

**Die Rolle der humanen Enzyme
Paraoxonase-2 und -3 bei
Krebserkrankungen und *Pseudomonas*
Infektionen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Eva-Maria Schweikert
geb. am 29.09.1984 in Mainz
Mainz, 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	11
1.1 <i>Mitochondrien und oxidativer Stress</i>	11
1.2 <i>Apoptose-Signalwege</i>	13
1.2.1 <i>Intrinsische Apoptose</i>	13
1.2.2 <i>Apoptose infolge von DNA-Schäden</i>	14
1.2.3 <i>ER-Stress induzierte Apoptose</i>	16
1.2.4 <i>Extrinsische Apoptose</i>	17
1.3 <i>Kennzeichen der Krebsentstehung und Therapieansätze</i>	18
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa Infektionen</i>	23
1.5 <i>Die Proteinfamilie der Paraoxonasen</i>	24
1.5.1 <i>Paraoxonasen und Arteriosklerose</i>	25
1.5.2 <i>Paraoxonasen und Krebs</i>	26
1.5.3 <i>PON2 als Schutzenzym gegen Pseudomonas aeruginosa Infektionen</i>	27
2 Ziele der Arbeit	29
3 Material	30
3.1 <i>Chemikalien</i>	30
3.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	31
3.3 <i>Laborgeräte</i>	32
3.4 <i>Reagenzien und Kits</i>	33
3.5 <i>Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien</i>	34
3.6 <i>Enzyme und Standards</i>	35
3.7 <i>Antikörper</i>	35
3.8 <i>Sekundärantikörper</i>	36
3.9 <i>Plasmide</i>	37
3.10 <i>Primer und Sonden</i>	37
3.11 <i>Oligonukleotide für RNA-Interferenz</i>	39
3.12 <i>Zelllinien</i>	39
3.13 <i>Medien und Medienzusätze für die Zellkultur</i>	40
3.14 <i>Bakterien</i>	41

4 Methoden	42
<hr/>	
4.1 <i>Zellbiologische Arbeitsmethoden</i>	42
4.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen	42
4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen	42
4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat eukaryoter Zellen	43
4.1.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen	43
4.1.5 Stabile Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen	44
4.1.6 Transfektion von siRNA in eukaryote Zellen	45
4.1.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Chemilumineszenz und Fluoreszenzmessung	45
4.1.8 Messung mitochondrialen Superoxids in eukaryoten Zellen mittels FACS	46
4.1.9 Messung von Apoptosemerkmalen in eukaryoten Zellen mittels FACS	46
4.1.10 Messung der Caspase-3/7-Aktivität und der Zell-Viabilität in eukaryoten Zellen	48
4.1.11 Reporter-Gen-Analysen zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivität	48
4.1.12 Konfokale Lasermikroskopie in lebenden Zellen	49
4.2 <i>Molekularbiologische Arbeitsmethoden</i>	50
4.2.1 Restriktion von DNA	50
4.2.2 Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse von DNA	50
4.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
4.2.4 Dephosphorylierung und Ligation von DNA	51
4.2.5 Transformation von DNA in Bakterien	51
4.2.6 Plasmid-DNA-Präparation	51
4.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
4.2.8 Klonierung der Plasmide pDsRed-Express-PON2 bzw. pDsRed-Express- PON3	52
4.2.9 Klonierung des Plasmids StrepOne-PON2-His	53
4.2.10 Herstellung der PON2-Mutanten	53
4.2.11 Sequenzierung klonierter DNA	54
4.2.12 Extraktion der Gesamtzell-RNA aus eukaryoten Zellen	54
4.2.13 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	54
4.2.14 cDNA-Synthese mittels Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	55
4.2.15 Quantitative <i>real-time</i> -RT-PCR (qRT-PCR)	55
4.2.16 <i>Cancer survey panel</i>	56
4.3 <i>Proteinbiochemische Arbeitsmethoden</i>	57
4.3.1 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryoten Zellen	57

4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	57
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
4.3.4	Proteinfärbung mit Coomassie-Blue	59
4.3.5	Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen	59
4.3.6	Massenspektrometrische Analysen	60
4.3.7	Immunopräzipitation von PON2 mit <i>Dynabeads</i> [®] <i>Protein A</i>	60
4.3.8	Immunopräzipitation von PON2 mit α -HA-Antikörper	61
4.3.9	Immunopräzipitation von PON2 mit α -GFP-Antikörper	62
4.3.10	Zellfraktionierung von eukaryoten Zellen	63
4.3.11	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	64
4.3.12	Messung der Enzym-Aktivität von PON2 und PON3	64
4.3.13	Messung der Enzym-Aktivität der PON2-Mutanten	65
4.3.14	Statistik	65
5	Ergebnisse	66
<hr/>		
5.1	<i>Die Rolle von PON3 in der Tumorbilogie</i>	66
5.1.1	Expression von PON3 in Krebszellen	66
5.1.2	Expression von PON3 in der Tumorumgebung	68
5.1.3	Lokalisation und Funktion von PON3	69
5.1.4	PON3 schützt vor dem intrinsischen Zelltod	72
5.1.5	PON3 schützt vor ER-Stress-induzierter Apoptose	77
5.1.6	Eine PON3-Überexpression kann nicht vor der extrinsischen Apoptose schützen	79
5.1.7	PON3 vermindert die DNA-Schäden-induzierte Apoptose	81
5.1.8	Der <i>knock-down</i> von PON3 verursacht keine spontane Apoptose	82
5.2	<i>PON2 und PON3 agieren als Schutzenzyme gegen Pyocyanin-induzierten oxidativen Stress und Inflammation</i>	86
5.2.1	PON3 schützt die Zellen vor PCN-induziertem ROS	86
5.2.2	PON2 und PON3 schützen die Zellen vor der PCN-induzierten inflammatorischen Antwort	87
5.2.3	3OC12 vermindert die hydrolytische Aktivität von PON3 und führt zu ihrer Degradation	90
5.3	<i>Charakterisierung des PON2-inaktivierenden und –degradierenden Signalweges</i>	94
5.3.1	PON2 wird vermutlich durch eine Dephosphorylierung inaktiviert	94
5.3.2	Die Position S331 könnte die Inaktivierung von PON2 vermitteln	101
5.3.3	Die PON2-Inaktivierung erfolgt vermutlich über einen Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Signalweg	103
5.3.4	Die Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus in der 3OC12-induzierten	

PON2-Degradation	104
6 Diskussion	111
<hr/>	
6.1 <i>Die Rolle von PON3 in der Tumorbiologie</i>	111
6.1.1 Paraoxonasen als mögliche Tumormarker	111
6.1.2 PON3 als anti-apoptotisches Enzym in den Mitochondrien	114
6.1.3 Paraoxonasen als <i>tumor target</i> ?	120
6.2 <i>Wie PON2 und PON3 durch ihre anti-oxidative Eigenschaft vor P. aeruginosa Virulenzfaktoren schützen können</i>	122
6.3 <i>Charakterisierung des PON2-inaktivierenden und –degradierenden Signalweges</i>	124
6.3.1 Die PON2-Inaktivierung erfolgt vermutlich über eine Ca ²⁺ / Calmodulin-abhängige Dephosphorylierung	125
6.3.2 Die Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus in der 3OC12-induzierten PON2-Degradation	128
7 Zusammenfassung	130
8 Literatur	131
9 Publikationsliste	143
10 Danksagung	145
11 Lebenslauf	146
12 Eidesstattliche Versicherung	147

Abkürzungsverzeichnis

3OC12	N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton
5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
A	Adenin bzw. Alanin
Act D	Actinomycin D
Ala	Alanin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CHOP	<i>C / EBP homologous protein 10</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoQ, Q	Coenzym Q ₁₀
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dimethylsulfoxid
DMSO	engl. <i>Dulbecco's modified eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>

EDTA	Ethylendiamintetrasessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. <i>et alii</i> (und andere)
F	Phenylalanin
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
<i>firefly</i>	engl. Glühwürmchen
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP bzw. EGFP	(<i>enhanced</i>) grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
GRP78	engl. <i>glucose regulated protein of 78 kD</i>
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HBSS	engl. <i>Hank's buffered saline solution</i>
HDL	engl. <i>high density lipoprotein</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
hnRNP	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	engl. <i>low density lipoprotein</i>
M	Mol
mA	Milliampere

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
n	nano
Na ⁺ -Pyruvat	Natrium-Pyruvat
NADH	Nikotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
oxLDL	engl. <i>oxidized low density lipoprotein</i>
p	pico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCN	Pyocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PON	Paraoxonase
QH [•]	Ubisemiquinon-Radikal
QH ₂	Ubiquinol
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> Reverse-Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	engl. <i>reactive oxygene species</i>
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
S	Serin
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfat</i>)

Ser	Serin
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SMC	engl. <i>smooth muscle cells</i>
STS	Staurosporin
T	Thymin bzw. Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Tuni	Tunicamycin
Tyr	Tyrosin
U	Uracil bzw. Units
UPR	engl. <i>unfolded protein response</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien und oxidativer Stress

Mitochondrien stellen die „Energiekraftwerke“ der Zelle dar, indem sie während der Atmungskette unter aeroben Bedingungen das energiereiche Molekül Adenosintriphosphat (ATP) bilden. Dabei ist die Entstehung reaktiver Sauerstoff- (*reactive oxygen species*, ROS, z.B. O_2^- , H_2O_2 , OH^-) und Stickstoff-Spezies (*reactive nitrogen species*, RNS, z.B. NO , NO^- , $ONOO^-$) in aeroben Organismen unvermeidlich. Die Mitochondrien stellen die Hauptquelle von ROS dar, indem in der Atmungskette auch unter physiologischen Bedingungen Superoxid (O_2^-) durch Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff entsteht ^{1,2}. Dieses wird jedoch direkt von den anti-oxidativen Superoxiddismutasen (SOD; SOD1 im Cytosol / SOD2 in den Mitochondrien) zu H_2O_2 und Wasser dismutiert. ROS oder RNS galten früher eher als zufällige und schädliche Nebenprodukte, die in hohen Konzentrationen den Organismus schädigen. Dabei wird eine Stoffwechsellage, bei welcher das physiologische Ausmaß an ROS überschritten wird, als oxidativer Stress bezeichnet. Eine übermäßige ROS-Produktion in den Mitochondrien kann zu oxidativen Schädigungen von DNA, Lipiden und Proteinen führen ^{3,4}, Zelltod induzieren (siehe unten, 1.2 und ⁵) und ist zudem an inflammatorischen Prozessen, der Alterung von Zellen und der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Diabetes Mellitus und Krebs beteiligt ⁶. Jedoch konnten inzwischen einige Studien belegen, dass ROS und RNS eine Rolle als Redox-Signalmoleküle in physiologischen Prozessen und in der Abwehr von Pathogenen inne haben ⁷. Demnach sind ROS und RNS nicht nur schädlich, vielmehr ist ein ausgewogenes Redox-Gleichgewicht in der Zelle für ihre Funktion wichtig. Diese Redox-Homöostase zwischen der Produktion der Radikale und ihrer Beseitigung wird fortwährend durch anti-oxidative Enzyme wie SOD, Glutathionperoxidase und Katalase sowie durch anti-oxidative Moleküle wie α -Tocopherol (Vitamin E), β -Carotin, Ascorbat (Vitamin C) und Glutathion aufrecht erhalten ⁷.

Die Atmungskette beginnt mit der Übertragung von zwei Elektronen von NADH auf den Flavinmononukleotid-Kofaktor (FMN) des Komplex I (NADH-Dehydrogenase). Von dort werden die Elektronen über die Coenzym-Q-Reduktionsstelle des Komplex I auf Ubiquinon (auch Coenzym Q_{10} , CoQ bzw. Q) übertragen, während dieses dabei zu Ubiquinol (QH_2) reduziert wird (siehe Abbildung 1-1). QH_2 diffundiert in der inneren Mitochondrienmembran zum Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) und gibt am Q_o -Zentrum zwei Elektronen ab,

wobei es selbst dabei wieder zu Q oxidiert wird. Das erste Elektron wird über das Rieske-Protein in Komplex III auf Cytochrom c (Cyt c) übertragen, welches das Elektron weiter zum Komplex IV transportiert. Das zweite Elektron wird auf die Q-Bindestelle Q_i übertragen, von welcher es vorübergehend auf ein Q unter Entstehung eines Ubisemiquinon-Radikals (QH^{\cdot}) übertragen wird. Dieses bildet nach Übertragung eines zweiten Elektrons ausgehend vom Q_i -Zentrum wieder ein Q, in einem Prozess der als Q-Zyklus bekannt ist⁸. Cyt c überträgt sein Elektron auf den Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase), der nach Erhalt von insgesamt vier Elektronen molekularen Sauerstoff zu Wasser oxidiert. Ziel der Atmungskette bzw. der Elektronenübertragung zwischen den Komplexen ist der Aufbau eines Protonengradienten, indem Protonen von der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran in den Intermembranraum geschleust werden. Dieser kann schließlich zur Gewinnung von energiereichem ATP mit Hilfe des Komplex V (FoF1-ATP-Synthase) genutzt werden. Des Weiteren können auch Elektronen über den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) in die Atmungskette eingespeist werden, indem Elektronen von Succinat im Rahmen des Citratzyklus am Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) des Komplex II auf Q unter Entstehung von QH_2 übertragen werden. Eine hohe Aktivität von Komplex II kann zu einem reversen Elektronentransfer von QH_2 zurück auf die Q-Bindungsstelle von Komplex I führen⁹, wodurch die Elektronenübertragung von Komplex I auf Q erschwert wird. Dadurch kann es zur Bildung von radikalischen und nicht-radikalischen Semiquinon-Zwischenstufen kommen, die wiederum ihre Elektronen auf O_2 unter Bildung von $O_2^{\cdot-}$ übertragen⁹⁻¹¹. Dieser bisher nicht genau aufgeklärte Mechanismus scheint die größte Superoxidproduktion in den Mitochondrien zu verursachen^{9, 12, 13}.

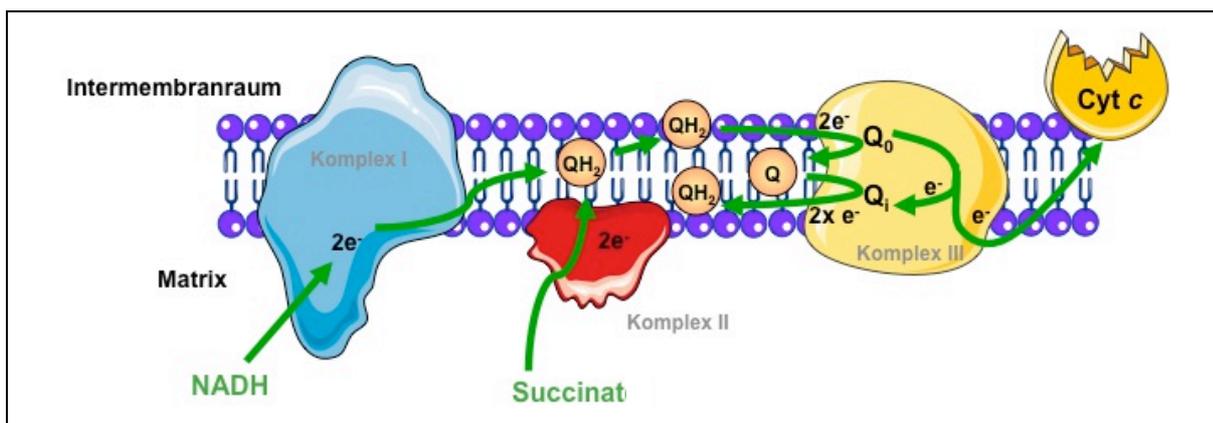


Abbildung 1-1: Elektronentransportkette in den Mitochondrien. Dargestellt ist ein schematischer Ausschnitt der inneren Mitochondrienmembran mit den Komplexen I-III und der Elektronentransportprozesse unter Beteiligung des Coenzym Q10. Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text.

1.2 Apoptose-Signalwege

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und dient dazu, Zellbestandteile kontrolliert abzubauen, während die Bestandteile von benachbarten Zellen aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu werden im unprogrammierten Zelltod, der Nekrose, die Zellorganellen unkontrolliert zerstört und in die Umgebung freigesetzt. Charakteristisch für apoptotische Zellen ist die komplette Änderung ihrer Morphologie, wie das Schrumpfen der Zelle, das Aufblähen (*blebbing*) von Membranen und die Fragmentierung der nukleären DNA. Eine zentrale Rolle in der Apoptose kommt der Aktivierung einer bestimmten Klasse von Cysteinproteasen, den Caspasen zu, welche als inaktive Zymogene in nahezu allen tierischen Zellen exprimiert werden. In Folge von Apoptose-induzierenden Signalen werden sie durch proteolytische Spaltung aktiviert und spalten ihrerseits wiederum andere Caspasen, woraus schließlich die Apoptose resultiert. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade kann über die im Folgenden erläuterten Wege des intrinsischen, ER-Stress-induzierten und extrinsischen Signalweges erfolgen.

1.2.1 Intrinsische Apoptose

Der intrinsische Signalweg der Apoptose kann über verschiedene intrazelluläre Stimuli, z.B. dem pro-apoptotischen Faktor CHOP, DNA-Schäden, UV-Strahlung und Cytostatika aktiviert und schließlich über die Mitochondrien vermittelt werden ¹⁴. In der intrinsischen Apoptose spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle, indem sie neben einer Reihe pro-apoptotischer Proteine (z.B. AIF, Smac / DIABLO) auch insbesondere das stark pro-apoptotisch wirkende Cytochrom c (Cyt c) freisetzen (siehe Abbildung 1-2). Die Freisetzung verläuft nach derzeitigem Wissenstand in einem zweistufigen Prozess: Unter Beteiligung der Proteine Bax und Bak (Mitglieder der Bcl-2-Familie, *B-cell lymphoma 2*) werden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran (*outer mitochondrial membrane*; OMM) generiert, so dass lösliche Proteine aus dem Intermembranraum abfließen können. Bax und Bak können vermutlich auch an VDAC (*voltage-dependent anion channel*) binden und die Porengröße dieses Kanals erweitern ¹⁵. Zwar kommt es hierbei zur geringen Freisetzung eines löslichen Cyt-c-Pools, doch reicht dies in der Regel nicht zur Apoptosom-Bildung aus. In einem zweiten, wahrscheinlich unabhängigen Schritt kommt es zur Entkopplung der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran (*inner mitochondrial membrane*, IMM), in Folge dessen Elektronen auf O₂ übertragen werden, was zur O₂⁻-Bildung führt. Dies wird spontan oder mittels der SOD2 in H₂O₂ überführt. H₂O₂ stellt wiederum ein Substrat für Cyt c dar, welches eine H₂O₂-abhängige Peroxidation des Cardiolipins verursacht ¹⁶, eines ausschließlich in der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten Lipids. Normalerweise liegt ein geringer Teil des Cyt c als löslicher Pool im Intermembranraum zwischen IMM und

OMM vor, während der andere Teil gebunden an Cardiolipin in der IMM verankert ist. In vitalen Zellen übernimmt Cyt c dort die Elektronenübertragung von Komplex III auf Komplex IV während der Atmungskette. Die Peroxidation von Cardiolipin führt jedoch zu strukturellen Änderungen infolgedessen die Interaktion verloren geht und Cyt c in den Intermembranraum und schließlich in das Cytosol entlassen wird^{17, 18}. Diese zwei vermutlich unabhängigen Ereignisse führen somit zur vollen Aktivierung der mitochondrialen Depolarisation und Freisetzung apoptotischer Faktoren¹⁹. Es konnte gezeigt werden, dass alleine weder ROS-Produktion noch die Permeabilisierung der OMM durch Bax ausreichen, um genügend Cyt c zur Apoptoseinduktion freizusetzen^{20, 21}. Cyt c bindet dann zusammen mit dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), welches über eine Konformationsänderung mit seiner CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) an die Procaspase-9 bindet und diese durch Spaltung zur Caspase-9 aktiviert. Das so gebildete Apoptosom führt wiederum zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7, die schließlich zum Zelltod führen. Somit stellen die Cardiolipin-Peroxidation, die anschließende Cyt-c-Freisetzung und Apoptosom-Bildung die molekulare Verbindung zwischen der mitochondrialen ROS-Produktion einerseits und der Ausführung der Apoptose andererseits dar²².

1.2.2 Apoptose infolge von DNA-Schäden

Schäden an der DNA stellen eine mögliche Ursache für die Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges dar. Diese können spontan im Verlauf der DNA-Replikation, durch ROS oder durch mutagene Substanzen, extreme Wärme oder UV-Strahlung verursacht werden. Die Kontrollpunkte der verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmen anhand eines möglichen DNA-Schadens, ob der Zellzyklus zum Erliegen kommt, DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden und ob die genomische Stabilität gewährleistet werden kann²³. Falls der DNA-Schaden zu schwerwiegend ist bzw. falls die entsprechenden Reparaturmechanismen in der Zelle nicht mehr greifen, kann dies zur Einleitung der Apoptose führen. Verschiedene Chemotherapeutika setzen hier an, indem sie beispielsweise durch den Einbau von Basenanaloga (5-Fluorouracil) oder durch Alkylierung (Cisplatin) die DNA schädigen und dadurch den Zelltod einleiten. Dies führt zur post-translationalen Stabilisation und Akkumulation des Tumorsuppressors p53, welcher die Expression von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak induziert²⁴. Diese permeabilisieren die Mitochondrienmembran und führen über die Freisetzung des Cyt c zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (siehe 1.2.1, Abbildung 1-2)²⁵. Diese Freisetzung führt zu einer Defizienz an Cyt c in den Mitochondrien, was zur weiteren ROS-Bildung beitragen kann. Der Stoffwechsel bzw. die Elektronentransportkette (*electron transport chain*, ETC) in den Mitochondrien muss den Verlust des Cyt c durch einen höheren Umsatz ausgleichen,

wodurch zwangsläufig mehr O_2^- entsteht ²². Da O_2^- zur Cardiolipin-Peroxidation und Cyt-c-Freisetzung führen kann, wird der apoptotische Signalweg durch die ROS-Produktion weiter verstärkt. Somit führt p53 nicht nur über Bax, sondern auch über die ROS-Erhöhung zur Cyt-c-Freisetzung bzw. zur Aktivierung der mitochondrial-vermittelten Apoptose ²².

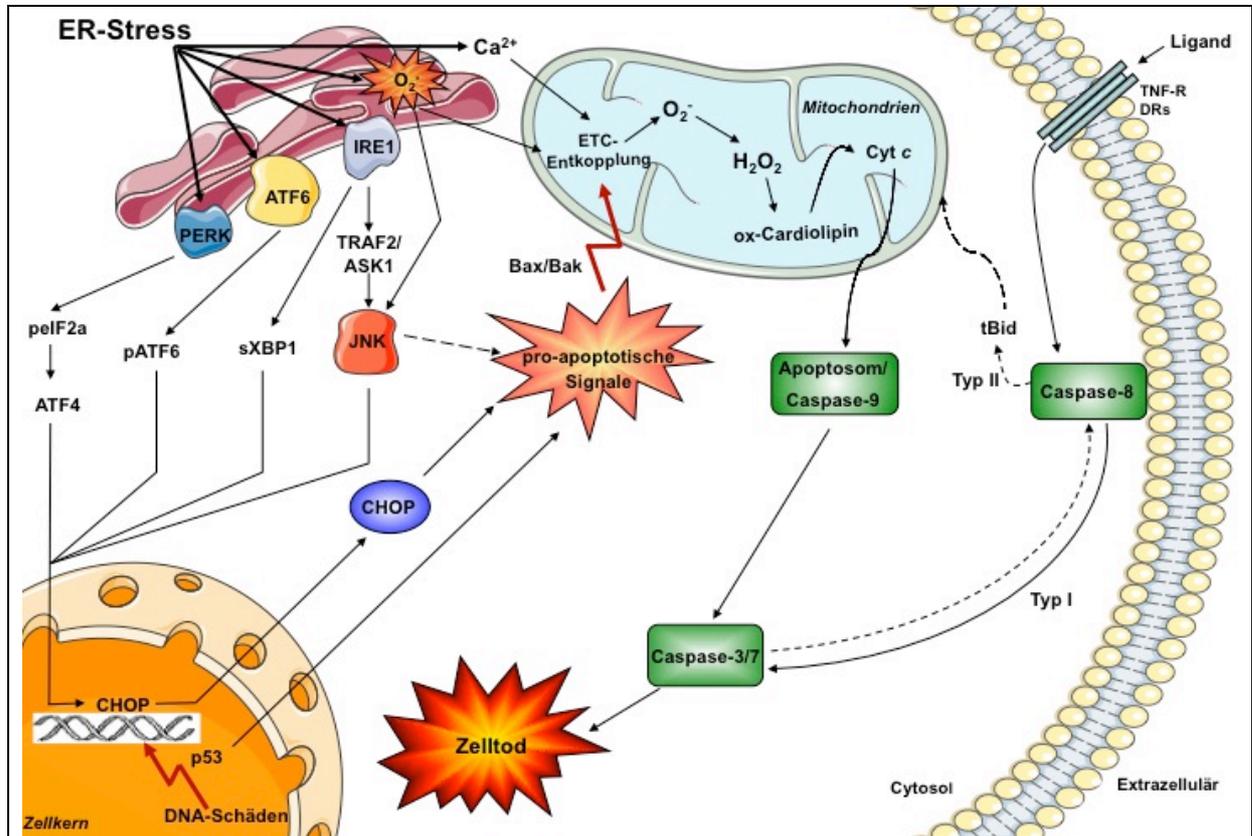


Abbildung 1-2: Schematische Übersichtsdarstellung der beschriebenen Apoptose-Signalwege.
Mitte oben: Die intrinsische Apoptose (siehe 1.2.1) kann durch intrazelluläre pro-apoptische Signale wie p53, CHOP und JNK ausgelöst werden. Diese aktivieren Bax / Bak, welche Poren in der Mitochondrienmembran bilden. Zusammen mit ROS führt dies zur Entkopplung der ETC, zur Bildung von Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), zur Cardiolipin-Peroxidation (ox-Cardiolipin) und schließlich zur Freisetzung von Cyt c. Dieses bildet u.a. zusammen mit der Caspase-9 das Apoptosom, welches die Caspasen 3 und 7 aktiviert und zum Zelltod führt.
Links oben: ER-Stress (siehe 1.2.3) kann die ER-Stress-Sensoren PERK, ATF6 und IRE1 aktivieren. ROS und eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase können die Entkopplung der ETC verursachen. PERK phosphoryliert eIF2a (peIF2a), welches den Transkriptionsfaktor ATF4 aktiviert. ATF6 wird durch Phosphorylierung aktiviert (pATF6) und transloziert in den Zellkern. IRE1 führt zum Spleißen der XBP1-mRNA (*spliced* XBP1, sXPB1) und zur Aktivierung von JNK über TRAF2 / ASK1.
Links unten: Im Zellkern führen die ER-Stress-Signale zur CHOP-Expression. Schäden an der DNA führen zur Akkumulation von p53 (siehe 1.2.2).
Rechts: Die extrinsische Apoptose (siehe 1.2.4) kann über extrazelluläre Liganden durch Bindung an den Todesrezeptor (*death receptor*, DR, z.B. TNF-R) ausgelöst werden. In Typ-I-Zellen führt dies zur Caspase-8 und Caspase-3/7-Aktivierung. In Typ-II-Zellen (gestrichelte Linien) führt die Caspase-8-Aktivierung zur Spaltung von Bid zu tBid, welches über pro-apoptotische Faktoren die Freisetzung von Cyt c bewirkt. Dies führt wiederum zur Apoptosom-Bildung, Caspase-3/7-Aktivierung und zum Zelltod. Die Caspase-3 kann zudem in einer positiven Rückkopplungsschleife die Caspase-8 aktivieren. Weitere Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text.

1.2.3 ER-Stress induzierte Apoptose

Neben den Mitochondrien als Schlüsselrolle in der Amplifikation von apoptotischen Signalen, kann auch das Endoplasmatische Retikulum (ER) in der Apoptose involviert sein. ER-Stress kann als Initiator der Apoptose fungieren, beispielsweise wenn ungefaltete Proteine akkumulieren oder der Transport zwischen ER und Golgi inhibiert wird und dadurch der UPR-Signalweg (*unfolded protein response*) aktiviert wird²⁶. Andere Auslöser können auch eine Störung in der Ca^{2+} -Homöostase oder eine Überladung mit Lipiden (*lipid overload-induced UPR*) sein, welche zum Tod der Makrophagen bzw. zur Arteriosklerose wesentlich beitragen können²⁷. Dabei ist das Hauptziel des UPR das Überleben der Zelle, jedoch kann der Signalweg ebenso Zelltod verursachen. Der UPR-Signalweg kann demnach über die Ausübung der physiologischen Funktion und das Überleben der betroffenen Zelle entscheiden und ist daher mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, wie Arteriosklerose, Diabetes oder Neurodegenerationen²⁸. Ferner ist der UPR-Signalweg folgendermaßen an der Entstehung von Krebszellen beteiligt: Tumorzellen sind bereits während ihrer malignen Transformation verschiedenen Stressformen ausgesetzt (z.B. durch hohe Syntheseleistungen und Energiebedarf bei gleichzeitiger Hypoxie und Mangelversorgung an Glucose / O_2 / Aminosäuren etc.), welche in ihrer Gesamtheit ER-Stress auslösen und somit den UPR aktivieren. Dieser kann die Apoptose induzieren, primär jedoch unterstützt er das Fortbestehen der Zelle unter Stressbedingungen. Letzteres wird pathophysiologisch in einigen Tumorformen vermehrt induziert (z.B. über GRP78 Überexpression, siehe unten), was wiederum eine maligne Transformation begünstigt. Folglich stellt der UPR einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt bei Krebserkrankungen dar²⁹.

Akkumulieren ungefaltete Proteine im ER werden diese von Chaperonen insbesondere der HSP70 Familie wie z.B. HSPA5 / GRP78 (*heat shock protein A5 / glucose-regulated-protein of 78 kDa*) gebunden. Dies führt zum Verlust der Interaktion von GRP78 mit den ansonsten daran gebundenen ER-Stress-Sensoren PERK (*pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*), IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) und ATF6 (*activated transcription factor 6*). Der UPR-Signalweg läuft dann unter Beteiligung dieser Transmembranproteine nach folgendem Schema ab (siehe Abbildung 1-2): 1. Die Aktivierung der Kinase PERK führt zur Phosphorylierung von eIF2a (*eukaryotic initiation factor-2 α*), welches die Translation blockiert, um eine weitere Proteinsynthese zu unterbinden. Gleichzeitig induziert dies paradoxer Weise die Synthese des Transkriptionsfaktors ATF4, welcher verschiedene UPR-Zielgene induziert. 2. Die Aktivierung von IRE1, welches ein bifunktionales Enzym ist – es besitzt eine Kinase und eine Endoribonuklease-Aktivität. Als Kinase stimuliert es über TRAF2 / ASK1 (*TNF receptor-associated factor 2 / apoptosis signal-regulating kinase 1*) die Proteinkinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*); als Endoribonuklease führt es zum Abbau von mRNAs kodierend für Membran- und sekretierte Proteine und insbesondere vollzieht IRE1

ein unkonventionelles Spleißen der XBP1-mRNA (*x-box binding protein 1*), was den Transkriptionsfaktor XBP1 generiert. 3. ATF6 transloziert in den Golgi Apparat, wird dort prozessiert und aktiviert, und transloziert daraufhin als Transkriptionsfaktor in den Kern, um ebenfalls UPR-Zielgene zu aktivieren²⁸. Zusammen führt dies zur Transkriptionsaktivierung von Chaperonen und pro-apoptotischem CHOP, welches wiederum pro-apoptotische Bcl-2-Proteine aktivieren kann. Falls der ER-Stress unüberwindbar ist, ist CHOP der wesentliche Initiator der Apoptose, was daran deutlich wird, dass eine CHOP-Defizienz zu einer Resistenz gegenüber verschiedener cytotoxischer Stimuli führt^{30,31}. JNK kann jedoch auch direkt über ROS aktiviert werden, wobei vermutlich ASK1 dabei als Zielprotein für ROS die Aktivierung von JNK vermittelt^{32,33}.

Neben ungefalteten Proteinen kann auch eine Störung in der Ca^{2+} -Homöostase ER-Stress auslösen. Das ER spielt als Hauptspeicher des intrazellulärem Ca^{2+} und als Regulator der Ca^{2+} -Homöostase eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion. Eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase kann beispielsweise durch oxidativen Stress induziert und durch Bcl-2 vermindert werden³⁴. Die Bcl-2 Proteinfamilie besteht aus mehreren Mitgliedern, deren Funktion entweder anti-apoptotisch (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, MCL-1) oder pro-apoptotisch (z.B. Bax, Bad, Bid, Bak, Bim, Puma, Noxa) ist. Somit gelten Bcl-2-Proteine als kritische Regulatoren zwischen Zellüberleben und –tod. Unter anderem sind sie auch im ER lokalisiert und können dort die Ca^{2+} -Freisetzung bzw. den Ca^{2+} -abhängigen Zelltod regulieren³⁵. Anti-apoptotisches Bcl-2 reduziert die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER nach apoptotischen Stimuli, hingegen führen die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung³⁶. Ein erhöhter Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle kann zu einer vermehrten Ca^{2+} -Aufnahme in den Mitochondrien führen³⁷. Darauf folgt die Öffnung von Ca^{2+} -gesteuerten Poren (PTP, *permeability transition pore*), was im Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und im Zelltod resultiert³⁷. Bax und Bak kontrollieren die Apoptose direkt an den Mitochondrien, aber auch indirekt als Kontrollpunkt für Ca^{2+} -abhängige apoptotische Stimuli am ER, die wiederum über die Mitochondrien verstärkt werden.

1.2.4 Extrinsische Apoptose

Der extrinsische Signalweg kann entweder unabhängig von den Mitochondrien Apoptose auslösen (Typ-I-Zellen) oder benötigt den mitochondrialen Weg zur Signalverstärkung (Typ-II-Zellen). In beiden Zell-Typen kann die Apoptose durch Ligandenbindung (z.B. TNF- α , TRAIL, FasL) an einen Todes-Rezeptor (*death receptor*, DR) der TNF-Familie eingeleitet werden. Im Falle des am besten charakterisierten TNF-Rezeptor / Ligand-Systems kommt es zur Trimerisierung des Fas-Rezeptors und somit zur Formation des Todesrezeptorkomplexes DISC (*death-inducing signaling complex*). Hierbei wird das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) über die homophile Interaktion

der Todesdomänen aus Rezeptor und Adapterprotein rekrutiert. Darüber hinaus besitzt FADD eine Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*), die über eine homophile Interaktion an die DED der Pro-Caspase-8 bindet und zu deren autokatalytischen Spaltung führt^{38, 39}. In Typ-I-Zellen aktiviert die prozessierte Caspase-8 direkt andere Mitglieder der Caspase-Familie (Caspase-3 und -7) und stimuliert dadurch die Apoptose (siehe Abbildung 1-2)⁴⁰. In Typ-II-Zellen startet der Fas-DISC-Komplex eine Rückkopplungsschleife über die Mitochondrien, wodurch die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien verstärkt und die Aktivierung der Caspase-8 amplifiziert wird⁴⁰. Dazu spaltet die Caspase-8 das cytosolische Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*). Das entstehende C-terminale Spaltprodukt tBid (*truncated Bid*) vermittelt nach der Translokation in die Mitochondrien die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren. Es kommt zur Freisetzung von Cyt c, welches über Apaf-1 die Caspase-9 aktiviert und wiederum zur Caspase-3-Aktivierung führt. Diese aktiviert in einer positiven Rückkopplungsschleife die Caspase-8 unabhängig vom Fas-DISC-Komplex⁴⁰.

1.3 Kennzeichen der Krebsentstehung und Therapieansätze

Krebs kann unterschiedliche Ursachen haben, jedoch scheint allen Krebszellen die Erlangung von bestimmten Fähigkeiten während der vielschrittigen Entwicklung von Tumoren gemein zu sein. Hierzu zählen nach Hanahan et al.⁴¹ die Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen, das Umgehen von Wachstumssuppressoren, das Abschwächen pro-apoptotischer Mechanismen, das Erlangen von replikativer Immortalität, die Angiogeneseinduktion, die Aktivierung von Invasion und Metastasierung, die Reprogrammierung des Energiemetabolismus und die Vermeidung vor einer durch das Immunsystem vermittelten Zerstörung der Krebszelle. Die von Hanahan et al.⁴¹ ausführlich diskutierten Mechanismen, sollen in Anlehnung an den Review nachfolgend erläutert und in diesem Zusammenhang aktuelle Therapieansätze aufgezeigt werden.

Unter physiologischen Bedingungen wird das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod u.a. durch Kontrollpunkte des Zellzyklus streng geregelt. Krebszellen hingegen deregulieren diese Signale und werden davon verstärkt unabhängig. Die Signale werden meist durch Wachstumsfaktoren vermittelt, welche an Zelloberflächenrezeptoren binden, die typischerweise eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne besitzen (z.B. EGF-Rezeptor, *epidermal growth factor*). Letztere reguliert über den nachfolgenden Signalweg (z.B. MAPK / ERK, PI3K / AKT, JAK / STAT) das Fortschreiten des Zellzyklus und das Wachstum der Zelle. Eine Vielzahl von Melanomen weisen eine Mutation der Proteinkinase B-Raf (*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*) auf, was über das exprimierte RAF zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (MAP, *mitogen-activated*

protein) führt⁴². Ähnlich führt eine Mutation der Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase zu einer übermäßigen Aktivierung des PI3K / AKT-Signalweges^{43, 44}. Eine mutierte, permanent exprimierte Version von onkogenem MYC wird zudem in vielen Krebszellen gefunden. Des Weiteren können auch Defekte in negativen Feedback-Schleifen ursächlich für eine verstärkte Proliferation sein, wie z.B. durch Mutation der Ras-GTPase, welche zu mehr onkogenem RAS führt⁴¹.

Neben der Induzierung und Erhaltung von wachstumsfördernden Signalen spielt auch die Umgehung von Signalwegen, welche die Zellproliferation negativ regulieren, eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung. Bekannte Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom-Protein (pRB) und p53, welche beide Regulatoren darüber sind, ob eine Zelle proliferiert oder ob die Seneszenz bzw. die Apoptose aktiviert wird. Während pRB wachstums-inhibierende Signale von außen in die Zelle vermittelt, stellt p53 einen intrazellulären Sensor dar, der vor allem bei DNA-Schäden regulierend wirkt: Falls der Grad der DNA-Schäden im Genom hoch ist oder die Menge an Nukleotiden, Glucose oder Oxygenierung nicht optimal sind kann p53 den Zellzyklus anhalten. Dieser Arrest dauert solange an, bis diese Bedingungen wieder optimal sind. Wenn dies nicht mehr möglich sein sollte, kann p53 alternativ zur Apoptose führen. Es werden sehr häufig Mutationen in pRB oder p53 (>50% aller Tumore) in Krebszellen gefunden, die zum Verlust ihrer Funktion führen und damit das Entkommen vor der Apoptose fördern^{45, 46}.

Die Abschwächung pro-apoptotischer Mechanismen ist ein weiteres Charakteristikum der Karzinogenese, wobei die Apoptose normalerweise eine natürliche Barriere der Krebsentstehung darstellt⁴⁷. Dabei spielt die Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*, z.B. Bcl-2, Bxl-x_L, Mcl-1) mit anti-apoptotischem Bcl-2 als Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie zusammen mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak eine entscheidende Rolle in der Regulation der Apoptose. Wenn Bax und Bak nicht mehr durch anti-apoptotische Faktoren wie Bcl-2 inhibiert werden, zerstören sie durch Porenbildung die Integrität der mitochondrialen Membran und führen zur Cyt-c-Freisetzung (siehe 1.2.1). Die Gruppe der BH3-*only*-Proteine (z.B. Puma, Noxa und Bim) können dabei entweder Bcl-2 in seiner anti-apoptotischen Funktion inhibieren oder direkt pro-apoptotische Mitglieder dieser Familie stimulieren⁴⁸. Dabei kann die Expression von Noxa und Puma durch p53 und Bim durch geringe Mengen an Überlebenssignalen (z.B. Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 / 2, Igf1/2) hochreguliert werden^{25, 49}. Über den Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 entkommen die Krebszellen häufig der Apoptose; alternativ kann die Hochregulation von anti-apoptotischen Regulatoren (Bcl-2, Bxl-x_L) und Überlebenssignalen (Igf1/2) oder die Runterregulation von pro-apoptotischen Faktoren (Bax, Bim, Puma) zum Überleben der Krebszelle beitragen.

Unter physiologischen Bedingungen können Zellen nur eine bestimmte Anzahl von Teilungen durchmachen und gehen dann in einen seneszenten Zustand oder aber in eine Krisen-Phase, in der die meisten Zellen sterben. Dabei ist die für eine Zelle mögliche Anzahl der Teilungen in der DNA über die Telomere (Chromosomenenden) vorprogrammiert, welche von Teilung zu Teilung kürzer werden. In immortalisierten Zellen wie Krebszellen wird zu über 90% das Enzym Telomerase exprimiert, welches in nicht-immortalisierten Zellen fehlt⁴¹. Die Telomerase kann die Integrität der Telomere aufrecht erhalten und führt vermutlich darüber zu einer Resistenz der Krebszellen gegenüber der Seneszenz und der Krise / Apoptose.

Ebenso wie normale Zellen brauchen auch Krebszellen eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Blutbahn. Zu diesem Zweck bilden Tumore eigene Gefäße in dem Prozess der Angiogenese aus. Bei der Angiogenese handelt es sich um einen komplexen Ablauf, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Pericyten und glatten Muskelzellen durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren wie etwa VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) aktiviert werden. Beide Faktoren VEGF und FGF konnten hochreguliert in Krebszellen gefunden werden und stehen ursächlich mit der Angiogenese von Tumorzellen in Verbindung^{50, 51}. Darüber hinaus konnten auch Pericyten, welche in Gefäßen normaler Gewebe eine wichtige mechanische und physiologische Unterstützung der Endothelzellen bieten, assoziiert mit vielen Neovaskulaturen der Tumore gefunden werden⁵².

Ein benigner Tumor kann zwar destruktiv wachsen, aber er respektiert Gewebsgrenzen, ist also zumeist abgegrenzt. Ein Charakteristikum von malignen Tumoren hingegen ist die Fähigkeit der Krebszellen zur Invasion und Metastasierung. Diese entwickeln typischerweise Veränderungen in ihrer Anhaftung an andere Zellen und an die extrazelluläre Matrix (ECM). Die häufig beobachtete Herunterregulation bzw. Inaktivierung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin weist auf seine Rolle als Schlüssel-Suppressor der Invasion und Metastasierung hin⁵³. Wiederum ermöglicht die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls Integrin eine Anheftung der Krebszellen im Zielgebiet⁵⁴. Paradoxerweise können inflammatorische Zellen die Invasion von Krebszellen fördern, indem sie sich am Rand der Tumore ansammeln und Enzyme und andere Faktoren produzieren, die dem Abbau der ECM dienen (z.B. Matrix-Metalloproteinasen) und ein invasives Wachstum fördern⁵⁵⁻⁵⁷.

Die Reprogrammierung des Energiemetabolismus stellt ein weiteres Krebsmerkmal dar. Normale Zellen gewinnen unter aeroben Bedingungen Energie über die Glykolyse und Zellatmung. Bereits vor langem wurde von Warburg beschrieben, dass Krebszellen ihren Metabolismus auch bei Vorhandensein von Sauerstoff auf die „aerobe Glykolyse“ umstellen können^{58, 59}. Trotz des dadurch geringeren Energiegewinns der Krebszelle kann das

Zurückgreifen auf die Glykolyse sinnvoll sein, da Krebszellen oftmals hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Hierzu passend regulieren Krebszellen über onkogenes RAS oder Hypoxie die Transkriptionsfaktoren HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1*) und HIF2 α hoch, welche wiederum die Glykolyse steigern⁶⁰. Weiterhin regulieren Krebszellen den Glucosetransporter GLUT1 hoch, welcher den Glucoseimport in das Cytoplasma erhöht und somit den vermehrten Energiebedarf deckt⁶¹.

Die Vermeidung vor einer durch das Immunsystem vermittelten Zerstörung der Krebszelle ist ebenso grundlegend für die Karzinogenese, jedoch ist bisher nicht genau aufgeklärt, wie Krebszellen dem Immunsystem entkommen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Defizienz in T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) empfänglicher für die Entstehung von Krebs waren⁶². Eventuell könnten Krebszellen infiltrierende CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*) und NK-Zellen blockieren, indem sie TGF- β (*transforming growth factor*) oder andere immunsuppressive Faktoren sekretieren⁶³.

Zugrundeliegend für die aufgelisteten Merkmale, die kennzeichnend für die Entstehung von Krebs sind, sind zwei weitere Eigenschaften: Die genomische Instabilität und Entzündungen (Inflammation). Erst die erhöhte Mutationsrate in Krebszellen und die damit verbundene Instabilität des Genoms sorgt dafür, dass die Zelle eine derartige genetische Diversität hervorbringen kann⁶⁴. Inflammation kann ebenso zu vielen Besonderheiten der Krebszellen beitragen, indem Zellen des Immunsystems Wachstumsfaktoren, Überlebensfaktoren, pro-angiogene Faktoren etc. zur Verfügung stellen⁶⁵.

Laut statistischem Bundesamt stirbt rund jeder vierte in Deutschland an den Folgen einer Krebserkrankung^a, weshalb es besonders wichtig ist, derzeitige Therapieformen weiterzuentwickeln. Insgesamt bilden die oben erläuterten Kennzeichen von Krebszellen vielversprechende Angriffspunkte der Krebstherapie⁴¹. Zur Zeit stellt die Chemotherapie die hauptsächliche Therapieform bei Krebserkrankungen dar, wobei die meisten der verwendeten Cytostatika die schnelle Teilungsfähigkeit der Tumorzellen ausnutzen, da diese empfindlicher als gesunde Zellen auf Störungen der Zellteilung reagieren. Die Substanzen können beispielsweise durch Schädigung der DNA die Zelle in die Apoptose führen (z.B. 5-Fluorouracil, Cisplatin, siehe 1.2.2). Jedoch ist die Inhibition nur eines Signalweges wahrscheinlich nicht ausreichend, da Krebszellen oftmals Resistenzen gegenüber der Behandlung ausbilden können. Vermutlich müssen mehrere parallele Signalwege gleichzeitig gehemmt werden, um den Krebs effektiv zu bekämpfen und eine Resistenzentwicklung gegenüber der Therapie zu vermeiden. Hierzu könnte ein gleichzeitiges und insbesondere Tumor-spezifisches Ansetzen an mehreren oben genannten Krebskennzeichen durch eine kombinierte Therapie evtl. auch zusammen mit einer eher unspezifischen Chemotherapie für einen besseren Therapieerfolg sinnvoll sein. Gerade eine

^a Statistisches Bundesamt Deutschland, www.destatis.de

Kombination von vielen Strategien in einer moderaten Wirkstoffkonzentration könnte zu größerem Erfolg bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen führen, denn letztere sind bei hochdosierten Einzeltherapien oftmals schwerwiegend. Derzeit zur Inhibition von Proliferationssignalen meist in Kombination mit Chemotherapie erfolgreich angewendet werden beispielsweise die monoklonalen Antikörper / Tyrosinkinase-Inhibitoren Trastuzumab (Herceptin[®]) bei Brustkrebs, Erlotinib (Tarceva[®]) bei Pankreaskarzinom, Panitumumab (Vectibix[®]) bei kolorektalen Karzinomen, Gefitinib (Iressa[®]) und Cetuximab (Erbix[®]) bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Auch bereits eingesetzt werden VEGF-Inhibitoren zur Angiogenese-Hemmung wie Bevacizumab (Avastin[®]) und anti-CTLA4-Antikörper zur Immunaktivierung wie Ipilimumab (Yervoy[®]). Weiter ist die Entwicklung von Substanzen sinnvoll, welche an den übrigen Stellen angreifen: so z.B. Stimulantien der pro-apoptotischen BH3-Proteine, Telomerase-Inhibitoren, HGF / c-Met-Inhibitoren zur Unterdrückung der Metastasierung, aerobe Glykolyse-Inhibitoren, PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase)-Inhibitoren, welche die genomische Instabilität der Krebszellen ausnutzen, oder auch selektive anti-inflammatorische Substanzen ⁴¹.

Dies zeigt, wie wichtig die Identifizierung von tumorspezifischen Mechanismen ist, um „Schwachstellen“ der jeweiligen Krebszellen aufzudecken und dementsprechend eine Therapie entwickeln zu können. Die oben genannten Beispiele belegen wie Tumor-eigene, anti-apoptotische Mechanismen als Ziele in der Krebstherapie genutzt werden können. Jedoch stellen auch vorangehende Signalwege attraktive Angriffstellen dar, da sie viele kritische Mediatoren beinhalten, von denen die meisten leider wenig verstanden sind. Einen solchen stromaufwärts liegenden Mediator, welcher eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung spielt, stellen Redox-Signale in den Mitochondrien dar, da sie sowohl den Energiemetabolismus als auch den Zelltod regulieren. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysfunktion in den Mitochondrien zu vielen Krankheiten führt und derzeit zahlreiche Wirkstoffe entwickelt werden, welche die Mitochondrien als Ziel haben ⁶⁶. Mitochondrien haben direkt oder über ER-Stress-Signalwege einen Einfluss auf die Apoptose bzw. auf Krebs-relevante Signalwege ⁶⁷ (siehe 1.2.1 und 1.2.3). Daher stellen anti-oxidative Moleküle oder Proteine vielversprechende Ziele in der Krebstherapie sowie in der Behandlung vieler anderer Krankheiten dar. Eine Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein solches anti-oxidatives Enzym als potentiell-neues Angriffsziel (*tumor target*) für die Krebstherapie zu charakterisieren (siehe unten).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen

Bei dem humanen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um einen opportunen Krankenhauskeim. Dieser befällt typischerweise die Atemwege von z.B. immunsupprimierten Patienten oder solchen, die an Cystischer Fibrose, Lungenentzündung, Brandwunden, HIV oder einer allgemeinen Schwächung z.B. durch eine Krebserkrankung und Chemotherapie leiden⁶⁸. Insgesamt kann aufgrund von Hochrechnungen von etwa 500.000 bis 800.000 Fällen nosokomialer Infektionen im Jahr in Deutschland ausgegangen werden, wobei *P. aeruginosa* mit ca. 10% aller Krankenhausinfektionen zu den in Deutschland am häufigsten auftretenden Krankenhauskeimen zählt^b. Eine Infektion kann zu schwerwiegenden Schäden im Wirt führen, während die Behandlung mit Antibiotika oftmals durch Multi-Resistenzen und der Biofilm-Formation der Bakterien behindert wird, welche diesen einen physikalischen Schutz vor einer Antibiose bietet. Des Weiteren sekretiert *P. aeruginosa* eine Reihe von Virulenzfaktoren, die der bakteriellen Kommunikation dienen und die Abwehrmechanismen des infizierten Wirtes schwächen. Zwei wichtige Faktoren sind das *quorum-sensing* Molekül N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3OC12) und das redox-aktive Pyocyanin (PCN). Die lokale 3OC12-Konzentration gilt als Maß der bakteriellen Zelldichte – ein Mechanismus, der als *quorum-sensing* bezeichnet wird und durch welchen die Bakterien ihre Genexpression koordinieren. Wenn die bakterielle Dichte und damit die 3OC12-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert erreicht, werden die Bakterien durch Expression von Virulenzfaktoren (immunogene Exoenzyme und Toxine) und durch Induzierung von inflammatorischen Prozessen virulent. Das Lacton 3OC12 hat sowohl immunmodulatorische als auch inflammatorische Eigenschaften, wie einen inhibitorischen Effekt auf die von Dendritischen Zellen aktivierten T-Zellen⁶⁹, die pro-inflammatorische Induktion von IL-6 und IL-8 in Lungenepithelzellen und Lungenfibroblasten⁷⁰ und in der Auslösung der Wirtszell-Apoptose^{71,72}. Studien in Mäusen haben gezeigt, dass 3OC12 ein essentieller Faktor für die bakterielle Kolonisierung und der Etablierung von chronischen Lungeninfektionen darstellt⁷³.

Die Produktion des Virulenzfaktors PCN wird positiv durch *quorum-sensing* Signale einschließlich des 3OC12 reguliert⁷⁴. PCN verursacht oxidativen Stress und hat eine große Bandbreite an Effekten auf die Lungenepithelzellen wie die Auslösung von Zellaalterung, ciliärer Dyskinesie, der Induktion der IL-8-Sekretion, die Verringerung des Glutathion-Gehalts und die Inhibierung der Katalase-Aktivität^{74,75}. Dabei ist die Redox-Aktivität von PCN maßgeblich für die Schäden, welche im Wirt entstehen. Das zwitterionische PCN transferiert im Cytosol Elektronen von reduziertem NADH oder NADPH auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Superoxid, welches weiter zu H₂O₂ umgesetzt wird⁷⁶. Zusätzlich stört PCN

^b Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8, Nosokomiale Infektionen, Juni 2002, Verlag Robert Koch-Institut

eines der wichtigsten anti-infektiösen Systeme der Lungenmucosa, nämlich das antimikrobielle Duox / SCN⁻ / LPO-System, indem es mit diesem System um die gleichen Substrate (molekularer Sauerstoff und NADPH) konkurriert ⁷⁷. Das Duox / SCN⁻ / LPO-System dient der Verteidigung gegen Pathogene durch Generierung oxidativer Metabolite. Hierbei bildet das Duox-Enzym H₂O₂ mit Hilfe von Sauerstoff und NADPH, welches die Umsetzung von Thiocyanat (SCN⁻) durch die Lactoperoxidase (LPO) zu mikrobizidem Hypothiocyanit (OCSN⁻) fördert ⁷⁸. PCN ist für die Lungeninfektion unabdingbar, so konnte in einem Mausmodell für akute Lungenentzündung demonstriert werden, dass *P. aeruginosa* Stämme, welchen die Fähigkeit zur PCN Produktion fehlte, eine wesentlich geringere Virulenz als der Wild-Typ Stamm aufwies ⁷⁹.

Derzeit werden *P. aeruginosa* Infektionen mit Antibiotika therapiert, wie beispielsweise mit Piperacillin, Cephalosporinen (± Aminoglykosiden), Fluoroquinolonen und Carbapenemen. Eine erfolgreiche Behandlung ist jedoch aufgrund der bereits erwähnten Multi-Resistenzen und der Biofilm-Formation oftmals nur schwer oder nicht mehr möglich. Seit einiger Zeit werden klinische Studien zu *Pseudomonas*-Impfungen durchgeführt, wobei sich der Impfstoff IC43 bereits in Phase III befindet. Dieser Impfstoff beruht auf der Wirtsimmunisierung mittels zweier Oberflächenantigene von *P. aeruginosa* und konnte eine Phase-II-Studie erfolgreich beenden (<http://www.clinicaltrials.gov>). Auch die Entwicklung von *quorum-sensing*-Inhibitoren könnte einen großen Vorteil im Bekämpfen von *P. aeruginosa* Infektionen darstellen ⁸⁰⁻⁸². Falls es gelingen würde, die Biofilm-Formation durch solche Inhibitoren zu verhindern, könnte die Behandlung mit Antibiotika aufgrund der besseren Zugänglichkeit zu den Bakterien deutlich verbessert werden.

1.5 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Die Paraoxonase-1, -2, und -3 (PON1, PON2, PON3) bilden zusammen die Genfamilie der Paraoxonasen, eine Gruppe homologer Gene, die im Menschen in einem Cluster auf Chromosom 7 lokalisiert sind und deutliche strukturelle Gemeinsamkeiten haben ^{83, 84}. Die PONs haben alle ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa und weisen eine Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene von ca. 65% auf ⁸³. Namensgebend für die PONs ist die Fähigkeit von PON1 zur Hydrolyse des toxischen Paraoxons und verwandter Substrate, jedoch besitzt PON2 keine und PON3 nur geringe Hydrolyseaktivität gegenüber Organophosphaten. Allen gemeinsam ist die enzymatische Lactonase-Aktivität, wobei sie verschiedene und z.T. überlappende Substratspezifität haben ⁸⁵⁻⁸⁷. Die experimentell besten und spezifischsten Substrate für PON1 sind Phenylacetat das Organophosphat Diazon, für PON2 das Lacton 3OC12 und für PON3 Lovastatin ⁸⁵. Die endogenen Substrate hingegen sind unbekannt. Alle drei PONs zeigen eine anti-oxidative Wirkung, was sich durch protektive

Eigenschaften der PON-Proteine im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder widerspiegelt (siehe unten), in denen eine Störung des Redox-Gleichgewichts und oxidativer Stress von Bedeutung sind⁸⁸. Neben der anti-oxidativen Eigenschaft, die den PONs gemeinsam ist, bestehen Unterschiede in Lokalisation, enzymatischer Aktivität, Regulation und Assoziation mit unterschiedlichen Krankheiten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben.

1.5.1 Paraoxonasen und Arteriosklerose

Bei Arteriosklerose handelt es sich um eine chronische inflammatorische Erkrankung, die unter anderem durch die Akkumulation verschiedener Zellen, Lipiden und extrazellulären Matrices in der Intima der Arterien gekennzeichnet ist. Auch wenn reduzierte Mengen an HDL (*high density lipoprotein*) und erhöhte LDL-Mengen (*low density lipoprotein*) Risikofaktoren darstellen, kann die Arteriogenese vermutlich nicht nur durch das LDL / HDL-Verhältnis oder die Cholesterol und Lipidablagerung in der Arterienwand erklärt werden. Immer mehr Daten weisen auf eine fundamentale Rolle von oxidativem Stress in der Arteriosklerose hin. Dabei könnte LDL als wesentliche Zielstruktur der Oxidation sowohl in der Initiierung als auch im Voranschreiten der Arteriosklerose wesentlich beteiligt sein⁸⁹. Eventuell könnten hier die anti-oxidativen Paraoxonasen als Schutzenzyme gegen Arteriosklerose ansetzen, indem sie die Oxidation von LDL vermindern. Gleichzeitig vermindern PONs auch die durch oxidativen Stress begünstigte inflammatorische Reaktion der Gefäßwand sowie direkte Zellschädigungen durch ROS und Zellverlust durch Apoptose.

PON1 wird vorwiegend in der Leber, in geringen Mengen auch in der Niere exprimiert und liegt zum vermutlich größten Teil HDL-assoziiert im Serum vor. Eine charakteristische Funktion von PON1 ist die Verhinderung der Oxidation von LDL-Partikeln im Serum⁹⁰. Auch für PON3, welches ebenfalls hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und an HDL-assoziiert vorliegen kann, wurde die Fähigkeit nachgewiesen, den Serumgehalt an oxidiertem LDL zu verringern^{91, 92}. PON1 und PON3 wirken demnach humoral anti-oxidativ, indem sie die Oxidation von LDL-Partikeln minimieren und somit vor kardiovaskulären Erkrankungen schützen könnten⁹³. Auch wenn PON3 wie PON1 als Serumbestandteil der HDL-Fraktion auftreten kann, werden lediglich 5% des exprimierten PON3 in die Blutbahn abgegeben, während bei PON1 dieser Anteil 80% beträgt⁹⁴. Demnach ist der protektive Effekt von PON3 gegenüber der Oxidation von LDL-Partikeln (oxLDL) im Vergleich zu PON1 gering. In Untersuchungen mit Mäusen, die transgen humanes PON3 überexprimierten, wurde ein vermindertes Auftreten von Arteriosklerose und ein reduzierter Leptingehalt im Blut beschrieben⁹⁵. Die Serumkonzentration von PON3 ist gering und Analysen von PON3-überexprimierenden Mäusen ergaben, dass weder humane noch murine PON3 mit murinem HDL assoziiert⁹⁵. Daher ist davon auszugehen, dass die intrazelluläre PON3 bei den

beobachteten anti-oxidativen Effekten eine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz zu PON2, welche ubiquitär exprimiert wird, scheint die Expression von PON3 vorwiegend auf bestimmte Gewebe bzw. Zellen beschränkt zu sein. Dabei sind die Befunde für die Expression in Zellen, welche relevant für kardiovaskuläre Erkrankungen sind, kontrovers. Marsillach et al. haben PON3 in immunohistochemischen Analysen von Mäusen in murinen vaskulären Zellwänden und Makrophagen gefunden, während im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass humane PON3 nicht in humanen Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, aortalen Adventitia-Fibroblasten und vielen anderen Zelltypen exprimiert wird^{96,97}. PON2 konnte bisher im Serum nicht nachgewiesen werden⁹⁸ und liegt als intrazelluläres Protein hauptsächlich in den Mitochondrien und im ER lokalisiert vor⁹⁹. Vermutlich über eine Reduktion intrazellulärer Radikalbildung und somit nach extern gelangender ROS können PON2 und PON3 die LDL-Oxidation inhibieren. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass PON2 die Entwicklung der Arteriosklerose abschwächt^{100,101}. Somit haben PON2 und PON3 ähnlich wie PON1 eine anti-atherogene Wirkung und alle PONs stellen daher ein mögliches Ziel für eine Therapie dar. Eine Hochregulation der PONs könnte vor der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der Arteriosklerose schützen und möglicherweise könnten sich schon bestehende arteriosklerotische Plaques durch eine Verminderung des oxLDLs zurückbilden.

1.5.2 Paraoxonasen und Krebs

Die Entstehung von Krebs ist entscheidend dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorzelle in der Lage ist, dem Zelltod zu entkommen⁴¹. Dabei entwickeln Tumorzellen zahlreiche Strategien, in denen das Entkommen der intrinsischen Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Die Ausführung des intrinsischen Zelltods ist hauptsächlich durch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie bestimmt^{41,48}, welche die mitochondriale Porenöffnung und Cyt-c-Freisetzung regulieren (siehe 1.2.1). Hierbei stimuliert eine vermehrte ROS-Produktion in den Mitochondrien die Cyt-c-Freisetzung und Apoptose. Da Krebszellen ohnehin aufgrund des höheren Stoffwechselumsatzes der proliferierenden Zellen und aufgrund der oft hypoxischen Umgebung eine vermehrte ROS-Produktion aufweisen, wäre die Hochregulation von anti-oxidativen Proteinen für die Krebszelle vorteilhaft. Tatsächlich konnte kürzlich eine Rolle für PON2 in der Tumorgenese gezeigt werden: PON2 war in verschiedenen Tumorgeweben deutlich hochreguliert und ein *knock-down* von PON2 führte in bestimmten Krebszellen zur spontanen Apoptose und zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika¹⁰². PON2 vermittelt ihre anti-apoptotische Wirkung vermutlich durch ihre Fähigkeit, die Superoxid-Produktion in den Mitochondrien abzuschwächen¹⁰². Dabei bindet PON2 wahrscheinlich an CoQ und vermindert quasi als „Isolator“ die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff^{100,103}. Ferner

konnte PON2 nicht nur gegen Stimuli der intrinsischen Apoptose schützen, sondern auch ER-Stress-induzierte Apoptose abschwächen¹⁰²; ob dies auf demselben Mechanismus beruht ist derzeit noch unklar. Da PON3 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu PON2 aufweist und ebenfalls anti-oxidativ wirkt^{95, 104-107}, könnte PON3 eventuell eine ähnliche anti-apoptotische Wirkung haben. Jedoch sind bisher weder der anti-oxidative noch ein möglicher anti-apoptotischer Mechanismus von PON3 untersucht worden. PON1 kann als extrazelluläres Protein die intrazelluläre redox-vermittelte Apoptose vermutlich nicht modulieren. Dennoch gibt es Berichte, welche den PON1-Genotyp mit verschiedenen Tumoren wie Nierenkarzinom, Brust-, Ovar- und Prostatakrebs assoziieren⁸⁸.

1.5.3 PON2 als Schutzenzym gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen

Bisher sind keine endogenen, physiologischen Substrate der Paraoxonasen bekannt. Jedoch stellt die PON2-Aktivität einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen *Pseudomonas aeruginosa* dar, da 3OC12 (N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton) als Schlüsselmolekül der bakteriellen Kommunikation durch PON2 effektiv hydrolysiert wird¹⁰⁸. Dies führt zu einer Störung des *quorum-sensing* und schwächt eventuell die bakterielle Virulenz von *P. aeruginosa* ab (siehe 1.4). Vermutlich diffundiert 3OC12 aus extrazellulären Bereichen des Lungenepithels in die Lungenzellen, in welchen dieses durch PON2 hydrolysiert wird. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass intakte tracheale Epithelzellen aus PON2-defizienten Mäusen eine geringere Fähigkeit zur 3OC12-Inaktivierung aufwiesen¹⁰⁹. Die damit verbundene Konzentrationsabnahme von 3OC12 könnte dazu führen, dass der die bakterielle Virulenz regulierende Schwellenwert der 3OC12-Konzentration nicht oder verzögert erreicht wird. Damit hätte das körpereigene Immunsystem zum einen mehr Zeit, die Bakterien zu erkennen und zu beseitigen, zum anderen würde die dadurch abgeschwächte Expression von Virulenzfaktoren zu einer geringeren Wirtsschädigung führen. Vor allem die somit verhinderte Biofilm-Formation könnte dazu beitragen, dass die Bakterien zugänglicher für die Behandlung mit Antibiotika werden. Tatsächlich wurde in aktuellen Studien gezeigt, dass durch eine Behandlung mit Lactonase die Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa* gestört und die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Antibiotika erhöht wird¹¹⁰.

Zusätzlich zu ihrer Lactonase-Aktivität besitzt PON2 eine anti-oxidative Fähigkeit, welche die mitochondriale Superoxid-Produktion vermindern kann und dadurch das Überleben der Zelle fördern kann^{100, 102, 103}. Im Einzelnen konnte gezeigt, dass PON2 die PCN-induzierte ROS-Produktion in humanen Epithelzellen verringert¹¹¹. Jedoch führte die Behandlung von 3OC12 in Zellkulturexperimenten zu einer Ca²⁺-vermittelten PON2-Inaktivierung und Degradation¹¹². Somit kann 3OC12 einen Signalweg induzieren, welcher

die hydrolytische Aktivität von PON2 inaktiviert und das Enzym abbaut, was wiederum zur höheren zellulären Stabilität von 3OC12 führt. Als Konsequenz kann PON2 nicht mehr antioxidativ gegenüber PCN wirken; damit verstärkt 3OC12 die ROS-Bildung durch PCN. Die Aufklärung dieses PON2-inaktivierenden und -degradierenden Mechanismus könnte demnach einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen: Falls die PON2-Inaktivierung und ihr darauf folgender Abbau verhindert werden könnte, könnte PON2 weiterhin gegen die *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren 3OC12 und PCN schützen. Da die PON2-Inaktivierung Ca^{2+} -vermittelt, sehr schnell und reversibel erfolgte, wurde eine Phosphorylierung / Dephosphorylierung mittels Proteinkinasen / Phosphatasen diskutiert ¹¹¹. Auch andere Modifikationen wie Methylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinylierungen und Glykosylierungen / Deglykosylierungen könnten eine Rolle in der PON2-Inaktivierung und Degradation spielen, jedoch ist derzeit nichts darüber bekannt.

2 Ziele der Arbeit

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit umfasst einen Bereich zu PON3 im Hinblick auf Krebserkrankungen und einen zu PON2 und PON3 im Rahmen von Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen. Ein Ziel der Arbeit war die Untersuchung der PON3 bezüglich ihrer Rolle in der Tumorgenese. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die zu PON3 paraloge PON2 die Superoxid-Bildung in den Mitochondrien vermindern und vor dem Zelltod schützen kann^{100, 102, 103, 111}. Es ist bekannt, dass PON3 anti-oxidativ wirkt, jedoch sind sowohl der genaue Mechanismus als auch ihre pathophysiologische Rolle weitestgehend ungeklärt und wurden hier erstmalig untersucht. Zur Aufklärung ihrer Rolle in Krebserkrankungen und als möglicher Tumormarker sollte die PON3-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien und -geweben analysiert werden. Weiter sollte ihre anti-apoptotische Funktion in verschiedenen Apoptose-Signalwegen aufgeklärt werden. Als fernes Ziel könnte PON3 als Angriffsstelle für eine Tumorthherapie dienen.

Aufgrund ihrer anti-oxidativen Funktion wurde vermutet, dass PON3 ebenso wie PON2 vor dem *P. aeruginosa* Virulenzfaktor Pyocyanin (PCN) schützen könnte. Zu diesem Zweck sollte ein Schutz von PON3 gegenüber der Superoxid-Produktion nach PCN-Behandlung analysiert werden. Weiter sollte ein möglicher anti-inflammatorischer Effekt von PON2 und PON3 gegenüber der PCN-nachgeschalteten Cytokin-Sekretion und des zugrundeliegenden Mechanismus aufgeklärt werden. Da PON2 infolge von Störungen in der Ca^{2+} -Homöostase durch 3OC12 inaktiviert und abgebaut wird¹¹¹ sollte untersucht werden, inwieweit dies auch für die PON3-Aktivität, mRNA und Protein zutrifft. Dies könnte wertvolle Hinweise auf den molekularen Mechanismus der PON2-Inaktivierung und -Degradation liefern. Vorläufige Befunde deuteten auf eine post-translationale Modifikation (PTM) ursächlich für die PON2-Inaktivierung, bei welcher es sich vermutlich um eine Phosphorylierung / Dephosphorylierung handelt. Dies galt es zu verifizieren und es sollten Art und Position der PTM identifiziert werden. Die Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus sollte als mögliche Ursache der 3OC12-vermittelten PON2-Degradation analysiert werden. Die biomedizinische Relevanz dieser Befunde und das avisierte Fernziel lägen darin, dass die Verhinderung der 3OC12 / Ca^{2+} -abhängige PON2-Inaktivierung ggf. eine Therapieunterstützende Maßnahme bei bestehenden *P. aeruginosa* Infektionen darstellen könnte.

3 Material

3.1 Chemikalien

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

10-N-Nonyl-Acridinorange-bromid (NAO)	Invitrogen
5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlordihydro-fluoreszindiacetat (Carboxy-H ₂ DCFDA)	Molecular Probes
8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazin-1,4(2H, 3H)dion Sodium Salz (Chemilumineszenz-Probe, L-012), Luminolderivat	Wako Pure Chemical Industries Ltd.
Actinomycin D	Sigma
Ampicillin	Roth
Antimycin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
BS ³ -Crosslinker	Pierce
BSA	Sigma
Cisplatin	Sigma
DEPC	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DL-Norleucin	Sigma
<i>Dulbecco's modified eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma
Dulbecco's PBS, steril	Gibco
FCS Gold	PAA
G418 Sulphat, 50 mg/ml	Gibco
HALT Proteaseinhibitor, 100 x	Pierce
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS) mit Calcium und Magnesium (HBSS ⁺⁺), steril	Gibco

Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (HAT), 50 x	Gibco
Kanamycin	Roth
L-Glutamin, 100 x	Gibco
Methanol	Roth
Mito-HE	Molecular Probes
N-3-oxododecanoyl-L-Homoserinlacton	Sigma
Na ⁺ -Pyruvat	PAA
Penicillin / Streptomycin, 100 x	PAA
PhosphoSTOP	Roche
Pyocyanin	Cayman Chemicals
Rotenon	Sigma
RPMI 1640	PAA
Saponin	Fluka
Staurosporin	Sigma
Thapsigargin	Molecular Probes
TNF- α	Miltenyi Biotec
Trypsin / EDTA, 10 x	PAA
Tunicamycin	Sigma

3.2 Verbrauchsmaterialien

12-well-Platten	Greiner
24-well-Platten	Greiner
6-well-Platten	Greiner
96-well-Platten bzw. 96-well-Platten <i>Advanced TC</i> TM für HEK293-Zellen	Greiner
<i>Amersham Hyperfilm</i> TM <i>ECL</i>	GE Healthcare
Entwickler- und Fixierlösung	Kodak
<i>High performance chemiluminescence film</i>	GE Healthcare
<i>Lab-Tek chamber Slides</i>	Nunc / Greiner
Polystyrol Rundboden-Röhrchen	BD Falcon
Protean Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare

Reaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Greiner
<i>TripleFlasks</i> Zellkulturflasche (500 cm ²)	Nunc
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturflaschen steril mit Filterdeckel (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²)	Greiner

3.3 Laborgeräte

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
<i>ChemiDoc XRS imaging system</i> mit <i>QuantityOne 4.6.7</i> Software	BioRad
CO ₂ -Inkubatoren CO-150 und Excella ECO-170	New Brunswick Scientific
FACSAria Durchflusszytometer	BD Biosciences
FACSCalibur mit CellQuest Pro Software	BD Biosciences
FluoStar Optima Fluometer	BMG Labtechnologies
Gelelektrophoresekammer, Mini-Protean-III	BioRad
Gelelektrophoresekammer, <i>Perfect-Blue</i> Doppelgelsystem Twin L	Peqlab Biotechnologies
iCycler	BioRad
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Mini-Transblot-Zelle, Mini-Protean-III	BioRad
Nanodrop	Peqlab Biotechnologies
Thermomixer kompakt	Eppendorf
<i>Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell</i>	BioRad
Zeiss LSM-710 mit ZEN2008 Software	Zeiss
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge J2-MC mit Rotor JA 25.50, JA 14	Beckmann

3.4 Reagenzien und Kits

Annexin-V-APC	BD Biosciences
<i>Annexin-V Apoptosis Detection Kit I</i>	BD Biosciences
<i>Attractene Transfection Reagent</i>	Qiagen
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	Pierce
<i>Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems</i>	Promega
<i>CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega
<i>CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay</i>	Promega
DRAQ5®	Cell Signaling Technology
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>	Promega
<i>Dynabeads® Protein A Dynal® Biotech</i>	Invitrogen
<i>ER-Tracker™ Red dye / ER-Tracker™ Green dye</i>	Invitrogen
<i>GeneJET™ Gel Extraction Kit</i>	Fermentas
<i>GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Fermentas
<i>GFP-Trap® A</i>	ChromoTek
<i>HA Tag IP / Co-IP Kit</i>	Pierce
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits</i>	Applied Biosystems
<i>Human Inflammatory Multi-Analyte ELISArray™ Kit</i>	SA Biosciences
<i>MitoTracker® Orange</i>	Molecular Probes
Nanofectin™	PAA
<i>peqGOLD Total RNA Kits</i>	Peqlab Biotechnologies
<i>PureLink™ HiPure Plasmid Purification Kit</i>	Invitrogen
<i>QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene
<i>SAINT-RED siRNA / RNAi-Delivery System</i>	Synvolux Therapeutics
<i>TissueScan cancer survey panel-III, TissueScan matched lung cancer panel-IV</i>	OriGene
<i>Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus</i>	PerkinElmer

3.5 *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
BS ³ -Lösung	5 mM BS ³ in <i>Conjugation</i> -Puffer, frisch angesetzt
<i>Conjugation</i> -Puffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,15 M NaCl pH 7-9
Coomassie	GelCode™ Blue Stain Reagent (Pierce)
<i>Dilution</i> -Puffer (GFP-IP)	10 mM Tris / HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, Proteaseinhibitor
DNA-Ladepuffer, 6 x	30% Glycerin in H ₂ O, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
<i>Elution</i> -Puffer	50 mM Glycin pH 2.8
Kathodenpuffer	25 mM Tris / HCl pH 9.4, 40 mM DL-Norleucin, 0,05% SDS
LB-Agar-Platten	40 g LB-Agar, 1 l Wasser, autoklaviert
LB-Agar-Platten mit Ampicillin	LB-Agar-Platten, 10 µg/ml Ampicillin
LB-Agar-Platten mit Kanamycin	LB-Agar-Platten, 30 µg/ml Kanamycin
Lysispuffer 3	200 mM NaCl, 100 mM Tris / HCl pH 7.4, 2% Triton X-100, Proteaseinhibitor, PhosphoSTOP
Mito-Puffer	10 mM HEPES pH 7.9, 125 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 2 mM K ₂ HPO ₄ , Proteaseinhibitor
nicht-reduzierender SDS-Ladepuffer, 2 x	Pierce
Proteaseinhibitor, 100 x	Pierce
<i>Quenching</i> -Puffer (Dynabeads)	1 M Tris / HCl pH 7.5
RIPA	50 mM Tris / HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-400, 0,5% NaDesoxicholat, 1% SDS
SDS-Ladepuffer, 5 x	250 mM Tris / HCl pH 6.8, 0,5 M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS, 0,2% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer, 5 x	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
TAE, 20 x	50 mM Tris pH 7.4, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA
TB-Medium	50,8 g Terrific Broth-Trockenmedium, 4 ml Glycerin,

	996 ml Wasser
TBS, 1 x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl
TBS / Tween	1 x TBS, 0,18% Tween
Wash-Puffer (Cytochrom-c-Freisetzung)	1% FCS, 0,1% Natriumazid in Dulbecco's PBS
Wash-Puffer (GFP-IP)	10 mM Tris / HCl, 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, Proteaseinhibitor
Wash&Bind-Puffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,01% Tween, pH 8
Wash3-Puffer (<i>Dynabeads</i>)	50 mM Tris / HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 0,2% Triton X-100
Wasser	ddH ₂ O
WB2	BupH (<i>HA Tag IP / Co-IP Kit</i> , Pierce), 0,1% Tween, 100 mM NaCl

3.6 Enzyme und Standards

1 kbp-DNA-Leiter	Roth
100 bp-DNA-Leiter	Roth
<i>PageRuler™ Prestained Protein Leiter</i>	Fermentas
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche
<i>SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™</i>	Sigma
Taq-Polymerase	Die bakteriell exprimierte Taq-Polymerase wurde von der AG Kleinert aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.
VELOCITY™ DNA Polymerase	Bioline

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

3.7 Antikörper

Alle Antikörper wurden gemäß der entsprechenden Herstellerempfehlung in 5%-igem Milchpulver oder in 5%-igem BSA in TBS / Tween (siehe 3.5) verwendet.

monoklonaler α -Cytochrom c; Klon 7H8.2C12 (<i>mouse</i> , 1:1.000 für Western Blot, 1:20 für FACS)	BD Biosciences
monoklonaler α -GAPDH (<i>mouse</i> , 1:5.000)	Santa Cruz
monoklonaler α -HA (<i>mouse</i> , 1:1.000)	Sigma
monoklonaler α -human-Tubulin (<i>mouse</i> , 1:2.000)	Dianova
monoklonaler α -Komplex-III (Untereinheit Kern-2) (<i>mouse</i> , 1:1.000)	Mito-Sciences
monoklonaler α -Phosphotyrosin, Klon 4G10® (<i>mouse</i> , 1:1.000)	Upstate (Millipore)
mouse-IgG1 κ (MOPC-21, 1:10)	Sigma
Phosphoserin Detektionskit, sechs monoklonale Antikörper (<i>mouse</i> , 1:100)	NanoTools
Phosphothreonin Detektionskit, drei monoklonale Antikörper (<i>mouse</i> , 1:100)	NanoTools
polyklonaler α -human-GRP78 (<i>goat</i> , 1:750)	Santa Cruz
polyklonaler α -human-Lamin (<i>goat</i> , 1:1.000)	Santa Cruz
polyklonaler α -human-PON2 (<i>rabbit</i> , 1:2.000)	Auftragssynthese ausgeführt durch Eurogentec
polyklonaler α -human-PON3 (<i>rabbit</i> , 1:750)	Sigma
polyklonaler α -Phospho-SAPK / JNK (Thr183 / Tyr185) Antikörper (<i>rabbit</i> , 1:1.000)	Cell Signaling
<i>Protein Folding and Stability Antibody Sampler Kit</i>	Cell Signaling

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.

3.8 Sekundärantikörper

anti- <i>mouse</i> AlexaFluor-647 aus der Ziege (1:40)	Molecular Probes
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5.000)	Sigma
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5.000)	Cell Signaling

anti- <i>mouse</i> IgG aus dem Pferd, Peroxidase gekoppelt (1:5.000)	Cell Signaling
anti- <i>mouse</i> IgG aus dem Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (1:20.000)	Sigma

3.9 Plasmide

pcDNA3-HA	Invitrogen
pcDNA3-HA-PON2	Dieses Plasmid wurde durch Dr. S. Horke, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, kloniert und zur Verfügung gestellt.
pcDNA3-His-PON2-iso1-WT	Dr. S. Horke, s.o.
pDsRed-Express-N1	Clontech
pDsRed-Express-PON2	E. M. Schweikert
pDsRed-Express-PON3	E. M. Schweikert
pEGFP-N1	Clontech
pEGFP-PON2	Dr. S. Horke, s.o.
pEGFP-PON2-Mutanten	E. M. Schweikert
pEGFP-PON3	Dieses Plasmid wurde durch Dr. J. F. Teiber, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, kloniert und zur Verfügung gestellt.
pEXPR-IBA103	IBA
pGL4.32[luc2P / NF- κ B-RE / Hygro]	Promega
<i>Renilla</i> -Plasmid	Dieses Plasmid wurde durch Dr. M. Bros, Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, kloniert und zur Verfügung gestellt.
StrepOne-PON2-His	E. M. Schweikert

3.10 Primer und Sonden

Alle Primer und *TaqMan*-Sonden für PCR und qRT-PCR-Analysen (siehe 4.2.15) wurden von MWG-Biotech bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM)

als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert. Primer und Sonden für PON2 und PON3 wurden zudem als vordesignierte *Taqman*-Sonden von Applied Biosystems bezogen.

Tabelle 3-1: Verwendete Primer und Sonden. Die in PON2 mutierten Basen wurden in den entsprechenden Primern unterstrichen.

Primer / Sonde	Sequenz (5' – 3')
GAPDH_sense	CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG C
GAPDH_antisense	TGG CAT GGA CTG TGG TCA TGA G
GAPDH_Sonde	CCT GGC CAA GGT CAT CCA TGA CAA C
PON3_sense	TGG GAT CAC AGT CTC AGC AG
PON3_antisense	TCC ACT AAG GTG CCC AAC TG
PON3_Sonde	TGG AAA AAC ATG ATA ACT GGG A
CHOP_sense	GAC CTG CAA GAG GTC CTG TC
CHOP_antisense	CTC CTC CTC AGT CAG CCA AG
CHOP_Sonde	CAC CAC TCT TGA CCC TGC TT
PON2-S36A-for	CCT CCA GAG AAG TAG <u>AAG</u> CTG TAG ACC TTC CAC
PON2-S36A-rev	GTG GAA GGT CTA CAG <u>CTT</u> CTA CTT CTC TGG AGG
PON2-S103A-for	CAA GGG CAC GGG AAT TAA GAA <u>TCG</u> <u>CTC</u> GTG GGT TTG ATT TG
PON2-S103A-rev	CAA ATC AAA CCC ACG <u>AGC</u> GAT TCT TAA TTC CCG TGC CCT TG
PON2-Y192F-for	CTC TGA TCC TTT CTT AAA <u>GTI</u> TTT AGA AAC ATA CTT GAA CTT ACA C
PON2-Y192F-rev	GTG TAA GTT CAA GTA TGT TTC TAA <u>AAA</u> CTT TAA GAA AGG ATC AGA G
PON2-T195A-for	CCT TTC TTA AAG TAT TTA GAA <u>GCA</u> TAC TTG AAC TTA CAC TGG GC
PON2-T195A-rev	GCC CAG TGT AAG TTC AAG TAT <u>GCT</u> TCT AAA TAC TTT AAG AAA GG
PON2-S208A-for	CTG GGC AAA TGT TGT TTA CTA <u>CGC</u> TCC AAA TGA AGT TAA AGT GGT AG
PON2-S208A-rev	CTA CCA CTT TAA CTT CAT TTG <u>GAG</u> <u>CGT</u> AGT AAA CAA CAT TTG CCC AG
PON2-S221A-for	GGT AGC AGA AGG ATT TGA <u>TGC</u> AGC AAA TGG GAT CAA TAT TTC ACC
PON2-S221A-rev	GGT GAA ATA TTG ATC CCA TTT GCT <u>GCA</u> TCA AAT CCT TCT GCT ACC
PON2-S228A-for	GAT TTG ATT CAG CAA ATG GGA TCA ATA <u>TTG</u> CAC CTG ATG ATA AGT ATA
PON2-S228A-rev	TAT ACT TAT CAT CAG GTG <u>CAA</u> TAT TGA TCC CAT TTG CTG AAT CAA ATC
PON2-S331A-for	GGG TCT GTT CTC CAA GGA AGT <u>GCT</u> GTA GCC TCA GTG TAT GAT GGG
PON2-S331A-rev	CCC ATC ATA CAC TGA GGC TAC <u>AGC</u> ACT TCC TTG GAG AAC AGA CCC
PON2-S331E-for	GGG TCT GTT CTC CAA GGA AGT <u>GAG</u> GTA GCC TCA GTG TAT GAT GGG

PON2-S331E-rev	CCC ATC ATA CAC TGA GGC TAC <u>CTC</u> ACT TCC TTG GAG AAC AGA CCC
PON2-Y346F-for	GGG AAG CTG CTC ATA GGC ACT TTA <u>TTC</u> CAC AGA GCC TTG TAT TG
PON2-Y346F-rev	CAA TAC AAG GCT CTG TGG <u>AAT</u> AAA GTG CCT ATG AGC AGC TTC CC
pcDNA3-Seq-fwd	CCA CTG CTT ACT GGC TTA TC
P2Cterm-His-Xho	TCT CTC CTC GAG ATG GTG GTG ATG ATG ATG ATG TGG ATC CGC G

3.11 Oligonukleotide für RNA-Interferenz

Die PON3-spezifische siRNA wurde von Dharmacon erhalten (Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs) und die Kontroll-*Stealth*[®]-siRNA von Invitrogen (unbekannte Zufalls-Sequenz ohne Zielstruktur mit einem G / C Gehalt von etwa 40%).

3.12 Zelllinien

Tabelle 3-2: Verwendete Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Quelle / Hersteller
EA.hy 926	Humane immortalisierte Hybridzelllinie aus HUVEC und A549-Zellen	¹¹³ ; American Tissue Culture Collection
EA.hy PON2-GFP	EA.hy 926-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-EGFP-Fusionsprotein exprimieren	Dr. S. Horke
EA.hy PON3-GFP	EA.hy 926-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON3-EGFP-Fusionsprotein exprimieren	E. M. Schweikert
EA.hy PON3-DsRed	EA.hy 926-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON3-DsRed-Fusionsprotein exprimieren	E. M. Schweikert
HEK293T (im Weiteren als HEK293 abgekürzt)	Humane embryonale Nierenzelllinie die das SV40 <i>large</i> T-Antigen exprimiert	Bereitgestellt von Dr. S. Horke

HEK PON2-GFP	HEK293-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-EGFP-Fusionsprotein exprimieren	Bereitgestellt von Dr. S. Horke
HEK PON3-GFP	HEK293-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON3-EGFP-Fusionsprotein exprimieren	Bereitgestellt von Dr. S. Horke
A549	Humane Lungen-Adenokarzinom Zelllinie	Bereitgestellt von Dr. S. Horke
HepG2	Humane Leberzellkarzinom Zelllinie	Bereitgestellt von Dr. S. Horke

Alle anderen Zelllinien oder Zelllysate wurden freundlicherweise von Dr. B. Köberle (833K, Susa, GCT27, HT1376, RT112, MGHU-1) und PD. Dr. C. Dietrich (Caco-2), Institut für Toxikologie, Dr. S. Horke (HeLa, HUVEC, Huh7, Lama-R, Lama-S, KCI-R, KCI-S, Nalm6, K562, Jurkat T-cells, THP, HL60, HCW2), Prof. Dr. H. Kleinert (C28I, Jurkat) und Prof. Dr. E. Closs (DLD-1, U373) Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

3.13 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

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

DMEM-Vollmedium für EA.hy	500 ml <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (1000 mg/l Glukose), 10% FCS, 10 ml HAT, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin / Streptomycin
DMEM-Vollmedium für HEK293	wie EA.hy aber ohne HAT
DMEM-Vollmedium für A549 und HepG2	500 ml <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (1000 mg/l Glukose), 5% FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin / Streptomycin

Den stabil überexprimierenden Zelllinien wurden 300 µg/ml G418 zum Medium zugegeben.

3.14 Bakterien

E. coli-DH5 α

New England Biolabs

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

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

4.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO₂-Begasung bzw. 10% für die EA.hy 926-Zellen in ihrem jeweiligen Vollmedium (siehe 3.13) kultiviert. Stabil transfizierten EA.hy- bzw. HEK-Zelllinien wurde zusätzlich G418 (300 µg/ml) zugesetzt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5-10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch ein- bis zweiminütige Inkubation mit 2 ml 0,5%-iger Trypsinlösung im Brutschrank enzymatisch vom Boden der Kulturflasche abgelöst und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von frischem serumhaltigem Medium beendet. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Erhaltung der Stammkultur in der Kulturflasche zurück gehalten, während die restlichen Zellen je nach Bedarf eingefroren, verworfen oder in Zellkulturschalen ausplattiert wurden.

4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen nach der Trypsininkubation in frischem Medium aufgenommen und in ein steriles 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 900 x g, RT) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in eiskaltem Vollmedium, welches zusätzlich 10% DMSO und 10% FCS enthielt, wieder aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Kryo-Röhrchen überführt, zunächst bei -80°C eingefroren und zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurde das Kryo-Röhrchen auf 37°C erwärmt, sofort in 5 ml Medium aufgenommen und das DMSO-haltige Medium durch Zentrifugation (5 min, 900 x g, RT) abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausplattiert.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat eukaryoter Zellen

Nach enzymatischer Ablösung der Zellen aus der Zellkulturflasche (siehe 4.1.1) wurden die Zellen in ein steriles 50 ml Gefäß überführt und 10 µl der Suspension zur Bestimmung der Zellzahl auf das Zählraster einer Neubauerkammer aufgetragen. Anschließend wurden die vier Großquadrate im Zählraster der Kammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde mit zehn multipliziert und ergab die Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension. Die Zellen wurden dann in 96-, 24-, 12- oder 6-*well*-Platten unter Zugabe des entsprechenden Volumens an Vollmedium ausplattiert.

Tabelle 4-1: Zellzahl für Aussaat

Zelllinie	Kulturgefäß	Konfluenz	Zellzahl
EA.hy 926	96- <i>well</i> -Platte	80%	$1,2 \times 10^4$
	24- <i>well</i> -Platte	50%	5×10^4
	24- <i>well</i> -Platte	80%	8×10^4
	12- <i>well</i> -Platte	80%	$1,6 \times 10^5$
	6- <i>well</i> -Platte	80%	$5,5 \times 10^5$
HEK293	96- <i>well</i> -Platte	80%	$2,4 \times 10^4$
	24- <i>well</i> -Platte	50%	2×10^5
	12- <i>well</i> -Platte	80%	6×10^5
	6- <i>well</i> -Platte	80%	$1,4 \times 10^6$
A549 / HepG2	96- <i>well</i> -Platte	50%	8×10^3
	24- <i>well</i> -Platte	50%	6×10^4
	24- <i>well</i> -Platte	80%	8×10^4
	12- <i>well</i> -Platte	50%	3×10^5
Caco-2	96- <i>well</i> -Platte	50%	1×10^4
	24- <i>well</i> -Platte	50%	1×10^5

4.1.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen

Eine Transfektion beschreibt das Einbringen von DNA in eine eukaryotische Zelle. Bei dieser können auch mehrere Plasmide gleichzeitig in eine Zelle transfiziert werden. Hierfür wurden die Zellen in einer Konfluenz von 80% ausplattiert und am Folgetag mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™ nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurde die empfohlene Nanofectin-Menge zur Verringerung der Cytotoxizität halbiert und

beispielsweise bei einem 24-*well* je 1 µg Plasmid mit 1,6 µl Nanofectin™ transfiziert. A549-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Attractene ein Tag nach dem Ausplattieren nach Herstellerangaben transfiziert, wobei nur ein Drittel der empfohlenen Attractene-Menge eingesetzt wurde, d.h. es wurden bei einem 24-*well* je 0,4 µg Plasmid mit 0,5 µl Attractene transfiziert.

4.1.5 Stabile Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen

Bei der stabilen Transfektion wird die exogene Plasmid-DNA dauerhaft in das Genom einer Zelle integriert. Die Selektion zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen erfolgt üblicherweise mit Hilfe eines Selektionsantibiotikums. Das Plasmid kodiert dabei neben dem zu analysierenden Gen für ein Resistenzgen, welches die transfizierten Zellen vor der Cytotoxizität des Selektionsantibiotikums schützt. Da beide Gene auf demselben Plasmid lokalisiert vorliegen, wird davon ausgegangen, dass selektionierte Zellen die gesamte transfizierte Plasmid-Sequenz enthalten und demnach auch das *gene-of-interest* exprimieren.

Zur Transfektion wurden die Zellen in 6-*well*-Platten in einer Konfluenz von 80% ausplattiert und am Folgetag mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™ transfiziert (siehe 4.1.4). Ein Tag nach der Transfektion wurde zum Medium das Selektionsantibiotikum (300 µg/ml G418) hinzugesetzt. In den Folgetagen wurde regelmäßig das Medium gewechselt, um abgestorbene untransfizierte Zellen zu entfernen. Nach einiger Zeit bildeten sich Kolonien der transfizierten Zellen, die schließlich zusammengeführt und per FACS (*fluorescent activated cell sorting*) angereichert wurden. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch zweimalige Zentrifugation (4 min, 900 x g, 4°C) und Resuspendieren in 2%-igem FCS in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 2%-igem FCS in PBS resuspendiert und durch einen Filtersiebdeckel in ein FACS-Röhrchen überführt. Das Sortieren der Zellen wurde im Rahmen der *FACS Core Facility* der Institute für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz von J. Altmaier am FACS Vantage mit GFP bzw. DsRed-spezifischen Wellenlängen durchgeführt. Die sortierten Zellen wurden danach in der Regel in 25 cm²-Zellkulturflaschen überführt und weiterhin unter Selektionsdruck durch Gabe des Selektionsantibiotikums (300 µg/ml G418) kultiviert. Die Expression des transfizierten Gens wurde anschließend durch Western-Blot-Experimente (siehe 4.3.5) überprüft.

4.1.6 Transfektion von siRNA in eukaryote Zellen

Mit Hilfe von siRNAs kann die Expression spezifischer Gene abgeschaltet werden. Dies ermöglicht die Untersuchung von Effekten, welche durch die verminderte Genexpression verursacht werden. Diese Versuche dienen der Charakterisierung von Proteinfunktionen und stellen methodisch das Gegenteil der Überexpression dar. Bei siRNAs (*small interfering RNA*) handelt es sich um 21-28 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs, die nach Einbringen in eine eukaryotische Zelle an komplementäre mRNA-Sequenzen binden und dadurch ihren Abbau bewirken.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50% mit dem siRNA-Transfektionsreagenz *SAINT-RED* nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die eingesetzte siRNA hatte eine Endkonzentration von 25-70 nM. Zur Kontrolle unspezifischer Effekte, die durch die Transfektion bzw. den aktivierten RNAi-Signalweg verursacht werden könnten, wurde parallel eine Kontroll-siRNA mit unbekannter Zufalls-Sequenz transfiziert.

4.1.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Chemilumineszenz und Fluoreszenzmessung

Zur Detektion von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies wurden zellpermeable Indikatoren verwendet, die bei Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies ihre Struktur ändern. Dabei nimmt das Chemilumineszenz bzw. Fluoreszenzsignal zu, welches mit einem 96-*well*-Mikrotiterplatten-Lesegerät für Chemilumineszenz (Berthold-Technologies LB 960) bzw. Fluoreszenz (BMG FluoStar Optima) detektiert wird.

Zur Messung der ROS-Produktion mittels Chemilumineszenz wurde das Luminolderivats L-012 als Detektionsreagenz verwendet. Hierbei wurden die Zellen in einer Konfluenz von 80% in einer weißen 96-*well*-Platte ausplattiert. Vor der ROS-Messung wurden die Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen und 30 min mit L-012 (500 µM) in HBSS⁺⁺ bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Pyocyanin (2,4 µM; in L-012-Lösung) behandelt und umgehend die ROS-Bildung im Chemilumineszenz Lesegerät detektiert.

Die Fluoreszenzdetektion von ROS erfolgte mit Hilfe des Indikators carboxy-H₂DCFDA. Hierzu wurden die Zellen in einer Konfluenz von 80% in einer weißen 96-*well*-Platte (*Advanced TC*[™] mit spezieller Beschichtung für HEK293-Zellen) ausplattiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit HBSS⁺⁺ gewaschen und 30 min mit carboxy-H₂DCFDA (0,5 µM) in HBSS⁺⁺ bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen und die ROS-Bildung mittels Pyocyanin (2,4 µM) in HBSS⁺⁺ induziert. Die anschließende Fluoreszenzdetektion erfolgte bei 485 / 520 nm.

4.1.8 Messung mitochondrialen Superoxids in eukaryoten Zellen mittels FACS

Als Ergänzung zur oben beschriebenen Methode (siehe 4.1.7) wurde spezifisch mitochondriales Superoxid mittels FACS bestimmt. Hierzu wurde Mito-HE verwendet, welches durch Anregung und Emissionsmessung bei 405 / 580 nm spezifisch für Superoxid ist ¹¹⁴. Zur Messung des mitochondrialen Superoxidgehalts wurden die Zellen in einer Konfluenz von 80% in 12-*well*-Platten ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen, für 20 min mit Mito-HE (2 µM) bei 37°C inkubiert, erneut gewaschen und mit Antimycin (15 µM) bzw. Rotenon (20 µM) in HBSS⁺⁺ behandelt. Nach zwei Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Vollmedium aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal durch Zentrifugation (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspension in eiskaltem PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 400 µl PBS resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und in einem FACSAria Durchflusszytometer bei Ex / Em-Wellenlängen von 405 / 580 nm analysiert.

4.1.9 Messung von Apoptosemerkmalen in eukaryoten Zellen mittels FACS

Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurden verschiedene Apoptosemerkmale von Zellen bestimmt. Hierzu wurde die Annexin-V-Bindung an die Zellmembran bei gleichzeitiger Messung der Einlagerung des nicht zellmembrangängigen Farbstoffs 7-Amino-Actinomycin detektiert. Zudem wurden weitere Apoptosemerkmale wie die Cardiolipin-Peroxidation, die Cytochrom-c-Freisetzung und die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials mittels FACS bestimmt.

Es wurden Zellen in einer Konfluenz von 80% in 24- bis 12-*well*-Platten ausplattiert und am Folgetag mit verschiedenen Stimuli in Vollmedium behandelt, wie z.B. mit Staurosporin. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Trypsin aus den Zellkulturschalen heraus gelöst, in Vollmedium aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal durch Zentrifugation (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspension mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Herstellerangaben mit Annexin-V gekoppelt mit Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) aus dem *Annexin-V apoptosis detection kit 1* (siehe 3.4) gefärbt und gemessen.

Für die Bestimmung der Cardiolipin-Peroxidation wurden die Zellen mit 10-N-Nonyl-Acridinorange-bromid (NAO) behandelt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der nur an nicht-oxidiertes Cardiolipin bindet. Demnach bedeutet eine Abnahme im Signal eine Zunahme an peroxidiertem Cardiolipin. Nach dem Trypsinisieren (s.o.) wurden die Zellen in Vollmedium

aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (4 min, 350 x g, 4°C). Die NAO-Färbung (50 nM) in PBS erfolgte für 15 min bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimalig in eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300 µl 2%-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert und gemessen.

Die Cyt-c-Freisetzung wurde mittels Immunfärbung bestimmt, wobei eine Abnahme im Fluoreszenzsignal die Freisetzung von Cyt c aus den Mitochondrien widerspiegelt. Technisch basiert die Methode darauf, dass die Plasmamembran durch limitierte Detergenzienbehandlung perforiert und cytoplasmatisches Cyt c ausgewaschen wird, wohingegen mitochondriales Cyt c in der Zelle verbleibt und über Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper angefärbt wird. Hierzu wurden die Zellen am Vortag in einer Konfluenz von 80% in 12-*well*-Platten ausplattiert. Nach dem Trypsinisieren (s.o.) wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und durch zweimaliges Zentrifugieren (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspendieren in eiskaltem PBS gewaschen. Bei allen Waschschritten wurden 1,5 ml Puffer verwendet. Danach wurden die Zellen zweimalig in *Wash*-Puffer (siehe 3.5) gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl 4%-igem Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit *Wash*-Puffer gewaschen, zentrifugiert und mit 100 µl mouse-IgG1k in 0,2% Saponin in PBS für 5 min bei RT blockiert. Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen mit 100 µl Cytochrom-c-Antikörper in PBS für 20 min bei 4°C inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen wieder gewaschen, zentrifugiert und mit dem sekundären Antikörper AlexaFluor-647 in 100 µl PBS für 20 min bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden schließlich zweimalig gewaschen, zentrifugiert, in 100 µl 4%-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert und zu 400 µl eiskaltem PBS in FACS-Röhrchen überführt.

Das mitochondriale Membranpotential wurde mittels Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIOC₆ analysiert. In niedrigen Konzentrationen lagert sich DIOC₆ präferentiell in die Mitochondrien ein, wobei ein Verlust des Membranpotentials zu einer Abnahme des DIOC₆-Fluoreszenzsignals führt. Die Zellen wurden hierfür nach Trypsinisieren (s.o.) in Vollmedium aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (4 min, 350 x g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit DIOC₆ (10 nM) in PBS für 20 min bei 37°C im Dunkeln gefärbt. Dann wurden die Zellen zweimalig in eiskaltem PBS gewaschen und schließlich mit 300 µl 2%-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert und gemessen.

Die Messungen erfolgten am FACSCalibur-Zytometer, welches mit CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgestattet war. Dabei wurden jeweils 10.000 *events* für die entsprechenden Excitations- / Emissionswellenlängen erfasst (APC = 650 / 660 nm, PE = 496 / 578 nm, 7-AAD = 546 / 655 nm, Alexa Fluor 647 = 650 / 665 nm, NAO = 495 / 519 nm und DIOC₆ = 484 / 501 nm).

4.1.10 Messung der Caspase-3/7-Aktivität und der Zell-Viabilität in eukaryoten Zellen

Die Zellen wurden in 96-*well*-Platten in einer Konfluenz von 80% ausplattiert und am Folgetag mit verschiedenen Stimuli in 40 µl Vollmedium behandelt. Nach verschiedenen Zeiten wurden *Caspase-Glo-3/7*[®] bzw. *CellTiter-Glo*[®] Reagenz hinzugegeben, welches ein zur Caspase-Aktivität bzw. zum ATP-Gehalt proportionales Chemilumineszenzsignal induziert. Dabei entsprach die Menge an zugesetztem Reagenz der Menge an Medium. Zur gleichzeitigen Messung von lebenden und toten Zellen wurde der *CytoTox-Glo*[™] *Cytotoxicity Assay* verwendet. Dabei entsprach die Menge der jeweils zugesetzten Reagenzien der halben Menge an Medium. Die Messungen erfolgten gemäß den Herstellerangaben, wobei die empfohlenen Reagenzmengen bei allen Assays um das 2,5-fache verringert wurden.

4.1.11 Reporter-Gen-Analysen zur Bestimmung der NF-κB-Aktivität

Reporter-Gen-Systeme können zur Untersuchung von eukaryotischer Genexpression und Regulation verwendet werden. Das hier verwendete pGL4.32[luc2P / NF-κB-RE / Hygro]-Plasmid (Promega) beinhaltet fünf Kopien eines NF-κB *Response Elements* (NF-κB-RE), welches die Transkription des *firefly*-Luciferase Reporter Gens Luc2P reguliert. Die Expression der *firefly*-Luciferase wurde durch Zugabe eines Substrates und dessen spezifische Umsetzung als Lichtsignal im Chemilumineszenz Lesegerät gemessen. Bei Aktivierung von NF-κB dissoziiert dieses von dem Inhibitorprotein IκB und kann in den Nukleus translozieren, wo es die Transkription verschiedener endogener Zielgene und hier die Transkription der *firefly*-Luciferase aktiviert. Somit korreliert die Zunahme im Luciferase-Signal mit einer erhöhten Menge von aktivem NF-κB. Neben dem Reporterplasmid wurde ein Plasmid ko-transfiziert, welches für die *Renilla*-Luciferase kodiert (siehe 3.9). Da die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert wird, ist deren erzeugtes Lichtsignal proportional zur Transfektionseffizienz und diente somit als interne Kontrolle zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Dieses Enzym hat eine andere Substratspezifität und kann von jener der *firefly*-Luciferase unterschieden werden.

A549-Zellen wurden in einer Konfluenz von 80% in 24-*well*-Platten ausplattiert und am Folgetag mit Attractene (siehe 4.1.4) mit einem PON2-HA-Plasmid oder einem PON3-GFP-Plasmid transfiziert. Die Vergleichszellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche nur für das entsprechende Fusionsprotein HA bzw. GFP kodierten. Zudem wurden das NF-κB-Reporter-Plasmid und ein *Renilla*-Plasmid ko-transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit Pyocyanin (100 µM) in Vollmedium behandelt und anschließend die *firefly*- / *Renilla*-Aktivitäten mit Hilfe des *Dual-Luciferase*[™] *Reportergen Systems* von Promega nach Herstellerangaben bestimmt.

4.1.12 Konfokale Lasermikroskopie in lebenden Zellen

Stabil überexprimierende Zellen oder naive Zellen wurden in Lab-Tek-Kammern oder 24-well-Mikroskopie-Platten in einer Konfluenz von 50-80% ausplattiert. Am Folgetag wurden naive Zellen ggf. mit PON2 oder PON3 exprimierenden Plasmiden als eGFP- oder DsRed-Fusionsprotein transient transfiziert (siehe 4.1.4). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit reduziertem *MitoTracker*[®] *Orange* (1:1000), *ER-Tracker*[™] *Red* bzw. *Green* (1:1000) oder DIOC₆ (10 nM) in HBSS⁺⁺ für 30 Minuten bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in HBSS⁺⁺ mit DRAQ5 (1:1000) aufgenommen und mikroskopiert. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein Zeiss LSM-710 mit ZEN2008 Software verwendet und die Zellen unter einem Plan / Apochromat 63x / 1.4 *oil DIC*-Objektiv betrachtet. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sicher gestellt. Alternativ wurde ein spezielles Verfahren (λ -Modus) zur parallelen Spektraldetektion und anschließendem *Linear Unmixing* in die vier Kanäle *MitoTracker*[®] *Orange*, *ER-Tracker*[™] *Red*, DRAQ5 und EGFP benutzt. Diese Methode erlaubt die optische Trennung von Farbstoffen mit stark überlappenden Emissions-Spektren, so dass eine Vielzahl von Farbstoffen kombiniert und gleichzeitig analysiert werden können.

Excitations- / Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: EGFP = 488 / 520 nm, *ER-Tracker*[™] *Green* = 504 / 511 nm, DIOC₆ = 484 / 501 nm, DsRed = 554 / 586 nm, *MitoTracker*[®] *Orange* = 554 / 576 nm, *ER-Tracker*[™] *Red* = 587 / 615 nm und DRAQ5 647 / 680 nm.

4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden zur Charakterisierung von Plasmid-DNA oder zur Präparation von DNA-Fragmenten für Klonierungen verwendet. Beim analytischen Verdau wurde 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Enzym nach Angaben des Herstellers für ein bis drei Stunden inkubiert. Bei präparativen Restriktionen wurden 5-10 µg DNA eingesetzt. Anschließend wurde die geschnittene DNA zur Überprüfung und Charakterisierung auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.2 Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse von DNA

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdau oder von Plasmidpräparationen wurden Agarosegele mit 0,8% - 2% Agaroseanteil verwendet, wobei sich der Agaroseanteil nach den Fragmentgrößen richtete. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der Agarose wurde TAE-Puffer verwendet. Zur späteren Detektion der DNA wurde dem Gel der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 ng/ml zugesetzt. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 100-150 V aufgetrennt. Anschließend wurden die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und konnten durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe identifiziert werden.

4.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente bestimmter Größe spezifisch zu isolieren, wurde die DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Vermeidung von Schäden an der DNA wurde eine niedrige UV-Intensität gewählt und die UV-Exposition möglichst kurz gehalten. Die enthaltene DNA wurde mit dem *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Fermentas) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück eluiert.

4.2.4 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Sofern eine präparierte DNA-Sequenz (*insert*) in einen Vektor mittels Restriktionsverdau kloniert werden soll, muss die Religation des geschnittenen Vektors während der Ligation verhindert werden. Zu diesem Zweck wurden die durch Restriktionsenzyme verdauten Plasmide vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierzu wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz nach Herstellerempfehlung mit 1 µl (1 U) alkalischer Phosphatase aus dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) behandelt. Für die Ligationen von geschnittener Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurde 30-50 ng linearisiertes, dephosphoryliertes Plasmid mit der entsprechenden Menge des Fragments, entsprechend den molekularen Verhältnissen von 1:3 bzw. 1:5 zusammen mit 1 µl (5 U) T4-DNA-Ligase (*Rapid DNA Ligation Kit*, Roche) in einem 10 µl Ansatz für 5 min bei RT ligiert.

4.2.5 Transformation von DNA in Bakterien

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes (siehe 4.2.4) mit 50 µl kompetenten DH5α-Bakterien (New England Biolabs) nach Herstellerempfehlung inkubiert bzw. der Hitzeschock durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen, die nur das Wachstum solcher Bakterien zuließen, die auch das Resistenzgen-enthaltende Plasmid aufgenommen hatten.

4.2.6 Plasmid-DNA-Präparation

Zur DNA-Gewinnung aus Bakterienklonen 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 Plasmid Miniprep-Kit 1* (Peqlab), Midipräparationen mit dem *HiPure Plasmid Filter Midiprep-Kit* (Invitrogen) jeweils entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Bei beiden Präparationen wurde das DNA-Pellet in sterilem destilliertem Wasser resuspendiert.

4.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen dienen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmiden mit spezifischen Primerpaaren. Die hier durchgeführte PCR-Reaktion wurden im iCycler (Biorad) unter Verwendung der *proof-reading* DNA-Polymerase VELOCITY™ durchgeführt.

Reaktionsansatz (20 µl):	
5 x PCR Puffer	4 µl
dNTPs (0,2 mM)	0,88 µl
Primer-sense (10 pmol/µl)	2 µl
Primer-antisense (10 pmol/µl)	2 µl
DNA-Template	0,1 µg DNA
VELOCITY™ DNA-Polymerase	0,5 µl
DMSO	0,5 µl
Wasser	auf 20 µl auffüllen

Reaktionsprofil:			
Temperatur:	Dauer:		
95°C	2 min	Template Denaturierung	
95°C	45 sec	} x 35 Denaturierung	
58°C	1 min		Annealing
72°C	90 sec		Elongation
72°C	10 min		
4°C	∞		

4.2.8 Klonierung der Plasmide pDsRed-Express-PON2 bzw. pDsRed-Express-PON3

Die Plasmide pDsRed-Express-PON2 bzw. pDsRed-Express-PON3 wurden mit Hilfe der Plasmide pEGFP-PON2 bzw. pEGFP-PON3 und pDsRed-Express kloniert. Hierzu wurden die Plasmide pEGFP-PON2 und pDsRed-Express mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *AgeI* bzw. die Plasmide pEGFP-PON3 und pDsRed-Express mit den Enzymen *EcoRI* und *SacII* verdaut (siehe 4.2.1). Zudem wurden die linearisierten pDsRed-Express-Plasmide dephosphoryliert (siehe 4.2.4). Danach wurden die Plasmide mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die PON2- (1066 bp) bzw. PON3-Fragmente (1041 bp) und die pDsRed-Express-Plasmide ausgeschnitten. Durch Ligation wurden die PON2- bzw. PON3-Fragmente schließlich in das passend geschnittene pDsRed-Express-Plasmid eingebracht (siehe 4.2.4), in Bakterien transformiert (siehe 4.2.5), aufgereinigt (siehe 4.2.6) und sequenziert (siehe 4.2.11).

4.2.9 Klonierung des Plasmids StrepOne-PON2-His

Das Plasmid StrepOne-PON2-His wurde mit Hilfe der Plasmide pEXPR-IBA103 und pcDNA3-His-PON2-iso1-WT kloniert. Hierzu wurde ein PON2-His(8x)-Fragment mit Hilfe der Primer pcDNA3-Seq-fwd und P2Cterm-His-Xho mittels PCR (siehe 4.2.7) aus dem pcDNA3-His-PON2-iso1-WT-Plasmid vervielfältigt. Danach wurde das ~1200 bp große Fragment aufgereinigt (siehe 4.2.3). Das PON2-His(8x)-Fragment sowie das pEXPR-IBA103-Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* verdaut (siehe 4.2.1) und anschließend aufgereinigt (siehe 4.2.3). Dann wurde das linearisierte pEXPR-IBA103-Plasmid dephosphoryliert und mit dem PON2-His(8x)-Fragment ligiert (siehe 4.2.4). Das entstandene Konstrukt wurde in Bakterien transformiert (siehe 4.2.5), aufgereinigt (siehe 4.2.6) und sequenziert (siehe 4.2.11).

4.2.10 Herstellung der PON2-Mutanten

Durch die Mutation einzelner Aminosäuren von PON2 wurde untersucht, welcher Rest in PON2 3OC12- bzw. Ca^{2+} -abhängig dephosphoryliert wird und somit die Aktivität von PON2 reguliert. Hierzu wurden phosphorylierbare Stellen (Serin, Threonin, Tyrosin) durch sterisch ähnliche, aber nicht mehr phosphorylierbare Aminosäuren (Serin und Threonin zu Alanin, Tyrosin zu Phenylalanin) mutiert (siehe Abbildung 4-1).

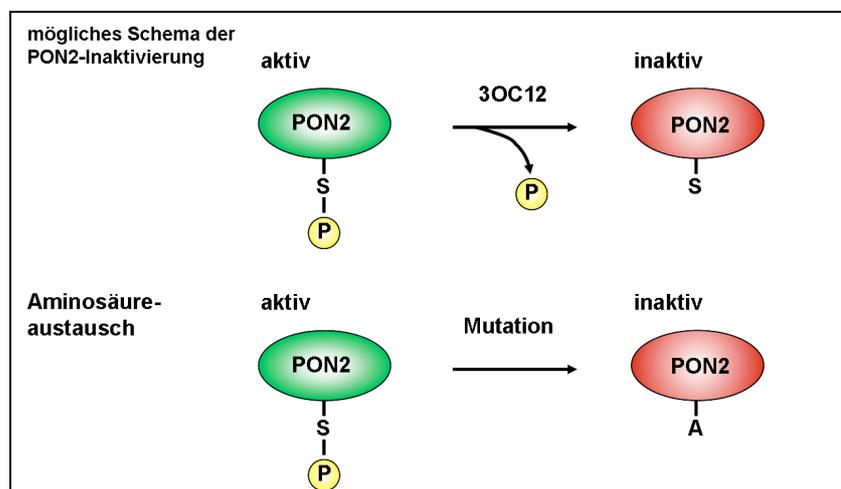


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung zur Mutation von PON2. PON2 könnte durch 3OC12 dephosphoryliert und damit inaktiviert werden (oben). Daher wurden potentiell phosphorylierbare Stellen in PON2 durch sterisch ähnliche, nicht-phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht (hier Serin zu Alanin), um die Inaktivierung von PON2 zu simulieren (unten).

Durch eine PCR, welche der Mutagenese diene, wurde die PON2-DNA-Sequenz und somit die Kodierung für einzelne Aminosäuren im PON2-Protein verändert. Dazu wurden PCR-Primer designt, in denen die Codons der auszutauschenden Aminosäuren durch den Austausch von 1-3 Basen so verändert wurden, dass sie für eine andere Aminosäure kodierten. Ausgehend von diesen Primern wurde das Ausgangsplasmid durch eine *proof-reading* DNA-Polymerase vom *forward*-Primer aus in 3'-Richtung und vom *reverse*-Primer aus in 5'-Richtung abgelesen und die mutierte Form amplifiziert. Anschließend wurde das Ausgangsplasmid durch Zugabe des Restriktionsenzym *DpnI* im PCR-Ansatz verdaut. Die *DpnI*-Endonuklease verdaut ausschließlich methylierte DNA, so dass hierdurch spezifisch die *template*-DNA verdaut wird.

Alle Mutagenesen wurden mit dem *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. In die Transformation wurden für eine höhere Ausbeute 5 µl der *DpnI*-verdauten DNA eingesetzt. Die Plasmide wurden anschließend aus den Bakterien in DNA-Midipräparationen (siehe 4.2.6) isoliert und sequenziert (siehe 4.2.11). Die Plasmide wurden mittels transienter oder stabiler Transfektion (siehe 4.1.4 bzw. 4.1.5) in HEK293-Zellen eingebracht.

4.2.11 Sequenzierung klonierter DNA

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab, Göttingen als Auftragssequenzierung durchgeführt.

4.2.12 Extraktion der Gesamtzell-RNA aus eukaryoten Zellen

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

4.2.13 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 entspricht dabei der Reinheit der Nukleinsäureproben und zeigt die Verunreinigung durch Protein-Rückstände aus der Präparation an. Dies ergibt sich aus der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und jener von Proteinen bei 280 nm. Dabei sollte das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} nicht unter 1,8 liegen.

4.2.14 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* (4.2.15). Alle RT-PCRs wurden mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 80 ng RNA eingesetzt. Bei den verwendeten Primern handelt es sich um ein Gemisch aus Primern mit Zufallssequenzen (*random-primer-mix*).

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

Zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA aus Gesamtzell-RNA wurde die quantitative *real-time-RT-PCR* verwendet. Hierbei handelt es sich prinzipiell um eine PCR mit zwei sequenzspezifischen Primern, wobei die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge durch Verwendung einer sequenzspezifischen *TaqMan*-Sonde erfolgte, die innerhalb des amplifizierten cDNA-Stranges bindet. Die Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)) am 5'-Ende markiert und am 3'-Ende mit einem sogenannten *Quencher* (z. B. Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)). Solange die Sonde an die komplementäre cDNA gebunden und intakt ist, wird durch die räumliche Nähe von Fluoreszenzmarkierung und *Quencher* kein Fluoreszenzsignal abgegeben. Während der Extensionsphase der PCR wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Sonde gespalten und Fluoreszenzfarbstoff und *Quencher* entfernen sich räumlich voneinander. Erst jetzt wird eine Fluoreszenz emittiert und kann vom Detektor erfasst werden. Das entstehende Signal ist dabei direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA und somit zur ursprünglichen mRNA-Menge. Zur Quantifizierung wird die Expressionsrate der spezifischen Probe zunächst mittels $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode gegen die Expressionsrate einer konstitutiv exprimierten mRNA (z.B. Glycerin-aldehyd-3-phosphat; GAPDH) aus derselben Probe normalisiert. Anschließend erfolgt die Berechnung einer geänderten Expression durch den relativen Vergleich von behandelten und unbehandelten Proben.

Reaktionsansatz (20 µl):		Reaktionsprofil:		
2 x Puffer	10 µl	95°C	1 min	1 x
dNTPs (0,2 mM)	0,4 µl	95°C	1 min	} 45 x
sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	95°C	30 sec	
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	60°C	1 min	
TaqMan-Sonde (10 pmol/µl)	1 µl	4°C	∞	
Taq	0,5 µl			
RNA-freies Wasser	3,1 µl			
cDNA	3 µl			

Der Ansatz für die PON2- und PON3-Primer unterschied sich geringfügig. Statt des aufgeführten 1 µl Primer der drei Primer wurde jeweils nur 1 µl eines vordesignierten Primer-Mixes (Applied Biosystems) verwendet, der sowohl *sense*- und *antisense*-Primer als auch die Sonde enthielt.

4.2.16 Cancer survey panel

Für die Messung von PON3-cDNA in verschiedenen Krebsgeweben wurden die *cancer survey panel „TissueScan cancer survey panel-III“* (4 x 96-well format) und *„TissueScan matched lung cancer panel-IV“* von OriGene verwendet. Beide *panels* wurden mittels qRT-PCR gemessen (siehe 4.2.15), wobei hier die Polymerase SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) nach folgendem Schema verwendet wurde:

Reaktionsansatz (20 µl):		Reaktionsprofil:		
SYBR® Green	10 µl	95°C	5 min	1 x
sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	95°C	1 min	} 50 x
antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	95°C	30 sec	
TaqMan-Sonde (10 pmol/µl)	1 µl	60°C	1 min	
RNA-freies Wasser	7 µl	4°C	∞	

Bevor der Reaktionsansatz mit Primern und *TaqMan*-Sonden für PON3 bzw. GAPDH (MWG, siehe 3.10) auf die Platte gegeben wurde, wurde diese für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Mixes wurde die Platte für 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und gemessen. Die cDNA der beiden *panels* wurden durch den Hersteller bereits auf β-Actin normalisiert, während der *„TissueScan cancer survey panel-III“* hier noch zusätzlich mittels $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode

auf GAPDH normalisiert wurde. Auf der Herstellerhomepage können weitere Informationen über die Gewebe und die detaillierten pathologischen Befunde erhalten werden (<http://www.origene.com/qPCR/Tissue-qPCR-Arrays.aspx>).

4.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

4.3.1 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 70-100 µl Lysispuffer 3 (siehe 3.5) 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 min bei 4°C wurden die Zellen durch das im Lysispuffer enthaltene Detergenz aufgeschlossen. Die Lysate wurden danach zur Entfernung der Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 4.3.2) bestimmt.

4.3.2 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.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von Proteinen wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ¹¹⁵ verwendet. SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, wodurch diese denaturiert werden und ihre Eigenladung durch die stark negative Ladung von SDS überdeckt wird. Da SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine bindet, weisen diese ein konstantes Masse-

Ladungsverhältnis auf. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ebenfalls proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Für SDS-PAGE-Experimente wurde entweder das Mini-Protean-System 3 von Biorad, oder das *Perfect-Blue* Doppeltgelsystem Twin L von Peqlab verwendet. Es kamen folgende Gelsysteme aus Trenngel und Sammelgel zum Einsatz:

Tabelle 4-2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele im BioRad Mini-Gel

	12% Trenngel	5% Sammelgel
H ₂ O	3,3 ml	2,2 ml
30% Bisacrylamid	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris, pH 8.8	2,5 ml	---
0,5 M Tris, pH 6.8	---	1 ml
10%-iges SDS	0,1 ml	0,04 ml
10%-iges APS	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

Tabelle 4-3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele im Peqlab Perfect-Blue L-Gel

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

Die abgedichteten Glasplatten wurden zu zwei Dritteln mit der vorbereiteten 12%-igen Trenngelmischung gefüllt und direkt im Anschluss zur Vermeidung von Luftblasen mit Isopropanol überschichtet. Das 5%-ige Sammelgel wurde zur besseren Erkennbarkeit der Taschen mit Bromphenolblau (in 0,5 M Tris, pH 6.8, gleicher Volumenanteil wie SDS) versetzt. Die zuvor auf eine gemeinsame Konzentration eingestellten Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Als Größenstandard wurde zusätzlich ein Proteinmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten

Spannung von 100 V (ca. 1-2 h) bei Biorad-Minigelen und einer konstanten Stromstärke von 9 mA / Gel (ca. 16 h) bei den Gelen unter Verwendung des Peqlab-Systems.

4.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Blue

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung können Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Der Coomassie-Farbstoff färbt unspezifisch Proteine durch Anlagerung an basische Seitenketten der Aminosäuren. Dazu wurde das Polyacrylamidgel mit dem *GelCode™ Blue Stain Reagent* (Pierce) nach Herstellerempfehlung gefärbt. Die so gefärbten Proteinbanden konnten mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten werden und mittels Massenspektrometrie (siehe 4.3.6) analysiert werden.

4.3.5 Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen

Durch Western-Blot-Analysen können bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Per SDS-PAGE aufgetrennte Proteine werden in einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran oder PVDF-Membran transferiert. Nachdem freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden, kann das Protein mit spezifischen Antikörpern (Primärantikörper) detektiert werden. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird dann mittels eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym, hier eine Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), katalysiert die Umsetzung eines zugegebenen Substrats zu seiner oxidierten Form, bei der eine Lumineszenz entsteht, welche detektiert werden kann. Die Visualisierung erfolgt schließlich durch Belichtung eines Positivfilms oder im digitalen *ChemiDoc-XRS* Detektionssystem (Biorad). Letzteres erlaubt eine genaue Quantifizierung der Signale über einen hohen Intensitätsbereich und erfasst >50-fache Unterschiede in Bandenintensitäten.

Je nach Anwendung wurden verschiedene Transfersysteme verwendet. In der Regel wurden die Proteine mit einem *Semidry*-Blotsystem (Biorad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese zunächst 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Proteine dann mit dem *Semidry*-Blotsystem auf die PVDF-Membran übertragen. Diese wurde zuvor kurz in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und für 10 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Auf der Anodenplatte wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte und zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman 3 MM Papiere aufeinandergeschichtet auf die dann die äquilibrierte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel

und vier in Kathodenpuffer getränkte Whatman 3 MM Papiere geschichtet wurden. Transferiert wurde für 20 Minuten bei konstanten 3 mA/cm² SDS-Gel.

Zur Detektion der Proteine JNK und der des *Protein Folding and Stability Antibody Sampler Kits* (Cell Signaling) wurde eine Mini Trans-Blot Zelle von Biorad entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Zur Detektion mit α -Phosphotyrosin-Antikörper (Klon 4G10®, Millipore) wurden die Proteine mit einem *Semidry*-Blotsystem auf eine Nitrozellulose-Membran nach Angaben des Antikörperherstellers übertragen.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen, wurde die Membran nach dem Transfer für eine Stunde gemäß der entsprechenden Herstellerempfehlung in 5%-igem Milchpulver oder in 5%-igem BSA in TBS / Tween inkubiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in einer Lösung des Primärantikörpers in 5%-igem Milch- bzw. BSA-Puffer in *end-over-end* Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde viermal mit TBS / Tween gewaschen und anschließend die Membran in einer Lösung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers in Blockierpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach erneuten Waschschritten mit TBS / Tween und TBS wurde der Blot mit Hilfe des ECL-Systems (*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*, Perkin Elmer) im Chemi-Doc-XRS Imagingsystem digital aufgenommen oder es wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der durch die freigewordene Chemilumineszenz belichtet wurde.

4.3.6 Massenspektrometrische Analysen

Die Coomassie-gefärbten ausgeschnittenen Gelstücke aus 4.3.4 wurden in destilliertem Wasser in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 4°C aufbewahrt bzw. bei RT verschickt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Gabriele Stöhr (AG Prof. Dr. M. Mann, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried).

4.3.7 Immunopräzipitation von PON2 mit *Dynabeads*[®] *Protein A*

Mit Hilfe der Immunopräzipitation (IP) kann PON2 aus dem komplexen Proteingemisch von Gesamtzellextrakten angereichert werden. Dabei wird die spezifische Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ausgenutzt. Durch die Kopplung eines α -PON2-Antikörpers an Protein A-beschichtete *Dynabeads* (Invitrogen), kann endogene PON2 aus den Zelllysaten extrahiert werden.

A549-Zellen wurden in 75 cm²-Flaschen bis zu einer Konfluenz von maximal 70% wachsen gelassen. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 μ M 3OC12 in Vollmedium für 30 min behandelt und anschließend vorsichtig mit PBS

gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde je 1 ml Lysispuffer 3 (siehe 3.5) zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Platte mechanisch abgelöst und die erhaltene Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Ultraschallbehandlung (3 x 10 s, mit je 30 s Abkühlung zwischen den Behandlungen) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Lysate wurden danach zur Entfernung der Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 4.3.2) bestimmt.

Je 500 µg Zelllysate wurden für die Immunpräzipitation mit *Dynabeads*® Protein A eingesetzt. Die *Dynabeads* wurden zunächst gemischt, dann 100 µl in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch 90-sekündiges Anhalten eines Magneten vom Überstand getrennt. Nach Abnahme des Überstandes wurden die *Dynabeads* zweimal mit 400 µl *Wash&Bind*-Puffer gewaschen. Es wurden 20 µl α-PON2-Antikörper in 400 µl *Wash&Bind*-Puffer verdünnt und nach Zugabe zu den *Dynabeads* für 60 min bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Zur kovalenten Kopplung des α-PON2-Antikörpers wurde der Komplex zunächst zweimal mit 400 µl *Conjugation*-Puffer gewaschen und anschließend in 300 µl BS³-Lösung aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation unter Schütteln bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl *Quenching*-Puffer abgestoppt. Dann wurde erneut 15 min inkubiert und zweimal mit 400 µl *Wash&Bind*-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die spezifische Bindung von PON2 aus Zelllysaten durch Zugabe von 500 µg Protein zu den *Dynabeads* bei einer Inkubation von 2 h (oder über Nacht) bei 4°C in *end-over-end* Rotation. Der Komplex wurde zweimal mit 400 µl *Wash&Bind*-Puffer gewaschen. Zur pH-Elution wurden 30 µl *Elution*-Puffer auf den Komplex gegeben und für 2 min auf Eis inkubiert. Das PON2-enhaltende Eluat wurde von den *Dynabeads* abgenommen und sofort in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem 6 µl *Quenching*-Puffer zur pH-Neutralisierung vorgelegt waren. Nach dreimaligem Waschen der *Dynabeads* mit 400 µl *Wash&Bind*-Puffer wurde der Elutionsschritt wiederholt und das Eluat mit dem bereits abgenommenen vereint. Die *Dynabeads* konnten nun nach dreimaligem Waschen mit 400 µl *Wash&Bind*-Puffer noch einmal mit Zelllysate beladen werden und die Prozedur wiederholt werden. Zu den 66 µl Eluat wurde 5x SDS-Ladepuffer hinzugefügt und mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennt.

4.3.8 Immunopräzipitation von PON2 mit α-HA-Antikörper

Unter Verwendung des *HA Tag IP / Co-IP Kits* (Pierce), welches α-HA-Antikörper gekoppelt an Agarose enthält, kann HA-markierte PON2 aus überexprimierenden Zellen isoliert werden. Der Vorteil gegenüber der *Dynabeads* liegt in der höheren Ausbeute an angereicherter PON2, wodurch sich diese Methode besser zur Probengewinnung für eine anschließende massenspektrometrische Analyse eignet. Die Immunopräzipitation erfolgte

nach Angaben des Herstellers mit den folgenden Abweichungen und Ergänzungen.

PON2-HA überexprimierende HEK293-Zellen wurden in 75 cm²-Flaschen bis zu einer Konfluenz von maximal 70% wachsen gelassen. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 µM 3OC12 in Vollmedium für 30 min behandelt und anschließend vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 750 µl M-Per (Pierce, +Proteaseinhibitor, +PhosphoSTOP) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Platte mechanisch abgelöst und die erhaltene Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 4.3.2) bestimmt. Es wurden 700 µg Lysat auf die Säule gegeben und 6 µl α-HA-Agarose hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in *end-over-end* Rotation. Der Überstand wurde abzentrifugiert (10 s, 5.000 x g) und die Säule dreimal mit 500 µl WB2 gewaschen. Zur Elution wurden 25 µl 2 x *reducing sample buffer* (Pierce, +1 µl β-Mercaptoethanol) hinzugegeben und für 5 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Säulen zentrifugiert und das Eluat in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Dieses wurde in zwei Teile aufgeteilt und mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennt. Ein kleiner Teil des Eluates (ca. 20%) wurde zur Überprüfung der Immunopräzipitation mittels Western Blot detektiert (siehe 4.3.5), der andere wurde mittels Coomassie-Färbung (siehe 4.3.4) sichtbar gemacht und für die Massenspektrometrie (siehe 4.3.6) verwendet.

4.3.9 Immunopräzipitation von PON2 mit α-GFP-Antikörper

Mit Hilfe von α-GFP-Antikörper gekoppelt an Agarose kann GFP-markierte PON2 aus überexprimierenden Zellen isoliert werden. Diese Methode wurde gewählt, da über die *HA Tag IP / Co-IP* kein ausreichend reine PON2 für die massenspektrometrische Analyse angereichert werden konnte. Die Immunopräzipitation mittels *GFP-Trap*[®] A (ChromoTek) erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den folgenden Abweichungen und Ergänzungen.

PON2-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden in *TripleFlasks*-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von maximal 70% wachsen gelassen. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 µM 3OC12 in Vollmedium für 30 min behandelt, anschließend in PBS resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 900 x g, RT) wurde der Überstand abgesogen und noch einmal mit PBS gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer 3 lysiert. Die erhaltene Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch eine 20-minütige Inkubation bei 4°C wurden die Zellen durch das im Lysispuffer enthaltene Detergenz aufgeschlossen. Die Lysate wurden danach zur Entfernung der Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4°C) und der Überstand

in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 4.3.2) bestimmt.

Die *GFP-Trap*[®] *beads* wurden zunächst in *Dilution*-Puffer äquilibriert. Hierzu wurden 60 µl *beads* in 500 µl eiskaltem *Dilution*-Puffer gelöst, abzentrifugiert (2 min, 2.700 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Dies wurde zweimal wiederholt und anschließend 3 mg Zelllysate auf die *beads* gegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 min bis 2 h bei 4°C in *end-over-end* Rotation. Der Protein-Agarose-Komplex wurde auf Säulen aus dem *HA Tag IP / Co-IP Kit* (Pierce) überführt, da diese eine saubere Abtrennung zwischen der Agarose und dem Überstand mittels Zentrifugation (2 min, 2.000 x g, 4°C) erlauben. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl eiskaltem *Wash*-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die *beads* in 100 µl 2 x *reducing sample buffer* (Pierce) für 10 min bei 95°C aufgekocht. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Säulen zentrifugiert, das Eluat in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und mit 4 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Ein kleiner Teil (ca. 10%) des Eluates wurde zur Überprüfung der Immunopräzipitation mittels Western Blot analysiert (siehe 4.3.5), der andere wurde mittels Coomassie-Färbung (siehe 4.3.4) sichtbar gemacht und für die Massenspektrometrie (siehe 4.3.6) verwendet.

4.3.10 Zellfraktionierung von eukaryoten Zellen

Zur Fraktionierung von Zellkern, Mitochondrien, Mikrosomen bzw. ER und von cytosolischen Proteinen wurden A549-Zellen aus T175-Zellkulturflaschen mit 5 ml Trypsin abgelöst, mit 15 ml DMEM-Vollmedium wieder aufgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (10 min, 900 x g, 4°C). Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS, wurde das Pellet in 3,5 ml Mito-Puffer resuspendiert und zum Aufschluss der Zellen viermal durch eine 26G-Kanüle passagiert, gefolgt von 10 Stößen in einem 3 ml-Glasmogenisator. Die Lyse der Zellen wurde mittels Trypan-Blau-Färbung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und solange wiederholt bis wenigstens ca. 80% der Zellen lysiert und somit Trypan-Blau positiv waren. Nach Zentrifugation (5 min, 1.000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt, das Pellet in 500 µl Mito-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000 x g, 4°C). Dieses Pellet enthält die Nuclei. Zur Fällung der Mitochondrien wurde der resultierende Überstand mit dem Überstand des vorigen Schritts vereint und zweimal zentrifugiert (20 min, 10.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde wieder zentrifugiert (60 min, 100.000 x g, 4°C), um die Mikrosomen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und enthielt die cytosolischen Proteine. Das 1.000 x g Pellet (Zellkern und Zelltrümmer) wurde in 500 µl, das 10.000 g Pellet (Mitochondrien) in 250 µl und das 100.000 g Pellet (Mikrosomen bzw. ER) in 250 µl Mito-Puffer aufgenommen. Die

Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (siehe 4.3.2) bestimmt und die Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.3) und im Western Blot detektiert (siehe 4.3.5).

4.3.11 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe beispielsweise Proteine aber auch andere niedermolekulare Verbindungen in einer Probe nachgewiesen werden können. Bei dem hier verwendeten *Human Inflammatory Multi-Analyte ELISArray™ Kit* (SA Biosciences) handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Dieser ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung der Menge an verschiedenen Cytokinen und Chemokinen in einer Probe. Die 96-*well*-ELISA-Platte ist mit zwölf verschiedenen Antigen-spezifischen Antikörpern in 8-er Reihen beschichtet und ermöglicht die Messung von sechs verschiedenen Proben. Die beiden übrigen Reihen dienen als Negativkontrolle und Positivkontrolle mit bekannter Cytokin- / Chemokinkonzentration und erlauben so eine quantitative Bestimmung in den Proben. Durch Inkubation des Zellüberstandes können die sekretierten Cyokine an die Antikörper binden. Nach Waschen der ungebundenen Proteine wird ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper auf die Platte gegeben, wobei der zweite Antikörper an eine andere Stelle des Antigens bindet und so einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich) bildet. Nach weiteren Waschschrinen wird ein Substrat hinzugegeben, welches durch die gebundene Peroxidase proportional zu der Menge an dem zu analysierenden Protein zu einer blauen Farbe umgesetzt wird. Die Farbentwicklung wird schließlich abgestoppt und die Absorption kann bei 450 nm gemessen werden.

EA.hy 926-Zellen wurden zu einer Konfluenz von 80% auf einer 6-*well*-Platte ausgesät und am Folgetag mit 1,5 ml Vollmedium ohne FCS für 16 h mit oder ohne Pyocyanin (10 μ M) behandelt. Die Zellüberstände wurden nach Herstelleranweisung des *Human Inflammatory Multi-Analyte ELISArray™ Kits* (SA Biosciences) verwendet. Die Absorption wurde im FluoStar Optima gemessen. Um mögliche optische Unebenheiten der ELISA-Platte auszugleichen, wurde die korrigierte OD berechnet, indem von den Werten bei einer Absorption von A_{450} die Werte bei A_{570} abgezogen wurden.

4.3.12 Messung der Enzym-Aktivität von PON2 und PON3

Die Messung der Enzymaktivität von PON2 und PON3 diente dazu, Veränderungen in der Aktivität durch die Behandlung von 3OC12 festzustellen. Hierfür wurden HEK293-Zellen, die PON2 bzw. PON3 überexprimieren, auf 24-*well*-Platten in einer Konfluenz von 50% ausplattiert. Die Zellen wurden mit 100 μ M 3OC12 in Vollmedium für 10 min bzw. 30 min bei 37°C behandelt. Das Medium wurde danach entfernt und die Zellen in frischem Medium

resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4 min, 900 x g, 4°C). Das Medium wurde vollständig abgezogen, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert bzw. bei -20°C verschickt. Die Messung der Enzymaktivität in den Zellpellets anhand der Substrate 3OC12 (PON2) bzw. Lovastatin (PON3) wurde von Dr. John F. Teiber (Dallas, USA) durchgeführt, wie bereits beschrieben^{85, 108}.

4.3.13 Messung der Enzym-Aktivität der PON2-Mutanten

Die Messung der Enzymaktivität in den PON2-Mutanten diente dazu, Effekte der Punktmutation auf die Aktivität von PON2 zu analysieren. Entweder wurden stabil überexprimierende HEK293-Zellen verwendet und wie in 4.3.12 beschrieben behandelt oder es wurden HEK293-Zellen auf eine 6-well-Platte in einer Konfluenz von 80% ausplattiert, mit Nanofectin™ transfiziert (siehe 4.1.4) und mittels FACS sortiert (siehe 4.1.5). Die Zellen wurden anschließend gezählt, wobei $1 \cdot 10^4$ Zellen für einen Western Blot (siehe 4.3.3 und 4.3.4) zurückgehalten wurden. Die restlichen Zellen (Zellzahl lag zwischen $5 \cdot 10^4$ und $3 \cdot 10^5$) wurden 1:1 in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, wobei die einen unbehandelt blieben und die anderen mit 3OC12 in Vollmedium (100 µM, 30 min, 37°C) behandelt wurden. Die Zellen wurden danach zentrifugiert (4 min, 900 x g, 4°C), mit frischem Medium gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Medium wurde vollständig abgezogen, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert bzw. bei -20°C verschickt. Die Messung der Lactonase-Aktivität in den Zellpellets anhand des Substrates 3OC12 wurde von Dr. John F. Teiber (Dallas, USA) durchgeführt¹⁰⁸.

4.3.14 Statistik

Zur Erstellung der in Kapitel 5 gezeigten Graphiken wurden die Programme *GraphPad Prism 5*, *QuantityOne 4.6.7* (Biorad) und *ZEN2008* (Zeiss) verwendet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der übrigen Graphen erfolgte mittels *1-way* oder *2-way* ANOVA. 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.

5 Ergebnisse

5.1 Die Rolle von PON3 in der Tumorbilogie

Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle im Stoffwechsel und in der Regulation des Zelltodes spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle in neuen Konzepten der Medikamentenentwicklung gegen Krebs. Jüngste Studien zeigten, dass die zu PON3 paraloge PON2 in der Lage ist, die Superoxid-Bildung in den Mitochondrien zu vermindern und vor dem Zelltod zu schützen^{100, 102, 103, 111}. Der PON3 kommt vermutlich eine ähnliche Funktion zu, jedoch sind weder ihre anti-oxidativen Mechanismen noch ihre pathophysiologische Rolle vollständig bekannt. Daher wurde im Folgenden der Redox-Mechanismus aufgeklärt und die Relevanz der PON3-Expression für die Tumorgenese untersucht.

5.1.1 Expression von PON3 in Krebszellen

Zur Aufklärung der Rolle von PON3 in der Tumorbilogie wurde zunächst der PON3-mRNA-Gehalt in humanen Zelllinien aus verschiedenen Geweben und aus soliden Tumoren mittels qRT-PCR untersucht (siehe 4.2.15). Hierbei stellte sich heraus, dass PON3 vorwiegend in Tumorzelllinien aus der Lunge (A549), der Leber (HepG2) und dem Kolon (Caco-2) exprimiert wird (Abbildung 5-1). Nahezu keine PON3-mRNA konnte in primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC), in immortalisierten Endothelzellen (EA.hy 926), in glatten Muskelzellen aus der Media (SMC) oder in adventitiellen Fibroblasten aus der Vene (AoAF) detektiert werden, dementsprechend scheint PON3 in keiner Schicht des Blutgefäßes exprimiert zu werden. Zudem konnte keine PON3-mRNA in Tumorzelllinien aus der Niere (HEK293) oder aus dem Zervix (HeLa) gefunden werden.

Des Weiteren wurde die PON3-Protein-Expression in zahlreichen Zelllinien untersucht und mit der von PON2 verglichen. Den mRNA-Daten entsprechend, wurde keine PON3 in Endothelzellen (HUVEC, EA.hy 926), in HeLa- und in HEK293-Zellen gefunden (Abbildung 5-2a). Ferner konnte PON3 nicht in Zellen aus soliden Tumoren von Testes (833K, Susa, GCT27), der Blase (HT1376, RT112, MGHU-1) oder Gliomzellen (U373) und geringfügig in immortalisierten Zellen aus Chondrocyten (C28I) detektiert werden.

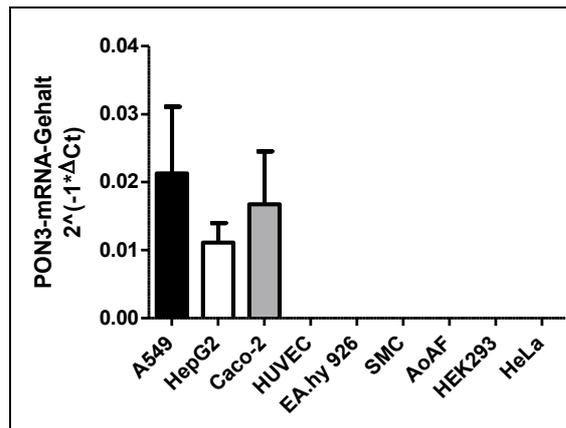


Abbildung 5-1: Charakterisierung der PON3-mRNA-Expression in Zelllinien aus verschiedenen Geweben oder soliden Tumoren. Der PON3-mRNA-Gehalt wurde nach der $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode ($2^{-1*\Delta Ct}$) berechnet, während GAPDH als interne Kontrolle diente. PON3 wird vor allem in humanen Tumorzelllinien aus Lunge (A549), Leber (HepG2) und Kolon (Caco-2) exprimiert. In den übrigen Zelllinien aus Gefäß (EA.hy 926, HUVEC, SMC, AoAF), Niere (HEK293) und Zervix (HeLa) konnte keine PON3-mRNA detektiert werden.

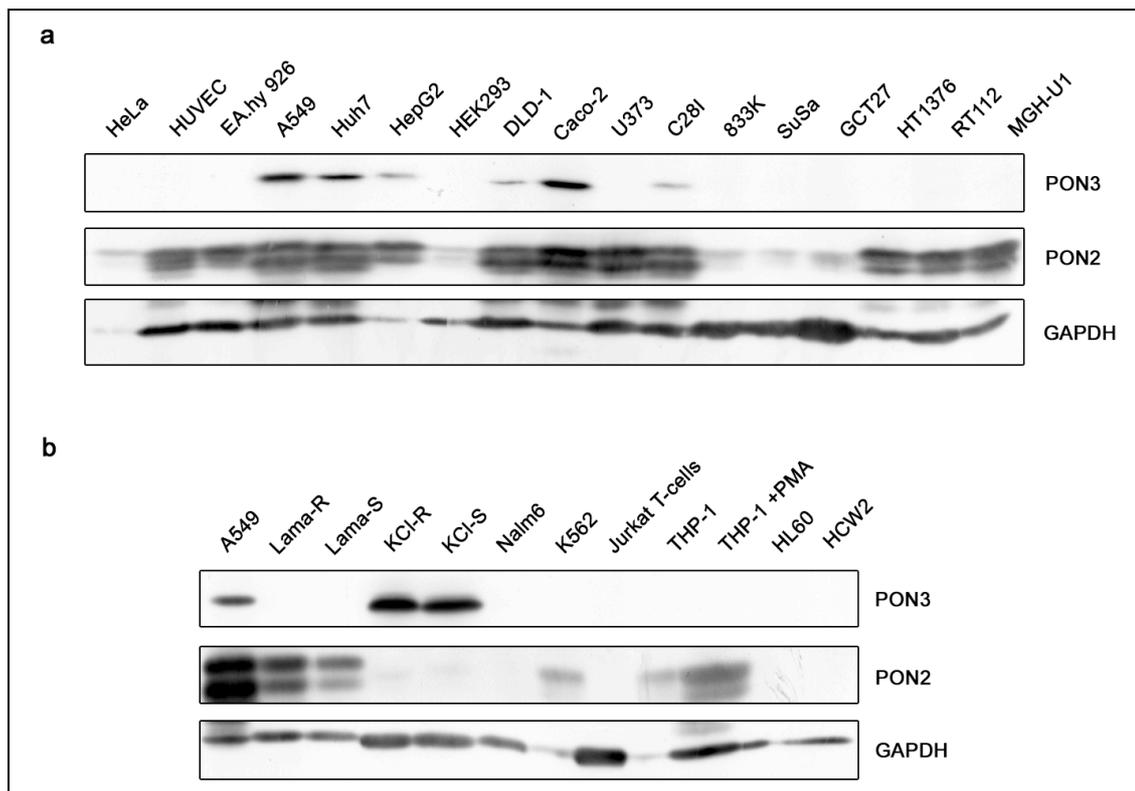


Abbildung 5-2: Charakterisierung der PON3-Proteinexpression in Zelllinien aus verschiedenen Geweben, soliden Tumoren (a) oder Leukämien (b). Zelllysate (je 30 μ g Protein) aus unterschiedlichen Zelllinien wurden mittels Western Blot mit Antikörpern gegen PON3, PON2 und GAPDH analysiert. PON2 wurde als Vergleichskontrolle verwendet, während GAPDH als Ladekontrolle diente. PON3 wird vor allem in humanen Tumorzelllinien aus Lunge (A549), Leber (Huh7, HepG2), Kolon (DLD-1, Caco-2) und in KCl-Zellen (Leukämie) exprimiert. Bezüglich der Lama- und KCl-Zellen bedeuten „R“ und „S“ eine Resistenz bzw. eine Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Imatinib. THP-1-Monocyten wurden durch Behandlung mit PMA zu Makrophagen differenziert („THP-1 +PMA“). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zu PON2 scheint die PON3-Expression stark auf einige Zelllinien aus soliden Tumoren beschränkt zu sein. PON3 konnte vor allem in Tumorzellen aus Lunge (A549), Leber (Huh7, HepG2) und dem Kolon (DLD-1, Caco-2) gefunden werden. Vorherige Studien haben gezeigt, dass PON2 die Resistenz gegen Chemotherapeutika in Leukämiezellen erhöht¹⁰². Zudem wurde eine Hochregulation von PON2 mit einer schlechten Prognose in Kohorten mit pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie (ALL; ^{116, 117}) und einer Imatinibresistenz bei Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML; ¹¹⁸) assoziiert. PON3 wird hingegen nur in den CML-Zelllinien KCI-R und KCI-S (resistent bzw. sensitiv gegenüber der Behandlung mit Imatinib) exprimiert, während sie in den anderen getesteten Leukämiezelllinien nicht detektiert werden konnte (Abbildung 5-2b, A549-Lysat diente dem Vergleich).

5.1.2 Expression von PON3 in der Tumorumgebung

Im nächsten Schritt wurde die PON3-mRNA-Menge in ungefähr 380 verschiedenen Proben gemessen, welche sowohl aus gesunden als auch aus malignen Geweben erhalten wurden (siehe 4.2.16, Abbildung 5-3a). Hierbei war die PON3-Expression in allen getesteten Tumoren deutlich erhöht, ausgenommen in Proben aus dem Zervix. Eine moderate Hochregulation um das 2- bis 3-fache trat in Tumorgewebe von Ovarien, Niere, Lymphknoten und Kolon auf. Hohe PON3-mRNA-Mengen wurden in Tumorgewebe aus Pankreas, Lunge, Blase, Schilddrüse, Prostata, Leber und Testes beobachtet (>3-fach). Eine auffällig starke über das 10-fache hochregulierte PON3-mRNA-Expression zeigten Tumorproben aus Magen und Endometrium / Uterus. In Probenpaaren (gesundes und erkranktes Gewebe aus demselben Patienten) aus 24 Lungenkrebspatienten, war die PON3-mRNA-Expression im Tumorgewebe insgesamt um das 3-fache höher als in den gesunden Geweben (Abbildung 5-3b-d). Des Weiteren wurden die Proben in verschiedene Kategorien nach Alter, Stadium und Diagnose eingeteilt. Demnach war die PON3-mRNA um das 5-fache in Patienten zwischen 60-65 Jahren hochreguliert, während jüngere Patienten (40-59 Jahre) sogar eine verminderte PON3-mRNA-Menge aufwiesen (~0.3-fach, Abbildung 5-3b). Die PON3-mRNA-Expression war am niedrigsten in Tumoren, die sich im Stadium I befanden (~0.5-fach), jedoch höher in Proben aus Stadium II (~5-fach) und Stadium III (~3-fach, Abbildung 5-3c). Die stärkste Zunahme in der PON3-mRNA-Menge trat in Proben aus Plattenepithelkarzinomen auf (~5,5-fach, Abbildung 5-3d).

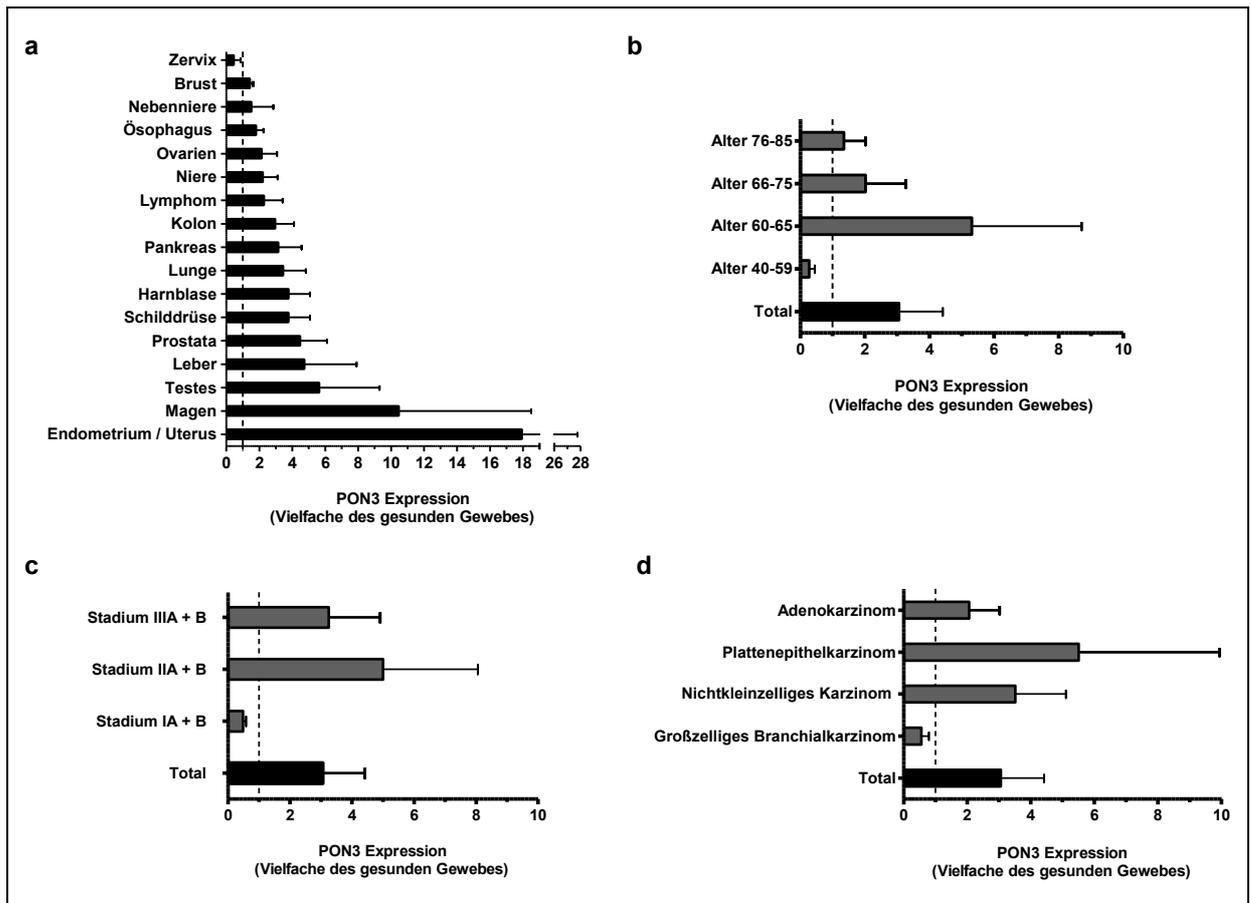


Abbildung 5-3: PON3 wird in verschiedenen humanen Tumoren überexprimiert. (a) Die Menge an PON3-cDNA wurde in verschiedenen Krebszellen gegenüber der Expression in normalen Geweben bestimmt. Hierzu wurde eine qRT-PCR mit einem *TissueScan cancer survey panel-III* durchgeführt, welcher in etwa 380 cDNA-Proben aus verschiedenen Tumoren beinhaltet. (b-d) Ebenso wurde ein *TissueScan matched lung cancer panel-IV* verwendet, welcher 24 Probenpaare beinhaltet, mit jeweils Material aus erkranktem und gesundem Gewebe aus demselben Patienten. Die 24 Probenpaare wurden alle zusammengefasst („Total“) oder nach Alter (b), Stadium (c) oder Diagnose (d) in verschiedene Gruppen eingeteilt.

5.1.3 Lokalisation und Funktion von PON3

Verschiedene Studien konnten einen anti-oxidativen Effekt für PON3 zeigen^{95, 104-107}, jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus bisher unbekannt. Da PON3 die mitochondriale Redox-Signalkette beeinflussen könnte, wurden die subzelluläre Lokalisation und die anti-oxidative Funktion von PON3 im Folgenden getestet. Hierzu wurden lebende HEK293-Zellen, welche PON3 als GFP- oder DsRed-Fusionsprotein überexprimierten, im konfokalen Lasermikroskop aufgenommen (siehe 4.1.12). Das PON3-Signal zeigte hierbei deutliche Überlappungen mit Markern für sowohl Mitochondrien als auch ER (Abbildung 5-4a). In einem weiteren Experiment wurden A549-Zellen fraktioniert, mittels Western Blot aufgetragen und mit verschiedenen Antikörpern die Trennung in eine Zellkernfraktion (NP),

eine Mitochondrienfraktion (MP), eine Mikrosomen- bzw. ER-Fraktion (P100) und eine Fraktion cytosolischer Proteine (S100) überprüft (siehe 4.3.10, Abbildung 5-4b).

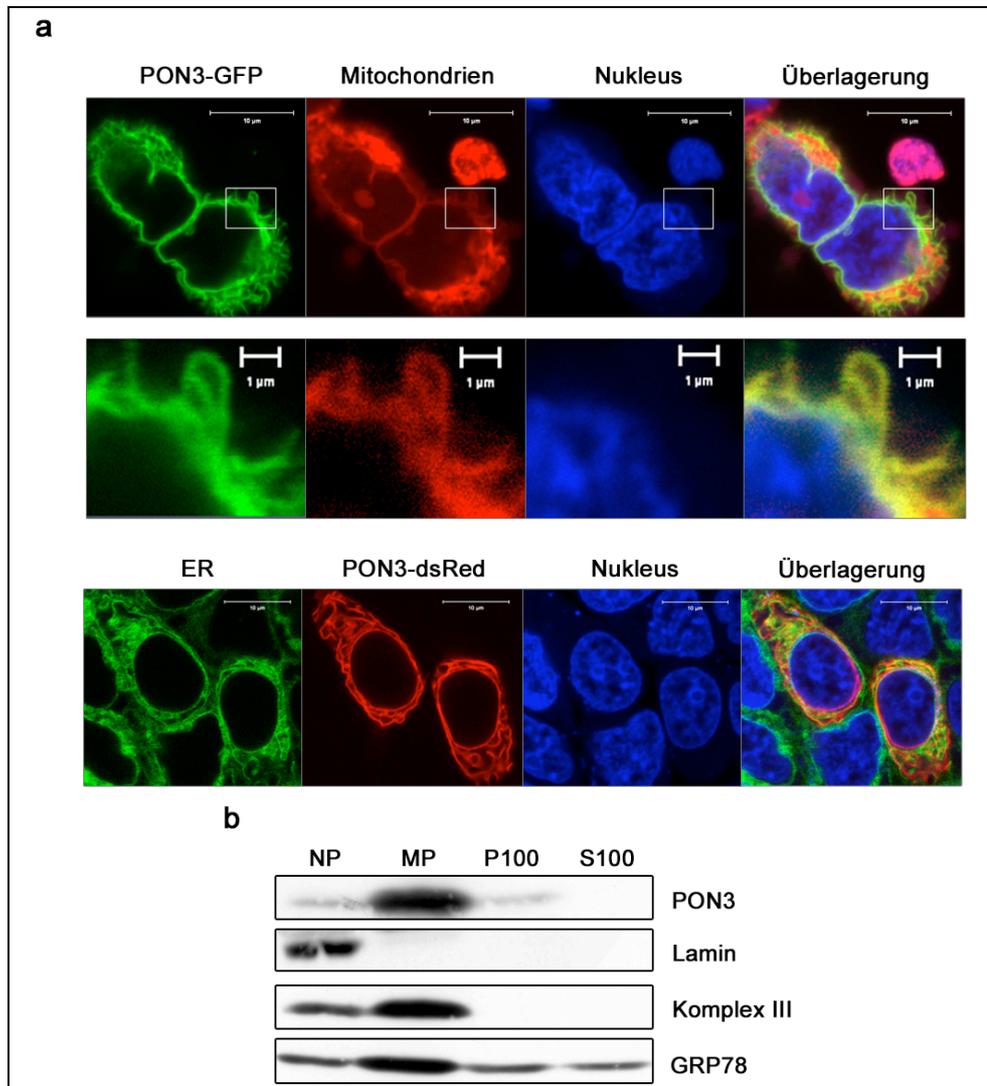


Abbildung 5-4: PON3 kolokalisiert mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und mit der mitochondrialen Membran. (a) Lebende HEK293 Zellen, welche PON3-GFP überexprimieren, wurden mit reduziertem *MitoTracker*[®] *Orange* gefärbt (in rot dargestellt, oberer Kanal). Markierte Bereiche der Zellen wurden im mittleren Kanal vergrößert dargestellt. Lebende HEK293 Zellen, welche PON3-DsRed überexprimieren, wurden mit *ER-Tracker*[™] *Green* gefärbt (unterer Kanal). Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt (in blau dargestellt). Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Skalierung = 10 µm im oberen und unteren Kanal, 1 µm im mittleren Kanal). (b) A549-Zellen wurden mittels Zentrifugation fraktioniert, die Fraktionen (je 50 µg Protein) wurden in einem Western Blot mit Antikörpern gegen PON3, Lamin, Komplex III und GRP78 analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten. NP = Nukleäres Pellet; MP = Mitochondriales Pellet; P100 = 100.000 x g Pellet; S100 = 100.000 x g Überstand.

Dabei diente das nukleäre Lamin als Marker für den Zellkern, das mitochondriale Protein Komplex III als Marker für die Mitochondrien und das ER-lokalisierte Chaperon GRP78 als Marker für das ER. GRP78 wurde nicht nur im ER, sondern auch in allen anderen Fraktionen

detektiert. Dies korreliert mit Beobachtungen von vorherigen Studien, in welchen GRP78 im Nukleus ¹¹⁹, in den Mitochondrien ¹²⁰, im Cytosol ¹²¹ und als Zelloberflächenprotein in Krebszellen ¹²² gefunden wurde. Trotz geringfügiger Verunreinigungen von Komplex III in der Kernfraktion aufgrund von nicht vollständig aufgeschlossenen Zellen, konnten die Fraktionen voneinander getrennt werden und geben Aufschluss über die Lokalisation von PON3. Diese konnte vor allem in Fraktionen gefunden werden, welche Nukleus, Mitochondrien oder ER enthielten (Abbildung 5-4b). Die PON3-Bande in der Zellkernfraktion könnte dabei ebenfalls durch eine Kontamination mit nicht aufgeschlossenen Zellen entstanden sein. Hingegen konnte keine PON3 im Überstand gefunden werden, welcher die löslichen Proteine enthält.

Nachdem gezeigt wurde, dass PON3 vorwiegend in Mitochondrien und ER lokalisiert ist, wurde nun der Einfluss von PON3 auf die Superoxid-Freisetzung aus Mitochondrien untersucht. Dazu wurden naive oder PON3-überexprimierende HEK293-Zellen (oder PON2-überexprimierende als Vergleich) mit dem Dihydroethidiumderivat Mito-HE gefärbt, welches spezifisch die mitochondriale Superoxid-Produktion detektiert (siehe 4.1.8). Zum einen wurden die Zellen mit dem Komplex-III-Inhibitor Antimycin A behandelt, welcher eine Superoxid-Freisetzung auf beiden Seiten der inneren mitochondrialen Membran verursacht. Zum anderen wurden sie mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon behandelt, welcher nur zu einer Superoxid-Freisetzung auf der Matrixseite führt. Die anschließenden FACS-Analysen zeigten, dass in den PON3-überexprimierenden Zellen ähnlich zu PON2 signifikant weniger mitochondriales Superoxid akkumulierte als in naiven Zellen (Abbildung 5-5).

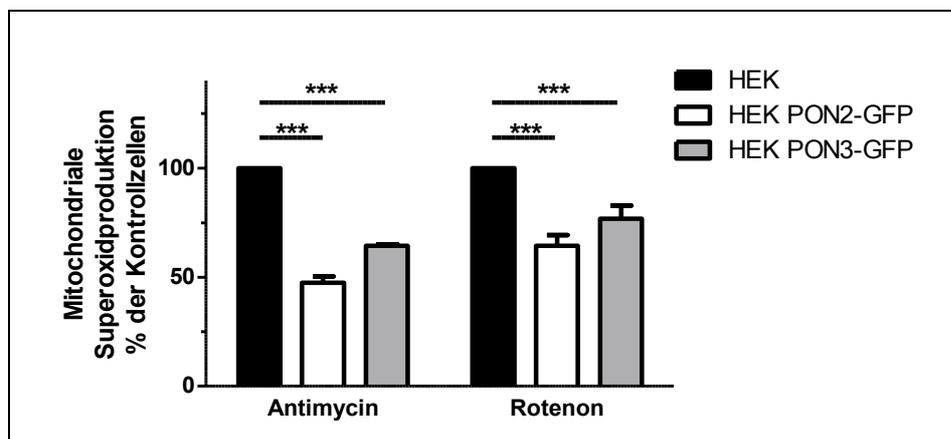


Abbildung 5-5: PON3 vermindert die mitochondriale Superoxid-Bildung. Die genannten Zellen wurden mit Mito-HE (2 μ M) beladen und mit Antimycin A (15 μ M) oder Rotenon (20 μ M) für zwei Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert (Ex / Em 405 / 580 nm). Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten (nicht gezeigt) normalisiert und die Anzahl an naiven, Mito-HE positiven HEK293-Zellen als 100% dargestellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten, in welchen jeweils 10.000 Zellen gemessen wurden (Mittelwert \pm SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.1.4 PON3 schützt vor dem intrinsischen Zelltod

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung des intrinsischen Zelltodes, indem sie Cytochrom c (Cyt c) freisetzen. Dabei wird die Freisetzung von Cyt c durch Cardiolipin kontrolliert, wobei eine verstärkte Superoxid-Bildung zu dessen Peroxidation. Als Konsequenz kann das peroxidierte Cardiolipin Cyt c nicht mehr in der inneren mitochondrialen Membran binden, wodurch dieses durch eine von Bax / Bak gebildete permeable Pore freigesetzt wird. Diese Zerstörung der mitochondrialen Membran führt zu einem Verlust des Membranpotentials. Aufgrund dessen wurde getestet, ob PON3 vor einer Cyt-c-Freisetzung, Cardiolipin-Peroxidation und einem Verlust des Membranpotentials nach Staurosporin-Behandlung schützen kann (siehe 4.1.9). Der PKC-Inhibitor Staurosporin stimuliert den intrinsischen Apoptose-Signalweg und führt bekannterweise zur Generierung von mitochondrialem Superoxid während der Apoptose. Abbildung 5-6a zeigt, dass die Cytochrom-c-Freisetzung deutlich durch die PON3-Überexpression in EA.hy 962-Zellen verringert werden kann. In Übereinstimmung dazu zeigten die naiven Zellen eine starke Cardiolipin-Peroxidation, während diese durch die PON3-Überexpression verhindert werden kann (Abbildung 5-6b). Dementsprechend konnte die PON3-Überexpression auch vor dem Verlust des Membranpotentials schützen (Abbildung 5-6c und Abbildung 5-7). Zusätzlich zeigt Abbildung 5-7, dass das mitochondriale Netzwerk durch die PON3-Überexpression erhalten bleibt, während es in den naiven Zellen deutlich zerstört wurde.

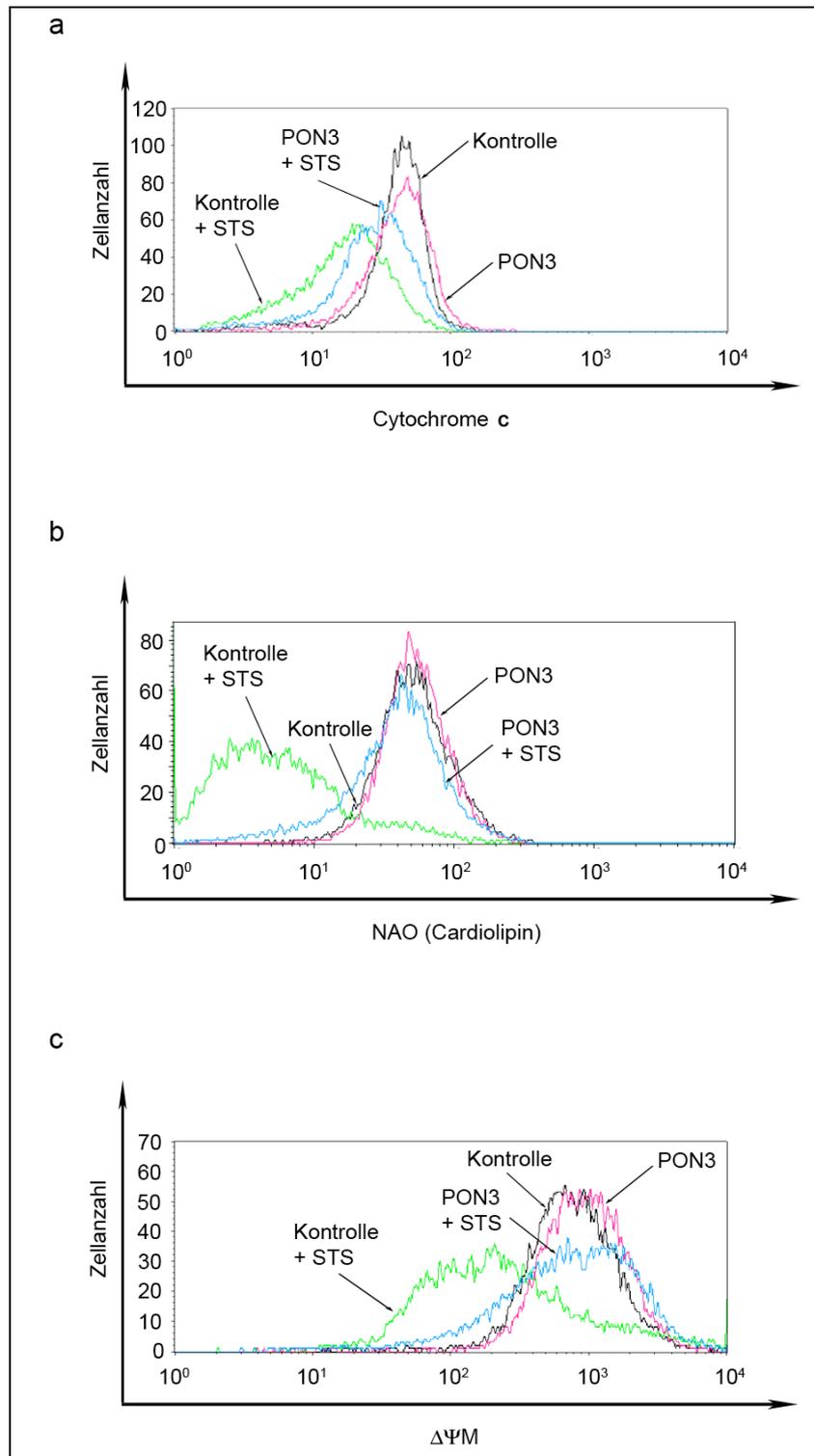


Abbildung 5-6: Eine PON3-Überexpression vermindert die Cytochrom-c-Freisetzung, die Cardiolipin-Peroxidation und den Verlust der mitochondrialen Integrität. (a)-(c) Naive oder PON3-DsRed überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 16 h mit Staurosporin (STS, 1 μM in a und b, bzw. 0,3 μM in c) behandelt. Anschließend wurde die Cytochrom-c-Freisetzung nach Immunfärbung (a), die Cardiolipin-Peroxidation nach NAO-Färbung (b) oder das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi M$) nach DIOC₆-Färbung (c) mittels FACS analysiert. Eine Linksverschiebung des Peaks spiegelt eine verstärkte Cytochrom-c-Freisetzung (a), eine Cardiolipin-Peroxidation (b) bzw. ein Verlust in der Membranintegrität der Mitochondrien (c) wider. Diese Verschiebung kann in naiven (grün vgl. mit schwarz), jedoch kaum in PON3-überexprimierenden Zellen (blau vgl. mit rot) beobachtet werden. Die Abbildungen repräsentieren jeweils einen von drei unabhängigen Versuchen.

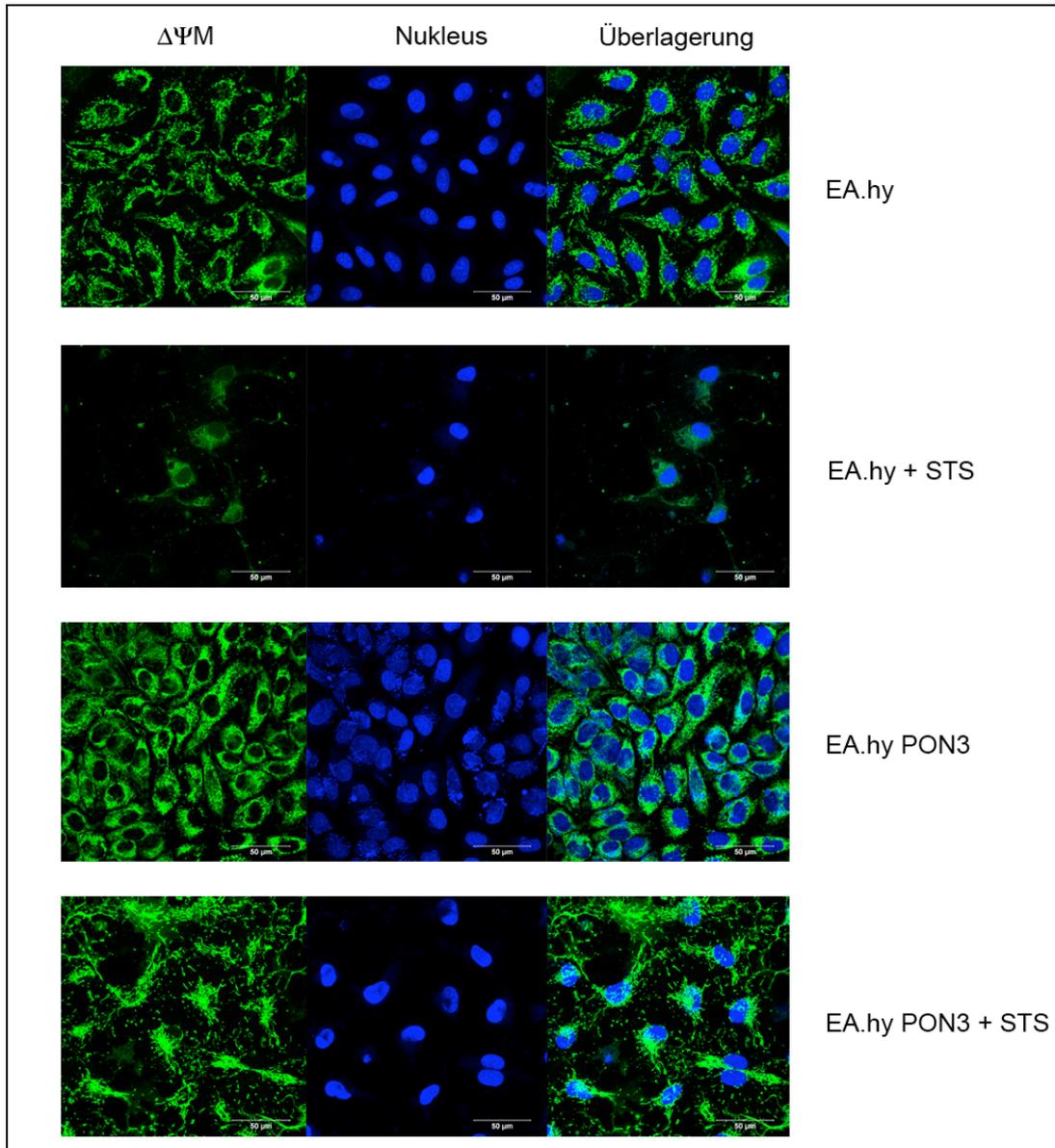


Abbildung 5-7: Eine PON3-Überexpression vermindert den Verlust der mitochondrialen Integrität und des mitochondrialen Netzwerkes. Naive oder PON3-DsRed überexprimierende lebende EA.hy 926-Zellen wurden für 24 h mit Staurosporin (STS, 0,3 μM) behandelt. Anschließend wurde das mitochondriale Membranpotential (DIOC_6 , $\Delta\Psi_M$ in grün dargestellt) sichtbar gemacht und unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Eine Abnahme im DIOC_6 -Signal reflektiert den Verlust des Membranpotentials. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt (in blau dargestellt). Skalierung = 50 μm .

Um zu prüfen, ob PON3 gegen die intrinsische Apoptose schützt, wurden PON3-überexprimierende EA.hy 926-Zellen mit Staurosporin behandelt und mittels FACS-Analysen auf die Apoptosemarker Annexin-V und 7-AAD untersucht (siehe 4.1.9). Hierbei kann man zwischen gesunden (ungefärbt), früh-apoptotischen (Annexin-V-gefärbt) und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen (doppelgefärbt) differenzieren. Diese Unterscheidung ist möglich, da Annexin-V schon an die Oberfläche von früh-apoptotischen

Zellen bindet, hingegen 7-AAD erst durch bereits permeabilisierte Zellmembranen in die Zellen gelangen kann. In naiven EA.hy 926-Zellen führte die Staurosporin-Behandlung zu einem starken Anstieg in der Zahl der früh-apoptotischen Zellen (Abbildung 5-8a). Die prozentuale Auswertung der apoptotischen Zellen zeigt einen Anstieg der Apoptose in naiven oder GFP-überexprimierenden Zellen auf über 60% (Abbildung 5-8b). GFP-überexprimierende Zellen wurden als zusätzliche Kontrolle verwendet, um einen Einfluss des GFP-tags auf die Apoptose auszuschließen. In Zellen, welche PON3 (oder PON2 als Vergleich) überexprimierten, war die Zunahme an Annexin-V-gefärbten Zellen deutlich geringer und der Anteil an apoptotischen Zellen betrug nur etwa die Hälfte verglichen mit den naiven Zellen (~30%, Abbildung 5-8a und b).

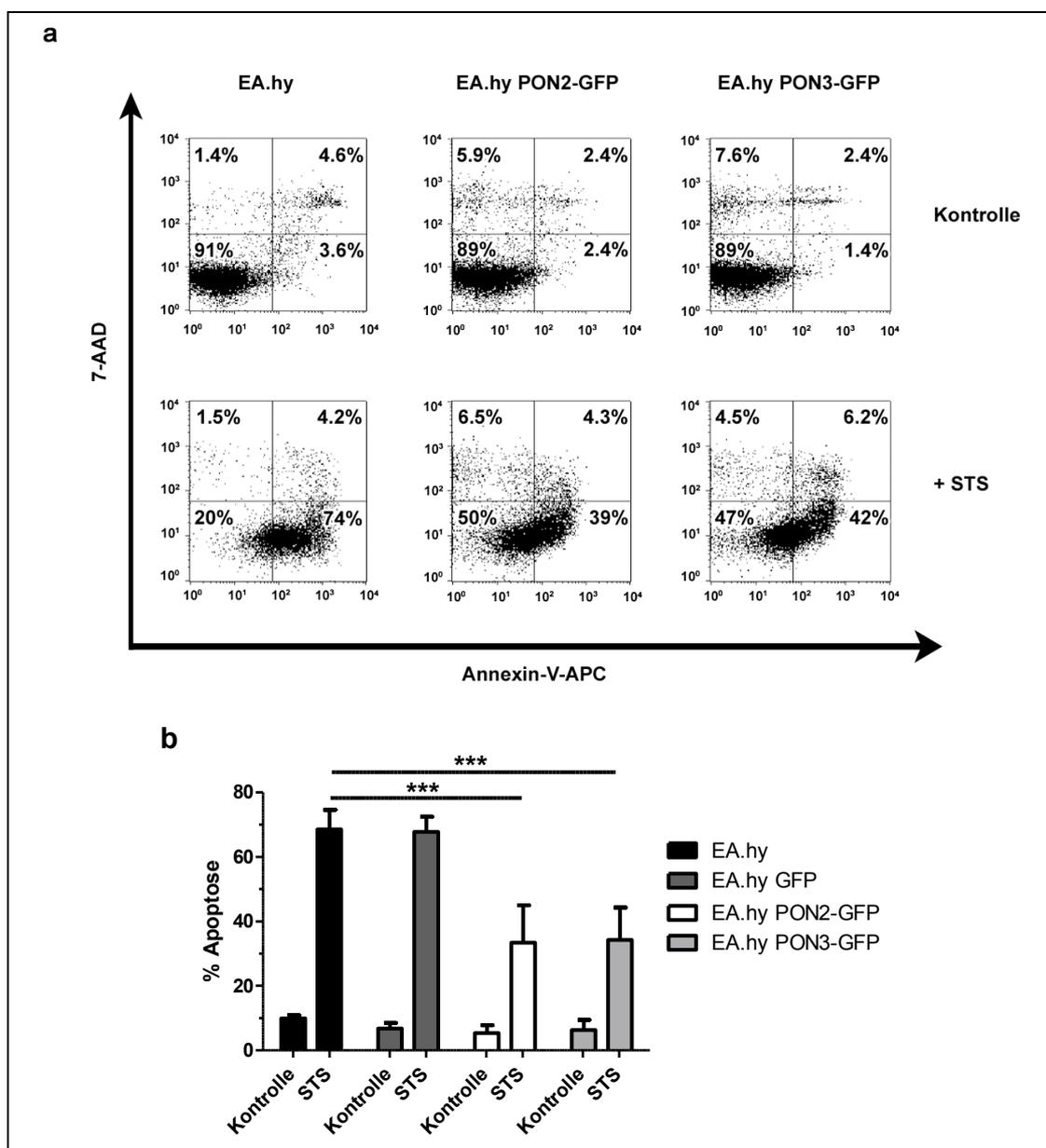


Abbildung 5-8: Die PON3-Überexpression kann in EA.hy 926-Zellen die intrinsische Apoptose vermindern. (a) Die genannten Zellen wurden für 16 h mit Staurosporin (STS, 1 μ M) behandelt, mit Annexin-V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels FACS gemessen. Der prozentuale Anteil an ungefärbten Zellen nach STS-Behandlung ist in den PON2-GFP bzw. PON3-GFP überexprimierenden Zellen verglichen mit den naiven EA.hy 926-Zellen höher. Dies indiziert einen verminderten Zelltod. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen, welche in (b) zusammengefasst sind. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde aus der Summe der früh-apoptotischen (Annexin-V-APC gefärbten) und der spät-apoptotischen bzw. nekrotischen (Annexin-V-APC und 7-AAD doppelgefärbten) Zellen berechnet (Mittelwert \pm SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

Darüber hinaus wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach Staurosporin-Behandlung in HEK293-Zellen gemessen, welcher in den naiven Zellen aufgrund des vermehrten Zelltodes verglichen zur Kontrolle um etwa 50% sinkt (Abbildung 5-9). In PON3-überexprimierenden Zellen (bzw. PON2 als Vergleich) war der ATP-Gehalt signifikant höher als in den naiven Zellen, was den Schutz von PON3 gegenüber der von Staurosporin ausgelösten Apoptose belegt.

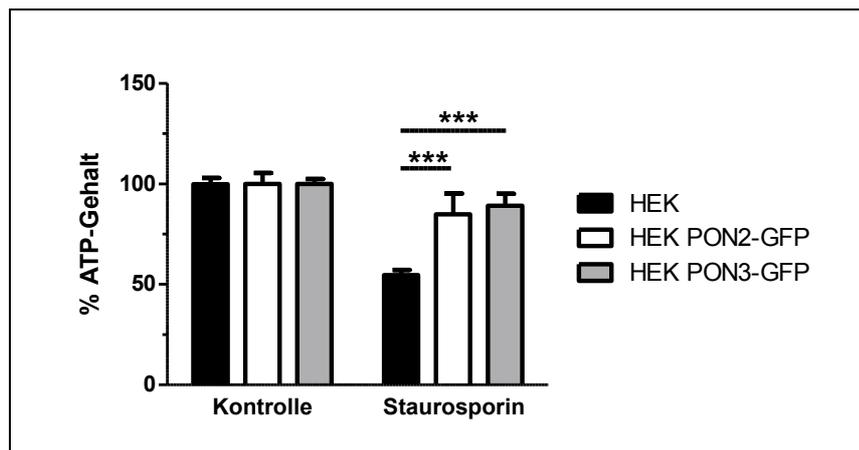


Abbildung 5-9: Die PON3-Überexpression kann in HEK293-Zellen den Zelltod vermindern. Die genannten Zellen wurden für 48 h mit Staurosporin (5 μ M) behandelt und auf ihren ATP-Gehalt untersucht siehe (4.1.10), welcher als Maß für die Zellviabilität diente. Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Insgesamt zeigt der Graph die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimente in Doppelwerten (Mittelwert \pm SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.1.5 PON3 schützt vor ER-Stress-induzierter Apoptose

Als Modulator für die Stressantwort und für das Überleben der Zelle kommt dem ER-Stress-Signalweg eine wichtige Rolle bei Krebs- und inflammatorischen Prozessen zu. Da PON3 in den vorherigen Analysen auch im ER gefunden wurde, wurde im Folgenden analysiert, inwieweit PON3 die ER-Stress-induzierte CHOP-Expression beeinflusst. Bei CHOP handelt es sich um einen entscheidenden Mediator zwischen dem Gleichgewicht von Zellüberleben und -tod³⁰. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen mit Tunicamycin behandelt, welches den UPR-Stresssignalweg aktiviert und zur ER-Stress-induzierten Apoptose führt. Die qRT-PCR-Analyse zeigt, dass signifikant weniger CHOP-mRNA in PON3-überexprimierenden Zellen (bzw. PON2 als Vergleich) durch Tunicamycin induziert wurde als in naiven Zellen (Abbildung 5-10a). In Übereinstimmung mit dem zugrundeliegenden Mechanismus, nach welchem pro-apoptotisches CHOP durch die Kinase JNK aktiviert wird, wurde ein Schutz durch eine PON3-Überexpression auf die JNK-Aktivierung nach Tunicamycin-Behandlung festgestellt (Abbildung 5-10b). Da PON3 sowohl die UPR-vermittelte JNK-Aktivierung als auch die Expression von pro-apoptotischem CHOP abschwächt, liegt es Nahe, dass sie auch vor Tunicamycin-induzierter Apoptose schützen könnte. Tatsächlich führt eine Überexpression von PON3 (bzw. PON2 als Vergleich) in EA.hy 926-Zellen zu einem deutlichen Schutz vor der Caspase-3/7-Aktivierung (siehe 4.1.10, Abbildung 5-10c). Bereits niedrige Tunicamycin-Konzentrationen (1 µg/µl) können die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials, ROS, Calcium-Anstieg, GRP79, XBP1-Splicing und den Zelltod von Endothelzellen induzieren¹²³. Interessanterweise konnte die Verminderung des Zelltodes auch noch bei 10-fach höheren Tunicamycin-Konzentrationen beobachtet werden.

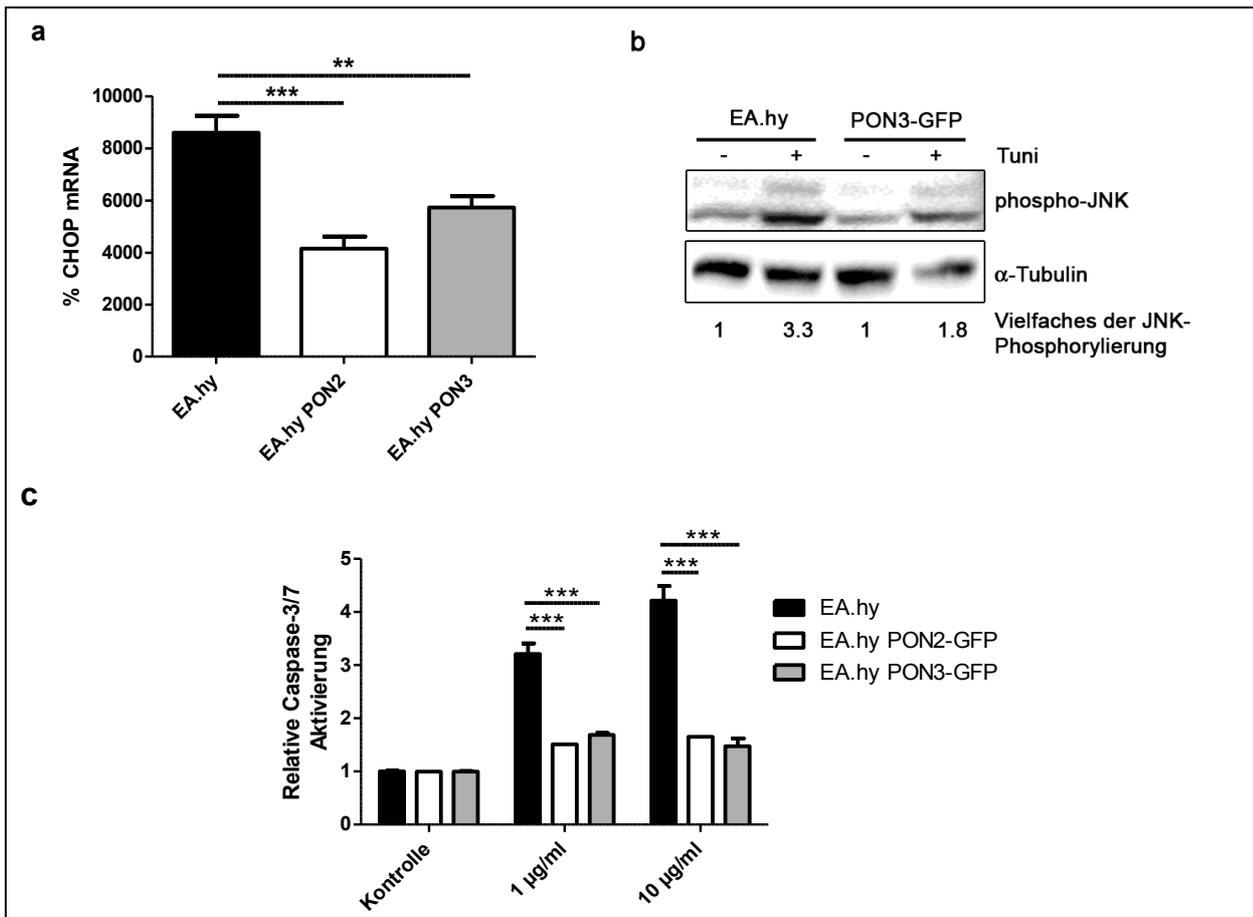


Abbildung 5-10: Eine PON3-Überexpression vermindert pro-apoptisches CHOP, JNK-Aktivierung und schützt vor ER-Stress-induzierter Apoptose. (a) Die genannten Zellen wurden für 16 h mit Tunicamycin (1 µg/ml) behandelt und danach auf ihre CHOP-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten (nicht gezeigt) normalisiert. Der Graph zeigt die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM; **: p<0,01; ***: p<0,001; 1-way-ANOVA) **(b)** Naive und PON3-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 30 min mit Tunicamycin (Tuni, 1 µg/ml) behandelt und auf ihre JNK-Phosphorylierung als Maß für die Aktivierung mittels Western Blot untersucht. Die Banden wurden mittels *QuantityOne* quantifiziert und die Intensitäten auf die jeweilige Ladekontrolle (α-Tubulin) und auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. **(c)** Die genannten Zellen wurden für 24 h mit Tunicamycin in den angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend auf ihre Caspase-3/7-Aktivität untersucht. Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM; ***: p<0,001; 2-way-ANOVA).

Es ist bekannt, dass JNK über die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden kann. Eventuell könnte PON3 ihren Schutz vor der JNK-Aktivierung über eine Inhibierung der PKC vermitteln. Daher wurden die Zellen mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin oder mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt und mittels Western Blot analysiert, inwieweit die PON3-Überexpression die JNK-Aktivierung beeinflusst. Erwartungsgemäß müsste eine Inhibition der PKC zur verminderten JNK-Aktivierung führen. Dennoch könnte Staurosporin über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zur JNK-Aktivierung führen,

welche wiederum durch die anti-oxidative Eigenschaft von PON3 abgeschwächt werden könnte. Abbildung 5-11 zeigt jedoch, dass Staurosporin zur Inaktivierung von JNK führt und die PON3-Überexpression nichts an der Staurosporin-vermittelten JNK-Dephosphorylierung ändert. Des Weiteren kann die PON3-Überexpression nicht vor einer PMA-induzierten JNK-Aktivierung schützen. Der Effekt von PON3 auf JNK scheint demnach spezifisch für den Tunicamycin-induzierten UPR-Signalweg zu sein und PON3 moduliert die PKC-vermittelte JNK-Phosphorylierung in Gegenwart von STS oder PMA nicht. Zudem zeigt dies, dass der Schutz von PON3 gegen STS (siehe oben) nicht über JNK, sondern vermutlich durch einen direkten mitochondrialen Effekt vermittelt wird.

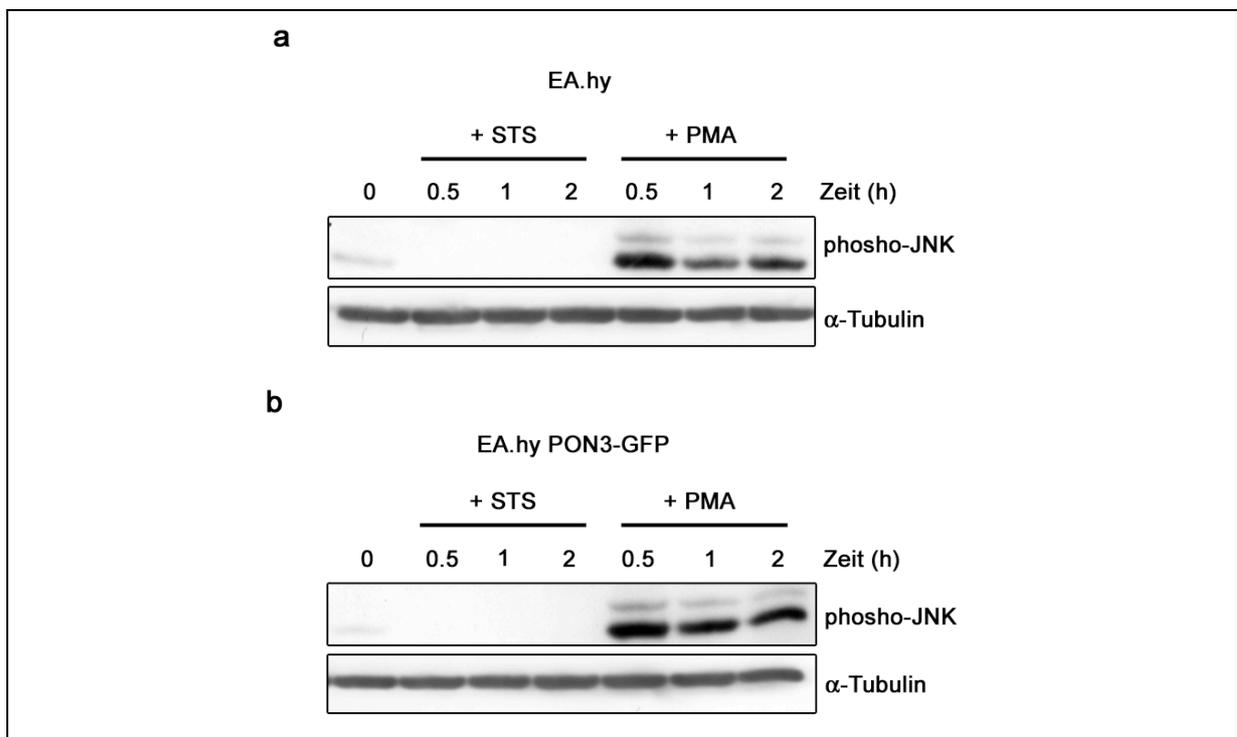


Abbildung 5-11: Die PON3-Überexpression schützt nicht gegen PMA-induzierte JNK-Aktivierung, während Staurosporin JNK inaktiviert. Naive (links) oder PON3-GFP überexprimierende (rechts) EA.hy 926-Zellen wurden mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin (STS, 0,3 μ M) oder mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 100 nM) für die angegebene Zeitdauer behandelt. Die Zellysate wurden mittels Western Blot mit Antikörpern gegen phospho-JNK und α -Tubulin analysiert. Es wurde ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen abgebildet.

5.1.6 Eine PON3-Überexpression kann nicht vor der extrinsischen Apoptose schützen

Vorherige Studien konnten zeigen, dass PON2 nicht in der Lage ist, die extrinsische Apoptose zu beeinflussen¹⁰². Ähnlich dazu konnte auch hier gezeigt werden, dass PON3 die Liganden-stimulierte extrinsische Apoptose in EA.hy 926-Zellen nicht verhindern kann.

Abbildung 5-12a gibt einen Überblick darüber, wie die gleichzeitige Behandlung mit TNF- α und Actinomycin D (Act D) zur Aktivierung der extrinsischen Apoptose führt. PON3 (bzw. PON2 als Vergleich) kann die Zelle nicht vor der Caspase-3/7-Aktivierung durch TNF- α und Act D schützen (Abbildung 5-12b). Im Gegensatz hierzu war die Caspase-3/7-Aktivierung nach alleiniger Act-D-Behandlung oder nach Staurosporin deutlich vermindert.

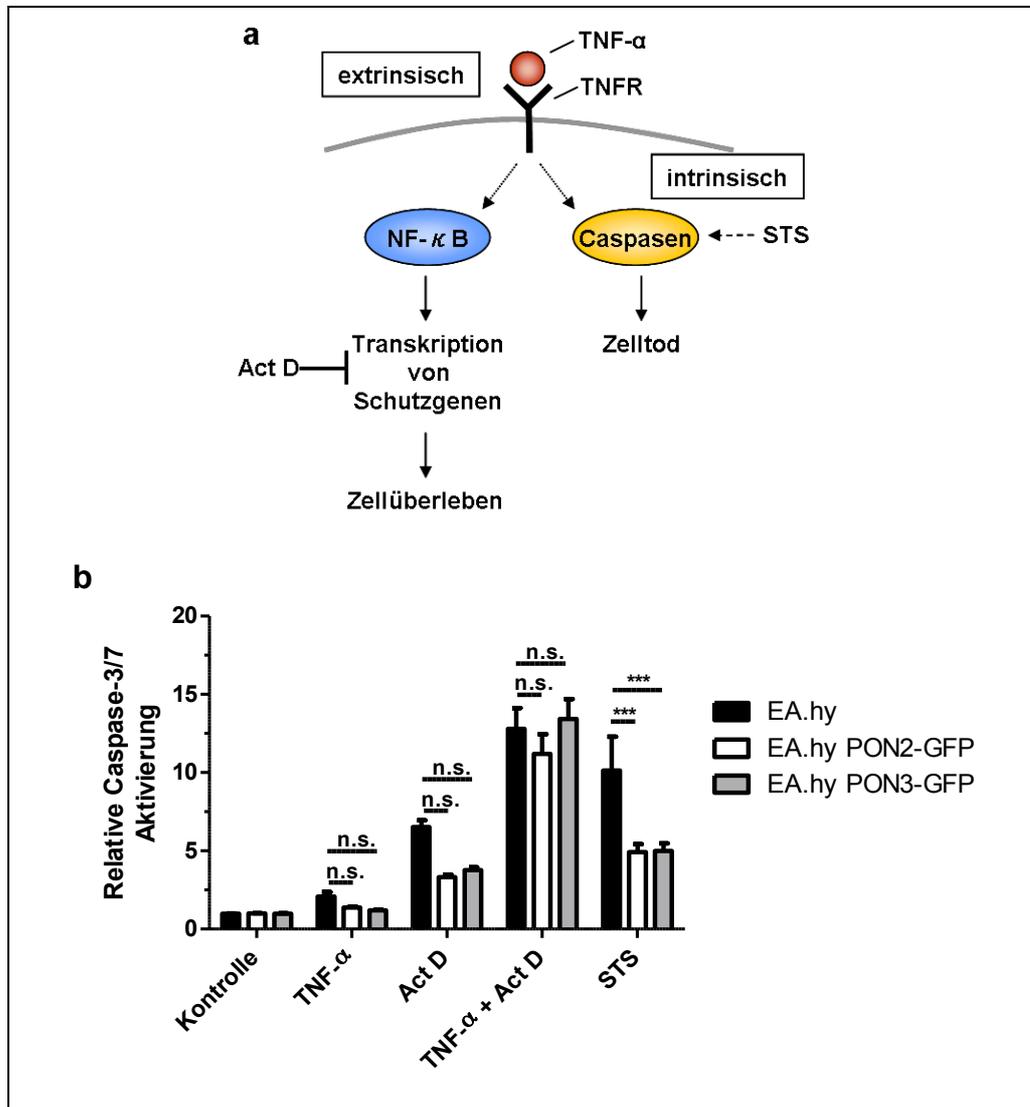


Abbildung 5-12: Eine PON3-Überexpression kann nicht vor der Liganden-induzierten extrinsischen Apoptose schützen. (a) Schematische Darstellung zur Liganden-induzierten extrinsischen Apoptose: TNF- α aktiviert über seine Bindung an den TNF-Rezeptor (TNFR) die parallelen Signalwege zum Zellüberleben und Zelltod. Actinomycin D (Act D) blockiert die RNA-Synthese und damit die Expression der Gene, die zum Zellüberleben benötigt werden, wodurch das Gleichgewicht auf die Seite der Caspase-Aktivierung bzw. des Zelltodes verschoben wird. Staurosporin (STS) induziert den intrinsischen Apoptoseweg. (b) PON3 verändert die Liganden-induzierte Caspase-3/7-Aktivierung nicht. Die genannten Zellen wurden für 16 h mit TNF- α (200 U), Actinomycin D (Act D, 1 μ g/ml) oder beidem, oder mit Staurosporin (STS, 1 μ M) behandelt und auf ihre Caspase-3/7-Aktivität untersucht. Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.1.7 PON3 vermindert die DNA-Schäden-induzierte Apoptose

Bekannterweise können DNA-Schäden zur Apoptose führen, welche in der Regel über die Mitochondrien vermittelt wird. Demnach könnte PON3 durch ihre anti-oxidative Eigenschaft vor DNA-Schäden-induzierter Apoptose schützen. In FACS-Analysen (Annexin-V / 7-AAD) von EA.hy 926-Zellen nach Behandlung mit der DNA-schädigenden Substanz Cisplatin konnte eine PON3-Überexpression die Rate an apoptotischen Zellen gegenüber naiver Zellen signifikant verringern (Abbildung 5-13a und b).

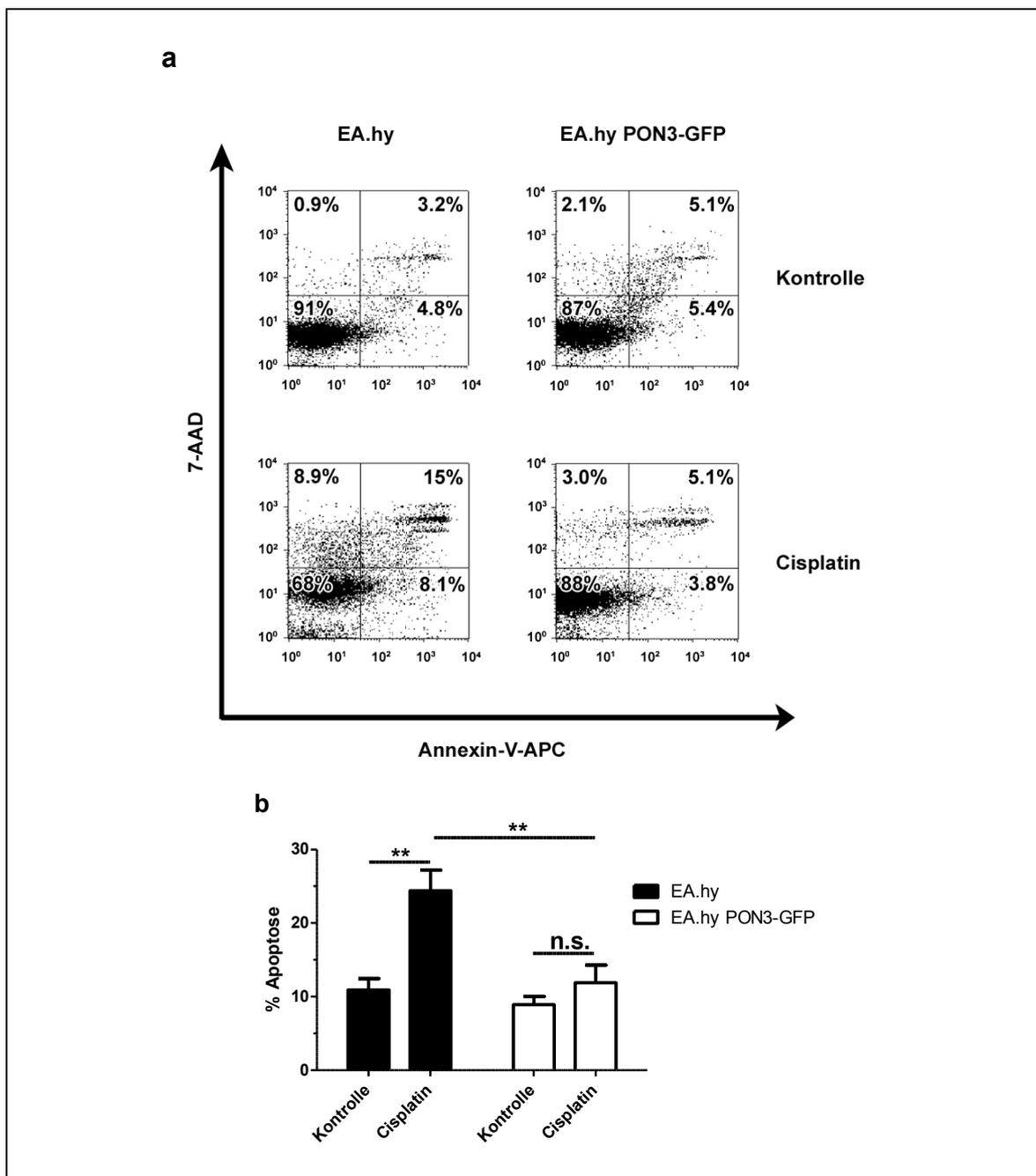


Abbildung 5-13: Eine PON3-Überexpression schützt vor DNA-Schäden-induzierter Apoptose. (a) Naive oder PON3-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 72 h mit Cisplatin (4 µg/ml) behandelt, mit Annexin-V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels FACS gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, welche in (b) zusammengefasst sind. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde aus der Summe der früh-apoptotischen (Annexin-V-APC gefärbten) und der spät-apoptotischen bzw. nekrotischen (Annexin-V-APC und 7-AAD doppelgefärbten) Zellen berechnet (Mittelwert ± SEM; n.s.: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; 2-way-ANOVA).

5.1.8 Der *knock-down* von PON3 verursacht keine spontane Apoptose

Da eine PON3-Hochregulierung die Zelle vor der Apoptose schützen kann, wurde im Folgenden getestet, ob eine PON3-Defizienz im Umkehrschluss zu einem besseren Ansprechen auf Chemotherapeutika führen kann. Darüber hinaus wurde untersucht, ob alleine der PON3-*knock-down* Zelltod verursachen kann. Hierfür wurde PON3 in A549- oder HepG2-Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) herunterreguliert und der Zelltod nach drei Tagen im FACS analysiert (siehe 4.1.6 und 4.1.9). Die PON3-Defizienz verursachte keine spontane Apoptose in beiden Zelllinien. Dies zeigte sich dadurch, dass kein signifikanter Unterschied in der Apoptose zwischen Zellen, die mit siRNA gegen PON3 oder unspezifischer Kontroll-siRNA behandelt wurden, zu beobachten war (Abbildung 5-14a und b bzw. Abbildung 5-15a und b). Des Weiteren erhöhte der PON3-*knock-down* die Empfindlichkeit für das Chemotherapeutikum Staurosporin in A549-Zellen nicht (Abbildung 5-14a und b). Der effiziente *knock-down* von PON3 zeigt sich in einem mit denselben Zellen parallel durchgeführten Western Blot (Abbildung 5-14c). Darüber hinaus wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach dem RNAi-vermittelten *knock-down* und nach gleichzeitiger Behandlung mit Staurosporin bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass die PON3-Herunterregulation den ATP-Gehalt nicht veränderte und den Staurosporin-induzierten Zelltod nicht verstärkte (Abbildung 5-16). Darauf wurden als weitere PON3-exprimierende Zelllinie Caco-2-Zellen mit den Chemotherapeutika Cisplatin oder 5-Fluorouracil (5-FU) behandelt, welche beide DNA-Schäden und damit Zelltod verursachen. Abbildung 5-17 zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Rate lebender zu toter Zellen zwischen mit PON3-siRNA und Kontroll-siRNA behandelten Caco-2 Zellen. Die Behandlung mit Cisplatin oder 5-FU führte erwartungsgemäß zu einer Zunahme an toten Zellen, jedoch konnte kein vermehrtes Zellsterben durch den PON3-*knock-down* beobachtet werden (Abbildung 5-17). Folglich hatte der *knock-down* von PON3 in keiner der bisher bekannten PON3-exprimierenden Zelllinien aus soliden Tumoren der Lunge (A549), Leber (HepG2) und Kolon (Caco-2) einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und löste auch keine spontane Apoptose aus. Über die einzige aus dieser Arbeit bekannte PON3-exprimierende Leukämiezelllinie KCl kann keine Aussage getroffen werden, da kein ausreichender PON3-*knock-down* erzielt werden konnte (nicht gezeigt).

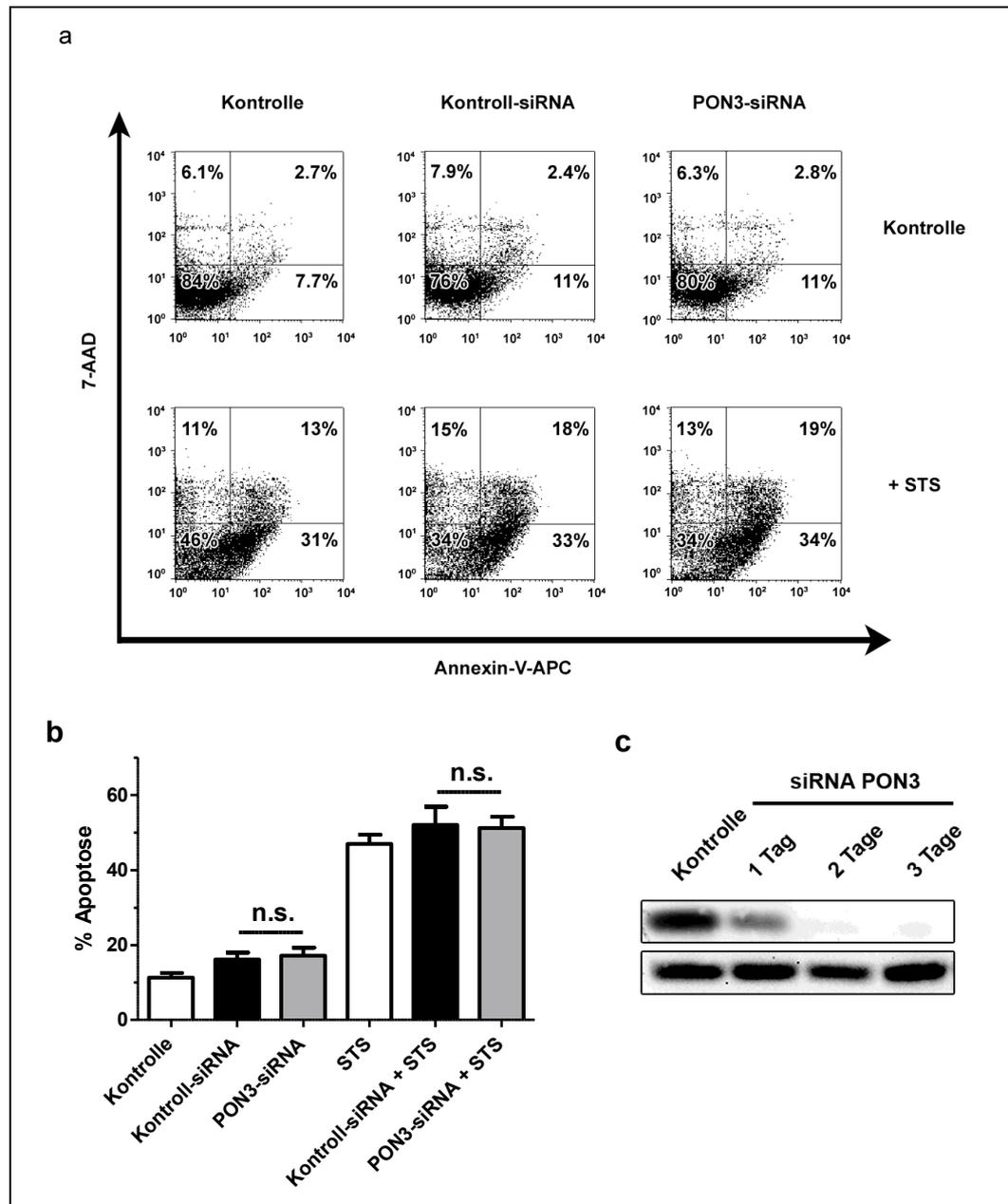


Abbildung 5-14: Eine PON3-Defizienz verursacht weder einen spontanen Zelltod noch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika in A549-Zellen. (a) A549-Zellen wurden mit siRNA gegen PON3 und unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Staurosporin (STS, 1 μ M) behandelt. Nach insgesamt drei Tagen wurden die Zellen mit Annexin-V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels FACS gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Versuchen, welche in **(b)** zusammengefasst sind. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde aus der Summe der früh-apoptotischen (Annexin-V-APC gefärbten) und der spät-apoptotischen bzw. nekrotischen (Annexin-V-APC und 7-AAD doppelgefärbten) Zellen berechnet (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA). **(c)** A549-Zellen wurden mit siRNA gegen PON3 transfiziert und nach 1-3 Tagen lysiert. Die Zelllysate (je 30 μ g Protein) wurden mittels Western Blot mit Antikörpern gegen PON3 und α -Tubulin analysiert.

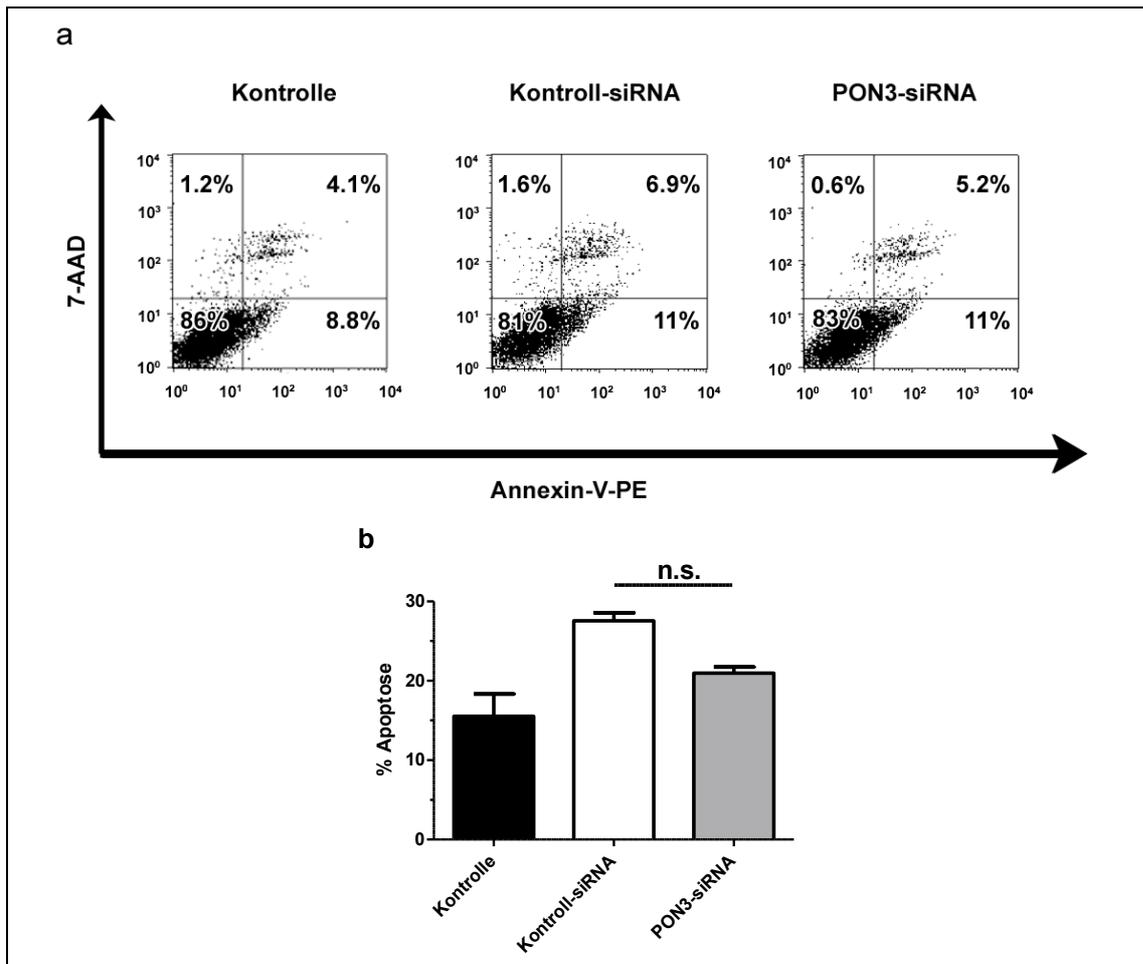


Abbildung 5-15: Eine PON3-Defizienz verursacht keinen spontanen Zelltod in HepG2-Zellen. (a) HepG2-Zellen wurden für drei Tage mit siRNA gegen PON3 und unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert, mit Annexin-V-PE und 7-AAD gefärbt und mittels FACS gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, welche in **(b)** zusammengefasst sind. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde aus der Summe der früh-apoptotischen (Annexin-V-APC gefärbten) und der spät-apoptotischen bzw. nekrotischen (Annexin-V-APC und 7-AAD doppelgefärbten) Zellen berechnet (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA).

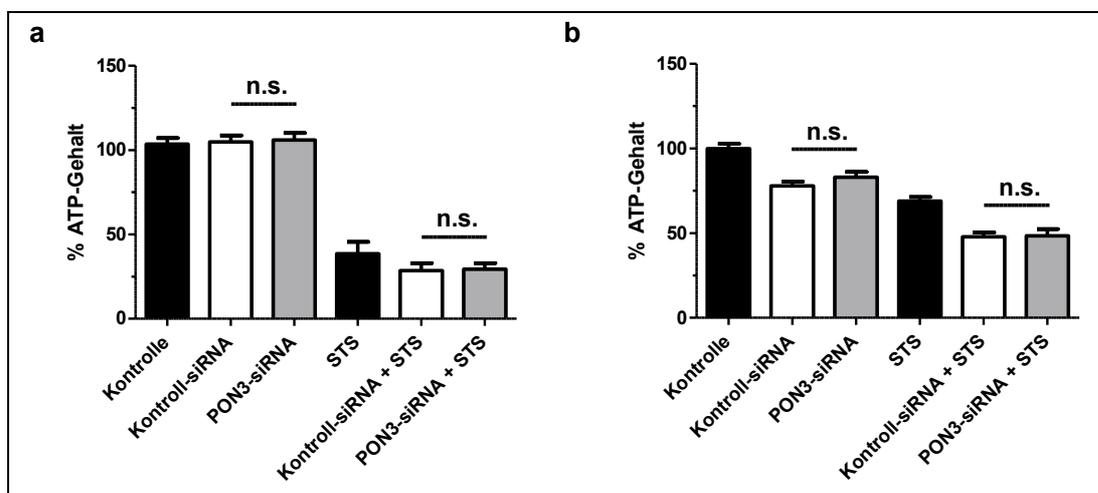


Abbildung 5-16: Eine PON3-Defizienz verursacht weder einen spontanen Zelltod noch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika in A549- oder HepG2-Zellen. (a) A549-Zellen oder (b) HepG2-Zellen wurden mit siRNA gegen PON3 oder unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Staurosporin (STS, 1 μ M) behandelt. Nach insgesamt drei Tagen wurden die Zellen auf ihren ATP-Gehalt untersucht, welcher als Maß für die Zellviabilität diente. Für die Darstellung wurde der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrolle als 100% gesetzt und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen je eine Zusammenfassung von mindestens drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA).

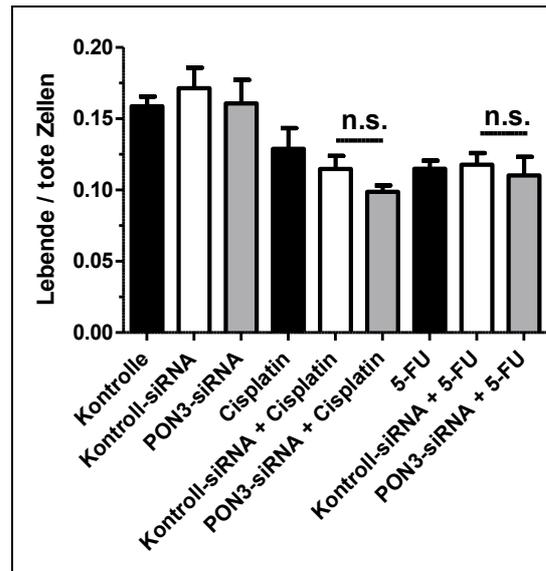


Abbildung 5-17: Eine PON3-Defizienz verursacht weder einen spontanen Zelltod noch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika in Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden mit siRNA gegen PON3 oder unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Cisplatin (4 μ g/ml) oder 5-Fluorouracil (5-FU, 100 μ M) behandelt. Nach insgesamt drei Tagen wurden die lebenden und toten Zellen mit Hilfe des *CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assays* (siehe 4.1.10) quantifiziert und als Quotient dargestellt. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von fünf unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA).

5.2 PON2 und PON3 agieren als Schutzenzyme gegen Pyocyanin-induzierten oxidativen Stress und Inflammation

Pyocyanin (PCN) spielt *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der Infektion mit *P. aeruginosa*, da es ein von diesen Bakterien sekretierter, redox-aktiver Metabolit ist, welcher oxidativen Stress verursacht und das Lungenepithel gravierend schädigt^{77, 79}. Darüber hinaus verursacht PCN Schäden in den Epithelzellen unter anderem durch die Sekretion von IL-8, was zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort und zum Zelltod führen kann¹²⁴. Vorherige Studien der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass PON2 die durch PCN verursachte ROS-Produktion in Epithelzellen vermindern kann¹¹¹. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen PON2 und PON3 und dem oben beschriebenen antioxidativen Effekt von PON3 wurde vermutet, dass PON3 ebenfalls vor PCN-induzierter ROS-Bildung schützen könnte.

5.2.1 PON3 schützt die Zellen vor PCN-induziertem ROS

Um eine Verminderung der PCN-induzierten ROS-Produktion durch PON3 zu prüfen, wurden naive oder PON3-überexprimierende HEK293-Zellen mit dem fluoreszierenden ROS-Indikator carboxy-H₂DCFDA beladen und anschließend mit PCN stimuliert (siehe 4.1.7). PON2-überexprimierende Zellen wurden als Vergleich verwendet. Die PON3-GFP-Überexpression führte ebenso wie die von PON2-GFP zu einer signifikant verringerten ROS-Produktion in Antwort auf die PCN-Stimulation (Abbildung 5-18a). Um eine mögliche direkte Oxidation von carboxy-H₂DCFDA durch PCN, einen ungewollten Effekt durch das GFP-*tag* oder einen HEK293-spezifischen Effekt auszuschließen, wurden in einem alternativen Ansatz sowohl das detektierende Reagenz als auch das *tag* und die Zelllinie ausgetauscht. Hierzu wurde die ROS-Produktion mit Hilfe des Luminolderivats L-012 in EA.hy 926-Zellen gemessen; zusätzlich wurde PON3 als GFP- und als DsRed-Fusionsprotein überexprimiert. Ähnlich wie in PON3-GFP-überexprimierenden HEK293-Zellen wiesen die PON3-GFP- und PON3-DsRed-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen eine signifikant reduzierte ROS-Produktion nach PCN-Behandlung auf (Abbildung 5-18b).

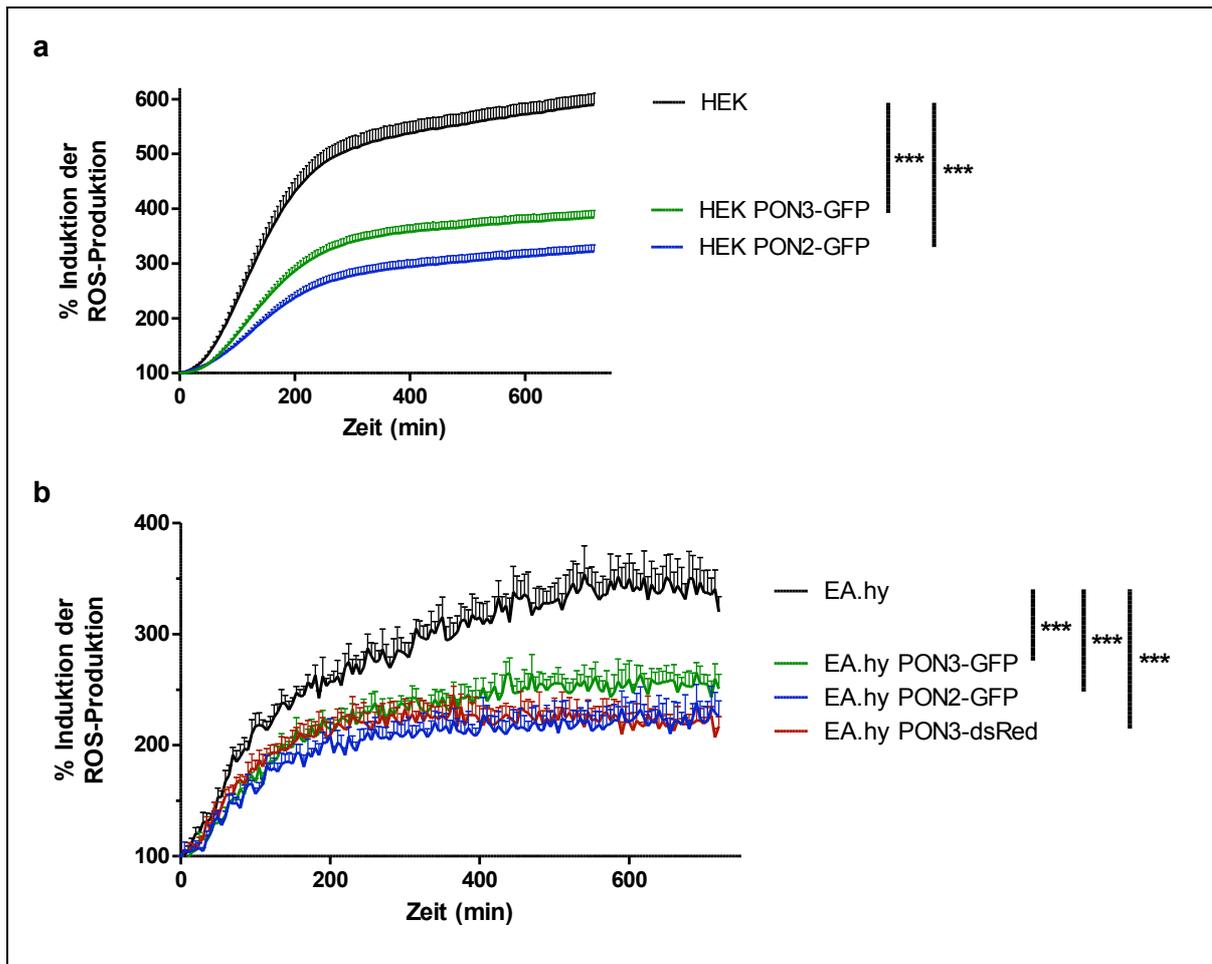


Abbildung 5-18: Eine PON2- oder PON3-Überexpression vermindert die ROS-Produktion, welche durch das *P. aeruginosa* Signalmolekül Pyocyanin (PCN) induziert wird. (a) Die genannten Zellen wurden mit carboxy-H₂DCFDA beladen und mit PCN (2,4 µM) stimuliert. Der Anstieg in der carboxy-H₂DCFDA-Fluoreszenz als Maß für die ROS-Produktion wurde über 12 h hinweg aufgenommen. **(b)** Die genannten Zellen wurden mit L-012 beladen und mit PCN (2,4 µM) stimuliert. Der Anstieg im L-012-Chemilumineszenzsignal als Maß für die ROS-Produktion wurde über 12 h hinweg aufgenommen. Die Grafiken zeigen ein repräsentatives Ergebnis für je drei unabhängige Experimente als prozentuale Steigerung der gemittelten Signal-Intensität aus Vierfach-Werten über die Zeit (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.2.2 PON2 und PON3 schützen die Zellen vor der PCN-induzierten inflammatorischen Antwort

PCN führt über die ROS-Induktion zu einer inflammatorischen Antwort, indem es die Sekretion von Interleukinen verursacht. Diese könnte durch die Aktivierung von NF- κ B ausgelöst werden^{77, 124}. Um die anti-inflammatorischen Eigenschaften von PON2 und PON3 zu testen, wurde zunächst die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in Lungenepithelzellen (A549) nach PCN-Behandlung untersucht. Unter Verwendung von Genreporter-Analysen wurde die A549-Zellen mit den folgenden drei Plasmiden ko-transfiziert: 1. Mit einem NF- κ B-*firefly*-Luciferase-Reporterplasmid, 2. mit einem *Renilla*-Luciferase-Expressionsplasmid zur

Normalisierung und 3. mit einem PON2- bzw. PON3-Expressionsplasmid. Die Kontrollen erhielten dabei die gleichen Vektoren aber ohne PON2- bzw. PON3-*insert*. In A549-Kontrollzellen ohne PON2- bzw. PON3-Überexpression führte die PCN Stimulation zu einer 4- bis 6-fachen Erhöhung der NF- κ B-Aktivität (Abbildung 5-19). Im Gegensatz hierzu verursachte sowohl die PON2- als auch die PON3-Überexpression eine deutliche Verminderung in der Aktivierung dieses wichtigen Signalweges, der maßgeblich an der inflammatorischen Antwort beteiligt ist.

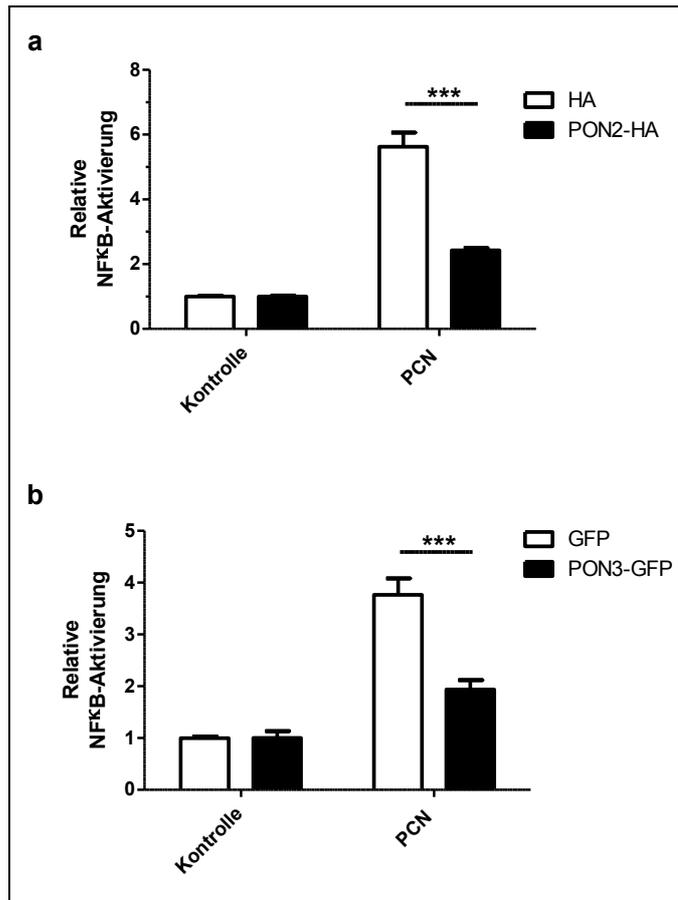


Abbildung 5-19: Eine PON2- oder PON3-Überexpression vermindert die NK- κ B-Aktivierung, welche durch das *P. aeruginosa* Signalmolekül Pyocyanin (PCN) induziert wird. A549 Zellen, welche HA oder PON2-HA (a) bzw. GFP oder PON3-GFP (b) transient überexprimierten, wurden mit PCN (100 μ M) für 4 h stimuliert. Anschließend wurde mittels eines Gen-Reporter-Assays die NK- κ B-Aktivität gemessen. Für die Darstellung wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von zwei bis drei unabhängigen Experimenten in Dreifachwerten (Mittelwert \pm SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

Da NF- κ B sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt, wurde im Folgenden untersucht, welche Cytokine von Endothelzellen sekretiert werden, nachdem sie mit PCN stimuliert wurden. Vor allem sollte dabei analysiert werden, inwieweit die Überexpression von PON2 bzw. PON3 die potentielle Freisetzung von Cytokinen beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA durchgeführt, welcher die

inflammatorischen Cytokine / Chemokine IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF quantifiziert. Die Zellüberstände von PCN-behandelten naiven oder PON2- bzw. PON3-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden dazu verwendet. Beachtlicherweise wurde nur ein einziges der untersuchten Cytokine in Endothelzellen durch PCN induziert, nämlich IL-8 (<1000 pg/ml, Abbildung 5-20a). Dabei war der IL-8-Gehalt um das ca. 6-fache durch die PCN-Behandlung gegenüber den unbehandelten EA.hy 926-Zellen erhöht (Abbildung 5-20b). Die Freisetzung von IL-8 konnte deutlich durch die PON2- bzw. PON3-Überexpression verringert werden. Zusammenfassend wirken PON2 und PON3 als potente anti-inflammatorische Enzyme, was durch ihre Fähigkeit zur Verminderung der ROS-Produktion, NF- κ B-Aktivierung und IL-8-Sekretion in Gegenwart des Virulenzfaktors PCN deutlich wird.

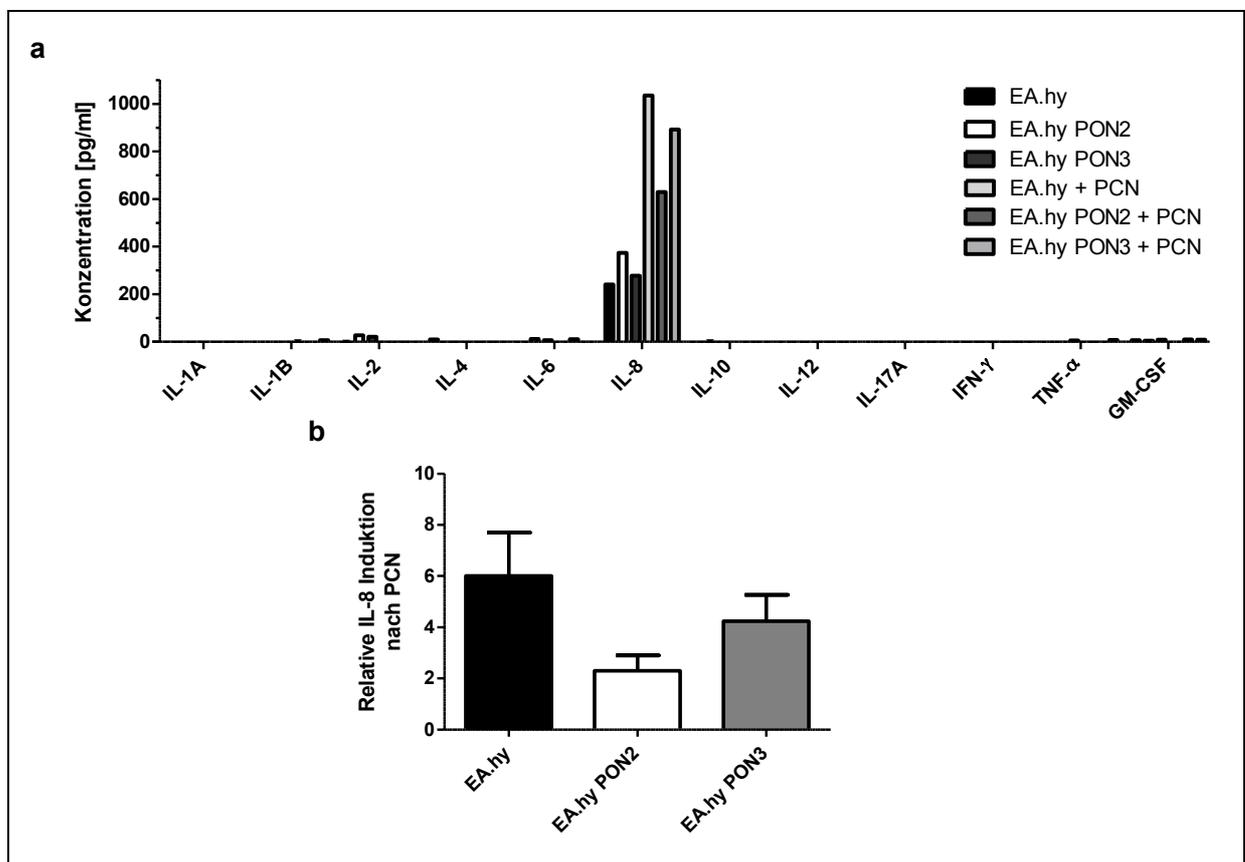


Abbildung 5-20: Pyocyanin (PCN) induziert die Sekretion von IL-8, welche durch eine Überexpression von PON2 oder PON3 vermindert werden kann. (a) Naive, PON2-GFP oder PON3-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit PCN (10 μ M) für 16 h behandelt. Die Zellüberstände wurden auf die Sekretion der gezeigten Cytokine und Chemokine mittels ELISA untersucht. **(b)** Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Versuchen, in welchen die Sekretion von IL-8 in den PCN-behandelten Zellen als ein Vielfaches der jeweiligen unbehandelten Kontrollen berechnet wurde.

5.2.3 3OC12 vermindert die hydrolytische Aktivität von PON3 und führt zu ihrer Degradation

Neben dem Virulenzfaktor PCN sekretiert *P. aeruginosa* das *quorum-sensing* Signalmolekül 3OC12. Dieses kann durch PON2 hydrolysiert und damit inaktiviert werden, da PON2 eine dominante 3OC12-Hydrolyseaktivität besitzt¹⁰⁸. Vorherige Studien der Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass Hydrolyseaktivität sowie mRNA- und Protein-Level von PON2 aktiv durch 3OC12 herunterreguliert werden¹¹¹. Hierdurch konnte PON2 weder gegen 3OC12 noch gegen die PCN-induzierte ROS-Produktion schützen. Der endogene durch PON2-vermittelte Schutz gegen die *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren 3OC12 und PCN wird somit wiederum durch 3OC12 ausgehebelt. Eventuell könnte folglich die Verhinderung der (3OC12-vermittelten) PON2-Inaktivierung bzw. Degradation einen möglichen therapeutischen Ansatz gegen die Infektion mit *P. aeruginosa* darstellen. Da PON3 ebenso wie PON2 den durch PCN verursachten oxidativen Stress vermindert, könnte PON3 eventuell den Verlust der anti-oxidativen Eigenschaft von PON2 gegenüber PCN kompensieren. Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob PON3 ähnlich wie PON2 durch 3OC12 herunterreguliert wird. Für diese Fragestellung wurden die Effekte von 3OC12 auf die hydrolytische Aktivität, die mRNA- und die Protein-Menge von PON3 analysiert. Es wurden HEK293-Zellen verwendet, die PON2-GFP (als Vergleich) oder PON3-GFP überexprimierten und auf ihre Lactonase- bzw. Lovastatinase-Aktivität (für PON2 bzw. PON3, siehe 4.3.12) untersucht. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien in anderen Zelllinien, wurde die PON2-Aktivität sehr schnell nach der 3OC12-Behandlung vermindert. Die hydrolytische Aktivität von PON2 wurde bereits nach 10 min um ~50% und nach 30 min um mehr als 80% reduziert (Abbildung 5-21a). In vorherigen Analysen der Arbeitsgruppe konnte bereits aufgeklärt werden, dass die PON2-Aktivität gegenläufig mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt korreliert: Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Menge (ausgelöst durch 3OC12 oder einem Ca^{2+} -Ionophor) an, führt dies zu einer Inaktivierung von PON2 – ein Effekt, der wiederum durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA verhindert werden konnte¹¹¹. Interessanterweise wurde die PON3-Lovastatinaseaktivität ebenso schnell durch 3OC12 inaktiviert, wobei die Rate der Inaktivierung nahezu identisch mit der für PON2 beobachteten war (Abbildung 5-21b).

Vorherige Daten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass 3OC12 einen starken Ca^{2+} -Influx in A549- und EA.hy 926-Zellen in einem sehr kurzen Zeitintervall verursacht¹¹¹. Dies bildet die Grundlage für eine aktive, Ca^{2+} -abhängige PON2-Inaktivierung und Degradation. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob PON3 ebenfalls Ca^{2+} -abhängig degradiert wird, da dies auf einen für PON2 und PON3 gemeinsamen regulatorischen Signalweg hinweisen könnte. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit 3OC12 behandelt und auf ihren mRNA-Gehalt mittels qRT-PCR nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 5-22a ist

eine Abnahme in der PON3-mRNA nach 16 h 3OC12-Behandlung auf ~70% erkennbar. Als nächstes wurde festgestellt, ob die PON3-mRNA aktiv abgebaut wird oder ob die Abnahme den normalen mRNA-Abbau reflektiert. Dazu wurden A549-Zellen mit 3OC12 oder dem RNA-Synthese-Inhibitor 5, 6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid (DRB) oder mit einer Kombination aus beidem behandelt. Da sich in den DRB / 3OC12 doppelt behandelten Zellen die PON3-mRNA-Menge nicht von der in den DRB-behandelten unterschied, kann gefolgert werden, dass die PON3-mRNA nach Behandlung mit 3OC12 nicht aktiv abgebaut wird (Abbildung 5-22b).

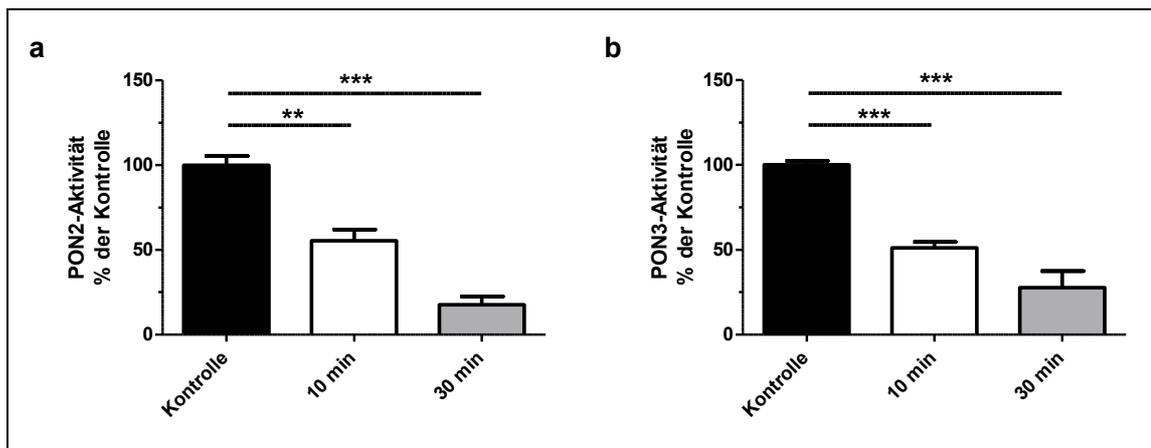


Abbildung 5-21: Die PON2- und PON3-Aktivität wird durch die Behandlung mit 3OC12 verringert. (a) PON2-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) für die angegebene Zeitdauer behandelt und auf ihre 3OC12-Hydrolyseaktivität mittels HPLC untersucht. **(b)** PON3-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) für die angegebene Zeitdauer behandelt und auf ihre Lovastatinase-Hydrolyseaktivität untersucht. Für die Darstellungen wurden die Kontrollen als 100% angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Absolutwerte der unbehandelten bis zu den behandelten Zellen reichten von 22 bis 3,7 nmol/min/mg (a) bzw. 0,15 bis 0,04 nmol/min/mg (b). Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von je drei unabhängigen Experimenten in Doppelwerten (Mittelwert \pm SEM; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; 1-way-ANOVA).

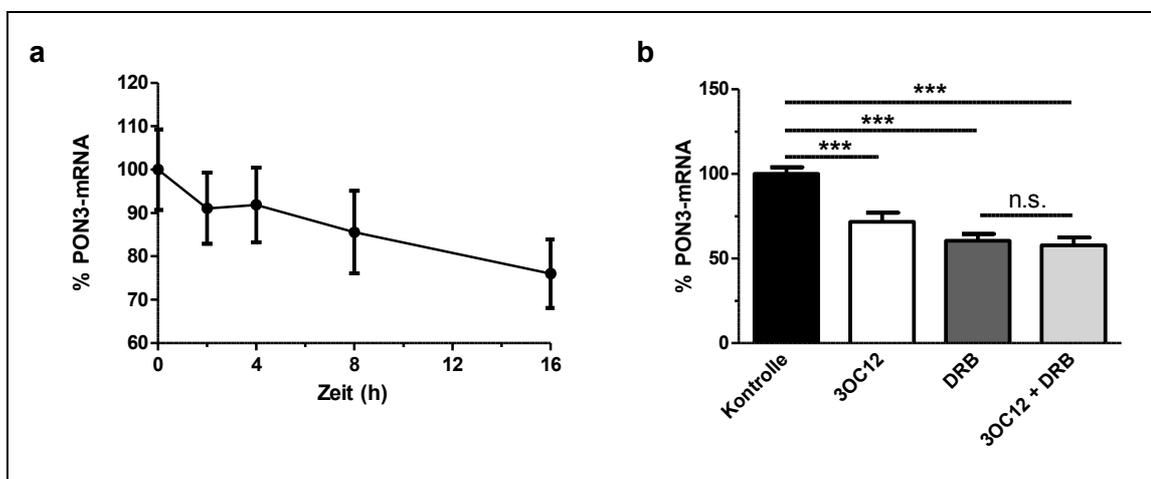


Abbildung 5-22: Die PON3-mRNA wird durch 3OC12 nicht aktiv abgebaut. (a) A549-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) für die angegebenen Zeiten behandelt und mittels qRT-PCR auf ihren PON3-mRNA Gehalt untersucht. (b) A549-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) oder DRB (100 μ M) oder einer Kombination aus beidem für 24 h behandelt. Anschließend wurde ebenfalls der PON3-mRNA Gehalt mittels qRT-PCR analysiert. Für die Darstellungen wurden die Kontrollen als 100% angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von je drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,05$; ***: $p < 0,001$; 1-way-ANOVA).

Schließlich wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um den PON3-Proteingehalt nach Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts durch 3OC12 zu bestimmen. Als Vergleich wurde der SERCA-Inhibitor Thapsigargin verwendet, welcher die Freisetzung der Ca^{2+} -Speicher in das Cytosol verursacht und ebenfalls zu einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase führt. Die Behandlung von A549-Zellen mit 3OC12 für verschiedene Zeiten zeigte, dass der PON3-Proteingehalt zeitabhängig abnahm und annähernd komplett nach 16 h verschwand (Abbildung 5-23a und b). Ähnlich wurde auch PON2 zeitabhängig degradiert und auf ~50% nach 16 h vermindert (Abbildung 5-23a und b). In Übereinstimmung hierzu konnte in A549-Zellen, welche mit verschiedenen Thapsigargin-Konzentrationen behandelt wurden, eine signifikante konzentrationsabhängige Degradation von PON2 und PON3 beobachtet werden (Abbildung 5-24a und b).

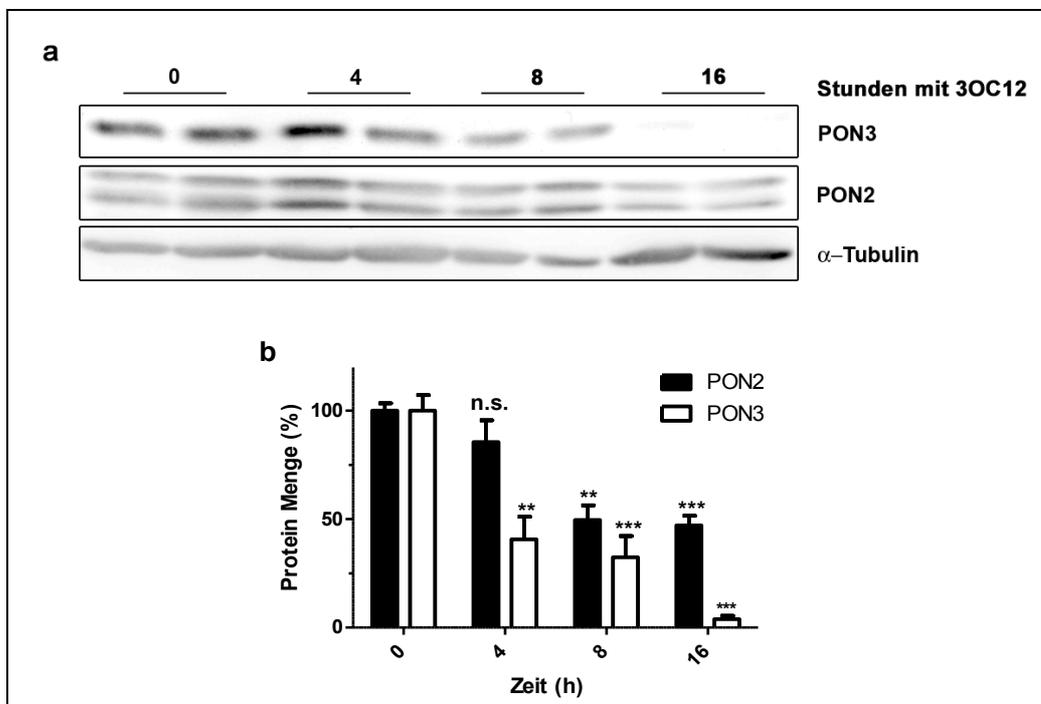


Abbildung 5-23: PON2 und PON3 werden durch die 3OC12-Behandlung abgebaut. (a) A549-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) in den angegebenen Zeiten behandelt. Die Zelllysate (je 50 μ g Protein) wurden mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen PON3, PON2 und α -Tubulin analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, welche quantifiziert und in (b) zusammengefasst wurden. Die Intensitäten wurden auf die jeweilige Ladekontrolle (α -Tubulin) und auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert, welche als 100% angenommen wurden. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollen (Mittelwert \pm SEM; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

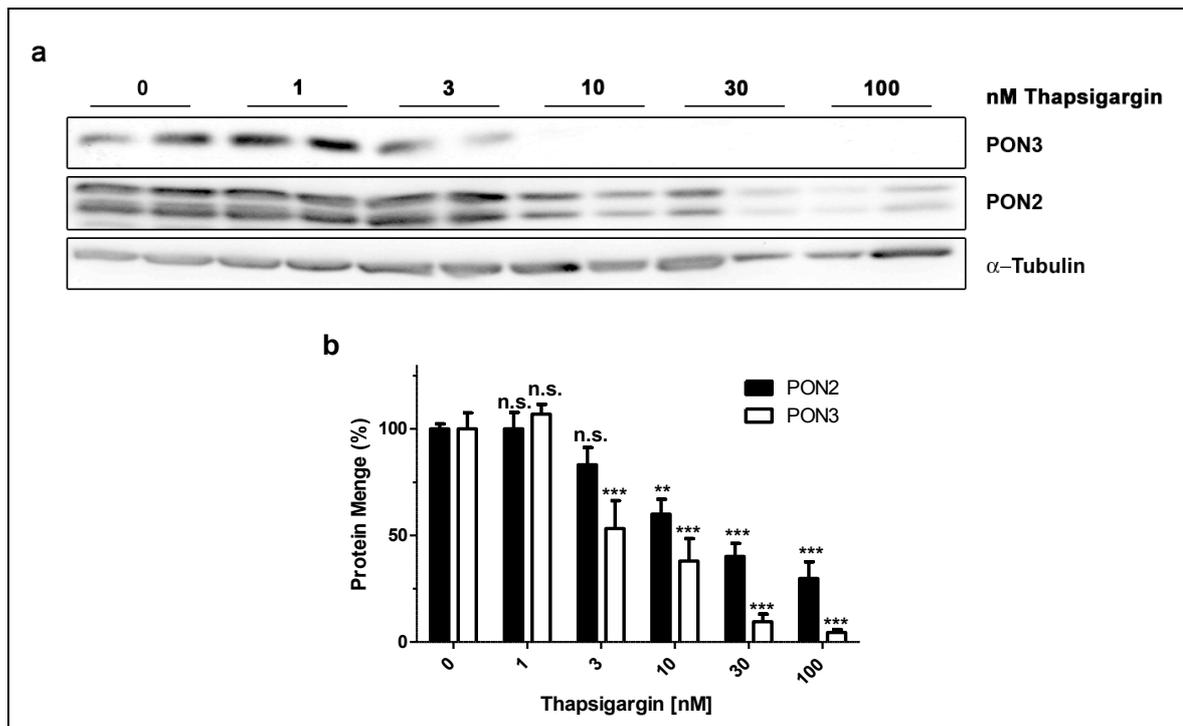


Abbildung 5-24: PON2 und PON3 werden durch die Thapsigargin-Behandlung abgebaut. (a) A549-Zellen wurden mit Thapsigargin für 24 h in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zelllysate (je 50 μ g Protein) wurden mittels Western Blot aufgetragen und mit Antikörpern gegen PON3, PON2 und α -Tubulin detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, welche mittels *QuantityOne* quantifiziert und in (b) zusammengefasst wurden. Die Intensitäten wurden auf die jeweilige Ladekontrolle (α -Tubulin) und auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert, welche als 100% angenommen wurden. Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollen (Mittelwert \pm SEM; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.3 Charakterisierung des PON2-inaktivierenden und – degradierenden Signalweges

Die vorherigen Ergebnisse dieser Arbeit bestärken die Rolle von PON2 und PON3 in der zellulären Abwehr von Virulenzfaktoren des Bakteriums *P. aeruginosa* bzw. der hierdurch aktivierten Signalwege. Beide Enzyme haben anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften gegenüber dem *P. aeruginosa* Virulenzfaktor Pyocyanin und können somit als Schutzenzyme agieren. Darüber hinaus kann PON2 durch ihre dominante 3OC12-Hydrolyseaktivität die Virulenz von *P. aeruginosa* abschwächen, indem sie die bakterielle Kommunikation stört. Jedoch zeigten die Daten auch, dass das Bakterium den von PON2 und PON3 vermittelten Schutz umgeht, indem 3OC12 zur Inaktivierung und zum Abbau der beiden Enzyme führt. Demnach könnte die Aufklärung des der Inaktivierung zugrundeliegenden Mechanismus ein Schlüssel zur Identifikation eines therapeutischen Ansatzes zur Erhaltung der beiden Schutzenzyme darstellen. Da die Inaktivierung von PON2 und PON3 durch 3OC12 Ca^{2+} -abhängig und sehr schnell erfolgt, ist eine posttranslationale Modifikation naheliegend. Im Folgenden wurden daher die posttranslationale Inaktivierung von PON2 und der zugrundeliegende Signalweg der PON2-Degradation untersucht.

5.3.1 PON2 wird vermutlich durch eine Dephosphorylierung inaktiviert

Erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus der PON2-Aktivierung können vorherige Studien in der Arbeitsgruppe bereits geben: Die PON2-Inaktivierung erfolgt Ca^{2+} -vermittelt, sehr schnell und reversibel, was eine Phosphorylierung / Dephosphorylierung mittels Proteinkinasen / Phosphatasen nahe legt¹¹¹. Des Weiteren erfolgt die PON2-Inaktivierung durch 3OC12 vermutlich unabhängig von einem Rezeptor^c. Eine 2D-SDS-PAGE-Analyse zeigte zudem, dass PON2 nach 3OC12-Behandlung zu einem basischeren pH ($\Delta\text{pI} = 0.1$) verschoben war ohne dabei eine Massenänderung aufzuweisen; dies weist ebenfalls auf eine Dephosphorylierung von PON2 hin^c. Falls es sich tatsächlich um eine Dephosphorylierung handeln sollte, kämen für PON2 ca. 50 Serin- / Threonin- und Tyrosinreste als potentiell phosphorylierbare Stellen in Frage. Daher wurde in einem ersten Ansatz analysiert, ob es sich um eine Serin- / Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierung handelt und ob diese nach 3OC12-Behandlung vermindert würde. Zu diesem Zweck wurde endogene PON2 aus 3OC12-behandelten oder unbehandelten A549-Zellen immunopräzipitiert und mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin (P-Ser), Threonin (P-Thr) oder Tyrosin (P-Tyr) mittels Western Blot detektiert. Abbildung 5-25a und d zeigen, dass

^c Marion Goldeck, Diplomarbeit 2009, Fachbereich Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

PON2 Ser-phosphoryliert ist und dass diese Phosphorylierung nach 3OC12-Behandlung um >50% abnimmt. Eventuell könnte das nach 3OC12-Behandlung verbleibende phospho-Ser-Signal durch noch nicht inaktivierte PON2 oder durch eine andere Ser-phosphorylierte Stelle zustande kommen, der keine unmittelbare Rolle in der PON2-Inaktivierung zukommt. Des Weiteren ist erkennbar, dass PON2 Thr-phosphoryliert ist, jedoch ändert sich die Signalintensität durch die 3OC12-Behandlung nicht (Abbildung 5-25b). PON2 scheint nicht Tyr-phosphoryliert zu sein, zumindest wird PON2 nicht von dem hier verwendeten Antikörper erkannt (Abbildung 5-25c).

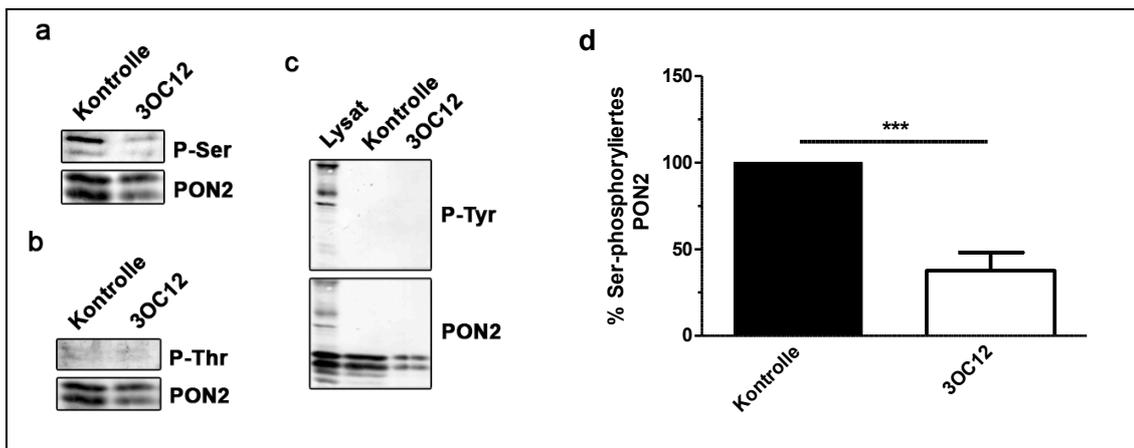


Abbildung 5-25: PON2 ist Serin-, Threonin-, aber nicht Tyrosin-phosphoryliert. Zudem wird PON2 durch 3OC12 Serin-dephosphoryliert. (a)-(c) A549-Zellen wurden für 30 min mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt. Aus den Zelllysaten wurde endogene PON2 mit Hilfe eines α -PON2-Antikörpers gekoppelt an *Dynabeads* immunopräzipitiert (siehe 4.3.7) und mittels Western Blot analysiert. Die Proteine wurden mit einem Mix aus sechs Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin (a, P-Ser), mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Threonin (b, P-Thr) bzw. einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (c, P-Tyr) detektiert. Ein Antikörper gegen PON2 diente zur Überprüfung der Immunopräzipitation bzw. als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Ergebnissen. (d) Die Banden aus (a) wurden quantifiziert, auf die Ladekontrolle (PON2) und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, welche als 100% angenommen wurde (Mittelwert \pm SEM; ***: $p < 0,001$; 1-way-ANOVA).

Den Analysen zufolge wird PON2 durch einen von 3OC12 bzw. Ca^{2+} aktivierten Signalweg an einem Ser-Rest dephosphoryliert. Jedoch lässt der Befund offen, ob die für die Inaktivierung verantwortliche Dephosphorylierung an mehreren Resten oder einem durch die Phospho-Antikörper nicht erkannten Rest erfolgt. Zum anderen ist die genaue Position der Serin-Phosphorylierung weiter unbekannt. Durch diese Methode kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Dephosphorylierung von PON2 ein Nebeneffekt der 3OC12-Behandlung darstellt, während PON2 durch eine andere unbekannte Modifikation inaktiviert würde. Daher wurde ein massenspektrometrischer Ansatz gewählt, mit welchem unvoreingenommen alle Reste auf eine mögliche (De-) Phosphorylierung untersucht wurden und darüber hinaus auch weitere Modifikationen wie z.B. Acetylierungen, Methylierungen,

Ubiquitylierungen und (De-) Glykosylierungen betrachtet werden konnten. Da für die massenspektrometrische Analyse von Proteinmodifikationen große Mengen an reinem Protein benötigt wurden, wurde zunächst die Immunopräzipitation von PON2 optimiert. Ziel war es eine deutliche PON2-Bande im Coomassie-Gel zu erhalten, die dann ausgeschnitten und weiter analysiert werden konnte. Aus dem vorherigen Versuch, in welchem endogene PON2 aus A549-Zellen immunopräzipitiert wurde (Abbildung 5-25), war bereits bekannt, dass die isolierte PON2-Menge nicht ausreichte, um im Coomassie-gefärbten Gel als Bande sichtbar zu werden (nicht gezeigt). In einem weiteren Ansatz wurde HA-markierte PON2 aus überexprimierenden HEK293-Zellen nach 3OC12-Behandlung bzw. ohne Behandlung mittels HA-Antikörper immunopräzipitiert.

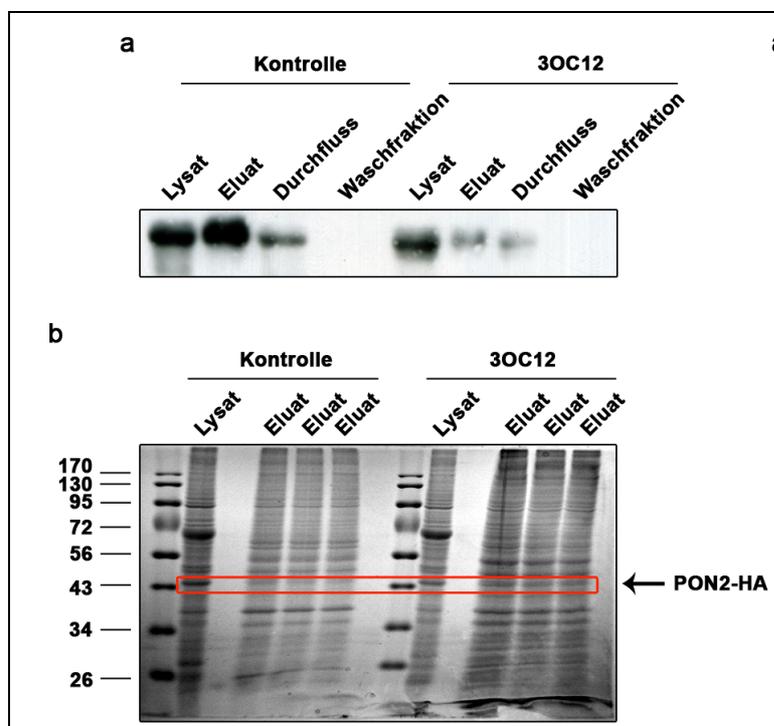


Abbildung 5-26: Immunopräzipitation von PON2 über ein HA-tag. (a) PON2-HA überexprimierende HEK293-Zellen wurden für 30 min mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt (Kontrolle). Aus den Zelllysaten wurde PON2 mit Hilfe eines α -HA-Antikörpers gekoppelt an Agarose immunopräzipitiert (siehe 4.3.8) und ein Teil des Eluates (20%) im Western Blot mit einem HA-Antikörper analysiert. Zudem wurden Lysat (20 μ g), Überstand (10%) und Waschfraktion (10%) zur Kontrolle verwendet. (b) Das restliche Eluat (80%) aus (a) wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel auf drei Spuren verteilt und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. PON2-HA befindet sich in den Banden im rot markierten Bereich.

Im Western Blot ist eine intensive HA-PON2-Bande in den unbehandelten Kontrollen und eine schwächere Bande in den 3OC12-behandelten Lysaten zu erkennen (Abbildung 5-26a). Auch im Coomassie-gefärbten Gel ist eine Bande zu sehen, bei der es sich vermutlich um

PON2-HA handelt, jedoch befinden sich auch viele weitere Banden als Verunreinigung in den Spuren der Eluate (Abbildung 5-26b).

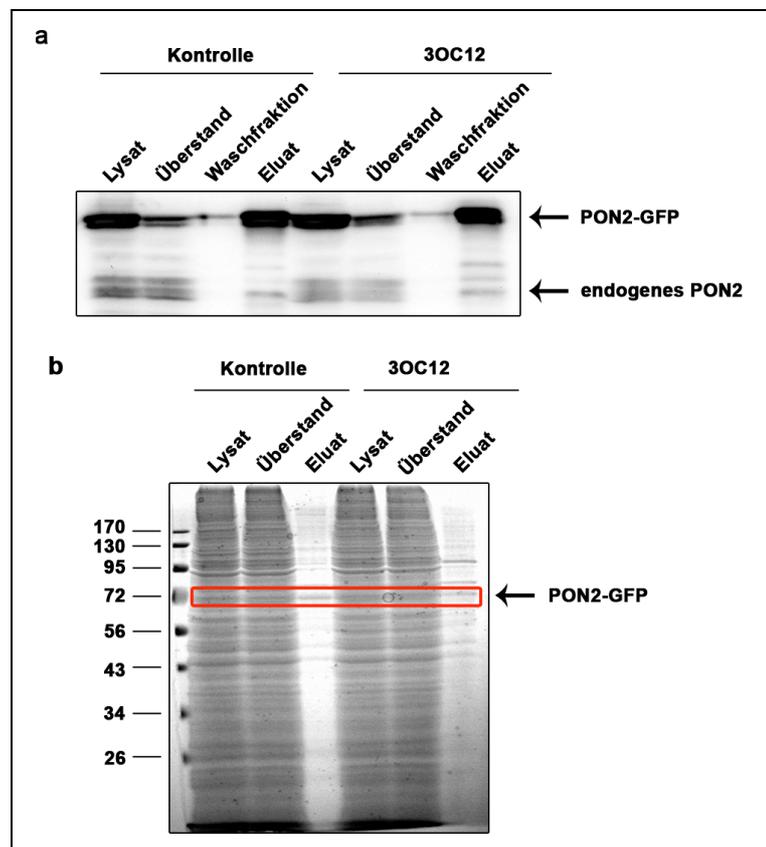


Abbildung 5-27: Immunopräzipitation von PON2 über ein GFP-tag. (a) PON2-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden für 30 min mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt (Kontrolle). Aus den Zelllysaten wurde PON2 mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers gekoppelt an Agarose immunopräzipitiert (siehe 4.3.9) und ein Teil des Eluates (10%) im Western Blot mit einem PON2-Antikörper analysiert. Zudem wurden Lysat (~100 μ g), Überstand (15%) und Waschfraktion (10%) zur Kontrolle verwendet. (b) Das restliche Eluat (90%) aus (a) wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel auf drei Spuren verteilt und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. PON2-GFP befindet sich in den Banden im rot markierten Bereich. Dieser Bereich wurde in den Eluates der Kontrolle und 3OC12 ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert.

Aufgrund der großen Verunreinigung der Eluate mit anderen Proteinen in der vorangegangenen Immunopräzipitation, wurde im Weiteren PON2-GFP über eine GFP-Immunopräzipitation aufgereinigt. Hierfür wurden 3OC12-behandelte oder unbehandelte HEK293-Zellen mit stabiler PON2-GFP-Überexpression verwendet. Im Western Blot und im Coomassie-gefärbten Gel ist eine deutliche PON2-GFP-Bande zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Anreicherung in den Eluates schließen lässt (Abbildung 5-27a und b). Abbildung 5-27b zeigt zudem, dass die Verunreinigung durch andere Proteine weitaus geringer ist als zuvor. Interessanterweise wurde endogene PON2 ebenfalls ko-eluiert und ist im Western Blot sichtbar (Abbildung 5-27a). Die auf diese Weise erhaltenen Eluate wurden mit

verschiedenen Enzymen verdaut (z.B. Trypsin, Chymotrypsin) und mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe 4.3.6). Insgesamt konnte so eine Sequenzabdeckung von >90% erreicht werden. In der Analyse wurde eine einzige bisher unbekannte phosphorylierte Stelle an einem Serin-Rest an Position 36 in PON2 aus Eluat von unbehandelten Zellen gefunden (Abbildung 5-28). Weitere Modifikationen waren nicht vorhanden bzw. konnten nicht detektiert werden.

1	M	G	R	L	V	A	V	G	L	L	G	I	A	L	A	L	L	G	E	R	L	L	A	L	R	N	R	L	K	A	S	R	E	V	E	S	V	D	L	P	H	C	H	L	I	K	G	I	E	A
51	G	S	E	D	I	D	I	L	P	N	G	L	A	F	F	S	V	G	L	K	F	P	G	L	H	S	F	A	P	D	K	P	G	G	I	L	M	M	D	L	K	E	E	K	P	R	A	R	E	L
101	R	I	S	R	G	F	D	L	A	S	F	N	P	H	G	I	S	T	F	I	D	N	D	D	T	V	Y	L	F	V	V	N	H	P	E	F	K	N	T	V	E	I	F	K	F	E	E	A	E	N
151	S	L	L	H	L	K	T	V	K	H	E	L	L	P	S	V	N	D	I	T	A	V	G	P	A	H	F	Y	A	T	N	D	H	Y	F	S	D	P	F	L	K	Y	L	E	T	Y	L	N	L	H
201	W	A	N	V	V	Y	Y	S	P	N	E	V	K	V	V	A	E	G	F	D	S	A	N	G	I	N	I	S	P	D	D	K	Y	I	Y	V	A	D	I	L	A	H	E	I	H	V	L	E	K	H
251	T	N	M	N	L	T	Q	L	K	V	L	E	L	D	T	L	V	D	N	L	S	I	D	P	S	S	G	D	I	W	V	V	C	H	P	N	G	Q	K	L	F	V	Y	D	P	N	N	P	P	S
301	S	E	V	L	R	I	Q	N	I	L	S	E	K	P	T	V	T	T	V	Y	A	N	N	G	S	V	L	Q	G	S	S	V	A	S	V	Y	D	G	K	L	L	I	G	T	L	Y	H	R	A	L
351	Y	C	E	L																																														

S/T/Y potentiell phosphorylierte Stellen

Abbildung 5-28: PON2 ist an Position S36 phosphoryliert. In der massenspektrometrischen Analyse des Materials aus Abbildung 5-27 wurde eine Phosphorylierung von PON2 aus unbehandelten Zellen an der Stelle S36 gefunden.

Nachdem die vorherigen Analysen auf eine Serin-Dephosphorylierung von PON2 als Ursache für die Inaktivierung durch 3OC12 deuten, wurde nun versucht, mit Hilfe von Mutation einzelner Aminosäurereste die genaue Position zu identifizieren. Auch Threonin- und Tyrosin-Reste wurden weiter in Betracht gezogen, da diese möglicherweise nicht durch die Phospho-Antikörper erkannt worden sind. Um eine Auswahl der zu mutierenden Stellen zu treffen, wurden drei Strategien verfolgt: 1. Da PON2 und PON3 beide durch 3OC12 sehr schnell inaktiviert wurden, könnte die verantwortliche Stelle an einer zwischen den Proteinen konservierten Stelle erfolgen. 2. In einem Strukturvergleich von Harel et al.¹²⁵ zwischen allen drei Paraoxonasen PON1-3 wurden bereits aktive Stellen für die Hydrolyseaktivität vorhergesagt. 3. Mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers können potentiell phosphorylierbare Stellen vorhergesagt werden. Basierend auf diesen Strategien wurden die Stellen S103, Y192, T196, S208, S221, S228, S331 und Y346 ausgewählt (Abbildung 5-29) und durch sterisch ähnliche aber nicht phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht (z.B. Serin zu Alanin). Als weitere Stelle wurde S36 mutiert, da diese in der MS-Analyse als einzige phosphorylierte Stelle gefunden wurde.

Nach Mutation der ausgewählten Positionen in PON2 wurden die PON2-Mutanten bzw. PON2 als Kontrolle in HEK293-Zellen transient transfiziert, mit 3OC12 behandelt und die Hydrolyseaktivität gemessen. Die Expression wurde mittels Western Blot überprüft (nicht gezeigt) und die parallel gemessenen Aktivitäten wurden auf diese Expressionsrate normalisiert. Wie erwartet hatte PON2 eine hohe Hydrolyseaktivität, welche durch die 3OC12-Behandlung reduziert wurde (Abbildung 5-30). Falls durch die Mutation eine aufgrund ihrer Phosphorylierung für die Aktivität verantwortliche Stelle so verändert würde, dass sie einem dephosphorylierten PON2 entspräche, so wäre idealer Weise keine PON2-Aktivität mehr messbar. Darauf aufbauend wurde die Hypothese formuliert, dass die Mutation der essentiellen Aminosäure dazu führen müsste, dass 1. die Aktivität der (unbehandelten) PON2-Mutation jener der Lacton-behandelten PON2 entspräche und 2., dass eine Lacton-Behandlung die Aktivität der PON2-Mutation nicht weiter reduzieren könne. Obwohl in allen Mutanten eine Aktivität gemessen wurde, so fällt auf, dass die Aktivität der Mutanten S36A und S331A sehr niedrig war und sich nicht signifikant von der PON2-Aktivität nach 3OC12-Behandlung unterscheidet. Folglich stellen die beiden Mutanten S36A und S331A mögliche Kandidaten dar, die für die Inaktivierung von PON2 verantwortlich sein könnten.

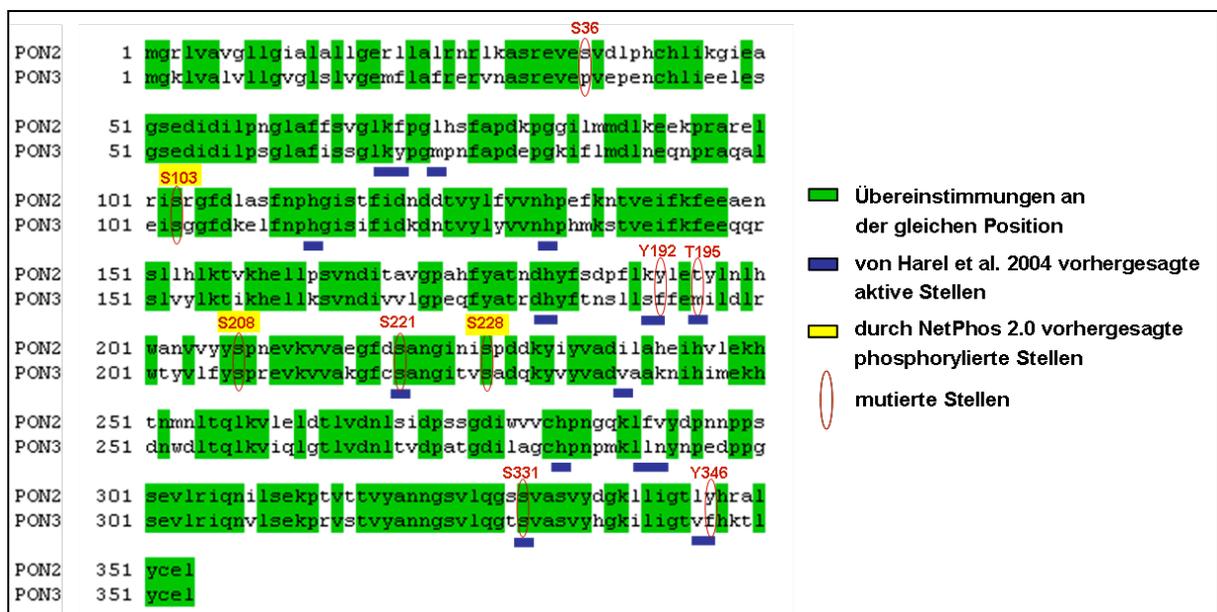


Abbildung 5-29: Entscheidungsgrundlage zur Auswahl der in PON2 mutierten Aminosäuren. Die Proteinsequenzen von PON2 und PON3 wurden mittels einer BLOSUM62-Matrix aneinander abgeglichen. Übereinstimmungen an der gleichen Position sind grün markiert. Die von Harel et al. ¹²⁵ vorhergesagten aktiven Stellen, welche durch einen Strukturvergleich von PON1, PON2 und PON3 ermittelt wurden, sind in blau unterstrichen. Insgesamt wurden durch den NetPhos 2.0 Server 16 potentiell phosphorylierte Stellen in PON2 vorhergesagt. Gelb markiert wurden die Stellen, welche auch im Folgenden mutiert wurden.

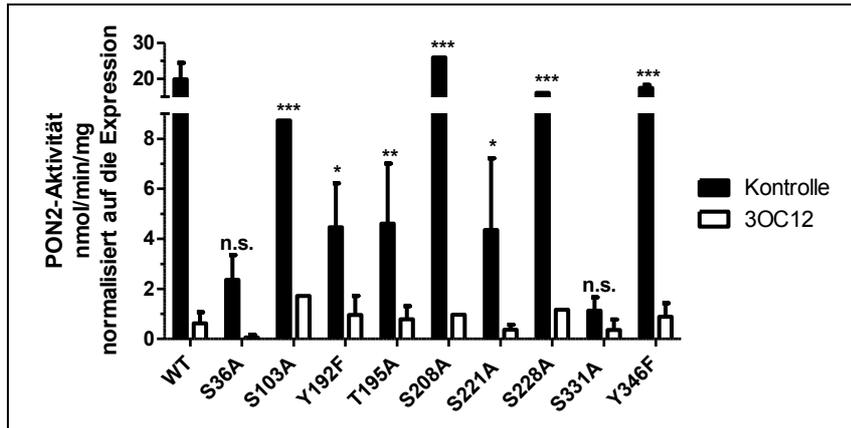


Abbildung 5-30: Die PON2-Mutanten S36A und S331A zeigen nur geringe PON2-Aktivität. HEK293-Zellen transient transfiziert mit GFP (nicht gezeigt), PON2-GFP (Wildtyp, WT) oder mit den gezeigten PON2-GFP-Mutanten wurden mit 3OC12 (100 μ M) für 30 min behandelt und auf ihre 3OC12-Hydrolyseaktivität untersucht (siehe 4.3.13). Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurden die gemessenen Aktivitäten auf das jeweilige Verhältnis zwischen überexprimiertem und endogenem PON2-Protein normalisiert. Zudem wurde von allen Werten die endogene PON2-Basalaktivität von GFP-exprimierenden Zellen abgezogen (Hintergrund). Die Signifikanzen beziehen sich auf die 3OC12-behandelten PON2-GFP-Zellen (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,5$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Signifikanzen zwischen den unbehandelten und 3OC12-behandelten Zellen nicht eingetragen, jedoch unterschieden sich diese in den S36A- und S331A-Mutanten nicht signifikant.

Neben der Hydrolyseaktivität wurde die Lokalisation einiger ausgewählter Mutanten mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Falls PON2 ihre enzymatische Aktivität durch die Mutation der potentiell phosphorylierten Stellen einbüßt, so wäre aufgrund der strukturellen Veränderung eventuell auch eine Änderung in der Lokalisation denkbar. In transient überexprimierenden EA.hy 926-Zellen kolokalisiert PON2 erwartungsgemäß mit ER und Mitochondrien (Abbildung 5-31). Auch bei den untersuchten PON2-Mutanten zeigten die Signale für PON2-GFP deutliche Überlappungen mit Markern für sowohl Mitochondrien als auch ER.

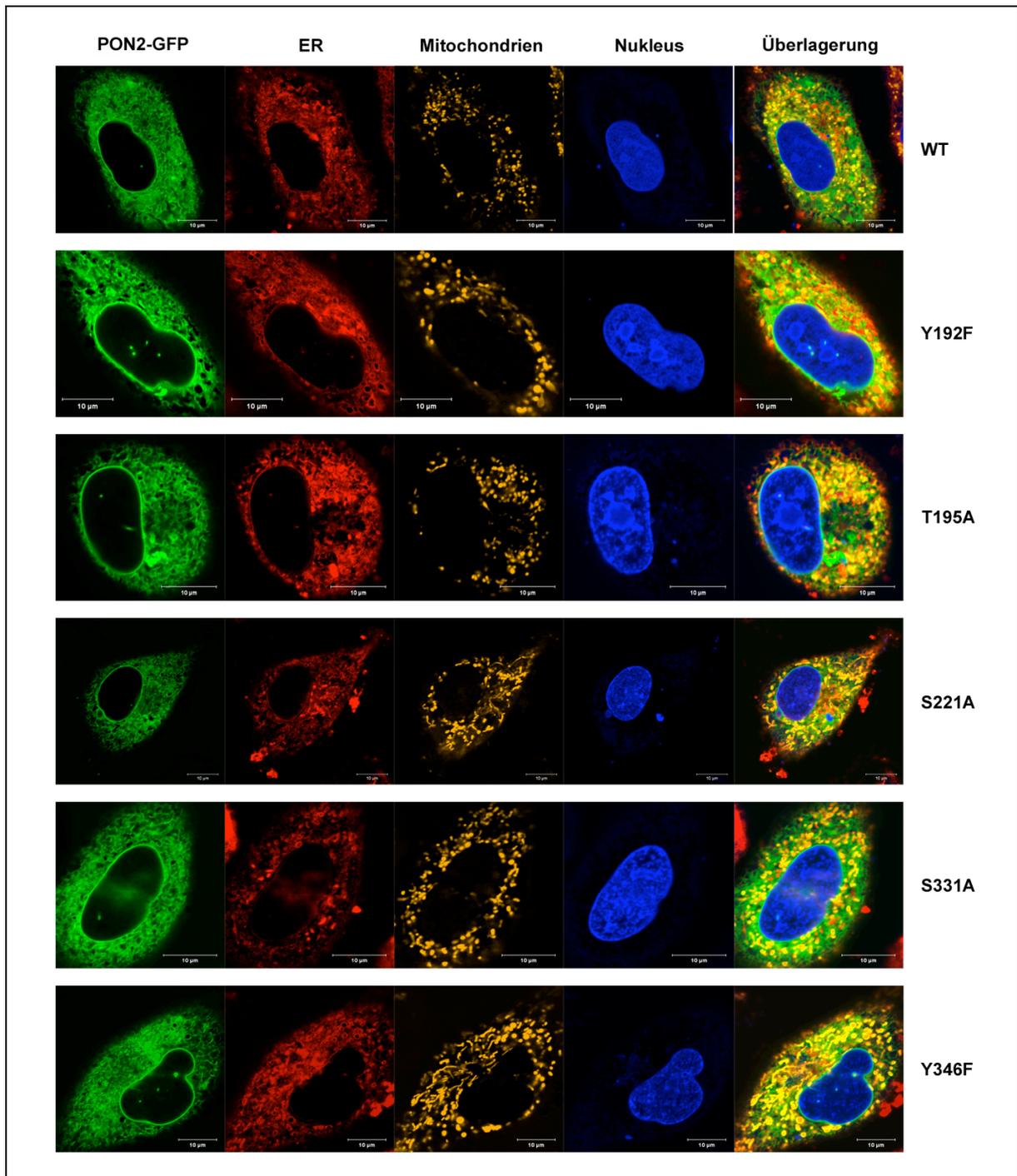


Abbildung 5-31: PON2 und die PON2-Mutanten kolokalisieren hauptsächlich mit dem ER und den Mitochondrien. Lebende EA.hy 926-Zellen transient transfiziert mit PON2-GFP (WT) oder mit den gezeigten PON2-GFP-Mutanten wurden mit *ER-Tracker™ Red* (in rot dargestellt), reduziertem *MitoTracker® Orange* (in orange dargestellt) und DRAQ5 (Kernmarker; in blau dargestellt) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop im λ -Modus aufgenommen und mittels *Linear Unmixing* in die einzelnen Kanäle geteilt (Skalierung = 10 μm).

5.3.2 Die Position S331 könnte die Inaktivierung von PON2 vermitteln

Aufgrund der sehr geringen PON2-Aktivität der S331A-Mutante wurde vermutet, dass diese Stelle für die 3OC12-vermittelte Inaktivierung verantwortlich sein könnte. Ferner ließe dies

schlussfolgern, dass die aktive PON2 an Position S331 phosphoryliert ist und durch eine Dephosphorylierung inaktiviert wird. Demnach sollte die S331A-Mutante keine Ser-Phosphorylierung aufweisen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden HEK293-Zellen, welche PON2-S331A mit einer GFP-Markierung überexprimierten bzw. PON2-WT als Vergleich mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt. Nach Immunopräzipitation und Western Blot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin (P-Ser) fallen in Abbildung 5-32 mehrere Dinge auf: Zum einen ist erwartungsgemäß ein Verlust der Ser-Phosphorylierung nach 3OC12-Behandlung von PON2 zu erkennen. Zum anderen weist die S331A-Mutante kaum ein P-Ser-Signal auf, welches zudem ungefähr der Intensität von 3OC12-behandeltem PON2 entspricht. Weiterhin verursacht die 3OC12-Behandlung von S331A keine Signalabnahme. Dies deutet darauf hin, dass PON2 an der Position S331 phosphoryliert vorliegt und durch die 3OC12-Behandlung an dieser Stelle dephosphoryliert wird. Das schwache bestehende P-Serin-Signal nach 3OC12-Behandlung bzw. in der S331A-Mutante könnte aufgrund einer weiteren Ser-phosphorylierten Stelle zustande kommen oder durch eine unspezifische Bindung der P-Ser-Antikörper an PON2 verursacht worden sein.

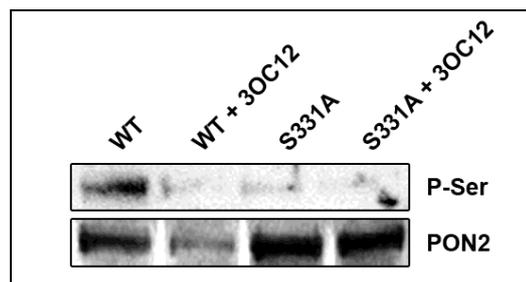


Abbildung 5-32: PON2 wird durch 3OC12 Serin-dephosphoryliert, hingegen die PON2-Mutante S331A kaum Serin-phosphoryliert ist. PON2-GFP (WT) oder PON2-S331A-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden für 30 min mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt. Aus den Zelllysaten wurde PON2 mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers immunopräzipitiert und im Western Blot aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem Mix aus sechs Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin bzw. mit einem PON2-Antikörper detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Ergebnissen.

Eine Möglichkeit um zu überprüfen, ob Position S331 durch 3OC12 inaktiviert wird, bietet die „phosphomimetische“ Mutation. Hierzu wurde das Serin an Position S331 durch eine Glutaminsäure (E) ausgetauscht, da diese der räumlichen Struktur von phosphoryliertem Serin am nächsten kommt. Falls somit die Aktivität von PON2 erhalten bleiben sollte, wäre darüber hinaus zu erwarten, dass PON2-S331E nicht mehr durch 3OC12 inaktiviert werden kann. Die Mutante S331E wurde in HEK293-Zellen überexprimiert, mit 3OC12 behandelt und die Hydrolyseaktivität bestimmt. GFP- und PON2-GFP-überexprimierende HEK293-Zellen dienten als Vergleich. Die S331E-Mutante zeigte weder nach noch vor der 3OC12-Behandlung eine Aktivität, die über der endogenen PON2-Aktivität lag (vgl. GFP, Abbildung

5-33). Vermutlich behindert ähnlich wie Alanin auch die Glutaminsäure an Position S331 die PON2-Aktivität. Somit ist die Glutaminsäure hier vermutlich nicht zur Simulation eines phosphorylierten Serins geeignet.

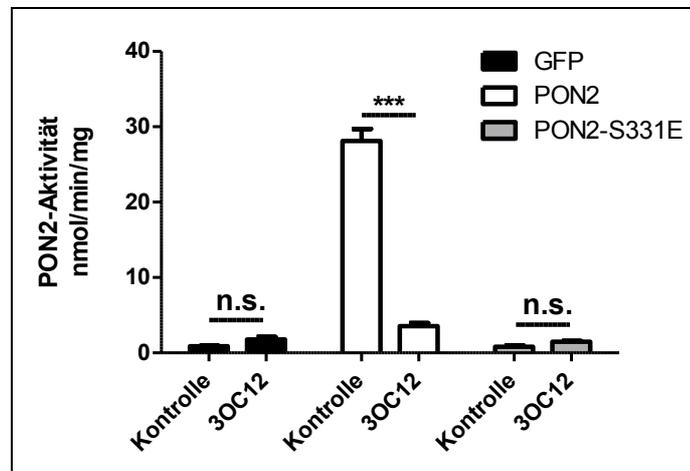


Abbildung 5-33: Die PON2-Mutante S331E zeigt keine Lactonase-Aktivität. HEK293-Zellen transient transfiziert mit GFP, PON2-GFP oder mit der PON2-GFP-Mutante S331E wurden für 30 min mit 3OC12 behandelt und auf ihre 3OC12-Hydrolyseaktivität untersucht. Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelwerten (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0,5$; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.3.3 Die PON2-Inaktivierung erfolgt vermutlich über einen Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Signalweg

Im Rahmen einer Kooperation konnten von John F. Teiber^d bisher unveröffentlichte Daten generiert werden, die weitere Hinweise auf den durch 3OC12-vermittelten Signalweg zur PON2-Inaktivierung geben. Wie bereits bekannt war, wird PON2 über den durch 3OC12-vermittelten Ca^{2+} -Influx inaktiviert, was durch Behandlung mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA verhindert werden konnte¹¹¹. Da aufgrund der vorherigen Analysen dieser Arbeit eine Dephosphorylierung von PON2 vermutet wurde, wurde eine Vielzahl von Proteinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren verwendet, um den der PON2-Inaktivierung zugrundeliegenden Signalweg aufzuklären. Tatsächlich konnte eine Vorbehandlung von A549-Zellen mit dem Calmodulin(CaM)-Inhibitor W7 oder dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus die Inaktivierung von PON2 durch 3OC12 verhindern (Abbildung 5-34a und b). Abbildung 5-34c zeigt ein mögliches Schema der PON2-Inaktivierung, in welchem durch 3OC12-freigesetztes Ca^{2+} einen Komplex mit CaM bildet, der die CaM-Kinase aktiviert. Diese wiederum könnte die Phosphatase Calcineurin aktivieren und PON2 über eine Dephosphorylierung inaktivieren.

^d Department of Internal Medicine, Division of Epidemiology, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

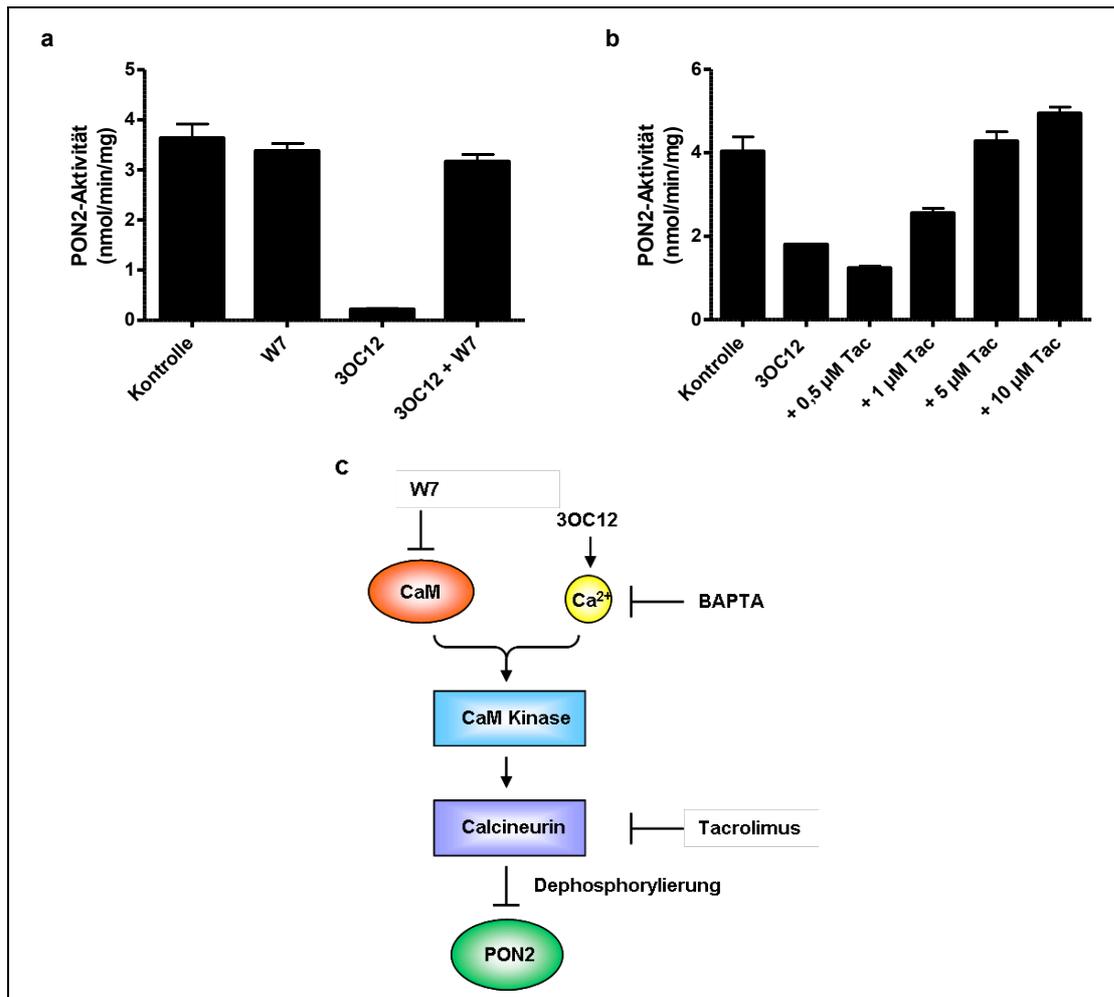


Abbildung 5-34: Die Inaktivierung von PON2 durch 3OC12 kann durch Inhibition von Calmodulin (CaM) oder Calcineurin verhindert werden. (a) Die Deaktivierung von PON2 nach 3OC12 kann durch Behandlung mit dem CaM-Inhibitor W7 verhindert werden. A549-Zellen wurden mit W7 (25 μM) für 2 h vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit 3OC12 (100 μM) für 5 min behandelt und auf ihre auf ihre 3OC12-Hydrolyseaktivität untersucht. (b) Die Deaktivierung von PON2 nach 3OC12 kann durch Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus (Tac) verhindert werden. A549-Zellen wurden mit Tac in den angegebenen Konzentrationen für 1 h vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit 3OC12 (50 μM) für 10 min behandelt und auf ihre 3OC12-Hydrolyseaktivität untersucht. (c) Mögliches Schema der Ca^{2+} / CaM-vermittelten Inaktivierung von PON2. Die Daten wurden im Rahmen einer Kooperation von John F. Teiber^o generiert.

5.3.4 Die Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus in der 3OC12-induzierten PON2-Degradation

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit weisen auf eine Ca^{2+} / CaM-abhängige Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von PON2 durch 3OC12 hin. In früheren Studien und in Analysen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Degradation von PON2 ebenfalls Ca^{2+} -vermittelt wird (¹¹¹, Abbildung 5-23 und Abbildung 5-24). Jedoch ist bisher nichts über den genauen Mechanismus bekannt, welcher zum 3OC12-vermittelten

PON2-Abbau führt. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob 3OC12 Zielproteine des Proteasom-vermittelten Abbaus aktiviert und ob PON2 über diesen Weg degradiert wird. Zunächst wurden A549-Zellen mit 3OC12 bzw. zum Vergleich mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und im Western Blot mit einer Reihe an Antikörpern gegen Signalproteine des Proteasom-vermittelten Abbaus detektiert. Hierbei handelte es sich um die Faktoren Skp1, Skp2, Ubiquitin, UBC3, SUMO1, SUMO2 / 3, ISG15 und NEDD8. Es sollte überprüft werden, ob einerseits 3OC12 die Abundanz dieser Faktoren änderte und andererseits, ob 3OC12 zu einer kovalenten Modifikation von PON2 mit diesen Faktoren führte. Die 3OC12-Behandlung führte zu einer Zunahme von ubiquitinylierten Proteinen, von SUMO-1 und UBC-3 (Abbildung 5-35a, c und e). Interessanterweise ist eine Abnahme im NEDD-8-Signal nach 3OC12-Behandlung zu beobachten (Abbildung 5-35f). Dies kann durch eine zunehmende kovalente Bindung an andere Proteine erklärt werden, die dann bei einem höheren Molekulargewicht zu sehen sein sollten. Tatsächlich konnte eine Zunahme eines anderen unbekanntes Proteins bei ca. 30 kDa beobachtet werden, bei welchem es sich jedoch aufgrund des zu geringen Molekulargewichts nicht um PON2 handelt kann (nicht gezeigt). Die Signalintensitäten für Skp1 und SUMO-2 / 3 blieben durch die 3OC12-Behandlung unverändert, jedoch war auch keine Signalzunahme nach Behandlung mit MG132 zu erkennen (Abbildung 5-35b und d).

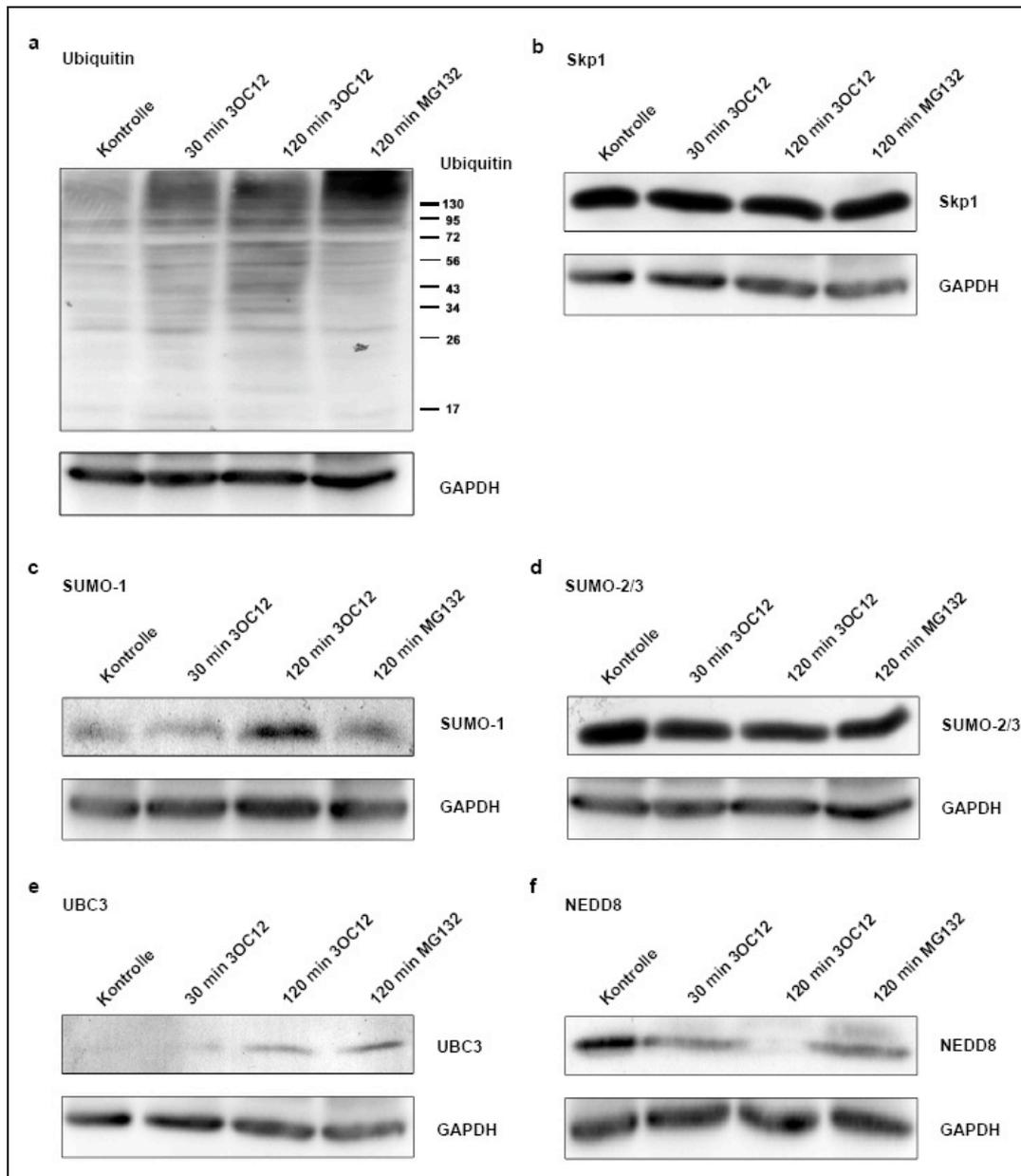


Abbildung 5-35: Die Behandlung mit 3OC12 in A549-Zellen führt zur Aktivierung und erhöhten Expression von Zielproteinen des Proteasom-vermittelten Abbaus. A549-Zellen wurden mit 3OC12 (100 μ M) für 30 bzw. 120 min behandelt oder als Kontrolle mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (10 μ M) für 120 min behandelt. Die Zellysate (je 50 μ g Protein) wurden mittels Western Blot mit Antikörpern gegen Ubiquitin (a), Skp1 (b), SUMO-1 (c), SUMO-2 / 3 (d), UBC3 (e), NEDD8 (f) und GAPDH als Ladekontrolle analysiert.

Aus dem vorherigen Versuch kann gefolgert werden, dass 3OC12 den Proteasom-vermittelten Abbau aktiviert, indem es zu einer verstärkten Ubiquitinylierung führt und die Expression anderer Zielproteine hochreguliert. Nun soll gezeigt werden, ob der PON2-Abbau eventuell über eine Markierung mit Ubiquitin (8 kDa), SUMO (11-15 kDa), NEDD8 (9 kDa) oder ISG15 (15 kDa) vermittelt werden könnte. Erwartungsgemäß sollte eine derartige Markierung von PON2 zu einem höheren Molekulargewicht führen, welcher als *Shift* im

Western Blot zu sehen sein sollte. Bisher konnte kein solcher *Shift* von PON2 zu einem höheren Molekulargewicht nach 3OC12-Behandlung beobachtet werden (nicht gezeigt), was eventuell dadurch begründet werden könnte, dass der verwendete PON2-Antikörper nach der Markierung nicht mehr an PON2 binden kann. Aus diesem Grund wurde im Folgenden PON2-GFP aus überexprimierenden HEK293-Zellen nach 3OC12-Behandlung immunopräzipitiert und mit Antikörpern gegen Ubiquitin, SUMO, NEDD8 und ISG15 detektiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob PON2 mit Zielproteinen des Ubiquitin-vermittelten Abbaus wie dem E2-Ubiquitin-*carrier*-Protein UBC3 oder mit Proteinen des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Skp1 und Skp2) interagiert. Abbildung 5-36 zeigt, dass PON2 nicht durch die 3OC12-Behandlung ubiquitinyliert wird, da keine PON2-Bande nach der Immunopräzipitation auftritt. Der Western Blot mit Antikörper gegen PON2 zeigt dabei, dass die Immunopräzipitation von PON2-GFP (~72 kDa) erfolgreich war, während die zusätzlichen Doppelbande bei ~43 kDa durch ko-immunopräzipitierte endogene PON2 zustande kommt. Die Analyse ob PON2 mit Zielproteinen des Ubiquitin-vermittelten Abbaus interagiert ergab, dass keines der untersuchten Proteine UBC3, Skp1 und Skp2 mit PON2 ko-eluiert wurde (Abbildung 5-37a-c). Folglich spielt vermutlich der über Ubiquitin-vermittelte Abbau durch das Proteasom keine Rolle in der PON2-Degradation, welche durch 3OC12 vermittelt wird. Ferner konnte auch keine Sumoylierung, Neddylierung oder ISG15-Markierung nachgewiesen werden (Abbildung 5-38a und b, Abbildung 5-39a und b).

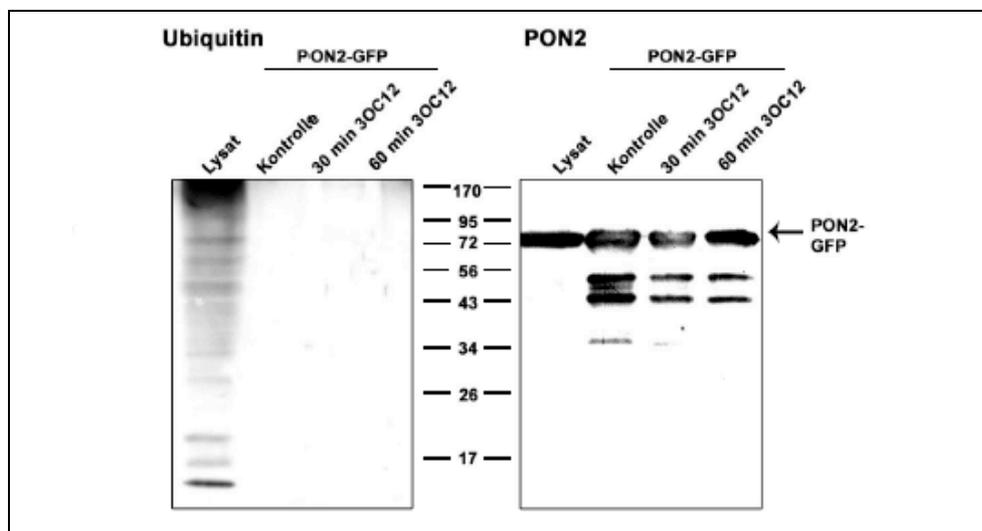


Abbildung 5-36: PON2 wird nicht durch 3OC12-Behandlung ubiquitinyliert. PON2-GFP überexprimierende HEK293-Zellen wurden für 30 min bzw. 60 min mit 3OC12 behandelt bzw. blieben unbehandelt. Aus den Zelllysaten wurde PON2 mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers immunopräzipitiert und die Eluate mittels Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurde Lysat (50 μ g) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Ubiquitin und gegen PON2 als Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Ergebnissen.

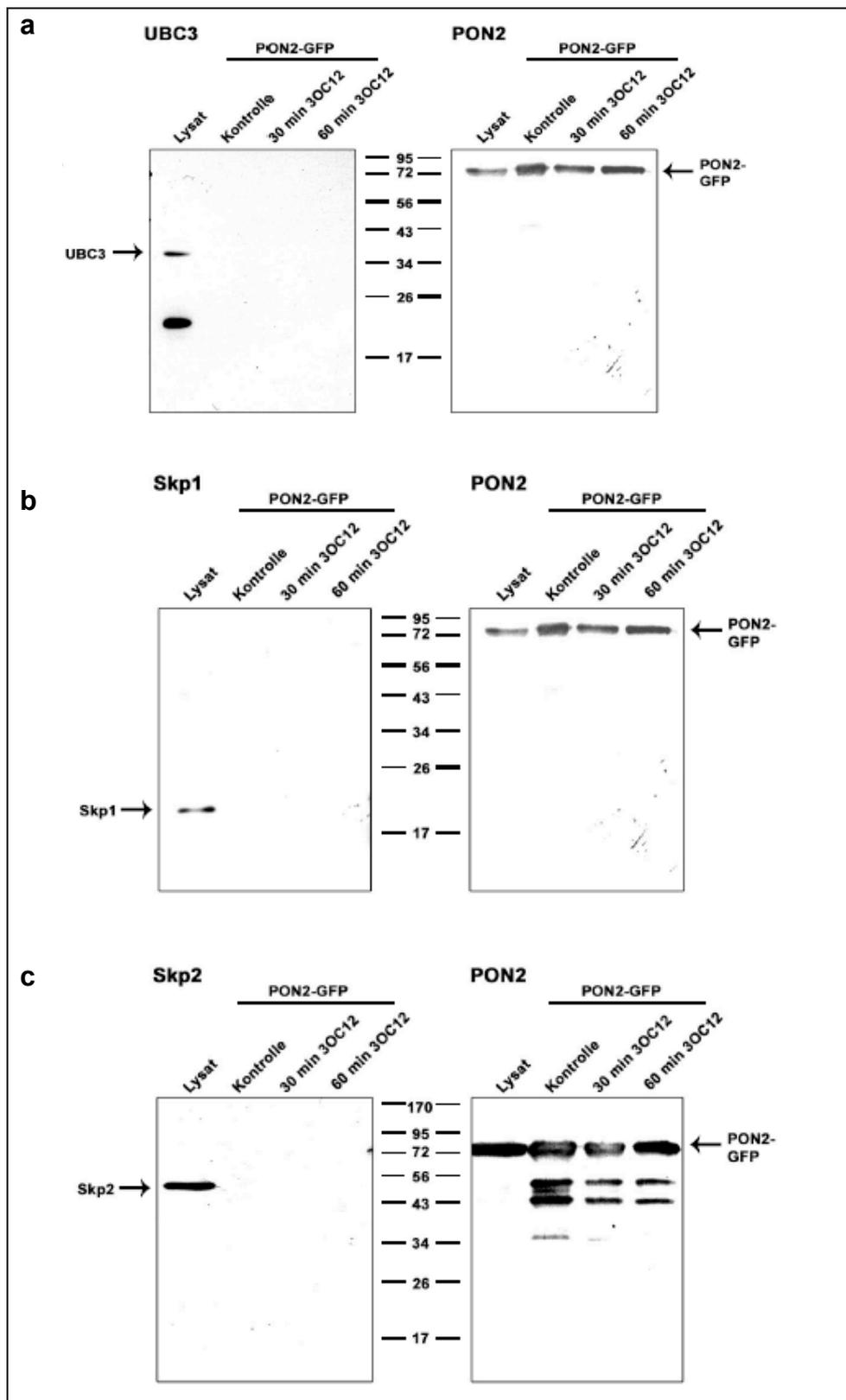


Abbildung 5-37: PON2 interagiert nicht durch 3OC12-Behandlung mit dem E2-Ubiquitin-carrier-Protein UBC3 oder mit den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex-Proteinen Skp1 und Skp2. Behandlung, Immunopräzipitation und Western Blot erfolgten analog zu Abbildung 5-36. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen UBC3 (a), Skp1 (b) und Skp2 (c) und gegen PON2 als Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Ergebnissen.

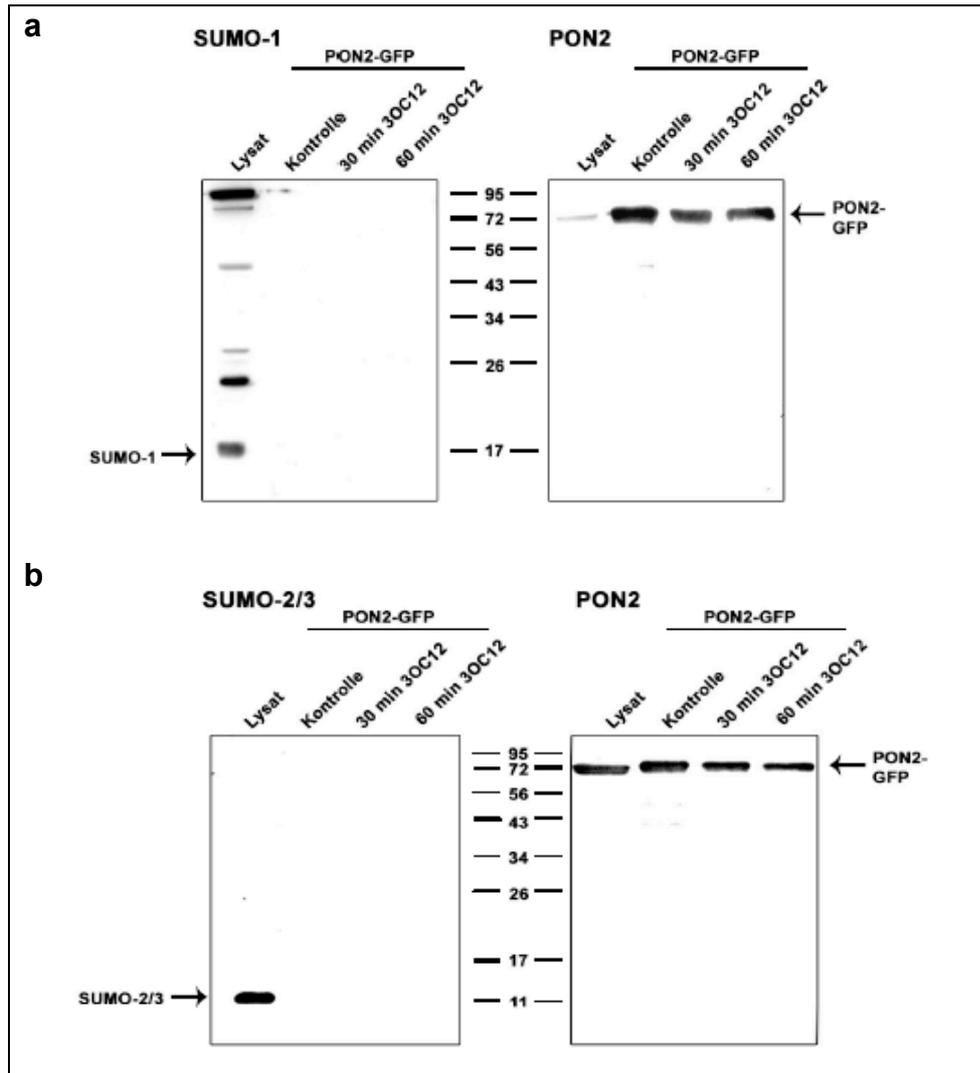


Abbildung 5-38: PON2 wird nicht durch 3OC12-Behandlung sumoyliert. Behandlung, Immunopräzipitation und Western Blot erfolgten analog zu Abbildung 5-36. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen SUMO-1 (a) und SUMO-2 / 3 (b) und gegen PON2 als Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Ergebnissen.

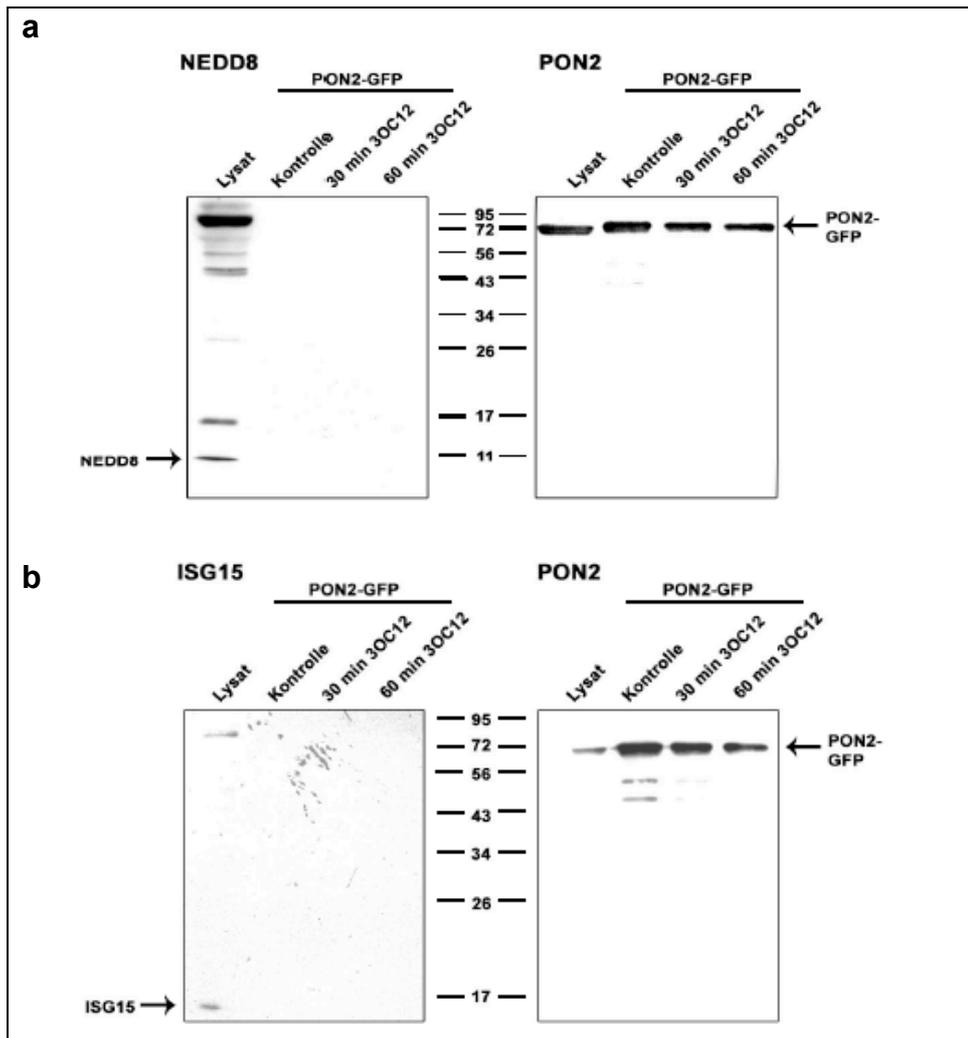


Abbildung 5-39: PON2 wird nicht durch 3OC12-Behandlung mit NEDD8- oder ISG15-markiert. Behandlung, Immunopräzipitation und Western Blot erfolgten analog zu Abbildung 5-36. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen NEDD8 (a) und gegen ISG15 (b) und gegen PON2 als Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Ergebnissen.

6 Diskussion

6.1 Die Rolle von PON3 in der Tumorbilogie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass humane PON3 in verschiedenen Neoplasien deutlich hochreguliert wird. Darüber hinaus führt die verstärkte PON3-Expression zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose. Vorherige Studien haben bisher die enzymatische Aktivität von PON3 charakterisiert und zeigen können, dass PON3 eine protektive Rolle gegenüber Fettleibigkeit und Arteriosklerose spielt^{86, 95}. Scheinbar kam dieser schützende Effekt durch eine Verminderung der Zellvermittelten LDL-Oxidation zustande^{92, 105}, jedoch konnte PON3 *in vitro* nicht vor einer Kupfer-induzierten LDL-Oxidation schützen⁸⁵. Mit hoher Wahrscheinlichkeit schützt PON3 durch ihre anti-oxidative Eigenschaft, für welche bisher unbekannte Cofaktoren benötigt werden. Bei diesem Cofaktor handelt es sich den Ergebnissen nach vermutlich um das Coenzym Q₁₀. Bemerkenswerterweise konnte hier gezeigt werden, dass die gleiche anti-oxidative Aktivität eine anti-apoptotische bzw. onkogene Rolle in Krebserkrankungen des Menschen spielt.

6.1.1 Paraoxonasen als mögliche Tumormarker

Tumormarker stellen ein nützliches Werkzeug dar, um den Verlauf der Krebserkrankung zu diagnostizieren. Seltener können diese der Früherkennung von Krebs dienen, wie beispielsweise eine Mutation im BRCA1-Gen (*breast cancer*), bei welcher es mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% zu einer Brustkrebserkrankung bei betroffenen Frauen im Laufe ihres Lebens kommt¹²⁶. Je mehr über die molekularen Ursachen einer Krebserkrankung bekannt ist, umso genauer können Voraussagen über Krankheitsverlauf oder voraussichtliches Ansprechen auf eine geplante Therapie getroffen werden. Ein solcher aktuell diskutierter prädikativer Biomarker ist das TRAP2E-Gen (*transcription factor AP-2 epsilon*), welches eine Vorhersage auf das Ansprechen von Darmkrebspatienten auf die Chemotherapie erlauben soll¹²⁷. Die Vorteile eines solchen Wissens liegen auf der Hand: Der Patient kann direkt mit dem für diesen Tumor wirksamen Chemotherapeutikum behandelt werden bzw. eine Behandlung mit einem Wirkstoff, für welchen der Tumor

resistent ist, kann dem Patienten einschließlich der Nebenwirkung somit erspart werden. Daher kommt der Suche von neuen Tumormarkern für individualisierte Verlauf- und Therapie-Prognosen eine bedeutende Rolle zu. Da oxidativer Stress von Mitochondrien eine wichtige Funktion in der Apoptose hat und zu Krebs führen kann, gewinnen Antioxidantien und Proteine mit anti-oxidativen Eigenschaften wie die Paraoxonasen zunehmend an Bedeutung. Im Folgenden soll daher unter Einbeziehung der hier erlangten Ergebnisse diskutiert werden, inwieweit die Paraoxonasen 1-3 als mögliche neue Tumormarker geeignet sein könnten.

Mit Hilfe eines cDNA-Arrays wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass PON3 in allen getesteten Krebsarten (außer Zervix) hochreguliert war. Dabei war PON3 um das 2- bis 3-fache in Tumorgeweben von Ovarien, Niere, Lymphknoten und Kolon hochreguliert. Besonders stark war die PON3-Hochregulation in Tumoren von Pankreas, Lunge, Blase, Schilddrüse, Prostata, Leber und Testes (>3-fach). Sogar um das >10-fache war die PON3-cDNA in Magen und Endometrium / Uterus erhöht. Diese Ergebnisse wurden mit einem Lungenkarzinom-cDNA-Array verifiziert, in welchem PON3 vor allem in älteren Patienten (60-65), in späteren Stadien (II und III) und in Plattenepithelkarzinomen hochreguliert war. Im Gegensatz zu PON2, welche ubiquitär exprimiert wird, war die PON3-Expression weitestgehend auf Zellen aus soliden Tumoren von Lunge, Leber und Kolon beschränkt und konnte nur in einer Leukämiezelllinie (KCI) gefunden werden. Im Rahmen einer Kooperation mit S. Reddy[°] konnte der Befund der erhöhten PON3-cDNA-Menge in Ovarialtumoren durch Proteindaten bestätigt werden, in welchen PON3 in Proben von Ovarialkarzinomen verglichen mit gesundem Ovargewebe aus dem gleichen Patienten hochreguliert war⁹⁷. Ein möglicher Grund für die starke Hochregulation der PON3-cDNA-Expressionslevel in den Krebsgeweben könnte in den basal niedrigen Mengen an PON3 im gesunden Gewebe liegen. Aufgrund dieser enormen Hochregulation in bestimmten Tumorgeweben könnte PON3 eventuell als geeigneter Tumormarker in bestimmten Krebsgeweben fungieren. Hierzu wären weitere Untersuchungen unter Einbeziehung einer ausreichend großen und homogenen Patienten-Gruppe notwendig. Um dies auch im HTS (*high throughput system*) anwenden zu können, müssten optimalerweise jedoch neue *read-out* Systeme geschaffen werden, da ein Western Blot hierzu ungeeignet ist. Denkbar wäre ein Ansatz, welcher die Lovastatinase-Aktivität von PON3 proportional als Fluoreszenz-Signal anzeigt. Dies wäre unter Umständen gerade bei Leukämien erfolgreich, weil die basale PON3-Expression und somit die Aktivität in Zellen des Blutsystems unter der Nachweisgrenze liegt.

Ähnlich könnte auch PON2 als ein solcher Marker für bestimmte Tumore dienen. In PON2-Microarray-Studien konnte eine Überexpression von PON2 in einigen soliden

[°] Department of Medicine, University of California, Los Angeles, California; USA

Tumoren aus Leber- und Prostata-Karzinomen gefunden werden^{128, 129}. Zudem wurde in Genexpressionsstudien in Leukämien eine Hochregulation von PON2 beobachtet, wie beispielsweise in pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämie (ALL)¹¹⁶. Interessanterweise wurde PON2 in einer anschließenden Studie als eines von fünf hochregulierten Genen in pädiatrischen ALL-Patienten identifiziert, deren Krankheitsverlauf eine schlechte Prognose hatte¹¹⁷. In diesen Patienten war die Wahrscheinlichkeit auf ein Ansprechen auf die üblicherweise eingesetzten Chemotherapeutika bei ALL wie beispielsweise die Anthracycline Doxorubicin und Daunorubicin gering¹¹⁷. Demnach könnte diesen Kindern die kaum aussichtsreiche Behandlung mit Chemotherapeutika der Erstlinientherapie erspart bleiben, während alternative wirksamere Chemotherapeutika gefunden werden müssten. In einer anderen Leukämie, der chronischen myeloische Leukämie (CML), wurde die Genexpression von PON2 mit einer primären Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Imatinib (Glivec®) assoziiert¹¹⁸. Demnach könnte PON2 als Tumormarker in CML-Patienten eine Aussage darüber ermöglichen, ob eine Therapie mit Imatinib überhaupt sinnvoll bzw. erfolgversprechend wäre. Interessanterweise waren Zellen, in welchen PON2 durch einen *knock-down* herunterreguliert war, empfindlicher für die Behandlung mit Doxorubicin (Endothelzellen EA.hy 926) bzw. für Imatinib (CML-Zellen K562)¹⁰²; folglich könnte hier PON2 ein Angriffsziel für zukünftige Krebstherapien darstellen (siehe auch 6.1.3). Ferner wurde eine PON2-Überexpression in Lymphozyten gefunden, welche mit einem T-Zell Leukämievirus infiziert waren¹³⁰. In Studien der Arbeitsgruppe wurde übereinstimmend mit cDNA-Daten gezeigt, dass der PON2-Gehalt in einigen Tumoren auf Proteinebene erhöht ist. In verschiedenen Tumoren in cDNA-Arrays war PON2 hochreguliert, so wiesen Harnblase, Leber, Niere, Lymphome und Endometrium / Uterus eine 2-4-fache PON2-Hochregulation gegenüber normalen Geweben auf¹⁰². Auf Proteinebene war PON2 in Pankreas-, Leber-, Nieren-, und Lungen-Tumoren überexprimiert, wobei die stärkste Hochregulation (>10-fach) in Tumoren aus Thymus und Non-Hodgkin-Lymphomen auftrat¹⁰².

Auch für PON1 wäre eine Rolle als Tumormarker denkbar, zumindest wurde das Q-Allel von PON1 häufiger in Nierenkarzinom-Patienten gefunden¹³¹ und gezeigt, dass verschiedene PON1-Genotypen zu einem erhöhten Prostatakrebsrisiko neigen¹³². Weiter wurden die PON1 Allele Q192R und L55M, bei welchen der Aminosäureaustausch zu einer veränderten PON1-Aktivität führte, mit einem 18-29% erhöhten Risiko für aggressiven Prostatakrebs assoziiert¹³³.

6.1.2 PON3 als anti-apoptotisches Enzym in den Mitochondrien

Nachdem demonstriert wurde, dass PON3 in zahlreichen Tumorgeweben hochreguliert wird, stellte sich die Frage nach der biomedizinischen Relevanz und dem Mechanismus. Dafür war es entscheidend, sowohl die Lokalisation von PON3 als auch ihre anti-oxidative und anti-apoptotische Wirkung genauer zu betrachten. Hierbei wurde gezeigt, dass PON3 gegen verschiedene apoptotische Stimuli schützen konnte, deren gemeinsame Nenner die Mitochondrien in der Ausführung der Apoptose darstellten. Im Folgenden werden die PON3-Lokalisation, ihre Funktion in den Mitochondrien und der anti-apoptotische Mechanismus von PON3 diskutiert.

PON3 schützt vor der intrinsischen Apoptose

Mittels konfokaler Lasermikroskopie in HEK296-Zellen wurde nachgewiesen, dass PON3 in den Mitochondrien und im ER lokalisiert vorliegt. Auch die Zellfraktionierung von A549-Zellen weist deutlich auf eine Lokalisation von PON3 in Mitochondrien und ER hin. Bisher ist nichts darüber bekannt, wie PON3 oder auch PON2 in diese Membranen kommen. Verschiedene *Software-Tools* haben nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für PON2 und PON3 für eine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt und identifizierten keine der typischen Mitochondrien-Lokalisations-Sequenz⁹⁷. Zudem ist bisher keine mögliche Interaktion mit einem Membranrezeptor beschrieben worden, welcher die Membranintegration bewirken könnte. PON3 besitzt eine ähnliche Aminosäuresequenz zu der von sekretierter PON1 und vermutlich auch Übereinstimmungen in der räumlichen Struktur. Daher könnte der N-Terminus von PON3 ähnlich wie bei PON1^{134, 135} als Lipidanker dienen und genügend positiv geladene Reste bzw. amphiphil genug für einen mitochondrialen Import sein. Folglich ist PON3 mit seinem N-Terminus in der Membran verankert, aber es konnte methodisch nicht aufgelöst werden, ob PON3 aus der inneren Mitochondrienmembran (IMM) in den Intermembranraum oder in Richtung mitochondrialer Matrix orientiert ist.

Mit Hilfe von Mito-HE wurde spezifisch mitochondriales Superoxid detektiert. PON3 konnte dabei die Superoxid-Produktion nach Hemmung des Komplex I durch Rotenon und Komplex III durch Antimycin A vermindern. Dies erlaubt entscheidende Schlussfolgerungen bzgl. der Topologie der anti-oxidativen PON3 Funktion. Durch Inhibition des Komplex III mit Antimycin A wird die Superoxidbildung auf beiden Seiten der IMM induziert, indem die Elektronen nicht mehr von CoQ auf Cyt c übertragen werden können. Die radikalische Zwischenstufe von CoQ, das Ubisemichinon (QH⁻), bleibt durch die Blockade der Q_r-Stelle des Komplex III länger an der Q₀-Stelle und überträgt durch Autooxidation sein freigesetztes Elektron beidseitig der Membran auf Sauerstoffmoleküle, wodurch Superoxid (O₂⁻) entsteht.

Rotenon hingegen führt zur Superoxidbildung auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran, indem es die Übertragung der Elektronen aus Komplex I auf CoQ blockiert. Folglich kann PON3 die Entstehung von ROS an zwei unterschiedlichen Positionen in der Mitochondrienmembran verhindern. CoQ bewerkstelligt den Elektronentransfer zwischen den Komplexen I und III; somit stellt der Transporter die einzige Gemeinsamkeit der beiden O_2^- -Quellen dar, die durch PON3 moduliert wurden. Dies legt nahe, dass PON3, ähnlich wie für PON2 bereits vermutet^{100, 103}, ihre anti-oxidative Wirkung über die Bindung an CoQ vermittelt. Hierfür sprechen auch Daten, die im Rahmen der Kooperation mit S. Reddy^e generiert wurden, welche die Bindung von CoQ an PON3 mittels Massenspektrometrie und SPR-Analysen (*surface plasmon resonance*) belegen⁹⁷. Vermutlich wirkt PON3 als Isolator indem sie verhindert, dass radikalische Zwischenstufen des CoQ mit Sauerstoff in Kontakt kommen bzw. Superoxid entsteht. Dies müsste jedoch im Weiteren durch strukturelle Analysen bestätigt werden. Zwar gibt es Studien, in welchen eine solche Isolationswirkung von Proteinen vorgeschlagen wird, jedoch sind bisher keine konkreten Beispiele bekannt^{136, 137}.

Auch wenn nur vermutet werden kann, wie PON3 die Entstehung von Superoxid verhindert, so sprechen die Daten dafür, dass PON3 durch ihre anti-oxidative Eigenschaft die Zelle vor der Apoptose schützt. Der intrinsische Apoptose-Signalweg wird über die Freisetzung von Cyt c aus den Mitochondrien ausgelöst, welche teilweise durch das Mitochondrien-spezifische Lipid Cardiolipin kontrolliert wird¹³⁸ (siehe 1.2.1). Als potenter Induktor für den intrinsischen Apoptose-Signalweg wurde hier Staurosporin (STS) verwendet. STS wurde zunächst als spezifischer PKC-Inhibitor beschrieben¹³⁹, was allerdings inzwischen widerlegt wurde. Tatsächlich inhibiert STS eine Vielzahl verschiedener Kinasen, wie z.B. Proteinkinase A (PKA), Phosphorylase-Kinase, RSK (*ribosomal protein S6 kinase*), EGFR-Kinase und Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (Ca / CaM PKII)¹⁴⁰⁻¹⁴³ und wird deshalb auch als Breitbandkinaseinhibitor bezeichnet. Insgesamt konnte jedoch bisher keine Kinase identifiziert werden, durch welche die apoptotische Wirkung des STS spezifisch vermittelt wird. Die Apoptose-Induktion erfolgt im Falle von STS über den mitochondrialen Apoptose-Signalweg unabhängig vom Todesrezeptorsignalweg¹⁴⁴ und kann durch Bcl-2 inhibiert werden¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Auch wenn der genaue Mechanismus von STS nicht geklärt ist, kann es als potenter Induktor von ROS, Cyt-c-Freisetzung und der Apoptose genutzt werden. Eine Zunahme an Superoxid in den Mitochondrien durch Behandlung mit STS führt zur Peroxidation des Cardiolipins – was aufgrund einer dadurch induzierten Strukturänderung von Cardiolipin zum Verlust der Interaktion mit Cyt c führt¹⁴⁸. Diese Peroxidation konnte durch PON3 vermutlich durch ihren Schutz vor der O_2^- -Bildung verhindert werden. Peroxydiertes Cardiolipin kann Cyt c nicht mehr binden, wodurch der lösliche Pool an Cyt c bzw. die Cyt-c-Freisetzung vergrößert wird. Des Weiteren führt die

STS-induzierte Cyt-c-Freisetzung zu einer Störung der ETC und zu einem Verlust des Membranpotentials. PON3 konnte sowohl die Cyt-c-Freisetzung als auch den Verlust des Membranpotentials deutlich vermindern, sehr wahrscheinlich ebenfalls durch ihre antioxidative Eigenschaft bzw. durch ihren Schutz vor der Cardiolipin-Peroxidation. Des Weiteren verminderte eine PON3-Überexpression die durch STS-vermittelte intrinsische Apoptose in EA.hy 926-Zellen und die Cytotoxizität in HEK293-Zellen. Ergänzende Daten wurden im Rahmen der Kooperation mit S. Reddy^e erhalten, in welchen die PON3-Überexpression in HeLa-Zellen zu einem Schutz vor der durch Myxothiazol ausgelösten Apoptose führte⁹⁷. Ähnlich wie STS verursacht auch Myxothiazol eine erhöhte O₂⁻-Produktion in den Mitochondrien, indem es die Elektronenübertragung von Komplex III auf Cyt c verhindert. Folglich kann auch hier der anti-apoptotische Effekt von PON3 auf ihre Fähigkeit zurückgeführt werden, die O₂⁻-Produktion in den Mitochondrien zu vermindern. Der Schutz vor der O₂⁻-Entstehung stellt wahrscheinlich die Hauptfunktion von PON3 dar und weist auf ihre natürliche Rolle hin, in welcher sie physiologischem oxidativem Stress der Zelle entgegenwirken könnte.

Die Rolle von PON3 in anderen Apoptose-Signalwegen

Der ER-Stress-Signalweg *unfolded protein response* (UPR) moduliert das Zellüberleben und ist damit hochrelevant für Krebs und inflammatorische Prozesse¹⁴⁹. Somit stellt er einen Ansatzpunkt für neue therapeutische Entwicklungen dar, in welchem CHOP eine fundamentale Rolle als Mediator des Gleichgewichts von Zellüberleben und -tod spielt^{67, 150}. Die Expression des pro-apoptotischen CHOP kann durch JNK aktiviert werden, was wiederum die Caspase-Aktivierung und Apoptose zur Folge haben kann, sofern CHOP ausreichend lang und konzentriert vorliegt (siehe 1.2.3). PON3 schützt vor der UPR-vermittelten Apoptose nach Tunicymacin, was sich zum einen in einer verminderten CHOP-Expression zeigte. Zum anderen vermindert PON3 die Aktivierung von JNK und schwächt die nachfolgende Caspase-3/7-Aktivierung ab. In vorherigen Studien konnte die zu PON3 paraloge PON2 ebenso gegen UPR-vermittelten Zelltod schützen¹⁰². Weiter wurde gezeigt, dass PON2 nicht die CHOP-aktivierenden UPR-Faktoren ATF6, XBP1 oder p-eIF2a beeinflusst¹⁰²; somit ist der genaue Mechanismus des PON2-vermittelten Schutzes unklar. Daher müsste in weiteren Studien aufgeklärt werden, ob PON2 bzw. PON3 über ihre mitochondrialen Effekte schützen oder ob sie den Signalweg von IRE1 zu TRAF2 / ASK1, vom ER zu den Mitochondrien oder von lokalen ROS / Ca²⁺-Antworten modulieren. Weiter müsste aufgedeckt werden, wie PON2 / PON3 die JNK-Phosphorylierung vermindert. Beispielsweise kann JNK über die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden¹⁵¹, jedoch belegen die hier erlangten Daten, dass PON3 die PKC-vermittelte JNK-Aktivierung nicht

modulieren kann. Da JNK auch durch ROS aktiviert werden kann, schützt PON3 wahrscheinlich durch ihre anti-oxidative Eigenschaft oder durch einen mitochondrialen Effekt vor der JNK-Phosphorylierung.

Es wurde gezeigt, dass PON2 nicht gegen die Behandlung mit TNF- α / Act D oder TRAIL in EA.hy 926-Zellen schützt¹⁰². Ähnlich wie PON2, konnte auch PON3 die extrinsische Apoptose nach gleichzeitiger Behandlung mit TNF- α und Act D in EA.hy 926-Zellen nicht beeinflussen bzw. die Caspase-3/7-Aktivierung nicht abschwächen. Im Gegensatz dazu vermindert PON3 die Caspase-3/7-Aktivierung deutlich nach alleiniger Behandlung mit Act D oder STS. Demnach ist PON3 nicht in der Lage, den Liganden-induzierten Zelltod in Typ-I-Zellen (EA.hy 926) zu verhindern, in welchen die Rezeptorbindung von Caspase-8 ohne die Einbindung der Mitochondrien ausreichend stark Zelltod auslösen kann. Es wäre denkbar, dass PON3 aufgrund ihres anti-oxidativen Effektes in den Mitochondrien die extrinsische Apoptose in Typ-II-Zellen vermindern könnte. Diese benötigen für die Apoptoseinduktion die Mitochondrien für eine Rückkopplungsschleife zur Signalverstärkung bzw. für eine verstärkte Caspase-3/7-Aktivierung. Jedoch konnten Analysen im Rahmen der Kooperation mit S. Reddy^e zeigen, dass PON3 auch in HeLa-Zellen (Typ-II) nicht in der Lage war, gegen die durch TNF- α / Act D induzierte Caspase-3/7-Aktivierung zu schützen⁹⁷. Ebenso schwächte weder eine Überexpression von PON2 noch PON3 nach Behandlung mit TRAIL die Caspase-3/7-Aktivierung ab⁹⁷. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von Typ-II-Zellen mit TNF- α / Act D zur Apoptose unabhängig von Bid-Spaltung, Bax / Bak oder Cyt-c-Freisetzung führt¹⁵². Dies könnte erklären, weshalb PON3 hier keinen schützenden Effekt hat, da die TNF- α / Act D-Behandlung in Typ-II-Zellen zu einer Mitochondrien-unabhängigen Typ-I-Apoptose führt. Weiterhin wäre zu erwarten gewesen, dass PON3 die TRAIL-vermittelte Apoptose abschwächen könnte, jedoch ist die Apoptose-Induktion über die Todesrezeptoren eventuell zu stark als das PON2 bzw. PON3 über die Mitochondrien noch schützen könnten.

Apoptose kann auch durch DNA-schädigende Agenzien ausgelöst werden, welche über p53 und der Aktivierung von Bax zur Cyt-c-Freisetzung und Caspase-Aktivierung führen (siehe 1.2.2). Somit läuft auch dieser Signalweg über die Mitochondrien, weshalb eine Schutzfunktion von PON3 vermutet wurde. Tatsächlich konnte PON3 in EA.hy 926-Zellen teilweise vor Cisplatin schützen, welches durch DNA-Schädigung bzw. deren Alkylierung zur Apoptose führt. Obwohl seit langem bekannt ist, dass Cisplatin die nukleären DNA-Stränge miteinander querverknüpft und dadurch die Replikation gestört wird, wird kontrovers diskutiert, wie Cisplatin die Apoptose induziert^{153, 154}. Erstaunlicherweise binden nur ca. 1% des intrazellulären Cisplatin an nukleäre DNA¹⁵⁵. Es wird vermutet, dass Cisplatin vielmehr direkt an den Mitochondrien wirkt¹⁵³. Dabei wurde die Cisplatin-Behandlung mit einer Lokalisation von p53 aus dem Zellkern in die Mitochondrien und einer verstärkten Bindung

des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A an Cisplatin-geschädigte mitochondriale DNA assoziiert¹⁵⁶. Zum anderen wird diskutiert, dass Cisplatin seine apoptotische Wirkung durch ein bisher unbekanntes nukleäres Ereignis direkt über die Translokation von Bax zu den Mitochondrien vermittelt und dadurch zur Cyt-c-Freisetzung führt¹⁵³. Eventuell könnte Cisplatin auch an VDAC binden und die Poren zusammen mit anti-apoptotischen Faktoren der Bax / Bcl-2-Familie vergrößern¹⁵³. Die hier ermittelten Daten bestärken die Hypothese eines mitochondrialen Effektes von Cisplatin, da der Schutz von PON3 in den Mitochondrien vermutlich auf der Abschwächung der O_2^- -Produktion beruht, welche durch den Cisplatin-induzierten Verlust des Cyt c bzw. eines verstärkten Umsatzes in der Elektronentransportkette ausgelöst wird.

PON3 in der Schnittstelle zwischen Mitochondrien und ER

PON3 konnte ebenso wie PON2 vor der intrinsischen, DNA-vermittelten und ER-Stress-induzierten Apoptose schützen. Allen Apoptose-Signalwegen gemeinsam ist die entscheidende Rolle der Mitochondrien, welche die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren vermitteln. Eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität aufgrund einer verminderten O_2^- -Produktion könnte der Schlüssel des PON2/3-vermittelten Schutzes darstellen. Aufgrund der Lokalisation von PON2/3 nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch im ER und dem Befund, dass PON2/3 vor der ER Stress-induzierten JNK-Aktivierung schützen, scheinen beide PONs eine bisher weitestgehend unbekannte Rolle im ER zu spielen. Ein denkbares Modell wäre, dass PON2/3 als Schnittstelle zwischen Mitochondrien und ER ihre anti-oxidative Funktion ausüben könnten (siehe Abbildung 6-1). Es ist seit langem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bekannt, dass Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen direkt mit dem ER assoziiert vorliegen können¹⁵⁷. Es wäre aber auch denkbar, dass die äußere mitochondriale Membran (OMM) mit der ER-Membran verschmilzt und PON2/3 dadurch in Kontakt mit dem ER-Lumen treten. Aufgrund der vermuteten Rolle von PON2/3 als Isolatoren des CoQ sind die beiden Enzyme wahrscheinlich in der inneren mitochondrialen Membran (IMM) lokalisiert und könnten durch die Membranverschmelzung in direkten Kontakt zu ER-Rezeptoren gelangen. Hierfür spricht, dass die OMM sehr fluide ist und häufig Fusionierungen und Teilungen zwischen Mitochondrien stattfinden¹⁵⁸. Des Weiteren wurden bisher lokale, stabile Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und dem ER beschrieben, die der Ca^{2+} -Regulation dienen¹⁵⁹, bei welchen es sich um quasi-synaptische Verbindungen handelt¹⁶⁰. Wahrscheinlich schließt sich die mitochondriale Außenmembran mit der des ER zusammen und bildet die sogenannte MAM (*mitochondria-associated ER-membrane*), die dem Signalaustausch zwischen ER und Mitochondrien dient¹⁶¹⁻¹⁶³. Diese Befunde belegen die hohe Dynamik in

der OMM-Fusionierung und die enge Verbindung zwischen ER und Mitochondrien, weshalb eine partielle Verschmelzung der Membranen durchaus denkbar wäre. PON2/3 könnten in der intrinsischen Apoptose somit über die verminderte O_2^- -Produktion vor der Cardiolipin-Peroxidation und damit vor der Cyt-c-Freisetzung schützen, was zu der Abschwächung in der Apoptose führt. Der Schutz vor der DNA-vermittelten Apoptose kommt vermutlich ebenfalls durch die Fähigkeit von PON2/3 zustande, nach der p53-vermittelten Cyt-c-Freisetzung die Mitochondrien vor einer Apoptose-fördernden verstärkten O_2^- -Produktion zu bewahren. Da auch in der distalen ER-Stress-Antwort die Mitochondrien beteiligt sind, könnten auch hier PON2/3 die Integrität der Mitochondrien bewahren bzw. die JNK-Aktivierung und CHOP-Expression vermindern. Die Abschwächung von JNK bzw. CHOP könnte aber auch durch einen anti-oxidativen Effekt direkt am ER erklärt werden: PON2/3 könnten den ROS-Gehalt im ER vermindern und dadurch die JNK-Aktivierung abschwächen oder durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die JNK-Aktivierung über den ER-Rezeptor IRE1 und über ASK1 verringern. Möglicherweise könnte PON2/3 ebenfalls durch Interaktion mit CoQ den ROS-Gehalt im ER verringern; dazu passend wurde CoQ auch in ER-Membranen gefunden ¹⁶⁴.

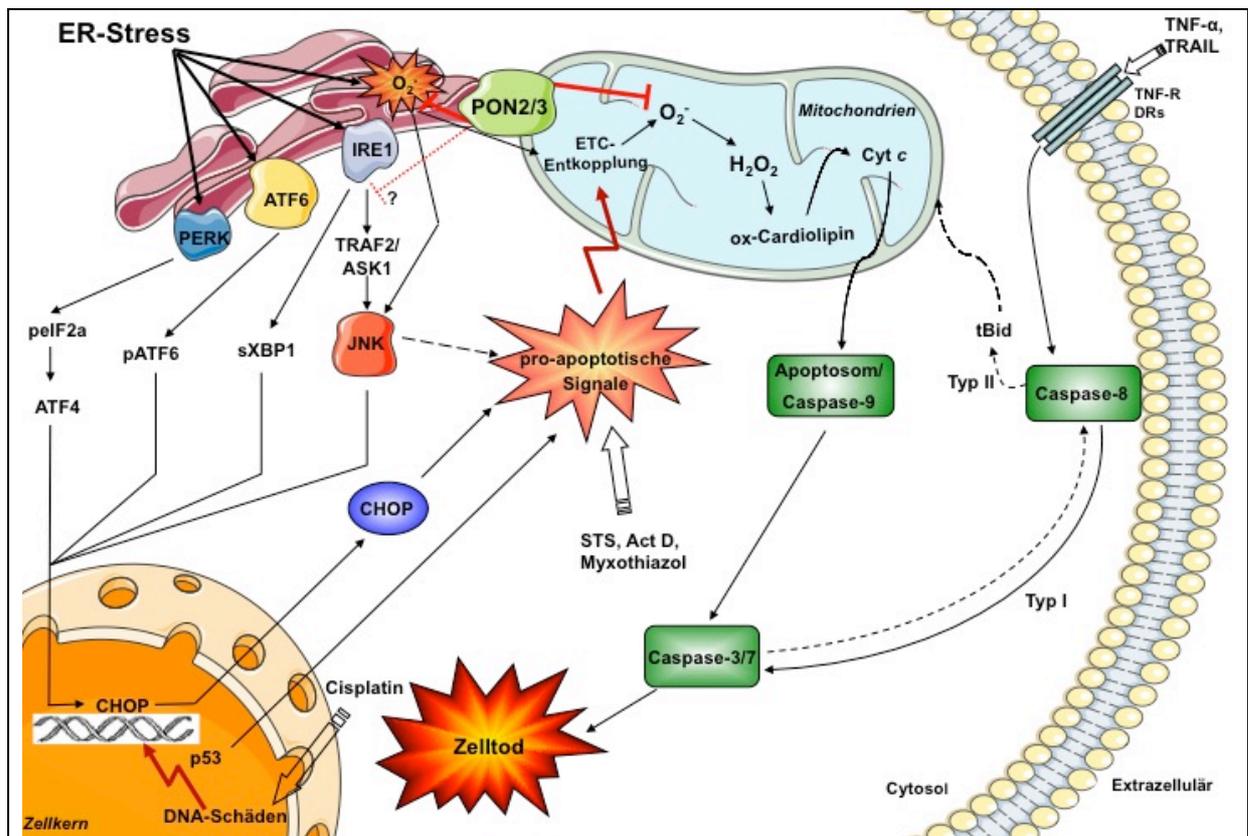


Abbildung 6-1: PON2 bzw. PON3 in der Schnittstelle zwischen ER und Mitochondrien. Die beiden anti-oxidativen Enzyme PON2 und PON3 vermitteln ihren Schutz gegenüber intrinsischer, DNA-vermittelter und ER-Stress-induzierter Apoptose vermutlich an der Schnittstelle zwischen ER und Mitochondrien. Abkürzungen und weitere Erläuterungen gemäß Text.

6.1.3 Paraoxonasen als *tumor target*?

PON2 und PON3 können beide gegen mitochondrial-vermittelten Zelltod schützen, indem sie die pro-apoptotische mitochondriale O_2^- -Produktion vermindern^{97, 102}. Eine Hochregulation von PON2 bzw. PON3 in Krebszellen schützen diese vermutlich vor der O_2^- -Produktion, die aufgrund des höheren Stoffwechselumsatzes der proliferierenden Zellen und aufgrund der oft hypoxischen Umgebung erhöht ist. Die Krebszelle ist durch ihre Fähigkeit vor dem Zelltod zu entkommen entscheidend gekennzeichnet⁴¹, wobei eine verminderte O_2^- -Produktion vorteilhaft für die Krebszelle im Überleben sein kann, da ROS zur Apoptose führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass eine PON3-Überexpression die Zelle vor verschiedenen Chemotherapeutika (z.B. Staurosporin, Actinomycin D, Cisplatin) schützen kann. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass ein PON3-*knock-down* die Zellen anfälliger für die Behandlung mit Chemotherapeutika machen könnte. In vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte bereits ein solcher Effekt für PON2 gezeigt werden: Der *knock-down* machte die Zellen zum einen anfälliger für die Behandlung mit Chemotherapeutika, zum anderen löste dieser sogar eine spontane Apoptose in einigen Tumorzelllinien aus¹⁰². Letzterer Befund war eher unerwartet, da PON2-defiziente Mäuse lebensfähig sind, während die verbleibende PON2-Expression in diesen Mäusen ungefähr vergleichbar mit der in RNAi-Zellkulturexperimenten sein dürfte¹⁰¹. Jedoch konnten keine ähnlichen Ergebnisse für PON3 erzielt werden: Der *knock-down* von PON3 erhöhte in keiner der getesteten Zelllinien aus Tumoren der Lunge (A549), Leber (HepG2) und Kolon (Caco-2) die Empfindlichkeit für Chemotherapeutika und löste auch keine spontane Apoptose aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bisher nicht die Tumorzelllinie getestet wurde, welche empfindlich für einen PON3-*knock-down* ist. Hierfür würde die Tatsache sprechen, dass auch nur die Hälfte der getesteten Zellen auf einen PON2-*knock-down* reagierten¹⁰². Eventuell ist auch die generelle PON3-Expression zu gering, um einen vergleichbaren Effekt wie für PON2 zu erzielen. Dennoch bietet die PON3-Überexpression den Tumorzellen einen enormen antioxidativen und anti-apoptotischen Vorteil, wodurch die hochregulierte PON3 ein gutes Angriffsziel in der Krebstherapie (*tumor target*) darstellen könnte. Möglicherweise könnte auch die gemeinsame Runterregulation von PON2 und PON3 ein Ansatzpunkt bieten, da beide in den Mitochondrien eine anti-apoptotische Funktion ausüben, jedoch in unterschiedlicher Stärke in verschiedenen Tumorgeweben hochreguliert sind. Eine spannende Frage hierbei wäre es herauszufinden, wie die PON2/3-Expression in Tumorzellen hochreguliert wird. In verschiedenen Tumoren wie beispielsweise in Prostata-Adenokarzinomen wird das Chromosom 7 amplifiziert¹²⁹. Auf diesem ist auch das PON-Cluster lokalisiert; somit könnte die Amplifizierung des Chromosoms zu einer Hochregulation der PON-Expression beitragen. Alternativ könnten die PONs auch durch jene Signalwege

hochreguliert werden, die mit ROS und Krebs in Verbindung gebracht werden, wie z.B. PPAR- γ , AP-1, β -Catenin / Wnt, NF- κ B, HIF-1 α , PI3K, und Nrf2¹⁶⁵. In Übereinstimmung hierzu konnten frühere Studien zeigen, dass die PON2-Expression durch oxidativen Stress¹⁶⁶, PI3K / PDGFR, PPAR γ , NADPH-Oxidase- oder AP-1-Aktivierung erhöht werden konnte^{167, 168}. Basierend auf den hier erzielten Ergebnissen erscheint es wahrscheinlich, dass die Krebszelle die anti-oxidative Funktion von PON2 bzw. PON3 nutzt, um dem Zelltod zu entkommen. Daher könnte die Aufklärung der PON2/3-Expressionsregulation helfen, einen Weg zu finden, um PON2/3 spezifisch in Tumorzellen herunterzuregulieren bzw. auszuschalten.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Rolle von PON3 in Krebs könnten Mausmodelle mit einer PON3-Überexpression von transgener humaner PON3 oder PON3-*knock-out* Tiere darstellen. Shih et al. haben kürzlich ein transgenes Mausmodell für PON3 etabliert, deren Befunde bestätigen, dass humane und murine PON3 sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden^{95, 166}. Daher könnte das Mausmodell mit humaner PON3 in seinen Möglichkeiten bzw. in seiner Relevanz limitiert sein bzw. benötigt eine genaue Verifikation der Lokalisation und Funktion. Darüber hinaus ist die hydrolytische Aktivität von muriner PON3 unklar und aufgrund bisher unbekannter Mechanismen wurde ein geschlechtsspezifischer Effekt für PON3 bezüglich Arteriosklerose und Adipositas beobachtet⁹⁵. Daher wäre es zur Untersuchung von PON3 in humanen Tumoren sinnvoll, primäres Tumormaterial zu verwenden bzw. neue adäquate *in vivo* Modelle zu testen. Falls dies erfolgreich sein sollte, könnten solche Studien die klinische Relevanz von PON3 entschlüsseln und helfen, neue therapeutische Strategien zu entwickeln, welche auf PON3 zielen.

PON1 wurde zwar bisher nur HDL-assoziiert gefunden, könnte aber eventuell auch ein Anti-Tumor-Ziel darstellen. Als extrazelluläres Protein ist PON1 vermutlich nicht in der Lage, anti-apoptotisch in der Zelle zu wirken. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass PON1 teilweise zurück von HDL-Partikeln in die Zelle gelangen kann und dort weiter anti-oxidativ wirken kann¹⁶⁹. Zudem wurde der PON1-Genotyp mit verschiedenen Tumoren wie Nierenkarzinom, Brust-, Ovar- und Prostata-Krebs in Verbindung gebracht⁸⁸. Somit könnte PON1 zusammen mit intrazellulärer PON2 und PON3 einen anti-apoptischen Effekt in Tumorzellen haben bzw. eine Angriffsstelle für Tumorthapien darstellen, in welchen alle drei PONs eventuell herunterreguliert werden könnten. Ferner bestärken die Ergebnisse, dass Redox-Signalwege eine wichtige Funktion in der Krebsentstehung spielen. Daher bieten diese eine hilfreiche Zielstruktur für therapeutische Ansätze gegen Krebs.

6.2 Wie PON2 und PON3 durch ihre anti-oxidative Eigenschaft vor *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren schützen können

Wie in 1.4 aufgeführt, erstreckt sich die derzeitig wirksame Therapieoption bei bestehenden *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen auf die Antibiotika Piperacillin, Cephalosporine (\pm Aminoglykoside), Fluoroquinolone und Carbapeneme. Die antibiotische Eradikation von *P. aeruginosa* wird jedoch häufig dadurch erschwert, dass die Bakterien Multi-Resistenzen entwickeln und einen Biofilm bilden, welcher die Bakterien unzugänglich für Antibiotika macht. Zudem sekretiert *P. aeruginosa* verschiedene Virulenzfaktoren, welche die bakterielle Kommunikation regulieren und den infizierten Wirt schädigen. Daher ist es wichtig, die Wirt-Pathogen-Interaktion von *P. aeruginosa* zu verstehen, um neue mögliche Therapien zu entwickeln. Zusammen mit Ergebnissen aus vorherigen Studien zeigen die Daten dieser Arbeit, dass PON2 und PON3 einen Abwehrmechanismus gegen den durch Virulenzfaktoren induzierten oxidativen Stress, inflammatorische Antwort und Cytokin-Freisetzung bilden ^{109, 111, 170}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PON2 und PON3 vor dem PCN-induzierten Schaden in der Wirtszelle schützen können. Aus Studien der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass die PCN-induzierte ROS-Produktion durch PON2 vermindert wird ¹¹¹. Hier wurde mit verschiedenen Techniken in unterschiedlichen Zelllinien gezeigt, dass PCN zur ROS-Produktion, NF- κ B-Aktivierung und IL-8-Sekretion führt, welche durch Überexpression von PON2 oder PON3 verringert wurden. Hierfür wurden v.a. Systeme gewählt, die relevant für eine *P. aeruginosa* Infektion sind, wie Epithelzellen (EA.hy 926) und Lungenepithelzellen (A549) – da die Bakterien insbesondere Brandwunden oder andere Hautverletzungen sowie Lungeninfektionen als Eintrittspforte nutzen. Vorherigen Studien ergaben, dass PCN die Produktion von O_2^- und H_2O_2 induziert, was Schäden in verschiedenen Zelllinien verursachte ⁷⁵. Die Überexpression von PON2 und PON3 führte zu einer signifikanten Verminderung der ROS-Produktion in EA.hy 926- und HEK293-Zellen, was den protektiven Effekt beider Enzyme gegenüber PCN-induzierten oxidativen Schäden widerspiegelt. Interessanterweise unterscheiden sich PON2 und PON3 in ihrer Substratspezifität: PON2 hat eine dominante Lactonase-Aktivität, während PON3 eine viel bessere Aktivität für einige große Lactone oder Arylester (z.B. Statine, Estradiolacetate) besitzt. Daraus kann gefolgert werden, dass der Schutz von PON2 und PON3 nicht über die Lactonase-Aktivität vermittelt wird, sondern vielmehr durch einen gemeinsamen anti-oxidativen Mechanismus. Dabei scheint der anti-oxidative Effekt von PON3 unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität zu sein, ähnlich wie es bereits durch vorherige Studien für PON2 gezeigt werden konnte ¹⁰³. Wie oben bereits erläutert, agieren PON2 und PON3

vermutlich an der inneren mitochondrialen Membran als Isolator von CoQ, was zu einer verminderten Superoxid-Produktion führt^{97, 100, 103}, die offensichtlich direkt oder indirekt durch PCN ausgelöst wurde.

Die hier erzielten Daten weisen auf eine Rolle für NF- κ B als Mediator zwischen Effekten der ROS-Bildung, welche durch PCN ausgelöst wird und pro-inflammatorischen Immunantworten durch die IL-8-Sekretion hin. Bekannterweise wird NF- κ B durch Redox-Signale reguliert und könnte demnach durch den PCN-induzierten oxidativen Stress aktiviert werden. In Übereinstimmung hierzu war PCN in der Lage NF- κ B zu aktivieren, was durch PON2 oder PON3 abgeschwächt wurde. In vorherigen Studien wurde beobachtet, dass PCN die IL-8-Expression in humanen Lungenepithelzellen erhöht¹²⁴. Ähnlich wurde eine erhöhte IL-8-Sekretion in EA.hy 296-Zellen durch PCN gezeigt, während diese durch Überexpression von PON2 oder PON3 verringert worden ist. Hierbei wurden noch zahlreiche andere pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine auf ihre PCN-induzierte Freisetzung untersucht, jedoch war IL-8 der einzig nachweisbar sekretierte Faktor. Somit scheint interessanterweise primär IL-8 die endotheliale PCN-induzierte Inflammation zu vermitteln. Weiter ist bekannt, dass die Aktivität des IL-8-Promotor und die IL-8-Expression durch NF- κ B aktiviert werden kann^{171, 172}. Zusammenfassend resultieren die anti-inflammatorischen Eigenschaften von PON2 und PON3 wahrscheinlich auf ihrer Fähigkeit, die ROS-Produktion zu verringern, während weniger oxidativer Stress zu einer verminderten NF- κ B-Aktivierung und IL-8-Freisetzung führt.

Des Weiteren wurde der Effekt von 3OC12 auf die Hydrolyseaktivität, mRNA und Protein von PON3 aufgeklärt. Im Gegensatz zu PON2¹¹¹ wurde die PON3-mRNA nicht aktiv abgebaut; demnach wird die Stabilität der beiden mRNAs vermutlich über unabhängige Mechanismen reguliert. Der PON3-Proteingehalt wurde dagegen deutlich durch die 3OC12- oder Thapsigargin-Behandlung verringert. Thapsigargin wurde als Vergleichssubstanz eingesetzt, da es wie 3OC12 eine starke Ca^{2+} -Fluktuation induziert. Durch Blockade der SERCA (Sarcoplasmatische / Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase) führt es zu einer Entleerung des Ca^{2+} -Speichers im ER. Wie für PON2 bereits gezeigt¹¹¹, induziert eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase ebenfalls eine PON3-Degradation. Dies erfolgt für PON2 und PON3 möglicherweise in einem analogen, Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus, da die Degradation in beiden Fällen ähnliche Kinetiken (3OC12) und Konzentrations-Abhängigkeiten (Thapsigargin) zeigte. Ähnlich wie bei PON2 wurde die hydrolytische Aktivität von PON3 viel ausgeprägter und schneller verringert als das Protein abgebaut wurde. Da beide Enzyme nach derzeitigem Wissenstand keine Cofaktoren für die Enzymaktivität benötigen weist dies darauf hin, dass ein post-translationaler Effekt direkt für die Inaktivierung der PON2- bzw. PON3-Aktivität verantwortlich ist.

Die Daten bestärken, dass PON2 und PON3 eine Rolle in der Abwehr gegen die Virulenz von *P. aeruginosa* spielen, zeigen aber auch, dass ihre endogene Schutzfunktion 3OC12-vermittelt inhibiert wird. Zum einen wird vermutlich durch eine post-translationale PON2-Modifikation dessen Lactonase-Aktivität inaktiviert, sodass PON2 das *quorum-sensing* nicht mehr abschwächen kann. Zum anderen führt der Signalweg mittels einer PON2- und PON3-Herunterregulation dazu, dass beide Enzyme wahrscheinlich nicht mehr gegen redox-aktives PCN schützen können. Demnach könnte die Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen einen wichtigen therapeutischen Ansatz zur Erhaltung der Schutzfunktion von PON2 und PON3 darstellen. Es wäre von großem Vorteil, wenn die 3OC12-vermittelte Abnahme in der PON2-Aktivität verhindert werden könnte und PON2 weiterhin durch den Abbau von 3OC12 protektiv wirken könnte. Vor allem die Studie, in welcher die Lactonase-Behandlung die Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber Antibiotika erhöht ¹¹⁰, zeigt den Nutzen einer solchen Therapie. Durch die Inhibierung des *quorum-sensing* durch PON2 könnte somit die antibiotische Therapie unterstützt werden. Aufgrund der hohen Similarität von PON2 und PON3 und unter Berücksichtigung, dass beide Proteine durch eine 3OC12-vermittelte Ca^{2+} -Störung inaktiviert werden, ist es wahrscheinlich, dass hier die gleiche post-translationale Modifikation an einem konservierten Rest (bzw. Resten) stattfindet. Die Befunde liefern damit wichtige Hinweise auf die Modifikation, bei welcher es sich um eine (De-) Phosphorylierung, Methylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinylierungen und (De-) Glykosylierungen handeln könnte. In Anbetracht der Bedeutung dieses bisher z.T. noch unverstandenen Mechanismus werden die bisherigen Befunde im folgenden Abschnitt detaillierter erläutert.

6.3 Charakterisierung des PON2-inaktivierenden und – degradierenden Signalweges

Wie bereits oben diskutiert, können PON2 und PON3 die bakterielle Virulenz von *P. aeruginosa* wahrscheinlich abschwächen, indem sie anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften gegenüber PCN aufweisen. Darüber hinaus baut PON2 das *quorum-sensing* Molekül 3OC12 ab, wird jedoch durch die 3OC12-vermittelte Ca^{2+} -Störung inaktiviert und abgebaut. Daher ist es wichtig, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, um einen therapeutischen Ansatz zur Erhaltung der beiden Schutzenzyme entwickeln zu können.

6.3.1 Die PON2-Inaktivierung erfolgt vermutlich über eine Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Dephosphorylierung

Verschiedene Hinweise deuten auf eine Regulation der enzymatischen Aktivität mittels Phosphorylierung / Dephosphorylierung von PON2 hin. Die PON2-Inaktivierung erfolgt Ca^{2+} -vermittelt, innerhalb weniger Minuten und kann durch Behandlung mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA aufgehoben werden¹¹¹. Im Rahmen der Diplomarbeit von M. Goldeck^c in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass für die PON2-Inaktivierung kein Rezeptor benötigt wird: Die PON2-Aktivität nahm in Zellen nach Verdau der Oberflächenproteine durch Trypsin unverändert durch die 3OC12-Behandlung ab. Vermutlich diffundiert 3OC12 als zwitterionisches Fettsäuremolekül durch die Zellmembran hindurch und vermittelt seinen Effekt über intrazelluläre Proteine. Mittels 2D-SDS-PAGE-Analyse wurde zudem gezeigt, dass PON2 nach 3OC12-Behandlung einen um 0.1 basischeren *pI* aufweist, was mit einer Dephosphorylierung übereinstimmen könnte. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Daten weisen darauf hin, dass PON2 Serin- und Threonin-phosphoryliert ist. Die Behandlung mit 3OC12 führte zu einem deutlichen Verlust in dem Signal für phosphoryliertes Serin, während sich das Signal für phosphoryliertes Threonin nicht veränderte. Dies spricht dafür, dass die PON2-Aktivität über eine Serin-Phosphorylierung an einer bisher unbekannt Stelle moduliert wird. Mittels massenspektrometrischer Analyse konnte erstmals ein phosphorylierter Serin-Rest an Position 36 identifiziert werden. Neben der Glykosylierung von PON2⁹⁹ war bisher keine andere post-translationale Modifikation bei einer Paraoxonase bekannt. Weitere PON2-Modifikationen wurden durch diese Methode nicht detektiert, sind also entweder nicht vorhanden oder die hier verwendete Methode war nicht geeignet, um diese zu erkennen. Eine Mutation des gefundenen phosphorylierten Serins (S) an Position 36 zu der nicht phosphorylierbaren, sterisch ähnlichen Aminosäure Alanin (A) sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich hierbei um die aktivitätsbestimmende Stelle von PON2 handelt. Darüber hinaus wurden noch weitere mögliche Reste mutiert, die nach Kriterien der Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung (NetPhos Server 2.0), vorhergesagte aktive Stellen¹²⁵ und der Sequenzübereinstimmung zu PON3 ausgewählt wurden (siehe 5.3.1). Erwartungsgemäß müsste das mutierte Enzym nach Austausch einer für die Inaktivierung durch 3OC12 verantwortlichen Stelle eine Lactonase-Aktivität aufweisen, die sich 1. nicht von der Aktivität von 3OC12-behandelter PON2 unterscheidet und 2. nicht mehr durch 3OC12 verringert werden kann. Diese Kriterien konnten von zwei PON2-Mutanten erfüllt werden, bei denen es sich um die Mutationen S36A und S331A handelt. Beide zeigten eine geringe PON2-Aktivität, wobei die der Mutante S331A am geringsten war. Des Weiteren unterschied sich die Lactonase-Aktivität der unbehandelten Mutanten nicht signifikant von der der 3OC12-behandelten PON2. Auch zwischen

unbehandelter und 3OC12-behandelter Mutante trat kein signifikanter Unterschied auf. Somit sind die beiden Positionen für die enzymatische Aktivität von PON2 wichtig und stellen mögliche Kandidaten dar, die für die 3OC12-vermittelte Inaktivierung verantwortlich sein könnten. Neben der Messung der PON2-Aktivität wurde die Lokalisation einiger ausgewählter Mutanten mittels konfokaler Lasermikroskopie überprüft. Eine veränderte PON2-Proteinstruktur infolge der Mutation könnte eine Lokalisationsänderung mit sich ziehen, jedoch kolokalisierten alle untersuchten Mutanten weiterhin mit ER und Mitochondrien ebenso wie die unmutierte PON2. Weiter analysiert wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mutante S331A, da diese die geringste PON2-Aktivität aufwies und dieser Rest vermutlich die Aktivität von PON2 moduliert. Falls S331 physiologischerweise phosphoryliert sein sollte und sofern dies die einzige Serin-Phosphorylierung wäre, so sollte die S331A-Mutante nicht durch Antikörper gegen phosphoryliertes Serin erkannt werden. Tatsächlich entsprach das Signal der S331A-Mutante dem von 3OC12-behandelter PON2. Zudem war keine Signalabnahme nach 3OC12 in der S331A-Mutante zu beobachten. Daher ist es wahrscheinlich, dass dieser Rest in unbehandelter PON2 phosphoryliert vorliegt und durch 3OC12 über einen bisher unbekanntem Mechanismus dephosphoryliert wird. Ein Austausch des Ser-Restes mit einer Glutaminsäure, welche der räumlichen Struktur eines phosphorylierten Serins ähnelt, sollte schließlich Aufschluss darüber geben, ob diese Dephosphorylierung für die PON2-Inaktivierung verantwortlich ist. Falls dieser „phosphomimetische“ Austausch erfolgreich wäre, könnte die Glutaminsäure auch nach 3OC12-Behandlung weiterhin phosphoryliertes Serin simulieren und die PON2-Enzymaktivität erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass die Glutaminsäure (E) an dieser Position nicht für eine solche Simulation geeignet war, da die Mutante S331E keine PON2-Aktivität aufwies. Somit scheint ähnlich wie Alanin auch die Glutaminsäure an dieser Position die Enzymaktivität zu stören. Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur, in welchen Serin zur Analyse von möglichen Phosphorylierungen (sogenannte *phosphomimetic mutations*) durch eine Glutaminsäure ausgetauscht wurde^{173, 174}, da diese strukturell am ähnlichsten zu phosphoryliertem Serin ist. Eventuell könnte hier aber der Austausch zu einer Asparaginsäure mehr Erfolg bringen, da der Rest dieser Aminosäure um ein C-Atom kürzer ist als der von Glutaminsäure. Dies könnte möglicherweise dazu führen, dass der kürzere Rest eine geringere sterische Störung mit sich brächte, während gleichzeitig die Enzymaktivität von PON2 erhalten bliebe und nicht mehr 3OC12-vermittelt inaktiviert würde.

Die im Rahmen dieser Arbeit geführte Kooperation mit J. F. Teiber^d konnte weitere Daten hervorbringen, welche Hinweise auf den durch 3OC12-vermittelten Signalweg zur PON2-Inaktivierung gaben. Da aus den obigen Daten eine Dephosphorylierung von PON2 als mögliche Ursache der PON2-Inaktivierung als wahrscheinlich galt, wurden verschiedene Proteinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren getestet, die der Aufklärung des PON2-

inaktivierenden Signalweges dienen sollten. Dabei führte sowohl die Inhibierung von Calmodulin (CaM) durch W7 als auch die Inhibierung von Calcineurin durch Tacrolimus zur Erhaltung der PON2-Aktivität in Gegenwart von 3OC12. Vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die PON2-Inaktivierung durch 3OC12 über einen rapiden Ca^{2+} -Influx in der Zelle vermittelt wird und dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA verhindert werden kann¹¹¹. Zusammen sprechen die Daten für eine Ca^{2+} / CaM-vermittelte Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung von PON2 (siehe 5.3.3 bzw. Abbildung 5-34).

Die hier erhaltenen Daten geben weitere wichtige Hinweise auf die 3OC12-vermittelte Inaktivierung von PON2. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PON2 normalerweise Serin-phosphoryliert vorliegt und durch 3OC12 Serin-dephosphoryliert wird. Aus den verschiedenen Analysen kann gefolgert werden, dass die Positionen S36 und S331 phosphoryliert sind und dass die Position S331 durch 3OC12 dephosphoryliert wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Dephosphorylierung an Position S331 nur ein Nebeneffekt der 3OC12-Behandlung ist und die eigentliche PON2-Inaktivierung durch eine post-translationale Modifikation an einer oder mehreren anderen Stellen erfolgt. Jedoch spricht die stark reduzierte PON2-Aktivität nach Mutation von S36 und S331 dafür, dass diese Positionen kritisch für die PON2-Aktivität sind und für die 3OC12-vermittelte Inaktivierung verantwortlich sein könnten. Auch die Daten von J. F. Teiber weisen darauf hin, dass eine Dephosphorylierung von PON2 ursächlich für die Inaktivierung ist, da durch Blockade der Phosphatase Calcineurin die PON2-Aktivität erhalten blieb. Da der Austausch des Serins an der Stelle S331 zur Glutaminsäure keinen weiteren Aufschluss darüber brachte, ob diese Stelle maßgeblich für die 3OC12-vermittelte Inaktivierung ist, müssten hier weitere Analysen durchgeführt werden. Des Weiteren könnten ähnliche Mutationen an Position S36 generiert werden. Auffälligerweise blieb ein schwaches Signal für phosphoryliertes Serin nach 3OC12-Behandlung von PON2 bzw. in der S331A-Mutante bestehen; dies könnte eventuell durch die Phosphorylierung an Position S36 zustande kommen, die durch 3OC12 nicht moduliert würde. Demnach würde hier keine Dephosphorylierung durch 3OC12 stattfinden bzw. würde diese Position keine Rolle in der 3OC12-vermittelten PON2-Inaktivierung spielen. Abschließend stellt die Position S331 die vielversprechendste Stelle dar, an welcher 3OC12 durch Dephosphorylierung die PON2-Aktivität ausschalten könnte. Sollte es gelingen, diese Inaktivierung an PON2 zu verhindern, könnte dies einen vielversprechenden Ansatz gegenüber der 3OC12-vermittelten Virulenz von *P. aeruginosa* darstellen. Auch eine Blockade des Signalweges, der zur PON2-Inaktivierung führt, könnte eine interessante Angriffsstelle für eine mögliche Therapie bilden.

6.3.2 Die Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus in der 3OC12-induzierten PON2-Degradation

Im Rahmen dieser Arbeit und in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass PON2 durch die Behandlung mit 3OC12 abgebaut wird¹¹¹, jedoch ist der zugrundeliegende Signalweg bisher unbekannt. Eine Entschlüsselung dieses Mechanismus könnte jedoch nützlich sein, um therapeutisch den Abbau von PON2 und PON3 zu verhindern. Damit könnten diese Enzyme weiterhin hydrolytisch, anti-oxidativ und anti-inflammatorisch gegenüber den *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren 3OC12 bzw. PCN wirken. Ein möglicher Signalweg, über welchen die meisten intrazellulären Proteine abgebaut werden, stellt der Proteasom-vermittelte Abbau dar. Dieser dient normalerweise dem Abbau zelleigener Proteine, deren Bestandteile dann recycelt werden. Dabei wird Ubiquitin kovalent an zelluläre Proteine gebunden und markiert diese für den Proteasom-vermittelten Abbau. Hierzu bildet Ubiquitin zunächst mit der E1-aktivierenden Komponente einen Thiolester-Komplex. Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf das Ubiquitin-carrier-Protein E2 übertragen und darauf auf die E3-Ubiquitin-Ligase. Diese vermittelt schließlich die Bindung von Ubiquitin an ein Lysinrest des Zielproteins¹⁷⁵. Somit können Proteine, welche Proteasom-vermittelt abgebaut werden, methodisch relativ einfach anhand ihrer Ubiquitynylierung erkannt werden. Weitere Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, sind Komponenten des Ubiquitin-carrier-Proteins E2 (z.B. UBC3 und UBC3B) und Komponenten des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Skp1, *S phase kinase associated protein1*; CUL1, *Cullin homolog 1* und Skp2-F-box-Protein). Ubiquitin ist der vorherrschende Regulator der Degradation von einer Vielzahl an Zielproteinen¹⁷⁶, jedoch können auch Ubiquitin-ähnliche Proteine die Proteine reversibel modifizieren und verschiedene biologische Prozesse regulieren¹⁷⁷⁻¹⁸⁵. Die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine besteht aus drei kleinen Ubiquitin-verwandten Modifikationsproteinen SUMO1-3 (*small ubiquitin-related modifier proteins*), NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8*) und ISG15 (*interferon-stimulated 15 kDa protein*)^{186, 187}. Eine Markierung oder Interaktion mit einem der genannten Proteine könnte also darauf hinweisen, dass ein Proteasom-vermittelter Abbau vorliegt.

Hier wurde gezeigt, dass die Behandlung von 3OC12 in Lungenkarzinomzellen (A549) zu einer Aktivierung von einer Vielzahl an Signalproteinen des Proteasom-vermittelten Abbaus führt. Sowohl die Zahl an ubiquitynylierten Proteinen als auch die Menge an SUMO-1 und UBC3 nahm deutlich zu. Demnach ist es durchaus denkbar, dass die 3OC12-vermittelte PON2-Degradation Proteasom-vermittelt erfolgt. Jedoch ergaben die Analysen, dass PON2 weder mit Ubiquitin, SUMO, NEDD8 oder ISG15 markiert wird, noch dass eine Interaktion mit den Proteinen UBC3, Skp1 oder Skp2 vorliegt. Folglich scheint die Degradation von PON2 nicht Proteasom-vermittelt zu erfolgen.

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass PON2 Ca^{2+} -abhängig degradiert wird: Eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase durch 3OC12, Thapsigargin oder dem Ca^{2+} -Ionophor A23187 führt zur PON2-Degradation, die durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA geblockt werden kann^{111, 112}. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Inhibierung von Calpain die Thapsigargin-vermittelte PON2-Degradation verhindert¹¹². Dabei stellt Ca^{2+} einen potenten Aktivator von cytoplasmatischen Proteasen wie Calpain dar¹⁸⁸. Eventuell aktiviert 3OC12 ebenfalls durch die Ca^{2+} -Freisetzung Calpain, was zum Abbau von PON2 führt. Dies müsste in Folgestudien analysiert werden, wobei hier die gleichzeitige Betrachtung von PON3 hilfreich sein könnte, da diese vermutlich über den gleichen Signalweg abgebaut wird.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Rolle von PON3 in der Tumorgenese und zum anderen eine mögliche Schutzfunktion von PON2 und PON3 gegenüber *P. aeruginosa* Infektionen untersucht. Bereits seit dem Jahr 2000 ist die anti-oxidative Eigenschaft von PON3 bekannt⁹², jedoch war der zugrundeliegende Mechanismus bisher ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PON3 die Superoxid-Entstehung in den Mitochondrien abschwächt, wobei sie ihre anti-oxidative Eigenschaft vermutlich als Isolator des Coenzym Q₁₀ vermittelt. Gleichzeitig wurde demonstriert, dass sich Tumorzellen diese anti-oxidative Eigenschaft zu Nutze machen. PON3 war in zahlreichen Tumorgeweben hochreguliert und bietet einen effektiven Schutz gegenüber vielen apoptotischen Stimuli, deren Gemeinsamkeit in der mitochondrial-vermittelten Signalweiterleitung liegt. Es konnte eine mögliche Funktion von PON3 als Tumormarker und Angriffspunkt in der Krebstherapie aufgezeigt werden. Die hier erlangten Daten liefern wertvolle Hinweise auf die Rolle von PON3 in Krebserkrankungen, welche eine Basis für zukünftige Analysen darstellen, die der Entwicklung neuer Krebstherapien dienen könnten.

Erstmalig wurde gezeigt, dass PON3 die Superoxid-Produktion durch PCN, einem Virulenzfaktor des Bakteriums *P. aeruginosa*, abschwächen kann. Darüber hinaus wurde eine anti-inflammatorische Rolle von PON2 und PON3 gegenüber der PCN-induzierten NF- κ B-Aktivierung und IL-8-Sekretion aufgedeckt. PON3 wird ähnlich wie PON2 in einer Ca²⁺-sensitiven Weise inaktiviert und degradiert. Die Ergebnisse belegen, dass PON2 und PON3 einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems in der *P. aeruginosa* Abwehr darstellen, während ihre Schutzfunktion wahrscheinlich durch denselben 3OC12-vermittelten Signalweg von *P. aeruginosa* inhibiert wird. Dabei erfolgt die PON2-Inaktivierung durch 3OC12 wahrscheinlich Ca²⁺ / Calmodulin-vermittelt, indem die Position S331 dephosphoryliert wird. Eine mögliche Rolle des Proteasom-vermittelten Abbaus von PON2 wurde ausgeschlossen und eine Calpain-vermittelte PON2-Degradation bestätigt. PON2 und PON3 bieten somit einen therapeutischen Ansatz gegenüber *P. aeruginosa*, deren Ziel das Abschwächen des *quorum-sensing* durch PON2 und die Verminderung von Schäden durch redox-aktives PCN durch PON2 und PON3 sein könnte. Falls es gelänge, die Inaktivierung / Degradation von PON2 bzw. PON3 zu verhindern, könnte die endogene Schutzfunktion dieser Enzyme weiter aufrecht erhalten werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern nützliche Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus bzw. Signalweg und bieten wichtige Grundlagen, die helfen können, diesen zu inhibieren.

8 Literatur

1. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys.* 1996;29:169-202
2. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59:527-605
3. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, Uchida K, Kurokawa K. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 1998;437:24-28.
4. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-344
5. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ros) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2000;5:415-418
6. Valdivia A, Perez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordan J. Superoxide dismutases: A physiopharmacological update. *J Physiol Biochem.* 2009;65:195-208
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95
8. Crofts AR, Holland JT, Victoria D, Kolling DR, Dikanov SA, Gilbreth R, Lhee S, Kuras R, Kuras MG. The q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc(1) complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777:1001-1019
9. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial nadh:Ubiquinone oxidoreductase (complex i). *J Biol Chem.* 2004;279:39414-39420
10. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex i-mediated reactive oxygen species generation: Modulation by cytochrome c and nad(p)+ oxidation-reduction state. *Biochem J.* 2002;368:545-553
11. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of h₂o₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29:89-95
12. Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: Implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:22040-22051
13. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by nadh:Ubiquinone oxidoreductase (complex i) depends on the ph gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J.* 2004;382:511-517

14. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118
15. Banerjee J, Ghosh S. Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004;323:310-314
16. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova, II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology.* 2005;1:223-232
17. Kirkland RA, Adibhatla RM, Hatcher JF, Franklin JL. Loss of cardiolipin and mitochondria during programmed neuronal death: Evidence of a role for lipid peroxidation and autophagy. *Neuroscience.* 2002;115:587-602
18. Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications.* 1999;264:343-347
19. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1259-1263
20. Piccotti L, Buratta M, Giannini S, Gresele P, Roberti R, Corazzi L. Binding and release of cytochrome c in brain mitochondria is influenced by membrane potential and hydrophobic interactions with cardiolipin. *J Membr Biol.* 2004;198:43-53
21. Kirkland RA, Windelborn JA, Kasprzak JM, Franklin JL. A bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2002;22:6480-6490
22. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:913-922
23. Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: Chemosensitization versus chemoprotection. *Nature reviews. Cancer.* 2004;4:216-225
24. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303:1010-1014
25. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. P53- and drug-induced apoptotic responses mediated by bh3-only proteins puma and noxa. *Science.* 2003;302:1036-1038
26. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends in cell biology.* 2004;14:20-28
27. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol.* 2003;5:781-792
28. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: A stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006;66:S102-109
29. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or foe? *Nat Rev Cancer.* 2004;4:966-977
30. Oyadomari S, Mori M. Roles of chop/gadd153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11:381-389

31. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*. 2008;118:3378-3389
32. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:2277-2293
33. Shen HM, Liu ZG. Jnk signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:928-939
34. Distelhorst CW, Lam M, McCormick TS. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced Ca^{2+} pool depletion. *Oncogene*. 1996;12:2051-2055
35. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T. Calcium and apoptosis: Facts and hypotheses. *Oncogene*. 2003;22:8619-8627
36. Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ, Scorrano L. Regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} dynamics by proapoptotic bcl-2 family members. *Biochemical pharmacology*. 2003;66:1335-1340
37. Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca^{2+} signaling and apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2000;32:35-46
38. Wajant H. The fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science*. 2002;296:1635-1636
39. Chen G, Goeddel DV. Tnf- α signaling: A beautiful pathway. *Science*. 2002;296:1634-1635
40. Krammer PH. Cd95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407:789-795
41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:646-674
42. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010;29:5545-5555
43. Jiang BH, Liu LZ. Pi3k/pten signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;102:19-65
44. Yuan TL, Cantley LC. Pi3k pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497-5510
45. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-16
46. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. *Science*. 1984;223:1028-1033
47. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432:307-315
48. Adams JM, Cory S. The bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26:1324-1337
49. De Bruyne E, Bos TJ, Schuit F, Van Valckenborgh E, Menu E, Thorrez L, Atadja P, Jernberg-Wiklund H, Vanderkerken K. Igf-1 suppresses bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood*. 2010;115:2430-2440
50. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*. 2009;19:329-337

51. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:789-791
52. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*. 2010;85:593-598
53. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:a003129
54. Felding-Habermann B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:203-213
55. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39-51
56. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141:52-67
57. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer*. 2009;9:239-252
58. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124:269-270
59. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-314
60. Semenza GL. Hif-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20:51-56
61. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7:11-20
62. Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology*. 2008;84:988-993
63. Yang L, Pang Y, Moses HL. Tgf-beta and immune cells: An important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology*. 2010;31:220-227
64. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2010;11:220-228
65. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883-899
66. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis*. 2009;14:624-640
67. Verfaillie T, Garg AD, Agostinis P. Targeting er stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer letters*. 2010
68. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs*. 2007;67:351-368
69. Boontham P, Robins A, Chandran P, Pritchard D, Camara M, Williams P, Chuthapisith S, McKechnie A, Rowlands BJ, Eremin O. Significant immunomodulatory effects of pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules: Possible link in human sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115:343-351
70. Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. Il-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the pseudomonas autoinducer n-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by nf-kappa b and activator protein-2. *J Immunol*. 2001;167:366-374

71. Li H, Wang L, Ye L, Mao Y, Xie X, Xia C, Chen J, Lu Z, Song J. Influence of pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecule n-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone on mast cells. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198:113-121
72. Jacobi CA, Schiffner F, Henkel M, Waibel M, Stork B, Daubrawa M, Eberl L, Gregor M, Wesselborg S. Effects of bacterial n-acyl homoserine lactones on human jurkat t lymphocytes-oddhl induces apoptosis via the mitochondrial pathway. *Int J Med Microbiol*. 2009;299:509-519
73. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule n-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol*. 2002;184:1132-1139
74. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol Med*. 2004;10:599-606
75. Hassan HM, Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol*. 1980;141:156-163
76. Reszka KJ, O'Malley Y, McCormick ML, Denning GM, Britigan BE. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from pseudomonas aeruginosa, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:1448-1459
77. Rada B, Lekstrom K, Damian S, Dupuy C, Leto TL. The pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J Immunol*. 2008;181:4883-4893
78. Rada B, Leto TL. Redox warfare between airway epithelial cells and pseudomonas: Dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol Res*. 2009;43:198-209
79. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*. 2004;72:4275-4278
80. Bjarnsholt T, van Gennip M, Jakobsen TH, Christensen LD, Jensen PO, Givskov M. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nat Protoc*. 2010;5:282-293
81. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Hoiby N, Givskov M. Attenuation of pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J*. 2003;22:3803-3815
82. Ni N, Li M, Wang J, Wang B. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev*. 2009;29:65-124
83. 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;33:498-507
84. 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;213:149-157
85. 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;46:1239-1247
86. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys*. 2007;461:24-29
87. Draganov DI. Lactonases with organophosphatase activity: Structural and evolutionary perspectives. *Chem Biol Interact*. 2010;187:370-372

88. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy S, Horke S. Protectors and traitors - the roles of pon2 and pon3 in atherosclerosis and cancer. *J Lipids, in press*. 2012
89. Azizi F, Rahmani M, Raiszadeh F, Solati M, Navab M. Association of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and paraoxonase enzyme activity with premature coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2002;13:9-16
90. 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;101:1581-1590
91. 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;12:61-69
92. 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;275:33435-33442
93. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:1304-1316
94. Draganov DI. Human pon3, effects beyond the hdl: Clues from human pon3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100:1104-1105
95. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusic AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100:1200-1207
96. 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;45:146-157
97. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Foerstermann U, Shabazian A, Grijalva V, Shih DM, Farias-Eisner R, Teiber JF, Reddy ST, Horke S. Pon3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. 2012, in press
98. 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;276:44444-44449
99. 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;115:2055-2064
100. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva V, Morvardi S, Clarke C, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2010
101. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusic 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;281:29491-29500
102. 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*. 2011;2:e112

103. 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;285:24398-24403
104. 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;27:1368-1374
105. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:153-163
106. Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih D, Fogelman AM. Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2008;19:405-408
107. 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;21:542-547
108. 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;76:2512-2519
109. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis 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:L852-860
110. Kiran S, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant pseudomonas aeruginosa. *Iran J Microbiol*. 2011;3:1-12
111. 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;426:73-83
112. 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;416:395-405
113. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor viii-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:3734-3737
114. Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc*. 2008;3:941-947
115. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227:680-685
116. 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;102:2951-2959

117. 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;115:1394-1405
118. 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;20:1400-1407
119. Matsumoto A, Hanawalt PC. Histone h3 and heat shock protein grp78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilvocarcin v in human fibroblasts. *Cancer Res*. 2000;60:3921-3926
120. Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK. Localization of grp78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J*. 2006;396:31-39
121. Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. Regulation of perk signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the upr regulator grp78/bip. *PLoS One*. 2009;4:e6868
122. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R. Cell surface expression of the stress response chaperone grp78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*. 2004;6:275-284
123. Witte I, Horke S. Assessment of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in endothelial cells. *Methods Enzymol*. 2011;489:127-146
124. Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE. Pseudomonas pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*. 1998;66:5777-5784
125. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11:412-419
126. Hodgson SV, Morrison PJ, Irving M. Breast cancer genetics: Unsolved questions and open perspectives in an expanding clinical practice. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004;129C:56-64
127. Ebert MP, Tanzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, Tetzner R, Lofton-Day C, Rosenberg R, Reinacher-Schick AC, Schulmann K, Tannapfel A, Hofheinz R, Rocken C, Keller G, Langer R, Specht K, Porschen R, Stohlmacher-Williams J, Schuster T, Strobel P, Schmid RM. Tfp2e-dkk4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:44-53
128. 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;128:369-379
129. 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;7:51-60
130. Pise-Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chatterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guillerm 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;62:3562-3571

131. Uyar OA, Kara M, Erol D, Ardicoglu A, Yuce H. Investigating paraoxonase-1 gene q192r and I55m polymorphism in patients with renal cell cancer. *Genet Mol Res.* 2011;10:133-139
132. Antognelli C, Mearini L, Talesa VN, Giannantoni A, Mearini E. Association of cyp17, gstp1, and pon1 polymorphisms with the risk of prostate cancer. *Prostate.* 2005;63:240-251
133. Stevens VL, Rodriguez C, Talbot JT, Pavluck AL, Thun MJ, Calle EE. Paraoxonase 1 (pon1) polymorphisms and prostate cancer in the cps-ii nutrition cohort. *Prostate.* 2008;68:1336-1340
134. Sorenson RC, Aviram M, Bisgaier CL, Billecke S, Hsu C, La Du BN. Properties of the retained n-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase. *Chemico-biological interactions.* 1999;119-120:243-249
135. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic n-terminal leader sequence associates with hdl's by binding phospholipids : Apolipoprotein a-i stabilizes activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1999;19:2214-2225
136. Moser CC, Farid TA, Chobot SE, Dutton PL. Electron tunneling chains of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:1096-1109
137. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417:1-13
138. Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Stoyanovsky DA, Wipf P, Kochanek PM, Greenberger JS, Pitt B, Shvedova AA, Borisenko G. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: A kiss of death. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:1439-1453
139. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications.* 1986;135:397-402
140. Meyer T, Regenass U, Fabbro D, Alteri E, Rosel J, Muller M, Caravatti G, Matter A. A derivative of staurosporine (cgp 41 251) shows selectivity for protein kinase c inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int J Cancer.* 1989;43:851-856
141. Nakano H, Kobayashi E, Takahashi I, Tamaoki T, Kuzuu Y, Iba H. Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of rous sarcoma virus transforming protein p60. *The Journal of antibiotics.* 1987;40:706-708
142. Secrist JP, Sehgal I, Powis G, Abraham RT. Preferential inhibition of the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase by staurosporine. *The Journal of biological chemistry.* 1990;265:20394-20400
143. Yanagihara N, Tachikawa E, Izumi F, Yasugawa S, Yamamoto H, Miyamoto E. Staurosporine: An effective inhibitor for ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase ii. *Journal of neurochemistry.* 1991;56:294-298
144. Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Caspase-8/fllice functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 2000;19:4563-4573
145. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research.* 1994;211:314-321

146. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. Role of ced-3/ice-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *The Journal of cell biology*. 1996;133:1041-1051
147. Takahashi A, Hirata H, Yonehara S, Imai Y, Lee KK, Moyer RW, Turner PC, Mesner PW, Okazaki T, Sawai H, Kishi S, Yamamoto K, Okuma M, Sasada M. Affinity labeling displays the stepwise activation of ice-related proteases by fas, staurosporine, and crma-sensitive caspase-8. *Oncogene*. 1997;14:2741-2752
148. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS letters*. 2001;509:435-438
149. Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: A matter of life or death. *Cell death and differentiation*. 2006;13:363-373
150. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:1013-1030
151. Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M. Calcineurin preferentially synergizes with pck-theta to activate jnk and il-2 promoter in t lymphocytes. *The EMBO journal*. 1998;17:3101-3111
152. Walter D, Schmich K, Vogel S, Pick R, Kaufmann T, Hochmuth FC, Haber A, Neubert K, McNelly S, von Weizsacker F, Merfort I, Maurer U, Strasser A, Borner C. Switch from type ii to i fas/cd95 death signaling on in vitro culturing of primary hepatocytes. *Hepatology*. 2008;48:1942-1953
153. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2007;39:43-50
154. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*. 2009;1:280-291
155. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*. 2001;59:657-663
156. Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor a and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer research*. 2003;63:3729-3734
157. Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*. 1990;122:1-63
158. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2010;11:872-884
159. Filippin L, Magalhaes PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:39224-39234
160. Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO journal*. 1999;18:96-108
161. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca(2+) transfer from the er to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787:1342-1351

162. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. Mam: More than just a housekeeper. *Trends in cell biology*. 2009;19:81-88
163. de Brito OM, Scorrano L. An intimate liaison: Spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *The EMBO journal*. 2010;29:2715-2723
164. Kalen A, Norling B, Appelkvist EL, Dallner G. Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1987;926:70-78
165. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1603-1616
166. 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;23:468-474
167. 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;37:2052-2063
168. 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;84:145-154
169. Deakin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat ML, James RW. Hdl-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:102-109
170. Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Foerstermann U, Teiber J, 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
171. Kunsch C, Rosen CA. Nf-kappa b subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol*. 1993;13:6137-6146
172. Kang HB, Kim YE, Kwon HJ, Sok DE, Lee Y. Enhancement of nf-kappab expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line snuhs3. *Stem Cells Dev*. 2007;16:615-623
173. Pusapati GV, Eiseler T, Rykx A, Vandoninck S, Derua R, Waelkens E, Van Lint J, von Wichert G, Seufferlein T. Protein kinase d regulates rhoa activity via rhotekin phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2012
174. Song Q, Pallikkuth S, Bossuyt J, Bers DM, Robia SL. Phosphomimetic mutations enhance oligomerization of phospholemman and modulate its interaction with the na/k-atpase. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:9120-9126
175. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. *The EMBO journal*. 1998;17:7151-7160
176. Osaka F, Kawasaki H, Aida N, Saeki M, Chiba T, Kawashima S, Tanaka K, Kato S. A new nedd8-ligating system for cullin-4a. *Genes & development*. 1998;12:2263-2268
177. Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: Ubiquitin, sumo and related modifiers. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28:321-328
178. Matunis MJ, Wu J, Blobel G. Sumo-1 modification and its role in targeting the ran gtpase-activating protein, rangap1, to the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*. 1998;140:499-509

179. Duprez E, Saurin AJ, Desterro JM, Lallemand-Breitenbach V, Howe K, Boddy MN, Solomon E, de The H, Hay RT, Freemont PS. Sumo-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein pml: Implications for nuclear localisation. *Journal of cell science*. 1999;112 (Pt 3):381-393
180. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein sumo-1. *The EMBO journal*. 1999;18:6462-6471
181. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT. Sumo-1 modification activates the transcriptional response of p53. *The EMBO journal*. 1999;18:6455-6461
182. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. Sumo-1 modification of ikappabalpha inhibits nf-kappab activation. *Molecular cell*. 1998;2:233-239
183. Stickle NH, Chung J, Klco JM, Hill RP, Kaelin WG, Jr., Ohh M. Pvh1 modification by nedd8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Molecular and cellular biology*. 2004;24:3251-3261
184. Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP. Mdm2-mediated nedd8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*. 2004;118:83-97
185. Hamerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, Coughlin P, Aebersold R, Aderem A. Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *Journal of immunology*. 2002;168:2415-2423
186. Chiba T, Tanaka K. Cullin-based ubiquitin ligase and its control by nedd8-conjugating system. *Current protein & peptide science*. 2004;5:177-184
187. Ritchie KJ, Zhang DE. Isg15: The immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:237-246
188. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 2000;150:887-894

9 Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

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.

Vorträge:

Schweikert E. M., Goldeck M., Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. The role of PON3 in reduction of oxidative stress and cell death. 4th International conference on Paraoxonases, La Pineda 2010.

Abstracts:

Schweikert E. M., Teiber J.F., Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* subverts our defense by inactivating paraoxonase-2: the search for post-translational modifications. 8th International Conference of Innate Immunity, Chania 2011.

Horke S., **Schweikert E. M.**, Witte I, Förstermann U. *Pseudomonas aeruginosa* knows how to defend: the human enzyme PON2 reduces Pyocyanin-induced oxidative stress, but is

inactivated by autoinducer 3OC12. 8th *International Conference of Innate Immunity*, Chania 2011.

Schweikert E. M., Teiber J. F., Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. The interplay between *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and the critical human defence enzymes PON2 and PON3. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Bonn 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 signaling. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Bonn 2011.

Witte I., **Schweikert E. M.**, Wilgenbus P., Förstermann U., Horke S. The role of PON3 in reduction of oxidative stress and cell death. European Cell Death Organisation Euroconference, Ghent 2010.

Schweikert E. M., Teiber J. F., Wilgenbus P., Helbig L., Förstermann U., Horke S. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* subverts our defense by inactivating paraoxonase-2: the search for post-translational modifications. 4th International conference on Paraoxonases, La Pineda 2010.

Schweikert E. M., Goldeck M., Wilgenbus P., Helbig L., Förstermann U., Horke S. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* subverts our defense by inactivating paraoxonase-2: the search for post-translational modifications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 381:R134.

10 Danksagung

11 Lebenslauf

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Eva-Maria Schweikert, 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 _____