RDW).

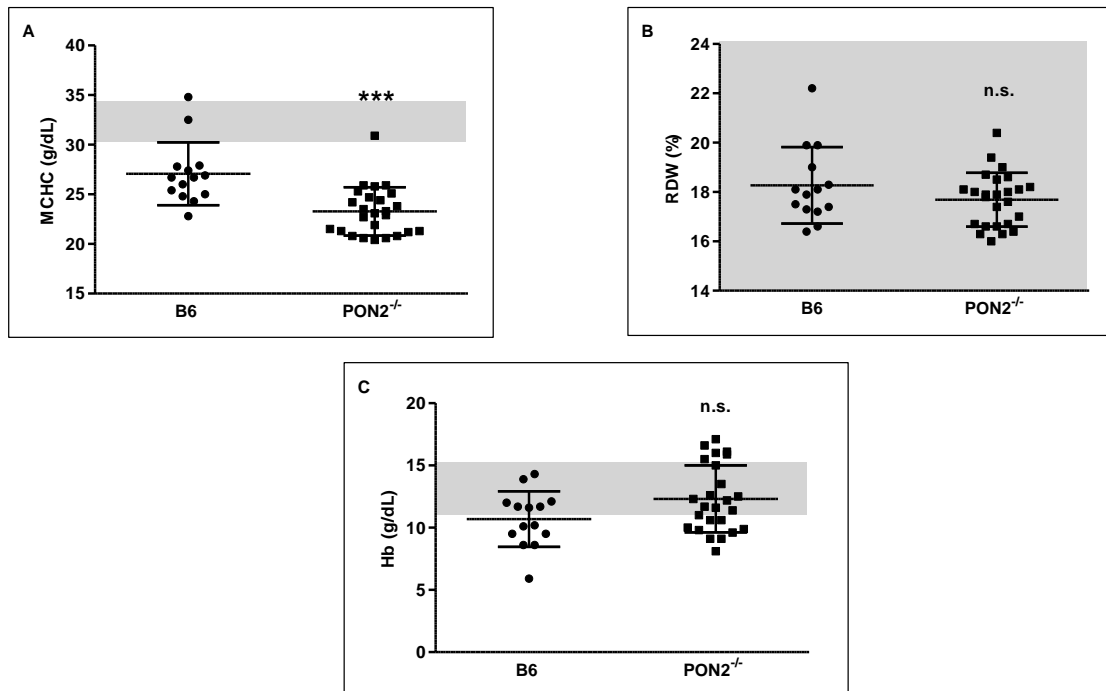


Abbildung 38: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2^{-/-}- und C57Bl/6-Mäusen. Den genannten Mausstämmen wurde Blut entnommen und mittels eines HEMAVET-Gerätes labormedizinisch untersucht. A) Durchschnittliche Hämoglobinkonzentration eines Erythrozyten (*mean cellular hemoglobin concentration*, MCHC); B) Index für die Verteilung der Menge an Erythrozyten (*red blood cell count distribution width*, RDW); C) Hämoglobingehalt (Hb); der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Normbereich des jeweils analysierten Wertes; (***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

Die Analyse der Thrombozyten des peripheren Blutes von PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen ist in Abbildung 39 graphisch dargestellt. Auffällig war, dass die Anzahl der Thrombozyten in PON2^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt war (Abbildung 39 A), wohingegen das mittlere Thrombozytenvolumen, d.h. die Größe der Thrombozyten, signifikant erhöht war (Abbildung 39 B).

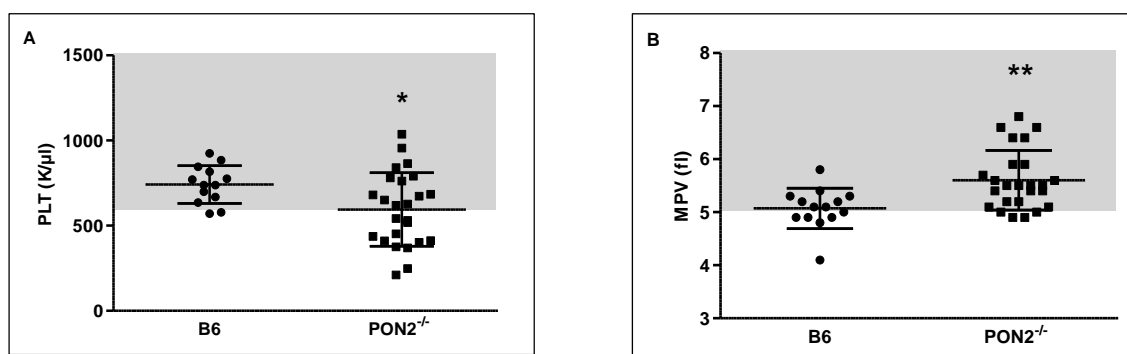


Abbildung 39: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von PON2^{-/-}- und C57Bl/6-Mäusen. Den genannten Mausstämmen wurde Blut entnommen und mittels eines HEMAVET-Gerätes labormedizinisch untersucht. A) Thrombozytenzahl (*platelets*, PLT); B) mittleres Thrombozytenvolumen (*mean platelets volume*, MPV); der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Normbereich des jeweils analysierten Wertes; (**: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; t-Test).

Ferner wurden die Leukozyten im peripheren Blut von *knock-out*- und C57Bl/6-Mäusen analysiert. Der Begriff Leukozyten bezeichnet mehrere Zellarten, nämlich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. In Abbildung 40 A ist die absolute Leukozytenzahl graphisch

dargestellt, welche bei $PON2^{-/-}$ -Mäusen signifikant erhöht ist. Hingegen zeigen die neutrophilen Granulozyten keine quantitativen Unterschiede (Abbildung 40 B), während die Lymphozyten in $PON2^{-/-}$ -Tieren signifikant erniedrigt sind (Abbildung 40 C). Monozyten (Abbildung 40 D) sowie eosinophile und basophile Granulozyten (Abbildung 40 E+F) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen.

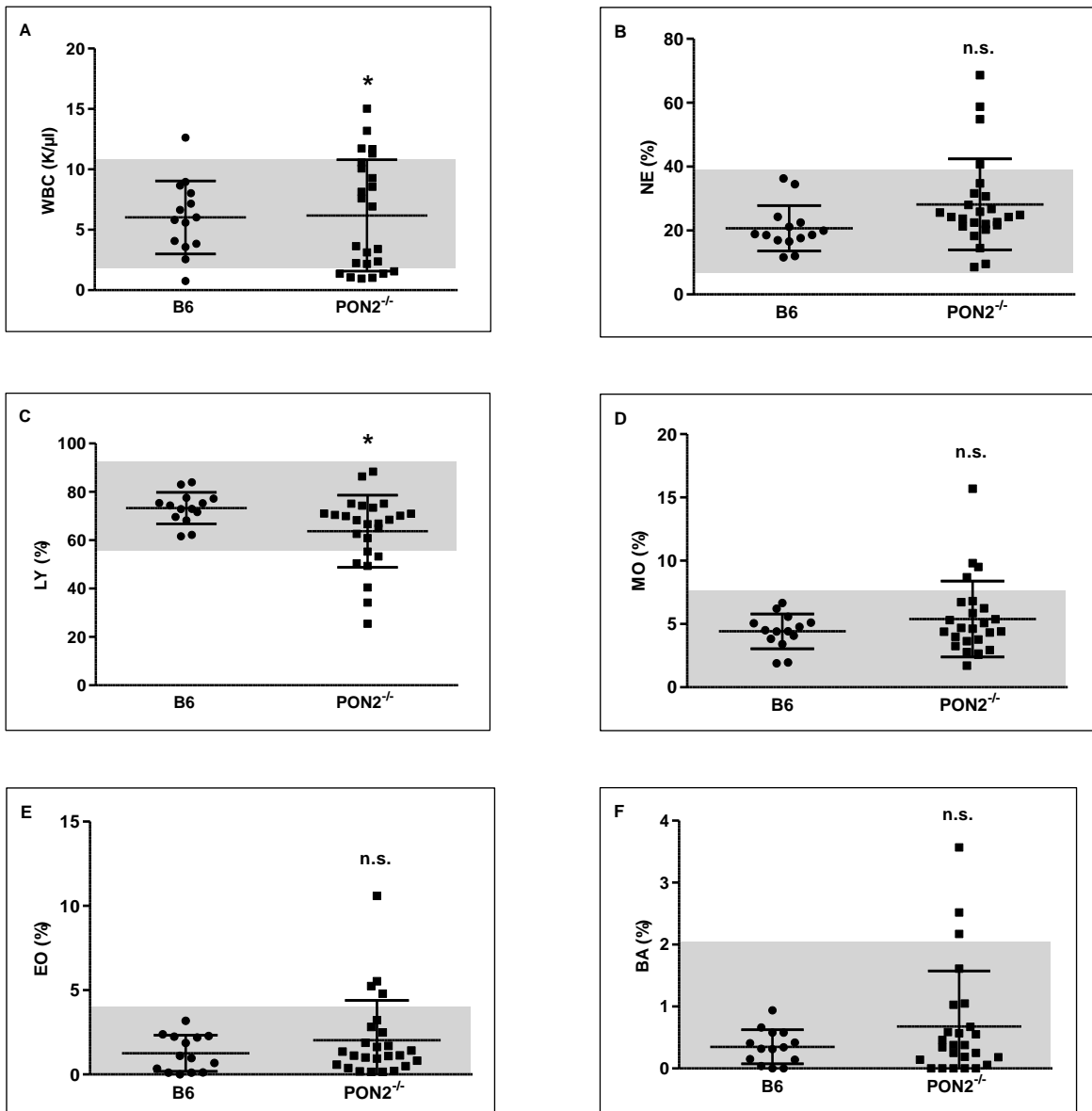


Abbildung 40: Befunde der labormedizinischen Untersuchung des peripheren Blutes von $PON2^{-/-}$ - und C57Bl/6-Mäusen. Den genannten Mausstämmen wurde Blut entnommen und mittels eines HEMAVET-Gerätes labormedizinisch untersucht. A) Leukozytenzahl (*white blood cells*, WBC); B) Gehalt an Neutrophilen (*neutrophils*, NE); C) Lymphozytengehalt (*lymphocytes*, LY); D) Monozytengehalt (*monocytes*, MO); E) Eosinophilengehalt (*eosinophils*, EO); F) Basophilengehalt (*basophils*, BA); der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet den Normbereich des jeweils analysierten Wertes; (*: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$; t-Test).

4.11 Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2^{+/+})

4.11.1 Aufbau des Gene-Targeting-Vektors

Die Voraussetzungen für den Aufbau eines *Targeting*-Vektors sind, dass er mit einer bekannten und definierten Stelle im Genom rekombinieren kann. Demnach muss der Vektor über Sequenzabschnitte verfügen, die homolog zu einer bestimmten endogenen Sequenz sind. Für diesen Zweck wurde der ROSA26-Vektor (freundlichsten zur Verfügung gestellt von Dr. Simone Wörtge, AG Waisman) ausgewählt. Der ROSA26-Lokus ist ubiquitär in der Maus exprimiert und leicht zugänglich für ein *Gene-Targeting*^{100, 111}. Zudem führt die Inaktivierung der ROSA26-Transkripte zu keinem offensichtlich veränderten Phänotyp.

Zur Überexpression des murinen PON2-Gens wurde dessen cDNA-Sequenz aus einem Expressionsklon amplifiziert, über einen Zwischenschritt C-terminal flankiert mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag, und schließlich in den ROSA26-Vektor einkloniert (siehe 3.6.4). Der ROSA26-Vektor enthält, neben den zur endogenen Sequenz homologen Sequenzabschnitten, eine Neomycin-Stopp-Kassette, die es erlaubt, Zellen die das durch homologe Rekombination eingefügte *Gene-Targeting* tragen zu selektionieren. Des Weiteren ist die Selektions-Stopp-Kassette von *loxP*-Sequenzen (*locus of crossover*) in gleicher Orientierung flankiert. Dies ermöglicht die spätere Deletion der Neomycin-Stopp-Kassette durch eine Cre-vermittelte Rekombination. Erst dann ist eine gleichzeitige Expression des murinen PON2-HA und EGFP durch den *Cytomegalovirus enhancer plus chicken beta-actin* Promoter (CAGs-Promoter) möglich. Des Weiteren ist die IRES-EGFP-Kassette mit einer FRT-Sequenz flankiert, die es erlaubt, durch Kreuzung mit einem *Flp-Deleter*-Mausstamm das EGFP zu entfernen. In der schematischen Abbildung 41 ist der Aufbau des zu integrierenden Vektor-Konstruktes in den ROSA26-Lokus durch homologe Rekombination gezeigt. Zudem wird die Cre-vermittelte Deletion der Neomycin-Stopp-Kassette dargestellt.

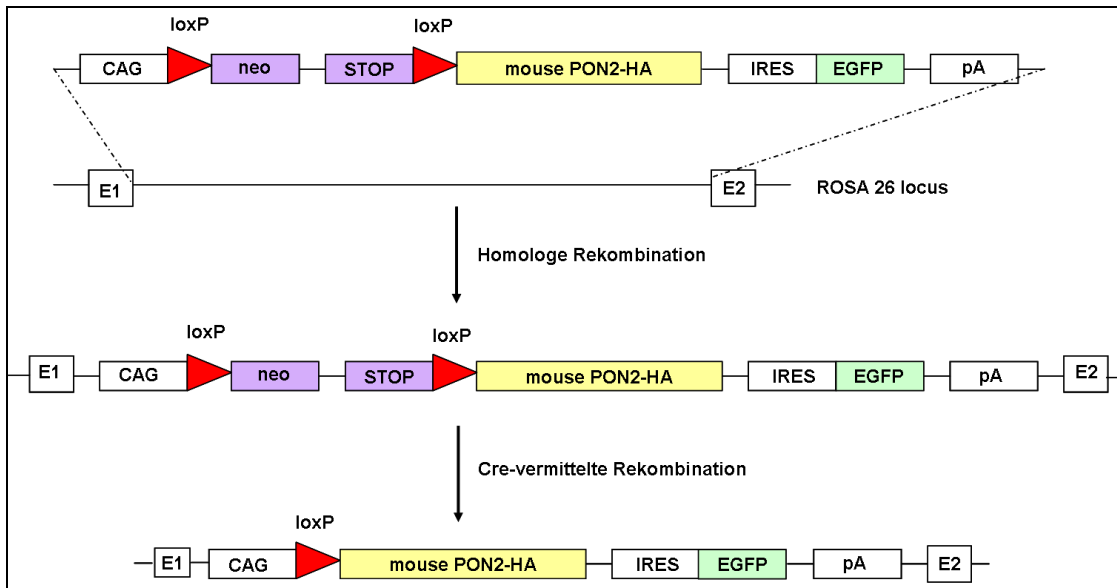


Abbildung 41: Homologe und Cre-vermittelte Rekombination des *Gene-Targeting*-Vektors in den ROSA26-Lokus. Übersicht über das *Gene-Targeting*-Konstrukt, das durch homologe Rekombination in den ROSA26-Lokus eingebracht werden soll. Unten: Darstellung der Cre-vermittelten Deletion der Neomycin-Stopp-Kassette. Erläuterungen siehe Text.

4.11.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Das *Gene-Targeting*-Konstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym *AsiI* linearisiert und durch Elektroporation in murine V6.5 ES-Zellen transfiziert. Nach der Selektion mit Genitocin (G418) wurden resistente ES-Zellkolonien isoliert und expandiert. Anschließend wurde die genomische DNA der Zellklone in einer Southern Blot-Analyse (siehe 3.6.7) auf homologe Rekombinationsereignisse untersucht. Dazu wurde die genomische DNA zunächst mit *EcoRI* restringiert und wie in Abschnitt 3.6.7 beschrieben für den Southern Blot-Analyse eingesetzt. Zur Detektion wurde eine radioaktiv markierte Sonde generiert, welche ca. 1 kbp lang war und vor dem 5'-Bereich des ersten Exons band. Nach erfolgter homologer Rekombination konnten mit der radioaktiv markierten Sonde ein 15,6 kb Wildtyp-Fragment und ein 7,7 kb Fragment für das mutante Allel detektiert werden. Ein 10 kb Fragment konnte durch eine zusätzlich in den Locus eingebrachte *EcoRI*-Schnittstelle, die sich innerhalb der PON2-HA-Kassette befindet, nachgewiesen werden. Abbildung 42 zeigt eine schematische Darstellung der Ereignisse nach erfolgreicher homologer Rekombination und Abbildung 43 zeigt durch die Southern Blot-Analyse positiv auf homologe Rekombination getesteten ES-Zellklone. Von 400 analysierten ES-Zellklonen wurden fünf positiv auf homologe Rekombination getestet.

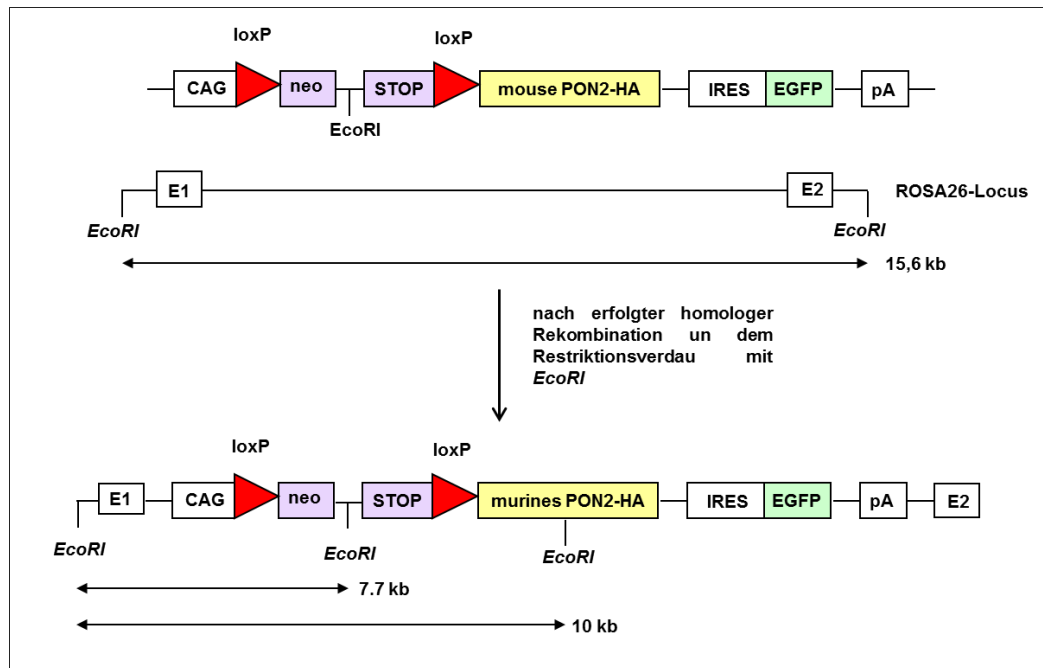


Abbildung 42: Ereignisse nach erfolgreicher homologer Rekombination in den ROSA26-Lokus. Durch die Restriktion mit *EcoRI* werden nach erfolgter homologer Rekombination ein 15,6 kb Wildtyp-Fragment und ein 7,7 kb Fragment für das mutante Allel im Southern Blot detektiert. Des Weiteren kommt es nach der Restriktion mit *EcoRI*, durch eine zusätzlich in das *Gene-Targeting*-Konstrukt eingefügte *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb der PON2-HA-Kassette, zu der Detektierung eines 10 kb-Fragments.

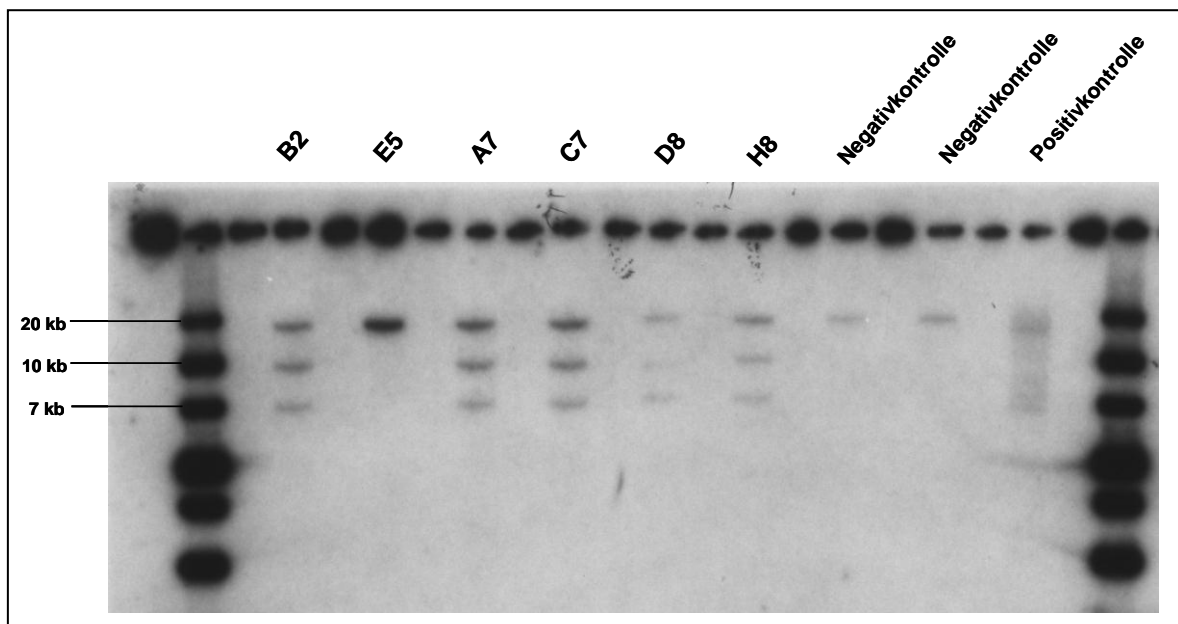
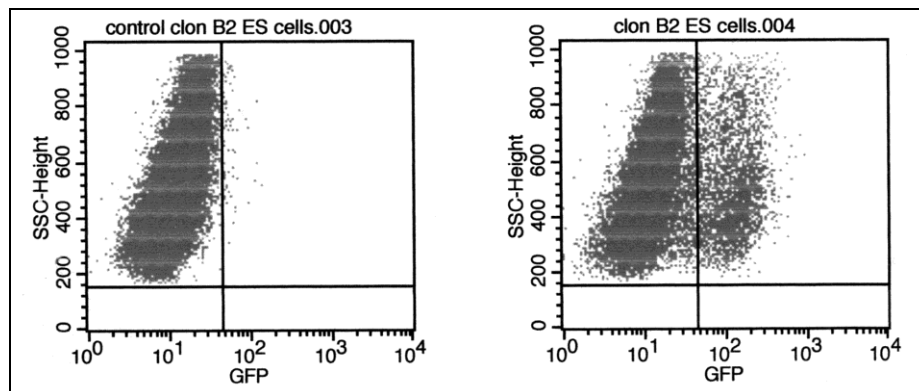


Abbildung 43: Southern Blot-Analyse. Auf dem Röntgenfilm sind die fünf ES-Zellklone (B2, A1, C1, D8 und H8), bei denen es zu einer homologen Rekombination des *Gene-Targeting*-Konstruktes in den ROSA26-Lokus kam, gezeigt. Der ES-Zellklon E5 zeigt nur das 15,6 kb Wildtyp-Fragment. Zudem wurden zwei Negativ- und eine Positiv-Kontrolle aufgetragen.

4.11.3 Cre-induzierbare Expression von GFP in auf homologe Rekombination getesteten ES-Zellklonen

Bevor die positiv auf homologe Rekombination getesteten ES-Zellklone in die Blastozysten von C57Bl/6 Mäusen injiziert wurden, wurde überprüft, ob die Cre-vermittelte Rekombination in diesen Zellklonen erwartungsgemäß funktionierte und zur Expression von PON2-HA und GFP führte; letzteres wurde mittels FACS geprüft. Dazu wurde ein Teil der Zellen der ES-Zellklone mit dem pGK-Cre-Plasmid (freundlichsten zur Verfügung gestellt von Dr. Simone Wörtge, AG Waisman) durch Elektroporation transfiziert oder blieben untransfiziert. Dieses Plasmid induziert die Cre-vermittelte Rekombination und deletiert die Neomycin-Stopp-Kassette aus dem ROSA26-Locus. Dadurch ist der CAGs-Promoter in der Lage die Expression des murinen PON2-HA und von EGFP zu induzieren. Nach 48 Stunden wurden die Zellen durch eine Durchflusszytometrie-Analyse auf das durch den CAGs-Promoter induzierte GFP-Signal untersucht. In Abbildung 44 ist eine repräsentative Analyse gezeigt. In der linken Abbildung sind die untransfizierten ES-Zellklone gezeigt, die kein GFP exprimieren. In der rechten Abbildung sind ES-Zellen mit GFP-Expression durch eine Verlagerung nach rechts in den GFP-Fluoreszenzkanal zu sehen.



Quad	Events	% Gated	% Total	Quad	Events	% Gated	% Total
UL	62376	99,87	84,47	UL	26550	89,51	67,88
UR	81	0,13	0,11	UR	3110	10,49	7,95
LL	0	0,00	0,00	LL	0	0,00	0,00
LR	0	0,00	0,00	LR	0	0,00	0,00

Abbildung 44: Dot-Plot; ES-Zellen wurden mit dem pGK-Cre-Plasmid mittels Elektroporation transfiziert oder blieben unbehandelt. Nach 48 Stunden wurden die ES-Zellen analysiert. Links: untransfizierte Zellpopulation. Rechts: transfizierte Zellpopulation. x-Achse: Fluoreszenzkanal 1: GFP; y-Achse: relative Granulität; gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.11.4 Injektionen und Genotypisierung der Chimären

Für die Injektionen in C57Bl/6-Blastozysten wurden mehrere ES-Zellklone ausgewählt. Jede aus den Klonen entstandene Folgegeneration (F1) wies einen Chimerismus auf. Die F2-Generation wurde anschließend mittels PCR auf den mutierten ROSA26-Lokus hin

untersucht. Insgesamt wurden fast 300 Mäuse auf das durch homologe Rekombination mutierte Allel analysiert, jedoch waren alle durchgeführten PCRs negativ. Im August 2011 teilte Dr. S. Wörtge (Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz) uns mit, dass bei über 90% der durch die AG Waisman gekauften und in dieser Arbeit verwendeten Zellen eine Trisomie 8 festgestellt wurde. Damit war eine erfolgreiche Realisierung des Projektes mit den in der Arbeit verwendeten ES-Zellklonen ausgeschlossen.

5 Diskussion

5.1 Methoden zur Identifizierung PON2-Promoter-bindender Proteine

Bisher ist wenig über die Regulation der Expression des humanen Enzyms PON2 bekannt. Dies ist jedoch von besonderem Interesse, da PON2 mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. PON2 ist auf Grund seiner enzymatischen Laktonase-Aktivität in der Lage das Homoserinlaktone 3OC12, ein Schlüsselmolekül im „quorum sensing“ von *P. aeruginosa* Infektionen, zu hydrolysieren und zu inaktivieren^{14, 15, 44}. Als Teil der angeborenen Immunität schützt PON2 vermutlich vor bakteriellen *Pseudomonas* Infektionen, indem es den essentiellen Virulenzfaktor 3OC12 hydrolysiert^{44, 46, 47}. Des Weiteren werden genetische Polymorphismen des PON2-Gens sowohl mit kardiovaskulären Erkrankungen als auch diabetischen Komplikationen in Verbindung gebracht^{50, 51}, obwohl hier auch gegensätzliche Studienergebnisse vorliegen³⁴. Mechanistisch wird bisher davon ausgegangen, dass die PON2-Proteinexpression in der Zelle negativ mit der Bildung von oxidativem Stress korreliert und so der Schutz vor Arteriosklerose begründet ist^{21, 23}. Hierzu passend wurde beschrieben, dass die PON2-Expression in humanen Carotis-Läsionen negativ korreliert mit dem Fortschreiten der Arteriosklerose¹¹². Ferner wird PON2 mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie ALS, und Krebs in Verbindung gebracht^{61, 72-75, 77, 113-115}.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von drei Verfahren eine Vielzahl PON2-Promoter-bindender Proteine identifiziert. Der Vorteil dabei war, dass die Methoden völlig unabhängig voneinander waren. In einem ersten Ansatz wurden aus einem komplexen nukleären Proteingemisch Proteine, die spezifisch an die PON2-Promoter-Sequenz banden, mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden (MS und LC / MS) detektiert (siehe Abschnitt 4.1).

Ergänzend dazu wurde die PON2-Promoter-Sequenz durch verschiedene Programme in einer *in silico*-Analyse auf mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren untersucht (siehe Abschnitt 4.2). Durch diese Art der Analyse wurden konservierte Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz zwischen verschiedenen Spezies charakterisiert. Jene Genloci, die im Laufe der Zeit nur einer geringen Diversität unterliegen, also konserviert sind, werden als wichtig oder entscheidend für die Proteinfunktion im Verlauf der Evolution angesehen.

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe fand man, dass die PON2-Expression in verschiedenen Tumoren, u. a. in Lymphomen, im Vergleich zu gesundem Gewebe gesteigert ist. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass eine Überexpression von PON2 leukämische K562-Zellen vor einer Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Imatinib (Glivec®) schützt. Im Gegensatz dazu führte der *knock-down* des PON2-Proteins in diesen Zellen zu einer spontanen Apoptose ⁶¹. Aufgrund dieser Analysen wurden K562-Zellen benutzt, um Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die PON2 regulieren könnten und in direktem Zusammenhang mit Leukämien stehen. Dazu wurden wie in Abschnitt 4.3 beschrieben über 70 Transkriptionsfaktoren durch spezifische siRNAs herunterreguliert und anschließend die PON2-mRNA-Expression analysiert. Dabei fiel unter anderem auf, dass die meisten der untersuchten Transkriptionsfaktoren offensichtlich eine positive Regulation der PON2-Expression bewirkten.

Die drei in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur Identifizierung PON2-Promoter-bindender bzw. regulierender Faktoren zeigen in ihrer Analyse voneinander unabhängige Verfahren, die sich in ihrer Gesamtheit ergänzen. Neben Bindungspartnern, die durch die massenspektrometrischen und *in silico* Methoden gefunden wurden, wurden mögliche konservierte Bindungsstellen und eine evtl. Regulation durch einen bestimmten Transkriptionsfaktor (Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse) gezeigt. Dabei wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit einer Vorhersage steigt, wenn bestimmte Proteine / Transkriptionsfaktoren von mehr als einer Methode vorhergesagt werden. Untermuert wird dies durch die Tatsache, dass Einzelfunde wie z. B. AUF-1 oder HIF-1 α offensichtlich keine Rolle bei der Regulation der Expression von PON2 spielen (siehe Abschnitte 4.5 und 4.6). Dagegen zeigen Mehrfachfunde wie LEF-1 oder FoxO4 eine Beteiligung an der Regulation der PON2-Expression (siehe Abschnitte 4.8.3 und 4.8.6).

5.2 Das mRNA-bindende Protein AUF-1 ist nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt

Das mRNA-bindende Protein AUF-1 wurde mit Hilfe der massenspektrometrischen Methoden als PON2-Promoter-bindendes Protein charakterisiert. Zwar handelt es sich bei AUF-1 um keinen Transkriptionsfaktor, jedoch ist das Protein an Vorgängen wie pre-mRNA-*Splicing* und mRNA-Bindung beteiligt ¹⁰³. Aus der Literatur gibt es Hinweise wonach eine Überexpression von AUF-1 zur Deregelation einiger mRNAs führt und so die Tumorgenese anregt ¹¹⁶. Zudem ging ein *knock-down* aller AUF-1-Isoformen mit einer Inhibierung des Wachstums bei einigen Krebszelllinien einher, wohingegen die Überexpression von AUF-1 zum Wachstum führte ¹¹⁷. Dieser protektive Effekt von AUF-1 in einigen Krebszelllinien wurde als Anlass genommen, um die Rolle von AUF-1 bei der Regulation der PON2-

Expression genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse in Abschnitt 4.5 zeigen jedoch, dass das ubiquitär exprimierte RNA-bindende Protein AUF-1 nicht an der Regulation der PON2-Expression beteiligt ist. Es erscheint somit möglich, dass AUF-1 in der durchgeführten Analyse falsch-positiv an die angebotene PON2-Promoter-DNA band, vermutlich aufgrund seiner hohen Affinität zu Nukleinsäuren. Ebenso wurde dieser Faktor in den *in silico*-Vorhersagen nicht aufgeführt, wobei sich diese vermutlich ausschließlich auf Transkriptionsfaktoren begrenzen.

5.3 Hypoxie und der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 α steigern nicht die Expression des PON2-Proteins

Ein Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der *in silico*-Analyse identifiziert wurde, ist der ubiquitär exprimierte Hypoxie-induzierte Faktor-1 α (HIF-1 α). Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α hydroxyliert und proteosomal abgebaut⁶⁸. Bei Sauerstoffmangel wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert in den Kern. Dort reguliert HIF-1 α die Expression einer Reihe von Genen, die in verschiedenen Signalwegen wie Glukoseaufnahme, Wachstum, Angiogenese und Zelltod involviert sind⁶⁹. Je nach Tumor kommt es in den betroffenen Zellen und Geweben gegebenenfalls zu einer Mangelversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Aufgrund der entstehenden Hypoxie wird mehr ROS generiert, was wiederum zu einer Aktivierung von HIF-1 α führt⁶⁹. Dementsprechend haben sich Tumore die durch HIF-1 α aktivierten Signalwege, die zum Überleben der Zelle unter Hypoxie führen, zu Nutze gemacht. Hierunter fallen unter anderem die Angiogenese, Proliferation und Stress-Resistenz. Die fälschliche Aktivierung von HIF-1 α führt zumeist zu einem malignen Phänotyp und einer aggressiven Tumorentwicklung. Ferner ist HIF-1 α mit einer erhöhten Metastasierung und einer schlechten Überlebensrate bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom verbunden⁶⁴.

PON2 ist ein anti-oxidatives und anti-apoptotisches Protein, welches in mehreren Tumoren überexprimiert wird^{23, 61}. Normalerweise stellt die Apoptose eine natürliche Barriere für die Krebsentwicklung dar, unter anderem auch weil bei der Tumorentstehung eine Mangelversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ein pro-oxidatives Milieu erzeugt⁶⁴. Dies führt zu einer Aktivierung von HIF-1 α . Neben der Aktivierung des für die Angiogenese wichtigen Proteins VEGF⁷¹ wäre es unter hypoxischen Bedingungen möglich, dass es zu einer Steigerung der PON2-Expression kommt – entweder durch die oxidative Stimulation, welche bekanntermaßen die PON2-Expression induziert^{21, 59} oder direkt durch HIF-1 α . Mit der Aktivierung der PON2-Expression würde sich der Tumor sowohl die anti-oxidative als auch anti-apoptotische Funktion des Enzyms zu Nutze machen. Des Weiteren wird durch die

Steigerung an Proteinfaltungsreaktionen bei der Tumorbildung der UPR-Signalweg aktiviert⁶⁸. PON2 ist in der Lage die ER-Stress-induzierte Apoptose durch die Reduzierung des pro-apoptotischen CHOP-Proteins zu verhindern⁶¹. Ferner inhibiert PON2 die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung⁶¹. Das Protein PON2 wäre damit ein ideales Ziel bei der Bildung und Weiterentwicklung von Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Hypoxie auf die PON2-Expression untersucht (siehe Abschnitt 4.6). Weder die endotheliale Zelllinie EA.hy 926 noch die Adenokarzinomzelllinie A549 zeigten auf mRNA- und Proteinebene eine Steigerung der PON2-Expression unter hypoxischen Bedingungen. Um zu zeigen, dass die Zellen tatsächlich unter Hypoxie litten, wurde gleichzeitig die HIF-1 α -Proteinexpression in beiden Zelllinien bestimmt. Da die Expression von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen deutlich gesteigert war, muss davon ausgegangen werden, dass die PON2-Expression in den untersuchten Zelllinien nicht durch Hypoxie aktiviert wird. Die durch Hypoxie ausgelöste Aktivierung von HIF-1 α ist somit ebenfalls nicht an der Regulation der PON2-Expression in EA.hy 926- und A549-Zellen beteiligt. Folglich wird die PON2-Expression in Tumoren vermutlich durch andere Signalwege positiv reguliert, zumindest in Tumoren mit endothelialen Anteilen (bzw. den entsprechenden Gefäßanteilen) oder in epithelialen Lungentumoren, für welche die benutzten Zellen repräsentativ sein könnten.

5.4 Die Regulation der PON2-Expression in Leukämiezellen

In mehreren unabhängigen Microarray-Analysen wurde ein Zusammenhang zwischen PON2 und verschiedenen Krebserkrankungen gefunden⁷²⁻⁷⁶. Interessanterweise wurde PON2 mit einer Imatinib-Resistenz bei CML-Patienten assoziiert⁷⁷. Im Einklang mit diesen Ergebnissen weisen viele Tumore, insbesondere Leukämien, eine erhöhte Expression des PON2-Proteins auf⁶¹. Des Weiteren schützt PON2 verschiedene Tumorzelllinien vor einer Behandlung mit Chemotherapeutika. Der *knock-down* des Proteins führt dagegen zu einer spontanen Apoptose in den untersuchten Zellen. PON2 ist damit als pro-Onkogen anzusehen. Wie die gesteigerte PON2-Expression in Tumoren hauptsächlich Leukämien zu Stande kommt und welche regulatorischen Mechanismen daran beteiligt sind, ist bisher unbekannt.

Eine Vielzahl von Leukämien ist mit der t(9;22)(q34;q11) chromosomalen Translokation, dem sogenannten „Philadelphia-Chromosom“, assoziiert. Die Translokation führt zur Entstehung des bcr-abl-Onkogens durch eine Verschmelzung des bcr-Gens auf Chromosom 22 mit dem c-abl-Gen auf Chromosom 9¹⁰⁴. Bcr / Abl ist ein Zytoplasmprotein mit einer konstitutiven Tyrosinkinaseaktivität, die zu einer abnormalen Vermehrung von Leukozyten führt. So besitzen 90% der CML-, 30% der ALL- und 5% der AML-Patienten das „Philadelphia-Chromosom“. Medikamentös behandeln kann man „Philadelphia-Chromosom-positive

Patienten“ mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, sowie den Weiterentwicklungen Dasatinib, Nilotinib und anderen. Der Kinaseinhibitor Imatinib hemmt kompetitiv und selektiv die Kinasedomäne des Bcr / Abl-Proteins und gilt als eines der ersten Präparate, welches gezielt molekularbiologisch entwickelt worden ist ¹¹⁸. Während der Therapie mit Imatinib zeigt sich jedoch bei drei von neun Patienten eine Resistenz gegen das Medikament. Klinische Studien belegen, dass dies bei 50 – 90% der Patienten auf eine Mutation innerhalb der Kinasedomäne des Bcr / Abl-Proteins zurückzuführen ist. Da dies der Angriffsort von Imatinib ist, bleiben in der Folge auch hohe therapeutische Dosen wirkungslos. In klinischen Studien wurde bisher nur eine weitere Art der Resistenz nachgewiesen ^{119, 120}. Demnach führt eine Duplikation des bcr / abl-Gens zum Verlust der Wirkung von Imatinib ¹¹⁹.

Aufgrund der pro-onkogenen Funktionen von PON2 wurde in Abschnitt 4.7.1 untersucht, ob die Expression der Tyrosinkinase Bcr / Abl die PON2-Expression steigert. Dazu wurde die PON2-Proteinexpression in einem induzierbaren Bcr / Abl-Expressionssystem untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es keinen Hinweis auf eine Modifikation der PON2-Expression durch Bcr / Abl gab. Ob die mit PON2 in Verbindung gebrachte Imatinib-Resistenz bei CML-Patienten ebenfalls Bcr / Abl-unabhängig ist bleibt jedoch unklar, da die gezeigten Ergebnisse auf murinen und nicht humanen Zellen basieren. Zudem ist es fraglich, ob die Ergebnisse einer Zelllinie auf einen Organismus übertragbar sind. Im Organismus selbst wäre dies wahrscheinlich auch abhängig vom Stroma selbst, dem umgebenden Gewebe und eventuell anderen aktivierten Signalwegen. Des Weiteren ist unbekannt, ob die im Experiment gewählte Zeit sinnvoll war, eventuell hätte man einen späteren Zeitpunkt zur Lyse der Zelle wählen können.

In einem weiteren Experiment wurde die PON2-Expression in Imatinib-sensitiven und Imatinib-resistenten CML-Zelllinien untersucht (Abschnitt 4.7.4). Im Vergleich zu Imatinib-sensitiven Zelllinien zeigten die Imatinib-resistenten Zelllinien eine signifikante Steigerung der PON2-Expression, was mit oben beschriebener Rolle von PON2 zur Imatinib-Resistenz passen könnte. Wie bereits erwähnt, wurde eine Regulation des PON2-Proteins durch eine gesteigerte Expression der Tyrosinkinase Bcr / Abl, zumindest in murinen TonB-Zellen, nicht nachgewiesen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass PON2 durch alternative Signalwege in der Zelle aktiviert wird. Durch die Expression der Tyrosinkinase Bcr / Abl werden auch andere Signalwege wie Ras / Raf / MEK / ERK und PI3K / Akt induziert ¹¹⁹. Beide Signalwege münden in der Aktivierung der Kinase ERK. Daraufhin transloziert ERK in den Kern und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren. Dies führt zur Transkription von Genen, die für Proteine kodieren die eine Tumorgenese fördern, wie z. B. Wachstumsfaktoren und anti-apoptotische Proteine. In Makrophagen wurde bereits gezeigt, dass eine uPA-vermittelte Steigerung der PON2-Expression durch ERK reguliert wird ⁸⁰. Ob

ERK an einer PON2-vermittelten Imatinib-Resistenz in Leukämiezellen involviert ist, wird in Abschnitt 5.5.1 ausführlich diskutiert.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer Steigerung der PON2-Expression in Leukämien führen könnte, wäre über die *Fms-like* Tyrosinkinase 3 (Flt3). Flt3 gehört zur Familie der Klasse III Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird in der Hämatopoese ausschließlich in hämatopoetischen Progenitorzellen und CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) exprimiert¹²¹. Ein Drittel aller AML-Patienten tragen eine Mutation, bei der es zu einer internen Tandemduplikation (ITD) in der juxtamembranären Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase kommt¹²². Die Flt3-ITD verursacht eine konstitutive Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, wie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K / Akt) und *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-related kinase* (MAPK / ERK)^{123, 124}. Dadurch werden die Proliferation und das Überleben sowie die myeloische Differenzierung und die leukämische Transformation von hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark von Mäusen induziert¹²⁵⁻¹²⁸. Fuhrman et al. zeigten, dass die uPA-induzierte Steigerung der PON2-Expression in Makrophagen durch die Kinase ERK vermittelt wird⁸⁰. Wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben wurde der Effekt der Flt3-ITD auf die PON2-Expression untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die PON2-Expression durch eine vorhandene Flt3-ITD nicht gesteigert wurde verglichen mit Zellen, die die Wildtypform des Flt3-Proteins exprimierten. Demnach ist eine Regulation von PON2 durch die Tyrosinkinase Flt3 auszuschließen.

In Abschnitt 4.7.3 wurde die Expression von PON2 in verschiedenen AML-Zelllinien mit der in der Adenokarzinomzelllinie A549 verglichen. A549-Zellen weisen eine starke endogene PON2-Expression auf. Bei einem *knock-down* des PON2-Proteins wird in diesen Zellen eine spontane Apoptose ausgelöst⁶¹. Es wurde festgestellt, dass die Menge an endogenem PON2 zumindest in den untersuchten Zellen geringer erschien in Relation zu A549-Zellen. Zu beachten ist, dass kein Normalgewebe als Vergleich analysiert wurde, daher wurde nur beurteilt, ob sich die Expression von PON2 in den untersuchten AML-Zelllinien von der in A549-Zellen tendenziell unterschied. Interessanterweise exprimierten HL-60-Zellen fast gar kein PON2. Von den anderen analysierten Zellen zeigten nur THP-1-Zellen eine etwas stärkere PON2-Expression. Daher scheint PON2 in HL-60-, Molm-13- und MV4-11-Zellen wahrscheinlich keine wichtige pro-onkogene Funktion zuzukommen, wie das der Fall bei A549-Zellen ist. Die Ergebnisse weisen zudem daraufhin, dass nicht jede Leukämieform bzw. Tumorform mit einer hohen PON2-Expression assoziiert ist. Ob PON2 eine Rolle als genereller Tumormarker bei Leukämien bzw. Tumoren zugesprochen werden kann, ist daher unwahrscheinlich. Daher hängt die Assoziation von PON2 und Tumor gegebenenfalls vom jeweiligen Gewebe ab. Dies belegen zudem die Ergebnisse von Witte et al., die zeigten, dass nicht jeder Tumor eine starke PON2-Expression aufweist⁷⁸.

5.5 Die Regulation der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562

5.5.1 Die PON2-Proteinexpression in K562-Zellen wird nicht durch das Chemotherapeutikum Imatinib oder die Kinase ERK reguliert

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.8.1 zeigen, dass die PON2-Expression signifikant in Imatinib-resistenten Zellen gesteigert ist. Zudem ist dieser Effekt offensichtlich Bcr / Abl-unabhängig (Abschnitt 4.7.1). In der vorliegenden Arbeit sollte u. a. untersucht werden, ob es in der CML-Zelllinie K562 zu einer Imatinib-vermittelten Steigerung der PON2-Expression kommt. Eine Behandlung mit einer subletalen Dosis Imatinib zeigte keine Änderung in der PON2-Expression. Aufgrund der beschriebenen anti-apoptotischen Rolle von PON2⁶¹ erschien es möglich, dass K562-Zellen kompensatorisch die PON2-Expression nach Behandlung mit Imatinib steigern könnten. Dies scheint jedoch nicht vorzukommen.

Innerhalb der Zelle regt die Tyrosinkinase Bcr / Abl noch andere Signalwege an, wie z. B den Ras / Raf / MEK / ERK- oder PI3K / Akt-Signalweg¹¹⁹. Beide Signalwege sind in verschiedenen Tumoren überschießend aktiviert und führen zu einer gesteigerten Tumorentwicklung^{107, 108}. Ferner führen beide Signalwege zu einer Phosphorylierung und damit einer Aktivierung der Kinase ERK. Wie bereits erwähnt aktiviert ERK eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die die Transkription verschiedener Proteine die die Tumorgenese positiv beeinflussen, fördern^{107, 108}. Es scheint daher plausibel, dass PON2 mit seinen anti-apoptotischen und anti-oxidativen Eigenschaften ein Zielgen von ERK ist. In THP-1-Makrophagen wurde bereits eine ERK-vermittelte Regulation der PON2-Expression nachgewiesen⁸⁰. Ferner gibt es mehrere Hinweise, wonach eine Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Imatinib durch eine gesteigerte Phosphorylierung der Kinase ERK hervorgerufen wird^{108, 129}. Um zu analysieren, ob ERK an der Regulation der PON2-Expression beteiligt ist, wurden K562-Zellen für drei Tage mit dem ERK-Inhibitor PD 98059 behandelt (siehe Abschnitt 4.8.1). Die Ergebnisse zeigen, dass dies keinen Einfluss auf die Expression und damit die Regulation von PON2 hat. Damit ist die endogene PON2-Expression in K562-Zellen, im Gegensatz zu THP-1-Makrophagen, ERK-unabhängig.

Ergänzend wurde der Effekt einer Kombination von ERK-Inhibitor PD 98059 und Imatinib auf die PON2-Expression untersucht (Abschnitt 4.8.1). Dabei wurde festgestellt, dass die PON2-Expression am dritten Tag der Doppelbehandlung leicht, aber nicht signifikant anstieg. Folglich ergaben sich insgesamt keine Hinweise darauf, dass ERK oder Imatinib in K562 Zellen die endogene PON2-Expression modulieren.

5.5.2 Die durch GSK-3 β -vermittelte Steigerung der PON2-Expression in K562-Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor LEF-1 reguliert

In den Abschnitten 4.2 und 4.3 wurden durch eine *in silico* und eine Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse Transkriptionsfaktoren der LEF-1 / TCF-Familie als PON2-regulierende Faktoren identifiziert. Während die *in silico*-Analyse prinzipiell nur die Wahrscheinlichkeit einer Bindung anzeigt, ergab der *knock-down* dieser Faktoren, dass LEF-1 ein positiver und TCF4 ein negativer Regulator der PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 sind.

Die Transkriptionsfaktoren der LEF-1 / TCF-Familie sind in den Wnt / β -Catenin-Signalweg involviert ¹⁰⁹. Dieser Signalweg ist abhängig von einer Aktivierung durch Wnt-Proteine (extrazelluläre Liganden), die im Folgenden zu einer Stabilisierung von β -Catenin führen. Unter normalen Umständen wird der Gehalt an β -Catenin gering gehalten. In Abbildung 45 sind die Vorgänge bei An- und Abwesenheit von Wnt-Proteinen schematisch dargestellt. Bei der Abwesenheit von Wnt-Proteinen (Abbildung 45 linke Seite) bindet β -Catenin an einen im Zytoplasma befindlichen Proteinkomplex bestehend aus Axin, APC und der Serin- / Threonin-Proteinkinase GSK-3 β . GSK-3 β phosphoryliert β -Catenin, infolgedessen wird β -Catenin proteasomal abgebaut. Währenddessen binden die Transkriptionsfaktoren der LEF-1 / TCF-Familie im Zellkern an die DNA, jedoch ohne eine Transkription einzuleiten. Ohne β -Catenin sind diese Transkriptionsfaktoren aufgrund einer sterischen Inhibierung durch Groucho nicht in der Lage die Transkription zu aktivieren und wirken als Inhibitoren. Wird der Wnt / β -Catenin-Signalweg durch Wnt-Proteine, die an die entsprechenden Rezeptoren Frizzled und LRP 5 / 6 binden aktiviert, wird der Proteinkomplex aus Axin, APC und GSK-3 β nicht gebildet (Abbildung 45 rechte Seite). Folglich wird β -Catenin weder phosphoryliert noch abgebaut, sondern transloziert in den Zellkern, wo es Groucho verdrängt indem es an die β -Catenin-Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren LEF-1 / TCF bindet. Dies aktiviert die Transkription bestimmter Wnt-Zielgene, welche zentrale Prozesse regulieren wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose ^{109, 130}.

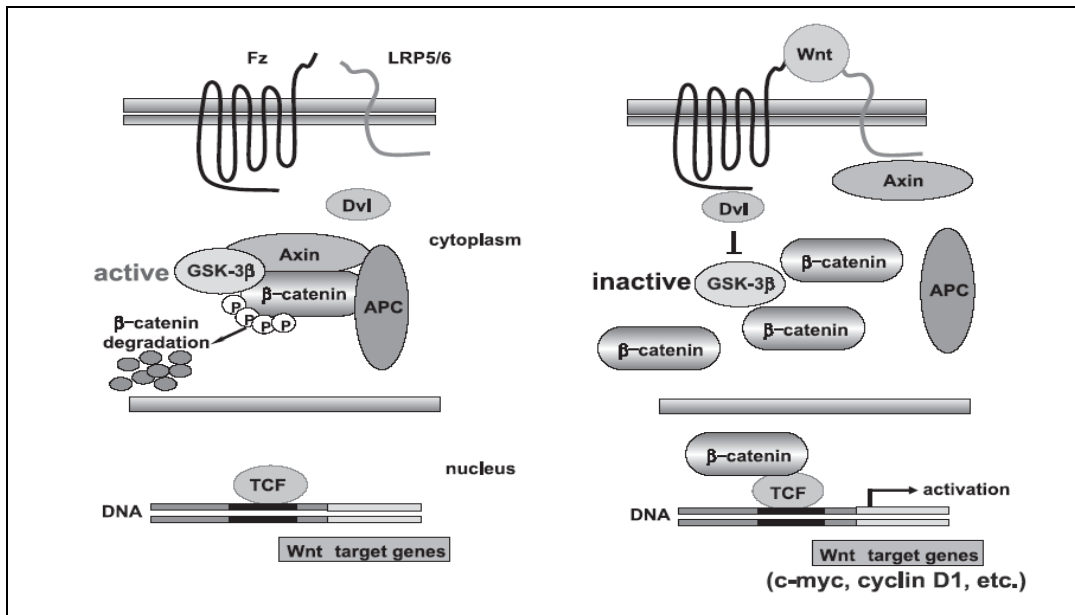


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Wnt / β -Catenin-Signalweges bei An- und Abwesenheit von Wnt-Proteinen. Verändert nach ¹³¹. Erläuterungen siehe Text.

Der Wnt / β -Catenin-Signalweg kann überschießend aktiviert werden z. B. durch Mutationen, welche letztlich die Kinase GSK-3 β blockieren. Da dies oftmals zur überproportionalen Aktivierung von proliferativen und anti-apoptotischen Faktoren führt, ist eine konstitutive Aktivierung des Wnt / β -Catenin-Signalweges an der Entstehung verschiedener Krebsarten beteiligt ^{130, 132}. Innerhalb des Wnt / β -Catenin-Signalweges fungiert die Proteinkinase GSK-3 β somit als negativer Regulator. Durch eine Blockade von GSK-3 β kann untersucht werden, ob ein bestimmtes Protein wie z. B. PON2 ein mögliches Zielgen im Wnt / β -Catenin-Signalweg darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde wie in Abschnitt 4.8.2 beschrieben die Auswirkung der Inhibierung der Kinase GSK-3 β in der CML-Zelllinie K562 untersucht. Der GSK-3 β -Inhibitor Valproinsäure führte zu einer signifikanten Steigerung der PON2-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Valproinsäure ist jedoch nicht spezifisch für GSK-3 β ¹³², so dass ebenso der spezifischere GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 verwendet wurde. Dies ergab ebenfalls, dass die Inhibierung von GSK-3 β zu einer signifikanten Steigerung der PON2-Promoter-Aktivität, der PON2-mRNA- und Proteinexpression führt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlich langer PON2-Promoter-Fragmente wurde zudem gezeigt, dass sich innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz eine Vielzahl von regulatorischen LEF-1 / TCF-Bindungsstellen befinden. Durch das kürzere 2,5 kb lange PON2-Promoter-Fragment, das die Region -2249 bis +112 des humanen PON2-Gens einschließt, wurde durch die Inhibierung von GSK-3 β der PON2-Promoter 7-fach induziert. Unter Verwendung des 7,5 kb langen PON2-Promoter-Fragments, das den Bereich -7343 bis +114 des humanen PON2-Gens umfasst, wurde innerhalb der gleichen Zeit und durch die gleiche Behandlung eine 12-fache Induktion gemessen. Die geringere Induktion des 2,5 kb langen PON2-Promoter-Fragments deutet darauf hin, dass

sich innerhalb dieser Sequenz weniger regulatorische LEF-1 / TCF-Bindungsstellen befinden als im 7,5 kb langen PON2-Promoter-Fragment. Dieses Ergebnis weist zudem darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren der LEF-1 / TCF-Familie an mehreren Stellen innerhalb des PON2-Promoters binden und so die Transkription von PON2 erhöhen.

Um zu analysieren welches Mitglied der LEF-1 / TCF-Familie an der Transkription von PON2 beteiligt ist, wurde als nächstes mit Hilfe von dominant-negativen (dn) Mutationen der LEF-1 / TCF-Familie die GSK-3 β -vermittelte Aktivierung des PON2-Promoters untersucht (Abschnitt 4.8.3). Die Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor TCF1 keinen Effekt auf die durch GSK-3 β vermittelte PON2-Promoteraktivierung hatte. Anders war dies bei den Transkriptionsfaktoren LEF-1 und TCF4, da die dn-Mutation von LEF-1 im Experiment die PON2-Promoteraktivität inhibierte, wohingegen das dnTCF4 die PON2-Promoter-Aktivität steigerte. Folglich steigert LEF-1 die PON2-Promoteraktivität, wohingegen TCF4 sie reduziert. Der gezeigte Effekt auf Promoterebene wurde zudem durch die Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse auf mRNA-Ebene bestätigt (siehe Abschnitt 4.3).

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob LEF-1 tatsächlich an den PON2-Promoter bindet und die Transkription von PON2 aktiviert. Mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIPs) (siehe Abschnitt 4.8.4) wurde untersucht, ob LEF-1 direkt an vorhergesagte und konservierte Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz bindet. In diesem Experiment war es nicht möglich die Bindung von LEF-1 an die PON2-Promoter-Sequenz nachzuweisen. Der verwendete LEF-1 Antikörper war vom Hersteller als ungeeignet für ChIP-Analysen angegeben worden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die ChIP-Analyse mit diesem Antikörper nicht funktionieren konnte. Im Vorfeld wurde jedoch gezeigt, dass der Antikörper im Western Blot sehr gut funktionierte und sehr spezifisch LEF-1 aus einem Gesamtzell-Proteinlysate detektierte. Zum Zeitpunkt der Durchführung der ChIP-Analysen war kein Antikörper auffindbar, der spezifisch LEF-1 detektiert und zudem noch erfolgreich bei ChIP-Analysen eingesetzt wurde. Die integrierte Positivkontrolle NFY zeigte die Funktionalität der ChIP Methode, nämlich eine Anreicherung des NFY-Proteins, das an seinen eigenen Promoter bindet. Das Ergebnis weist darauf hin, dass der im Versuch verwendete LEF-1-Antikörper nicht in der Lage war, Bindungsstellen innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz anzureichern. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich bei den in dieser Arbeit analysierten LEF-1-Bindungsstellen um keine regulatorischen Elemente handelt. Ein Nachteil der *in silico*-Analyse ist, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die identifizierten und als konserviert bezeichneten Bindungsstellen auch wirklich in die Regulation eingebunden sind. Aus diesem Grund wurden die Primerpaare für die ChIP-Analyse so ausgewählt, dass sie mehr oder weniger die komplette PON2-Promoter-Sequenz abdeckten. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit

erhöht werden, dass auch eine Anreicherung von Bindungsstellen, die nicht durch die Primerpaare abgedeckt wurden, erfolgen konnte.

In einer weiteren ChIP-Analyse wurden die Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 behandelt, um den β -Catenin Gehalt in der Zelle zu steigern. Dadurch wurde versucht die Bindung von β -Catenin an LEF-1 durch den Einsatz von drei verschiedenen β -Catenin Antikörpern nachzuweisen. Es wurde keine Anreicherung von LEF-1-Bindungsstellen durch die verwendeten Antikörper nachgewiesen. Durch den Einsatz von Primerpaaren, die bestimmte Wnt / β -Catenin-Zielgene detektieren wurde jedoch gezeigt, dass Wnt-Zielgene mit den verwendeten Antikörpern angereichert wurden. Dies zeigt, dass die verwendeten Antikörper β -Catenin und dessen (Kern-) Bindungspartner aus einem Chromatingemisch detektieren und anreicherten. Damit ist es wahrscheinlich, dass die für den Versuch designten Primerpaare keine LEF-1-Bindungsstellen detektieren, die an der Expression von PON2 beteiligt sind. In zukünftigen Experimenten sollten daher alle anderen vorhergesagten LEF-1-Bindungsstellen in ChIP-Analysen überprüft werden. Alternativ könnte man versuchen, durch die Verwendung eines DNA-Polymerase-2a Antikörpers und Primerpaaren, die innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz LEF-1-Bindungsstellen detektieren, eine Transkription nachzuweisen. Man würde so zeigen, dass es innerhalb der PON2-Promoter-Sequenz durch die Inhibierung von GSK-3 β zu einer Transkription des PON2-Gens an LEF-1 Bindungsstellen kommt.

5.6 Modell zur Regulation der Expression des humanen Enzyms PON2 in der Leukämiezelllinie K562

In diesem Abschnitt wird diskutiert aufgrund welcher regulatorischen Mechanismen es in K562-Zellen zu einer Steigerung oder Inhibition der PON2-Expression kommt. In Abbildung 46 wurden die möglichen Signalwege die an der Regulation der PON2-Expression beteiligt sind, schematisch dargestellt.

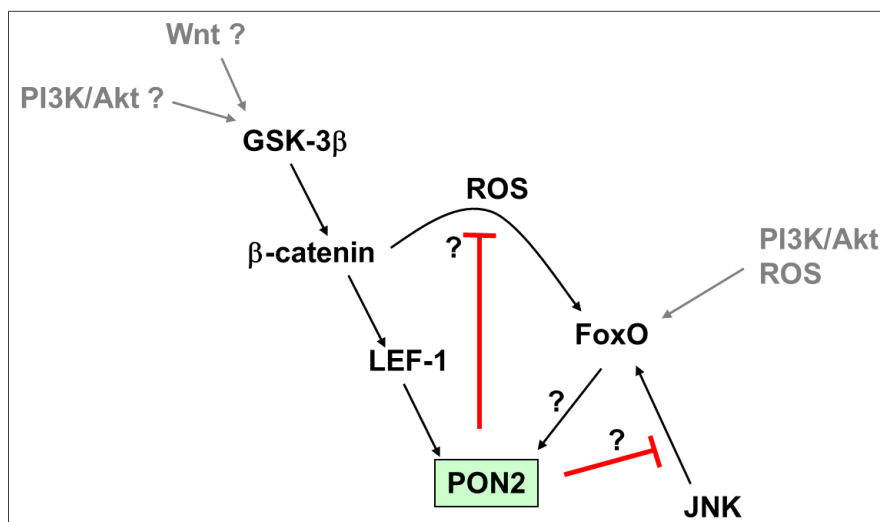


Abbildung 46: Schematische Darstellung einer möglichen Regulation von PON2 durch ROS und die Signalwege Wnt / β -Catenin, PI3K / Akt, JNK und die Transkriptionsfaktorfamilie FoxO. Erläuterungen siehe Text.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente belegen, dass die Inhibierung der Serin- / Threonin-Proteinkinase GSK-3 β zu einer transkriptionellen Steigerung der Expression des PON2-Proteins führt. Die Daten zeigen, dass die Aktivierung von PON2 wahrscheinlich durch LEF-1 gesteigert und durch TCF4 reduziert wird. Die Kinase GSK-3 β ist u. a. als negativer Regulator in den Wnt / β -Catenin-Signalweg involviert. Die Verwendung von Wnt / β -Catenin-Aktivatoren inhibiert daher die Kinase GSK-3 β und sollte die LEF-1-Induktion steigern. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde als Aktivator für den Wnt / β -Catenin-Signalweg das humane rekombinante Protein Wnt3a verwendet (siehe 4.8.5). Dabei wurde keine Induktion von LEF-1 festgestellt. Die Verwendung des murinen rekombinanten Proteins Wnt3a, das mit dem humanen Rezeptor kreuzreagiert, zeigte das gleiche Ergebnis. Eine Erklärung wäre, dass die in diesem Versuch verwendete Zelllinie K562 den für das Wnt3a-Protein benötigten Rezeptor Frizzled und / oder dessen Co-Rezeptoren LRP5 / 6 nicht exprimiert. Übereinstimmend hiermit wurde gezeigt, dass in einigen Leukämiezelllinien eine Aktivierung des Wnt / β -Catenin-Signalweges zwar durch den GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 möglich war, jedoch nicht durch das rekombinante Protein Wnt-3a¹³³. Da die Familie der Wnt-Proteine bei Vertebraten aus 16 Mitgliedern besteht¹³⁴ ist nicht auszuschließen, dass eventuell andere Wnt-Proteine in dieser Zelllinie die PON2-Transkription stimulieren. In zukünftigen Experimenten könnte deshalb versucht werden, andere Aktivatoren wie R-spondin oder Norrin zu verwenden¹³⁵⁻¹³⁷. Es ist jedoch zu beachten, dass Norrin ausschließlich an den Rezeptor Frizzled4¹³⁷ und R-spondin nur an den Rezeptor Frizzled8 und den Co-Rezeptor LRP6 bindet^{138, 139}. Des Weiteren ist es durchaus denkbar, dass ein anderer Signalweg zu einer Inhibierung von GSK-3 β und zu einer gesteigerten Transkription von PON2 vermittelt durch LEF-1 führt. Ein möglicher Signalweg wäre der PI3K / Akt-Signalweg.

Die Serin- / Threonin-Kinase Akt wird hauptsächlich durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert und spielt eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse⁹⁶, wie z.B. Glukosemetabolismus, Zellwachstum, Apoptose, Transkription und Zellmigration. Weil Akt die Apoptose durch die Aktivierung bzw. Inhibierung unterschiedlicher Gene verhindert, ist ein überschießend aktivierter PI3K / Akt-Signalweg an der Entwicklung vieler Krebsarten beteiligt^{96, 140}. Kommt es aufgrund von Mutationen zu einer abnormalen Steigerung des PI3K / Akt-Signalweges, inhibiert Akt zum einen die Kinase GSK-3 β mit oben beschriebenen Konsequenzen⁹⁶. Zum anderen verhindert Akt durch direkte Phosphorylierung und damit Inaktivierung der pro-apoptotischen FoxO-Transkriptionsfaktoren ein Absterben der Zelle, was die Tumorentstehung begünstigt^{96, 140, 141}. In THP-1-Makrophagen wurde bereits eine Regulation von PON2 durch PI3K nachgewiesen⁸⁰.

Mit Hilfe von PI3K-Inhibitoren wurde untersucht, ob die PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 durch den PI3K / Akt-Signalweg reguliert wird (Abschnitt 4.8.8). Dabei wurde eine Reduzierung der PON2-Proteinexpression durch LY 294002 um fast 50% detektiert. Daher ist davon auszugehen, dass der PI3K / Akt-Signalweg zumindest in der CML-Zelllinie K562 an der Regulation der PON2-Expression beteiligt ist. Eine Beteiligung des Wnt / β -Catenin-Signalweges in dieser Zelllinie ist jedoch nicht auszuschließen. Eventuell könnte PON2 je nach Stimulus auch durch beide Signalwege transkriptionell aktiviert werden (siehe Abbildung 46).

FoxO-Transkriptionsfaktoren aktivieren eine Reihe von Genen, die am Metabolismus, Zellzyklus, Apoptose, DNA-Reparatur und Resistenz gegenüber oxidativem Stress involviert sind. Eine Überexpression von FoxO-Transkriptionsfaktoren führte zu einer Inhibierung des Tumorwachstums *in vitro* und einer Abnahme der Tumorgroße bei Brustkrebs *in vivo*⁹⁶. Zudem wurde eine Interaktion zwischen FoxO-Transkriptionsfaktoren und dem Tumorsuppressor p53 dokumentiert¹⁴¹. Es wird dabei diskutiert, ob eine Koordination von FoxOs und p53 zur Tumorsuppression führen. In einer Vielzahl von Krebserkrankungen ist der PI3K / Akt-Signalweg überschießend aktiviert, was mit einer Inaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren einhergeht^{96, 140}.

Während Akt die FoxO-Transkriptionsfaktoren durch eine Phosphorylierung inhibiert, werden sie bei hohen ROS-Konzentrationen aktiviert. Mechanistisch erfolgt dies über den c-Jun N-terminalen- (JNK-) Signalweg durch eine Phosphorylierung an einer anderen Stelle des FoxO-Proteins^{94, 142}. Das anti-oxidative Protein PON2 könnte durch FoxO-Transkriptionsfaktoren induziert werden, um so der ROS-Akkumulation entgegenzuwirken (siehe Abbildung 46). Durch einen negativen *feedback-loop* über JNK könnte PON2 seine eigene Transkription wieder reduzieren, da es bekanntermaßen die JNK-Aktivierung verhindern kann⁶¹. Um dies zu überprüfen, könnte man versuchen eine Proteininteraktion

bei hohen ROS-Mengen zwischen JNK und PON2 mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation nachzuweisen.

Des Weiteren ist bekannt, dass es bei hohen ROS-Mengen zu einer Proteininteraktion zwischen β -Catenin und FoxO-Transkriptionsfaktoren kommen kann (siehe Abbildung 46)¹⁴⁰. Demnach würde β -Catenin vornehmlich über FoxO- und weniger über die LEF-1 / TCF-Transkriptionsfaktoren eine gesteigerte PON2-Expression hervorrufen können¹⁴³. Essers et al. zeigten eine solche evolutionär konservierte Interaktion zwischen β -Catenin und FoxO-Transkriptionsfaktoren bei oxidativem Stress¹⁴⁴. Bei physiologischen ROS-Mengen ist es dagegen wahrscheinlich, dass die Transkription von PON2 über LEF-1 vermittelt wird. Dies belegen zumindest die Versuche, die mit der dn-Mutation von LEF-1 durchgeführt wurden (Abschnitt 4.8.3). Des Weiteren ist eine Aktivierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch ROS direkt möglich⁹⁶. Hohe ROS-Mengen führen zu einer gesteigerten Aktivierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren und zur Transkription anti-oxidativer Gene, um die Zelle vor ROS zu schützen. FoxO-Transkriptionsfaktoren würden also direkt an die PON2-Promoter-Sequenz binden und dessen Transkription induzieren.

In Abschnitt 4.8.6 wurde überprüft, ob sich eine Überexpression von FoxO1 und FoxO4 positiv auf die PON2-Promoteraktivität auswirkt. Die Ergebnisse belegen, dass die PON2-Promoter-Aktivität durch beide FoxO-Transkriptionsfaktoren inhibiert wurde. Durch FoxO4 wurde die Aktivität des PON2-Promoters sogar um 50% reduziert. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da Araujo et al. zeigten, dass FoxO4 die Transkription der anti-oxidativ wirkenden Superoxid-Dismutase-2 (SOD2) bei oxidativem Stress steigerte¹⁴⁵, weshalb ein ähnlicher Effekt auf die PON2-Expression vermutet wurde. Zudem ergab die Transkriptionsfaktor *knock-down* Analyse, dass FoxO3 die PON2-Expression positiv beeinflusst. Diese offensichtlichen Gegensätze zwischen negativer (FoxO1; FoxO4) und positiver (FoxO3) Regulation von PON2 zeigen, dass hierbei unterschiedliche Funktionen je nach Protein-Isoform ausgeführt werden. Zudem kann dies variieren mit Stimulus und Zelltyp. Kommt es in den Zellen zu einem extremen Anstieg an ROS, wird entweder der JNK- oder PI3K / Akt-Signalweg in der Zelle aktiviert. Auch eine Proteininteraktion zwischen β -Catenin und FoxO-Transkriptionsfaktoren ist nicht auszuschließen. Die daraus resultierende Steigerung der PON2-Expression könnte den in der Zelle übermäßigen Anstieg an ROS reduzieren.

Eine Aktivierung des PI3K / Akt-Signalweges induziert die Expression anti-apoptotischer Gene⁹⁶. Im Gegensatz dazu aktivieren FoxO-Transkriptionsfaktoren pro-apoptotische Gene⁹⁶, so dass dies zu einer negativen Regulation des PON2-Promoters durch die FoxO-Transkriptionsfaktoren führt. Interessanterweise wäre dies eine Erklärung, warum PON2 in bestimmten Leukämien überexprimiert vorliegt, nämlich in mit T-Zellleukämievirus Typ-I infizierten Lymphozyten⁷⁴. Oteiza et al. demonstrierten, dass der T-Zellleukämievirus Typ-I

durch die Expression des Onkoproteins Tax eine Degradation von FoxO4 vermittelt ¹⁴⁶. Da FoxO4 hier als negativer Regulator von PON2 identifiziert wurde, würde folglich die Aktivität von Tax die PON2 Expression in den infizierten Lymphozyten steigern.

Zu beachten ist, dass die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche Regulation durch die Transkriptionsfaktoren FoxO1 und 4 nur die Geschehnisse auf Promoter-Ebene und die von FoxO3 auf mRNA-Ebene darstellen. In weiteren Versuchen sollte daher untersucht werden, wie sich eine Überexpression bzw. ein *knock-down* der verschiedenen FoxO-Transkriptionsfaktoren auf die PON2-mRNA-Expression und vor allem auf die des PON2-Proteins auswirkt.

5.7 Die PON2-Expression ist in Lungentumoren nicht gesteigert

Die Ergebnisse von Witte et al. belegen, dass die PON2-Expression in verschiedenen Tumoren gesteigert ist ⁶¹. Ferner wurde festgestellt, dass eine PON2-Überexpression vor allem in den Anfangsstadien z.B. von Nieren- und Blasentumoren vorlag, die mit fortschreitender Erkrankung langsam abfiel ⁷⁸. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass gerade zu Anfang der Tumorbildung die anti-oxidativen und anti-apoptischen Eigenschaften von PON2 für den Tumor essentiell sind. Denn gerade in dieser kritischen Phase agieren verschiedene Stress-Signale und -Signalwege (ROS; UPR; Calcium; ETC-Entkopplung in den Mitochondrien; proteosomale Degradation; Autophagie; Annexin V Exposition), welche die Apoptose und / oder andere intrinsische bzw. extrinsische Kaskaden aktivieren, die ein Absterben der Zelle verursachen sollen. PON2 könnte die entstehende Tumorzelle teilweise vor diesen Reaktionen schützen, indem es pro-apoptisches mitochondriales ROS reduziert und die Apoptose verhindert. Diese Hypothese wird von den Befunden unterstützt, dass das PON2-Protein nicht generell, sondern offensichtlich in selektiven Tumoren überexprimiert wird, was die Unterschiede in den Geweben und der Tumorgenese reflektieren kann. Gleichzeitig findet diese Vermutung dadurch Unterstützung, dass *in vitro* ein PON2 *knock-down* z. T. eine spontane Apoptose auslöste – ein bemerkenswerter Befund im Hinblick auf das Überleben PON2-defizienter Mäuse. Schließlich scheint PON2 aufgrund seiner anti-apoptischen Wirkung die Effekte von vielen Chemotherapeutika zu reduzieren. Demzufolge könnte PON2 essentiell für das Überleben bestimmter Tumore sein.

Witte et al. zeigten neben der stark gesteigerten PON2-Expression in Leber-, Nieren-, Blasenkarzinomen und Tumoren des lymphoiden Systems eine moderate Überexpression des PON2-Proteins in Lungentumoren ⁶¹. Gegenstand dieser Arbeit war es anhand einer cDNA-Probensammlung von 24 Patienten, die PON2-mRNA-Expression in karzinogenem Lungengewebe zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.9). Dabei ergab sich, dass das erkrankte

Lungengewebe von Patienten mit grosszelligem Lungenkarzinom eine Reduktion der PON2-Expression aufwies. Die anderen analysierten Karzinomformen in der Lunge zeigten keine Steigerung der PON2-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe der untersuchten Patienten. Im Anfangsstadium der Erkrankung war die PON2-Expression erniedrigt, stieg jedoch im Verlauf der Erkrankung auf das Niveau in gesundem Gewebe an. Dies Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisherigen Daten aus der Literatur. Ferner weist die Adenokarzinomzelllinie A549 eine sehr starke endogene Expression des PON2-Proteins auf und wie auch in anderen Tumorzelllinien führte der *knock-down* von PON2 auch in A549-Zellen zu einer spontanen Apoptose⁶¹. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PON2 zwar in Leukämien (mit PI3K / Akt-Beteiligung) nicht jedoch in Tumoren der Lunge dereguliert wird. Es wäre möglich, dass die Lunge bereits so viel PON2 exprimiert, dass eine weitere Steigerung des Proteins in den Zellen nicht notwendig wäre. Dies würde zudem bedeuten, dass PON2 nicht bei allen Tumorformen als genereller Tumormarker fungieren kann.

5.8 Analyse des hämatopoetischen Systems von *PON2*^{-/-}-Mäusen

Trotz der oben beschriebenen Funktionen von PON2 ist es bemerkenswert, dass *PON2*^{-/-}-Mäuse lebensfähig sind. Allerdings ist anzumerken, dass in diesen Tieren eher ein *knock-down* (nicht *knock-out*) durch ein β -Gal-Insert im PON2-Gen erzeugt wird, was eine Restexpression des endogenen PON2 von 5 - 15% zulässt. Dennoch neigen diese Tiere verstärkt zur Bildung von Arteriosklerose^{19, 58}, was umso bemerkenswerter ist, denn diese Tiere besitzen einen C57Bl/6J-Wildtyp-Hintergrund ohne gleichzeitigen ApoE oder LDLR *knock-out* – dies ist ansonsten eine Notwendigkeit für die Erzeugung von arteriosklerotischen Läsionen in Mäusen. Zwar belegen frühere Befunde die Rolle von PON2 in Makrophagen^{3, 11, 21, 26, 59, 147-151} oder vaskulären Zellen²³, doch war die Funktion von PON2 weder in Plasmazellen bekannt, noch wurde je untersucht, ob die Hämatopoese durch PON2 beeinflusst wird. Dies ist nicht nur aus dem Blick der Arteriosklerose wichtig, wo z.B. eine veränderte Anzahl von Makrophagen bedeutsam wäre, sondern insbesondere auch im Hinblick auf die Verbindung zu Leukämien.

Bei den Analysen des Knochenmarks wurde festgestellt, dass *PON2*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant mehr LT-HSCs besitzen. Dagegen gab es keine Unterschiede bei den Populationen der ST-HSCs und der MPPs. In den Zellkompartimenten der myeloischen Reihe zeigten *PON2*^{-/-}-Mäuse eine signifikante Erhöhung der Anzahl an GMPs. Diese Zellen sind die Vorläufer der Granulozyten und Makrophagen. Die untersuchten Populationen im Knochenmark der weiter determinierten Zellen aus der myeloischen Reihe

sowie der lymphatischen Reihe waren ohne Befund. LT-HSCs bilden einen Pool aus sich immer wieder selbsterneuernden Zellen, die die Fähigkeit besitzen sich in alle Zellen des hämatopoetischen Systems zu differenzieren. Hämatopoetische Stammzellen sind besonders anfällig für Stimulationen oder Schädigungen durch oxidativen Stress. Dies kann verschiedene Anämien verursachen oder in maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems münden^{92, 93}. Gerade in LT-HSCs werden Apoptose und insbesondere Differenzierung und Proliferation über ROS moduliert. Demzufolge könnte das Fehlen von PON2 zu einer Deregulation der Differenzierung und Proliferation führen. Das Enzym PON2 besitzt neben seiner anti-oxidativen Funktion eine pro-onkogene. In Versuchen mit verschiedenen Tumorzelllinien zeigten Witte et al., dass eine transiente Runterregulation des PON2-Proteins eine spontane Apoptose in diesen Zellen auslöste⁶¹. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt. Demzufolge könnte es sein, dass die LT-HSCs in PON2^{-/-}-Mäusen auch unter einer verstärkten Apoptose leiden. Um dies zu überprüfen, sollte in zukünftigen Analysen sowohl der ROS- als auch die Apoptoserate von LT-HSCs und GMPs genauer untersucht werden. Des Weiteren sollte analysiert werden, in welchen Zellen des hämatopoetischen Systems PON2 in welchen Mengen exprimiert wird, um regulatorische Mechanismen sowie die Bedeutung des Enzyms genauer zu charakterisieren.

Die Analyse der Zellen des hämatopoetischen Systems der Milz (Abschnitt 4.10.3) zeigten Unterschiede zwischen PON2 *knock-out* und C57Bl/6-Mäusen innerhalb der lymphatischen Reihe bei den reifen und noch weiter ausdifferenzierten B-Zellen. PON2^{-/-}-Mäuse hatten signifikant weniger reife B-Zellen, dagegen war die Anzahl der weiter ausdifferenzierten B-Zellen signifikant erhöht. Die untersuchten Progenitorzellen der lymphatischen Reihe im Knochenmark zeigten keine Unterschiede zwischen PON2^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Dies lässt einen Defekt in der Entwicklung von B-Zellen innerhalb der Milz vermuten. Bisher wurden die Durchflusszytometrie-Analysen der Zellen von Knochenmark, Milz und Thymus nur an jungen Tieren (drei bis sechs Monate) durchgeführt. Die augenscheinliche / äußere Untersuchung der Milzen von alten (zwölf Monate) weiblichen PON2^{-/-}-Mäusen zeigte, dass die Milzen dieser Tiere abnormal vergrößert und stark marmoriert waren. Das lässt darauf schließen, dass eine gestörte Entwicklung der Zellen in der Milz im Alter weiter zunimmt und zu einer Splenomegalie bei weiblichen PON2^{-/-}-Mäusen führt. Die entstehende Splenomegalie bei PON2^{-/-}-Mäusen könnte auf eine sich entwickelnde Leukämie hindeuten, was aber auf Grundlage der bisherigen Daten nicht belegt werden kann. Warum eine Splenomegalie nur bei weiblichen Tieren festgestellt wurde ist unklar. Naheliegend wäre, dass der Hormonhaushalt dieser Tiere durch den *knock-out* von PON2 gestört ist. Die Rolle von PON2 ist innerhalb des hormonellen Systems völlig unerforscht. Eine eingeschränkte Fertilität wurde bisher nicht festgestellt.

Im Thymus zeigte die Untersuchung des hämatopoetischen Systems (Abschnitt 4.10.4) eine erhöhte Anzahl an T-Helferzellen. Alle anderen analysierten Zelltypen, auch die Vorläufer der T-Zellen, unterschieden sich nicht signifikant von denen der Wildtyp-Mäuse. Im Gegensatz zur Milz wurden bisher keine Unterschiede in der Größe des Thymus zwischen $PON2^{-/-}$ -Mäusen und C57Bl/6-Mäusen festgestellt.

Die Analyse der Zellen des peripheren Blutes (siehe 4.10.5) zeigte Auffälligkeiten bei den Erythrozyten, den Thrombozyten und den Leukozyten. Die Untersuchung der Erythrozyten ergab, dass der Hämatokrit-Wert der $PON2^{-/-}$ -Mäuse signifikant erhöht war und zudem außerhalb des angegebenen Normbereichs lag. Des Weiteren waren die Erythrozyten vergrößert, der Hämoglobingehalt jedoch signifikant erniedrigt. Demgegenüber war die Menge an Erythrozyten im Vergleich zu dem der C57Bl/6-Mäuse unverändert. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist es, den Organismus mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen und entstehendes Kohlendioxid von den Zellen und Geweben abzutransportieren. Da die Erythrozyten zwar vergrößert, aber gleichzeitig der Hämoglobingehalt, der für die Aufnahme des Sauerstoffs und Kohlendioxids nötig ist, signifikant erniedrigt war, wäre es denkbar, dass $PON2^{-/-}$ -Mäuse wahrscheinlich unter einer mangelnden Versorgung durch Sauerstoff leiden. Inwieweit dies zu Schäden oder Stressreaktionen innerhalb des Organismus führt, ist bislang unklar. Zudem wiesen die Ergebnisse daraufhin, dass die Entwicklung der Erythrozyten abnormal verändert zu sein scheint. Da die Analyse der myeloischen Reihe in Knochenmark und Milz bisher keine Auffälligkeiten zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass es erst bei den ausdifferenzierten und reifen Erythrozyten zu diesem Effekt kommt. Da allerdings bei alten weiblichen Tieren eine Splenomegalie festzustellen war, könnte neben der B-Zellentwicklung auch die der Erythrozyten in der Milz gestört sein. Eventuell führen abnormale Zellteilungsreaktionen aufgrund einer gestörten DNA-Replikation zu den gezeigten Ergebnissen. Da für die Analysen von Knochenmark und Milz wesentlich weniger und ausschließlich junge Tiere zur Verfügung standen als für die des peripheren Blutes, sollte zukünftig besonders auf Veränderungen innerhalb der Differenzierung der Erythrozyten und B-Zellen geachtet werden.

Bei der weiteren Analyse des peripheren Blutes wurden zudem Unterschiede bei den Thrombozyten zwischen beiden Mäusespezies festgestellt. $PON2^{-/-}$ -Mäuse wiesen eine reduzierte Thrombozytenzahl auf. Dies war gleichzeitig mit einer Zunahme des mittleren Thrombozytenvolumens, der Größe, verbunden. Bei Verletzungen führt die rasche Thrombozytenaggregation zum Wundverschluss und stimuliert ferner die plasmatische Gerinnungskaskade durch Sekretion coagulatorischer Faktoren. Wie die Erythrozyten gehen sie aus der myeloischen Reihe des Knochenmarks hervor. Im Gegensatz zu den Erythrozyten reifen sie nicht in einem anderen Gewebe. Bei den Analysen des Knochenmarks wurden keine Auffälligkeiten bei den direkten Vorläufern der Thrombozyten

(MEPs) festgestellt. Die reduzierte Zahl und die Zunahme der Größe der Thrombozyten kann auf eine gestörte Thrombozytenaggregation bei PON2^{-/-}-Mäusen hinweisen, welche sich gegebenenfalls auch auf die plasmatische Gerinnung auswirken könnte. Ferner könnte die Zunahme der Größe auf abnormale Zellteilungsreaktionen oder Reifungsprozesse zurückzuführen sein. In zukünftigen Untersuchungen sollte daher die Gerinnung der PON2^{-/-}-Mäuse untersucht werden.

Die Untersuchung der Leukozyten zeigte, dass die absolute Leukozytenzahl in PON2 *knock-out* Mäusen leicht, aber signifikant erhöht war. Leukozyten sind Effektorzellen des Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr des Organismus gegen Mikroorganismen oder körperfremde Substanzen. Aus diesem Grund könnte davon ausgegangen werden, dass das Immunsystem von PON2^{-/-}-Mäuse verstärkt angeregt ist. Jedoch ist zu beachten, dass die Steigerung der Leukozytenzahl vor allem durch die Blutanalyse von alten (zwölf Monate) PON2^{-/-}-Mäusen zu Stande kam. Demgegenüber wurden nur junge C57Bl/6-Mäuse (drei bis max. sechs Monate) analysiert. Eine erhöhte Leukozytenzahl kommt meist altersbedingt vor und stellt somit wahrscheinlich keinen durch den *knock-out* von PON2 ausgelösten Effekt dar. Die Lymphozyten waren bei PON2^{-/-}-Mäusen signifikant erniedrigt, alle anderen analysierten Parameter wiesen keine Unterschiede zwischen PON2^{-/-}- und C57Bl/6-Mäusen auf. Die Lymphozyten beinhalten unter anderem alle T- und B-Zellen. Die Analysen der Zellen aus der Milz belegen, dass es in PON2^{-/-}-Mäusen eine reduzierte Anzahl an reifen B-Zellen, gleichzeitig jedoch einen Anstieg an noch weiter ausdifferenzierten B-Zellen gibt. Zudem waren die T-Helferzellen im Thymus bei PON2 *knock-out* Mäusen signifikant erhöht. Unterschiede bei den jeweiligen Vorläuferzellen wurden nicht festgestellt.

Welche Transkriptionsfaktoren und Signalwege in hämatopoetischen Zellen durch den Verlust von PON2 zu den gezeigten Ergebnissen führen ist bisher unbekannt. Aus den vorliegenden Analysen in der CML-Zelllinie K562 geht hervor, dass PON2 über eine Inhibierung der Kinase GSK-3 β über den PI3K / Akt-Signalweg reguliert wird. Auch eine Beteiligung des Wnt / β -Catenin-Signalweges an der PON2-Expression ist nicht auszuschließen. Beide Signalwege sind in einer Vielzahl von Tumoren dereguliert ^{96, 130, 134, 140, 152}. Der Wnt / β -Catenin-Signalweg ist daneben essentiell für das Überleben leukämischer Stammzellen in CML und AML ^{98, 99}. Somit könnte PON2 ein wichtiges Zielgen bei der Bekämpfung von Krebs sein. Es ist jedoch zu beachten, dass bisher wenig über regulatorische Mechanismen von PON2 bekannt ist. Zudem ist die PON2-Expression in verschiedenen Geweben eventuell unterschiedlich und wird je nach Stimulus durch verschiedene Signalwege reguliert. Damit wäre ein *knock-down* von PON2 nicht unbedingt eine geeignete Option für die Krebstherapie.

Zudem sind die Transkriptionsfaktoren aus der FoxO-Familie an der Regulation der PON2-Expression in Leukämien beteiligt. FoxO-Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und Determinierung von Erythrozyten sowie der Quieszenz von HSCs^{94, 141}. Zudem sind sie in den PI3K / Akt-Signalweg involviert^{96, 140}. Ein Verlust von FoxO3 führt zu einer signifikanten ROS-Akkumulation, oxidativen Schäden an Proteinen und einem reduzierten Lebenszyklus von zirkulierenden Erythrozyten⁹⁵. PON2^{-/-}-Mäuse zeigen aufgrund der abnormalen Entwicklung der Erythrozyten einen eventuell ähnlichen Phänotyp. Ferner kann aufgrund der erhöhten Anzahl an LT-HSCs davon ausgegangen werden, dass diese Zellen, wahrscheinlich aufgrund des Fehlens von PON2, unter einer erhöhten ROS-Akkumulation verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate leiden. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass der Zellzyklus in LT-HSCs ebenfalls gestört ist. Jedoch müssen dafür noch weitere Analysen folgen. Interessant erscheint, dass PON2 gegebenenfalls eines der entscheidenden aber zuvor unentdeckten Zielgene der FoxO-Familie, insbesondere FoxO3 und 4 sein könnte. In einem solchen Falle wäre es äußerst spannend, den Effekt von FoxO^{-/-} in PON2^{-/-}-Mäusen oder solchen mit konstitutiver PON2-Überexpression zu untersuchen.

5.9 Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2^{+/+})

In Abschnitt 4.11 wurde die erfolgreiche Klonierung des *Gene-Targeting*-Vektors ROSA26-CAG-mPON2-HA-IRES-EGFP zur Generierung eines Cre-abhängigen konditionalen PON2-Überexpressions-Mausmodells (PON2^{+/+}) dokumentiert. Ferner belegen Southern Blot-Analysen die gelungene homologe Rekombination des *Gene-Targeting*-Vektors in den ROSA26-Lokus muriner V6.5-ES-Zellen (Abschnitt 4.11.2). Auch eine Überprüfung der ES-Zellklone auf eine Cre-vermittelte Rekombination konnte durch die Expression von GFP durch eine FACS-Analyse bestätigt werden (Abschnitt 4.11.3). Durch die bei über 90% der Zellen auftretende Trisomie 8 war es jedoch nahezu ausgeschlossen, das weltweit erste PON2^{+/+}-Mausmodell zu generieren (Abschnitt 4.11.4). Da somit die ES-Zellen eine erfolgreiche Generierung der PON2^{+/+}-Maus verhinderten, das *Targeting*-Konstrukt aber kreiert und funktionell ist, könnte zukünftig eine alternative Methode das Vorhaben dennoch zum Erfolg führen. Meyer et al. zeigten, dass es möglich ist, ein Mausgenom durch die Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen durch homologe Rekombination genetisch zu verändern¹⁵³. Ein Zinkfinger ist eine aus 30 Aminosäuren bestehende Proteindomäne, die in einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen vorkommt. Eine Zinkfinger-Nuklease ist ein künstliches Enzym bestehend aus der bakteriellen Endonuklease *FokI* und insgesamt drei Zinkfingerdomänen¹⁵⁴. Diese erkennen eine spezifische Zielsequenz innerhalb der DNA und

verursachen durch die Endonuklease *FokI* einen Doppelstrangbruch. Durch eine sich anschließende homologe Rekombination wird der linearisierte *Gene-Targeting*-Vektor in den Locus integriert und es entsteht je nach Konstruktion des *Gene-Targeting*-Vektors ein *knock-in* oder *knock-out* Allel. In Abbildung 47 ist ein *Gene-Targeting* durch die Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen schematisch dargestellt.

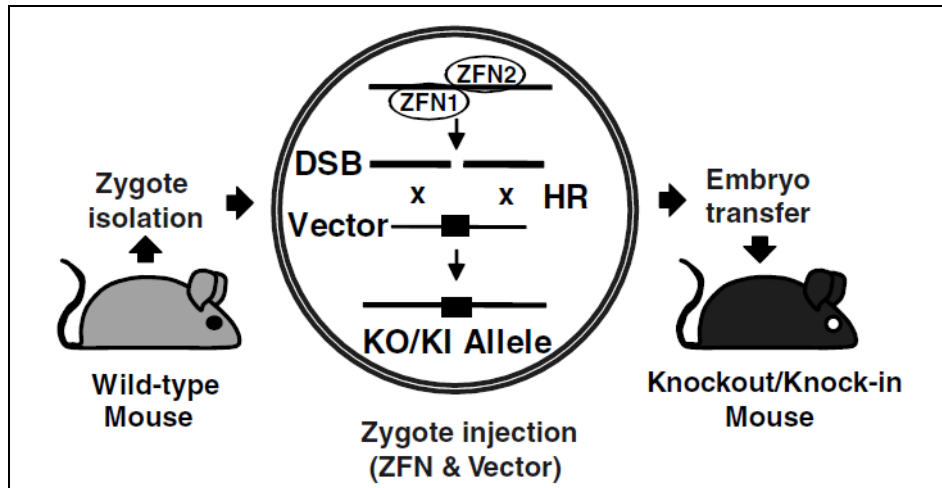


Abbildung 47: Schematische Darstellung eines *Gene-Targetings* durch homologe Rekombination vermittelt durch die Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen. Um einen *knock-out* oder *knock-in* zu generieren, müssen zunächst Zygoten aus einer Wildtyp-Maus isoliert werden. Anschließend wird die linearisierte DNA eines *Gene-Targeting*-Vektors zusammen mit der mRNA spezifischer Zinkfinger-Nukleasen in den Pronukleus und das Zytoplasma injiziert. Die homologe Rekombination der injizierten DNA mit der Zielsequenz resultiert in einem *knock-out* oder *knock-in* Allel. Danach werden die manipulierten Zygoten in scheinchwangere Weibchen transferiert, um mutante Mäuse zu erhalten.¹⁵³

Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass auf den Einsatz von embryonalen Stammzellen verzichtet werden kann. Damit ermöglicht diese Technik auch eine Manipulation anderer Organismen (Insekten, Pflanzen, menschliche Zelllinien, etc.). Des Weiteren kann man die Zinkfinger-Nukleasen so spezifizieren, dass sie nur eine bestimmte Region innerhalb des Genoms erkennen, wie z. B. den ROSA26-Lokus. Damit ist es möglich, einen *knock-in* oder *knock-out* zielgerichtet im Genom vorzunehmen. Ferner können innerhalb von wenigen Wochen genetisch veränderte Mäuse erhalten werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden durch den Einsatz von drei unabhängigen Methoden PON2-Promoter-bindende Proteine bzw. Faktoren identifiziert, die die PON2-mRNA-Expression beeinflussen. Anhand der erhaltenen, PON2-beeinflussenden Faktoren wurden verstärkt solche ausgewählt, die eine Rolle in der Tumorbilogie spielen. Durch verschiedene Untersuchungsmethoden wurde schließlich der Effekt dieser Faktoren in verschiedenen Zellmodellen auf die PON2-Expression genauer analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die PON2-Expression in der CML-Zelllinie K562 durch den PI3K / Akt-Signalweg, der in vielen Tumoren übermäßig aktiviert vorliegt, gesteigert wird. Auch eine Beteiligung des Wnt / β -Catenin-Signalweges kann nicht ausgeschlossen werden. Vermittelt wird die gesteigerte PON2-Expression durch die Inhibition der Kinase GSK-3 β , die in beiden genannten Signalwegen involviert ist. Die transkriptionelle Steigerung der PON2-Expression erfolgt schließlich durch den Transkriptionsfaktor LEF-1. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Familie der FoxO-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Regulation der PON2-Expression in K562-Zellen spielt. Dabei scheint die Aktivierung bzw. Inhibition der PON2-Expression von der jeweiligen Isoform abzuhängen.

Zudem wurde im Hinblick auf die Assoziation von PON2 mit Leukämien anhand eines PON2^{-/-}-Modells analysiert, welche Effekte PON2 auf die Hämatopoese besitzt. Dabei wurde festgestellt, dass PON2^{-/-}-Mäuse eine erhöht Anzahl an LT-HSCs und GMPs aufweisen. Ferner scheinen die Entwicklung von Erythrozyten und Thrombozyten durch den *knock-out* von PON2 gestört zu sein. Außerdem zeigten alte weibliche PON2^{-/-}-Mäuse eine Splenomegalie, die evtl. als Anzeichen für eine Leukämie gewertet werden könnte. Dies kann jedoch aufgrund der bisherigen Daten nicht belegt werden.

Abschließend wurde zur Generierung eines konditionalen PON2-Überexpressionsmodells erfolgreich ein *Gene-Targeting*-Vektor entwickelt. Mit einem solchen PON2-Überexpressionsmodell kann in Zukunft gewebe- und zellspezifisch die Expression von PON2 gesteigert und die Auswirkung einer Überexpression im Hinblick auf verschiedene Erkrankungen untersucht werden.

Bisher war wenig über die Regulation des humanen Enzyms PON2 bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, durch welche Signalwege und Transkriptionsfaktoren PON2 in Leukämiezellen reguliert wird. Im Hinblick auf die Rolle von PON2 in der Tumorbilogie ist es erstmals möglich, die PON2-Expression in Leukämien gezielt durch die Inhibition bzw. Aktivierung der PON2-regulierenden Faktoren zu beeinflussen und damit neue Wege in der Krebstherapie zu beschreiten.

7 Literatur

1. 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;33(3):498-507.
2. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene*. 1998;213(1-2):149-157.
3. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(9):1304-1316.
4. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100(8):1200-1207.
5. Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100(8):1104-1105.
6. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. 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;39(3):336-344.
7. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 1993;104(1-2):129-135.
8. 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):61-69.
9. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. 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;21(4):542-547.
10. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(2):146-157.
11. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. 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;276(48):44444-44449.
12. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*. 1953;53(1):110-117.
13. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*. 1953;53(1):117-124.

14. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1239-1247.
15. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys.* 2007;461(1):24-29.
16. Draganov DI. Lactonases with organophosphatase activity: structural and evolutionary perspectives. *Chem Biol Interact.* 187(1-3):370-372.
17. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6690):284-287.
18. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002;106(4):484-490.
19. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem.* 2006;281(40):29491-29500.
20. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1368-1374.
21. 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;37(12):2052-2063.
22. Altenhofer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Forstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24398-24403.
23. 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;115(15):2055-2064.
24. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286(1-2):152-154.
25. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2882-2891.
26. 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;101(8):1581-1590.
27. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. 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;18(10):1617-1624.
28. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(4):383-388.

29. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxyxynitrite donor. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24473-24481.
30. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(2):83-106.
31. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17527-17535.
32. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):2441-2447.
33. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003;107(22):2775-2779.
34. 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;363(9410):689-695.
35. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(2):153-163.
36. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, Waldmann C, Schmalz HG, ten Berg JM, Taubert D. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.*17(1):110-116.
37. Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, Sugiyama D, Degorter MK, Woolsey S, Tirona RG, Kim RB. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J.*
38. Delaney JT, Ramirez AH, Bowton E, Pulley JM, Basford MA, Schildcrout JS, Shi Y, Zink R, Oetjens M, Xu H, Cleator JH, Jahangir E, Ritchie MD, Masys DR, Roden DM, Crawford DC, Denny JC. Predicting clopidogrel response using DNA samples linked to an electronic health record. *Clin Pharmacol Ther.*91(2):257-263.
39. Hulot JS, Collet JP, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, Scott SA, Montalescot G. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ Cardiovasc Interv.*4(5):422-428.
40. Simon T, Steg PG, Becquemont L, Verstuyft C, Kotti S, Schiele F, Ferrari E, Drouet E, Grollier G, Danchin N. Effect of paraoxonase-1 polymorphism on clinical outcomes in patients treated with clopidogrel after an acute myocardial infarction. *Clin Pharmacol Ther.*90(4):561-567.
41. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, Neumann FJ. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet.*4(4):429-436.
42. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, Mayer K, Bernlochner I, Schomig A, Kastrati A. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J.*32(13):1605-1613.

43. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369(1):78-88.
44. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* 2008;76(6):2512-2519.
45. Schweikert EMA, J.; Wilgenbus, P.; Förstermann, U.; Teiber, J. F.; Horke S. Paraoxonase-2 and 3 are important defense enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors due to their anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *journal of lipids.* in press, 2012.
46. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusic AJ, Bourquard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(4):L852-860.
47. Horke S, Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Forstermann U, Xiao J, Kramer GL, Haines DC, Chowdhary PK, Haley RW, Teiber JF. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J.* 2010;426(1):73-83.
48. 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;62(1):36-44.
49. 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;154(3):641-649.
50. Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes. *Diabetologia.* 2001;44(1):104-107.
51. 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;258(4):363-368.
52. 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):110-112.
53. Erlich PM, Lunetta KL, Cupples LA, Huyck M, Green RC, Baldwin CT, Farrer LA. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 2006;15(1):77-85.
54. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusic AJ, Zabner J. A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35564-35571.
55. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(10):3373-3377.
56. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis.* 1998;139(1):131-136.

57. Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B, Scherer SW. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet.* 1998;54(5):394-399.
58. 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;89(4):368-373.
59. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPARgamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis.* 2007;195(2):313-321.
60. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):29-63.
61. Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, Li H, Forstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis.*2(1):e112.
62. 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;275(43):33435-33442.
63. Schweikert EMD, A.; Witte, I.; Wilegenbus, P.; Amort, J.; Förstermann, U.; Shabazian, A.; Grijalva, V.; Shih, D. M.; Farias-Eisner, R.; Teiber, J. F.; Reddy, S. T.; Horke, S. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death and Differ.* in press, 2012.
64. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*144(5):646-674.
65. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene.*29(41):5545-5555.
66. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
67. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-1337.
68. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.*40(2):294-309.
69. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):678-685.
70. Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2009;12(2):240-245.
71. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.*49(11):1603-1616.
72. Li Y, Tang R, Xu H, Qiu M, Chen Q, Chen J, Fu Z, Ying K, Xie Y, Mao Y. Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128(7):369-379.
73. Ribarska T, Ingenwerth M, Goering W, Engers R, Schulz WA. Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(2):51-60.
74. Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guilleum C, Gessain A, Brady JN. Transcription profile of cells infected with human T-

- cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res.* 2002;62(12):3562-3571.
75. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood.* 2003;102(8):2951-2959.
76. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, Devidas M, Mullighan CG, Wang X, Murphy M, Ar K, Wharton W, Borowitz MJ, Bowman WP, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta BM, Reaman GH, Smith MA, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(7):1394-1405.
77. Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Muller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 2006;20(8):1400-1407.
78. Witte IF, U.; Devarajan, A.; Reddy, S. T.; Horke, S. Protectors or traiters - the roles of PON2 and PON3 in atherosclerosis and cancer. *J of Lipids.* 2012.
79. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):468-474.
80. Fuhrman B, Gantman A, Khateeb J, Volkova N, Horke S, Kiyon J, Dumler I, Aviram M. Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFR-beta. *Cardiovasc Res.* 2009;84(1):145-154.
81. Fuhrman B, Khateeb J, Shiner M, Nitzan O, Karry R, Volkova N, Aviram M. Urokinase plasminogen activator upregulates paraoxonase 2 expression in macrophages via an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1361-1367.
82. Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res.* 2009;148:43-66.
83. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100 Suppl 1:11842-11849.
84. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1994;1(8):661-673.
85. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development.* 1997;124(10):1929-1939.
86. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(22):8736-8740.
87. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91(5):661-672.
88. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404(6774):193-197.
89. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001;97(11):3333-3341.

90. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. 2000;290(5499):2152-2154.
91. Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(11):1923-1940.
92. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, Van Etten RA. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*. 2003;424(6948):561-565.
93. Lee JM, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9751-9756.
94. Tothova Z, Gilliland DG. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell*. 2007;1(2):140-152.
95. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, Luciano JP, Brugnara C, Huber T, Ghaffari S. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2133-2144.
96. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1813(11):1978-1986.
97. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-414.
98. Wang L, O'Leary H, Fortney J, Gibson LF. Ph+VE-cadherin+ identifies a stem cell like population of acute lymphoblastic leukemia sustained by bone marrow niche cells. *Blood*. 2007;110(9):3334-3344.
99. Hu Y, Chen Y, Douglas L, Li S. beta-Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(1):109-116.
100. Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3789-3794.
101. Kirschnek S, Adams C, Gulbins E. Annexin II is a novel receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(3):900-906.
102. Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9(5):128-138.
103. Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, DeHaven K, Long L, Brewer G. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7652-7665.
104. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
105. Gu TL, Nardone J, Wang Y, Loriaux M, Villen J, Beausoleil S, Tucker M, Kornhauser J, Ren J, MacNeill J, Gygi SP, Druker BJ, Heinrich MC, Rush J, Polakiewicz RD. Survey of activated FLT3 signaling in leukemia. *PLoS One*. 6(4):e19169.
106. Choudhary C, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int J Hematol*. 2005;82(2):93-99.

107. Chung E, Kondo M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. *Immunol Res.*49(1-3):248-268.
108. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo P, Ruvolo V, Evangelisti C, Martelli AM, McCubrey JA. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia.*25(7):1080-1094.
109. Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):233-240.
110. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, Kruger M, Li H, Forstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis. *Biochem J.* 2008;416(3):395-405.
111. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 2001;1:4.
112. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, Morgante A, D'Armiento FP, D'Armiento M, Porcellini M, Sacchetti L, Bracale G, Salvatore F. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):594-600.
113. Saeed M, Siddique N, Hung WY, Usacheva E, Liu E, Sufit RL, Heller SL, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T. Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology.* 2006;67(5):771-776.
114. Slowik A, Tomik B, Wolkow PP, Partyka D, Turaj W, Malecki MT, Pera J, Dziedzic T, Szczudlik A, Figlewicz DA. Paraoxonase gene polymorphisms and sporadic ALS. *Neurology.* 2006;67(5):766-770.
115. Wills AM, Cronin S, Slowik A, Kasperaviciute D, Van Es MA, Morahan JM, Valdmanis PN, Meininger V, Melki J, Shaw CE, Rouleau GA, Fisher EM, Shaw PJ, Morrison KE, Pamphlett R, Van den Berg LH, Figlewicz DA, Andersen PM, Al-Chalabi A, Hardiman O, Purcell S, Landers JE, Brown RH, Jr. A large-scale international meta-analysis of paraoxonase gene polymorphisms in sporadic ALS. *Neurology.* 2009;73(1):16-24.
116. Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P, Delsol G, Morello D. A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPD overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res.* 2002;62(5):1489-1495.
117. Wang W, Martindale JL, Yang X, Chrest FJ, Gorospe M. Increased stability of the p16 mRNA with replicative senescence. *EMBO Rep.* 2005;6(2):158-164.
118. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000;289(5486):1938-1942.
119. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:461-476.
120. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005;353(2):172-187.
121. Rosnet O, Buhring HJ, deLapeyriere O, Beslu N, Lavagna C, Marchetto S, Rappold I, Drexler HG, Birg F, Rottapel R, Hannum C, Dubreuil P, Birnbaum D. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol.* 1996;95(3-4):218-223.

122. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-1918.
123. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. *Flt3* mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000;96(12):3907-3914.
124. Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J, Buerger H, Muller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H. Constitutive activation of Akt by *Flt3* internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9643-9650.
125. Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*. 1991;9(2):380-385.
126. Levis M, Tse KF, Smith BD, Garrett E, Small D. A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations. *Blood*. 2001;98(3):885-887.
127. Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, Witte L, Li Y, Small D. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2004;103(1):267-274.
128. Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia*. 2000;14(10):1766-1776.
129. Nambu T, Araki N, Nakagawa A, Kuniyasu A, Kawaguchi T, Hamada A, Saito H. Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci*. 101(1):137-142.
130. Clevers H. Wnt/beta-Catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-480.
131. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/beta-Catenin signaling pathway as novel anticancer drugs. *J Pharmacol Sci*. 2009;109(2):179-183.
132. Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs*. 2006;24(4):263-280.
133. Kawaguchi-Ihara N, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the self-renewal capacity of human acute leukemia cells by Wnt3A. *Anticancer Res*. 2008;28(5A):2701-2704.
134. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000;14(15):1837-1851.
135. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-Catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*. 2004;7(4):525-534.
136. Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*. 2005;309(5738):1256-1259.
137. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*. 2004;116(6):883-895.

138. Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, Yoon JK. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-Catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13247-13257.
139. Wei Q, Yokota C, Semenov MV, Doble B, Woodgett J, He X. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-Catenin signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15903-15911.
140. Kloet DE, Burgering BM. The PKB/FOXO switch in aging and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1813(11):1926-1937.
141. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell.* 2007;128(2):325-339.
142. Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 2004;23(24):4802-4812.
143. Hoogeboom D, Essers MA, Polderman PE, Voets E, Smits LM, Burgering BM. Interaction of FOXO with beta-Catenin inhibits beta-Catenin/T cell factor activity. *J Biol Chem.* 2008;283(14):9224-9230.
144. Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-Catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science.* 2005;308(5725):1181-1184.
145. Araujo J, Breuer P, Dieringer S, Krauss S, Dorn S, Zimmermann K, Pfeifer A, Klockgether T, Wuellner U, Evert BO. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet.* 20(15):2928-2941.
146. Oteiza A, Mechti N. The human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein tax controls forkhead box O4 activity through degradation by the proteasome. *J Virol.* 85(13):6480-6491.
147. Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1), the rate limiting enzyme in triglycerides biosynthesis. *J Lipid Res.* 2008.
148. Aviram M. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1(4):585-594.
149. Hayek T, Kaplan M, Kerry R, Aviram M. Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: A stimulatory role for d-glucose. *Atherosclerosis.* 2007.
150. Meilin E, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: Studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2009.
151. Rosenblat M, Hayek T, Hussein K, Aviram M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):175-180.
152. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005;15(1):28-32.
153. Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(34):15022-15026.

- 154.** Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1156-1160.

8 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Originalarbeiten:

Schweikert, E. M., Devarajan, A., Witte, I., Wilgenbus, P., **Amort, J.**, Foerstermann, U., Shabazian, A., Grijalva, V., Shih, D. M., Farias-Eisner, R., Teiber, J. F., Reddy, S. T. and Horke, S. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell death and differentiation*. 2012, in press.

Schweikert, E. M., **Amort, J.**, Wilgenbus, P., Foerstermann, U., Teiber, J. and Horke, S. Paraoxonases-2 and 3 are important defense enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors due to their anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *J Lipids*. 2012, in press.

Witte I., Altenhöfer S., Wilgenbus P., **Amort J.**, Clement A. M., Pautz A., Li H., Förstermann U., Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells: *Cell Death and Disease* (2011) 2.

Vorträge:

Amort J., Wilgenbus P., Buck F., Förstermann U., Horke S. Identification of proteins that bind and regulate the promoter of the multitasking human enzyme Paraoxonase-2; 4th International conference on Paraoxonases, La Pineda 2010.

Abstracts:

Amort J., Wilgenbus P., Schüler A., Kindler T., Förstermann U., Witte I., Horke S. The regulation of PON2 expression, a new key enzyme in hematopoiesis. 19th Euroconference on Apoptosis 2011 und Stem Cells in Development and Disease 2011

Amort J., Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. Expression analyses of PON2, a new anti-apoptotic gene regulated by GSK-3 β -dependent pathways. 34th annual meeting of the German Society for Cell Biology 2011

Horke S., Wilgenbus P., **Amort J.**, Schweikert E. M., Förstermann U., Witte I. The human enzyme PON2 controls tumor cell survival by critically modulating redox signalling. 34th annual meeting of the German Society for Cell Biology 2011

Witte I., Amort J., Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. Pursing redox-balance: Paraoxonase-2 as a new putative anti-tumor target. 52th annual meeting of DGPT, 2011

Amort J., Wilgenbus P., Buck F., Förstermann U., Horke S. Identification of proteins that bind and regulate the promoter of the multitasking human enzyme Paraoxonase-2. 51th annual meeting of DGPT 2010 und 33th annual meeting of the German Society for Cell Biology 2010

Witte I., Altenhöfer S., Wilgenbus P., **Amort J.**, Förstermann U., Horke S. New role for an anti-atherosclerotic enzyme: PON2 confers apoptosis resistance and is overexpressed in tumors. 51th annual meeting of DGPT 2010

9 Danksagung

10 Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Julianna Amort, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Sowohl wörtliche als auch sinngemäß entlehnte Stellen sind unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, April 2012 _____