



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# Die Rolle der Paraoxonase-2 in endothelialen Redox-Signalwegen und Entzündungsprozessen in der Blutgerinnung

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Julia Ebert  
geb. am 01.02.1988 in Mainz  
Mainz, 2016

Dekan: xxx

1. Berichterstatter: xxx

2. Berichterstatter: xxx

Tag der mündlichen Prüfung: xxx

*In Dankbarkeit  
meinen Eltern  
gewidmet.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>9</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>12</b>
<hr/>		
1.1	Das hämostatische System	12
1.1.1	Primäre Hämostase	12
1.1.2	Sekundäre Hämostase	14
1.1.3	Das Konzept der Zell-basierten Hämostase	17
1.1.4	Physiologische Inhibition der Gerinnung und das Fibrin-abbauende System	19
1.1.5	Die Rolle des Endothels in der Blutgerinnung	20
1.2	Die Proteinfamilie der Paraoxonasen	21
1.2.1	Die anti-oxidative Funktion von PON2	22
1.2.2	PON2 in der Arteriosklerose	24
1.3	Die Blutgerinnung in kardiovaskulären Erkrankungen	26
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
<hr/>		
3.1	Chemikalien	29
3.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.3	Laborgeräte	31
3.4	Reagenzien und Kits	32
3.5	Lösungen, Puffer und Medien	35
3.6	Enzyme und Standards	36
3.7	Antikörper	36
3.7.1	Primärantikörper	36
3.7.2	Sekundärantikörper	37
3.8	Oligonukleotide	37
3.8.1	Oligonukleotidsequenzen für quantitative real-time PCR	37
3.8.2	Oligonukleotidsequenzen für Genotypisierung transgener Mäuse	39
3.8.3	Oligonukleotidsequenzen für RNA-Interferenz	40

3.9	Zelllinien und Medien für die Zellkultur	40
3.10	Versuchstiere	40
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>43</b>
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	43
4.1.1	Isolation primärer Endothelzellen	43
4.1.2	Isolation primärer Thrombozyten und Präparation von Plasma	46
4.1.3	Auftauen kryokonservierter HUVECs	46
4.1.4	Kultivierung primärer Endothelzellen	46
4.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Aussaat primärer Zellen	47
4.1.6	Transfektion von siRNA in primäre humane Zellen	47
4.1.7	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in kryo-konserviertem Aortengewebe und in primären kultivierten Endothelzellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie	48
4.1.8	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in frisch isoliertem Aortengewebe mittels Chemilumineszenz	50
4.1.9	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in primären Zellen der Aorta und Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie	50
4.1.10	Durchflusszytometrische Quantifizierung endothelialer und thrombozytärer Oberflächenproteine	51
4.1.11	Durchflusszytometrische Messung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche primärer Endothelzellen und Thrombozyten	52
4.1.12	Bestimmung des intrazellulären Thrombozyten pH-Werts mittels Durchflusszytometrie	54
4.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	54
4.2.1	DNA Extraktion aus Gewebe	54
4.2.2	PCR zum Nachweis von Gensequenzen aus genomischer DNA	54
4.2.3	Agarosegelelektrophorese	55
4.2.4	RNA Extraktion aus primären Zellen oder Gewebe	56
4.2.5	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	56
4.2.6	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-PCR	56
4.2.7	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	57
4.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	60
4.3.1	Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus primären Zellen und Gewebe	60
4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	60
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
4.3.4	Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen	62
4.3.5	ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )	63
4.3.6	Messung der enzymatischen Aktivität von PON2	65
4.3.7	Messung der plasmatischen Thrombin-Aktivität	66

4.3.8	Messung der endothelialen TF-Aktivität	66
4.4	Arbeiten an Versuchstieren	67
4.4.1	Entnahme von Geweben und Blut aus Mäusen	67
4.4.2	Blutgerinnungszeitmessung mittels PT- und aPTT-Test	67
4.4.3	Blutgerinnungszeitmessung mittels <i>tail tip bleeding</i>	68
4.4.4	Messung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren	68
4.4.5	Messungen der vaskulären Funktion	69
4.4.6	Antikörper Applikation	70
4.4.7	Cre-loxP-vermittelte Re-Expression von PON2	70
4.4.8	Knochenmarkstransplantation	72
4.4.9	Hämatologische Analyse der Thrombozyten (Blutbild)	75
4.4.10	Messung der Thrombingenerierung in Plättchen-armem und Plättchen-reichem Plasma mittels <i>calibrated automated thrombography</i>	75
4.4.11	<i>In vivo</i> Biotinylierung zur Messung des Thrombozyten <i>turnovers</i>	76
4.5	Statistik	77
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>78</b>
5.1	Pon2-Defizienz verursacht eine beschleunigte Gerinnung	78
5.1.1	Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verkürzte Gerinnungszeiten	78
5.1.2	Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen erhöhte Gerinnungsfaktor-Aktivitäten	82
5.1.3	Pon2-Defizienz verursacht eine Erhöhung der plasmatischen Thrombin-Konzentration	83
5.2	Pon2-defiziente Endothelzellen weisen oxidativen Stress auf und sind pro-inflammatorisch	84
5.2.1	Pon2-Defizienz verursacht im Gefäß und in Endothelzellen eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies	85
5.2.2	Die erhöhte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und die verringerte Expression gerinnungshemmender Faktoren im Endothel von Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen	87
5.2.3	Humane primäre Endothelzellen zeigen ein verändertes Expressionsprofil Thrombin-modulierter Faktoren nach PON2- <i>knockdown</i>	91
5.2.4	Die Expression spezifischer Aktivierungsmarker auf der Endothelzelloberfläche sind in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert	96
5.2.5	Die endotheliale Phosphatidylserin-Exposition ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt	97
5.2.6	Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine endotheliale Dysfunktion	98
5.3	Die systemische Inflammation ist verursacht durch vaskuläre Pon2-Defizienz	99
5.4	Die erhöhte Aktivität von TF ist ursächlich für die verstärkte Gerinnung in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen	103
5.4.1	Die endotheliale TF-Expression ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert	104
5.4.2	Pon2-Defizienz steigert die endotheliale TF-Aktivität	104
5.4.3	Die Inhibition der TF-Aktivität normalisiert die Gerinnung und Endothelfunktion der PON2 <sup>-/-</sup> Mäuse	105

5.5	Die endotheliale PON2-Expression normalisiert die verstärkte Gerinnung der Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse	107
5.5.1	Die endotheliale und hämatopoetische Rekonstitution der PON2-Expression normalisiert die Gerinnung	108
5.5.2	Vaskuläres PON2 normalisiert die Gerinnung	112
5.6	Pon2-Defizienz verursacht eine erhöhte gerinnungsfördernde Aktivität der Thrombozyten	114
5.6.1	Verifizierung der PON2-Proteinexpression in Thrombozyten	114
5.6.2	Pon2 <sup>-/-</sup> Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Zellvolumen unabhängig von der Thrombozyten-Reifung	115
5.6.3	Pon2-defiziente Thrombozyten produzieren mehr reaktive Sauerstoffspezies	117
5.6.4	Der intrazelluläre pH-Wert von Thrombozyten ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert	118
5.6.5	Thrombozytäre Aktivierungsmarker sind in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert	118
5.6.6	vWF bindet verstärkt an Pon2 <sup>-/-</sup> Plättchen	119
5.6.7	Die gerinnungsaktivierende Funktion der Thrombozyten ist von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression abhängig	120
5.6.8	Die Thrombozyten-vermittelte Thrombingenerierung ist von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression abhängig	122
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>127</b>
6.1	PON2 reguliert die koagulatorische Aktivität des Endothels	128
6.2	PON2 kontrolliert endotheliale Entzündungsprozesse sowie die Endothelfunktion	132
6.3	Die thrombozytäre PON2 ist an der Regulation der Gerinnung beteiligt – ist dafür jedoch nicht essenziell	136
6.4	Die Bedeutung der Ergebnisse für zukünftige Forschungsrichtungen und die mögliche Rolle der PON2 in der gerinnungshemmenden Therapie	138
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>143</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>154</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>156</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die primäre Hämostase umfasst die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. _____	13
Abbildung 1-2: Die sekundäre Hämostase umfasst die plasmatische extrinsische und intrinsische Gerinnungskaskade. _____	15
Abbildung 1-3: Das Zell-basierte Konzept der Hämostase beschreibt die während der Gerinnung stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den Thrombozyten, Endothelzellen und den plasmatischen Gerinnungsfaktoren. _____	18
Abbildung 1-4: Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 in der inneren Mitochondrienmembran. ____	23
Abbildung 1-5: Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 involviert die Inhibition der Lipidperoxidation an der Plasmamembran. _____	24
Abbildung 3-1: Das <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mausmodell trägt einen $\beta$ -geo <i>gene trap</i> Vektor im <i>Pon2</i> -Lokus. _____	41
Abbildung 3-2: Kreuzungsschemata zur Etablierung und Fortführung der <i>Tek-Cre</i> <sup>+/-</sup> <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> und <i>Tek-Cre</i> <sup>+/-</sup> Mauslinie. _____	42
Abbildung 4-1: Isolation primärer Endothelzellen aus der Maus. _____	44
Abbildung 4-2: Die Cre Rekombinase-vermittelte Wiederherstellung der PON2-Expression in <i>Tek-Cre</i> <sup>+/-</sup> <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. _____	71
Abbildung 4-3: Das vaskuläre Expressionsprofil der <i>Tek-Cre</i> <sup>+/-</sup> <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mauslinie. _____	71
Abbildung 4-4: Der experimentelle Aufbau der Knochenmarkstransplantationen zur Generierung von WT und <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Chimären. _____	73
Abbildung 5-1: Die Gerinnungszeit von <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen ist im Vergleich zu WT Kontrollen verkürzt. ____	79
Abbildung 5-2: Der Phänotyp der beschleunigten Blutgerinnung ist bei weiblichen <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT stärker ausgeprägt als männlichen Mäusen und ist unabhängig vom Alter der Versuchstiere. _____	81
Abbildung 5-3: Gerinnungsfaktoren des intrinsischen plasmatischen Aktivierungsweges weisen in <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Aktivität auf. _____	82
Abbildung 5-4: Trotz einer unveränderten Konzentration plasmatischer Thrombin-Antithrombin-Komplexe liegt im Plasma von <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt aktives Thrombin vor. _____	83
Abbildung 5-5: Die Gefäßwand und das Endothel von <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen zeigen basal gegenüber dem WT erhöhte ROS-Level. _____	87
Abbildung 5-6: Das Genexpressionsprofil von makrovaskulären ECs von <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen vs. WT zeigt veränderte Expressionsraten inflammatorischer Marker. _____	89
Abbildung 5-7: Das Genexpressionsprofil von Gesamt-Leber-Lysaten von <i>Pon2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen vs. WT zeigt veränderte Expressionsraten inflammatorischer Marker. _____	90



Abbildung 5-8: Mikrovaskuläre ECs aus der Lunge von Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen zeigen gegenüber der WT Kontrolle eine erhöhte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren und eine erniedrigte mRNA-Expression des gerinnungshemmenden TFPI. _____	91
Abbildung 5-9: Überprüfung des Pon2- <i>knockdowns</i> in siRNA transfizierten HUVECs. _____	92
Abbildung 5-10: Das Genexpressionsprofil von Pon2-siRNA transfizierten HUVECs zeigt eine veränderte mRNA-Expression von Faktoren des Thrombin-Signalwegs. _____	93
Abbildung 5-11: Das Genexpressionsprofil von Thrombin-stimulierten, Pon2-siRNA transfizierten HUVECs zeigt eine veränderte mRNA-Expression von Faktoren des Thrombin-Signalwegs. _	94
Abbildung 5-12: Pon2- <i>knockdown</i> in unstimulierten und Thrombin-stimulierten HUVECs verursacht eine erhöhte mRNA-Expression von entzündungsmodulierenden Faktoren. _____	96
Abbildung 5-13: Das Expressionsprofil spezifischer Oberflächenproteine ist auf Pon2 <sup>-/-</sup> ECs unverändert. _____	97
Abbildung 5-14: Pon2 <sup>-/-</sup> ECs zeigen eine erhöhte Exposition von Phosphatidylserin in der äußeren Plasmamembranschicht. _____	98
Abbildung 5-15: Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine endotheliale Dysfunktion auf. _____	99
Abbildung 5-16: Pon2-Defizienz bewirkt eine erhöhte IL-6 und CCL22 Freisetzung in das Plasma. ____	100
Abbildung 5-17: Überprüfung des Engraftments der Knochenmark-transplantierten Mäuse. _____	102
Abbildung 5-18: Die Gefäßwand vermittelt die erhöhten IL-6 und CCL22 Plasmakonzentrationen in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen. _____	103
Abbildung 5-19: Pon2-Defizienz verändert nicht die endotheliale TF-Expression. _____	104
Abbildung 5-20: Die endotheliale TF-Aktivität ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen erhöht. _____	105
Abbildung 5-21: Anti-TF Behandlung (21E10 Antikörper) bewirkt eine Normalisierung der Gerinnungszeit in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen. _____	106
Abbildung 5-22: Anti-TF Behandlung (21E10 Antikörper) bewirkt eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion der Pon2 <sup>-/-</sup> Mäuse. _____	107
Abbildung 5-23: In Tek-Cre <sup>+/-</sup> Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen ist die PON2-Expression in ECs und in hämatopoetischen Zellen anteilig wiederhergestellt. _____	110
Abbildung 5-24: Die Tek-Cre-vermittelte Wiederherstellung der PON2-Expression in ECs und BCs normalisiert die Gerinnung. _____	111
Abbildung 5-25: Die Blutgerinnungszeiten sind in Pon2 <sup>-/-</sup> Knochenmark-transplantierten WT Chimären normalisiert. _____	113
Abbildung 5-26: PON2-Protein ist in humanen und murinen Thrombozyten detektierbar. _____	115
Abbildung 5-27: Pon2 <sup>-/-</sup> Thrombozyten sind unverändert in ihrer Anzahl und zeigen ein erhöhtes mittleres Zellvolumen. _____	115
Abbildung 5-28: Die Thrombozyten-Reifung ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen unverändert. _____	116
Abbildung 5-29: Pon2 <sup>-/-</sup> Plättchen zeigen einen erhöhten Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ____	117

Abbildung 5-30: Pon2-Defizienz verursacht keine Änderung des intrazellulären Thrombozyten pH-Werts. _____	118
Abbildung 5-31: Die Expression der Aktivierungsmarker P-Selektin und aktiviertes GPIIb/IIIa sind auf Pon2 <sup>-/-</sup> Plättchen unverändert. _____	119
Abbildung 5-32: Die Bindung von vWF an Pon2 <sup>-/-</sup> Thrombozyten ist nach Botrocetin-Stimulation erhöht. _____	120
Abbildung 5-33: Pon2 <sup>-/-</sup> Thrombozyten zeigen unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Phosphatidylserin-Exposition. _____	121
Abbildung 5-34: Die erhöhte Phosphatidylserin-Exposition auf Pon2 <sup>-/-</sup> Plättchen ist abhängig von vaskulären und thrombozytären Effekten. _____	122
Abbildung 5-35: Die basale und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in Plättchen-reichem Plasma ist in Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen erhöht. _____	123
Abbildung 5-36: Das erhöhte Thrombinpotential im Plättchen-reichen Plasma von Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen ist nicht auf eine verstärkte Aktivierung von kontaktabhängigen Gerinnungsfaktoren zurückzuführen. _____	124
Abbildung 5-37: Das erhöhte Thrombinpotential im Plättchen-reichen Plasma von Pon2 <sup>-/-</sup> Mäusen ist teilweise Phosphatidylserin-vermittelt und unabhängig von Thrombozyten TF. ____	125
Abbildung 5-38: Die Plättchen-vermittelte Thrombingenerierung ist abhängig von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression. _____	126
Abbildung 6-1: Schematische Illustration der vorgeschlagenen Endothel-abhängigen und Plättchen-vermittelten Prozesse, welche die Aktivierung der Blutgerinnung sowie die vaskulären Entzündungsprozesse im Pon2 <sup>-/-</sup> Modell induzieren. _____	127

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Chemikalien. _____	29
Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien. _____	30
Tabelle 3-3: Laborgeräte. _____	31
Tabelle 3-4: Reagenzien. _____	32
Tabelle 3-5: Bezeichnung, Entrez-Identifikationsnummer und Assay-Identifikationsnummer der im <i>Mouse custom-made TaqMan® Array</i> analysierten Gene. _____	33
Tabelle 3-6: Bezeichnung und Assay-Identifikationsnummer der im <i>Human Thrombin Signaling TaqMan® Array</i> analysierten Gene. _____	34
Tabelle 3-7: Lösungen, Puffer und Medien. _____	35
Tabelle 3-8: Enzyme und Standards. _____	36
Tabelle 3-9: Unkonjugierte und Fluoreszenz-konjugierte Primärantikörper für Western Blot-, FACS-, CLSM- und <i>in vivo</i> -Analysen. _____	36
Tabelle 3-10: Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen. _____	37
Tabelle 3-11: Verwendete murine Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen. _____	37
Tabelle 3-12: Verwendete murine <i>TaqMan</i> Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen. _____	38
Tabelle 3-13: Verwendete humane Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen. _____	38
Tabelle 3-14: Verwendete humane <i>TaqMan</i> Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen. _____	39
Tabelle 3-15: Verwendete murine Primer-Sequenzen zur Genotypisierung. _____	39
Tabelle 3-16: Verwendete murine <i>TaqMan</i> Sonden-Sequenzen zur Genotypisierung. _____	39
Tabelle 3-17: Verwendete Mausmodelle mit kurzer Beschreibung und Quelle. _____	40
Tabelle 4-1: Zellzahlen für die Aussaat der verwendeten primären Zellen zur Kultivierung. _____	47
Tabelle 4-2: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR. _____	55
Tabelle 4-3: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der <i>SYBR Green</i> qRT-PCR. _____	57
Tabelle 4-4: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der <i>TaqMan</i> qRT-PCR. _____	58
Tabelle 4-5: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der <i>TaqMan Array Fast 96-Well Plates</i> . _____	59
Tabelle 4-6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgelle für die SDS-PAGE. _____	62
Tabelle 4-7: Bewertungsschema für die Beurteilung des Gesundheitszustands der Knochenmark-transplantierten Tieren und Bestrahlungskontrollen. _____	74

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
A	Ampere
ADP / ATP	Adenosindiphosphat / Adenosintriphosphat
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit ( <i>activated partial thromboplastin time</i> )
AU	beliebig gesetzte Einheiten ( <i>arbitrary units</i> )
BC(s)	Blutzelle(n) ( <i>blood cell(s)</i> )
BM	Knochenmark ( <i>bone marrow</i> )
BMC(s)	Knochenmarkszelle(n) ( <i>bone marrow cell(s)</i> )
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti
Ca	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
Cl	Chlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	standardisiertes Nährmedium ( <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
EC(s)	Endothelzelle(n) ( <i>endothelial cell(s)</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
ECL	Elektrochemilumineszenz

## Abkürzungsverzeichnis

---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. et alii (und andere)
f	femto
F	Faktor
F...a	aktivierte Form des Faktors
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HBSS	Salzlösung ( <i>Hank's buffered saline solution</i> )
HDL	Lipoprotein hoher Dichte ( <i>high density lipoprotein</i> )
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HUVEC(s)	Primäre humane Endothelzelle(n) aus der Nabelschnurvene ( <i>human umbilical vein endothelial cell(s)</i> )
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IL / IL	Interleukin
k	Kilo
kb	Kilobase(n)
l	Liter
LDL	Lipoprotein niederer Dichte ( <i>low density lipoprotein</i> )
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop/Mikroskopie ( <i>laser scanning microscope/microscopy</i> )
m	Meter bzw. Milli
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
Na	Natrium
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

## Abkürzungsverzeichnis

---

Pon / PON	Paraoxonase
PS	Phosphatidylserin
PT	Prothrombinzeit ( <i>prothrombin time</i> )
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
Redox	Reduktion-Oxidation
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunde(n)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

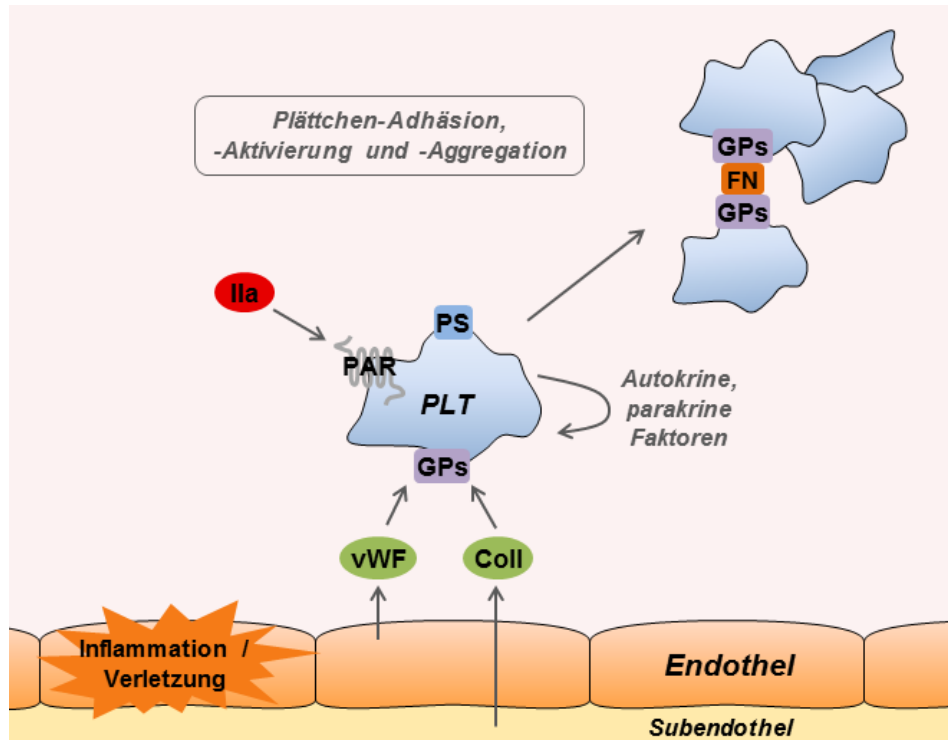
# 1 Einleitung

## 1.1 Das hämostatische System

Das hämostatische System umfasst die Gesamtheit aller physiologischen Reaktionen, die für die Beendigung einer Blutung verantwortlich sind und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Gerinnung und der Fließfähigkeit des Blutes aufrechterhalten.<sup>1, 2</sup> Sowohl zelluläre als auch molekulare Mediatoren sind an der Regulation des hämostatischen Gleichgewichts beteiligt und treten miteinander in einer Vielzahl von parallel verlaufenden Reaktionen in komplexe Wechselwirkungen. Bei Gefäßverletzungen werden zirkulierende Thrombozyten (Blutplättchen) zum Ort der Verletzung rekrutiert, wo sie zu einer Hauptkomponente des sich entwickelnden Thrombus werden. Zugleich wird durch die Initiation der plasmatischen Gerinnungskaskade Thrombin und schließlich ein stabiles Fibrinnetzwerk gebildet, das zusammen mit dem Thrombozyten-Thrombus für den Wundverschluss sorgt. Regulatorische Mechanismen wirken diesen Reaktionen entgegen und sorgen somit für die räumliche und zeitliche Begrenzung der Gerinnung.<sup>1</sup> Der lebenswichtige Mechanismus der Hämostase kann jedoch durch chronische pathologische Stimuli, wie z. B. durch vaskuläre Entzündungsprozesse, zu einer übermäßigen und unkontrollierten Aktivierung der Gerinnung führen. Dadurch können lebensbedrohliche kardiovaskuläre Ereignisse hervorgerufen werden (siehe 1.3).<sup>3</sup> In den letzten Jahren haben diverse Studien gezeigt, dass das anti-oxidative Protein Paraoxonase-2 (PON2) vor kardiovaskulären Erkrankungen schützt (siehe 1.2.2).<sup>4</sup> Da die Blutgerinnung kardiovaskuläre Pathologien maßgeblich beeinflusst,<sup>2, 3</sup> wird in der vorliegenden Arbeit erstmals die Rolle der PON2 in der Blutgerinnung charakterisiert wird. Im Hinblick darauf werden im Folgenden die grundlegenden Vorgänge und Komponenten der Hämostase erläutert.

### 1.1.1 Primäre Hämostase

Die Hämostase lässt sich in zwei Phasen, die primäre und sekundäre Hämostase, unterteilen, welche *in vivo* jedoch nicht getrennt voneinander ablaufen, sondern in enger Wechselwirkung miteinander stehen (siehe 1.1.3).<sup>5</sup>



**Abbildung 1-1: Die primäre Hämostase umfasst die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten.** Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion an der Gefäßwand durch die Bindung von (sub)endothelialen Proteinen (vWF, Collagen) und Thrombin (IIa) an thrombozytäre Rezeptoren sowie der darauffolgenden Thrombozytenaktivierung, welche mit der Expression und Sekretion wichtiger Moleküle einhergeht und schließlich die Thrombozytenaggregation induziert. vWF: von-Willebrand-Faktor; Coll: Collagen; GPs: Glykoprotein-Rezeptoren; PS: Phosphatidylserin; PAR: Protease-aktivierter Rezeptor; FN: Fibrinogen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die primäre Hämostase wird durch die Thrombozyten vermittelt (Abbildung 1-1). Diese kernlosen Zellen entstehen durch Zytoplasma-Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark und zirkulieren zunächst in einem ruhenden Zustand im Blutkreislauf.<sup>6</sup> In Antwort auf Gefäßverletzungen binden die Thrombozyten über die Membranrezeptoren Glykoprotein (GP) Ib-V-IX und VI an die freigelegten subendothelialen Collagenfasern und an immobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF). vWF wird u. a. von Endothelzellen freigesetzt und bindet an die endotheliale Zelloberfläche oder an die subendotheliale Matrix bindet.<sup>5</sup> Die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand sowie die Bindung weiterer aktivierender Faktoren, z. B. von Thrombin an Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), löst die Thrombozytenaktivierung aus.<sup>1</sup> Aktivierte Thrombozyten setzen aus ihren Speicher-Granula parakrine und autokrine Mediatoren, wie Adenosindiphosphat (ADP), vWF, Serotonin und Plättchenfaktor 4 frei, welche die Aktivierung der Thrombozyten vorantreiben, pro-inflammatorische Prozesse einleiten und eine Vasokonstriktion bewirken.<sup>2, 6</sup> Darüber hinaus werden die Gerinnungsfaktoren FVIII, FV sowie  $Ca^{2+}$  sekretiert und negativ geladene Phospholipide in der äußeren Schicht der thrombozytären



Plasmamembran angereichert, was sich katalysierend auf die plasmatische Gerinnungskaskade auswirkt (siehe 1.1.3).<sup>6</sup> Des Weiteren wird der Integrin-Rezeptor GPIIb/IIIa auf den Thrombozyten aktiviert. Der aktivierte GPIIb/IIIa vernetzt über die Bindung von Fibrinogen, vWF oder Fibronectin die Thrombozyten untereinander und ermöglicht damit die Thrombozytenaggregation. Im Zuge dessen kommt es durch eine Umorganisation des Zytoskeletts der Thrombozyten zur Ausbildung von Pseudopodien, die eine Quervernetzung ermöglichen. Diese molekularen Mechanismen der Plättchenadhäsion, -aktivierung und -aggregation münden schließlich in der Ausbildung eines primären Thrombus.<sup>2,6</sup>

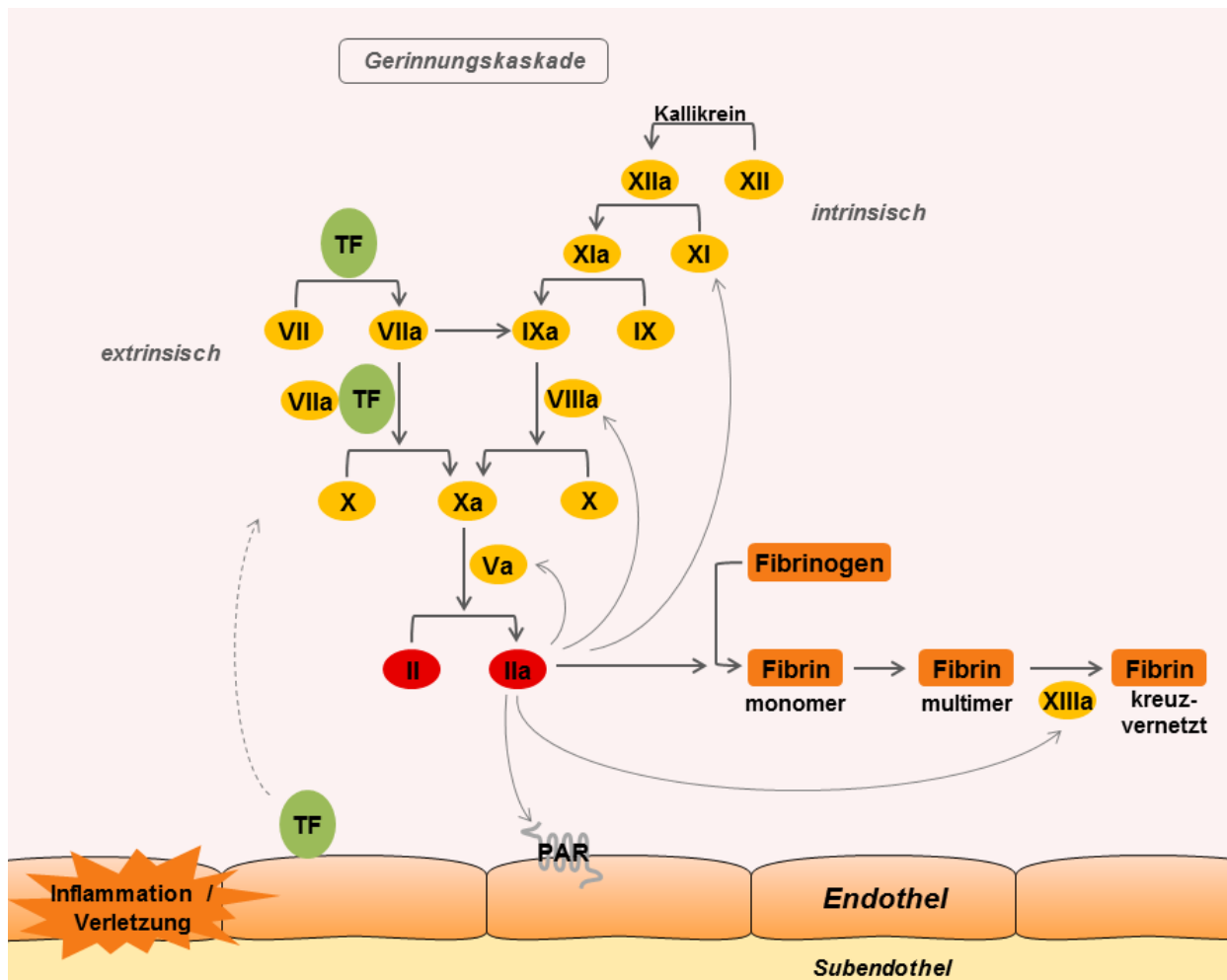
### 1.1.2 Sekundäre Hämostase

Parallel zu den Prozessen der primären Hämostase wird das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert.<sup>5</sup> In dieser Phase, der sekundären Hämostase, bewirkt eine wasserfallartige Kaskade von enzymatischen Reaktionen, welche bereits 1964 von Davie et al. beschrieben wurden, die Aktivierung von einer Reihe von plasmatischen Gerinnungsfaktoren.<sup>7</sup> In dieser Gerinnungskaskade wird jeweils ein inaktiver Gerinnungsfaktor (Zymogen) durch proteolytische Spaltung in eine aktive Protease überführt, welche ihrerseits das nächste Zymogen der Reaktionsabfolge aktiviert. Auf diese Weise wird schließlich Prothrombin (FII) in Thrombin (FIIa) umgewandelt. Die aktive Protease Thrombin spaltet Fibrinogen (FI) in Fibrin (FIa), welches durch Polymerisationsreaktionen ein Fasernetz ausbildet. In einem letzten Schritt katalysiert der durch Thrombin aktivierte FXIIIa kovalente Kreuzvernetzungen zwischen den Fibrinfasern, so dass schließlich ein festes Fibrinfasernetz resultiert (Abbildung 1-2). Zusammen mit den aggregierten Thrombozyten und mit eingebetteten Erythrozyten bildet das Fibrinnetz einen stabilen sekundären Thrombus, der die Blutung effektiv stillt.

Bei den Gerinnungsfaktoren handelt es sich um im Plasma zirkulierende Glykoproteine, die hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden. Sie werden in zwei verschiedene Klassen eingeteilt: Serinproteasen (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII) und Serinprotease-Kofaktoren (FV, FVIII). Letztere haben keine eigene enzymatische Aktivität, sind jedoch essentiell an der Aktivierung der Serinproteasen beteiligt. Von zentraler Bedeutung für die pro-koagulatorische Aktivität der Serinproteasen ist die post-transkriptionelle Carboxylierung von Glutamin-Resten in der N-terminalen Domäne. Dieser Schritt wird durch die  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase in der Leber mithilfe des Kofaktors Vitamin K katalysiert, weswegen diese Serinproteasen auch als

Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren bezeichnet werden. Die carboxylierten Glutamin-Reste binden  $\text{Ca}^{2+}$  und induzieren damit eine Konformationsänderung im Protein, welche die Bindung des Gerinnungsfaktors an Phosphatidylserin auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen oder Endothelzellen ermöglicht (siehe 1.1.3). Diese Bindung ist für einen effektiven Ablauf der Gerinnung essentiell. <sup>5</sup>

Die plasmatische Gerinnungskaskade lässt sich in zwei verschiedene Aktivierungswege unterteilen: die extrinsische und intrinsische Gerinnung. Diese Reaktionswege werden durch unterschiedliche Faktoren induziert, münden jedoch in einen gemeinsamen Weg, welcher die Aktivierung von Thrombin katalysiert (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Die sekundäre Hämostase umfasst die plasmatische extrinsische und intrinsische Gerinnungskaskade.** Schematische Darstellung der kaskadenartigen Aktivierungsreaktionen der Gerinnungsfaktoren, die über den Tissue Factor (TF)-induzierten extrinsischen Weg und über den amplifizierenden, intrinsischen Weg zur Thrombin (IIa)-Generierung führen, was schließlich in der Ausbildung eines Fibrinfasernetzwerks resultiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

### *Extrinsisches System*

Der primäre Auslöser der Blutgerinnung ist der transmembrane Glykoprotein-Rezeptor *Tissue Factor* (TF; Gewebefaktor; FIII), welcher den extrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung und damit den Hauptinitiationsschritt der Blutgerinnung einleitet.<sup>8</sup> Unter physiologischen Bedingungen wird TF hauptsächlich von Zellen des subendothelialen Gewebes exprimiert, die nicht in direktem Kontakt mit dem Blutstrom stehen, z. B. von Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen.<sup>9</sup> Diese extravaskuläre Lokalisation gewährleistet eine schnelle und effektive Induktion des extrinsischen Aktivierungswegs bei Gefäßverletzungen, da TF im Zuge der Freilegung des subendothelialen Gewebes den im Blutstrom zirkulierenden Gerinnungsfaktor FVII binden kann und diesen folglich aktiviert (siehe unten).<sup>1</sup> Bei Entzündungen wird in Antwort auf Zytokine und andere pro-inflammatorische Stimuli die TF-Expression auf Endothelzellen und zirkulierenden Monozyten induziert, so dass auch in diesem Fall die Gerinnungsreaktion eingeleitet werden kann.<sup>10, 11</sup> Allerdings kommt TF auch in einer inaktiven („*cryptic*“) Form auf der Zelloberfläche vor, welche durch post-transkriptionelle Mechanismen in die gerinnungsaktive („*decrypted*“) Form überführt werden muss.<sup>12</sup> Dieser Prozess, welcher als *TF decryption* bezeichnet wird, wird in 5.4 und 6.1 detaillierter thematisiert.

Im Folgenden wird der Ablauf der extrinsischen Gerinnungskaskade kurz beschrieben (Abbildung 1-2). Die plasmatische Gerinnung wird eingeleitet, in dem die extrazelluläre Domäne von TF FVII bzw. FVIIa bindet. Folglich wird der von TF gebundene FVII durch eine Konformationsänderung in der Proteasenregion in seine aktive Form (FVIIa) umgewandelt. FVIIa, welches in geringen Mengen im Plasma vorkommt, wird durch die Bindung an TF stabilisiert und damit katalytisch aktiv.<sup>13</sup> Der resultierende TF-VIIa Komplex auf TF-exprimierenden Zellen katalysiert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Aktivierung von FX und FIX. FXa bindet den Kofaktor FV auf Membranoberflächen und bewirkt im sogenannten Prothrombinase-Komplex zusammen mit FV und  $\text{Ca}^{2+}$  die enzymatische Spaltung von Prothrombin (FII) in Thrombin (FIIa).<sup>1</sup> Die Thrombin-generierung durch diesen Prothrombinase-Komplex mit FV ist zunächst ineffizient, da der Kofaktor FV noch nicht in seiner vollständig aktiven Form vorliegt. Sobald aber geringe Mengen an Thrombin generiert wurden, wird FV durch Thrombin aktiviert und der Prothrombinase-Komplex aus FXa und FVa kann folglich Thrombin effektiv aktivieren.<sup>1</sup> Mit der Bildung von FXa mündet die extrinsische Gerinnungskaskade zusammen mit der intrinsischen Gerinnungskaskade in die gemeinsame Endstrecke der plasmatischen Gerinnung.

### *Intrinsisches System*

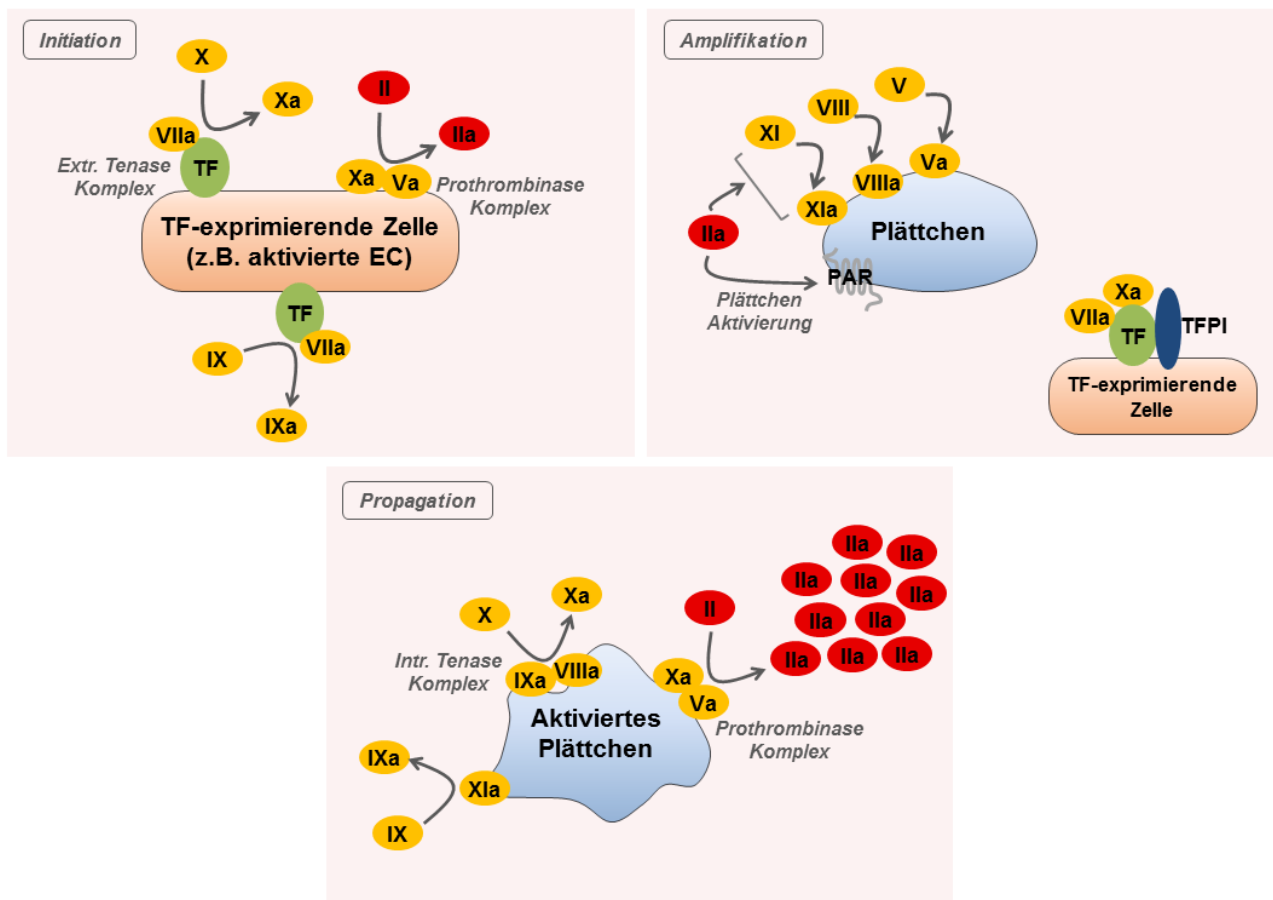
Im Gegensatz zur Funktion des TF-vermittelten extrinsischen Wegs als primärer Initiator des Gerinnungsprozesses, dient der intrinsische Weg hauptsächlich der Amplifikation der Thrombinbildung nach bereits erfolgter Gerinnungsaktivierung. In einer positiven Feedbackschleife aktiviert Thrombin den vorgeschalteten FXI, welcher den intrinsischen Weg einleitet, sowie die Kofaktoren FV und FVIII, welche den Ablauf der Aktivierungsreaktionen effektiv unterstützen. Dadurch wird die Thrombingenerierung massiv verstärkt.<sup>2</sup>

Die Reaktionskaskade des intrinsischen Weges und dessen Wechselwirkung mit dem TF-vermittelten Weg werden im Folgenden kurz beleuchtet (Abbildung 1-2). FXIa katalysiert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Spaltung von FIX. FIXa bewirkt im Tenase-Komplex gebunden an eine Phospholipid-Oberfläche zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und FVIIIa die Aktivierung von FX. Wie oben für den Kofaktor FV des Prothrombinase-Komplexes erläutert, ist auch der Tenase-Komplex erst dann effektiv, wenn Thrombin gebildet wurde und damit der Kofaktor FVIII in seine aktive Form überführt werden konnte. Mit FXa mündet der intrinsische Weg ebenfalls in der Generierung von Thrombin. Für eine zusätzliche Stimulierung des intrinsischen Wegs sorgt außerdem die Aktivierung von FIX durch TF-VIIa.<sup>1</sup> Es existiert jedoch auch ein Aktivierungsweg über die intrinsische Kaskade unabhängig von TF und Thrombin, die sogenannte Kontaktaktivierung von FXII. Hierfür ist der Kontakt von FXII und der plasmatischen Serinprotease Präkallikrein zu anionischen Oberflächen entscheidend. Dies resultiert in der Umwandlung von Präkallikrein in seine aktive Form Kallikrein, welche FXII aktiviert. FXIIa leitet folglich den intrinsischen Weg ein, in dem er die proteolytische Aktivierung von FXI bewirkt. Als negativ geladene Oberflächen dienen u. a. die Plasmamembran aktivierter Plättchen und freigelegtes Kollagen der extrazellulären Matrix.<sup>2</sup>

### **1.1.3 Das Konzept der Zell-basierten Hämostase**

Die Differenzierung der Hämostase in eine primäre und sekundäre Phase sowie die Unterscheidung in eine extrinsische und intrinsische plasmatische Gerinnungskaskade dient lediglich dem besseren Verständnis des hämostatischen Systems. Eine strenge Trennung zwischen diesen Vorgängen besteht *in vivo* nicht. Ganz im Gegenteil bestehen im gesamten Gerinnungsablauf zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächen und den Gerinnungsproteinen und sind sogar für einen effektiven Ablauf der Gerinnung essentiell. Dies

wird im Zell-basierten Modell der Hämostase verdeutlicht.<sup>14</sup> Dieses Modell, welches gegenwärtig breite Anwendung findet, nimmt eine andere Einteilung vor, durch welche die zentrale Bedeutung der zellulären Kontrolle der plasmatischen Gerinnungsreaktion deutlich herausgestellt wird. Es beschreibt drei zeitlich überlappende Abschnitte: die Initiation der Gerinnung, die Amplifikation und die Propagation (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Das Zell-basierte Konzept der Hämostase beschreibt die während der Gerinnung stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den Thrombozyten, Endothelzellen und den plasmatischen Gerinnungsfaktoren.** *Initiation:* Der TF-VIIa Komplex auf TF-exprimierenden Zellen (extrinsischer Tenase Komplex) aktiviert FX und FIX. FXa bewirkt zusammen mit FVa im Prothrombinase-Komplex die initiale Bildung von Thrombin (IIa). *Amplifikation:* Thrombin aktiviert Plättchen über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs). Auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen aktiviert Thrombin FV, FVIII und FXI. Auf TF-exprimierenden Zellen wird TF-VIIa im Komplex mit FXa durch *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) inaktiviert. *Propagation:* Durch die Bindung aktivierter Faktoren an die Thrombozytenoberfläche formieren sich zahlreiche intrinsische Tenase- und Prothrombinase-Komplexe, was in einer großen Anhäufung von Thrombin resultiert.<sup>14</sup> Abbildung in Anlehnung an Hoffmann et al.<sup>14</sup>. Weitere Erklärung siehe Text.

Die durch den TF-VIIa-Komplex vermittelte Initiation der Gerinnung findet auf der Oberfläche von TF-exprimierenden Zellen statt. Der TF-FVIIa-Komplex spaltet FIX und FX in FIXa bzw. FXa, was die Ausbildung des Prothrombinase-Komplexes auf der Zelloberfläche ermöglicht. Während der Amplifikationsphase fördert das durch den TF-Weg initial gebildete Thrombin,

welches zunächst in geringen Mengen vorliegt, die Aktivierung der Thrombozyten und aktiviert außerdem FV, FVIII und FXI. Zeitgleich wird der Initiationskomplex auf TF-exprimierenden Zellen durch *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) inhibiert. In der Propagationsphase kommt es durch die Thrombin-vermittelte FV-, FVIII- und FXI-Aktivierung in großem Maße zur Ausbildung von Tenase- und Prothrombinase-Komplexen auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten und folglich zu einer massiven Anhäufung von Thrombin, dem sogenannten *thrombin burst* (Abbildung 1-3).<sup>14</sup>

Für die Bindung der Gerinnungsfaktoren an Phospholipidmembranen und damit für den effektiven Ablauf der Aktivierungsreaktionen ist insbesondere Phosphatidylserin (PS), welches *in vivo* v. a. in der äußeren Schicht der Plasmamembran von aktivierten Thrombozyten bereitgestellt wird, von zentraler Bedeutung. Die Bindung an PS gewährleistet eine hohe lokale Konzentration der Faktoren, was die Komplexbildung begünstigt, und bewirkt außerdem eine Änderung in der Konformation der Gerinnungsfaktoren, so dass deren optimale Aktivität erreicht wird.<sup>15, 16</sup> Die Rolle der zellulären Externalisierung von PS wird in 5.2.5, 5.6.7 und 6.1 genauer beleuchtet.

### **1.1.4 Physiologische Inhibition der Gerinnung und das Fibrin-abbauende System**

Zur lokalen Eingrenzung und der Verhinderung einer übermäßigen Gerinnungsreaktion sind physiologische Inhibitoren der Gerinnung vorhanden. Die Regulation der Blutgerinnung erfolgt durch drei anti-koagulatorische Mechanismen: (1.) Inhibition von FXa und des TF-FVIIa-Komplexes durch TFPI, (2.) Inhibition von Thrombin, FXa und FIXa durch Antithrombin und (3.) Inaktivierung der Kofaktoren FV und FVIII durch aktiviertes Protein C (APC).<sup>2</sup> TFPI wird auf der Oberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert und sorgt nach Initiation der Gerinnung durch den TF-FVIIa-Komplex für die Unterbindung weiterer Thrombinbildung durch diesen Komplex, indem es mit TF-FVIIa und FXa einen quartären Komplex ausbildet.<sup>13, 14</sup> Deshalb ist die während der Propagationsphase stattfindende Thrombingenerierung nahezu unabhängig vom TF-Weg. Die Propagationsphase wird hauptsächlich durch Antithrombin und APC negativ reguliert. Antithrombin wirkt seine inhibitorische Funktion aus, indem es die im Plasma frei zirkulierenden Serinproteasen Thrombin, FXa und FIXa durch Komplexbildung abfängt. Protein C liegt ähnlich wie die Gerinnungsfaktoren zunächst in inaktiver Form im Plasma vor und wird durch einen Komplex aus Thrombin und dem endothelialen Rezeptor

Thrombomodulin aktiviert. APC inaktiviert FVa und FVIIIa durch Proteolyse, Protein S dient dabei als Kofaktor.<sup>2, 3</sup> In dieser Stelle wird deutlich, dass Thrombin selbst also auch eine anti-koagulatorische Funktion ausübt.

Zusätzlich zur Hemmung der Gerinnungsreaktionen sind regulatorische Prozesse nötig, die das Wachstum des entstehenden Fibrinnetzwerks eindämmen und das Gerinnsel auflösen. Diese Aufgabe hat das fibrinolytische System. Zentraler Mediator der Fibrinolyse ist die Serinprotease Plasmin, welche die Fibrinpolymere des gebildeten Thrombus in kleine Fibrinabbauprodukte spaltet. Initiiert wird die Fibrinolyse durch das von den Endothelzellen exprimierte Enzym gewebspezifischer Plasminogen Aktivator (*Tissue Plasminogen Activator*; tPA) und das Enzym Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (*Urokinase-Type Plasminogen Activator*; uPA). Diese Faktoren katalysieren die proteolytische Umwandlung des Zymogens Plasminogen in aktives Plasmin. Die Aktivität von tPA und uPA wiederum wird u. a. durch Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) kontrolliert, sodass die Fibrinolyse gehemmt und ein übermäßiger Fibrin-Abbau verhindert werden kann.<sup>3</sup>

### **1.1.5 Die Rolle des Endothels in der Blutgerinnung**

Unter den Gefäßwandzellen spielt insbesondere das Endothel, welches im Fokus dieser Arbeit steht, eine zentrale Rolle in der Initiation und Regulation der Gerinnung sowie in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen.<sup>17</sup> Unter physiologischen Bedingungen hat das Endothel wichtige anti-koagulatorische Funktionen. Das intakte Endothel sorgt durch die Expression von Ekto-Nukleotidasen für die Spaltung des pro-koagulatorischen ATP bzw. ADP zu Adenosin sowie durch die Sekretion von Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) für die Hemmung der Thrombozytenaggregation und für Vasodilatation.<sup>2</sup> Darüber hinaus hält es die Fließfähigkeit des Blutes aufrecht, in dem es Inhibitoren der Gerinnungsreaktion, wie z. B. TFPI, sowie Aktivatoren der Fibrinolyse, wie z. B. tPA, bereitstellt (siehe 1.1.4).

Das Endothel übt jedoch nicht nur gerinnungshemmende Funktionen aus. Endothelzellen sind zentral in pathologische Vorgänge involviert, die eine zu starke Blutgerinnung hervorrufen können. Ein wesentlicher Auslöser einer pro-koagulatorischen Aktivierung des Endothels sind vaskuläre Entzündungsprozesse. Pro-inflammatorische Cytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1, induzieren die Expression von TF auf Endothelzellen,<sup>10</sup> sodass die Gerinnungsreaktion durch die Ausbildung des TF-FVIIa-Komplexes auf Endothelzellen induziert wird (siehe 1.1.2).

Entzündungsfördernde Stimuli bewirken darüber hinaus eine verstärkte Synthese des Fibrinolyse-Inhibitors PAI-1 sowie eine Reduktion der tPA-Produktion in Endothelzellen, was eine verminderte fibrinolytische Aktivität des Endothels zur Folge hat. Die pro-inflammatorische und pro-koagulatorische Aktivierung des Endothels geht außerdem mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Thrombozyten einher, was die Entzündungs- und Gerinnungsreaktion vorantreibt.<sup>17</sup>

## 1.2 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Die Paraoxonase-2 (PON2), die im Zentrum dieser Arbeit steht, gehört zusammen mit der Paraoxonase-1 und -3 (PON1, PON3) der Proteinfamilie der Paraoxonasen an.<sup>18</sup> Alle drei Paraoxonasen weisen untereinander auf Nukleinsäure- und Aminosäure-Ebene eine hohe Sequenzähnlichkeit auf.<sup>18, 19</sup> Jedoch bestehen deutliche Unterschiede in deren Expressionsmuster, zellulärer Lokalisation und Aktivität.

Phylogenetische Analysen belegten, dass PON2 vermutlich den evolutionär ältesten Vertreter der Paraoxonasen darstellt und PON1 sowie PON3 wahrscheinlich durch Genduplikation aus PON2 hervorgegangen sind.<sup>20</sup> Alle drei PON-Gene sind unter den Säugern hoch konserviert. Basierend auf der cDNA-Sequenz und der abgeleiteten Aminosäurefolge wurde für PON2 zwischen Maus und Mensch eine Identität von über 85% festgestellt.<sup>18</sup>

PON2 wird sowohl beim Menschen als auch in der Maus ubiquitär exprimiert und ist ausschließlich intrazellulär bzw. Zell-assoziiert lokalisiert, hauptsächlich in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in der Plasmamembran.<sup>18, 21, 22</sup> Im Gegensatz dazu wird PON1 vorwiegend in der Leber exprimiert und liegt zum größten Teil im Serum assoziiert an *high density lipoproteins* (HDL) vor.<sup>20</sup> PON3 wird ebenfalls in der Leber, aber auch in anderen Geweben exprimiert<sup>23</sup> und liegt, wie PON1 aber zu einem geringeren Anteil, HDL-assoziiert im Blutkreislauf vor, wobei die Serum-Lokalisation von PON3 zwischen den Spezies variiert.<sup>24</sup> Für PON3 wurde außerdem, wie für PON2, eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen, hauptsächlich in den Mitochondrien und im ER.<sup>4</sup>

Namensgebend für die Paraoxonasen ist die Fähigkeit von PON1, dem erstbeschriebenen und am besten erforschten Vertreter der Proteinfamilie, das toxische Organophosphat Paraoxon sowie verwandte Substrate zu hydrolysieren. Aufgrund der Homologie zu PON1 wurden die später



entdeckte PON2 und PON3 ebenfalls als Paraoxonasen klassifiziert, obwohl PON2 keine und PON3 eine nur sehr geringe Organophosphatase-Aktivität besitzt.<sup>25</sup> Allen Paraoxonasen gemein ist deren Laktonase-Aktivität, wobei sie unterschiedliche und z. T. überlappende Substratspezifitäten aufweisen.<sup>26, 27</sup> Die endogenen Laktonase-Substrate der Paraoxonasen sind bislang jedoch unbekannt. Allerdings wurde für PON2 gezeigt, dass deren Laktonase-Aktivität einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* darstellt. Dies ist auf die effektive PON2-vermittelte Hydrolyse des Virulenzfaktors N-3-Oxododecanoyl-Homoserinlacton (3OC12) zurückzuführen, wodurch die bakterielle Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* abgeschwächt wird.<sup>28</sup> Des Weiteren besitzen alle drei Paraoxonasen eine wichtige anti-oxidative Funktion (siehe 1.2.1). Aufgrund dieser Funktion wird den Paraoxonasen eine wesentliche Rolle in Krankheitsbildern zugeschrieben, bei denen eine Störung des Redox-Gleichgewichts sowie oxidativer Stress und dadurch induzierte Entzündungsprozesse von Bedeutung sind, wie in der Arteriosklerose (siehe 1.2.2) oder bei Krebserkrankungen.

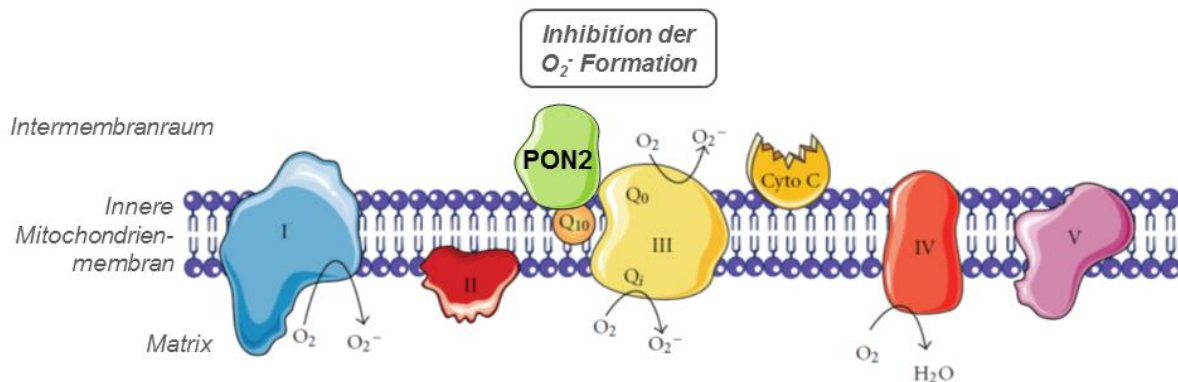
### 1.2.1 Die anti-oxidative Funktion von PON2

Oxidativer Stress tritt auf, wenn die Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), bspw. von Superoxid ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder des Hydroxylradikals ( $OH^\cdot$ ), den Abbau dieser Substanzen durch anti-oxidative Systeme übersteigt. Unter solchen Bedingungen können ROS Redox-sensitive Signalwege modulieren sowie oxidative Modifikationen an diversen Biomolekülen verursachen und damit pathologische Prozesse hervorrufen, wie z. B. inflammatorische Reaktionen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes Mellitus, Morbus Alzheimer und Krebs.<sup>29-33</sup> Interessanterweise wurde gezeigt, dass Paraoxonasen basierend auf ihrer anti-oxidativen Wirkungsweise mit diesen Erkrankungen assoziiert sind.

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Paraoxonasen unterscheidet sich vermutlich auch die anti-oxidative Wirkungsweise dieser Proteine. Das HDL-assoziierte Enzym PON1 verringert durch seine hydrolytische Aktivität die Peroxidation von Lipoproteinen im Serum.<sup>34, 35</sup> Das intrazelluläre Protein PON2 verfügt dagegen über einen alternativen anti-oxidativen Mechanismus, durch den es einen Zell-basierten Schutz vor erhöhtem oxidativen Stress vermittelt.<sup>23, 36, 37</sup> Da PON3 sowohl intrazellulär lokalisiert ist als auch (im Menschen, jedoch

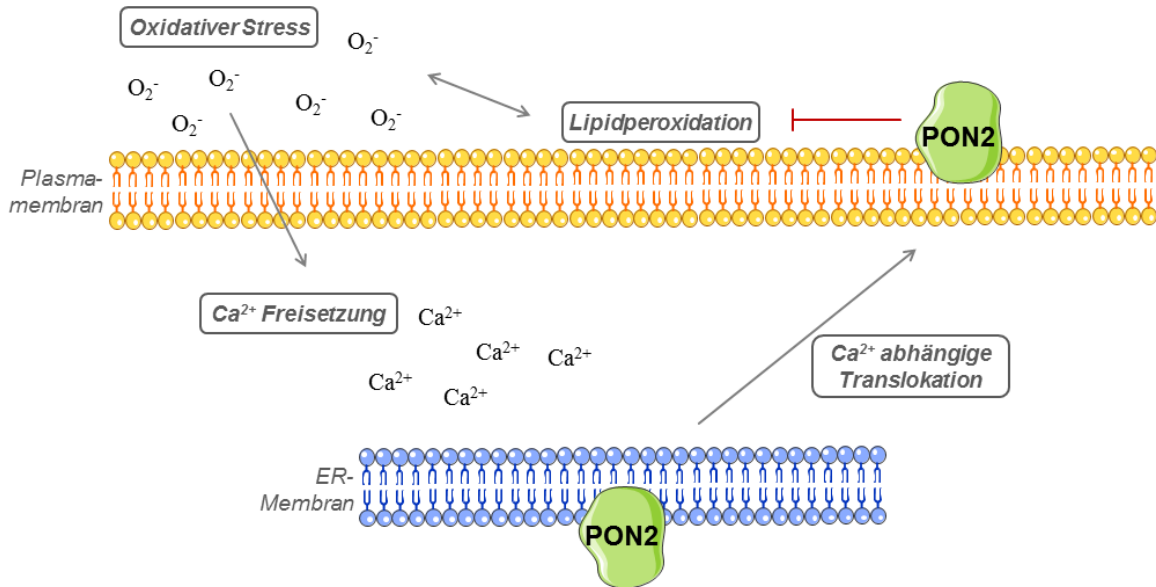
nicht in der Maus) HDL-assoziiert vorkommt, kann PON3 zum einen im Serum PON1-ähnliche Funktionen einnehmen und die LDL-Peroxidation effektiv verringern,<sup>38</sup> sowie zum anderen eine essentielle cytoprotektive Funktion wie PON2 ausüben<sup>23</sup>.

*In vitro* Studien an vaskulären Zellen zeigten, dass der RNAi-vermittelte *knockdown* von PON2 den Gehalt intrazellulärer ROS signifikant erhöht, eine Überexpression von PON2 dagegen den ROS-Level signifikant verringert.<sup>21, 39</sup> Auf der Grundlage biochemischer und zellbiologischer Analysen wurde die spezifische Verminderung der mitochondrialen Superoxid-Produktion als molekularen Mechanismus der anti-oxidativen Funktion von PON2 beschrieben.<sup>37, 40</sup> Wahrscheinlich verhindert PON2 durch die Bindung an Coenzym Q10 in der inneren Mitochondrienmembran die Übertragung von Elektronen von Komplex I und Komplex III auf molekularen Sauerstoff (Abbildung 1-4). Da PON2 Superoxid nicht direkt abbaut, sondern vielmehr dessen Bildung Coenzym Q10-abhängig verhindert, hat die anti-oxidative Funktion von PON2 also einen präventiven Charakter. Zudem zeigten Punktmutationsstudien, durch welche die enzymatische Laktonase-Aktivität spezifisch ausgeschaltet werden konnte, dass der beschriebene anti-oxidative Mechanismus von PON2 von deren Laktonase-Aktivität unabhängig ist.<sup>37</sup>



**Abbildung 1-4: Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 in der inneren Mitochondrienmembran.** Schematische Darstellung der Wirkung von PON2 in der mitochondrialen Elektronentransportkette. PON2 interagiert mit Coenzym Q10 in der inneren Mitochondrienmembran und verhindert dadurch die Bildung von Superoxid ( $O_2^-$ ) am Komplex I und Komplex III der mitochondrialen Atmungskette.<sup>37</sup> Abbildung aus Witte et al.<sup>4</sup> Weitere Erklärungen siehe Text.

Des Weiteren scheint der PON2-vermittelte Schutz vor oxidativem Stress die Inhibition der Peroxidation von Plasmamembranlipiden zu beinhalten.<sup>22</sup> Eine neuere Studie zeigte, dass PON2 ein Typ II Transmembranprotein ist und in Antwort auf oxidativen Stress vom ER an die Plasmamembran translozieren kann. Dort hemmt die C-terminale, extrazelluläre Domäne von PON2 wahrscheinlich durch ihre hydrolytische Aktivität die durch oxidativen Stress-induzierte Lipidperoxidation. (Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5: Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 involviert die Inhibition der Lipidperoxidation an der Plasmamembran.** Schematische Darstellung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen PON2 Translokation in Antwort auf oxidativen Stress und der PON2-vermittelten Inhibition der Peroxidation von Lipiden der Plasmamembran. <sup>22</sup> Abbildung in Anlehnung an Hagmann et al. <sup>22</sup>. Weitere Erklärungen siehe Text.

PON2 scheint demnach in den Mitochondrien durch Coenzym Q10-Bindung unabhängig von der enzymatischen Aktivität die Superoxid-Entstehung zu verhindern und zusätzlich durch ihre Laktonase-Aktivität die durch oxidativen Stress verursachte Lipidperoxidation der Plasmamembran zu inhibieren.

Da die mitochondriale Superoxid-Produktion essentiell in Zelltod-Signalwege involviert ist, hat der anti-oxidative Effekt von PON2 (und PON3) Auswirkungen auf den apoptotischen Zelltod. Die normalerweise durch PON2/3 verringerte mitochondriale Superoxid-Bildung resultiert in einer herabgesetzten ROS-vermittelten mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung, was eine verringerte intrinsische Apoptose sowie eine gesteigerte zelluläre Chemotherapeutika-Resistenz zur Folge hat. <sup>23, 39</sup> In Übereinstimmung mit dieser anti-apoptotischen Wirkung wurde beschrieben, dass verschiedene Tumore PON2 oder PON3 überexprimieren und damit eine erhöhte Zelltod-Resistenz aufweisen. <sup>23, 39</sup>

### 1.2.2 PON2 in der Arteriosklerose

Vaskulärer oxidativer Stress provoziert Entzündungsprozesse in der Gefäßwand, was gemeinsam in einer Beeinträchtigung der Funktion des Endothels, der sogenannten endothelialen Dysfunktion, resultiert. Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine verstärkte Gefäßpermeabilität und eine Beeinträchtigung der Vasotonusregulation charakterisiert. Diese Faktoren begünstigen

die Ausbildung von entzündeten, lipidreichen Gefäßläsionen und damit die Pathogenese der Arteriosklerose (Atherogenese).<sup>41</sup> Darüber hinaus ist die ROS-vermittelte oxidative Modifikation von *low density lipoproteins* (LDL) an der Initiierung und an der Progression der Arteriosklerose beteiligt.<sup>30</sup> Im Zusammenhang mit diesen pathologischen Prozessen wurde für alle Mitglieder der Paraoxonasen-Familie eine anti-atherogene Eigenschaft nachgewiesen, welche sich aus den beschriebenen anti-oxidativen Mechanismen ableitet.

Erste Hinweise auf die anti-atherogene Aktivität der Paraoxonasen lieferten Studien, die belegten, dass die HDL-assoziierte PON1 vor der oxidativen Modifikation von LDL *in vitro* schützt. Folgende Analysen zeigten, dass PON1 oxidierte Cholesterolester und Phospholipide in den oxidierten Lipoproteinen hydrolytisch degradiert, was wohl den zugrundeliegenden Mechanismus der anti-atherogenen Funktion von PON1 darstellt.<sup>34, 42-46</sup> Im Pon1-defizienten Mausmodell konnte der protektive Effekt von PON1 gegenüber der LDL-Oxidation bestätigt sowie ein deutliches erhöhtes Arteriosklerose-Risiko dieser Mäuse nachgewiesen werden.<sup>47, 48</sup> Die Überexpression von PON1 *in vivo* hat dagegen eine erhöhte Resistenz gegen Arteriosklerose zur Folge.<sup>49</sup> Ein weiterer, jüngst beschriebener Mechanismus der anti-atherogenen Wirkung der PON1 beruht auf deren Wechselwirkung mit der ebenfalls HDL-assoziierten Myeloperoxidase, welche für die oxidative Modifikation von Serumlipiden und Proteinen verantwortlich ist. PON1 kann die Aktivität der Myeloperoxidase durch Bindung effektiv inhibieren.<sup>50</sup>

Obwohl PON2 nicht HDL-assoziiert im Serum vorliegt, sondern intrazellulär lokalisiert ist, wurde auch für dieses Mitglied der Paraoxonasen-Familie eine ausgeprägte anti-atherogene Eigenschaft nachgewiesen. PON2-überexprimierende Zellen, welche eine erhöhte anti-oxidative Aktivität aufweisen (siehe 1.2.1), oxidieren LDL *in vitro* weniger effektiv als naive Zellen.<sup>36</sup> Eine Analyse arteriosklerotischer Plaques aus humanen Karotis-Arterien ergab, dass die PON2-Expression in den Gefäßwandläsionen im Vergleich zu gesundem Gefäßmaterial signifikant reduziert ist.<sup>51</sup> Zudem wurde im Tiermodell gezeigt, dass die adenovirale Überexpression der humanen PON2 in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Verringerung der Arteriosklerose *in vivo* führt.<sup>52</sup> Die anti-atherogene Wirkung von PON2 zeigte sich außerdem darin, dass unter fettreicher Ernährung (*high-fat diet*) Mäuse mit Pon2-Defizienz im Vergleich zu WT Kontrollen eine deutlich verstärkte Arteriosklerose entwickeln. Dies wurde auf eine erhöhte LDL-Peroxydation sowie auf eine verminderte anti-inflammatorische und anti-atherogene Kapazität des HDLs und der Makrophagen in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zurückgeführt.<sup>53</sup> Horke et al. wiesen in diesem Zusammenhang

nach, dass PON2 in den Zellen der Gefäßwand anti-oxidativ wirkt, was der endothelialen Dysfunktion entgegenwirken und damit zum Schutz vor der Arteriosklerose beitragen könnte.<sup>21</sup>

PON3 schützt ebenfalls vor der Oxidation von LDL *in vitro*.<sup>38</sup> Weil PON3 HDL-assoziiert in humanem Serum nachgewiesen wurde, wurde diesem Protein zunächst eine mit PON1 vergleichbare anti-oxidative und somit anti-atherogene Funktion zugesprochen.<sup>54</sup> Wie neuere Studien zeigen, ist der anti-atherogene Effekt von PON3 jedoch sehr wahrscheinlich auf das intrazelluläre Protein zurückzuführen, da die Serumkonzentration von PON3 im Vergleich zu PON1 sehr gering ist und weder die humane noch murine PON3 in überexprimierenden Mäusen mit HDL assoziiert.<sup>24,55</sup>

Im Gegensatz zu PON1, welche vor der Arteriosklerose schützt, indem sie humoral anti-oxidativ wirkt, zeigen also PON2 ausschließlich und PON3 zum größten Teil Zell-basierte anti-oxidative und damit anti-atherogene Funktionen. Wie die intrazelluläre anti-oxidative Wirkungsweise von PON2 und PON3 die Atherogenese beeinflusst, ist im Detail noch unklar. Zum einen scheinen PON2 und PON3 vermutlich über eine Reduktion intrazellulärer Radikalbildung und somit nach extern gelangender ROS die LDL-Oxidation zu inhibieren. Zum anderen könnte die anti-oxidative Funktion entscheidende Prozesse im Endothel und folglich die Atherogenese regulieren.

### 1.3 Die Blutgerinnung in kardiovaskulären Erkrankungen

Wenn das hämostatische System zugunsten pro-koagulatorischer Prozesse aus dem Gleichgewicht gerät, kann die intravasale Blutgerinnung zur Ausbildung von lebensbedrohlichen Gerinnseln im Kreislaufsystem führen, was als Thrombose bezeichnet wird. Thrombosen können in allen Blutgefäßen auftreten, sowohl in venösen als auch in arteriellen. Sie entstehen aufgrund von Veränderungen der Endothelschicht, der Zusammensetzung und Funktion der zirkulierenden Blutzellen und Gerinnungsfaktoren im Blut sowie aufgrund einer herabgesetzten Blutströmungsgeschwindigkeit. Während letzteres v. a. auf venöse Thrombosen zutrifft, wie z. B. auf die tiefe Beinvenenthrombose, werden arterielle Thrombosen meistens von arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand hervorgerufen.<sup>56</sup> Die gebildeten Blutgerinnsel können in lebensbedrohlichen Gefäßverschlüssen resultieren, entweder am Entstehungsort oder in Form von Embolien in peripheren Gefäßregionen. Auf diese Weise kann eine venöse Thrombose zur Lungenembolie, eine arterielle Thrombose zum Schlaganfall oder Herzinfarkt führen.

Da für PON2 eine Rolle in der Arteriosklerose beschrieben wurde (siehe 1.2.2), ist im Rahmen dieser Arbeit insbesondere der Zusammenhang zwischen der Blutgerinnung und der Arteriosklerose relevant. Neuere experimentelle Daten weisen darauf hin, dass die Blutgerinnung nicht nur für die Atherothrombose im Zuge einer Ruptur von arteriosklerotischen Plaques ausschlaggebend ist, sondern dass die Blutgerinnung auch die Entstehung und Progression der Arteriosklerose begünstigt. Während früher Phasen der Arteriosklerose wurde in der veränderten Gefäßwand eine Vielzahl an Gerinnungsproteinen nachgewiesen. Frühe sich entwickelnde arteriosklerotische Läsionen weisen darüber hinaus sogar im Vergleich zu späten stabilen Läsionen eine höhere Aktivität von Gerinnungsfaktoren auf.<sup>57</sup> Insbesondere scheint Thrombin eine wichtige Rolle in der Atherogenese zu spielen. Über PARs auf Endothelzellen, Thrombozyten und vaskulären glatten Muskelzellen induziert Thrombin pro-atherogene Prozesse, wie z. B. die Induktion der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen, Cytokinen und Chemokinen, die Plättchenaktivierung und die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen.<sup>58</sup> TF im Komplex mit FVIIa und FXa, welcher für die Thrombingenerierung verantwortlich ist, aber auch wichtige pro-inflammatorische Signalfunktionen ausübt, löst ähnliche pro-atherogene Prozesse im Gefäß aus.<sup>59</sup> Diese vielseitigen Wechselwirkungen der Komponenten des hämostatischen Systems mit der Inflammation und der Atherogenese verdeutlichen, dass die Blutgerinnung einen wichtigen Auslöser kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt.

## 2 Zielsetzung

Diverse Studien wiesen PON2 eine anti-oxidative Funktion nach und zeigten, dass Pon2-defiziente Mäuse ein deutlich erhöhtes Arteriosklerose-Risiko aufweisen. Da eine verstärkte Blutgerinnung zur Atherogenese beiträgt, besteht eine mögliche Ursache des kardiovaskulären Phänotyps von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen in einer Dysregulation des hämostatischen Systems. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion von PON2 in der Blutgerinnung zu charakterisieren und die zugrundeliegenden Mechanismen einer PON2-vermittelten Gerinnungsregulation aufzuklären sowie die daran beteiligten zellulären Komponenten des hämostatischen Systems zu identifizieren.

Dazu sollte in einem ersten Ansatz mithilfe von Gerinnungszeitmessungen aufgedeckt werden, ob Pon2-Defizienz *in vivo* die Blutgerinnung beeinflusst. Da aus vorherigen Studien der Arbeitsgruppe hervorging, dass PON2 in Gefäßwandzellen anti-oxidativ wirkt, sollte dies *in vivo* überprüft werden. Hierfür galt es mittels Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-basierter Methoden den basalen Gehalt bzw. die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Pon2<sup>-/-</sup> Gefäß im Vergleich zum WT zu bestimmen. Weil oxidativer Stress eine Aktivierung des Endothels sowie eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion auslöst und dies die Blutgerinnung fördert, sollte außerdem die Auswirkung der Pon2-Defizienz auf das endotheliale Expressionsprofil, auf Aktivierungsmarker der Endotheloberfläche sowie auf die Vasorelaxation untersucht werden. Darüber hinaus galt es mithilfe von immunologischen Nachweisverfahren und funktionalen Tests, die plasmatische Konzentration bzw. Aktivität von Cytokinen und gerinnungsfördernden Proteinen in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zu bestimmen.

Da sich anhand dieser Analysen ein pro-koagulatorischer Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse sowie eine pro-inflammatorische und TF-vermittelte gerinnungsfördernde Funktion des Pon2<sup>-/-</sup> Endothels herausstellte, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob in der Tat primär die endothelial exprimierte PON2 TF-abhängig die Blutgerinnung reguliert. Dazu wurden anti-TF Antikörper-Behandlungen *in vivo*, das Cre-loxP-Rekombinationssystem sowie Knochenmarkstransplantationen eingesetzt. Zusätzlich sollten durch diese Ansätze und weitere funktionelle Untersuchungen die Rolle von PON2 in der Thrombozyten-vermittelten Gerinnung untersucht werden.

Als fernes Ziel sollten die aus dieser Arbeit hervorgehenden Befunde dabei helfen, die Rolle der PON2 in kardiovaskulären Erkrankungen weiter aufzuklären und mögliche neue Therapie-strategien aufzuzeigen.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden durch Roth, Sigma Aldrich bzw. Merck erhalten.

**Tabelle 3-1: Chemikalien.**

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich
Antibiotikum/Antimykotikum, 100x, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/mL Fungizone® Antimykotikum	Gibco
APC-Cy7 Streptavidin	Biolegend
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA, Albumin Fraktion V)	Roth
CellROX-DeepRed	Molecular Probes
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	Molecular Probes
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dihydroethidium (DHE)	Molecular Probes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DRAQ5®	Cell Signaling
EDTA Solution, 100x	Thermo Scientific
Ethanol, vergällt	Roth
Ethanol Rotipuran®	Roth
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma Aldrich
Glycerin, 99%	Roth
Glycin	Roth
<i>Halt™ Protease Inhibitor Cocktail</i> , 100x	Thermo Scientific
HBSS mit Calcium und Magnesium (HBSS <sup>++</sup> ), steril	Gibco
Isofluran	Abbott
Isopropanol	Roth
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]Pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion)	Wako Chemicals
Lectin ( <i>Bandeiraea simplicifolia</i> ), FITC konjugiert	Sigma Aldrich
Milchpulver	Roth
Methanol	Roth
Penicillin / Streptomycin, 100x , 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/mL Streptomycin	Gibco



Pentobarbital	Serva
RPMI 1640	Gibco
sulfo-NHS-LC-biotin	Pierce
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Tween® 20	Sigma Aldrich

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien.**

24- <i>well</i> -Platten, 6- <i>well</i> -Platten	Greiner
96- <i>well</i> -Platten, µClear®, transparent, weiß	Greiner
<i>Amersham Hyperfilm™ ECL</i>	GE Healthcare
<i>Cell Strainer Cap</i> (12x75 mm)	BD Biosciences
Combitips 1,25 ml Pipettenspitzen	Eppendorf
Deckgläser, 24 x 50 mm	Menzel-Gläser
Einmalskalpell Typ 10A, steril	Swann-Morton
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Injekt®-F Feindosierungsspritze, 1 ml	Braun
Kryoröhrchen	Greiner
<i>Lab-Tek Chamber Slides</i>	Greiner
Micro Tetravettes für KC 4 Delta Coagulation Analyzer	Tcoag
Microvette® 500 K3E	Sarstedt
Pasteurpipetten	Roth
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml), steril	Greiner
Sterican® Standardkanülen (0,45 x 25 mm) 26G, 26G1/2	Braun
Sterican® Standardkanülen (0,60 x 25mm) 23G	Braun
Superfrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser
Vasofix Safety Kanülen (2,2 x 50 mm) 14G	Braun
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturflaschen steril mit Filterdeckel (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner
Zellsieb, 100 µm	Greiner

### 3.3 Laborgeräte

**Tabelle 3-3: Laborgeräte.**

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
ChemiDoc XRS Imaging System mit QuantityOne 4.6.7 Software	BioRad
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren CO-150 und Excella ECO-170	New Brunswick Scientific
Cryostat CM 1950	Leica
FACSCanto II Durchflusszytometer mit FACSDiva Software	BD Biosciences
FACSVantage SE mit CellQuest Pro Software	BD Biosciences
FluoStar Optima	BMG Labtech
Folienschweißgerät	Severin
Gelelektrophorese System Owl™ B2	Owl / Thermo Fisher
HEMAVET 950FS	DREW Scientific Inc
KC 4 Delta Coagulation Analyzer	Trinity Biotech
Leitz DM IL Mikroskop	Leica
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Mini-Transilluminator	BioRad
My Cycler™ Thermal Cycler	BioRad
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L	Peqlab
Präparierbesteck	FST
PT 1200 Präzisionswaage	Sartorius
Semidry-Blotsystem	BioRad
StepOnePlus Real Time-PCR System	Applied Biosystems
Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer	Sysmex
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Tischzentrifuge	Labnet
Vollschutzbestrahlungsanlage für Kleintiere, Typ OB 58-BA, Cäsium-137 Quelle 2x 60 Tetrabecquerel, Strahler-Nr: 086-90 + 090-90	Buchler
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GSL
Wire Myograph System	Danish Myo Technology
Zeiss LSM-710 mit ZEN2011 Software	Zeiss
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

### 3.4 Reagenzien und Kits

**Tabelle 3-4: Reagenzien.**

ACTICHROME® TF activity assay	Sekisui Diagnostics
Arcturur® PicoPure® RNA Isolation Kit	Applied Biosystems
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
dNTP-Mix	Peqlab
Gerinnungsfaktor II-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor IX-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor VIII-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor VII-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor XII-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor XI-Mangelplasma	Siemens
Gerinnungsfaktor X-Mangelplasma	Siemens
GoTaq Polymerase Puffer (5x)	Promega
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
KAPA SYBR FAST ABI Prism	Peqlab
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen
OLIGOBIND® Thrombin activity assay	Sekisui Diagnostics
Pathrombin SL	Siemens
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab
Q-Plex Array Chemiluminescent custom-made mouse multi-analyte ELISA	Quansys Bioscience
TaqMan® Array 96-Well Fast Plates: Mouse custom-made TaqMan® Array, Human Thrombin TaqMan® Array	Applied Biosystems
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems
TAT Complexes Mouse ELISA Kit	Abnova
Thromborel S	Siemens
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer
WesternBright™ Sirius HRP substrate	Advansta

**Tabelle 3-5: Bezeichnung, Entrez-Identifikationsnummer und Assay-Identifikationsnummer der im *Mouse custom-made TaqMan® Array* analysierten Gene.**

Gen	Entrez ID	Assay ID	Gen	Entrez ID	Assay ID
Pon2	330260	Mm00447159_m1	Thbs3	21827	Mm00449802_m1
Gtf2i	14886	Mm00494826_m1	Thbs4	21828	Mm03003598_s1
Pecam1	18613	Mm01242584_m1	Plg	18815	Mm00447087_m1
Nfkb1	18033	Mm00476361_m1	Plau	18792	Mm01274460_g1
Myc	17869	Mm00487804_m1	Plat	18791	Mm00476931_m1
Rel	19696	Mm01239661_m1	Plaur	18793	Mm00440911_m1
Cdkn1a	12575	Mm04205640_g1	Serpine1	18787	Mm00435860_m1
Cdkn1b	12576	Mm00438168_m1	Serpib2	18788	Mm00440905_m1
Egf	13645	Mm00438696_m1	Serpind1	15160	Mm00433939_m1
Egfr	13649	Mm00433023_m1	Serpina1a	20700	Mm02748447_g1
Vegfa	22339	Mm01281449_m1	Serpinf2	18816	Mm00435868_m1
Flt1	14254	Mm00438980_m1	Klkb1	16621	Mm00434658_m1
Kdr	16542	Mm01222421_m1	Fn1	14268	Mm01256744_m1
Flt4	14257	Mm01292604_m1	Cxcr1	227288	Mm00731329_s1
Pdgfa	18590	Mm01205760_m1	Cxcr2	12765	Mm99999117_s1
Pdgfra	18595	Mm00440701_m1	Selp	20344	Mm01295931_m1
Pdgfrb	18596	Mm00435546_m1	Sele	20339	Mm00441278_m1
Hspa5	14828	Mm00517690_g1	Il6	16193	Mm00446190_m1
Angpt4	11602	Mm00507766_m1	Cxcl1	14825	Mm04207460_m1
Gata1	14460	Mm01352636_m1	Ccl2	20296	Mm00441242_m1
Gata2	14461	Mm00492301_m1	Ccl5	20304	Mm01302427_m1
Gata3	14462	Mm00484683_m1	C3ar1	12267	Mm02620006_s1
F2r	14062	Mm00438851_m1	C5ar1	12273	Mm00500292_s1
F2r1	14063	Mm00433160_m1	Tgfb1	21803	Mm01178820_m1
F2r2	14064	Mm00438852_m1	Tgfb2	21808	Mm00436955_m1
F2r3	14065	Mm00433161_g1	Icam1	15894	Mm00516023_m1
Fga	14161	Mm00802584_m1	Vcam1	22329	Mm01320970_m1
Fgb	110135	Mm00805336_m1	Tnf	21926	Mm00443260_g1
Fgg	99571	Mm00513575_m1	Foxo1	56458	Mm00490672_m1
F2	14061	Mm00438843_m1	Foxo3	56484	Mm01185722_m1
F5	14067	Mm00484202_m1	Foxo4	54601	Mm00840140_g1
F7	14068	Mm00487333_m1	Nos3	18127	Mm00435217_m1
F8	14069	Mm00433174_m1	Nos2	18126	Mm00440502_m1
F9	14071	Mm01302526_m1	Bax	12028	Mm00432051_m1
F10	14058	Mm00484177_m1	Bid	12122	Mm00432073_m1
F11	109821	Mm00511167_m1	Bcl2l11	12125	Mm00437796_m1
F12	58992	Mm00491349_m1	Ddit3	13198	Mm01135937_g1
Tfpi	21788	Mm01334601_m1	Bbc3	170770	Mm00519268_m1
Vwf	22371	Mm00550376_m1	Pmaip1	58801	Mm00451763_m1
Thbd	21824	Mm00437014_s1	Bcl2	12043	Mm00477631_m1
Proc	19123	Mm00435966_m1	Bcl2l1	12048	Mm00437783_m1
Procr	19124	Mm00440992_m1	Birc3	11796	Mm01168413_m1
Serpina5	268591	Mm00435511_m1	Birc2	11797	Mm00431811_m1
Pros1	19128	Mm01343426_m1	Xiap	11798	Mm00776505_m1
Serpinc1	11905	Mm00446573_m1	Gapdh	14433	Mm99999915_g1
Thbs1	21825	Mm00449032_g1	Atp5j	11957	Mm01700456_m1
Thbs2	21826	Mm01279240_m1	Polr2a	20020	Mm00839493_m1

**Tabelle 3-6: Bezeichnung und Assay-Identifikationsnummer der im *Human Thrombin Signaling TaqMan® Array* analysierten Gene.**

Gen	Assay ID	Gen	Assay ID
18S	Hs99999901_s1	MAP2K1	Hs00605615_mH
GAPDH	Hs99999905_m1	MAP2K2	Hs00360961_m1
HPRT1	Hs99999909_m1	MAPK1	Hs01046830_m1
GUSB	Hs99999908_m1	MAPK11	Hs00177101_m1
ADCY6	Hs00209600_m1	MAPK12	Hs00268060_m1
AKT1	Hs00178289_m1	MAPK13	Hs00234085_m1
AKT2	Hs01086102_m1	MAPK14	Hs00176247_m1
AKT3	Hs00178533_m1	MAPK3	Hs00385075_m1
ARHGEF1	Hs00180327_m1	MYL9	Hs00382913_m1
ARHGEF11	Hs00207600_m1	MYLK	Hs00364926_m1
ARHGEF2	Hs00190884_m1	NFKB1	Hs00765730_m1
ARHGEF6	Hs00374462_m1	NFKB2	Hs00174517_m1
ARHGEF7	Hs00388776_m1	NRAS	Hs00180035_m1
CAMK1	Hs00269334_m1	PIK3CA	Hs00180679_m1
CAMK2A	Hs00211096_m1	PIK3CB	Hs00927728_m1
CAMK2B	Hs00365799_m1	PIK3CD	Hs00192399_m1
CAMK2G	Hs00538454_m1	PIK3R1	Hs00381459_m1
CAMK4	Hs00174318_m1	PIK3R2	Hs00178181_m1
EGF	Hs01099999_m1	PLCB1	Hs00248563_m1
EGFR	Hs01076078_m1	PLCB2	Hs00190117_m1
ELK1	Hs00428286_g1	PLCE1	Hs00275279_m1
F2	Hs01011988_m1	PLCG1	Hs00234046_m1
F2R	Hs00169258_m1	PLCG2	Hs00182192_m1
F2RL2	Hs00187982_m1	PPP1R12A	Hs00182099_m1
F2RL3	Hs00559732_m1	PRKCA	Hs00176973_m1
FYN	Hs00176628_m1	PRKCB	Hs00176998_m1
GATA1	Hs01085823_m1	PRKCD	Hs01090047_m1
GATA2	Hs00231119_m1	PRKCE	Hs00178455_m1
GATA3	Hs00231122_m1	PRKCZ	Hs00177051_m1
GATA4	Hs00171403_m1	PTK2	Hs00178587_m1
GATA6	Hs00232018_m1	PTK2B	Hs00169444_m1
GNA12	Hs00170899_m1	RAF1	Hs00234119_m1
GNA13	Hs01116111_m1	REL	Hs00968436_m1
GNAI1	Hs01053355_m1	RELA	Hs00153294_m1
GNAI2	Hs01064686_m1	RELB	Hs00232399_m1
GNAI3	Hs00197803_m1	RHOA	Hs00357608_m1
GNAQ	Hs00387073_m1	RHOB	Hs00269660_s1
GNAS	Hs00255603_m1	RHOC	Hs00237129_m1
GNB1	Hs00181845_m1	RND3	Hs00170603_m1
GNB3	Hs01564092_m1	ROCK1	Hs00178463_m1
GNG2	Hs00828232_m1	ROCK2	Hs00153074_m1
GRB2	Hs00157817_m1	RPS6KB1	Hs00177357_m1
HRAS	Hs00610483_m1	RRAS	Hs00196699_m1
IKBKB	Hs00233287_m1	RRAS2	Hs00273367_m1
ITPR1	Hs00181881_m1	SHC1	Hs00427539_m1
ITPR2	Hs00181916_m1	SLC2A4	Hs00168966_m1
ITPR3	Hs00609908_m1	SRC	Hs00178494_m1
KRAS	Hs00364282_m1	TBP	Hs00427621_m1

### 3.5 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 3-7: Lösungen, Puffer und Medien.

Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl pH 10,4, 20% Methanol
Calciumchlorid-Lösung (0,025 mol/l)	Siemens
Citrate Concentrated Solution	Sigma
DNA-Ladepuffer, 6x	30% Glycerin in H <sub>2</sub> O, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM) + GlutaMax™	Gibco
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS), (1x), steril, -CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>	Promocell
<i>Endothelial Cell Basal Medium Supplement Mix</i>	Promocell
Entwickler- und Fixierlösung	Kodak
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen
FACS-Puffer	1x PBS, 2% FCS, 1mM EDTA
Imidazol-Pufferlösung	Siemens
Kathodenpuffer	25 mM TrisHCl pH 9.4, 40 mM DL-Norleucin, 0,05% SDS
Krebs-HEPES Puffer	Noxygen
Natriumchlorid-Lösung	0,9% NaCl, ddH <sub>2</sub> O
<i>Opti-MEM® I + GlutaMAX™</i>	Gibco
RIPA-Lyseuffer	25 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Tergitol-Typ Nonylphenoethoxylat), 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS
SDS-Ladepuffer, 5x	250 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5 M Dithiothreitol, 40% Glycerin, 10% SDS, 0,2% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer, 5x	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
TAE, 20x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0,18% Tween
TBS / Tween	1x TBS, 0,1% Tween
TBS, 20x	200 mM Tris pH 7,6, 2 M NaCl
Wasser, doppel destilliert	ddH <sub>2</sub> O
RNase freies Wasser	ddH <sub>2</sub> O, 0,1% DEPC, autoklaviert

## 3.6 Enzyme und Standards

Tabelle 3-8: Enzyme und Standards.

1 kbp-DNA-Leiter	Roth
100 bp-DNA-Leiter	Roth
Accutase-Lösung	Sigma Aldrich
Collagenase II	Gibco
Dispase	Gibco
Go-Taq® DNA Polymerase	Promega
PageRuler™ Prestained Protein Leiter	Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
Taq DNA Polymerase	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H. Kleinert, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz.

## 3.7 Antikörper

### 3.7.1 Primärantikörper

**Tabelle 3-9: Unkonjugierte und Fluoreszenz-konjugierte Primärantikörper für Western Blot-, FACS-, CLSM- und *in vivo*-Analysen.** Die in Klammer stehenden Angaben beziehen sich für die unkonjugierten Antikörper auf die in Western Blot-Analysen verwendeten Verdünnungen und Spezies, für die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper auf die in durchflusszytometrischen Analysen eingesetzten Verdünnungen.

anti-GAPDH (mouse, 1:2.000)	Sigma Aldrich
anti-human PON2 ( <i>rabbit</i> , 1:2.000)	Auftragssynthese durch Eurogentec.
anti-mouse GPIIb ( <i>rat</i> , 1:200)	Emfret
anti-mouse PON2 ( <i>rabbit</i> , 1:500)	Auftragssynthese durch Eurogentec.
anti-mouse TF 21E10	Synthetisiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. W. Ruf, CTH, Universitätsmedizin Mainz / Department of Immunology and Microbial Sciences, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA.
anti-TF EPR8986 ( <i>rabbit</i> , 1:2.000)	Abcam
anti-Tubulin- $\alpha$ ( <i>mouse</i> , 1:2.000)	Dianova
anti- $\beta$ -Actin ( <i>mouse</i> , 1:5.000)	Sigma
APC anti-mouse CD120a (1:100)	Biolegend
APC anti-mouse CD62E (1:100)	Novus
FITC anti-human/mouse vWF (1:10)	Emfret
IgG from rabbit serum	Sigma Aldrich

FITC anti-mouse CD41 (1:500)	BD Biosciences
PE anti-mouse CD31 (1:200)	BD Biosciences
PE/Cy7 anti-mouse CD106 (1:100)	Biolegend
PerCP-eFluor710 anti-human/mouse CD62P (1:150)	eBioscience
PerCP-eFluor710 anti-mouse CD36 (1:50)	eBioscience

### 3.7.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 3-10: Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen.** Die in Western Blot-Analysen eingesetzten Verdünnungen der aufgeführten Sekundärantikörper sind in Klammern angegeben.

anti- <i>mouse</i> IgG aus dem Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt (1:20.000)	Sigma Aldrich
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase-gekoppelt (1:5.000)	Sigma Aldrich
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase-gekoppelt (1:5.000)	Cell Signaling
anti- <i>rat</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase-gekoppelt (1:5.000)	Sigma Aldrich

## 3.8 Oligonukleotide

### 3.8.1 Oligonukleotidsequenzen für quantitative real-time PCR

Alle Primer und *TaqMan* Sonden (*probes*) für qRT-PCR Analysen wurden von Eurofins Genomics bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

**Tabelle 3-11: Verwendete murine Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.**

murin	<i>forward</i> (5' → 3')	<i>reverse</i> (5' → 3')
asTf	GCACGGGAAAGAAACACTCATCATTG	CTCCGCAACAGTGCCGTGCAGGCAG
bActin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
C3ar1	TCACCCTGGCCGATTTCT	GATGGATGGGATAAGTTTGCACA
C5ar1	TTACCACAGAACCCAGGAGG	GCCATCCGCAGGTATGTTAG
Ccl5	GCCCACGTCAAGGAGTATTTCTA	ACACACTTGCGGTTTCCTTC
Cxcl1	ACTGCACCCAAACCGAAGTC	TGGGGACACCTTTTAGCATCTT
Cxcr1	TCCTCCCGCACACAAGGAA	GCCTGTTGGTTATTGGAAGTCTC
Cxcr2	AGCAAACACCTCTACTACCCTCTA	GGGCTGCATCAATTC AATACCA
F2	GGTGAACCTGCCATTGTAG	ATCTCCTCGCTTGGTGTCAT
F2r	TGTCTTCCCGCGTCCCTAT	GCGTCCCTCGGAGATGAAGG
Flt1	CACTGACATACCCAACTTGTGC	GTCCCATGTTATTCTTTGCCAT
Flt4	GGCAAATGGTTACTCCATGACC	ACAACCCGTGTGTCTTCACTG
flt4	CGGCAAGTCTTTGGCAAG	CCTTCTCCACATCAATCGAG



Fn1	ACCTCTGCAGACCTACCCAG	TTGGTGATGTGTGAAGGCTC
Gapdh	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
Gata4	GAAAACGGAAGCCCAAGAACC	TGCTGTGCCCATAGTGAGATGAC
Il6	ATGGATGCTACCAAACCTGGAT	TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT
Kdr	TTTGGCAAATACAACCCTTCAGA	GCTCCAGTATCATTTCCAACCA
Pai1	ACATGTTTAGTGCAACCCTGGC	CTGAGATGACAAAGGCTGTGGAG
Plau	GGAGGTGTATGCGTGTCTAC	CCATGATAGCAGGTTTTTGTATGC
Plaur	CGCCACAAACCTCTGCAAC	CTCTGTAGGATAGCGGCATTG
Pmaip1	CTCAGGAAGATCGGAGACAAAGT	GAGTTGAGCACACTCGTCCTT
Polr2a	GACAAAACCTGGCTCCTCTGC	GCTTGCCCTCTACATTCTGC
Pon2	CGGTATGTATGGGAAGATGCTGAC	TTGTTGTTGCTGCTTCTGGGG
Sele	AGCTACCCATGGAACACGAC	CGCAAGTTCTCCAGCTGTT
Serpina1a	GCCCTGGCAAATTACATTCT	CATTGCCTGCATAATCCATC
Tfpi	GGGCCACTGTGTGTCTGTT	GCACAAAATGTATGTAGCGGTTT
Tgfb2	CTTCGACGTGACAGACGCT	TTCGCTTTTATTCGGGATGATGT
Thbd	CACAGGCAGTCAATGCGTG	GAGCGCACTGTCATCAAATGT
Thbs1	GTGAGGTTTGTCTTTGGAACCA	GTTGTTGTCAAGGGTAAGAAGGA
Thbs3	AAGCCGGAACCTTTGGGGTG	AGTGAGTAAAGCTGTCCGAATCT
Thbs4	TCAAGGAAACATCGTTTTTGCG	CATCCCTGGTGTCCGTACATC
Tnfa	CCTGTAGCCCACGTCTGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC

Tabelle 3-12: Verwendete murine *TaqMan* Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.

murin	probe (FAM-5' → 3'-TAM)
bActin	CACTGCCGCATCCTCTTCTCTCCC
Gapdh	ATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGT
Pon2	CCAATGGCCTGGCTTTCTTT

Tabelle 3-13: Verwendete humane Primer-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.

human	forward (5' → 3')	reverse (5' → 3')
AKT2	ACCACAGTCATCGAGAGGACC	GGAGCCACACTTGTAGTCCA
bACTIN	GGTCATCACCATTGGCAATG	CGTCACACTTCATGATGGAGTTG
CAMK2B	GTCCACCGCGGCCTC	TTTTGGTGCTATTCGTCTGGG
GAPDH	CAACAGCCTCAAGATCATCAGC	TGGCATGGACTGTGGTCATGAG
GATA4	CGACACCCCAATCTCGATATG	GTTGCACAGATAGTGACCCGT
GATA6	CTGCGGGCTCTACAGCAAG	GTTGGCACAGGACAATCCAAG
GNG2	AACACCGCCAGCATAGCAC	CCTGTGATATTGGCTTCCATCT
ICAM1	ATGCCAGACATCTGTGTCC	GGGTCTCTATGCCCAACAA
ITPR3	CCAAGCAGACTAAGCAGGACA	AACTGCCATACTTACGACA
MYL9	GGAGTCCAGACCCGACG	CTTGCTGGACATCTTGGCTT

MYLK	CCTAGCTGAGAATGCCTTGG	TAGTGACCTGGCTTCCATCC
NFKB2	ATGGAGAGTTGCTACAACCCA	CTGTTCCACGATCACCAGGTA
PLCB2	ATCCGGGATACTCGCTTTGG	CACCACCGTGAGTGTCTTCAG
PON2	TCGTGTATGACCCGAACAATCC	AACTGTAGTCACTGTAGGCTTCTC
PRKCZ	CTTACATTTCTCATCCCGGAAG	TTCACCACTTTCATGGCGTAAA
PTK2	TGGTGCAATGGAGCGAGTATT	CAGTGAACCTCCTCTGACCG
RELB	CCATTGAGCGGAAGATTCAACT	CTGCTGGTCCCGATATGAGG
SLC2A4	ATCCTTGGACGATTCCTCATTGG	CAGGTGAGTGGGAGCAATCT
SRC	GACAGGCTACATCCCCAGC	CGTCTGGTGATCTTGCCAAAA
TNFA	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
VCAM1	GGGAAGATGGTCGTGATCCTT	TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA

**Tabelle 3-14: Verwendete humane *TaqMan* Sonden-Sequenzen für qRT-PCR Analysen.**

human	<i>probe</i> (FAM-5' → 3'-TAM)
bACTIN	ATGGAGTCCTGTGGCATCCACGAAACT
GAPDH	CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC
PON2	TCGTCAGAGGTTCTCCGCATCCAGA

### 3.8.2 Oligonukleotidsequenzen für Genotypisierung transgener Mäuse

Alle für die Genotypisierung verwendeten Primer und *TaqMan* Sonden wurden von Eurofins Genomics bezogen. Pon2 und LacZ wurden mittels Genotyping-PCR (siehe 4.2.2) und anschließender Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.3) analysiert. Cre wurde mittels *TaqMan* qRT-PCR (siehe 4.2.7) untersucht, wobei ApoB als Kontrolle diente.

**Tabelle 3-15: Verwendete murine Primer-Sequenzen zur Genotypisierung.**

murin	<i>forward</i> (5' → 3')	<i>reverse</i> (5' → 3')
ApoB	CACGTGGGCTCCAGCATT	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG
Cre	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
LacZ	ACTGGCAGATGCACGGTTACG	CGTAGTGTGACGCGATCGGCA
Pon2	TCGTGTATGACCCGAACAATCC	GCAGCCTCCTGAATCAAATC

**Tabelle 3-16: Verwendete murine *TaqMan* Sonden-Sequenzen zur Genotypisierung.**

murin	<i>probe</i> (FAM-5' → 3'-TAM)
ApoB	CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA
Cre	AAACATGCTTCATCGTCGGTCCGG

### 3.8.3 Oligonukleotidsequenzen für RNA-Interferenz

Zum Pon2-*knockdown* mittels RNA-Interferenz wurde Pon2-spezifische siRNA (Produkt-Nr.: HSS108256, siRNA Lokalisation: 366, Transkript NM\_000305 / NM\_001018161, Exon 4) und eine Negativkontroll-siRNA mit Zufallssequenz (Produkt-Nr.: 46-2002) von Invitrogen bezogen.

## 3.9 Zelllinien und Medien für die Zellkultur

Primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs) wurden durch Promocell bezogen und in Endothelzell-Medium (*Endothelial Cell Basal Medium*, Promocell) kultiviert, das mit Supplement Mix (Promocell) sowie 1x Penicillin / Streptomycin (Gibco, 100 U/ml) versetzt wurde. Zellpassagen zur Subkultivierung der HUVECs erfolgten alle 4-5 Tage. Die kultivierten HUVECs wurden maximal bis zur 6. Zellpassage (6 Subkultivierungsschritte, siehe 4.1.4) für Analysen herangezogen.

Isolierte primäre Endothelzellen aus der Lunge von Mäusen (siehe 4.1.1) wurden ebenfalls in Endothelzell-Medium (*Endothelial Cell Basal Medium*, Promocell) kultiviert, welches mit Supplement Mix (Promocell) sowie 1x Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco) versetzt wurde. Diese primären murinen Endothelzellen wurden für maximal 10 Tage kultiviert, wobei nach 5-6 Tagen eine zweite Zellselektion (siehe 4.1.1) durchgeführt wurde

## 3.10 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden gemäß §4 Abs. 1 und §6 Abs. 1 Nr. 4 oder § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes eingesetzt (siehe 4.4.1). Sofern nicht anders angegeben, waren die Versuchstiere weiblich und 8-14 Wochen alt. Die verwendeten Mausmodelle sind in Tabelle 3-17 zusammenfassend aufgelistet und werden im Folgenden beschreiben.

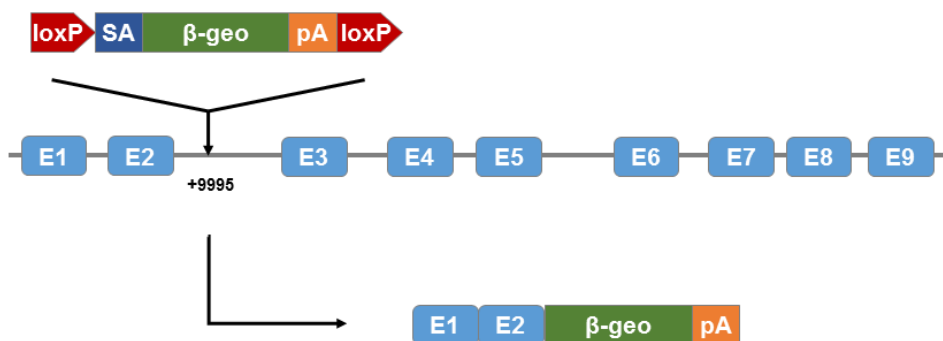
**Tabelle 3-17: Verwendete Mausmodelle mit kurzer Beschreibung und Quelle.**

Mausmodell	Beschreibung	Quelle
C57BL/6J WT	Inzuchtstamm	Translational Animal Research Center (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

C57BL/6J Pon2 <sup>-/-</sup>	Inzuchtstamm; Pon2-knockout durch Insertion einer floxP-flankierten β-geo Expressionskassette im zweiten Intron des murinen Pon2-Gens. <sup>53</sup>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. T. Reddy, Department of Medicine / Department of Molecular and Medical Pharmacology, University of California, Los Angeles, California, USA; importiert in TARC durch Prof. Dr. B. Fuhrmann, Technion Faculty of Medicine / Rambam Medical Center, Haifa, Israel.
C57BL/6J Tek-Cre <sup>+/-</sup>	B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J Stamm; Cre Rekombinase Expression unter Kontrolle des murinen endothelspezifischen Rezeptor-Tyrosinkinase (Tek, Tie2) Promotors. <sup>60</sup>	Stammnummer: 008863; Jackson Laboratory, USA.

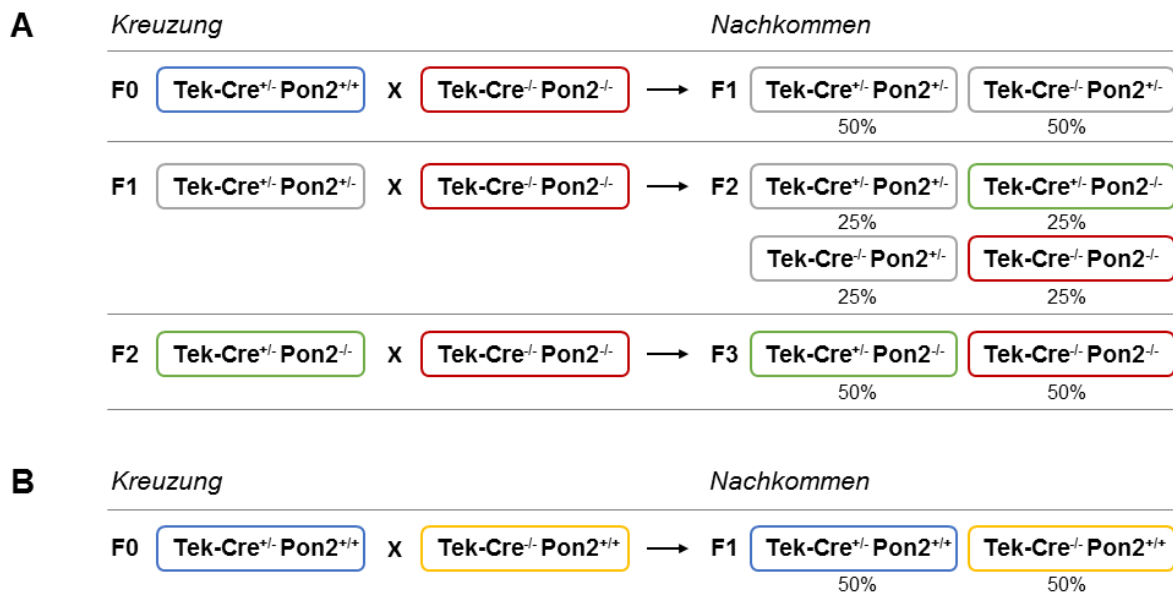
Wildtyp (WT) C57Bl/6J Mäuse wurden durch das *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erhalten.

Das Pon2<sup>-/-</sup> Mausmodell (C57Bl/6J) trägt eine Insertion einer β-Galaktosidase/Neomycin Fusionskassette (β-geo) im zweiten Intron, 9.995 bp nach dem Translationsstartpunkt des murinen Pon2-Gens. <sup>53</sup> Durch die Integration dieses *gene trap* Vektors in das Intron des Gens wird die β-geo Kasette mit dem Transkript der ersten zwei Pon2 Exone fusioniert, so dass ein mutiertes, funktionsloses Genprodukt entsteht (Abbildung 3-1). Die Pon2 mRNA-Restexpression im Pon2<sup>-/-</sup> Stamm beträgt 0-5% der WT Pon2 mRNA Expression (siehe 5.3, Abbildung 5-17; siehe 5.5.1, Abbildung 5-23). Die Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden aus Inzucht-Kreuzungen (Pon2<sup>-/-</sup> X Pon2<sup>-/-</sup>), die auf den WT C57Bl/6J Hintergrund zurückgekreuzt wurden, erhalten (F0: WT X Pon2<sup>-/-</sup>; F1: Pon2<sup>+/-</sup> X Pon2<sup>+/-</sup>).



**Abbildung 3-1: Das Pon2<sup>-/-</sup> Mausmodell trägt einen β-geo *gene trap* Vektor im Pon2-Lokus.** In das zweite Intron des murinen Pon2-Gens wurde ein von loxP-Stellen flankierter *gene trap* Vektor eingebracht, der eine Splice-Akzeptor-Stelle (SA) gefolgt von einer β-Galaktosidase/Neomycin Genkassette (β-geo) und einer poly-Adenin-Nukleotid-Sequenz (pA) trägt. SA vermittelt die Fusion der transkribierten Vektorsequenz mit der Splice-Donor-Stelle des gespleißten Transkripts von Exon 1 (E1) und Exon 2 (E2), so dass ein verkürztes Genprodukt aus E1-E2-β-geo-pA entsteht. pA dient der Detektion des mutierten Genprodukts mittels Northern Blot. <sup>53</sup> Abbildung nach Ng et al. <sup>53</sup>.

Außerdem wurden  $Pon2^{-/-}$  Mäuse mit C57BL/6J  $Tek-Cre^{+/-}$  verpaart, um  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  Mäuse zu erhalten (Abbildung 3-2 A), die eine Rekonstitution der  $Pon2$ -Expression spezifisch in Endothelzellen und im hämatopoetischen Kompartiment aufweisen (siehe 4.4.7). Durch die dritte Verpaarung im Kreuzungsschema wurden sowohl  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  als auch  $Pon2^{-/-}$  Mäuse erhalten (dritte Filialgeneration (F3) in Abbildung 3-2 A), welche für die Analysen parallel eingesetzt wurden. Zur Fortführung der  $Tek-Cre^{+/-}$  Linie wurde diese außerdem mit WT Mäusen verpaart (Abbildung 3-2 B). Daraus gingen  $Tek-Cre^{+/-}$  ( $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{+/+}$ ) und WT ( $Tek-Cre^{-/-} Pon2^{+/+}$ ) Mäuse hervor, die zusammen mit  $Pon2^{-/-}$  Mäusen als Kontrollen für die Untersuchungen der  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  Mäuse eingesetzt wurden.



**Abbildung 3-2: Kreuzungsschemata zur Etablierung und Fortführung der  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  und  $Tek-Cre^{+/-}$  Mauslinie. (A)** Generationsfolgen (Parentalgeneration F0; erste bis dritte Filialgeneration F1-3) zur Etablierung von  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  Mäusen. Angegeben sind die Genotypen der jeweils verpaarten Tiere und der daraus hervorgehenden Nachkommen mit prozentualer Häufigkeit. In F3 wurden sowohl  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  (grün) als auch  $Pon2^{-/-}$  Mäuse (rot) erhalten. **(B)** Verpaarung der  $Tek-Cre^{+/-}$  Mäuse (blau) mit WT Mäusen (gelb) zur Fortführung der  $Tek-Cre^{+/-}$  Linie. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden  $Tek-Cre^{+/-}$  und WT Tiere dienten zusammen mit den  $Pon2^{-/-}$  aus (A) als Kontrollen für die Untersuchungen der  $Tek-Cre^{+/-} Pon2^{-/-}$  Mäuse.

## 4 Methoden

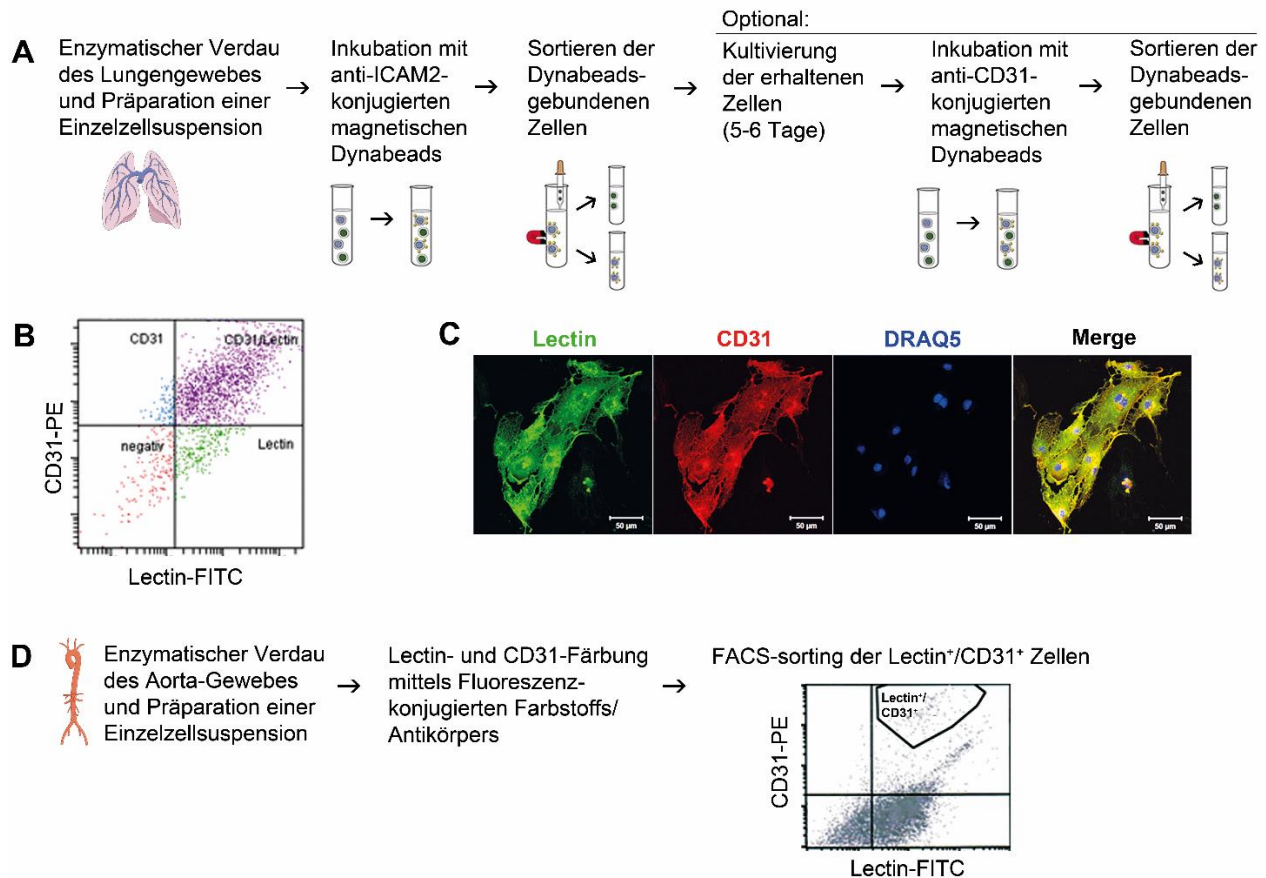
### 4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder steril erworbene Materialien verwendet. Die in den Beschreibungen der zellbiologischen Arbeiten aufgeführten Waschschritte beinhalten eine Zentrifugation bei 600-900 x g für 5 min und das darauffolgende Resuspendieren der Zellen in der angegebenen Lösung.

#### 4.1.1 Isolation primärer Endothelzellen

Zur Isolation primärer Endothelzellen (ECs) aus Mäusen wurden zwei verschiedene Methoden etabliert (Abbildung 4-1), die auf veröffentlichten Protokollen<sup>61, 62</sup> basieren.

Zur Isolation mikrovaskulärer ECs aus der Lunge (Abbildung 4-1 A) wurde das aus dem Versuchstier entnommene Gewebe (siehe 4.4.1) in einer 6-well-Platte mithilfe einer feinen Schere zerkleinert, in eine Collagenase II- und Dispase-haltige Verdauung (210 U/mg Collagenase II, 1 U/ml Dispase in DMEM+Glutamax) überführt und 45 min bei 37°C inkubiert. Nachdem der enzymatische Verdau durch Zugabe von serumhaltigem Medium (20% FCS in DMEM+Glutamax) abgestoppt wurde, wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen der Suspension durch eine 14G-Kanüle aus dem Gewebeverbund gelöst und mithilfe eines Zellsiebs von verbliebenden Gewebestücken getrennt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (400 x g, 5 min) pelletiert und in 0,1% BSA/PBS aufgenommen. Um die ECs im folgenden Schritt positiv sortieren zu können, wurde die Zellsuspension mit 10-15 µl anti-ICAM2-konjugierter magnetischer *Dynabeads* versetzt und für 15 min bei RT auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Die ICAM2-positiven, an die *Dynabeads* gebundenen Zellen wurden dann mithilfe eines Magneten durch mehrmaliges Abnehmen des Überstands nach Sedimentation der Zellen und erneutem Resuspendieren in 0,1% BSA/PBS isoliert. Daraufhin wurden die erhaltenen ECs entweder für 5 Tage in Vollmedium kultiviert und expandiert, inklusive eines zweiten Sortierungsschritts über anti-CD31-konjugierte magnetische *Dynabeads* oder direkt für Analysen verwendet ohne Kultivierung.



**Abbildung 4-1: Isolation primärer Endothelzellen aus der Maus. (A)** Methodische Vorgehensweise zur Isolation primärer mikrovaskulärer Endothelzellen (ECs) aus der Lunge mittels Antikörper-gekoppelter, magnetischer Dynabeads. **(B)** Überprüfung der Reinheit der isolierten Lungenzellen mittels durchflusszytometrischer Quantifizierung der CD31<sup>+</sup>/Lectin<sup>+</sup> Population. **(C)** Laser-Scanning-Mikroskopie zur Überprüfung der Reinheit der isolierten ECs. Grün: Lectin, rot: CD31, blau: Draq5 (Zellkern), Maßstableiste=50µm. **(D)** Methodische Vorgehensweise zur Isolation primärer makrovaskulärer ECs aus der Aorta mithilfe FACS-basierter Zells Selektion (FACS-sorting).

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels FACS- und LSM-basierte Analyse endothel-spezifischer Oberflächenmarker überprüft. Für die durchflusszytometrische Qualitätskontrolle wurden die aus der Lunge isolierten Zellen gezählt und einheitlich auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Färbungsansatz eingestellt. Die Zellen wurden in FACS-Puffer (1x PBS, 2% FCS, 1 mM EDTA) für eine Stunde bei 4°C mit FITC-konjugiertem Lectin (*Bandeiraea simplicifolia*, 1:1000) und PE anti-mouse CD31 (1:200) inkubiert, anschließend einmal in FACS-Puffer gewaschen und schließlich am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer (ausgestattet mit *FACSDiva* Software) quantitativ analysiert, wobei jeweils 10.000 *events* für die folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen erfasst wurden: Lectin-FITC: 488/516 nm; PE anti-CD31: 488 bzw. 548/575 nm. Die Angaben der Emissionswellenlängen beziehen sich auf die maximale Emissionswellenlänge der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe; zur Emissionsdetektion wurde stets ein Spektrum im Bereich von ca. max. Emissionswellenlänge  $\pm 20$  nm aufgenommen. Es

wurde ein Anteil von ca. 85% doppelt-positiver Zellen festgestellt (Abbildung 4-1 B). Um die Reinheit der isolierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu überprüfen, wurden diese in *Lab-Tek Chamber Slides* mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* ausplattiert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium durch frisches Endothelzellmedium versetzt mit FITC-konjugiertem Lectin (*Bandeiraea simplicifolia*, 1:200) und PE anti-mouse CD31 (1:100) ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Färbelösung abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und zur Zellkernfärbung mit DRAQ5 (1:1000) versetzt. Die Analyse der endothelspezifischen Oberflächenmarker erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*Zeiss LSM-710* mit *ZEN2011* Software), wobei die Zellen unter einem Plan / Apochromat 63x / 1.4 *oil DIC*-Objektiv betrachtet wurden. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sichergestellt. Folgende Excitations-/ Emissionswellenlängen für die Messung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden eingesetzt: Lectin-FITC: 488/516 nm; PE anti-CD31: 548/575 nm; und DRAQ5: 633/680 nm (Abbildung 4-1 C).

Der zweite methodische Ansatz diente der Isolation von makrovaskulären ECs aus der Aorta (Abbildung 4-1 D). Dazu wurde die Aorta aus dem Versuchstier entnommen (siehe 4.4.1) und in eiskaltem DMEM+Glutamax vom umgebenden Gewebe freipräpariert. Daraufhin wurde die Aorta in kleine Stücke geschnitten und für 45 min bei 37°C in Collagenase II- und Dispase-haltiger Verdaulösung (210 U/mg Collagenase II, 1 U/ml Dispase, 10 mg/ml BSA in DMEM+Glutamax) inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 400 x g wurde der Überstand abgenommen und das Aortagewebe erneut in frischer Verdaulösung aufgenommen und bei 37°C für 5 min inkubiert. Nachdem dieser Zentrifugations- und Inkubationsschritt zweimal wiederholt wurde, wurde das Gewebe mikroskopisch analysiert und für weitere 60-90 min in frischer Collagenase II-Dispase-Lösung bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Ablösen der Zellen vom Gewebe mikroskopisch kontrolliert und ggf. durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der Suspension unterstützt. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurde der enzymatische Verdau durch Zugabe von 1/10 Volumen FCS abgestoppt. Mithilfe eines Zellsiebes wurde die Zellsuspension von den Gewebstücken abgetrennt und durch Zentrifugation bei 800 x g für etwa 8 min pelletiert. Zur Färbung der Aortazellen für das darauffolgende Sortieren der Zellen mittels FACS wurden diese in 0,1% BSA haltigem RPMI-Puffer aufgenommen, mit Lectin-FITC (1:1000) und PE anti-CD31 (1:200) versetzt und für 30-45 min bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,1% BSA-haltigem HBSS-Puffer gewaschen und



darin für die FACS-Analyse aufgenommen. Die Endothelzellen wurden schließlich am *FACSVantage SE* anhand der Endothelzellmarker identifiziert und durch das Sortieren der doppelpositiven, d.h. der Lectin-gefärbten und CD31-positiven, Zellpopulation gewonnen.

### **4.1.2 Isolation primärer Thrombozyten und Präparation von Plasma**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz wurden Thrombozyten aus Vollblut der Versuchstiere und aus Vollblut von gesunden humanen Spendern (nach Einverständniserklärung des Spenders sowie gemäß der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes und der institutionellen Richtlinien des CTH) isoliert (durchgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk / Kathrin Schwierczek). Die Blutentnahme an den Mäusen erfolgte retroorbital mithilfe von silanisierten Pasteur-Pipetten, woraufhin das entnommene Vollblut mit Citrat im Verhältnis 1:9 versetzt wurde. Durch Zentrifugation des murinen Vollbluts bei 100 x g für 4 min bei RT bzw. des humanen Vollbluts bei 200 x g für 10 min bei RT wurde Plättchen-reiches Plasma (PRP) erhalten. Aus dem PRP wurden die Thrombozyten mittels Gelfiltration isoliert, wie beschrieben in <sup>63</sup>. Murines Plättchen-armes Plasma (PPP) wurde durch Zentrifugation des Vollbluts bei 30.000 x g für 10 min bei RT gewonnen.

### **4.1.3 Auftauen kryokonservierter HUVECs**

Zum Auftauen erworbener, kryokonservierter HUVECs wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und sofort in 5 ml Medium aufgenommen (siehe 3.9). Zur Kultivierung wurden die aufgetauten Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **4.1.4 Kultivierung primärer Endothelzellen**

Die Kultivierung primärer Zellen erfolgte im Vollmedium (siehe 3.9) im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Zur Subkultivierung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5-10 ml PBS pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bzw. 1-2 ml PBS pro 6-well gewaschen. Anschließend wurden sie durch ein- bis zweiminütige Inkubation mit 0,5 bzw. 2 ml Accutase-Lösung pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bzw. pro 6-well im Brutschrank vom Boden sowie voneinander gelöst. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von frischem

serumhaltigem Medium abgestoppt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Erhaltung der Stammkultur wieder in die Kulturflasche zurückgegeben. Die restlichen Zellen wurden den Versuchsbedingungen entsprechend in Zellkulturschalen ausplattiert (siehe 4.1.5).

#### 4.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat primärer Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl der aus der Stammkultur entnommenen Zellsuspension (siehe 4.1.4) wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert mit zehn multipliziert ergibt die Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension. Davon ausgehend wurden die für die Experimente benötigten Zellzahlen durch Verdünnung mit Vollmedium eingestellt und anschließend in die Zellkultur-Platten ausplattiert oder gemäß dem beschriebenen experimentellen Vorgehen weiter verfahren. Das Ausplattieren wurde am Vortag des jeweiligen Experiments durchgeführt, wobei je nach Kulturgefäß eine definierte Zellzahl ausgesät wurde, um die gewünschte Konfluenz am Versuchstag zu erhalten (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Zellzahlen für die Aussaat der verwendeten primären Zellen zur Kultivierung.**

Zellen	Kulturgefäß	Zellzahl	Konfluenz
Primäre murine ECs, aus der Lunge	24-well-Platte	$5 \times 10^4$	Ca. 50%
	Lab-Tek Chamber Slide	$1 \times 10^5$	Ca. 80%
HUVECs	24-well-Platte	$5 \times 10^4$	Ca. 50%

#### 4.1.6 Transfektion von siRNA in primäre humane Zellen

Das Einbringen von siRNAs (*small interfering RNA*) in Zellen ermöglicht es, die Expression spezifischer Gene abzuschalten bzw. herunterzuregulieren. Somit können Effekte, welche durch die verminderte Genexpression verursacht werden, untersucht und folglich Proteinfunktionen charakterisiert werden. SiRNAs sind kurze regulatorische RNA-Moleküle, die an eine komplementäre mRNA-Sequenz binden und dadurch den Abbau der komplementären mRNA durch den Dicer-Komplex bewirken. Dieser Mechanismus wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet.

Für die transiente Transfektion von siRNA in primäre humane Endothelzellen (HUVECs; siehe 3.9) wurden am Vortag  $5 \times 10^4$  Zellen in eine 24-well-Platte ausplattiert, so dass sie für die Transfektion eine Konfluenz von etwa 50% aufwiesen. Die Zellen wurden mit dem siRNA-Transfektionsreagenz *Lipofectamine RNAiMAX* nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die

eingesetzte siRNA hatte eine Endkonzentration von 65 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 (siehe 3.8.3). An Tag 3 nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 Stunden mit 1 U/ml humanem Thrombin behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen für qRT-PCR-basierende Genexpressionsanalysen lysiert (siehe 4.2.4). Die Kontrolle des Zielprotein-*knockdown* erfolgte sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene durch qRT-PCR Analysen 24 Stunden nach der Transfektion und durch Western-Blot Analysen an Tag 3 nach der Transfektion (siehe 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 und 4.3.4).

### **4.1.7 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in kryo-konserviertem Aortengewebe und in primären kultivierten Endothelzellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie**

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Gefäß bzw. spezifisch in Endothelzellen (ECs) wurde durch eine Reihe verschiedener methodischer Ansätze bestimmt: konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe 4.1.7), Chemilumineszenz-Messung (siehe 4.1.8) und FACS-Analyse (siehe 4.1.9).

Zur Bestimmung des ROS-Levels in der aortalen Gefäßwand mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Aorta aus den Versuchstieren entnommen (siehe 4.4.1), in kaltem Krebs-HEPES Puffer vom umgebenden Fettgewebe freipräpariert und in *Tissue Tek OTC* Einbettmedium in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um einen schonenden Tiefkühlvorgang zu ermöglichen, wurde die in *Tissue Tek OTC*-eingebettete Aorta nicht direkt in flüssigen Stickstoff, sondern in ein Isopentan-Stickstoff-Bad gehalten. Die vollständig tiefgefrorenen Proben wurden in Kryoröhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am Kryostat wurden  $10\ \mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt, auf Objektträger transferiert und sofort verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur ROS-Detektion wurde  $1\ \mu\text{M}$  DHE (Dihydroethidium) in Krebs-HEPES Puffer auf die Gefrierschnitte gegeben, 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Dunklen in einer feuchten Kammer inkubiert und am Zeiss LSM-710 analysiert. Um eine uniforme Färbung und Messung der Präparate zu gewährleisten, wurden Schnitte beider zu vergleichender Versuchsgruppen jeweils direkt nebeneinander auf demselben Objektträger platziert und gefärbt. Außerdem wurden für die Aufnahme am LSM die Einstellungen so gewählt, dass beide Aortenschnitte auf demselben

Bildausschnitt platziert waren und somit mit denselben Aufnahmebedingungen gemessen wurden. DHE wird durch Superoxid zu 2-Hydroxyethidium (2-HE) oxidiert, worauf es in die DNA der gefärbten Zellen interkaliert, dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften ändert und nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm im Bereich von 605 nm emittiert.<sup>64</sup> Mit anderen ROS hingegen reagiert DHE zu Ethidiumkation (E<sup>+</sup>), welches in einem anderen Wellenlängenbereich emittiert. Zusätzlich zur Messung des DHE-Signals wurde die Autofluoreszenz der Collagenfasern im Gefäß mit 488 nm (Excitation) / 516 nm (Emission) aufgenommen. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell mit einem 5x Objektiv aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sichergestellt. Zur Quantifizierung wurde die Zeiss ZEN2011 Software verwendet. Hierbei wurde die Fläche des Gewebes markiert, für welche die Lichtintensität gemessen werden sollte. Zellen des Fettgewebes außerhalb der Aorta oder Blutgerinnsel im Lumen, welche bei der Gewebspräparation nicht vollständig entfernt werden konnten, wurden in die Quantifizierung nicht einbezogen. Die Intensität der DHE-Fluoreszenz pro markierter Fläche wurde durch die Zeiss ZEN2011 Software bestimmt.

Ebenfalls mithilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde die endothelspezifische ROS-Produktion bestimmt. Hierzu wurden aus den Mäusen isolierte ECs (siehe 4.1.1) in *Lab-Tek Chamber Slides* mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* ausplattiert und am Folgetag nach Abnahme des Zellkulturmediums für eine Stunde bei 37°C in frischem Medium mit dem ROS-sensitiven Farbstoff CellROX-DeepRed (1:250) und dem EC-Marker Lectin-FITC (*Bandeiraea simplicifolia*, 1:200) inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch frisches Medium ersetzt und am Zeiss LSM-710 analysiert. CellROX-DeepRed ist eine zellpermeable, im reduzierten Zustand nicht-fluoreszierende Substanz, die infolge ROS-vermittelter Oxidation bei Anregung durch 633 nm im Wellenlängenbereich von 665 nm emittiert. Dementsprechend wurden folgende Excitations-/Emissionswellenlängen verwendet: Lectin-FITC: 488/516 nm; CellROX-DeepRed: 633/665 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte unter Verwendung eines Plan / Apochromat 63x / 1.4 *oil DIC*-Objektivs. Die Quantifizierung des CellROX-DeepRed Signals wurde, wie oben beschrieben, mit der Zeiss ZEN2011 Software durchgeführt, wobei ausschließlich Lectin-positive Zellen in die Analyse miteingeschlossen wurden, deren Anteil an der Gesamtpopulation bei etwa 85% lag.

#### **4.1.8 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in frisch isoliertem Aortengewebe mittels Chemilumineszenz**

In Ergänzung zu der unter 4.1.7 beschriebenen Methoden zur ROS-Quantifizierung wurde ein weiterer experimenteller Ansatzpunkt zur Bestimmung des ROS-Levels in der aortalen Gefäßwand gewählt. Die aus den Versuchstieren entnommene Aorta (siehe 4.4.1) wurde in eiskaltem Krebs-HEPES Puffer freipräpariert und mithilfe eines Skalpell in ca. 2 mm breite Ringe geschnitten. In einer weißen 96-*well*-Platte wurde 50 µl Krebs-HEPES Puffer pro *well* vorgelegt und jeweils ein Aortenring hineingegeben. Kurz vor dem Start der Chemilumineszenzmessung im *Centro LB960* Luminometer wurden 50 µl einer 200 µM L-012-Lösung (in Krebs-HEPES Puffer) pro *well* hinzugegeben, so dass die L-012-Endkonzentration 100 µM pro Aortenring betrug. Die Aortenringe der verschiedenen Versuchsgruppen wurden mit derselben L-012-Färbelösung gefärbt und simultan analysiert, um uniforme Messbedingungen zu gewährleisten. L-012 ist ein zellpermeables Luminol-Derivat, das bei Reaktion mit ROS zur Chemilumineszenz angeregt wird und daher als sensitiver Detektor für intrazelluläre ROS mit hoher Sensitivität für Superoxid dient.<sup>65</sup> Das Chemilumineszenzsignal wurde pro Aortenring bzw. *well* über einen Zeitraum von insgesamt etwa 25 min in ein- bis zweiminütigen Abständen gemessen. Die Messwerte wurden auf das Hintergrundsignal der Färbelösung normalisiert. Für die Auswertung wurde das normalisierte L-012-Intensitätssignal als Mittelwert aller Aortenringe pro Zeiteinheit kalkuliert.

#### **4.1.9 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in primären Zellen der Aorta und Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie**

Um die Ergebnisse der oben beschriebenen ROS-Messungen (siehe 4.1.7 und 4.1.8) zu verifizieren, wurde ein weiterer methodischer Ansatz zur Quantifizierung des vaskulären ROS-Levels angewendet. Hierbei erfolgte die Detektion der ROS durchflusszytometrisch mithilfe des Indikators CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Nachdem die Aorta entnommen (siehe 4.4.1) und in kaltem Krebs-HEPES Puffer vom umgebenen Fettgewebe freipräpariert wurde, wurden die Zellen der Aorta isoliert, indem das Aortengewebe durch einen Zellsieb gedrückt und mit Krebs-HEPES Puffer hindurch gespült wurde. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die gewonnenen Zellen in 1 ml *Erythrocyte Lysis* Puffer für 5 min auf Eis inkubiert und daraufhin in kaltem Krebs-HEPES Puffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen für die durchflusszytometrische ROS-

Bestimmung gefärbt, indem die Zellen in 0,5  $\mu\text{M}$  CM-H<sub>2</sub>DCFDA Lösung (in Krebs HEPES Puffer) aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Dunklen inkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Daraufhin erfolgte ein Waschriff in Krebs-HEPES Puffer, in welchen die Zellen schließlich für die FACS-Analyse aufgenommen wurden. Etwa 5 min vor der Messung am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer wurden 5  $\mu\text{l}$  7-AAD pro Ansatz hinzugegeben. 7-AAD dient als Marker für tote Zellen oder jene mit einer (ggf. durch die Präparation) beschädigten Plasmamembran, da es nur im Falle einer zerstörten Zellmembran von sterbenden oder toten Zellen in die Zelle eindringen kann und in die DNA interkaliert, was zur Änderung der Struktur- und somit der Fluoreszenzeigenschaften führt. Die 7-AAD-positiven Zellen wurden von der ROS-Bestimmung ausgeschlossen. Der zellpermeable Indikator CM-H<sub>2</sub>DCFDA, welcher in seiner reduzierten Form nicht fluoreszierend ist, ändert durch die Reaktion mit ROS seine Struktur. Durch die Abspaltung der Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen und durch Oxidation wird CM-H<sub>2</sub>DCFDA in das stark fluoreszierende 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt.<sup>66</sup> Der ROS-Level wurde somit anhand der CM-H<sub>2</sub>DCFDA-Signalintensität in den 7-AAD-negativen, intakten Zellen gemessen. Die Messung erfolgte dementsprechend bei folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen analysiert: CM-H<sub>2</sub>DCFDA: 488/520 nm; 7-AAD: 488/647 nm. Um einheitliche Messbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen mit derselben H<sub>2</sub>DCFDA-Färbelösung gefärbt und mit denselben Einstellungen zur FACS-Analyse gemessen. Zur Auswertung mithilfe der *FACSDiva* Software wurde die Zellzahl gegen die H<sub>2</sub>DCFDA-Signalintensität aufgetragen.

Zusätzlich zu der Untersuchung der vaskulären Zellen der Aorta wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz durch FACS-Analysen mittels CM-H<sub>2</sub>DCFDA der ROS-Level von primären Thrombozyten in verdünntem Plättchen-reichem Plasma bestimmt, wobei wie oben beschrieben vorgegangen wurde (durchgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk).

#### **4.1.10 Durchflusszytometrische Quantifizierung endothelialer und thrombozytärer Oberflächenproteine**

Das Oberflächenexpressionsprofil von ECs und Thrombozyten gibt Aufschluss über deren Aktivitätszustand. Um eine mögliche pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels und der

Blutplättchen zu überprüfen, wurden FACS-Analysen mittels fluoreszenz-gekoppelter Antikörper gegen charakteristische Zelloberflächenproteine durchgeführt.

Primäre ECs aus der Lunge wurden direkt nach der Isolation (ohne Kultivierung; siehe 4.1.1) gezählt und einheitlich auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Färbungsansatz eingestellt. Für die Färbung der ECs wurden zwei Mastermixe hergestellt, die die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in den in 3.7.1 angegebenen Verdünnungen in FACS-Puffer (1x PBS, 2% FCS, 1mM EDTA) enthielten, so dass in der FACS-Analyse pro Messung bzw. Färbeansatz gleichzeitig vier Oberflächenmarker untersucht werden konnten. Folgende Fluoreszenz-konjugierte Antikörper wurden eingesetzt und mit den angegebenen Excitations-/Emissionswellenlängen analysiert: PE anti-CD31: 488/575 nm; FITC anti-vWF: 488/516 nm; APC anti-CD120a: 633/660 nm, PerCP-eFluor710 anti-CD36: 488/710 nm; PE/Cy7 anti-CD106: 488/780 nm; APC anti-CD62E: 633/660 nm; PerCP-eFluor710 anti-CD62P: 488/710 nm. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C im Dunklen wurden die Zellen einmal in FACS-Puffer gewaschen und schließlich am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer quantitativ analysiert, wobei jeweils 100.000 *events* erfasst wurden. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des Medians der Fluoreszenzintensitäten.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz wurden thrombozytäre Oberflächenproteine durchflusszytometrisch analysiert (durchgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk). Thrombozyten in verdünntem Plättchen-reichem Plasma (siehe 4.1.2) wurden mit folgenden Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern nach Angaben des Herstellers gefärbt: PE Jon/A (anti-aktiviertes GPIIb/IIIa, Emfret), FITC Wug.E9 (anti-P-Selektin, Emfret) oder FITC anti-vWF (Emfret). Die Plättchen wurden gemäß publizierter Protokolle <sup>67</sup> mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin oder Botrocetin *in vitro* behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die Oberflächenpräsentation von aktiviertem GPIIb/IIIa, P-Selektin und vWF auf den Thrombozyten am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität quantifiziert.

#### **4.1.11 Durchflusszytometrische Messung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche primärer Endothelzellen und Thrombozyten**

Phosphatidylserin (PS) ist ein Phospholipid der Zellmembran, das unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivität von Aminophospholipid-Transferasen an der transversalen

Diffusion gehindert wird und somit nur in der inneren Lipidschicht lokalisiert ist.<sup>68</sup> Diese Asymmetrie kann durch pathologische Stimuli verloren gehen. Die Exposition von PS auf der Zelloberfläche wirkt gerinnungsaktivierend und pro-apoptotisch.<sup>69,70</sup>

Die quantitative Bestimmung von PS auf der Zelloberfläche primärer ECs erfolgte mithilfe des *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, mit dem die Annexin V-Bindung an PS bei gleichzeitiger Messung der Einlagerung des nicht zellmembrangängigen Farbstoffs 7-AAD (siehe 4.1.9) detektiert. Hierfür wurde Lungengewebe aus dem Versuchstier entnommen (siehe 4.4.1) und durch einen Zellsieb gedrückt und mit kaltem PBS hindurch gespült um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Daraufhin wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 1 ml *Erythrocyte Lysis Puffer* für 5 min auf Eis inkubiert und in PBS gewaschen. Pro Färbeansatz wurden die gewonnenen Zellen auf eine einheitliche Zellzahl von  $1 \times 10^5$  eingestellt und in 2% BSA-haltigem PBS RPMI-Puffer aufgenommen, mit Lectin-FITC (1:1000) versetzt und für 60 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2% BSA haltigem PBS gewaschen und in 100 µl *Annexin V-Binding Buffer* resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl PE Annexin V und 5 µl 7-AAD pro Ansatz hinzugegeben und 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl *Annexin V-Binding Buffer* wurden die Proben am *Accuri™ C6* Durchflusszytometer bei folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen gemessen: Lectin-FITC: 488/516 nm; PE Annexin V: 488/575 nm; 7-AAD: 488/647 nm. Zur Auswertung mithilfe der *BD Accuri C6* Software wurde in einem ersten Schritt die 7-AAD-positive Zellpopulation von der Analyse ausgeschlossen. Im zweiten Schritt wurde für die ausgewählte, 7-AAD-negative Zellpopulation die Anzahl der Annexin V-positiven Zellen, die ebenfalls positiv für den EC-Marker Lectin-FITC waren, bestimmt.

Außerdem wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz Thrombozyten auf die Exposition von PS untersucht (durchgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk / Mareike Döhrmann). Dazu wurde verdünntes Plättchen-reiches Plasma (siehe 4.1.2) mit FITC-konjugiertem Annexin V (eBiosciences) nach Herstellerangaben gefärbt und am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung des FITC Annexin V Signals erfolgte, in dem die Anzahl der Annexin V-positiven Plättchen in Bezug auf alle detektierten Plättchen bestimmt wurde.



#### **4.1.12 Bestimmung des intrazellulären Thrombozyten pH-Werts mittels Durchflusszytometrie**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz wurden aus den Versuchstieren gewonnene Thrombozyten in verdünntem Plättchen-reichem Plasma (siehe 4.1.2) auf den intrazellulären pH-Wert untersucht (durchgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk). Dazu wurde der zellpermeable pH-Indikator SNARF-4 (*SNARF-4F 5-(and-6)-carboxylic acid, acetoxymethyl ester, acetate*; Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. SNARF-4 zeigt in Abhängigkeit des intrazellulären pH-Werts eine Wellenlängenverschiebung der Emission bei 580 nm im saurem und bei 660 nm im basischem Milieu. Die Fluoreszenzintensitäten bei 660 nm und 580 nm wurden am *FACSCanto™ II* Durchflusszytometer bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei eine Erhöhung der Fluoreszenzratio (660/580 nm) eine Erhöhung des intrazellulären pH-Werts anzeigte.

## **4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **4.2.1 DNA Extraktion aus Gewebe**

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden diesen durch Stanzmarkierungen am Ohr (*ear clipping*) Gewebeproben entnommen, woraus die genomische DNA extrahiert wurde. Dabei wurde gemäß <sup>71</sup> vorgegangen. Das Gewebe wurde in 75 µl alkalischem Lyse-Reagenz (25 mM NaOH, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA in H<sub>2</sub>O, pH 12) für 30 min bei 95°C inkubiert. Danach wurde die Gewebeprobe auf Eis auf 4-10°C abgekühlt und 75 µl neutralisierendes Reagenz (40 mM Tris-HCl in H<sub>2</sub>O, pH 5) hinzugegeben. Nach abschließendem Durchmischen der Probe mittels Schüttler war die DNA-Extraktion abgeschlossen und wurde direkt für die anschließenden Genotypisierungs-PCR (siehe 4.2.2 und 4.2.7) eingesetzt.

### **4.2.2 PCR zum Nachweis von Gensequenzen aus genomischer DNA**

Um den Genotyp der Mäuse, die aus den verschiedenen Kreuzungsschemata hervorgingen, festzustellen, wurden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Hierfür wurde die aus den Gewebeproben extrahierte genomische DNA (siehe 4.2.1), 5x GoTaq Polymerase Puffer, GoTaq Polymerase, dNTPs sowie *forward* und *reverse* Primer (siehe 3.8.2) gemäß Tabelle 4-2 eingesetzt

und das angegebene PCR-Reaktionsprofil mittels *iCycler* angewendet. Die Menge der eingesetzten genomischen DNA betrug etwa 200 ng pro Reaktion. Die Primer wurden mit 15 pmol pro Reaktion eingesetzt. Die entstehenden Amplifikate hatten eine Länge von <200 bp.

**Tabelle 4-2: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR.**

PCR-Ansatz		PCR-Reaktionsprofil		
5 x GoTaq Reaction Buffer	5,00 µl	94 °C	5:00 min	1 x
dNTPs (0,2 mM)	0,75 µl	94 °C	0:30 min	35 x
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	1,50 µl	62 °C	0:45 min	
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	1,50 µl	72 °C	1:00 min	
H <sub>2</sub> O	12,75 µl	8 °C	∞	1x
GoTaq Polymerase (5 U/µl)	0,50 µl			
Genomische DNA	3,00 µl			

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.2.3) analysiert. Für den *Pon2*-Genotyp wurde zwischen Homozygotie und Heterozygotie wie folgt unterschieden: *Pon2*<sup>-/-</sup>: *Pon2*-negativ und LacZ-positiv; *Pon2*<sup>+/-</sup>: *Pon2*-positiv und LacZ-positiv; *Pon2*<sup>+/+</sup>: *Pon2*-positiv, LacZ-negativ. Der *Tek-Cre*-Genotyp wurde mittels quantitativer real-time PCR analysiert (siehe 4.2.7).

### 4.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten, wie etwa der Prüfung von PCR-Produkten, wurden Agarosegele mit 1% - 2%igem Agaroseanteil eingesetzt, um eine elektrophoretische Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Größe zu erreichen. Der Anteil der eingesetzten Agarose richtete sich nach den zu analysierenden DNA-Fragmentgrößen. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der Agarose wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Um die Agarose im Puffer zu lösen, wurde das Gemisch erhitzt, anschließend wurde dies mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µg/ml versetzt und schließlich in die horizontale Kammer des Gelelektrophorese Systems *Owl*<sup>TM</sup> *B2* gegossen. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und kann durch UV-Licht visualisiert werden. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Taschen des Gels aufgetragen und bei einer Spannung von 80-100 V für etwa 30 min im Gelelektrophorese System aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe durch Fluoreszenz unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe (1 kbp- bzw. 100 bp-DNA-Leiter) identifiziert.

#### **4.2.4 RNA Extraktion aus primären Zellen oder Gewebe**

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

Zur Extraktion von RNA aus den primären aortalen Endothelzellen, welche durch FACS-*sorting* isoliert wurden, wurde aufgrund der geringen Zellzahl das *Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit* eingesetzt, welches höhere Ausbeuten bei wenig Ausgangsmaterial gewährleisten sollte. Es wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen. Die RNA wurde in 11 µl Elutionspuffer gelöst.

#### **4.2.5 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 Spectrophotometer*. Der Messvorgang wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit der Nukleinsäureproben wurde durch das Verhältnis der Extinktion der Probe bei 260 nm zu 280 nm überprüft. Dieses OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Verhältnis, d.h. die Extinktion von Nukleinsäuren bei 260 nm bezogen auf jener von Proteinen bei 280 nm, weist auf Verunreinigungen durch Protein-Rückstände aus der Präparation hin. Der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Wert der verwendeten Nukleinsäure-Lösungen lag stets über 1,8, so dass von einem geringen Grad an Protein-Verunreinigung ausgegangen werden konnte.

#### **4.2.6 cDNA-Synthese mittels Reverse Transkriptase-PCR**

Zur quantitativen Analyse der Genexpression mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) ist es notwendig, die aus den primären Zellen oder aus Gewebe extrahierte RNA in cDNA (*complementary DNA*) umzuschreiben, welche als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR dient. Die cDNA-Synthese erfolgt mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die RNA in komplementäre DNA umschreibt. Die Synthese von cDNA aus der extrahierten RNA wurde mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* durchgeführt. Es wurden dabei 20-100 ng RNA für die Reverse Transkriptase-PCR eingesetzt und gemäß den Empfehlungen des Herstellers verfahren.

#### 4.2.7 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Quantitative Genexpressionsstudien wurden mittels qRT-PCR-Reaktionen durchgeführt. In dieser Reaktion wird der ursprünglich im analysierten Probenmaterial enthaltene, genspezifische mRNA-Gehalt detektiert und somit das Expressionsprofil von Zellen für ein spezifisches Gen angezeigt. Es wurden zwei verschiedene qRT-PCR Systeme verwendet: *SYBR Green* qRT-PCR und *TaqMan* qRT-PCR.

Die *SYBR Green* qRT-PCR basiert auf der Bindung eines sequenzunspezifischen Farbstoffs (*SYBR Green*) an doppelsträngige DNA. Durch Anregung bei 488 nm fluoresziert der eingesetzte Farbstoff bei 521 nm sobald er in doppelsträngige DNA interkaliert. Demnach wächst das Fluoreszenzsignal proportional mit der Menge der cDNA, die während der Reaktion amplifiziert wird. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals ist somit direkt proportional zur ursprünglichen mRNA-Menge. Da der Farbstoff auch an unspezifische PCR Produkte bindet, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurve gemessen. Dabei bewirkt eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur die Denaturierung doppelsträngiger DNA, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Änderung des Fluoreszenzsignals detektiert wird. Weil die DNA-Schmelztemperatur spezifisch für das amplifizierte Fragment ist, kann überprüft werden, ob während der PCR unspezifische Fragmente generiert wurden und unerwartet mehrere PCR Produkte entstanden sind.<sup>72</sup> Der Reaktionsansatz und das Reaktionsprofil der *SYBR Green* qRT-PCR setzte sich wie in Tabelle 4-3 beschrieben zusammen und wurde im *OneStepPlus Cycler* gemessen.

**Tabelle 4-3: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der *SYBR Green* qRT-PCR.**

PCR-Ansatz		PCR-Reaktionsprofil		
KAPA SYBR FAST	10,0 µl	95°C	0:20 min	1 x
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,4 µl	95°C	0:03 min	40 x
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,4 µl	60°C	0:30 min	
RNase-freies H <sub>2</sub> O	8,2 µl	60°C	1:00 min	1 x
cDNA	1,0 µl	60°C → 95°C	0:15 min / +0,3°C	1 x

Bei der *TaqMan* qRT-PCR wird zusätzlich zu den *forward* und *reverse* Primern eine sequenzspezifische DNA-Sonde (*TaqMan probe*) eingesetzt, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) markiert ist. Die Sonde ist für einen Genbereich

sequenzspezifisch, der zwischen den eingesetzten *forward* und *reverse* Primern liegt. Solange die Sonde an die komplementäre cDNA gebunden und intakt ist, liegt das Emissionsmaximum von FAM bei 580 nm, da es aufgrund der räumlichen Nähe zu TAMRA zum Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) von FAM auf TAMRA kommt.<sup>73</sup> Während der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten. Dadurch entfernen sich Fluoreszenzfarbstoff und Quencher räumlich voneinander, so dass der Energietransfer ausbleibt, FAM somit bei 518 nm emittiert und diese Emission durch Anregung bei 488 nm im qPCR-System detektiert werden kann. Folglich ist bei der *TaqMan* qPCR wie auch beim *SYBR green* System die detektierte Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge der während der Reaktion amplifizierten cDNA und somit zur ursprünglichen mRNA-Menge. Der *TaqMan* PCR-Ansatz und das verwendete Reaktionsprofil wurden gemäß Tabelle 4-4 eingesetzt und mittels *OneStepPlus Cyclor* gemessen.

**Tabelle 4-4: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der *TaqMan* qRT-PCR.**

PCR-Ansatz		PCR-Reaktionsprofil		
2x Reaktionspuffer	10,0 µl	95°C	1:00 min	1 x
dNTPs (0,2 mM)	0,4 µl	95°C	1:00 min	45 x
<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	95°C	0:30 min	
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	60°C	1:00 min	
<i>Taq Man</i> Sonde (10 pmol/µl)	1,0 µl	4°C	∞	1 x
RNase-freies H <sub>2</sub> O	3,1 µl			
Taq-Polymerase	0,5 µl			
cDNA	3,0 µl			

Zur Genotypisierung transgener Tek-Cre<sup>+/-</sup> und Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Dafür wurde pro Reaktion 3 µl der aus den Gewebeproben extrahierten genomischen DNA (siehe 4.2.1) eingesetzt. Der PCR-Ansatz und das Reaktionsprofil entsprachen ansonsten der in Tabelle 4-4 beschriebenen Angaben und wurde ebenfalls im *OneStepPlus Cyclor* gemessen. Im Falle des Cre-Lokus mussten die aus der Zucht hervorgehenden Mäuse nur zwischen heterozygot Tek-Cre<sup>+/-</sup> und homozygot Tek-Cre<sup>-/-</sup> (WT) unterschieden werden, da in der Zucht jeweils nur ein Elternteil Cre-heterozygot (Tek-Cre<sup>+/-</sup>) war und das andere Elternteil kein Cre Allel trug und somit WT (Tek-Cre<sup>-/-</sup>) war (siehe 3.10 und

Abbildung 3-2). Somit wurde der Cre-Genotyp wie folgt identifiziert: Tek-Cre<sup>-/-</sup>(WT): Cre-negativ; Tek-Cre<sup>+/-</sup>: Cre-positiv.

Um das Expressionsprofil eines breiten Spektrums an Genen untersuchen zu können, kamen *TaqMan*® Arrays im *Fast 96-Well Plates*-Format bestehend aus 96 verschiedenen *TaqMan*® *Gene Expression Assays* zum Einsatz. Diese *TaqMan*® *Array Plates* enthielten genspezifischen Primer und Sonden, welche durch den Hersteller in die *wells* der Platten vorgegeben waren. Zur Untersuchung des Genexpressionsprofils von primären aortalen Endothelzellen sowie von Lebergewebe aus der Maus wurde ein individuell gefertigter *TaqMan*® *Array* eingesetzt. Die hierdurch analysierten Gene sind involviert in die Gerinnung, Inflammation, Zelladhäsion, Endothelfunktion, Apoptose und Gentranskription (Tabelle 3-5). Ein zweiter Array, der *Human Thrombin TaqMan*® *Array*, diente der Analyse primärer humaner Endothelzellen (HUVECs) bezüglich der Expression von Genen, die an Thrombin-vermittelten Signalwegen beteiligt sind (Tabelle 3-6). Für den Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben die cDNA der zu untersuchenden Proben mit RNase-freiem Wasser und mit dem *TaqMan*® *Fast Advanced Master Mix* gemischt, der alle für die qRT-PCR-Reaktion benötigten Komponenten enthielt (Tabelle 4-5). Dies wurde auf die *96-wells* verteilt (10 µl pro Reaktion) und mit dem in Tabelle 4-5 angegebenen Reaktionsprofil im *StepOnePlus Cycler* gemessen.

**Tabelle 4-5: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der *TaqMan* Array *Fast 96-Well Plates*.**

PCR-Ansatz		PCR-Reaktionsprofil		
TaqMan® Master Mix	5,0 µl	50°C	2:00 min	1 x
cDNA	mind. 5 ng	95°C	0:20 min	1 x
RNase-freies H <sub>2</sub> O	auf 10 µl auffüllen	60°C	0:03 min	40 x
		60°C	0:30 min	
		4°C	∞	1 x

Die Berechnung des mRNA-Expressionslevels erfolgte für alle qRT-PCR-basierten Analysen durch die  $2^{-1\Delta\Delta}$ -Methode, welche ausgehend vom  $C^T$ -Wert (*cycle threshold*-Wert der exponentiellen Wachstumskurve des Fluoreszenzsignals) die Expressionsrate in Bezug auf eine konstitutiv exprimierte mRNA (*house keeping gene*) aus derselben Probe berechnet. Bei allen qRT-PCRs wurde stets auf zwei oder mehr *house keeping genes* normalisiert (verwendete *house keeping genes*: Glycerin-aldehyd-3-phosphat, GAPDH bzw. Gapdh; βActin; Polymerase RNA II Polypeptid A, Polr2a; mitochondriale ATP Synthase Fo Komplex, Atp5j; Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1, HPRT1; Glucuronidase β, GUSB).

## 4.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 4.3.1 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus primären Zellen und Gewebe

Zur Präparation von Proteinextrakten aus primären Zellen wurde das Zellkultur-Medium von den Zellen abgesogen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 80-100 µl RIPA-Lysepuffer (siehe 3.5), welcher mit 1x Halt Protease-Inhibitor und 1x EDTA versetzt wurde, lysiert. Im Falle von kultivierten, adhärennten Zellen wurden diese im Zuge der RIPA-Lyse mithilfe einer Pipettenspitze vom Boden der Zellkultur-Platte mechanisch abgelöst. Anschließend wurde die erhaltene Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse nicht-kultivierter primärer Zellen wurde ebenfalls mechanisch unterstützt, indem die Zellen nach dem Waschschrift mit 1x PBS und der anschließenden Zugabe von RIPA-Lysepuffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig durchmischt wurden. Die Proteinextrakt-Herstellung aus Gewebe erfolgte aus Organproben, die in flüssigen Stickstoff tiefgefroren wurden. Etwa 80 mg der tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mit 200 µl RIPA-Lysepuffer versetzt und mittels *TissueLyser* bei 50 Hz für 2-4 min bei -20 °C homogenisiert. Darauf folgte eine Zentrifugation der Gewebelysate bei 20.000 x g für 10 min bei 4°C, woraufhin der Lysat-Überstand abgenommen und Gewebsrückstände abgetrennt und verworfen werden konnten.

Die erhaltenen Proben wurden im Anschluss an die Lyse bei -20°C über Nacht eingefroren. Am Folgetag wurden die Lysate aufgetaut und bei 4°C für 30 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dessen Proteingehalt mittels BCA bestimmt (siehe 4.3.2) und anschließende Analysen (siehe 4.3.3 und 4.3.8) durchgeführt.

### 4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration von Gesamtprotein-Extrakten (siehe 4.3.1) wurde mittels BCA-Test bestimmt. Hierfür wurde das *BCA™ Protein Assay Kit* nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischer Lösung und der anschließenden Bildung eines violetten Farbkomplexes aus  $\text{Cu}^+$ -Ionen und Bicinchoninsäure (BCA), welcher bei 562 nm photometrisch detektiert wird. Somit ist die Menge der reduzierten Kupferionen direkt proportional zur Proteinmenge. Anhand des Vergleichs der gemessenen Absorption bei 562 nm mit einer Eichgeraden, welche aus Protein-

lösungen mit bekannter Konzentration erstellt wird, kann auf die Proteinkonzentration in der Lösung rückgeschlossen werden.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und zur anschließenden Identifizierung von Proteinen im Western Blot (siehe 4.3.4) wurde die Methode der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli <sup>74</sup> angewendet. Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Vor der Auftrennung im Gel werden die Proteine der zu untersuchenden Lysatproben (siehe 4.3.1) durch Inkubation mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) und der Erhitzung auf 95°C denaturiert. Da SDS negativ geladen ist und sehr effizient an Proteine bindet, wird die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar. Zudem bindet SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine, so dass die SDS-Protein-Komplexe ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis aufweisen. Folglich ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld dem Protein-Molekulargewicht proportional. Die Polyacrylamidmatrix fungiert als molekulares Sieb und trennt die Proteine nach ihrem Stokes-Radius auf.

Die SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophorese-Kammer (*Perfect-Blue Doppelsystem Twin L*), welche mit 12%igem Trenngel befüllt wurde. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und eine gerade Trennlinie zu gewährleisten, wurde das Trenngel sofort nach Befüllung mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol entfernt, das 5%ige Sammelgel zwischen die Platten auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Bromphenolblau im Sammelgel diente der deutlicheren Erkennbarkeit der Taschen. Die Proteinproben, deren Konzentration zuvor bestimmt (siehe 4.3.2) und auf eine einheitliche Konzentration eingestellt wurde, wurden mit 5x SDS-Auftragungspuffer versetzt. Das im Auftragungspuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff. Schließlich wurden die Proben sowie ein Proteinmarker als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 9 mA pro Gel (ca. 10 cm x 12 cm) für etwa 18 h (über Nacht) bzw. bei ca. 100 mA unter Kühlung der Gelapparatur für etwa 4 h.



Tabelle 4-6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE.

	12%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	8,25 ml	4,40 ml
30% Bisacrylamid	10,00 ml	1,34 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	6,25 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	2,00 ml
10%iges SDS	0,25 ml	0,08 ml
10%iges APS	0,25 ml	0,08 ml
0,5% Bromphenolblau in 0,5 M Tris, pH 6,8	-	0,08 ml
TEMED	0,03 ml	0,01 ml

#### 4.3.4 Western Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen

Mittels Western Blot Analysen werden Proteine durch einen elektrophoretischen Transfer auf eine Trägermembran übertragen und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Per SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennte Proteine wurden mit dem *Semidry*-Blotsystem durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtes, elektrisches Feld auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zunächst für etwa 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, 5 min in Wasser gewaschen und anschließend in Anodenpuffer II äquilibriert. Zum elektrischen Transfer wurden zwei mit Anodenpuffer I und darauf zwei mit Anodenpuffer II getränkte Whatmann Papiere auf die Blotting Apparatur gelegt, worauf dann die äquilibrierte PVDF-Membran platziert wurde. Das Gel wurde direkt auf die PVDF-Membran gelegt und mit vier in Kathodenpuffer getränkten Whatmann Papieren überschichtet. Mit dieser Anordnung wurde die Transferrichtung von der Kathode zur Anode gewährleistet. Der Transfer erfolgte bei 3 mA/cm<sup>2</sup> des Gels für 20 min.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in 5%igem Milchpulver in 1x TBS/Tween für mindestens 30 min abgesättigt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran in einer Lösung des Primärantikörpers in 5%igem Milchpulver in 1x TBS/Tween über Nacht bei 4°C in *end-over-end* Rotation. Im Falle des anti-mouse PON2 Antikörpers (Eurogentec) wurde für die Inkubation 5%iges BSA in TBS/Tween anstatt des 5%igen Milchpulvers in TBST/Tween eingesetzt. Am Folgetag wurde der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex mittels eines Meerrettich-Peroxidase (horseradish

peroxidase, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Dazu wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in TBS/Tween gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in der 5%igen Milchpulverlösung inkubiert. Darauf folgten erneute Waschschrte mit TBS/Tween (2 x 10 min bei RT) und TBS (1 x 10 min bei RT). Die Visualisierung der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Protein-Komplexe erfolgte durch die Zugabe eines Substrats der Peroxidase basierend auf dem ECL (*enhanced chemiluminescence*)-System. Bei der Peroxidase-katalysierten Umsetzung des zugegebenen ECL-Substrats in seine oxidierte Form kommt es zu Chemilumineszenz, welche detektiert werden kann. Hierfür wurde die Membran für eine Minute in *Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus* Lösung oder in *WesternBright™ Sirius* inkubiert.

Die Visualisierung der Lichtemission erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms und durch das digitale *ChemiDoc XRS Imaging System*. Zur quantitativen Auswertung der detektierten Protein-Banden wurde die Software *QuantityOne 4.6.7* verwendet, wobei die ermittelte Intensität der zu analysierenden Protein-Banden stets auf die von ebenfalls analysierten *house keeping proteins* (Glycerin-aldehyd-3-phosphat, GAPDH;  $\beta$ Actin) normalisiert wurde.

### **4.3.5 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)**

Mittels ELISA können Antigene, wie Proteine oder andere Verbindungen, in einer Probe durch eine antikörperbasierte Nachweisreaktion detektiert und quantifiziert werden. Das nachzuweisende Antigen wird dabei spezifisch über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und anschließend durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper, der an eine andere Stelle des Antigens bindet als der erste Antikörper, über eine Farbstoff- oder Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Aufgrund des hierbei gebildeten Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes wird dieses Nachweissystem auch als Sandwich-ELISA bezeichnet.

Zur Quantifizierung von verschiedenen Cytokinen und Chemokinen in Mausplasma wurden *Q-Plex Array Chemiluminescent custom-made mouse multi-analyte ELISAs* (Quansys) eingesetzt. Das Prinzip dieser multiplex-ELISAs basiert auf der simultanen Bestimmung mehrerer Analyte pro *well* der Mikrotiterplatte. Ermöglicht wird dies durch mehrere antigenspezifische Antikörper-Spots, die in jedem einzelnen *well* vorgelegt sind und mittels Chemilumineszenz-basierter Nachweisreaktion visuell auf die Antigen-Bindung analysiert werden können. Außerdem wird ein

Proteinstandard, welcher alle zu untersuchenden Analyte enthält, mitgeführt, so dass die quantitative Bestimmung mehrerer Analyte in einer Probe möglich ist. Folgende Cytokine und Chemokine wurden hierdurch analysiert: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 (p70 A/B-Heterodimer), IL-17, CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC) und TNF- $\alpha$ . Für die Messung wurde das präparierte Citratplasma (siehe 4.4.2) gemäß den Herstellerangaben mit dem im *Q-Plex Array Kit* enthaltenen *Assay Buffer* verdünnt, auf die ELISA-Platte aufgetragen und inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen abgetragen und der *Detection Mix*, welcher alle spezifischen biotinylierten Zweitantikörper enthielt, wurde hinzugegeben und inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Streptavidin-gekoppelte HRP (horseradish peroxidase) hinzugegeben, welche an das Biotin der Zweitantikörper bindet und dadurch die Nachweisreaktion verstärkt. Nach weiteren Waschschritten wurde ein Substrat hinzugegeben, welches durch die gebundene Peroxidase umgesetzt wird und Chemilumineszenz emittiert. Die Chemilumineszenz-Intensität wurde mithilfe des *ChemiDoc XRS Imaging Systems* detektiert und mit der Q-View Software in Bezug auf einen im ELISA mitgeführten Proteinstandard quantitativ analysiert. Die gleiche Vorgehensweise wurde außerdem für Zellkulturüberstände von kultivierten ECs angewendet. Dafür wurden isolierte ECs nach erfolgter zweifacher Zellektion (siehe 4.1.1) mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro *well* auf eine 24-*well*-Platte ausgesät und für weitere 3 Tage kultiviert. Nachdem 300  $\mu$ l frisches Medium zu den Zellen gegeben und für 3 h inkubiert wurde, wurden schließlich die Zellkulturüberstände abgenommen und nach Herstellerangaben für den *Q-Plex Array Chemiluminescent custom-made mouse multi-analyte ELISA* eingesetzt.

Des Weiteren wurde ein ELISA zur quantitativen Bestimmung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) im Mausplasma durchgeführt. TAT dient als Surrogat-Marker für die plasmatische Konzentration von Thrombin. Für diese Messung wurde ein *TAT Complexes Mouse ELISA Kit* (Abnova) eingesetzt, welches ebenfalls basierend auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs die Bestimmung der TAT-Konzentration im Mausplasma anhand einer Farbreaktion ermöglicht. Entsprechend der Herstellerangaben wurde das Mausplasma im *MIX-Diluent* verdünnt, auf die Platte aufgetragen und inkubiert, was die Bindung der im Plasma enthaltenen TAT-Komplexe an den an die Platte gebundenen Thrombin-Antikörper gewährleistete. Nach einem Waschschritt wurde der biotinylierte Mouse Antithrombin-Antikörper hinzugegeben und inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase hinzugefügt und erneut gewaschen. Der gebildete Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex wurde schließlich durch

Zugabe eines chromogenen Substrats der Peroxidase nachgewiesen. Die durch den Substratumsatz entstehende Farbentwicklung wurde durch Zugabe der *Stop Solution* abgestoppt und die Farbintensität durch die Messung der Absorption bei 450 nm mithilfe des *FLUOstar Optima Microplate Reader* ermittelt. Anhand des eingesetzten TAT-Standards erfolgte die Quantifizierung der TAT-Konzentration, welche der gemessenen Farbintensität proportional ist.

### 4.3.6 Messung der enzymatischen Aktivität von PON2

Die Messung der Enzymaktivität von PON2 diente der Überprüfung der gewebespezifischen, Cre-loxP-vermittelten PON2 Re-Expression im Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mausmodell. Da in der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Linie sowohl in ECs als auch in Zellen des hämatopoetischen Systems eine Cre-vermittelte Rekombination erwartet wurde, wurde die PON2-Aktivität in ECs und Blutzellen (*blood cells*, BCs) im Vergleich zu der in Leberzellen analysiert.

Die Isolation der ECs aus der Lunge der Versuchstiere erfolge wie in 4.1.1 beschrieben und ohne Kultivierung. Die BCs wurden aus Citrat-Vollblut gewonnen, welches im Zuge der Plasmapräparation für die Gerinnungsmessungen zentrifugiert wurde (siehe 4.4.2). Das dabei entstandene BC-Pellet wurde zur Lyse der Erythrozyten in kaltem *Erythrocyte Lysis* Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach zentrifugiert (4 min, 900 x g, 4°C), mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine erneute 5-minütige Inkubation in *Erythrocyte Lysis* Puffer. Anschließend wurden die Zellen wiederholt zentrifugiert und in frischem PBS resuspendiert. Zur Präparation der Leberzellen wurde die Hälfte eines entnommenen Leberlappens in kaltem PBS durch einen Zellsieb (100µm) gedrückt und gespült, wodurch eine Einzelsuspension erhalten wurde. Diese wurde zentrifugiert (4 min, 900 x g, 4°C) und zur Erythrozyten-Lyse für 5 min in kaltem *Erythrocyte Lysis* Puffer auf Eis inkubiert, gefolgt von erneuter Zentrifugation und Resuspension der Zellen in frischem PBS.

Die isolierten ECs, BCs und Leberzellen wurden abschließend zentrifugiert (4 min, 900 x g, 4°C), das PBS vollständig abgezogen, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert bzw. bei -20°C verschickt. Die Messung der enzymatischen Lactonase-Aktivität von PON2 in den Zellpellets erfolgte anhand der Bestimmung des PON2-vermittelten Umsatzes des Substrats N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3OC12). Dies wurde von Dr. John F. Teiber (Department of Internal Medicine, Division of Epidemiology, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA) gemäß publizierter Protokolle<sup>28,75</sup> durchgeführt.

#### 4.3.7 Messung der plasmatischen Thrombin-Aktivität

Im Gegensatz zur Bestimmung der plasmatischen Thrombin-Antithrombin-Konzentration (siehe 4.3.5) und der Thrombin (FII)-Aktivität mittels *prothrombin time* (siehe 4.4.4), erfolgte mithilfe des *OLIGOBIND Thrombin activity assay* (Sekisui Diagnostics) eine direkte Quantifizierung des funktional aktiven Thrombins im Plasma. Diese Methode beruht auf der Bindung von Thrombin an ein DNA-Aptamer, welches Thrombin in Plasma-Proben hoch-affin bindet. Da das aktive Zentrum von Thrombin dadurch nicht besetzt wird, kann im folgenden Schritt das Aptamer-gebundene Thrombin durch die Hydrolyse-Rate eines fluorogenen Peptid-Substrats quantifiziert werden.

Die Plasmaproben wurden entsprechend der Herstellerangaben präpariert, auf die DNA-Aptamer-beschichtete Platte aufgetragen, mit dem fluorogenen Substrat versetzt und im *FLUOstar Optima Microplate Reader* bei einer Excitations-/Emissionswellenlänge von 355/450 nm gemessen. Die simultane Messung einer Thrombin-Standardreihe diente der Berechnung des Thrombin-Levels (in mU/ml) im Plasma.

#### 4.3.8 Messung der endothelialen TF-Aktivität

Um die endotheliale Aktivität von *Tissue Factor* (TF), dem primären Auslöser der extrinsischen Gerinnung, bestimmen zu können, kam der *ACTICHROME TF activity assay* (Sekisui Diagnostics) gemäß den Herstellerangaben zum Einsatz. Da die endothelspezifische TF-Aktivität bestimmt werden sollte, wurden Proteinlysate aus isolierten und kultivierten ECs (siehe 4.1.1 und 4.3.1) für die Messung herangezogen.

Bei dieser Methode wird die zu analysierende Probe, hier die EC-Lysate, mit dem humanen Faktor VIIa (FVIIa) und dem humanen FX versetzt und bei 37°C inkubiert. Dies ermöglicht die Ausbildung des TF/FVIIa Komplexes, welcher die Umwandlung von FX in seine aktivierte Form FXa katalysiert. Die Menge des gebildeten FXa wird durch die FXa-vermittelte Spaltung des chromogenen Substrats SPECTROZYME® FXa gemessen, welches zur Reaktion dazu gegeben wird.

Die Intensität der entstandenen Färbung wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm mithilfe des *FLUOstar Optima Microplate Reader* bestimmt und mit den Messwerten einer TF-Standardreihe verglichen. Die erhaltene TF-Konzentration (in pM), welche basierend auf der TF-Aktivität ermittelt wurde, wurde abschließend auf die Gesamtproteinmenge (siehe 4.3.2) der

gemessenen Probe normalisiert. Zur Verifizierung der Spezifität der TF-Aktivitätsmessung wurden die ECs vor der Lyse mit 5 µg/ml anti-TF Antikörper 21E10 (siehe 3.7.1) in EC Medium für 3 h behandelt und ebenfalls im *ACTICHROME TF activity assay* analysiert.

## 4.4 Arbeiten an Versuchstieren

### 4.4.1 Entnahme von Geweben und Blut aus Mäusen

Zur Entnahme von Organen, Geweben und Blut aus den Versuchstieren wurden diese narkotisiert und getötet, gemäß §4 Abs. 1 und §6 Abs. 1 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes. Die Mäuse wurden dazu zunächst durch Isofluran-Begasung betäubt. Anschließend wurde eine tief narkotisierende bis nahe zu letale Dosis von 0,8 ml 1%igem Pentobarbital in 0,9%iger NaCl-Lösung pro 25 g Körpergewicht i. p. injiziert. Nachdem die tiefe Narkotisierung sichergestellt worden war, wurden die Eingriffe am Tier durchgeführt, wobei das Tier durch die Entnahme des Herzens getötet wurde.

Alle Tierversuche wurden durch den genehmigten Antrag mit dem Aktenzeichen 23177-07/G13-1-055 zur Durchführung von Tierversuchen nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch das Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz gestattet. Nach erfolgter Behandlung der Mäuse im Rahmen des Tierversuchs, wurden diese zur Entnahme von Gewebe und Blut, wie oben beschrieben, narkotisiert und getötet.

### 4.4.2 Blutgerinnungszeitmessung mittels PT- und aPTT-Test

Die plasmatische Blutgerinnung wurde durch das Messen der Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT) und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) analysiert. Die Blutentnahme für den PT- und aPTT-Test erfolgte mittels Herzpunktion an den tiefnarkotisierten Tieren. Mithilfe einer mit Citratlösung (siehe 3.5) benetzten Spritze und 26G-Kanüle wurden etwa 500 µl Vollblut entnommen und mit Citratlösung im Verhältnis 1:9 versetzt (1 Teil Citratlösung, 9 Teile Vollblut). Anschließend wurde die Blutprobe bei 1.500 x g für 20 min bei RT zentrifugiert und das Plasma durch das Abnehmen des klaren Überstands gewonnen. Die Gerinnungszeitmessungen wurden am *KC 4 Delta Coagulation Analyzer* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Bevor das Plasma mit den Reagenzien zur Gerinnungs-

messung versetzt wurde, wurde es im Falle des PT-Tests für 60 sek, im Falle des aPTT-Tests für 300 sek bei 37°C inkubiert.

Die Prothrombinzeit entspricht der Zeitspanne von der Zugabe von Thromborel S zum Plasma bis zum Einsetzen der Gerinnung des Plasmas durch die Bildung von Fibrin. Die Thromborel S-Lösung enthält *Tissue Factor* und  $\text{Ca}^{2+}$  und aktiviert damit das extrinsische System der plasmatischen Blutgerinnung. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit wird durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  zum Plasma, welches mit Parthrombin SL (enthält oberflächenaktive Silikondioxidpartikel und Phospholipide) versetzt wurde, und durch das Messen der Zeit bis zur eintretenden Fibrinbildung ermittelt. Die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen und  $\text{Ca}^{2+}$  zum Plasma induziert den intrinsischen Aktivierungsweg. Der PT-Test ist also Maß für den extrinsischen, der aPTT-Test für den intrinsischen Weg der plasmatischen Blutgerinnung.

### **4.4.3 Blutgerinnungszeitmessung mittels *tail tip bleeding***

Die Blutungszeit der Schwanzvene, die mithilfe der *tail tip bleeding*-Methode gemessen wird, gibt Auskunft über die ganzheitliche Blutgerinnung, da sowohl die plasmatischen als auch die zellulären und gefäßphysiologischen Komponenten der Gerinnung in die Messung eingehen. Zur Bestimmung der *tail tip bleeding time* wurde das Versuchstier in eine Apparatur platziert, so dass das Tier fixiert und der Schwanz frei zugänglich war. Exakt 10 mm der Schwanzspitze wurde mittels Skalpell abgetrennt. Der Schwanz wurde dann sofort im Winkel von 45° in 37°C warme 0,9%ige NaCl-Lösung gehalten und die Zeit bis zum Stopp der Blutung gemessen. Es wurde drauf geachtet, dass der Schwanz relativ ruhig gehalten wurde und dass die Zeit bis zum ersten Blutungsstopp genommen wurde, auch wenn die Blutung nach starker Bewegung des Schwanzes erneut einsetzte.

### **4.4.4 Messung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren**

Die Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI und FXII wurde am *KC 4 Delta Coagulation Analyzer* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde das Plasma wie in 4.4.2 beschrieben präpariert und in *Imidazole Buffer* (siehe 3.5) verdünnt. Dabei wurde für die Aktivitätsmessung der Gerinnungsfaktoren des gemeinsamen und des extrinsischen Weges (FII, FV, FVII und FX mittels *prothrombin time*, PT) eine 1:5 Verdünnung und für die Messung der Faktoren des intrinsischen Weges (FVIII, FIX, FXI und

FXII mittels *activated partial thromboplastin time*, aPTT) eine 1:20 Verdünnung eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass diese Verdünnungen unmittelbar vor der Messung frisch angesetzt wurden. Anschließend wurde das verdünnte Plasma mit dem Gerinnungsfaktor-Mangelplasma, welches defizient für den zu analysierenden Gerinnungsfaktor war, für 60 Sekunden (PT) bzw. 55 Sekunden (aPTT) inkubiert, die Reagenzien zur Gerinnungsmessung hinzugegeben (Thromborel S für PT; Parthrombin SL,  $\text{Ca}^{2+}$  für aPTT) und die Gerinnungszeit gemessen. Im Falle des aPTT-Tests wurde die Probe nach der Zugabe von Parthrombin SL für 185 Sekunden inkubiert bevor  $\text{Ca}^{2+}$  zum Start der Gerinnungszeitmessung hinzugegeben wurde. Alle Messungen der Gerinnungsfaktoraktivitäten wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das Prinzip dieser Messmethode beruht auf der Verdünnung des Plasmas, für das die Gerinnungsfaktoraktivität gemessen werden soll, in Gerinnungsfaktor-Mangelplasma. Da diesem Mangelplasma der zu analysierende Gerinnungsfaktor fehlt, wird ausschließlich die Aktivität des im Proben-Plasma enthaltenen Faktors widerspiegelt. Ist z. B. die plasmatische Gerinnungszeit im Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma gegenüber einer Kontrolle verkürzt, weist FV eine erhöhte Aktivität auf; ist die Gerinnungszeit im Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma dagegen verlängert, so ist die FV-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt.

### 4.4.5 Messungen der vaskulären Funktion

Die Endothel-abhängige vaskuläre Funktion der thorakalen Mauseorta wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Vaskuläre Pharmakologie / Prof. Dr. Huige Li / Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz gemäß publizierter Protokolle <sup>76, 77</sup> untersucht (durchgeführt von Dr. Xia Ning). Die Aorta wurde isoliert, vom perivaskulären Fett befreit und in 2-3 mm breite Ringe geschnitten. Die isometrische Spannung wurde mittels *Wire Myograph System* aufgezeichnet. Dafür wurden die aortalen Ringe im Vorfeld der Messung für 60 min äquilibriert und zwei Mal mit 120 mM KCl kontrahiert. Zur Bestimmung der vaskulären Funktion wurden die Ringe zunächst mit Noradrenalin auf eine submaximale Spannung von 80% der durch 120 mM KCl gehaltenen Spannung vor-kontrahiert, bevor dann die Vasodilatation durch die Zugabe steigender Konzentrationen von Acetylcholin induziert und aufgezeichnet wurde.

Im Falle eines intakten Endothels bewirkt Acetylcholin durch die Bindung an endotheliale muskarinische Rezeptoren eine Vasodilatation. Bei Schädigung des Endothels tritt jedoch eine Vasokonstriktion infolge einer direkten Wirkung von Acetylcholin auf glatte Muskelzellen auf. <sup>29</sup>



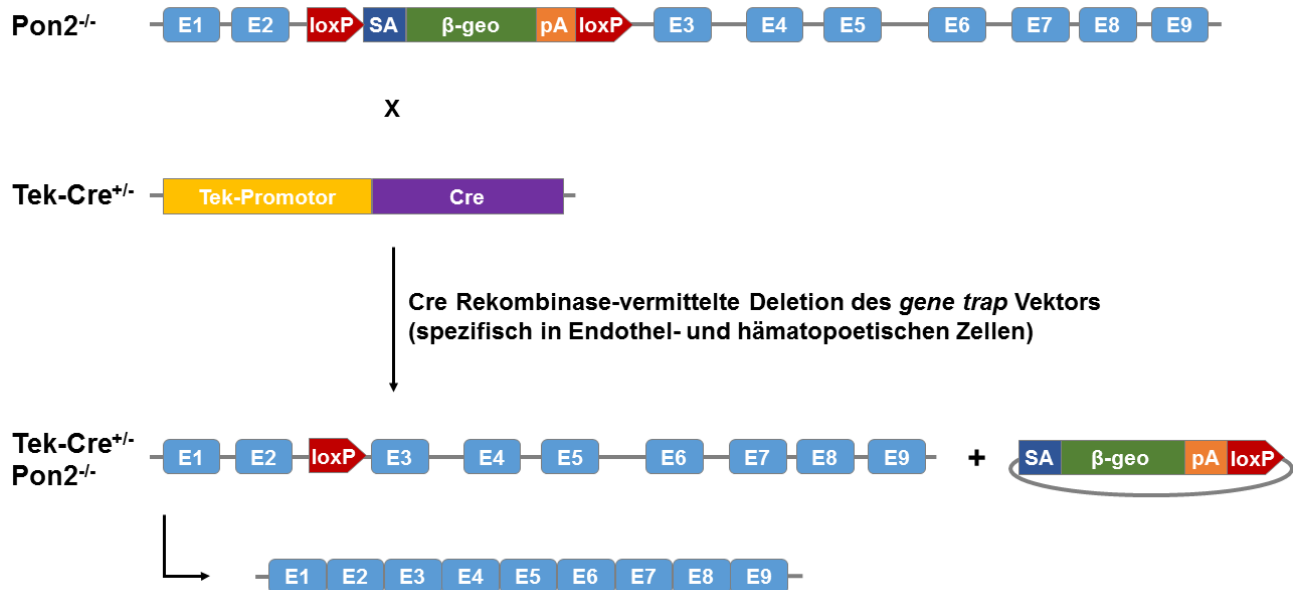
Somit gibt das Ausmaß der gemessenen Acetylcholin-induzierten Gefäßrelaxation Auskunft über die Endothelfunktion.

### 4.4.6 Antikörper Applikation

Um die Rolle von *Tissue Factor* (TF) in der PON2-regulierten Blutgerinnung zu untersuchen, wurde den Versuchstieren 72 und 24 Stunden vor den Analysen (siehe 4.4.2, 4.4.3 und 4.4.5) 0,5 mg anti-mouse TF Antikörper 21E10<sup>78</sup> (siehe 3.7.1) in 0,9%iger NaCl-Lösung pro Maus i. p. mithilfe einer 26G1/2-Kanüle verabreicht. Den Kontrollgruppen wurde eine IgG Kontrolle (siehe 3.7.1) in 0,9%iger NaCl-Lösung in gleicher Konzentration (2x 0,5 mg/Maus) bzw. ausschließlich 0,9%ige NaCl-Lösung 72 und 24 Stunden vor den Untersuchungen injiziert. Da anti-TF 21E10 die gerinnungsfördernde Aktivität von TF blockiert, lässt die Untersuchung von 21E10-behandelten Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen Rückschlüsse auf die Beteiligung von TF in der veränderten Blutgerinnung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zu.

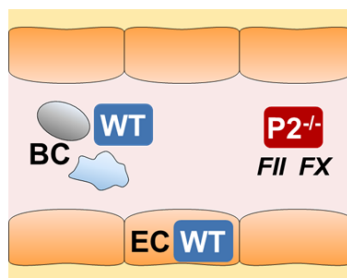
### 4.4.7 Cre-loxP-vermittelte Re-Expression von PON2

Um die Funktion der endothelial exprimierten PON2 im hämostatischen System zu untersuchen, wurde das Cre-loxP Rekombinationssystem angewendet. Dieses System dient der gewebe- und/oder zeitspezifischen Deletion von DNA-Abschnitten im Maus-Genom. Dabei macht man sich die Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) zunutze, welche die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (*locus of X-over of P1*) katalysiert und somit ein DNA-Segment, das zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen liegt, in Form eines zirkulären Produktes aus dem Chromosom herausschneidet. Dieses zirkuläre Fragment wird in der Zelle abgebaut. Indem die Cre-Expression in Abhängigkeit eines gewebespezifischen Promotors gesetzt wird, wird eine gewebespezifische Rekombination und damit Deletion des loxP-flankierten DNA-Segments erreicht. Zusätzlich zu dieser Gewebespezifität kann auch eine zeitspezifische Rekombination etabliert werden. Hierfür wird die Cre-Expression transkriptionell oder post-translational reguliert, z. B. durch die Verwendung Tetracyclin-abhängiger Promotoren oder Liganden-aktivierbarer Cre-Rekombinasen.



**Abbildung 4-2: Die Cre Rekombinase-vermittelte Wiederherstellung der PON2-Expression in Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen.** Durch die Kreuzung des *Pon2*<sup>-/-</sup> Stamms, welcher einen in den *Pon2*-Lokus eingebrachten, loxP-flankierten *gene trap* Vektor enthält (oben), mit einer *Tek-Cre*-exprimierenden Mauslinie (Mitte) wird eine gewebespezifische Deletion des für den *Pon2-knockout* verantwortlichen *gene trap* Vektors erzielt. Somit wird in den *Tek-Cre*<sup>+/-</sup> *Pon2*<sup>-/-</sup> Nachkommen eine Re-Expression von *PON2* spezifisch in Endothel- und hämatopoetischen Zellen etabliert.

Da der *gene trap* Vektor, welcher die *Pon2*-Defizienz im *Pon2*<sup>-/-</sup> Stamm bewirkt, von loxP-Sequenzen flankiert ist (siehe 3.10 und Abbildung 3-1), kann in diesem Mausmodell durch Kreuzung mit einer *Cre*-exprimierenden Mauslinie eine gewebespezifische Deletion dieses *knockout*-Fragments erzielt werden (Abbildung 4-2). Zur Endothel-spezifischen Rekombination wurde die *Pon2*<sup>-/-</sup> Linie mit *Tek*(*Tie2*)-*Cre*<sup>+/-</sup> Mäusen<sup>60</sup> verpaart. In den *Tek-Cre*<sup>+/-</sup> *Pon2*<sup>-/-</sup> Nachkommen sollte damit die Wiederherstellung der WT *PON2* Expression spezifisch in ECs erreicht werden. Da der Rezeptor-Tyrosinkinase (*Tek*, *Tie2*) Promotor nicht ausschließlich in ECs, sondern auch im hämatopoetischen Kompartiment aktiv ist,<sup>79</sup> ist neben der endothelialen *PON2* Re-expression ebenfalls eine gewisse Wiederherstellung der *PON2* Expression in hämatopoetischen Zellen zu erwarten (Abbildung 4-3).



**Abbildung 4-3: Das vaskuläre Expressionsprofil der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mauslinie.** Genotyp der Endothelzellen (EC), Blutzellen (BC) und der von Hepatozyten sekretierten Gerinnungsfaktoren (FII, FX etc.) im generierten *Tek-Cre*<sup>+/-</sup> *Pon2*<sup>-/-</sup> Mausstamm.

Die Nachkommen des angewendeten Kreuzungsschemas (siehe 3.10 und Abbildung 3-2) wurden zum Nachweis des Cre- und Pon2-Lokus genotypisiert (siehe 4.2.2, 4.2.3 und 4.2.7). Für die Analysen wurden Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> sowie als Kontrollen Tek-Cre<sup>+/-</sup> (Pon2<sup>+/+</sup>), Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäuse herangezogen. Zur Überprüfung der PON2 Re-Etablierung wurde sowohl die Pon2 mRNA Expression in isolierten ECs, Blutzellen (*blood cells*, BCs) und Leberlysaten mittels qRT-PCR bestimmt (siehe 4.2.7) als auch die PON2-Aktivität in Proteinlysaten aus isolierten ECs, BCs und der Leber gemessen (siehe 4.3.6).

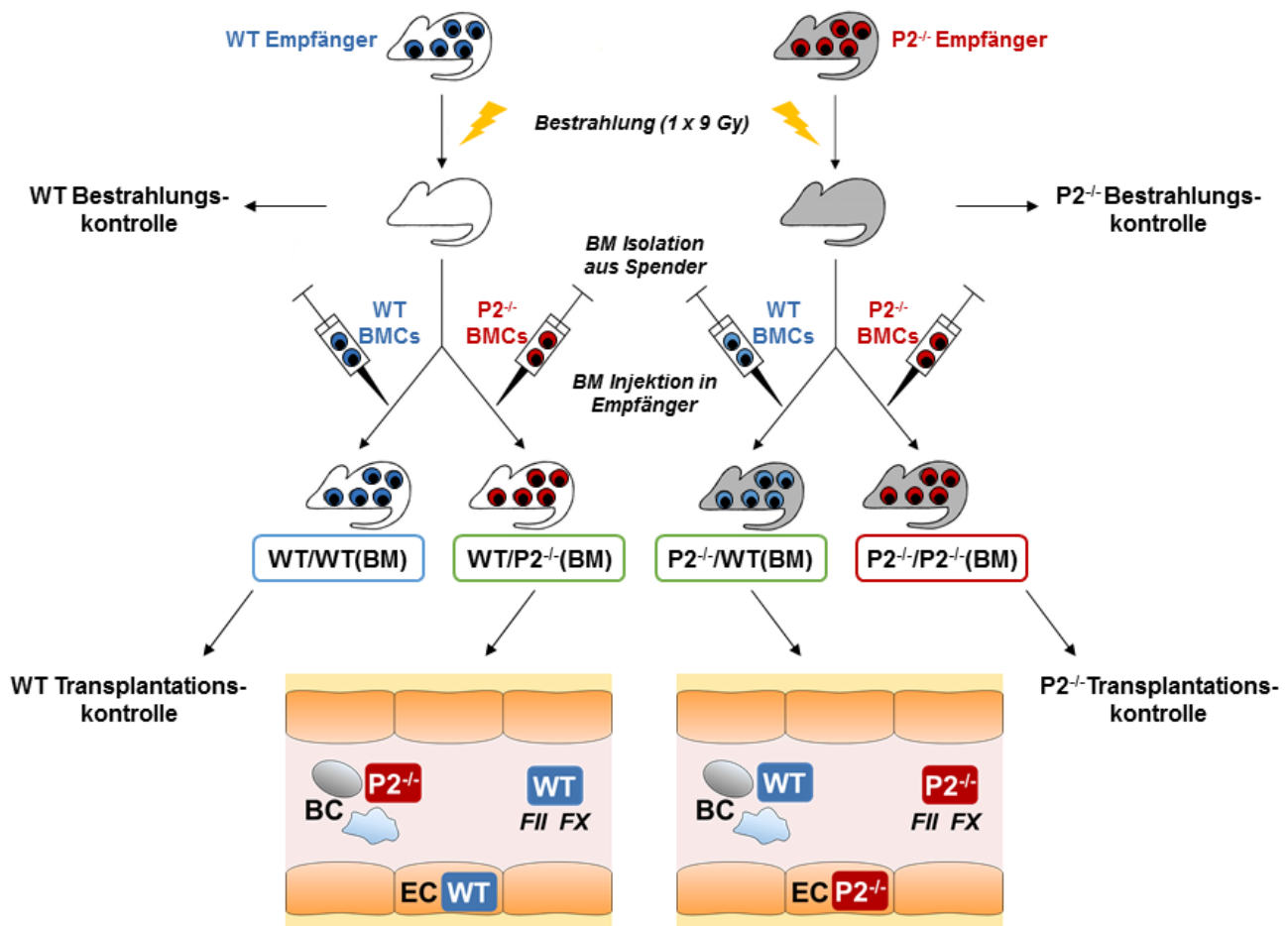
### 4.4.8 Knochenmarkstransplantation

Um die Funktion der Gefäßwand vs. der zirkulierenden Blutzellen, inklusiver der Thrombozyten, zu differenzieren, wurden allogene reziproke Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Übertragung von Knochenmarkszellen (*bone marrow cells*, BMCs) aus einer Spendermaus (Donor) in eine Empfängermaus (Rezipient), deren eigenes Knochenmark vor der intravenösen Injektion der Spender-BMCs durch eine letale Bestrahlungsdosis zerstört wurde. Dies ermöglicht es, Chimäre zu generieren, welche im hämatopoetischen (blutbildenden) System einen anderen Genotyp aufweisen als im restlichen Organismus.

Da die Bestrahlung der Empfängermaus mit einer letalen Strahlungsdosis die BMCs abtötet, wird das gesamte blutbildende System zerstört. Die Strahlenwirkung betrifft jede einzelne Zelle des Organismus. Das Knochenmark ist jedoch besonders radiosensitiv, da es eine hierarchische Proliferationsorganisation besitzt und sich beständig aus einer kleinen Population teilungsfähiger Stammzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, regeneriert.<sup>80</sup> Diese undifferenzierten multipotenten Stammzellen sind unter den Körperzellen die am strahlenempfindlichsten. Durch die anschließende Injektion der Donor-BMCs, repopulieren die Stammzellen des Spenders im Empfänger und erneuern somit dessen Hämatopoese (Donor-Hämatopoese). Dieses Anwachsen der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen wird als Engraftment bezeichnet.

Zur Isolation der BMCs wurden beide Femora- und Tibia-Knochen der Spendertiere entnommen und frei präpariert. Das Knochenmark wurde mithilfe einer 23G-Kanüle mit einer 2 ml Spritze und 4 ml eiskaltem RPMI/1x Penicillin-Streptomycin/0,1%BSA aus den Knochen herausgespült. Nachfolgend wurden die BMCs durch ein Zellsieb (*Cell-Strainer Cap*, 12x75 mm) vereinzelt und die dadurch präparierte Zellsuspension zweier Spendermäuse gleichen Genotyps vereinigt. Daraufhin wurden die BMCs bei 450 x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert und in DMEM

resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend gezählt und auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^7/\text{ml}$  eingestellt, um  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  DMEM i. v. verabreichen zu können. Die Empfängermäuse wurden 24 h vor der BMC Injektion in einer Vollschutzbestrahlungsanlage für Kleintiere (Cäsium-137 Quelle  $2 \times 60$  Tetrabecquerel) mit einer Dosis von 9 Gy bestrahlt. Die Injektion der BMCs ( $5 \times 10^6$  in  $100 \mu\text{l}$  DMEM) erfolgte i. v. in die Schwanzvene mittels 26G1/2-Kanüle und 1 ml Spritze nachdem die Empfänger für etwa 10 min unter einer Rotlichtlampe aufgewärmt wurden. Das Aufwärmen diente der Sichtbarmachung der Schwanzvenen. Ausgehend von den isolierten und vereinigten BMCs zweier Spender konnten 5-10 Rezipienten  $5 \times 10^7$  Zellen verabreicht werden.



**Abbildung 4-4: Der experimentelle Aufbau der Knochenmarkstransplantationen zur Generierung von WT und Pon2<sup>-/-</sup> Chimären.** Zur Transplantation von Knochenmark wurden WT und Pon2<sup>-/-</sup> (P2<sup>-/-</sup>) Empfängermäuse mit einer Dosis von  $1 \times 9$  Gy bestrahlt, wodurch ihr Knochenmark (*bone marrow*, BM) abgetötet wurde. Aus WT und Pon2<sup>-/-</sup> Spendertieren wurden Knochenmarkszellen (BMCs) isoliert und i. v. in die bestrahlten Empfänger injiziert. Somit wurden neben den 2 Bestrahlungskontrollgruppen, welche nur Medium erhielten, 4 unterschiedliche Gruppen transplantierte Mäuse generiert (Chimäre: WT/P2<sup>-/-</sup>(BM), P2<sup>-/-</sup>/WT(BM); Transplantationskontrollen: WT/WT(BM), P2<sup>-/-</sup>/P2<sup>-/-</sup>(BM)). Das vaskuläre Expressionsmuster der Chimären mit dem Genotyp der Endothelzellen (EC), Blutzellen (BC) und der von Hepatozyten sekretierten Gerinnungsfaktoren (FII, FX etc.) ist im unteren Teil dargestellt.

Auf diese Weise wurden sechs unterschiedliche Gruppen generiert (Abbildung 4-4). Zur Kontrolle der Bestrahlung wurden WT und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen nach erfolgter Bestrahlung ausschließlich DMEM i. v. verabreicht. Diese Bestrahlungskontrollen zeigten innerhalb der ersten zehn Tage deutliche Strahlenschäden, so dass sie gemäß dem Beurteilungssystem des Gesundheitszustands (siehe unten) abgetötet wurden. Um Effekte des Transplantationsverfahrens auf die Untersuchungen bestimmen und ausschließen zu können, wurden WT Mäusen WT BMCs und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen Pon2<sup>-/-</sup> BMCs transplantiert (Transplantationskontrollen). WT und Pon2<sup>-/-</sup> Chimäre wurden durch Knochenmarkstransplantation des reziproken Genotyps erhalten. Diese Chimären wiesen somit entweder Pon2<sup>-/-</sup> Blutzellen (BCs) im WT Hintergrund, inklusive eines WT Endothels und WT-abstammenden Gerinnungsfaktoren, oder WT BCs im Pon2<sup>-/-</sup> Hintergrund auf (Abbildung 4-4 unten).

Für die Beurteilung des Gesundheitszustandes aller Mäuse dieses Tierversuchs wurde ein etabliertes Bewertungsschema (Tabelle 4-7) nach Cooke et al.<sup>81</sup> verwendet. Die Tiere wurden innerhalb der ersten 10 Tage täglich und in den darauffolgenden Tagen alle 2 Tage auf die folgenden Parameter der *Graft-versus-Host-Reaktion* (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) untersucht: Beschaffenheit der Haut und des Fells, Körperhaltung, Aktivität und Gewicht. Mit einer Punkteskala von 0-2 Punkten pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10 Punkten. Nach den geltenden Richtlinien für einen angemessenen Umgang mit Tieren im Versuch wurden die Mäuse bei einem Wert von >6 durch Isofluran-Begasung narkotisiert und anschließend Genickbruch abgetötet.

**Tabelle 4-7: Bewertungsschema für die Beurteilung des Gesundheitszustands der Knochenmarkstransplantierten Tieren und Bestrahlungskontrollen.**

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0,5	Schuppung an Pfote und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	
1	Erythem an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch bei Bewegung	>50% des Beobachtungszeitraums keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1,5	offene Läsion	Struppiges Fell >50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	
2	multiple offene Läsionen	gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	keine Bewegung, auch nach Stimulation	>25% Gewichtsverlust

Nach 21 Tagen wurden die transplantierten Tiere für Analysen herangezogen. Das Engraftment wurde durch mRNA-Expressionsanalysen isolierter BCs überprüft. Dazu wurden die BCs, welche im Zuge der Plasmapräparation (siehe 4.4.2) gewonnen wurden, zur Lyse der Erythrozyten mit *Erythrocyte Lysis Buffer* behandelt (siehe 4.3.6) und mittels qRT-PCR Analysen (siehe 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6 und 4.2.7) auf die Pon2 mRNA-Expression analysiert. Zum Vergleich des Pon2-mRNA-Expressionslevels wurden Blutzellen untransplantierter Mäuse in diesen Analysen mitgeführt.

### **4.4.9 Hämatologische Analyse der Thrombozyten (Blutbild)**

Die Blutentnahme für die Bestimmung der Thrombozytenanzahl pro ml Blut (PLT) und des mittleren Thrombozytenvolumens (*mean platelet volume*, MPV) erfolgte mithilfe einer mit Citratlösung benetzter Spritze mit 26G Kanüle durch Herzpunktion an der Maus. Das entnommene Vollblut (ca. 100 µl) wurde in ein mit EDTA beschichtetes Reaktionsgefäß (Microvette® 500 K3E) überführt und mittels *Sysmex XP Haematology Analyzer* oder *HEMAVET 950FS* nach Angaben des Herstellers untersucht.

### **4.4.10 Messung der Thrombingenerierung in Plättchen-armem und Plättchen-reichem Plasma mittels *calibrated automated thrombography***

Zur Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Thrombozyten Physiologie & Dysfunktion / PD Dr. Kerstin Jurk / Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz *calibrated automated thrombography* (CAT)-Analysen in Plättchen-armem und Plättchen-reichem Plasma (*platelet poor plasma*, PPP; *platelet rich plasma*, PRP) durchgeführt (ausgeführt von PD Dr. Kerstin Jurk / Kathrin Schwierczek). Dazu wurde den Versuchstieren retroorbital Blut abgenommen und PPP sowie PRP wie in 4.1.2 beschrieben hergestellt. Mittels CAT wurde gemäß veröffentlichter Protokolle<sup>82, 83</sup> die Thrombingenerierung basal (durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup>) sowie zusätzlich induziert durch *Tissue Factor* (TF) oder Thrombin gemessen, wobei die Plasmaproben entweder mit Phospholipid-Vesikeln, Annexin V, anti-mouse TF Antikörper 21E10 oder FVIIai (*inhibitory factor VIIa*) behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Das endogene Thrombinpotential entspricht der AUC (*area under the curve*; Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) der Thrombinbildung.

#### **4.4.11 *In vivo* Biotinylierung zur Messung des Thrombozyten *turnovers***

Den kontinuierlichen Prozess der Thrombozyten-Degradation und den damit einhergehenden Ersatz durch neu gebildete Thrombozyten (*turnover*) wurde anhand der Zirkulationsdauer von biotinylierten Plättchen *in vivo* gemäß veröffentlichter Protokolle<sup>84, 85</sup> analysiert. Da Biotin an Oberflächenstrukturen von Blutplättchen, aber auch von anderen Blutzellen wie Erythrozyten, bindet, kann man durch die Applikation von Biotin die zirkulierenden Thrombozyten in der Maus markieren und unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Systems die Anzahl der biotinylierten Plättchen über einen längeren Zeitraum durch FACS-basierte Analysen von Blutproben bestimmen. Da murine Plättchen eine maximale Lebensdauer von fünf Tagen besitzen, wurden die Analysen über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt.

Zur *in vivo* Biotinylierung wurde den Versuchstieren 100 µl *sulfo-N-hydroxysuccinimide-long chain-biotin* Lösung (sulfo-NHS-LC-biotin, 30 mg/ml) mithilfe einer 26G-Kanüle i. v. in die Schwanzvene verabreicht. Eine halbe Stunde nach der Biotin-Injektion sowie in regelmäßigen Zeitabständen einmal pro Tag innerhalb der darauffolgenden 5 Tage wurde via Vena saphena Punktion ein geringes Blutvolumen (max. 10 µl) abgenommen. Die Quantität der biotinylierten Thrombozyten in den Blutproben, d. h. in der Zirkulation, zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mittels FACS-Analysen bestimmt. Dafür wurde die entnommene Blutprobe sofort in ein EDTA-Röhrchen überführt und mit 600 µl 2% FCS/PBS aufgefüllt. Daraufhin wurde die verdünnte Blutprobe weiter im Verhältnis 1:5 in 2% FCS/PBS verdünnt und zur Färbung mit APC-Cy7 Streptavidin (1:250) sowie mit FITC anti-CD41 (1:500) versetzt. Anti-CD41 diene als Plättchenmarker; Streptavidin zum Nachweis der Biotin-markierten Zellen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C im Dunklen wurden die Zellen in 2% FCS/PBS gewaschen und am FACSCanto™ II Durchflusszytometer bei folgenden Excitations-/Emissionswellenlängen gemessen: FITC anti-CD41: 488/516 nm; APC-Cy7 Streptavidin: 633/774 nm. Zur Auswertung wurden der an den jeweiligen Tagen gemessene Anteil der detektierten CD41<sup>+</sup>/Streptavidin<sup>+</sup> Zellen auf den Ausgangswert, d. h. auf den Anteil der doppelpositiven Zellen der ersten Messung, bezogen.

## 4.5 Statistik

Zur Erstellung der im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen wurden die Programme GraphPad Prism, SPSS Statistics, QuantityOne (Biorad) und ZEN2011 (Zeiss) verwendet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte durch das Programm GraphPad Prism. Dabei wurde für den Vergleich zweier Gruppen der t-Test (bei angenommener Normalverteilung mit einer Schiefe $<1$ ) oder der Mann-Whitney Test (bei angenommener Nicht-Normalverteilung mit einer Schiefe $>1$ ) angewendet. Zur statistischen Analyse von mehr als zwei Gruppen wurde der 1-way ANOVA mit *Bonferroni's multiple comparison test* oder der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* berechnet. Zur Bestimmung exakter p-Werte im 1-way ANOVA wurden sog. eingestellte p-Werte für jeden Vergleich innerhalb des multiplen Vergleichstests bestimmt (*multiplicity adjusted p values*). Die jeweils durchgeführten Statistiktests sind in den Abbildungslegenden aufgeführt.  $P < 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Sofern nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse mit Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Adobe Photoshop wurde optional für die Bildbearbeitungen verwendet, wobei (falls notwendig) Helligkeit und / oder Kontrast simultan für alle Bereiche eines Blots bzw. einer mikroskopischen Aufnahme geändert wurde.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Pon2-Defizienz verursacht eine beschleunigte Gerinnung

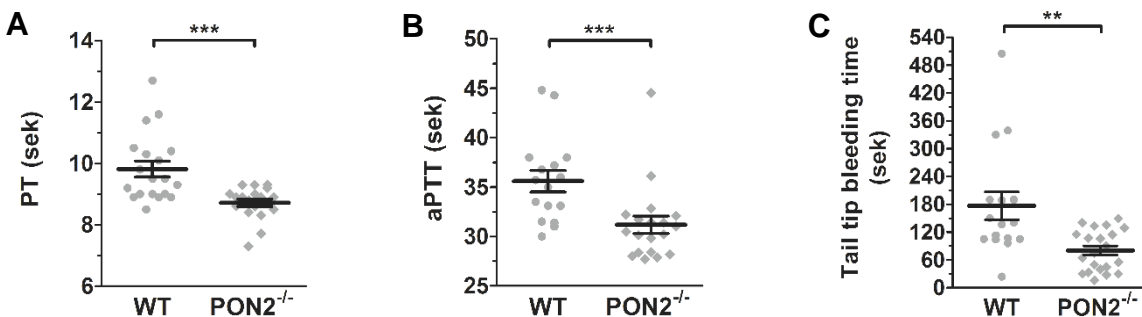
Eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre wies PON2 eine protektive Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen nach. Anhand von Untersuchungen von Patientenmaterial, Mausmodellen und in Zellkulturstudien wurde gezeigt, dass PON2 vor Arteriosklerose schützt.<sup>51-53</sup> Da eine verstärkte Blutgerinnung das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen substanziell erhöht (siehe 1.3) und demnach PON2 in der Regulation der Hämostase involviert sein könnte, wurde in dieser Arbeit erstmals die Auswirkung der Pon2-Defizienz *in vivo* auf die Blutgerinnung untersucht. Um zu prüfen, ob eine veränderte Blutgerinnung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber dem WT vorliegt, wurde die Gerinnungszeit der Versuchstiere quantifiziert. Dazu wurde unter Berücksichtigung des komplexen Zusammenspiels der verschiedenen Komponenten des hämostatischen Systems (siehe 1.1.3) sowohl die plasmatische Gerinnung als auch die gesamtheitliche Gerinnung, welche durch die Interaktion der Plasmafaktoren mit den vaskulären Zellen und Blutzellen vermittelt wird, analysiert (siehe 5.1.1). Darüber hinaus wurde die Aktivität und Konzentration einzelner plasmatischer Gerinnungsfaktoren erfasst (siehe 5.1.2 und 5.1.3).

#### 5.1.1 Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen verkürzte Gerinnungszeiten

Da das plasmatische Gerinnungssystem über zwei verschiedene Reaktionswege ausgelöst wird (siehe 1.1.2) wurde die Aktivität beider Wege, d.h. die Aktivität des extrinsischen und des intrinsischen Aktivierungswegs, analysiert. Die Untersuchung der extrinsischen Gerinnung, die durch *Tissue Factor* (TF) induziert wird, erfolgte durch die Bestimmung der Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT). Dazu wurde durch die Zugabe von TF und Ca<sup>2+</sup> zum Plasma, welches aus Citrat-Vollblut von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen präpariert wurde, der extrinsische Weg aktiviert und die Zeit bis zum Einsetzen der Fibrinbildung gemessen. Zur Untersuchung des intrinsischen Reaktionswegs diente die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT). Hierbei induzierte die Zugabe von Ca<sup>2+</sup> zum mit oberflächenaktiven Substanzen (u. a. Phospholipide) vorinkubierten Plasma den intrinsischen Weg über die Kontaktaktivierung von FXII, wobei ebenfalls die Messung der Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung des Plasmas erfolgte. Somit wurde anhand der PT-Messung die Funktion und

Konzentration der Faktoren VII, V, X, II sowie Fibrinogen und anhand des aPTT-Tests die der Faktoren XII, XI, IX, VIII, V, X, II sowie Fibrinogen erfasst. Außerdem waren beide angewendeten Gerinnungszeitmessungen sensitiv gegenüber der Aktivität und Menge der im Plasma vorhandenen Inhibitoren und fibrinolytischen Faktoren.

Sowohl die PT als auch die aPTT war in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erniedrigt im Vergleich zu WT Mäusen (Abbildung 5-1 A-B). Demnach kommt es durch Pon2-Defizienz *in vivo* bei Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade über den extrinsischen und über den intrinsischen Weg zu einer signifikant schneller einsetzenden Fibrinbildung gegenüber der WT Situation.



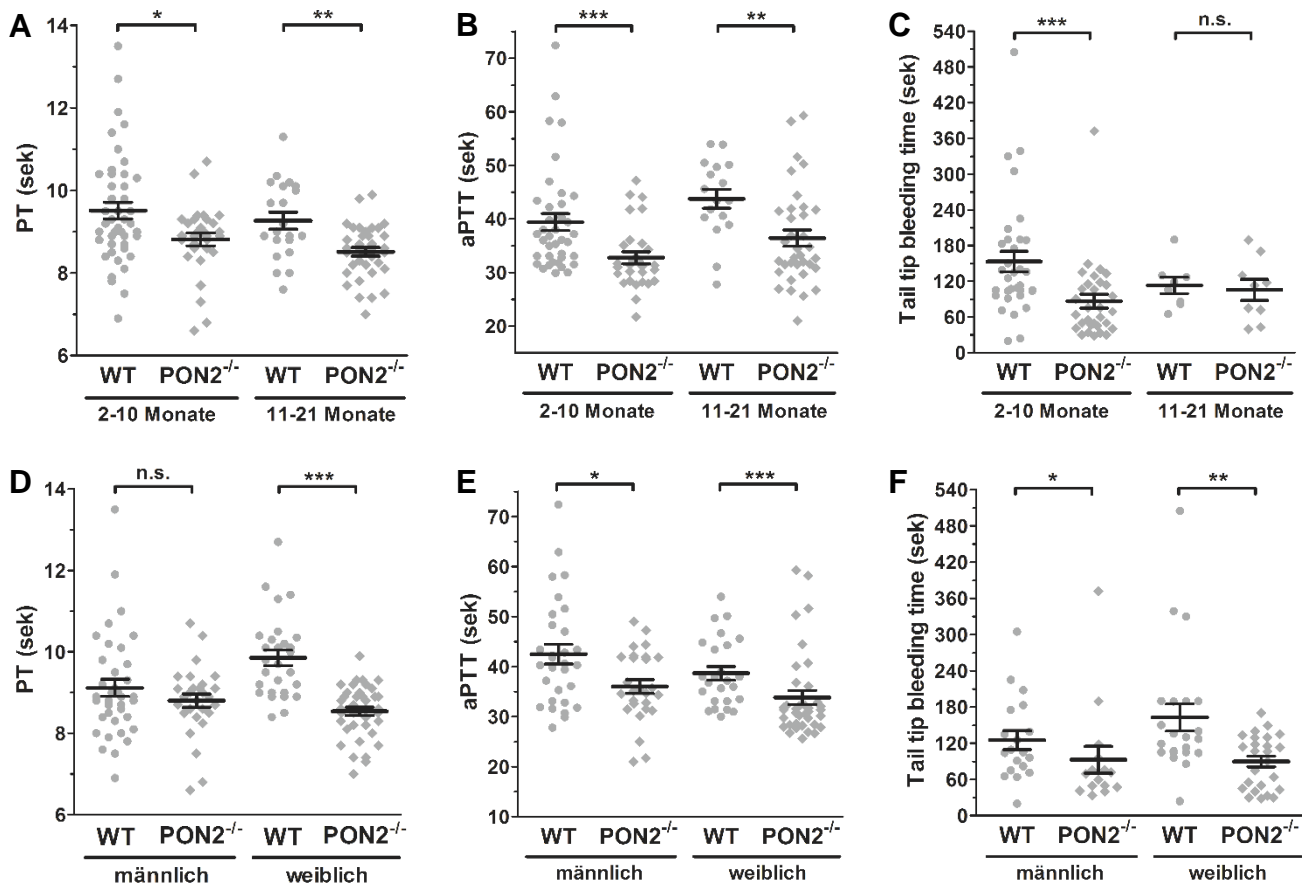
**Abbildung 5-1: Die Gerinnungszeit von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen ist im Vergleich zu WT Kontrollen verkürzt.** Aus Citrat-Vollblut von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde das Plasma präpariert und die **(A)** Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT) und **(B)** aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) durch Zugabe von gerinnungsaktivierenden Substanzen (PT: *Tissue Factor* / Aktivierung des extrinsischen Weges; aPTT: Silikon-dioxidpartikel, Phospholipide und Ca<sup>2+</sup> / Aktivierung des intrinsischen Weges) gemessen (n=16-19). \*\*\* p<0,0008; Mann Whitney Test. **(C)** Die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) wurde durch Abtrennen des distalen, 10 mm langen Teils der Schwanzspitze und Messung der Blutungsdauer in 37°C warmer NaCl-Lösung bis zum Einsetzen des Blutungsstopps bestimmt (n=16-21). \*\* p=0,0041; Mann Whitney Test. Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM.

Zusätzlich zur Quantifizierung der plasmatischen Gerinnungszeiten wurde durch die Bestimmung der Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) ein ganzheitlicher Messansatz gewählt, mit dem die durch alle hämostaseologischen Komponenten vermittelte Blutgerinnung überprüft werden konnte. Diese Messmethode, bei der die Blutungsdauer nach Abtrennung des distalen, 10 mm langen Teils der Schwanzspitze bis zur Blutungsstillung bestimmt wurde, erfasste also sowohl die plasmatischen als auch die zellulären Elemente der Hämostase. Die Ermittlung der *tail tip bleeding times* der analysierten Versuchstiere ergab eine signifikant verkürzte Blutungszeit der Schwanzvene im Falle von Pon2-Defizienz im Vergleich zum WT (Abbildung 5-1 C). Die Blutungszeit der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse betrug im Mittel nur etwa die Hälfte des anhand der WT Mäuse gemessenen Referenzwerts.

Diese Ergebnisse stützen die Befunde der plasmatischen Gerinnungszeitmessungen und belegen damit eine beschleunigte Blutgerinnung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen. Da die Differenz der Blutungszeit der Schwanzvene zwischen Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen deutlich größer ausfiel als die Differenz der PT sowie der aPTT zwischen Pon2<sup>-/-</sup> und WT, ist außerdem davon auszugehen, dass neben plasmatischen auch zelluläre Effekte maßgeblich zum pro-koagulatorischen Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Tiere beitragen. Des Weiteren wurden hiermit die Befunde der vorangegangenen Diplomarbeit (Julia Ebert, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Februar 2013) in der Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege / PD Dr. Sven Horke / Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz bestätigt. Die aus der Diplomarbeit hervorgegangenen PT, aPTT und *tail bleeding* Messergebnisse wurden in die hier gezeigten Analysen aufgenommen und um weitere Messungen zur Erhöhung der Stichprobenzahl erweitert (Abbildung 5-1).

Um zu überprüfen, ob der Gerinnungsphänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse in Abhängigkeit zu den eventuellen Einflussfaktoren Alter und Geschlecht steht, wurden die Daten der Gerinnungszeitmessungen (PT, aPTT, *tail tip bleeding time*) in Subgruppen analysiert. Die Messdaten aller analysierten Versuchstiere wurden für beide Genotypen zum einen nach dem Alter (2-10 Monate vs. 11-21 Monate, Abbildung 5-2 A-C) und zum anderen nach dem Geschlecht (Abbildung 5-2 D-F) unterschieden.

Der signifikant pro-koagulatorische Effekt trat sowohl in jungen als auch in alten Versuchstieren auf (Abbildung 5-2 A-C). Eine Ausnahme bildete jedoch die Blutungszeit der Schwanzvene der 11-21 Monate alten Tiere, welche im Gegensatz zur PT und aPTT zwischen Pon2-defizienten und WT Versuchstieren keinen signifikanten Unterschied zeigte (Abbildung 5-2 C). Generell ist das Messergebnis der *tail bleeding* Methode starker Variation unterworfen, was diesen Assay anfälliger für individuelle Schwankungen und weniger sensitiv gegenüber dem Identifizieren von Unterschieden zwischen den verschiedenen Gruppen machte. Die zur Kompensation benötigte hohe Stichprobenzahl für die *tail bleeding* Messung wurde für die Gruppen der 11-21 Monate alten Mäuse nicht erreicht, so dass abschließend keine Differenz festgestellt werden konnte. Da bereits junge Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse den pro-koagulatorischen Phänotyp zeigten, wurden 8-14 Wochen alte Versuchstiere für die Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzt.



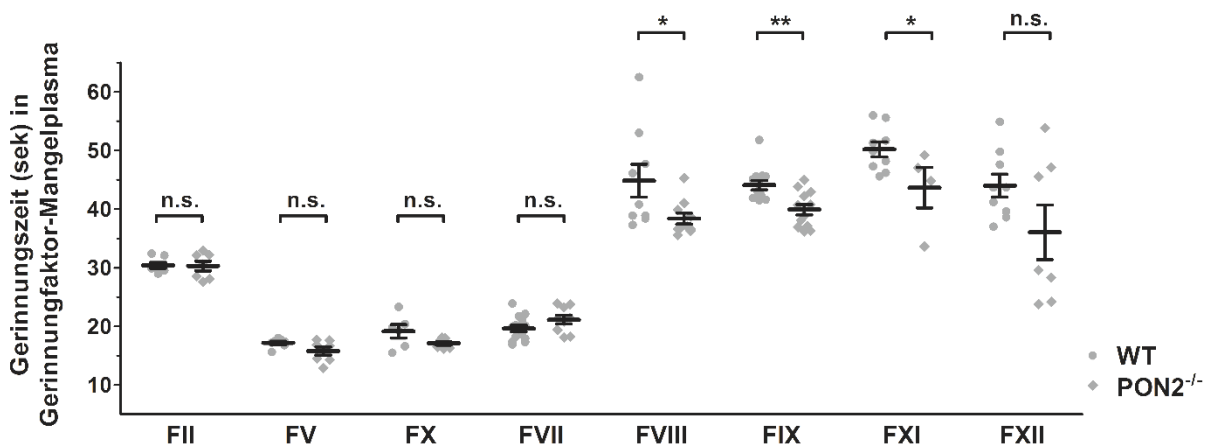
**Abbildung 5-2: Der Phänotyp der beschleunigten Blutgerinnung ist bei weiblichen Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT stärker ausgeprägt als männlichen Mäusen und ist unabhängig vom Alter der Versuchstiere.** Die gemessene Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) und die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) der Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäuse wurden nach (A-C) dem Alter (2-10 Monate alt vs. 11-21 Monate alt) und (D-E) dem Geschlecht der Versuchstiere subgruppiert (n=8-44). Die Gerinnungszeitmessungen erfolgen wie in Abbildung 5-1 beschrieben. Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM. \*\*\* p≤0,0007 \*\* p≤0,0090; p≤0,0440; n.s., nicht signifikant; Mann Whitney Test.

Die Subgruppenanalyse nach dem Geschlecht der Versuchstiere ergab, dass die Differenz der Gerinnungszeit zwischen beiden Genotypen in weiblichen Mäusen größer war als bei männlichen Versuchstieren. Für männliche Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte sich eine tendenziell erniedrigte PT und statistisch signifikant verminderte aPTT und *tail tip bleeding time*, diese Unterschiede waren jedoch weniger stark ausgeprägt als die der weiblichen Mäuse (Abbildung 5-2 D-E). Worauf der geschlechtsspezifische Unterschied beruht, bleibt an dieser Stelle offen und sollte in zukünftigen Untersuchungen ergründet werden.

Auf der Grundlage der alters- und geschlechtsspezifischen Datenanalyse wurden für alle Studien dieser Arbeit weibliche, 8-14 Wochen alte Mäuse herangezogen. Demzufolge sind auch in Abbildung 5-1 die Gerinnungszeiten weiblicher, junger Pon2<sup>-/-</sup> vs. WT Mäuse dargestellt.

### 5.1.2 $Pon2^{-/-}$ Mäuse zeigen erhöhte Gerinnungsfaktor-Aktivitäten

Um die Aktivität einzelner Gerinnungsfaktoren zu überprüfen, wurden PT und aPTT Gerinnungszeitmessungen in Gerinnungsfaktor-Mangelplasmen durchgeführt. Dafür wurde das Plasma von  $Pon2^{-/-}$  bzw. WT Mäusen in Mangelplasma verdünnt, welches für den zu analysierenden Gerinnungsfaktor defizient war. Dieser Test spiegelte daher die Aktivität des im Maus-Plasma enthaltenen Faktors wider und ließ auf eine verstärkte (verkürzte Gerinnungszeit im Mangelplasma) oder erniedrigte (verlängerte Gerinnungszeit im Mangelplasma) Gerinnungsfaktoraktivität im Vergleich zur WT Kontrolle schließen.



**Abbildung 5-3: Gerinnungsfaktoren des intrinsischen plasmatischen Aktivierungsweges weisen in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen eine erhöhte Aktivität auf.** Aus Citrat-Vollblut von  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen wurde das Plasma präpariert, mit Gerinnungsfaktor-spezifischem Mangelplasma versetzt und die Gerinnungszeit mittels PT (FII, FV, FVII, FX) bzw. aPTT (FVIII, FIX, FXI, FXII) gemessen, was die Aktivität des jeweiligen Faktors widerspiegelt (n=6-14). Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\* p=0,0019, \* p $\leq$ 0,047; n.s., nicht signifikant; t-Test.

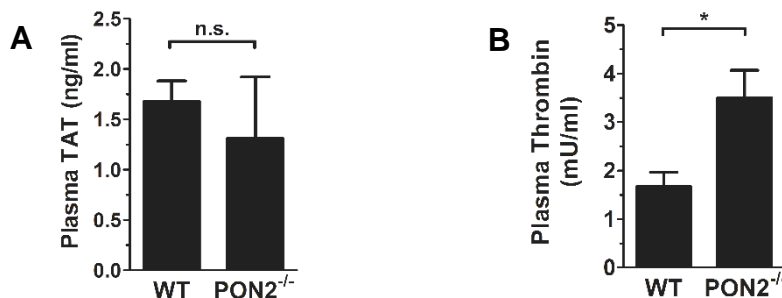
Die Gerinnungszeit im FII- und FVII-Mangelplasma war in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen gegenüber dem WT unverändert (Abbildung 5-3). Dies schließt eine gesteigerte Aktivierung und einen übermäßigen Verbrauch dieser Gerinnungsfaktoren aus. Im Gegensatz dazu zeigten die intrinsischen Gerinnungsfaktoren FVIII, FIX und FXI eine signifikant erhöhte Aktivität in  $Pon2^{-/-}$  vs. WT Mäusen (Abbildung 5-3). Außerdem wurde eine tendenziell gesteigerte Aktivität für FXII des intrinsischen Wegs und FV und FX des gemeinsamen Wegs festgestellt (FXII: p=0,108; FV: p=0,092; FX: p=0,090). Demzufolge geht die  $Pon2^{-/-}$ -vermittelte Hyperkoagulabilität mit einer erhöhten Aktivität und einem verstärkten Verbrauch von Faktoren und Kofaktoren des intrinsischen Gerinnungssystems einher.

### 5.1.3 Pon2-Defizienz verursacht eine Erhöhung der plasmatischen Thrombin-Konzentration

In Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen kommt es im Vergleich zum WT nach Gerinnungsaktivierung zu einer beschleunigten Fibrinbildung und einer schnelleren Blutungsstillung (siehe 5.1.1). Um zu überprüfen, ob auch unter basalen Bedingungen Thrombin im Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt vorliegt, wurden zwei verschiedene Messungen zur Quantifizierung der plasmatischen Thrombin-Konzentration durchgeführt.

Zunächst wurde die plasmatische Thrombin-Konzentration anhand des Nachweis von Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) mittels ELISA bestimmt. Da diese Komplexe während der Inhibition von Thrombin durch den plasmatischen Thrombin-Inhibitor Antithrombin III (AT III) entstehen, dient in diesem Assay TAT als Surrogat-Marker für Thrombin. Die plasmatische TAT-Konzentration im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma zeigte keine Veränderung gegenüber den WT Kontrollen (Abbildung 5-4 A), was auf einen unveränderten Thrombin-Plasmalevel unter basalen Bedingungen hinweist.

Zusätzlich zum TAT-ELISA wurde eine direkte Quantifizierung des funktional aktiven Thrombins im Plasma durchgeführt. Hierzu wurde eine Oligonukleotid-basierte Enzymaktivitätsmessmethode eingesetzt, welche auf der hoch affinen Bindung von im Plasma enthaltenen Thrombin an ein DNA-Aptamer und dem Umsatz eines fluorogenen Substrats durch Thrombin beruht. Anhand des gemessenen Fluoreszenzsignals wurde der Substratumsatz quantifiziert und damit auf die Konzentration von aktivem Thrombin im Plasma zurückgeschlossen. Es ergab sich hierdurch ein signifikant erhöhter Level an aktivem Thrombin unter basalen Bedingungen im Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT Plasma (Abbildung 5-4 B).



**Abbildung 5-4: Trotz einer unveränderten Konzentration plasmatischer Thrombin-Antithrombin-Komplexe liegt im Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt aktives Thrombin vor. (A)** Aus Citrat-Vollblut von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde Plasma gewonnen und mittels ELISA auf die Konzentration von im Plasma enthaltenen Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) untersucht (n=2-3). N.s., nicht signifikant; t-Test. **(B)** Außerdem wurde mittels Fluoreszenz-basierter Aktivitätsmessung die Konzentration von aktivem Thrombin im Pon2<sup>-/-</sup> und WT Plasma anhand des Thrombin-vermittelten Substratumsatzes quantifiziert (n=2-3). \* p=0,0138; t-Test. Mittelwert ± SEM.

Da die Thrombin-Aktivität stark durch die inhibitorische Komplexbildung mit AT III kontrolliert wird und es somit im Zuge der Thrombin-Aktivierung zur TAT-Formation kommt, korrelieren die Messgrößen TAT und Thrombin-Aktivität generell miteinander.<sup>86</sup> Dass hier jedoch im Plasma der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse ein gegenüber dem WT Plasma unveränderter TAT-Level aber eine erhöhte Konzentration an aktivem Thrombin gemessen wurde, könnte auf die unterschiedlichen Halbwertszeiten von TAT und Thrombin im Plasma zurückzuführen sein. TAT hat im Vergleich zu Thrombin eine längere Halbwertszeit und reflektiert daher die durchschnittliche Thrombin-Generierung über einen längeren Zeitraum, während die Thrombin-Aktivitätsmessung eine akkuratere Bestimmung des aktuellen Gerinnungsstatus aufzeigt.<sup>86</sup> Demzufolge scheint in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT eine erhöhte lokale und spontane Gerinnungsneigung vorzuliegen, welche sich nicht auf die totale TAT-Konzentration im Plasma auswirkt. Ob tatsächlich unter basalen Bedingungen der Thrombin-Level im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma erhöht ist, lässt sich anhand der Thrombin-Aktivitätsmessung nicht sicher nachweisen, da die Blutentnahme per se die Gerinnung induziert haben könnte. Dennoch lässt sich schlussfolgern, dass im Pon2-defizienten Status basal und / oder induziert durch einen lokalen Stimulus eine stärkere pro-thrombotische Situation vorliegt als beim WT.

## **5.2 Pon2-defiziente Endothelzellen weisen oxidativen Stress auf und sind pro-inflammatorisch**

Aus früheren Studien ging hervor, dass die anti-arteriosklerotische Wirkung von PON2 auf eine Förderung des Cholesterin-Efflux aus Makrophagen sowie eine Erhöhung des anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Potentials von HDL zurückzuführen ist.<sup>52</sup> Da PON2 jedoch nicht auf HDL oder LDL Partikeln vorkommt und somit diese nur indirekt beeinflusst und weil neben Plasmalipoproteinen und Makrophagen insbesondere die Gefäßwand maßgeblich zur Atherogenese beiträgt, wurde von Horke et al. der Mechanismen der anti-arteriosklerotischen Wirkung von PON2 in humanen Gefäßzellen untersucht. Aus dieser Studie ging hervor, dass PON2 in allen Zelltypen der Gefäßwand exprimiert wird und dort einen endogenen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress vermittelt, was möglicherweise entscheidend zur anti-arteriosklerotischen Wirkung von PON2 beiträgt.<sup>21</sup> Weil insbesondere die durch oxidativen Stress induzierte, pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigt, liegt die Vermutung nahe, dass PON2 über anti-oxidative und anti-

inflammatorische Prozesse im Endothel vor kardiovaskulären Pathologien schützen kann. Die vorherigen Ergebnisse (siehe 5.1) wiesen deutlich darauf hin, dass PON2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Blutgerinnung einnimmt. Daher wurden im Folgenden die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Entzündungsprozesse sowie die Funktion des Endothels in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen als mögliche zugrundeliegende Mechanismen für die erhöhte Gerinnungsneigung analysiert.

### **5.2.1 Pon2-Defizienz verursacht im Gefäß und in Endothelzellen eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies**

Diverse Studien zeigten, dass PON2 ein Membran-gebundenes Protein ist, hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisiert ist und die ROS-Produktion vermindert.<sup>21, 37, 39, 40</sup> Diese anti-oxidative Funktion der PON2 wurde *in vitro* für diverse Zelltypen nachgewiesen, u. a. in humanen Endothelzellen (ECs) nach Behandlung mit ROS-induzierenden Substanzen.<sup>21</sup> Bislang wurde dies jedoch nicht *in vivo* für das Gefäßsystem unter Abwesenheit ROS-induzierender Stimuli untersucht. Da oxidativer Stress das Thrombose-Risiko erhöht<sup>30</sup> und ein basal erhöhter ROS-Gehalt die Ursache der verstärkten Blutgerinnung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse darstellen könnte, wurde überprüft, ob in vaskulären Zellen und spezifisch in ECs des Pon2-defizienten Mausmodells ein erhöhtes Maß an ROS vorliegt.

Da es galt, die basalen ROS-Level unter ungestressten Bedingungen in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT zu bestimmen und daher eher geringere Unterschiede zu erwarten waren als dies z. B. in Zellkultur-Versuchen nach ROS-Induktion der Fall ist, wurden für diese Untersuchungen vier unterschiedliche und hoch-sensitive experimentelle Ansätze gewählt, um eventuelle Messungenauigkeiten zu kompensieren. Die Befunde der vorangegangenen Diplomarbeit (Julia Ebert, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Februar 2013) innerhalb der Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege / PD Dr. Sven Horke / Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz zeigten bereits, dass in vaskulären Zellen der Aorta aus Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen erhöhte ROS-Level vorliegen. Diese Ergebnisse, welche durch die vorliegende Arbeit verifiziert und um endothelspezifische Messungen erweitert wurden, wurden in die im Folgenden gezeigten Untersuchungsergebnisse aufgenommen (Abbildung 5-5).

Zur ROS-Detektion in der Gefäßwand wurden Gefrierschnitte von Aorten, welche aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und vom umgebenden Fettgewebe freipräpariert wurden, angefertigt und

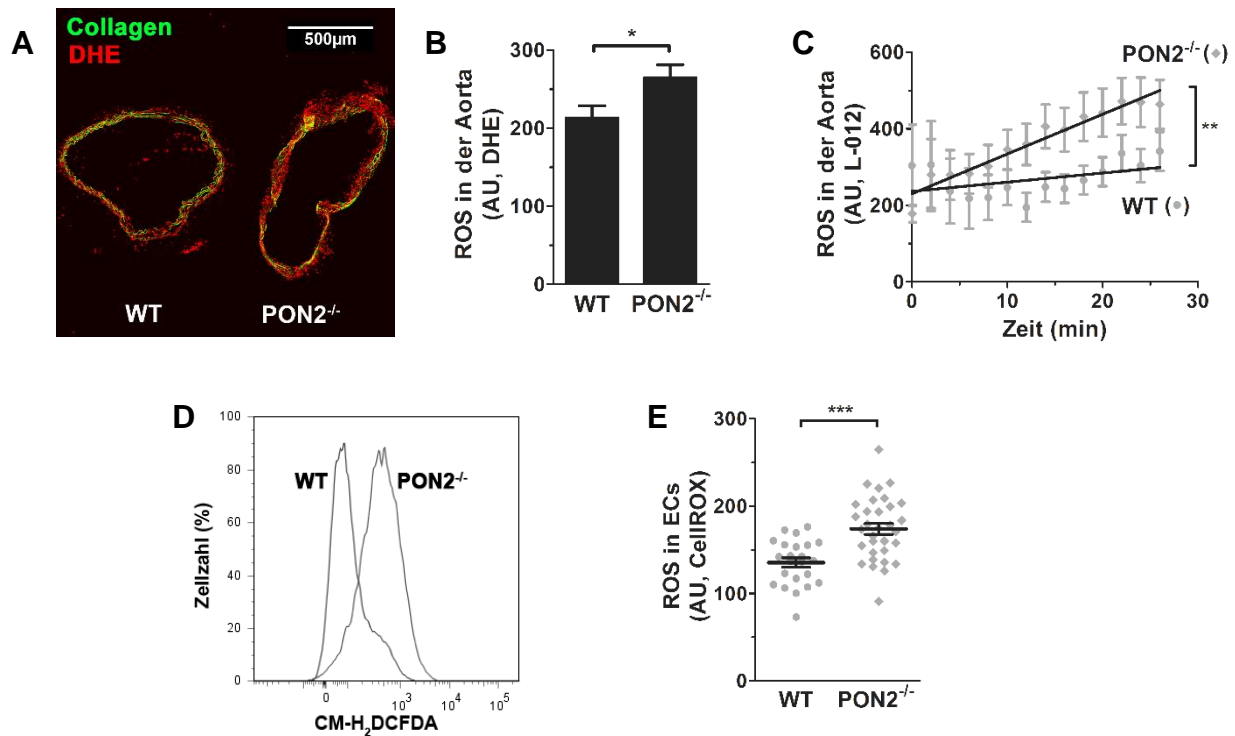


mit Dihydroethidium (DHE) gefärbt. Im Gegensatz zu anderen ROS reagiert Superoxid mit DHE zum spezifischen Oxidationsprodukt 2-Hydroxyethidium, das in die DNA interkaliert und nach Anregung in einem bestimmten Wellenlängenbereich Fluoreszenz emittiert (siehe 4.1.7). Dies ermöglicht die spezifische Detektion von Superoxid, welche hier mittels Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte. Die Färbung und die Fluoreszenzmessung der zu vergleichenden Präparate erfolgte auf dem jeweils selben Objektträger und wurde simultan durchgeführt, um exakt gleiche Messbedingungen für die Analyse beider Gruppen zu gewährleisten. Zur Orientierung wurde zusätzlich die Autofluoreszenz der Collagenfasern aufgenommen. Die Quantifizierung der konfokalen Aufnahmen ergab einen signifikant erhöhten Superoxid-Gehalt im vaskulären Gewebe von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber der WT Kontrolle (Abbildung 5-5 A-B).

Die erhöhte Superoxid-Produktion in der Pon2-defizienten Gefäßwand wurde mittels Chemilumineszenz-basierter Untersuchung von frisch isolierten Aortenringen bestätigt (Abbildung 5-5 C). Hierbei wurde zur Superoxid- bzw. ROS-Detektion das Luminol-Derivat L-012 eingesetzt, das durch Reaktion mit Superoxid bzw. ROS zur Chemilumineszenz angeregt wird (siehe 4.1.8). Die anhand des Chemilumineszenzsignals gemessene Superoxid-Produktion über die Zeit war in Pon2<sup>-/-</sup> Aortenringen gegenüber der Kontrolle erhöht.

Zudem wurden aus isolierten Aorten von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Tieren Einzelzellsuspensionen hergestellt und der ROS-Level der makrovaskulären Zellen mittels des fluoreszierenden ROS-Indikators CM-H<sub>2</sub>DCFDA durchflusszytometrisch bestimmt. Ein deutlicher Rechtsverschiebung der Fluoreszenzverteilung wies ebenfalls auf eine erhöhte ROS-Produktion in vaskulären Zellen der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse hin (Abbildung 5-5 D).

Um den ROS-Level spezifisch in ECs zu bestimmen, wurden mikrovaskuläre ECs aus der Lunge von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mittels anti-ICAM-2 / anti-CD31 Antikörper-vermittelter Selektion isoliert (siehe 4.1.1, Abbildung 4-1 A) und mit dem ROS-sensitiven Farbstoff CellROX-DeepRed gefärbt, welcher infolge ROS-vermittelter Oxidation Fluoreszenz emittiert. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ergab eine verstärkte ROS-Bildung in Pon2<sup>-/-</sup> ECs (Abbildung 5-5 E).



**Abbildung 5-5: Die Gefäßwand und das Endothel von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen basal gegenüber dem WT erhöhte ROS-Level.** (A) Gefrierschnitte der Aorta von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden mit Dihydroethidium (DHE) gefärbt und mittels LSM auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion untersucht (rot: DHE; grün: Autofluoreszenz der Collagenfasern; Maßstabsleiste=500µm). Repräsentative konfokale Aufnahme. (B) Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität pro Fläche der aortalen Gefrierschnitte (n=19 von 3 Mäusen pro Gruppe). Mittelwert ± SEM. \* p=0,0302; t-Test. (C) Frisch präparierte Aortenringe von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden mit L-012 beladen und die ROS-Formation anhand der L-012-Chemiluminesz über die Zeit gemessen. Der Graph zeigt eine von 5 durchgeführten Messungen mit jeweils 1 Maus pro Gruppe. Mittelwert ± SEM. Die Steigung der linearen Regression (durchgezogene Linien) war signifikant unterschiedlich, \*\* p=0,0053. (D) Aortale Zellen aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden mit 7-AAD (Zelltodmarker) und CM-H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt. Mittels FACS wurden die Intensität der CM-H<sub>2</sub>DCFDA-Fluoreszenz der 7-AAD-negativen Zellen bestimmt. Das Histogramm zeigt eine von 2 durchgeführten Messungen mit jeweils 1 Maus pro Gruppe. (E) Isolierte ECs aus der Lunge wurden mit Lectin-FITC (EC-Marker) und CellROX-DeepRed gefärbt und mittels LSM auf die ROS-Produktion anhand der CellROX-Fluoreszenzintensität in Lectin-positiven Zellen untersucht (n=22-23 von 2-3 Mäuse pro Gruppe). Mittelwert ± SEM. \*\*\* p=0,0001; t-Test.

Zusammenfassend belegten vier unabhängige methodische Ansätze, dass unter basalen Bedingungen Pon2-defiziente vaskuläre Zellen sowie im Speziellen Pon2-defiziente ECs mehr ROS produzieren als WT Kontrollen.

## 5.2.2 Die erhöhte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und die verringerte Expression gerinnungshemmender Faktoren im Endothel von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen

Da eine erhöhte ROS-Produktion pro-inflammatorisch wirkt und vaskuläre Entzündungsprozesse die Gerinnung fördern,<sup>41, 87, 88</sup> wurde geprüft, ob im Endothel von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen eine veränderte Expression von inflammatorischen Mediatoren vorliegt. Dazu wurde das mRNA-Expressionsprofil von Pon2<sup>-/-</sup> ECs analysiert und mit dem von WT ECs verglichen.

Mithilfe eines qRT-PCR Arrays wurde die endotheliale mRNA-Expression von über 90 Faktoren untersucht, welche in die Genregulation, endotheliale Funktion, Adhäsion, Apoptose, Inflammation und Gerinnung involviert sind. Hierzu wurden zunächst makrovaskuläre ECs herangezogen, die aus der Aorta der Versuchstiere mittels Lectin-/CD31-vermitteltem FACS-*sorting* isoliert wurden (siehe 4.1.1, Abbildung 4-1 D). Anhand der Ergebnisse des qRT-PCR Arrays stellte sich heraus, dass eine Reihe pro-inflammatorischer Mediatoren in Pon2<sup>-/-</sup> ECs relativ zu WT ECs differentiell exprimiert werden. So waren bezogen auf die WT Kontrollen Cxcl1 (Kc; murines Il-8 Homolog), Il-6, E-Selektin und Vcam-1 in Pon2<sup>-/-</sup> ECs 1,5 bis 3-mal stärker exprimiert (Abbildung 5-6).

Zusätzlich zur Analyse des Expressionsprofils von isolierten ECs wurden Leber-Proben von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen lysiert und für den gleichen qRT-PCR Array eingesetzt. Diese Gesamt-Leber-Lysate waren zum einen reich an ECs und ermöglichten es außerdem, die hepatische Expression der Gerinnungsfaktoren zu analysieren. Während sich die mRNA-Expression der Gerinnungsfaktoren als unverändert erwies, zeigte sich auch hier eine verstärkte Expression pro-inflammatorischer Faktoren in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber dem WT; darunter Cxcl1, Cxcr1, C5ar1 (Complement Faktor C5a Rezeptor) und Il-6 (Abbildung 5-7).

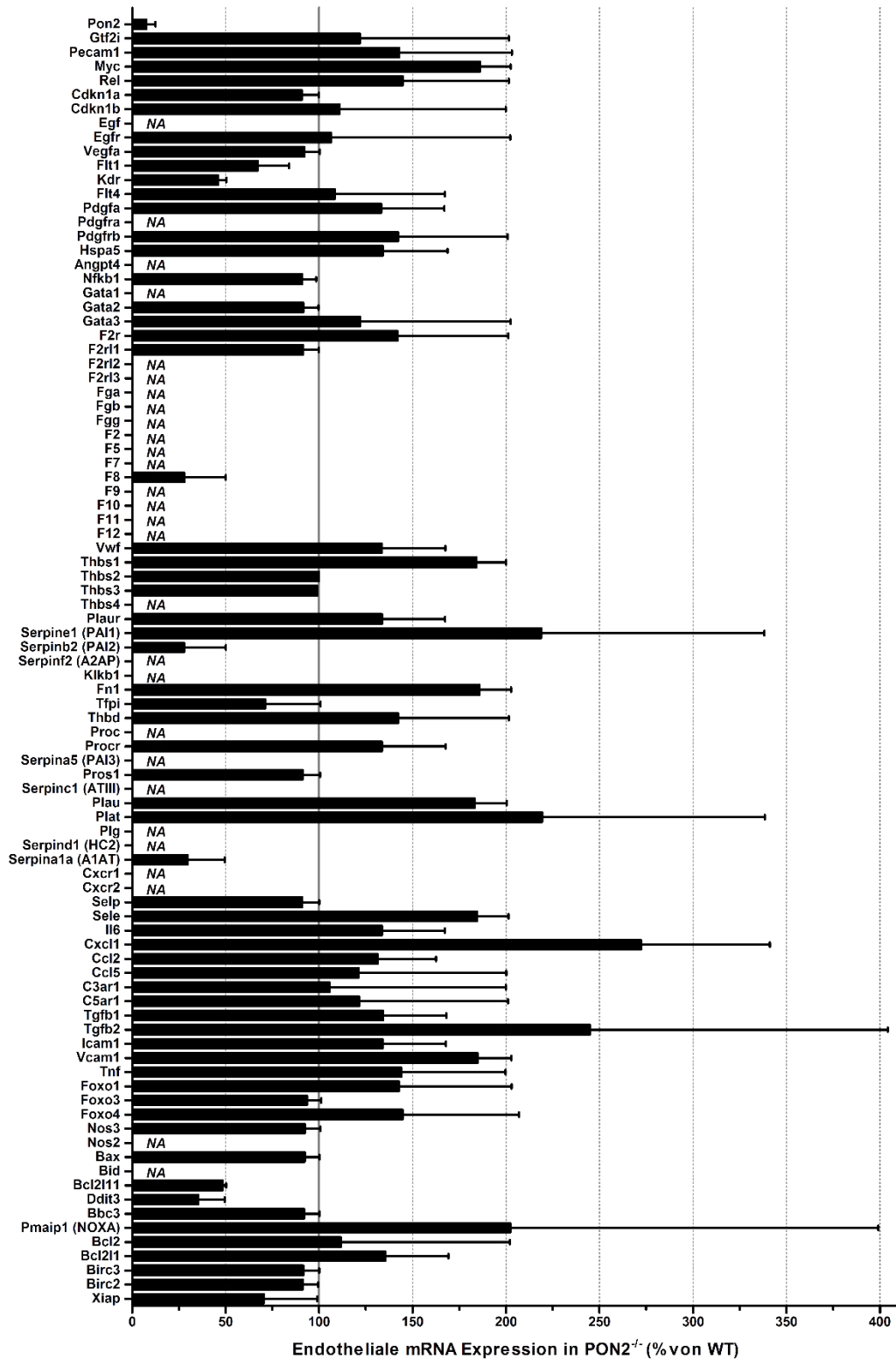
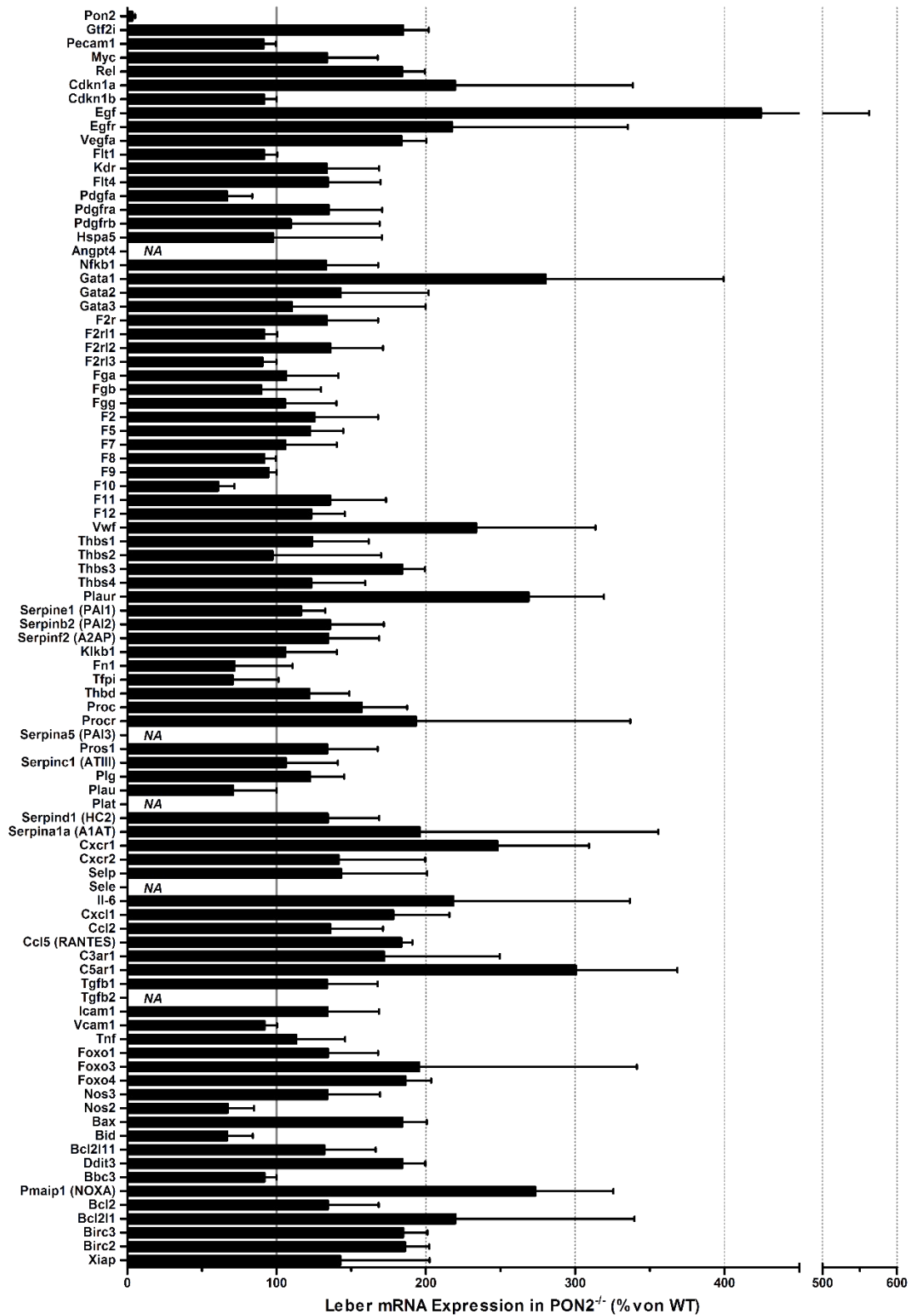
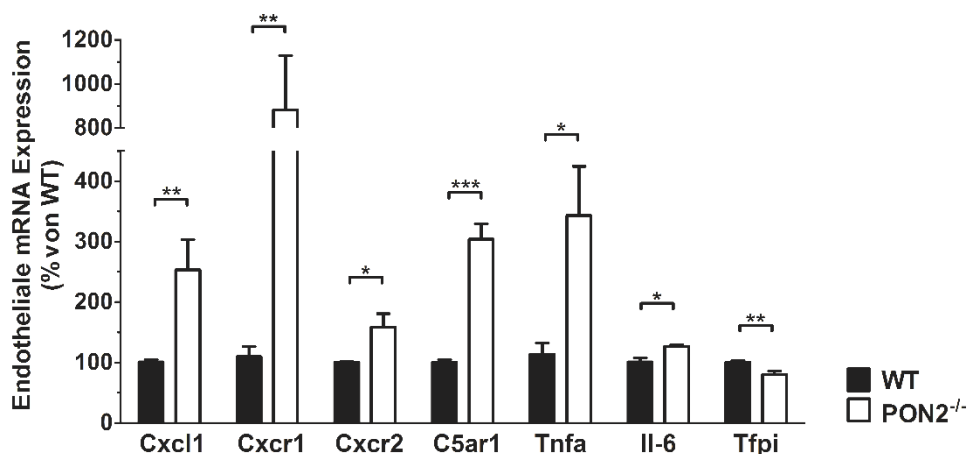


Abbildung 5-6: Das Genexpressionsprofil von makrovaskulären ECs von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen vs. WT zeigt veränderte Expressionsraten inflammatorischer Marker. ECs wurden mittels FACS-sorting (Lectin<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>) aus der Aorta von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und in einem qRT-PCR basierten Array auf die mRNA-Expression von über 90 Faktoren, involviert Gerinnung, Inflammation, Apoptose, Adhäsion, Endothelfunktion und Genexpression, untersucht (n=2-3 Analysen mit insgesamt 8-20 Mäusen pro Gruppe). Die Expressionsraten wurden normalisiert auf Gapdh, Polr2a, Atp5j und 18s und sind im Graphen als % von WT dargestellt; Mittelwert ± SEM. NA, not available (nicht detektierbar).



**Abbildung 5-7: Das Genexpressionsprofil von Gesamt-Leber-Lysaten von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen vs. WT zeigt veränderte Expressionsraten inflammatorischer Marker.** Lebergewebe aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde lysiert und mittels qRT-PCR basierendem Array auf die mRNA-Expression von über 90 Faktoren, involviert Gerinnung, Inflammation, Apoptose, Adhäsion, Endothelfunktion und Genexpression, untersucht (n=2-3 Analysen mit insgesamt 8-20 Mäusen pro Gruppe). Die Expressionsraten wurden normalisiert auf GAPDH, POLR2A, ATP5J und 18S und sind im Graphen als % von WT dargestellt; Mittelwert ± SEM. NA, *not available* (nicht detektierbar).

Basierend auf den qRT-PCR Array-Analysen (Abbildung 5-6, Abbildung 5-7) wurde die mRNA-Expression ausgewählter Faktoren ( $<0,5$  bzw.  $>1,5$ -fach in  $Pon2^{-/-}$  vs. WT) verifiziert. Da unter pro-inflammatorischen Bedingungen vor allem mikrovaskuläre Bereiche relevant für die Entstehung von Thrombosen sind, <sup>89</sup> wurden mikrovaskuläre ECs eingesetzt, die aus dem Lungengewebe der Versuchstiere mittels anti-ICAM-2 / anti-CD31 Antikörper-vermittelter Selektion isoliert wurden (siehe 4.1.1, Abbildung 4-1 A). Diese qRT-PCR Analysen belegten eine in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen signifikant erhöhte endotheliale Expression des Chemokins Cxcl1, seiner Rezeptoren Cxcr1 und Cxcr2 sowie von C5ar1, Tnf- $\alpha$ , und Il-6. Im Gegensatz dazu war die endotheliale Expression von *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (Tfpi) in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen gering aber signifikant reduziert verglichen mit den WT Kontrollen (Abbildung 5-8). Somit wurde gezeigt, dass Pon2-Defizienz eine erhöhte endotheliale Expression pro-inflammatorischer Mediatoren sowie eine erniedrigte Expression des Inhibitors des TF-Pathways verursacht.



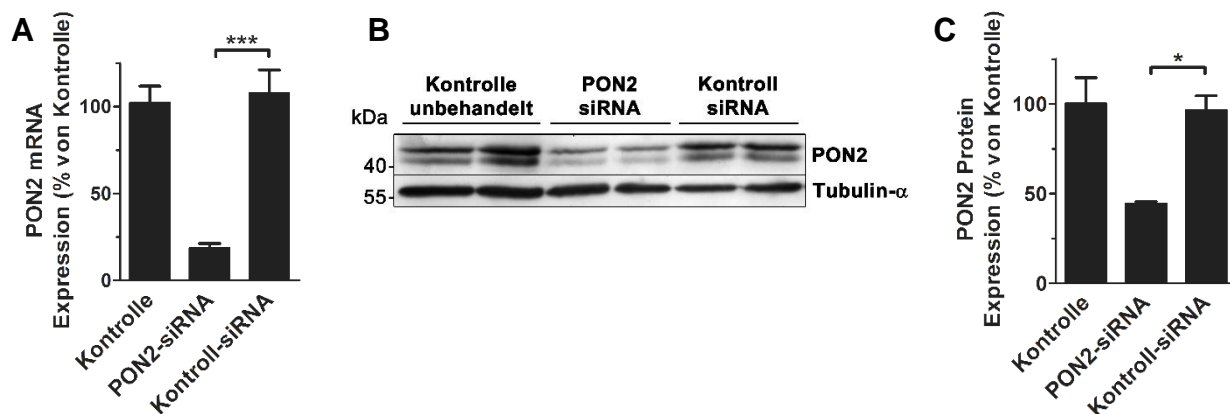
**Abbildung 5-8: Mikrovaskuläre ECs aus der Lunge von  $Pon2^{-/-}$  Mäusen zeigen gegenüber der WT Kontrolle eine erhöhte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren und eine erniedrigte mRNA-Expression des gerinnungshemmenden TFPI.** Mithilfe von anti-ICAM-2/CD31-gekoppelten Dynabeads wurden ECs aus der Lunge von  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen isoliert und mittels qRT-PCR auf die mRNA-Expression spezifischer Faktoren untersucht (n=4-12 Mäusen pro Gruppe). Die Expressionsraten wurden normalisiert auf GAPDH und POLR2A und sind im Graphen als % von WT dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,0156$ , \*\*  $p \leq 0,007$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; t-Test.

### 5.2.3 Humane primäre Endothelzellen zeigen ein verändertes Expressionsprofil Thrombin-modulierter Faktoren nach PON2-knockdown

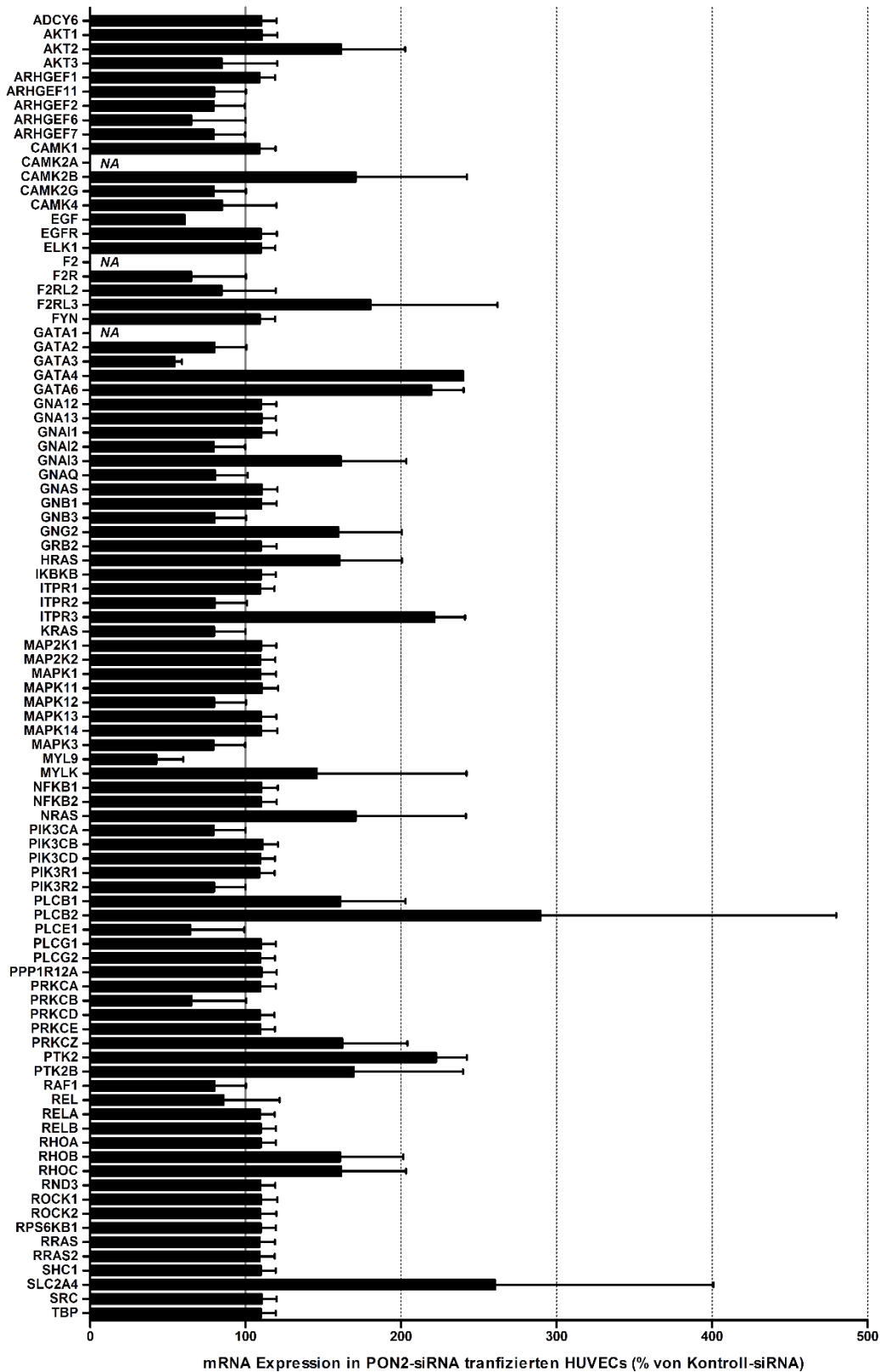
Einem pro-inflammatorischen Expressionsprofils des Endothels kann ein verändertes Thrombin-Signaling zugrunde liegen. Neben seiner zentralen Funktion als Fibrin-aktivierende Protease, wirkt Thrombin außerdem als multifunktionales Signalmolekül. Via Protease-aktivierter Rezeptoren (*Protease-activated receptors*, PARs) induziert Thrombin in ECs u. a. die Expression von E- und P-Selektin, die Produktion von Chemokinen, die Freisetzung von vWF sowie die

Steigerung der endothelialen Permeabilität.<sup>90</sup> Da die plasmatische Thrombinkonzentration in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber dem WT erhöht (siehe 5.1.3) und Pon2<sup>-/-</sup> ECs pro-inflammatorisch waren (siehe 5.2.2), wurde das Genexpressionsprofil von Faktoren des Thrombin-Signalings untersucht, um auf zellulärer Expressionsebene mögliche Mediatoren aufzudecken, die durch PON2 reguliert werden. Hierzu wurde durch RNA-Interferenz (RNAi) die PON2-Expression in humanen primären ECs (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) herunterreguliert, woraufhin diese Zellen mit Thrombin stimuliert wurden oder unbehandelt blieben, um schließlich mittels qRT-PCR die Expression Thrombin-modulierter Faktoren zu analysierten.

Im Vorfeld dieser Expressionsanalysen wurde der RNAi-vermittelte PON2-*knockdown* überprüft. Die mittels Lipid-Transfektion in die HUVECs eingebrachte Pon2-siRNA bewirkte an Tag 1 nach der Transfektion eine Herabregulation der Pon2 mRNA um etwa 80%, wobei Kontroll-siRNA transfizierte HUVECs keine mRNA-Expressionsänderung gegenüber den unbehandelten Zellen aufwiesen (Abbildung 5-9 A). Aufgrund einer relativ langen Proteinstabilität (zuvor bekannt) war der PON2-*knockdown* auf Proteinebene erst an Tag 3 erreicht. Dies wurde mithilfe von Western Blot Analysen bestätigt, welche eine Reduktion der PON2-Proteinexpression um ca. 50% in Bezug auf die siRNA-transfizierte Kontrolle zeigten (Abbildung 5-9 B-C). HUVECs gelten als schlecht transfizierbare Zellen und diverse Änderungen des Protokolls erzielten keine stärkere Reduktion der PON2-Expression als um ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle. Daher wurden die HUVECs an Tag 3 nach der Transfektion für die qRT-PCR Analysen lysiert.



**Abbildung 5-9: Überprüfung des Pon2-knockdowns in siRNA transfizierten HUVECs.** Humane primäre ECs (HUVECs) wurden mit Pon2-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert oder blieben unbehandelt. Die PON2-Expression wurde **(A)** auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR an Tag 1 nach der Transfektion bestimmt und **(B-C)** auf Proteinebene durch Western Blot Analysen mithilfe von anti-PON2 und anti-GAPDH Antikörpern an Tag 3 nach der Transfektion untersucht. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis (mit n=2-3) aus 5 unabhängigen Versuchen. Die anhand eines Proteingrößenstandards bestimmte Molekülmasse (kDa) ist für die entsprechende Auftrennungshöhe im Blot angegeben. Die PON2-Expressionsrate wurde auf (A) GAPDH bzw. (B, C) Tubulin-α normalisiert und ist im Graphen als % der unbehandelten Kontrolle dargestellt; Mittelwert ± SEM. \*\*\*p<0,0001, \* p=0,0251; t-Test.



**Abbildung 5-10: Das Genexpressionsprofil von Pon2-siRNA transfizierten HUVECs zeigt eine veränderte mRNA-Expression von Faktoren des Thrombin-Signalwegs.** Pon2-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierte HUVECs wurden mittels qRT-PCR basierendem Array auf die mRNA-Expression von über 90 Thrombin-modulierten Faktoren analysiert (n=3). Die Expressionsraten wurden auf 18S, GAPDH, HPRT1 und GUSB normalisiert und sind im Graphen als % von Kontroll-siRNA HUVECs dargestellt; Mittelwert ± SEM. NA, *not available* (nicht detektierbar).



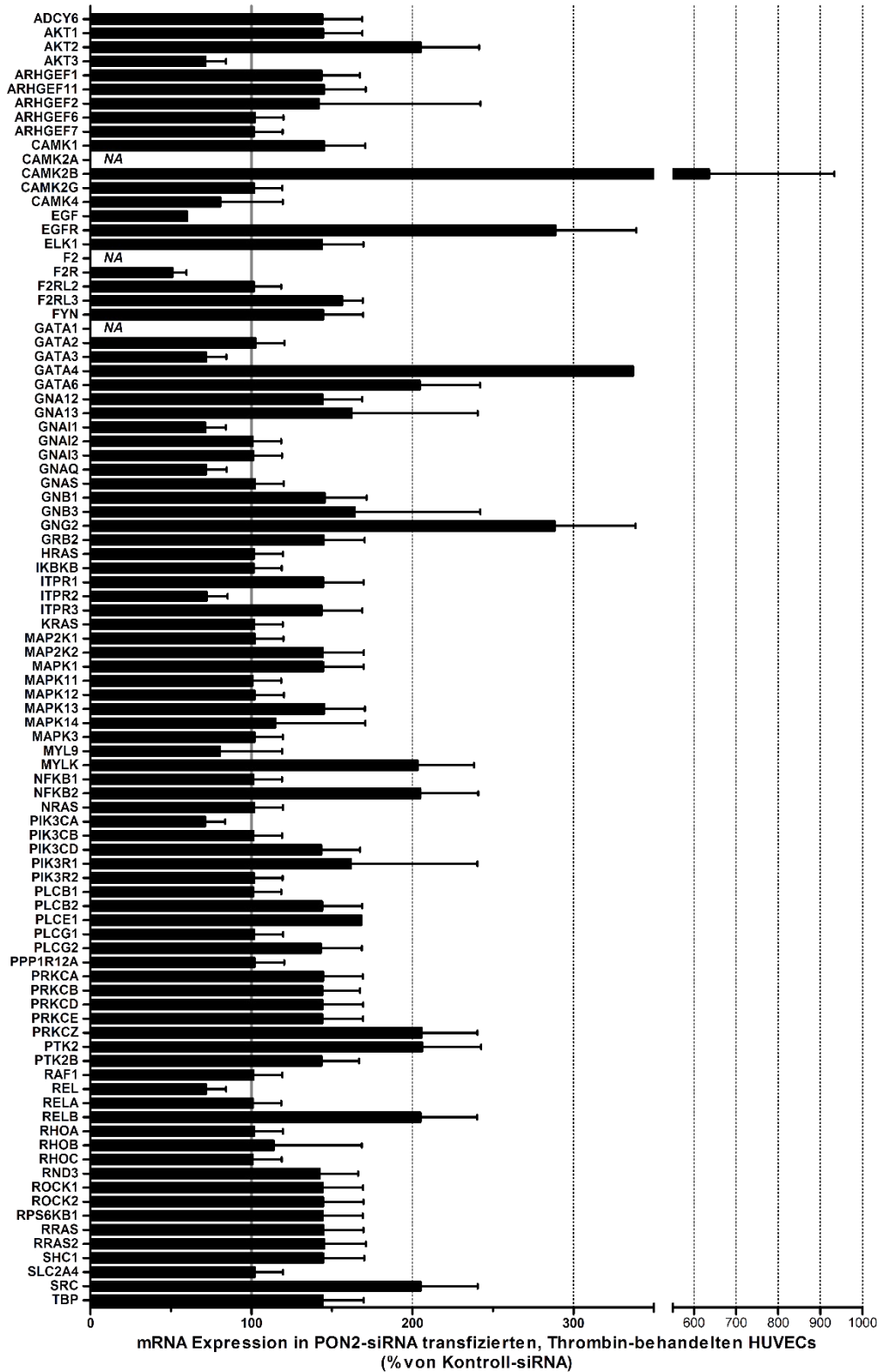
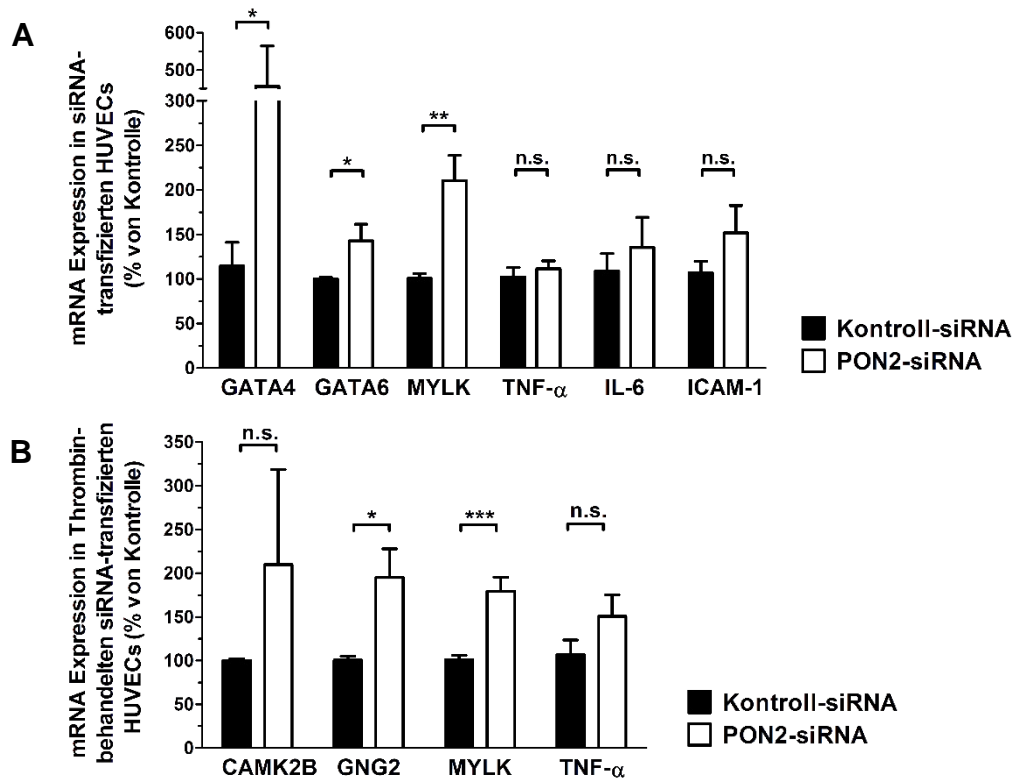


Abbildung 5-11: Das Genexpressionsprofil von Thrombin-stimulierten, Pon2-siRNA transfizierten HUVECs zeigt eine veränderte mRNA-Expression von Faktoren des Thrombin-Signalwegs. Pon2-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierte HUVECs wurden mit 1 U/ml Thrombin für 4h behandelt und mittels qRT-PCR basierendem Array auf die mRNA-Expression von über 90 Thrombin-modulierten Faktoren analysiert (n=3). Die Expressionsraten wurden auf 18S, GAPDH, HPRT1 und GUSB normalisiert und sind im Graphen als % von Kontroll-siRNA HUVECs dargestellt; Mittelwert ± SEM. NA, not available (nicht detektierbar).

Mittels qRT-PCR Array (*Human Thrombin Signaling TaqMan® Array*) wurde in den Pon2-siRNA transfizierten HUVECs die mRNA-Expression von über 90 Thrombin-modulierter Faktoren im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten HUVECs quantifiziert. Die qRT-PCR Array-Analyse der unstimulierten siRNA transfizierten HUVECs gab Auskunft drüber, welche Faktoren unter basalen Bedingungen möglicherweise durch PON2 reguliert werden (Abbildung 5-10). Zur Bestimmung des Expressionsprofils unter Thrombin-stimulierten Bedingungen wurden Pon2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfizierte HUVECs für den qRT-PCR Array eingesetzt, die mit 1 U/ml Thrombin stimuliert wurden (Abbildung 5-11).

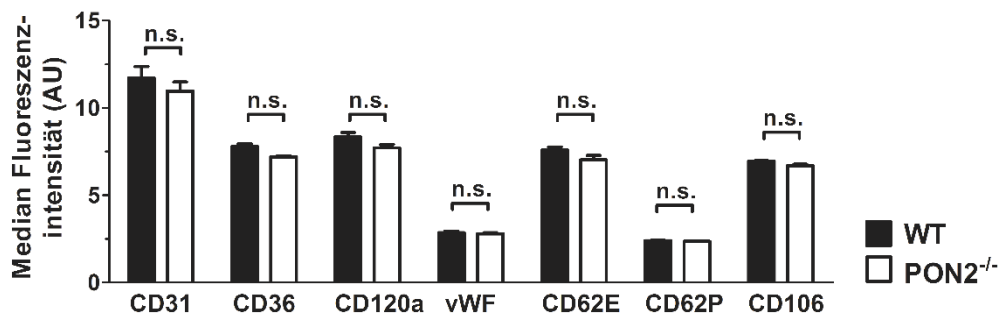
Auf der Grundlage dieser Ergebnisse (Abbildung 5-10, Abbildung 5-11) wurde die mRNA-Expression ausgewählter Faktoren (<0,5 bzw. >1,5-fach in Pon2-siRNA vs. Kontroll-siRNA HUVECs) verifiziert. Darüber hinaus wurden Pon2-siRNA transfizierte HUVECs auf die Expression der pro-inflammatorischen Mediatoren untersucht, die in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht exprimiert waren (siehe 5.2.2). Hierbei stellte sich heraus, dass unter unstimulierten Bedingungen die Transkriptionsfaktoren GATA4 und GATA6 sowie die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, MYLK) in HUVECs mit Pon2-*knockdown* relativ zur Kontrolle signifikant erhöht exprimiert waren (Abbildung 5-12 A). Auch unter aktivierten Bedingungen durch Thrombin-Stimulation wiesen Pon2-siRNA HUVECs eine signifikant verstärkte MYLK-Expression auf, sowie ein ebenfalls erhöhtes mRNA-Level der Signalmoleküle CAMK2B (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*) und GNG2 (*Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2*) (Abbildung 5-12 B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der PON2-*knockdown* möglicherweise eine verstärkte Expression von Komponenten von PAR-induzierten, Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Signalwegen induziert, was in einer verstärkten Endothel-permeabilität resultieren könnte.<sup>91</sup> Des Weiteren scheinen pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren induziert zu werden, was zu einer erhöhten Expression von Entzündungsmediatoren führen könnte.<sup>92</sup> Jedoch zeigte sich für die entzündungsfördernden Faktoren TNF- $\alpha$ , IL-6 und ICAM-1, die in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt exprimiert waren, ein nur tendenziell erhöhtes Expressionslevel (IL-6: p=0,145 und ICAM-1: p=0,111 in Abbildung 5-12 A; TNF- $\alpha$ : p=0,160 in Abbildung 5-12 B). Die in den HUVECs erreichte Herunterregulation der PON2-Proteinexpression auf 50% der WT Expression könnte eventuell nicht ausgereicht haben, um die in Pon2-defizienten Mäusen auftretenden erhöhten Expressionsraten der pro-inflammatorischen Faktoren zu induzieren.



**Abbildung 5-12: Pon2-knockdown in unstimulierten und Thrombin-stimulierten HUVECs verursacht eine erhöhte mRNA-Expression von entzündungsmodulierenden Faktoren.** Pon2-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten HUVECs (A) blieben unbehandelt bzw. (B) wurden mit 1 U/ml Thrombin für 4 h behandelt und wurden mittels qRT-PCR auf die mRNA Expression der genannten Faktoren untersucht (n=3-5). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,0409$ , \*\*  $p = 0,0019$ , \*\*\*  $p = 0,0003$ ; n.s., nicht signifikant; t-Test.

#### 5.2.4 Die Expression spezifischer Aktivierungsmarker auf der Endothelzelloberfläche sind in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert

Die pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels geht mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie anderer entzündungs- und gerinnungsfördernder Proteine auf der Zelloberfläche einher (siehe 1.1.5). Da PON2-knockdown in humanen ECs einen erhöhten mRNA-Gehalt entzündungsmodulierender Faktoren induzierte (siehe 5.2.3) und zudem Pon2-Defizienz *in vivo* eine signifikant erhöhte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Faktoren in ECs verursachte (siehe 5.2.2), wurde überprüft, ob auf der endothelialen Zelloberfläche von Pon2<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen ein verändertes Proteinprofil von Aktivierungsmarkern vorliegt. Hierzu wurden FACS Analysen mit ECs, welche aus Lungengewebe von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Tieren mittels anti-ICAM-2 Antikörper-vermittelter Selektion isoliert wurden, durchgeführt.



**Abbildung 5-13: Das Expressionsprofil spezifischer Oberflächenproteine ist auf Pon2<sup>-/-</sup> ECs unverändert.** ECs wurden aus der Lunge von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mittels anti-ICAM-2-gekoppelter magnetischer Dynabeads isoliert, mit verschiedenen Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gefärbt und auf die Expression der entsprechenden Oberflächenmarker durchflusszytometrisch anhand der Fluoreszenzintensität (*arbitrary units*, AU) untersucht (n=3). Mittelwert ± SEM. n.s., nicht signifikant; t-Test.

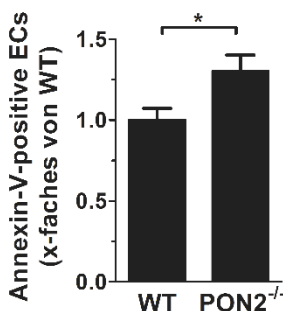
Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass die Präsentation von CD31, CD36, CD120a (TNF-R), CD62E (E-Selektin), CD62P (P-Selektin), CD106 und vWF auf der Oberfläche von Pon2<sup>-/-</sup> ECs im Vergleich zu WT ECs unverändert war (Abbildung 5-13). Da diese Marker typischerweise auf ECs mit fortgeschrittener, stark pro-inflammatorischer Aktivierung heraufreguliert sind, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Pon2-Defizienz eine limitierte chronische Aktivierung und Entzündung des Endothels unter basalen Bedingungen auslöst.

### 5.2.5 Die endotheliale Phosphatidylserin-Exposition ist in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt

Pathologische Stimuli, wie oxidativer Stress und Entzündungsprozesse, können die Phospholipid-Zusammensetzung der Plasmamembran verändern. So bewirken zelluläre Stresssignalwege die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) in die äußere Schicht der Plasmamembran, welches unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivität von Aminophospholipid-Transferasen nur in der inneren Lipidschicht lokalisiert ist.<sup>68, 93</sup> Eine massive Externalisierung von PS tritt während dem Prozess der Apoptose auf und leitet als „eat-me“-Signal die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen ein.<sup>70</sup> Eine moderate Exposition von PS, wie sie z. B. auf aktivierten Plättchen oder ECs zu finden ist, wirkt gerinnungsfördernd, da die PS-enhaltende und somit negativ geladene Zelloberfläche die Bindung von Gerinnungsfaktoren ermöglicht und dadurch die Aktivierung dieser in deren proteolytisch aktive Form stimuliert.<sup>69, 94</sup> Interessanterweise haben Studien der Arbeitsgruppe zur Untersuchung der anti-apoptotischen Funktion von PON2 gezeigt, dass PON2 vor einer verstärkten PS-Exposition schützt und dass dies mit einer

Verminderung der Superoxid-Produktion einhergeht.<sup>39</sup> In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob die pro-oxidativen und pro-inflammatorischen Pon2<sup>-/-</sup> ECs (siehe 5.2.1 und 5.2.2) ein erhöhtes Maß an PS auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran aufweisen, was zum Phänotyp der verstärkten Gerinnung von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe 5.1) beitragen könnte.

Die hierzu durchgeführten FACS Analysen, in denen PS auf der Zelloberfläche durch die Bindung von Fluoreszenz-konjugiertem Annexin V detektiert wurde, zeigten, dass Pon2<sup>-/-</sup> ECs aus Lungengewebe relativ zu WT ECs tatsächlich eine signifikant erhöhte PS-Externalisierung aufweisen (Abbildung 5-14). Dieses ist ein Hinweis auf die Aktivierung des Endothels von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen hin zu einem pro-inflammatorischen und pro-koagulatorischen Phänotyp.



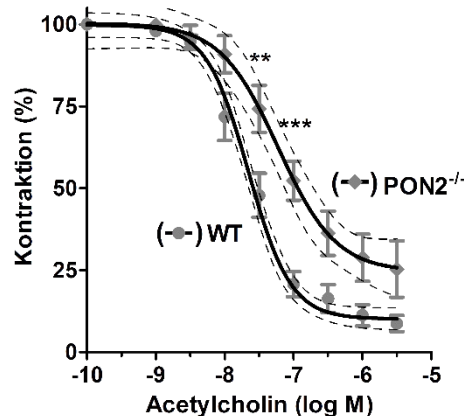
**Abbildung 5-14: Pon2<sup>-/-</sup> ECs zeigen eine erhöhte Exposition von Phosphatidylserin in der äußeren Plasmamembranschicht.** Aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde Lungengewebe isoliert und daraus eine Einzelzellsuspension präpariert und die Erythrozyten der Zellsuspension lysiert. Zur Detektion der ECs wurden die Lungenzellen mit Lectin-FITC gefärbt und anschließend mit dem Phosphatidylserin (PS)-bindenden PE Annexin V und mit 7-AAD (zur Exklusion toter / akut beschädigter Zellen) versetzt. Die quantitative Bestimmung von PS auf der Zelloberfläche der ECs erfolgte durch die Bestimmung der Anzahl der für Annexin V und Lectin doppelt positiven Zellen in der 7-AAD-negativen Zellpopulation. Der ermittelte Anteil der Annexin V positiven ECs ist als Vielfaches der WT Kontrolle dargestellt (n=7-8). Mittelwert ± SEM. \* p=0,0277; t-Test.

### 5.2.6 Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine endotheliale Dysfunktion

Der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Arteriosklerose liegt häufig eine Dysfunktion des Endothels zugrunde, die durch oxidativen Stress und die damit einhergehenden inflammatorischen Prozesse oder auch durch Erosion der endothelialen Schicht hervorgerufen wird.<sup>41</sup> Im Gegensatz zu einem gesunden Endothel, bei dem Acetylcholin durch die Bindung an endotheliale muskarinische Rezeptoren eine Vasodilatation auslöst, bewirkt Acetylcholin bei einem beschädigten Endothel über eine unmittelbare Wirkung auf die glatten Muskelzellen eine Vasokonstriktion.<sup>29</sup> Um zu überprüfen, ob Pon2-Defizienz *in vivo* eine endotheliale Dysfunktion verursacht, wurden Acetylcholin-induzierte Gefäßrelaxationsstudien durchgeführt. Hierzu wurde die Aorta aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und nach erfolgter Vorkontraktion mit KCl und

Noradrenalin das Ausmaß der Vasodilatation der Aortenringe, welche durch die Zugabe steigender Acetylcholin-Konzentrationen induziert wurde, aufgezeichnet.

Die Auftragung der prozentualen Kontraktion gegen die Acetylcholin-Konzentration ergab für die  $Pon2^{-/-}$  Aortenringe einen signifikanten Rechtsverschub des Kurvenverlaufs relativ zur Kontrolle, was eine deutlich verschlechterte Endothelfunktion der  $Pon2^{-/-}$  gegenüber der WT Mäuse anzeigt (Abbildung 5-15). Die Berechnung des  $\text{LogEC}_{50}$  Werts ergab, dass die halbmaximale Kontraktion der Aorta bei  $Pon2^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zur WT Aorta erst bei einer höheren Acetylcholin-Konzentration erreicht war. Zudem bewirkte die maximale Acetylcholin-Konzentration im Falle der  $Pon2^{-/-}$  Aortenringe eine deutlich geringere Kontraktion verglichen mit den Aortenringen der WT Mäuse (siehe *Bottom* Wert in Abbildung 5-15).

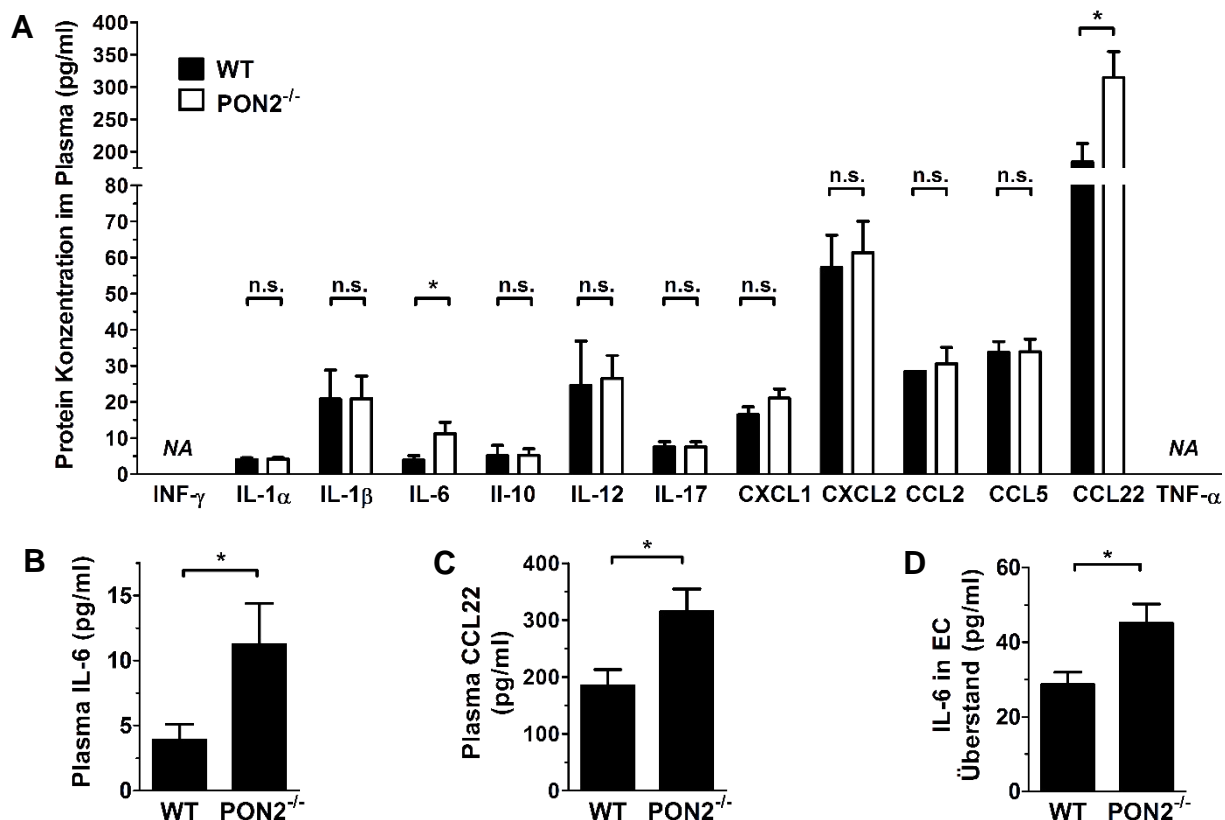


**Abbildung 5-15:  $Pon2^{-/-}$  Mäuse weisen eine endotheliale Dysfunktion auf.** Die aus  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen isolierte, freipräparierte Aorta wurde in Ringe geschnitten und vorkontrahiert (maximale Kontraktion durch KCl, submaximale Kontraktion durch Noradrenalin). Anschließend wurde die durch Zugabe steigender Acetylcholin-Konzentrationen induzierte Vasodilatation der Aortenringe im Myographen aufgezeichnet ( $n=6$  Aortenringe von insgesamt 3 Mäusen pro Gruppe). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ; 2-way ANOVA mit *Bonferroni multiple comparison test* und nichtlinearer Regression (durchgezogene Linien;  $R^2=0,84-0,97$ ) mit 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linien) zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen ( $\text{LogEC}_{50}$  Wert (halbmaximale Wirkung):  $Pon2^{-/-}$ : -7,22; WT: -7,65; *Bottom* Wert (Wirkung unter basalen Bedingungen):  $Pon2^{-/-}$ : 24,6; WT: 10,1).

### 5.3 Die systemische Inflammation ist verursacht durch vaskuläre $Pon2$ -Defizienz

Vaskuläre Entzündungsprozesse können eine verstärkte Sekretion inflammatorischer Mediatoren aus ECs und aus zirkulierenden Blutzellen in das Plasma induzieren. Erhöhte plasmatische Level von Cytokinen oder Chemokinen, wie z. B. IL-6, TNF- $\alpha$  oder CXCL1, stimulieren wiederum die lokale Entzündungsreaktion und regen durch deren Verbreitung über das Plasma auch systemisch pro-inflammatorische Prozesse an. Als Folge der Inflammation kommt es zur Aktivierung der

Blutgerinnung und Plättchenaktivierung.<sup>95</sup> Zum einen stellt dies einen physiologischen Schutzmechanismus zur Eindämmung der inflammatorischen Antwort z. B. auf ein eingetretenes Pathogen dar, weil der Blutstrom durch die lokale Thrombusbildung unterbunden wird. Zum anderen trägt eine übermäßige, unkontrollierte und systemische Entzündung jedoch zu pathologischen pro-thrombotischen Situationen bei.<sup>96</sup> Verdeutlicht wird dies u. a. durch die Induktion der Expression gerinnungsfördernder Faktoren ausgelöst durch pro-inflammatorische Mediatoren, wie z. B. die TNF- $\alpha$  induzierte TF-Expression auf ECs. Um zu untersuchen, ob der pro-koagulatorische Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer systemischen Inflammation einhergeht, wurde die plasmatische Konzentration einer Reihe wichtiger inflammatorischer Proteine bestimmt. Mittels multiplex-ELISA wurde dazu der Plasmalevel von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 (p70 A/B-Heterodimer), IL-17, CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL22 (MDC) und TNF- $\alpha$  in Pon2<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT Mäusen ermittelt.



**Abbildung 5-16: Pon2-Defizienz bewirkt eine erhöhte IL-6 und CCL22 Freisetzung in das Plasma.** (A) Aus Citrat-Vollblut von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden Plasmaproben gewonnen und die plasmatische Konzentration von 13 verschiedenen Cytokinen bzw. Chemokinen mittels multiplex-ELISAs bestimmt (n=5-6). NA, *not available* (nicht detektierbar). (B-C) Die Graphen zeigen die signifikant veränderten Konzentrationen von IL-6 und CCL22 im Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> vs. WT Mäusen aus den in (A) dargestellten Untersuchungsergebnissen. \* p $\leq$ 0,048; n.s., nicht signifikant; t-Test. (D) Isolierte ECs aus der Lunge von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden kultiviert und die Zellüberstände auf die Sekretion von IL-6 und CCL22 mittels ELISA untersucht (CCL22 war im EC-Überständen nicht detektierbar). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* p=0,0351; t-Test.

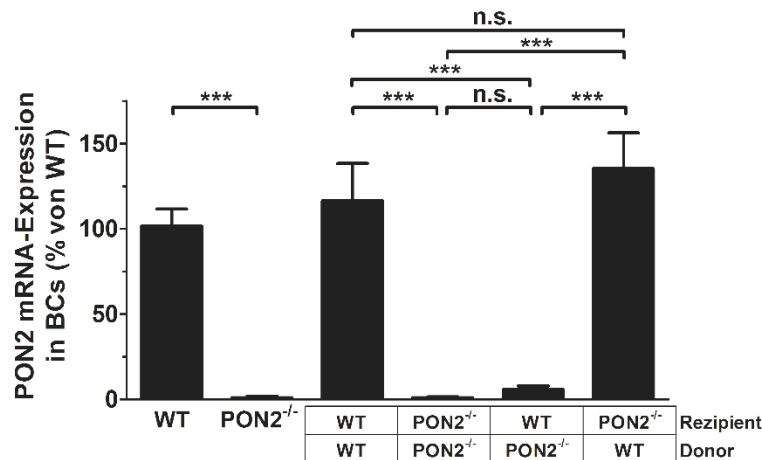
Während IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in den Plasmaproben nicht detektierbar waren und IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, CXCL2, CCL2 sowie CCL5 keine Unterschiede in deren Konzentration zwischen Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen aufwiesen (Abbildung 5-16 A), waren IL-6 und CCL22 im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma in signifikant höheren Konzentrationen im Vergleich zum WT vorzufinden (Abbildung 5-16 A-C). Bereits die Genexpressionsanalysen aus 5.2.2 deckten in ECs von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen ein signifikant erhöhtes Il-6 mRNA-Expressionslevel auf, was durch diese ELISA-Analysen auf Proteinebene bestätigt wurde. Ebenfalls war der mRNA-Gehalt von Cxcl1 in Pon2<sup>-/-</sup> ECs signifikant gesteigert (siehe 5.2.2), was sich im plasmatischen Proteingehalt nur in einem leicht erhöhten Trend widerspiegelte (p=0,177; Abbildung 5-16 A).

Ob in der Tat ECs an der verstärkten IL-6 und CCL22 Sekretion in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen beteiligt sind, wurde überprüft, indem isolierte ECs aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen kultiviert und die IL-6 und CCL22 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt wurde. CCL22 war im EC Überstand nicht detektierbar (nicht gezeigt). Dagegen wurde IL-6 in detektierbaren Mengen von den kultivierten ECs produziert und in das Zellkulturmedium sekretiert. Dabei stellte sich heraus, dass Pon2<sup>-/-</sup> EC signifikant mehr IL-6 produzieren als WT ECs (Abbildung 5-16 D).

Weil neben aktivierten ECs auch zirkulierende Blutzellen für die erhöhten IL-6 und CCL22 Plasma-Konzentrationen verantwortlich sein könnten, wurde im nächsten Schritt der primäre Ursprung dieser Cytokine identifiziert. Dazu wurden mithilfe von Knochenmarkstransplantationen reziproke Pon2<sup>-/-</sup> bzw. WT Chimäre generiert, deren eigenes Knochenmark (*bone marrow*, BM) durch Bestrahlung abgetötet und durch transplantiertes, allogenes BM ersetzt wurde, sodass deren hämatopoetische Zellen einen anderen Genotyp aufwiesen als der restliche Organismus (WT Mäuse mit Pon2<sup>-/-</sup> BM; Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse mit WT BM; siehe 4.4.8 und Abbildung 4-4). Dies ermöglichte es, zwischen der Funktion von PON2 in Blutzellen von der in der Gefäßwand zu unterscheiden und damit zu differenzieren ob Blutzellen-vermittelte oder endotheliale Effekte die systemische Inflammation in den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen hervorrufen. Als Transplantationskontrollen wurden Mäuse eingesetzt, die allogenes BM des eigenen Genotyps erhielten (WT Mäuse mit WT BM; Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse mit Pon2<sup>-/-</sup> BM). Zur Überprüfung des BM-Engraftments und der eingesetzten Hämatopoese durch das Spender-BM wurde den transplantierten Tieren am Untersuchungstag Blut entnommen, daraus die Blutzellen präpariert und mittels qRT-PCR die Pon2-Expression in den hämatopoetischen Zellen untersucht. Die ermittelten Pon2 mRNA-Level bestätigten im Vergleich zu nicht transplantierten Tieren die erwartete Wiederherstellung bzw.

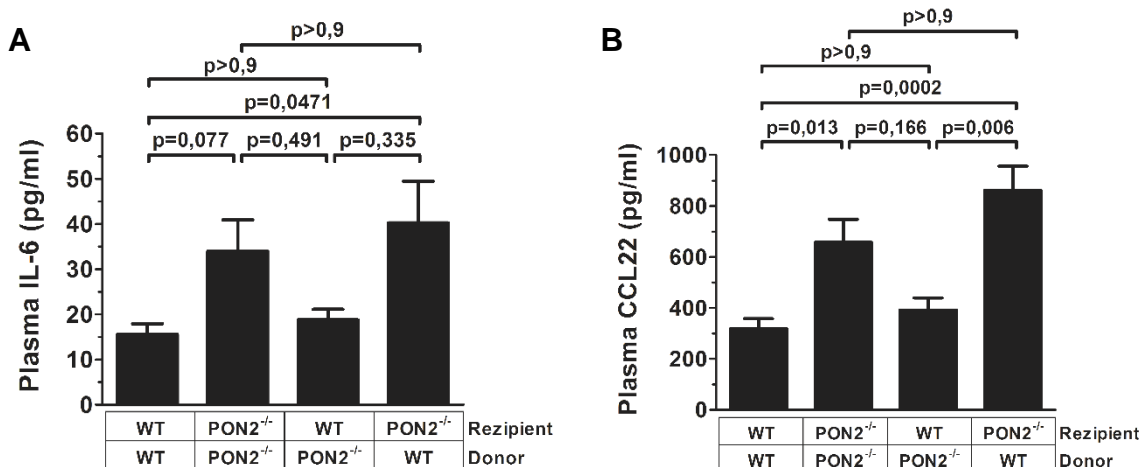


die Deletion der Pon2-Expression im hämatopoetischen Kompartiment der transplantierten Tiere, was die erfolgreiche Etablierung der BM-Chimären belegte (Abbildung 5-17).



**Abbildung 5-17: Überprüfung des Engraftments der Knochenmark-transplantierten Mäuse.** Zur Verifizierung des Engraftments der hämatopoetischen Stammzellen und der Rekonstitution der Hämatopoese durch die Donor-BMCs (*bone marrow cells*) im Empfänger wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Aus Citrat-Vollblut von Knochenmark-transplantierten WT und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen, welche nach erfolgter Bestrahlung entweder WT oder Pon2<sup>-/-</sup> Donor-BMCs erhielten, wurden Blutzellen (BCs) isoliert und deren Pon2 mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht (n=10-13). Als Kontrolle wurde ebenfalls der Pon2 mRNA-Expressionslevel von BCs aus naiven WT und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen bestimmt (n=3; links). Die Expressionsraten wurden auf Gapdh und bActin normalisiert und sind im Graphen als % von WT (naiv) dargestellt; Mittelwert ± SEM. \*\*\* p<0,001; n.s., nicht signifikant; 1-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test.

Mit der Generierung der BM-Chimären war es folglich möglich, zwischen der Auswirkung der vaskulären und der hämatopoetischen Pon2-Defizienz auf die Cytokin-Produktion zu unterscheiden. Dazu wurde aus den transplantierten Mäusen Plasma isoliert und die Konzentration von IL-6 und CCL22 mittels ELISA bestimmt. Wie in den nicht transplantierten Mäusen (Abbildung 5-16 B-C), zeigte sich eine deutlich erhöhte IL-6 und CCL22 Plasmakonzentration in den Pon2<sup>-/-</sup> Transplantationskontrollen im Vergleich zu den WT Transplantationskontrollen (Abbildung 5-18 A-B). Die Untersuchung der reziprok transplantierten Chimären ergab eine ebenfalls signifikant erhöhte IL-6 und CCL22 Konzentration im Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> Chimären mit WT BM im Vergleich zu WT Kontrollen, wohingegen die Cytokin-Level in WT Chimären mit Pon2<sup>-/-</sup> BM auf einer ähnlich niedrigen Konzentration lagen wie die WT Kontrollen (Abbildung 5-18 A-B). Demnach entsprach die Konzentration der proinflammatorischen Mediatoren dem WT Niveau, wenn die Gefäßwand PON2 exprimiert. Im Gegensatz dazu reichte die PON2-Expression in den Blutzellen nicht aus, um den proinflammatorischen Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zu normalisieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die systemische Inflammation in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen von der Gefäßwand und nicht von zirkulierenden Blutzellen herrührt.



**Abbildung 5-18: Die Gefäßwand vermittelt die erhöhten IL-6 und CCL22 Plasmakonzentrationen in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen.** Aus Knochenmark-transplantierten Chimären und Kontroll-Mäusen wurde Citrat-Plasma präpariert und mittels ELISA die Konzentration von (A) IL-6 und (B) CCL22 im Plasma der transplantierten Mäuse gemessen (n=5-6). Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* und exakten p-Werten (*multiplicity adjusted p values*).

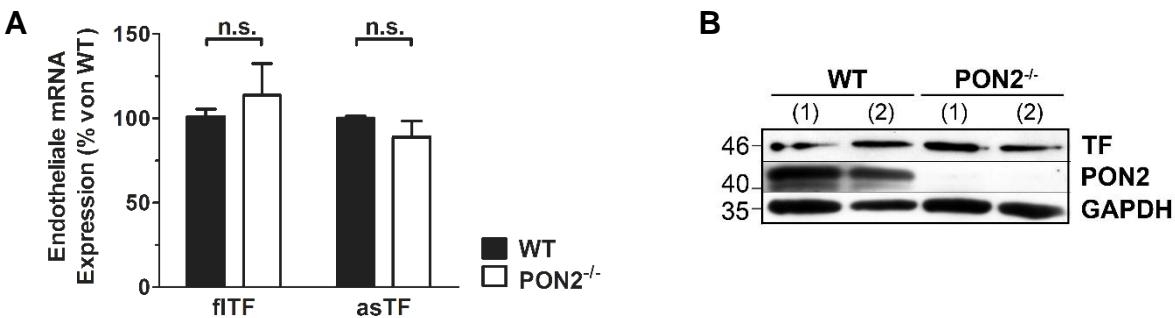
## 5.4 Die erhöhte Aktivität von TF ist ursächlich für die verstärkte Gerinnung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen

*Tissue Factor* (TF; Gewebefaktor; FIII) ist der primäre Auslöser der extrinsischen Blutgerinnung und wird unter physiologischen Bedingungen auf der Oberfläche von Zellen des extravaskulären Kompartiments exprimiert, was eine schnelle Initiation der Gerinnung bei Gefäßverletzungen gewährleistet. Im Gegensatz dazu exprimierten Zellen, die in direkten Kontakt mit dem Blutstrom kommen, wie ECs, unter physiologischen Bedingungen kein TF oder produzieren TF in nur sehr geringen Mengen.<sup>9</sup> Während Entzündungsprozessen kommt es jedoch durch pro-inflammatorische Stimuli, wie z. B. TNF- $\alpha$ , zur Induktion der TF-Expression auf ECs, was einen pro-koagulatorischen Status des Endothels etabliert.<sup>10, 11, 97, 98</sup> Neben der Regulation der TF-Expression ist insbesondere die post-translationale Regulation von TF wichtig für dessen pro-koagulatorische Aktivität. In diesem Zusammenhang beschrieben Studien den Prozess der TF *deryption*, bei dem durch Redox-abhängige Mechanismen in Synergie mit Phospholipid-Strukturen der Plasmamembran die inaktive („*cryptic*“) Form von TF in seinen gerinnungsaktiven („*decrypted*“) Zustand überführt wird.<sup>99</sup> Da Pon2-Defizienz ein pro-oxidatives und pro-inflammatorisches Endothel (siehe 5.2) sowie erhöhte plasmatische Cytokin Konzentrationen (siehe 5.3) verursacht, wurde eine verstärkte Expression und / oder Aktivität

von TF im Endothel als Ursache für die verstärkte Gerinnung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse vermutet und geprüft.

#### 5.4.1 Die endotheliale TF-Expression ist in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert

Zur Untersuchung der Auswirkung von Pon2-Defizienz auf die endotheliale TF-Expression wurden ECs aus dem Lungengewebe von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und qRT-PCR sowie Western Blot Analysen durchgeführt. Auf mRNA-Ebene zeigte sich weder für das *full length* Tf Transkript (flTF) noch für das alternativ gespleißte Tf Transkript (asTF) eine gegenüber den WT Mäusen veränderte Expression (Abbildung 5-19 A). Ebenso ergaben die Western Blot Analysen, dass keine Änderung der TF-Proteinmengen in den ECs der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse vorliegt (Abbildung 5-19 B).

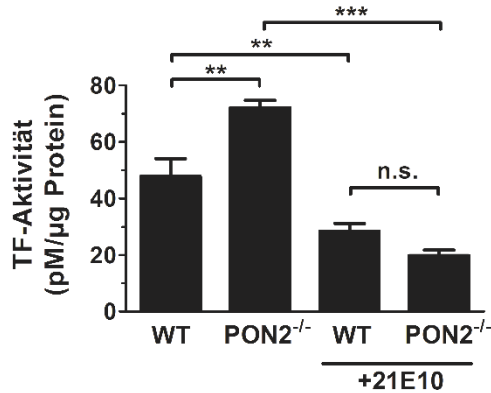


**Abbildung 5-19: Pon2-Defizienz verändert nicht die endotheliale TF-Expression.** Mithilfe von anti-ICAM-2/CD31-gekoppelten magnetischen Dynabeads wurden ECs aus der Lunge von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert und auf die Expression von TF analysiert. **(A)** Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von *full length* TF (flTF) und *alternatively spliced* TF (asTF) in den isolierten ECs quantifiziert (n=5-7). Die Expressionsraten wurden auf GAPDH und bActin normalisiert und sind im Graphen als % von WT dargestellt; Mittelwert ± SEM. n.s., nicht signifikant; t-Test. **(B)** Die TF-Expression in den isolierten ECs wurde auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert (n=3, Ergebnisse zweier repräsentativer Zellisolationen sind dargestellt). GAPDH diente als Ladekontrolle. Die anhand eines Proteingrößenstandards bestimmte Molekülmasse (kDa) ist für die entsprechende Auftrennungshöhe angeben.

#### 5.4.2 Pon2-Defizienz steigert die endotheliale TF-Aktivität

Da die endotheliale TF-Expression unverändert war (siehe 5.4.1), wurde als nächstes geprüft, ob Pon2-Defizienz die Aktivität von TF moduliert. Dazu wurden ECs aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen isoliert, kultiviert und für die TF-Aktivitätsmessung lysiert. Als Kontrolle wurden ECs im Vorfeld der Lyse mit einem Antikörper gegen murines TF (21E10 anti-TF), welcher die Gerinnungsaktivität von TF inhibiert, für 3 h inkubiert. Die Aktivität von TF wurde bestimmt, in dem FVIIa und FX zum EC-Lysat hinzugegeben und die FXa-vermittelte Umsetzung eines chromogenen Substrats gemessen wurde. Somit diente die Aktivierung von FX zu FXa durch den gebildeten TF-FVIIa/FX Komplex als Maß für die Quantifizierung der TF-Aktivität.

Tatsächlich stellte sich anhand dieser Messung heraus, dass TF in Lysaten der Pon2<sup>-/-</sup> ECs eine signifikant höhere Aktivität aufweist als in WT EC-Lysaten (Abbildung 5-20). Die Spezifität dieses Assays für die Gerinnungsaktivität von TF wurde anhand der signifikant erniedrigten Messergebnisse durch Inkubation mit dem anti-TF Antikörper 21E10 bestätigt (Abbildung 5-20).

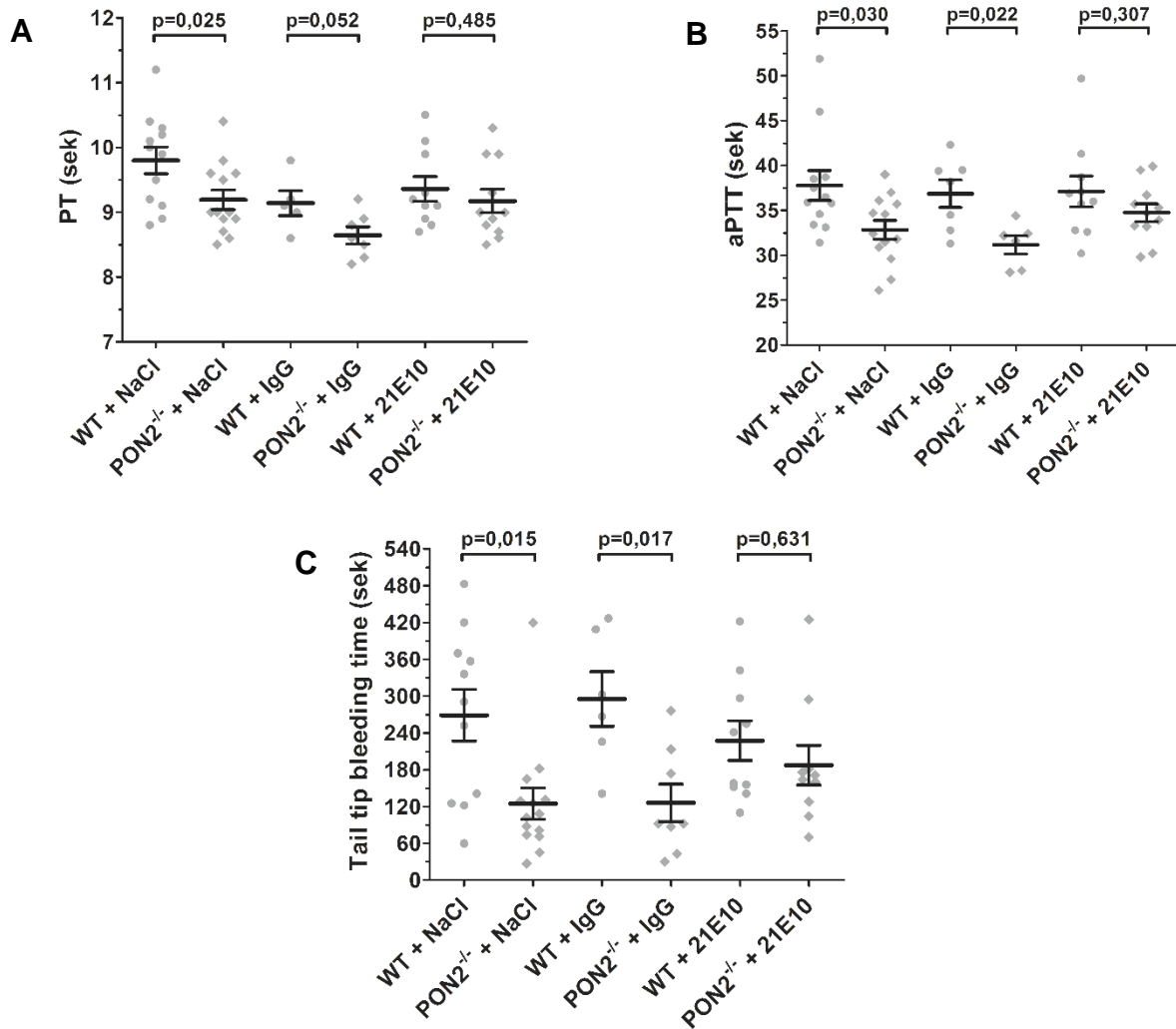


**Abbildung 5-20: Die endotheliale TF-Aktivität ist in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht.** ECs wurden aus der Lunge von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mittels anti-ICAM-2/CD31-gekoppelter magnetischer Dynabeads isoliert, kultiviert und für 3 h mit 5 µg/ml anti-TF 21E10 Antikörper behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden aus den ECs Proteinlysate hergestellt und die Aktivität von TF mithilfe eines absorptionsbasierten Assays quantifiziert (n=4-7). Die ermittelte TF-Aktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt der gemessenen Probe normalisiert; Mittelwert ± SEM. n.s., nicht signifikant; \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01; n.s., nicht signifikant; 1-way ANOVA mit *Bonferroni's multiple comparison test*.

#### 5.4.3 Die Inhibition der TF-Aktivität normalisiert die Gerinnung und Endothelfunktion der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse

Auf Grundlage der vorangegangenen Ergebnisse, welche eine gesteigerte endotheliale TF-Aktivität in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen aufzeigten (siehe 5.4.2), wurde im Folgenden verifiziert, ob TF *in vivo* für den pro-koagulatorischen Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse verantwortlich ist. Dazu wurde Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen 72 und 24 h vor dem Untersuchungszeitpunkt 0,5 mg 21E10 anti-TF Antikörper oder als Kontrolle IgG bzw. 0,9% NaCl i. p. verabreicht und anschließend die Gerinnungszeiten mittels Quantifizierung der PT, aPTT und der *tail tip bleeding time* bestimmt.

Wie erwartet, zeigten alle drei Messungen für die IgG- und NaCl-behandelten Kontrollgruppen eine deutlich verkürzte Gerinnungszeit im Falle der Pon2-Defizienz (Abbildung 5-21 A-C). Im Gegensatz dazu bewirkte die anti-TF Behandlung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse eine Normalisierung der PT, aPTT und *tail tip bleeding time*, so dass kein signifikanter Unterschied zwischen den 21E10-behandelten Pon2<sup>-/-</sup> und 21E10-behandelten WT Tieren festzustellen war (Abbildung 5-21 A-C).

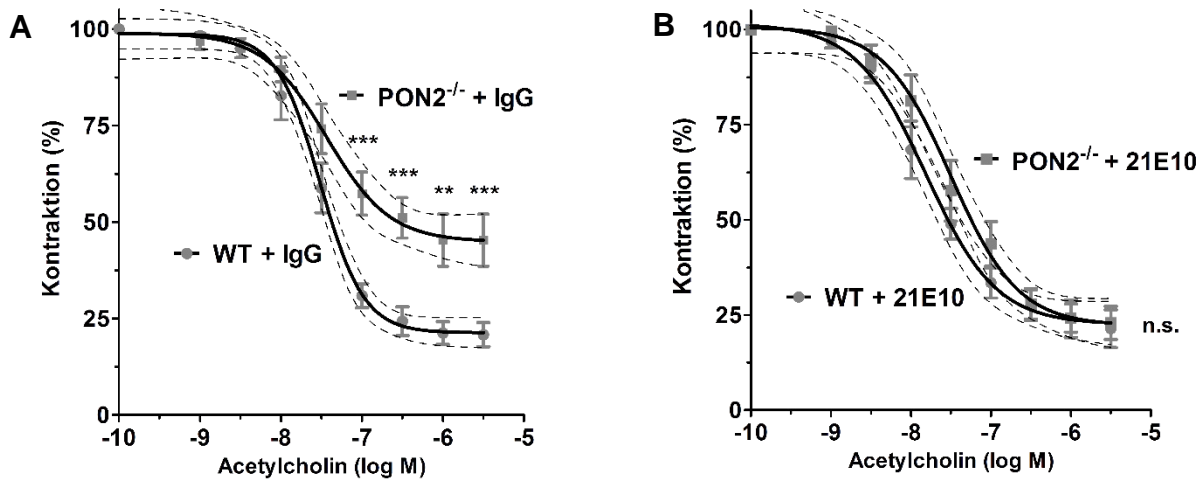


**Abbildung 5-21: Anti-TF Behandlung (21E10 Antikörper) bewirkt eine Normalisierung der Gerinnungszeit in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen.** Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden 72 und 24 h vor der Blutgerinnungsmessung jeweils 0,5 mg anti-TF (21E10) i. p. injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten im gleichen Verabreichungsmuster 0,5 mg Kontroll-IgG oder 0,9%ige NaCl-Lösung (Antikörper Lösungsmittel). Anschließend wurde wie zuvor beschrieben (siehe Abbildung 5-1) die plasmatische (A) Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT) und (B) aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) gemessen (n=5-13) sowie (C) die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) der Versuchstiere bestimmt (n=6-14). Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM. p-Werte sind in den Graphen angegeben; t-Test bzw. Mann Whitney Test.

Des Weiteren wurde mittels anti-TF Behandlung überprüft, ob die verstärkte endotheliale TF-Aktivität an der endothelialen Dysfunktion der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse beteiligt ist. Dazu wurde im Applikationsschema des vorherigen Experiments 21E10 bzw. Kontroll-IgG in Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäuse i. p. injiziert und anschließend die endotheliale Funktion anhand der Acetylcholin-induzierten Relaxation der Aorta gemessen.

Das aortale Gewebe der IgG-behandelten Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte verglichen mit dem von IgG-behandelten WT Tieren ein signifikant vermindertes endothelabhängiges Relaxationsvermögen (Abbildung 5-22 A), wie es zuvor für unbehandelte Pon2-defiziente Mäuse festgestellt wurde

(siehe 5.2.6). Interessanterweise war diese endotheliale Dysfunktion normalisiert, wenn  $Pon2^{-/-}$  Mäuse mit dem TF-inhibierenden Antikörper 21E10 behandelt wurden, was an der Annäherung des gemessenen Relaxationsverlaufs der Aortenringe von 21E10-behandelten  $Pon2^{-/-}$  Mäusen an den der Aortenringe von 21E10-behandelten WT Mäusen zu erkennen war (Abbildung 5-22 B).



**Abbildung 5-22: Anti-TF Behandlung (21E10 Antikörper) bewirkt eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion der  $Pon2^{-/-}$  Mäuse.**  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen wurden 72 und 24 h vor der Blutgerinnungsmessung jeweils 0,5 mg/ml anti-TF (21E10) oder 0,5 mg/ml Kontroll IgG i. p. injiziert. Daraufhin wurde die Aorta entnommen, freipräpariert und in Ringe geschnitten. Die Aortenringe der (A) IgG-behandelten und (B) 21E10-behandelten Mäuse wurden vorkontrahiert (maximale Kontraktion durch KCl, submaximale Kontraktion durch Noradrenalin) und die endothelabhängige Vasodilatation durch Zugabe steigender Acetylcholin-Konzentrationen im Myographen gemessen (n=4). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ ; n.s., nicht signifikant; 2-way ANOVA mit *Bonferroni multiple comparison test* und nichtlineare Regression (durchgezogene Linien;  $R^2 = 0,74-0,94$ ) mit 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linien) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen in (A), nicht jedoch in (B).

## 5.5 Die endotheliale PON2-Expression normalisiert die verstärkte Gerinnung der $Pon2^{-/-}$ Mäuse

Die vorherigen Ergebnisse dieser Arbeit bestärkten die Hypothese, dass PON2 über endotheliale Mechanismen die Blutgerinnung reguliert. Es stellte ich heraus, dass  $Pon2^{-/-}$  ECs oxidativen Stress aufweisen (siehe 5.2.1), pro-inflammatorisch sind (siehe 5.2.2) und vermehrt pro-inflammatorisches IL-6 produzieren, was in einem systemisch erhöhten IL-6 Plasmaspiegel resultiert, der durch die vaskuläre  $Pon2$ -Defizienz nicht aber durch Blutzellen-vermittelte Effekte verursacht wird (siehe 5.3). Zudem wurde dargelegt, dass TF auf  $Pon2^{-/-}$  ECs im Vergleich zu WT ECs eine erhöhte Aktivität aufweist und die Inhibition der TF-Aktivität die verstärkte Blutgerinnung in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen normalisiert (siehe 5.4). Um zu prüfen, ob tatsächlich das Endothel und nicht Effekte anderer Gewebe, wie z. B. des hämatopoetischen Zellkompartiments, für die verstärkte Gerinnung der  $Pon2^{-/-}$  Mäuse verantwortlich sind, wurden zwei verschiedene *in*

*in vivo* Modelle angewendet: Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse (siehe 5.5.1) sowie Knochenmark-transplantierte WT und PON2<sup>-/-</sup> Chimäre (siehe 5.5.2).

### 5.5.1 Die endotheliale und hämatopoetische Rekonstitution der PON2-Expression normalisiert die Gerinnung

Zur Klärung der Frage ob primär ECs, zirkulierende Blutzellen oder andere Zelltypen, wie z. B. Gerinnungsfaktor-sezernierende Hepatozyten, den Pon2<sup>-/-</sup>-induzierten pro-koagulatorischen Phänotyp auslösen, wurde die Pon2<sup>-/-</sup> Mauslinie mithilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystem genetisch modifiziert. Da die Pon2-Defizienz im Pon2<sup>-/-</sup> Mausstamm auf der Insertion eines mit lox-P-Sequenzen flankierten *gene trap* Vektors in das Pon2-Gen basiert (siehe 3.10 und Abbildung 3-1), kann durch eine Cre-vermittelte Rekombination der inserierte Vektor aus dem Genom herausgeschnitten werden und damit die Pon2-Expression wiederhergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Anwendung des in 3.10 und Abbildung 3-2 beschriebenen Kreuzungsschemas der Pon2<sup>-/-</sup> Stamm mit einer Cre-exprimierenden Linie verpaart, deren Cre-Expression unter der Kontrolle des endothelspezifischen Tek Rezeptor-Tyrosinkinase Promotors steht, um eine endothelspezifische Rekonstitution der Pon2-Expression zu erreichen (siehe 4.4.7, Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3). Zwar wurden Tek-Cre Mäuse als *in vivo* Modell für EC-spezifisches *gene targeting* beschrieben,<sup>60</sup> war jedoch auch eine gewisse Pon2-Rekonstitution in Blutzellen zu erwarten, da der Tek-Promotor auch in hämatopoetischen Zellen aktiv ist.<sup>79</sup>

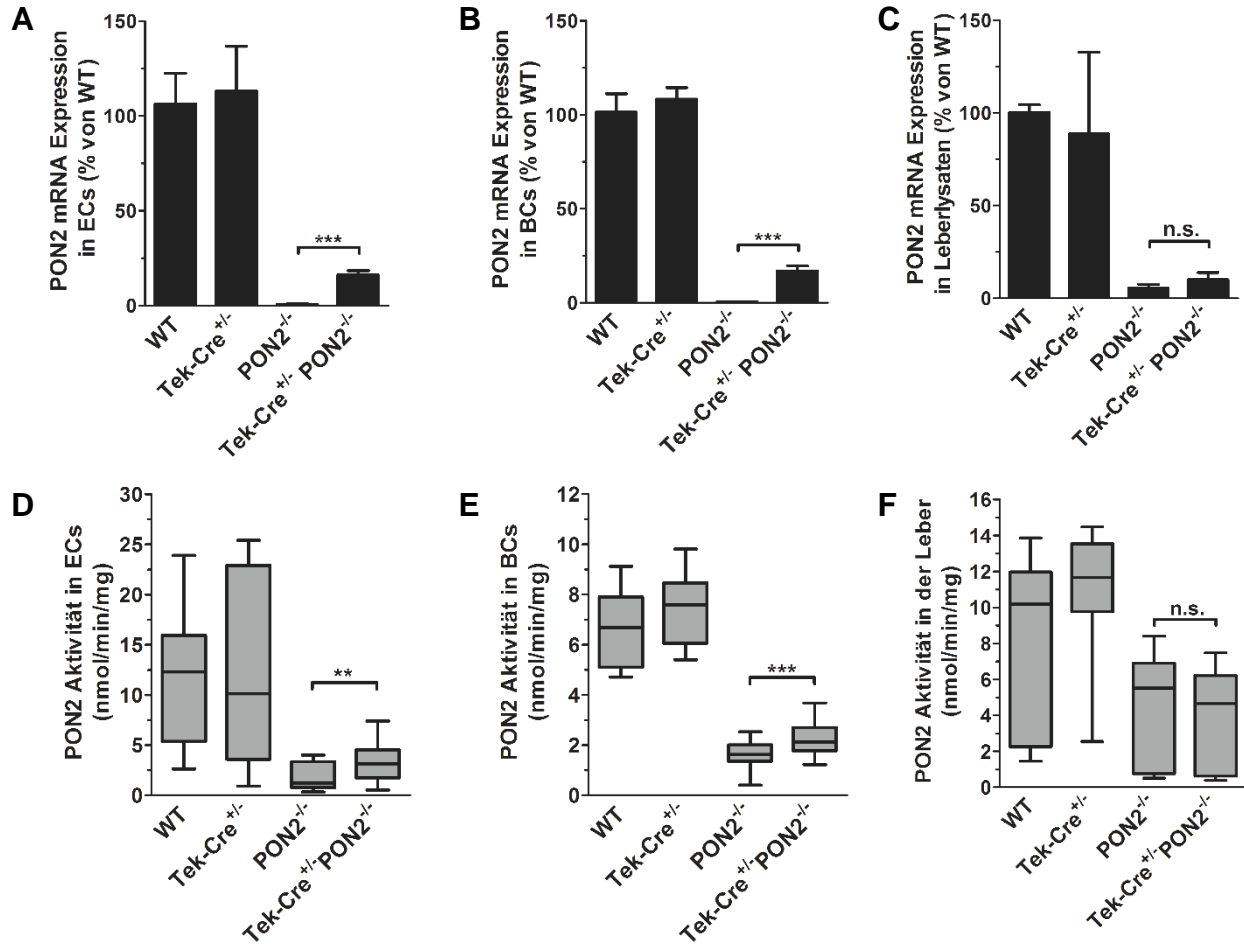
Die durch Verpaarung der Pon2<sup>-/-</sup> mit der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Line erhaltenen Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden im Vorfeld der Analysen auf deren Pon2-Expressionsmuster untersucht, um zu verifizieren, ob die Cre-vermittelte Rekombination erfolgreich war. Dazu wurden ECs, zirkulierende Blutzellen (*blood cells*, BCs) sowie Leberzellen aus Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und im Vergleich zu den aus WT, Pon2<sup>-/-</sup> und Tek-Cre<sup>+/-</sup> Mäusen isolierten Zellen für qRT-PCR Expressionsstudien und Enzymaktivitätsuntersuchungen herangezogen.

Die qRT-PCR Analysen zeigten, dass in ECs und BCs von Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen eine gegenüber den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöhte Pon2 mRNA-Expression vorhanden war (Abbildung 5-23 A-B). In Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen betrug der Pon2 mRNA-Level sowohl in ECs als auch in BCs das ca. 30-Fache der Pon2 mRNA-Restexpression in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen. Relativ zur wildtypischen Pon2 mRNA-Expressionsrate lag der endotheliale und hämatopoetische Pon2 mRNA-Level der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse bei ca. 25%. Wie erwartet,

ergab die Quantifizierung der Pon2 mRNA in Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Leberzellen dagegen im Vergleich zu den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikante Änderung (Abbildung 5-23 C). Die tendenziell leicht erhöhte Pon2 mRNA-Expression in Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Leberzellen im Vergleich zu Pon2<sup>-/-</sup> Leberzellen ist darauf zurück zu führen, dass in den Leber-Lysaten zu einem gewissen Anteil auch ECs und BCs enthalten waren. Ebenfalls wie zu erwarten, lag der Pon2 mRNA-Gehalt der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Kontrollen, welche zwar Cre exprimieren aber einen wildtypischen Pon2 Locus aufweisen, auf dem WT Niveau (Abbildung 5-23 A-C).

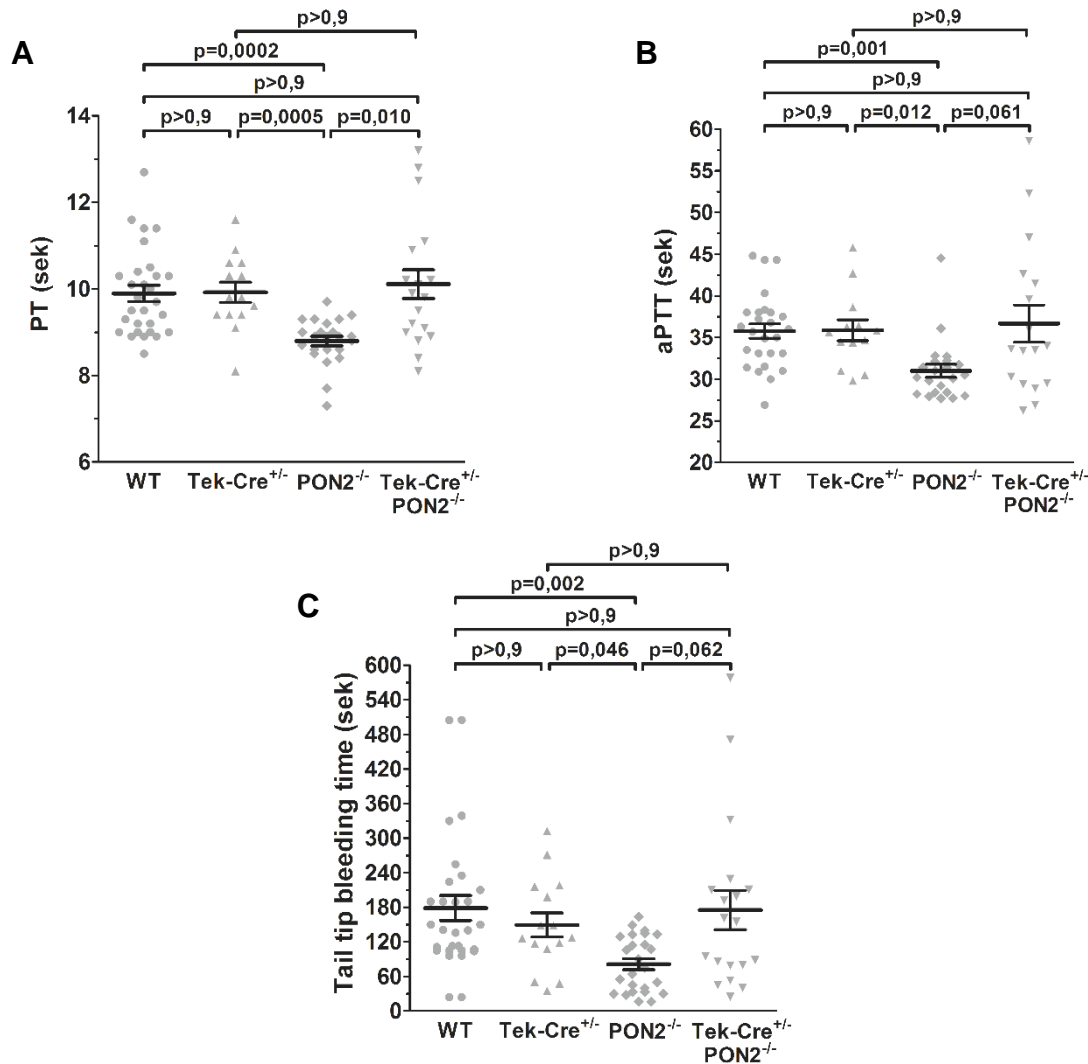
Als zweiten methodischen Ansatz zur Überprüfung der Pon2 Re-Expression in der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Linie wurde die enzymatische Laktonase-Aktivität von PON2 in ECs, BCs und Leberzellen bestimmt. Dies erfolgte anhand des PON2-vermittelten Umsatzes des Substrats N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3OC12). 3OC12 ist ein relativ spezifisches Substrat für PON2, jedoch besitzen alle Paraoxonasen eine enzymatische Laktonase-Aktivität und weisen z. T. überlappende Substratspezifitäten auf.<sup>26</sup> Da ECs und BCs kein PON1 und nur sehr schwach PON3 exprimieren,<sup>100</sup> diente die in ECs und BCs ermittelte PON2-Aktivität als spezifisches Maß für die endotheliale und hämatopoetische Pon2-Expression. Leberzellen produzieren dagegen neben PON2 auch PON1 und PON3,<sup>36, 38, 101</sup> weshalb die für Leberzellen gemessene 3OC12-Umsetzung möglicherweise zu einem geringen Anteil auch durch die Laktonase-Aktivität von PON1 und PON3 vermittelt wurde. Die Enzymaktivitätsmessung ergab eine signifikant erhöhte PON2-Aktivität in ECs und BCs von Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 5-23 D-E). Die PON2-Aktivität in Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> ECs und BCs lag bei etwa 30% der wildtypischen PON2-Aktivität. In Leberzellen ließ sich kein signifikanter Unterschied der PON2-Aktivität zwischen Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen feststellen (Abbildung 5-23 F). Die Tek-Cre<sup>+/-</sup> Kontrollen zeigten, wie erwartet, für alle Zelltypen eine ähnlich hohe PON2-Aktivität wie die WT Mäuse (Abbildung 5-23 D-F).





**Abbildung 5-23: In Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen ist die PON2-Expression in ECs und in hämatopoetischen Zellen anteilig wiederhergestellt.** (A) Die Effizienz der Tek-Cre-vermittelten Re-Expression von PON2 im Endothel wurde durch das Messen des Pon2 mRNA-Gehalts in isolierten ECs aus Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Tek-Cre<sup>+/+</sup>, Pon2<sup>-/-</sup> und WT Kontrollen mittels qRT-PCR bestimmt. Die gleichen qRT-PCR Analysen wurden für (B) isolierte Blutzellen (BCs) und (C) Gesamtleberlysate durchgeführt (n=3-10). Die mRNA-Expressionslevel wurden auf Gapdh und  $\beta$ -Actin normalisiert und sind im Graphen als % von WT dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p \leq 0,0006$ , n.s., nicht signifikant; Mann Whitney Test. (D) Die Tek-Cre-vermittelte Wiederherstellung der endothelialen PON2-Expression wurde außerdem durch die Bestimmung der PON2-Aktivität in isolierten ECs, (E) BCs, und (F) Gesamtleberproben in Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Tek-Cre<sup>+/+</sup>, Pon2<sup>-/-</sup> und WT Kontrollen verifiziert (n=7-11). Median  $\pm$  unteres/oberes Quartil mit min/max Wert. \*\*\*  $p=0,0005$ , \*\*  $p=0,0053$ ; n.s., nicht signifikant; t-Test bzw. Mann Whitney Test.

Zusammenfassend kann durch diese Untersuchungen festgehalten werden, dass im Endothel und in hämatopotischen Zellen der generierten Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Linie eine partielle Rekonstitution von PON2 erreicht wurde, welche bei rund 30% des wildtypischen PON2-Expressionslevels lag.



**Abbildung 5-24: Die Tek-Cre-vermittelte Wiederherstellung der PON2-Expression in ECs und BCs normalisiert die Gerinnung.** Die plasmatische (A) Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT) und (B) aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) von Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen sowie Tek-Cre<sup>+/+</sup>, Pon2<sup>-/-</sup> und WT Kontrollen (n=13-29) sowie (C) die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) dieser Tiere (n=15-29) wurde wie zuvor beschrieben (siehe Abbildung 5-1) ermittelt. Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* und exakten p-Werten (*multiplicity adjusted p values*).

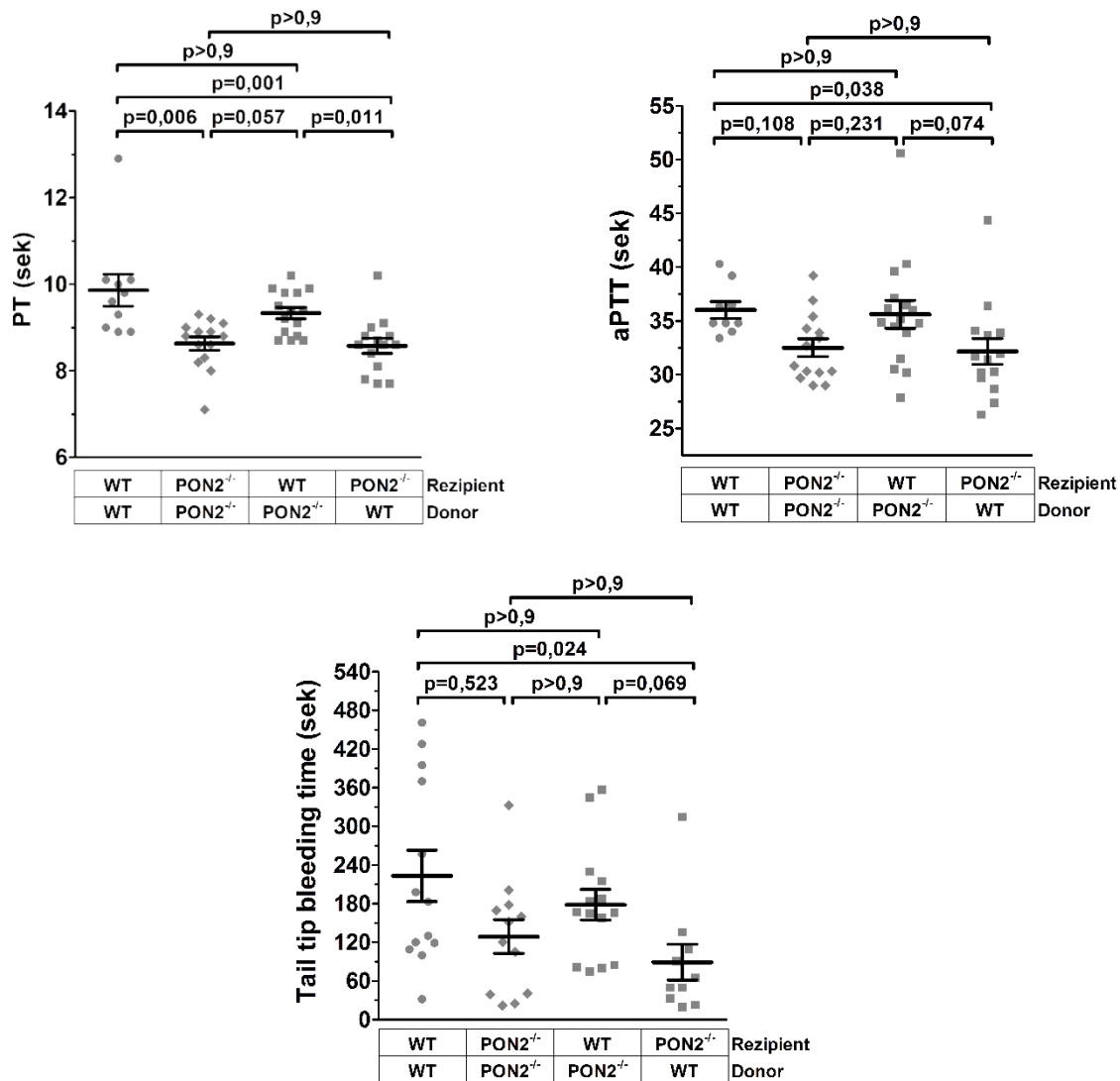
Da die vorangegangenen Analysen eine partielle Rekombination in der Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Linie belegten, wurde dieser neue Mausstamm eingesetzt, um die Endothel- und Blutzell-spezifische Funktion von PON2 in der Blutgerinnung zu untersuchen. Hierzu wurden die Gerinnungszeiten der Tek-Cre<sup>+/+</sup> Pon2<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT, Pon2<sup>-/-</sup> und Tek-Cre<sup>+/+</sup> Mäusen bestimmt. Die plasmatische PT und aPTT sowie die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen war gegenüber der WT und der Tek-Cre<sup>+/+</sup> Kontrollen signifikant erniedrigt (Abbildung 5-24 A-C), was die Ergebnisse aus 5.1.1 bestätigt und einen Einfluss der Cre-Expression per se auf die Blutgerinnung ausschließt. Interessanterweise dauerte in allen drei Messungen die

Gerinnungszeit von Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen relativ zu den Pon2<sup>-/-</sup> Kontrollen signifikant länger an. Zudem bestand zwischen den gemessenen Gerinnungszeiten der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen und WT bzw. der Tek-Cre<sup>+/-</sup> Kontrollen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 5-24 A-C). Folglich reichte die partielle Rekonstitution der PON2-Expression in den ECs und / oder hämatopoetischen Zellen aus, um einer Normalisierung der Blutgerinnung zu erreichen. Daher scheinen PON2-vermittelte Effekte in anderen Zelltypen an der Regulation der Gerinnung nicht beteiligt zu sein.

### 5.5.2 Vaskuläres PON2 normalisiert die Gerinnung

Die Ergebnisse des Tek-Cre<sup>+/-</sup> Pon2<sup>-/-</sup> Modells implizieren, dass ECs und / oder BCs für die verstärkte Blutgerinnung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich sind, wohingegen z. B. hepatische Effekte ausgeschlossen werden konnten (siehe 5.5.1). Um im nächsten Schritt zwischen der Funktion von PON2 im Endothel von der in hämatopoetischen Zellen zu differenzieren, wurde die Blutgerinnung von Knochenmark-transplantierten Chimären analysiert. Wie in 4.4.8 beschrieben und wie bereits in 5.3 angewendet, wurden mittels Knochenmarkstransplantation die vier experimentellen Gruppen generiert, in denen WT Rezipienten entweder WT oder Pon2<sup>-/-</sup> BM erhielten, ebenso wie Pon2<sup>-/-</sup> Rezipienten jeweils WT oder Pon2<sup>-/-</sup> BM verabreicht wurde.

Die ermittelte PT, aPTT und *tail tip bleeding time* der Transplantationskontrollen (WT Rezipient mit WT BM; Pon2<sup>-/-</sup> Rezipient mit Pon2<sup>-/-</sup> BM) waren im Falle von Pon2-Defizienz signifikant verkürzt (Abbildung 5-25 A-C). Diese Ergebnisse spiegeln die Resultate aus 5.1.1 wider. Die Untersuchung der reziproken BM-Chimären ergab, dass die Gerinnungszeiten der Pon2<sup>-/-</sup> Rezipienten mit WT BM auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie die Pon2<sup>-/-</sup> Transplantationskontrollen und vergleichen mit den WT Transplantationskontrollen signifikant verkürzt sind. Im Gegensatz dazu zeigte sich für WT Chimären mit Pon2<sup>-/-</sup> BM das umgekehrte Bild; die Gerinnungszeiten dieser Chimären waren gegenüber der Pon2<sup>-/-</sup> Transplantationskontrollen deutlich länger und zeigten relativ zur WT Kontrolle keinen Unterschied (Abbildung 5-25 A-C). Folglich löste die Pon2-Defizienz in der Gefäßwand die beschleunigte Gerinnung aus, wohingegen die Pon2-Defizienz in zirkulierenden BCs nicht ausreichte, um den pro-koagulatorischen Effekt der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse hervorzurufen.



**Abbildung 5-25: Die Blutgerinnungszeiten sind in Pon2<sup>-/-</sup> Knochenmark-transplantierten WT Chimären normalisiert.** Wie zuvor beschrieben (siehe Abbildung 5-1) wurde die plasmatische (A) Prothrombinzeit (*prothrombin time*, PT) und (B) aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*activated partial thromboplastin time*, aPTT) von Knochenmark-transplantierten Chimären und Kontroll-Mäusen bestimmt (n=9-16) sowie (C) die Blutungszeit der Schwanzvene (*tail tip bleeding time*) dieser Tiere gemessen (n=10-14). Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* und exakten p-Werten (*multiplicity adjusted p values*).

Zusammenfassend lässt sich anhand der Untersuchungen der *in vivo* Modelle (siehe 5.5.1 und 5.5.2) schlussfolgern, dass die verstärkte Gerinnung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse hauptsächlich durch endotheliale Effekte hervorgerufen wird. Unter Berücksichtigung der aus 5.2, 5.3 und 5.4 gewonnenen Erkenntnisse scheint PON2 die Blutgerinnung also primär über endotheliale und wahrscheinlich Redox-abhängige, inflammatorische Mechanismen zu regulieren, welche die TF-Aktivität auf ECs kontrollieren.

## **5.6 Pon2-Defizienz verursacht eine erhöhte gerinnungsfördernde Aktivität der Thrombozyten**

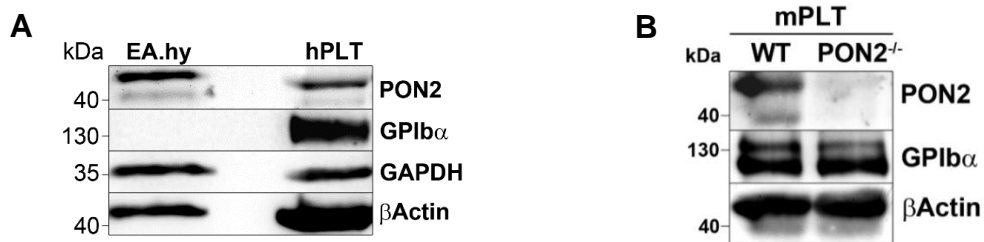
Die Blutgerinnung wird durch ein komplexes Netzwerk aus molekularen und zellulären Mediatoren reguliert. Unter den zellulären Komponenten spielen neben dem Endothel, welches im Fokus dieser Arbeit steht, die Thrombozyten (Plättchen) eine zentrale Rolle (siehe 1.1.1 und 1.1.3). Die Adhäsion der Plättchen an (sub)endotheliale Proteine, welche durch Gefäßverletzungen oder Entzündungsprozesse dem Blutstrom exponiert werden, induziert Plättchen-aktivierende Signalwege. Im Zuge der Plättchenaktivierung kommt es folglich zur Freisetzung von gerinnungsaktivierenden Faktoren aus den Granula sowie zur Aktivierung thrombozytärer Oberflächenproteine, welche die Thrombozytenaggregation einleiten.<sup>6</sup> Zudem bieten aktivierte Thrombozyten Bindestellen für Gerinnungsfaktoren, was die Ausbildung der Tenase- und Prothrombinase-Komplexe ermöglicht und damit eine enorme Anhäufung von Thrombin zur Folge hat.<sup>102</sup> Daher werden den Thrombozyten zum einen wichtige Funktionen bei der Gerinnungsinitiation und zum anderen eine substantielle Rolle bei der Gerinnungsamplifikation zugesprochen. Aus den Analysen dieser Arbeit ging hervor, dass der pro-koagulatorische Phänotyp der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse primär durch die Pon2-Defizienz im Endothel ausgelöst wird (siehe 5.5). Da Thrombozyten jedoch essentiell zur Blutgerinnung beitragen und eine mögliche Rolle der Plättchen in der Amplifikation der verstärkten Gerinnung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse vermutet wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Rolle der PON2 in der Funktion und Aktivität von Plättchen untersucht.

### **5.6.1 Verifizierung der PON2-Proteinexpression in Thrombozyten**

Untersuchungen verschiedener Forschergruppen zeigten, dass PON2 in diversen Geweben und Zelltypen exprimiert wird, u. a. auch in hämatopoetischen Zellen.<sup>36, 39</sup> Da bislang jedoch die Expression von PON2 in Thrombozyten noch nicht untersucht worden war, sollte im Vorfeld der Plättchen Analysen die thrombozytäre PON2-Proteinexpression verifiziert werden.

Isolierte Plättchen aus dem Blut von freiwilligen humanen Spendern sowie aus dem Blut von WT und Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden lysiert und mittels Western Blot auf deren PON2-Expression untersucht. Als Thrombozytenmarker diente der Plättchen Rezeptor Glykoprotein-Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ), als Ladekontrollen GAPDH und  $\beta$ -Actin. Im Vergleich zu Lysaten der humanen endothelialen Zelllinie EA.hy 926, welche als Positivkontrolle für die PON2-Expression dienten, war PON2 in

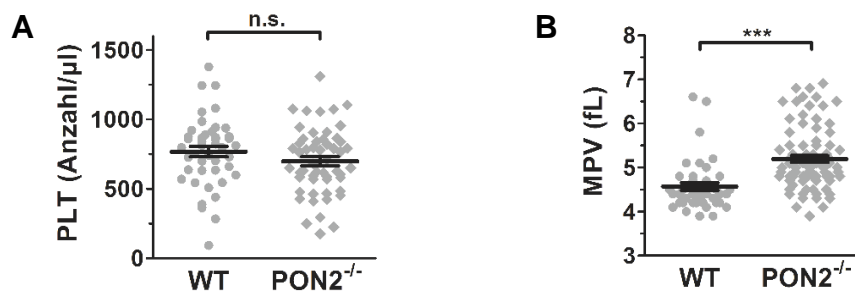
humanen Blutplättchen leicht nachweisbar (Abbildung 5-26 A). Auch die murinen WT Plättchen zeigten eine deutliche PON2-Expression (Abbildung 5-26 B), wohingegen, wie zu erwarten, kein PON2-Protein in Thrombozytenlysaten aus *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen detektierbar war.



**Abbildung 5-26: PON2-Protein ist in humanen und murinen Thrombozyten detektierbar.** Aus Vollblut isolierte Plättchen wurden isoliert und lysiert. Mittels Western Blot Analysen wurden (A) humane Thrombozyten-Lysate (hPLT) im Vergleich zu Lysaten der humanen Zelllinie EA.hy 926 (ATCC-No. CRL-2922™) und (B) murine Thrombozyten-Lysate (mPLT) von WT und *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen auf die PON2-Proteinexpression analysiert. GPIIb/IIIa diente als Thrombozytenmarker und GAPDH sowie β-Actin als Ladekontrolle. Die anhand eines Proteingrößenstandards bestimmte Molekülmasse (kDa) ist für die entsprechende Auftrennungshöhe im Blot angeben.

### 5.6.2 *Pon2*<sup>-/-</sup> Thrombozyten zeigen ein erhöhtes Zellvolumen unabhängig von der Thrombozyten-Reifung

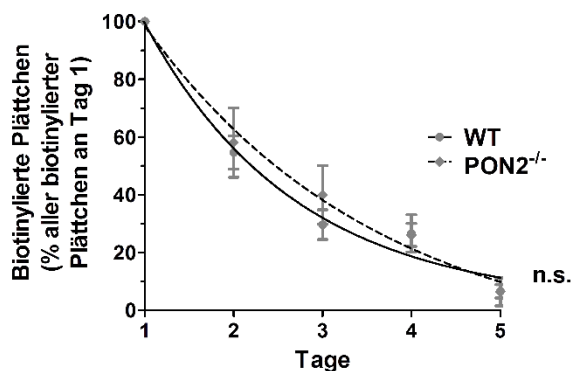
Gerinnungsstörungen sind oftmals mit einer abnormalen Anzahl und / oder Größe der Thrombozyten assoziiert. Eine verstärkte Blutungsneigung und spontane Thrombosen sind z. B. häufig auftretende Symptome von Krankheitsbildern, bei denen eine stark erhöhte oder verminderte Anzahl der Blutplättchen vorliegt.<sup>103, 104</sup> Ferner belegten Patientenstudien eine Korrelation zwischen einem erhöhten mittleren Plättchenvolumen und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>105</sup> Um zu prüfen, ob PON2 die Anzahl oder Größe der Thrombozyten beeinflusst, wurde mittels hämatologischer Tests die Zahl und das Volumen der Plättchen im Vollblut von *Pon2*<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT Mäusen bestimmt.



**Abbildung 5-27: *Pon2*<sup>-/-</sup> Thrombozyten sind unverändert in ihrer Anzahl und zeigen ein erhöhtes mittleres Zellvolumen.** Mittels hämatologischer Untersuchung des peripheren Blutes (Blutbild) von *Pon2*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde (A) die Anzahl der Plättchen pro μl (*platelet count*, PLT) und (B) das mittlere Zellvolumen der Plättchen (*mean platelet volume*, MPV) bestimmt (n=58-80). Scatterplots zeigen die individuellen Messwerte der analysierten Tiere; Mittelwert ± SEM. \*\*\* p<0,0001; n.s. nicht signifikant; t-Test.

Dabei stellte sich keine Änderung der Anzahl der Thrombozyten (PLT) heraus (Abbildung 5-27 A). Auffallend war jedoch, dass das mittlere Plättchenvolumen (*mean platelet volume*, MPV) bei  $Pon2^{-/-}$  Mäusen gegenüber dem WT signifikant erhöht war (Abbildung 5-27 B).

Ein erhöhtes Plättchenvolumen kann auf Reifungsstörungen in der Megakaryopoese oder Thrombozytopoese zurückzuführen sein, <sup>106</sup> durch welche die Anzahl großer unvollständig differenzierter Plättchen die Menge an älteren kleineren Plättchen übersteigt. Ob die  $Pon2$ -Defizienz die Degradation und / oder Neubildung der Plättchen, also das Thrombozyten-*turnover*, beeinflusst, wurde anhand der Messung der Zirkulationsdauer von biotinylierten Plättchen *in vivo* in  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen ermittelt. Dazu wurde  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen i. v. Biotin appliziert und anschließend über einen Zeitraum von fünf Tagen die Anzahl der Biotin-markierten Thrombozyten in der Zirkulation untersucht. In regelmäßigen Abständen entnommene Blutproben wurden mit Fluoreszenz-gekoppeltem Streptavidin zur Detektion der Biotin-markierten Zellen sowie mit Fluoreszenz-konjugiertem anti-CD41 als Plättchenmarker gefärbt und mittels FACS untersucht. Da sich über den gesamten Zeitraum der Anteil biotinylierter Plättchen in der Zirkulation der  $Pon2^{-/-}$  Mäusen nicht signifikant von der in WT Mäusen unterschied (Abbildung 5-28), kann gefolgert werden, dass die Thrombozyten-Reifung durch PON2 nicht beeinflusst wird.



**Abbildung 5-28: Die Thrombozyten-Reifung ist in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen unverändert.** Die Thrombozyten-Degradation und -Neubildung wurde anhand der Zirkulationsdauer von biotinylierten Plättchen *in vivo* bestimmt.  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen wurde Biotin i. v. injiziert und anschließend über einen Zeitraum von 5 Tagen regelmäßig Blut entnommen, welches mit Fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin und Thrombozytenmarker anti-CD41 gefärbt und auf die Anzahl der biotinylierten Plättchen mittels FACS untersucht wurde (n=3-6 Mäuse). Ergebnisse sind als Prozent der biotinylierten Plättchen aller Biotin-markierten Plättchen an Tag 1 nach der Biotin-Applikation dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. Eine nichtlineare Regression ( $R^2=0,89$ ) wurde erstellt; n.s., nicht signifikant.

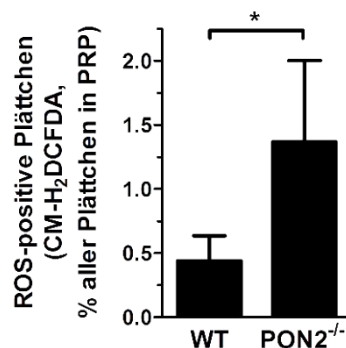
Ein vergrößertes mittleres Plättchenvolumen (MPV) ist außerdem ein wichtiger Indikator für deren pro-koagulatorische Aktivität. Plättchenfunktionsstudien zeigten, dass ein erhöhtes MVP mit einer verstärkten Thrombozytenaggregation und einem höheren Gehalt an sekretorischen

Granula und gerinnungsinduzierenden Proteinen korreliert.<sup>107, 108</sup> Im Folgenden wurde daher überprüft, ob Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen reaktiver sind als WT Plättchen und welche Mechanismen einer Pon2<sup>-/-</sup>-induzierten erhöhten Plättchenaktivität zugrunde liegen könnten.

### 5.6.3 Pon2-defiziente Thrombozyten produzieren mehr reaktive Sauerstoffspezies

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegten, dass Pon2-Defizienz eine verstärkte ROS-Produktion durch vaskuläre Zellen sowie im Speziellen durch ECs verursacht, was die anti-oxidative Funktion von PON2 *in vivo* unter basalen Bedingungen belegte (siehe 5.2.1). Da ROS ebenfalls in Thrombozyten die pro-koagulatorische Aktivität steigert<sup>109</sup> und weil ein solcher Vorgang im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen stünde, wurde die endogene ROS-Produktion in WT und Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten verglichen.

Dazu wurde Plättchen-reiches Plasma aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit dem ROS-Indikator CM-H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt und der Anteil ROS-positiver Plättchen in der detektierten Plättchenpopulation quantifiziert. Im Vergleich zu den WT Kontrollen ergab sich hierbei ein signifikant gesteigerter ROS-Gehalt in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 5-29). Somit scheint Pon2-Defizienz auch in Thrombozyten erhöhten oxidativen Stress zu induzieren, was eine verstärkte gerinnungsfördernde Aktivität der Thrombozyten verursachen könnte.



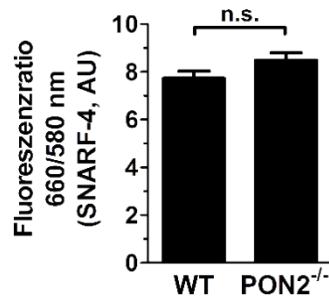
**Abbildung 5-29: Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen zeigen einen erhöhten Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).** Plättchen-reiches Plasma (PRP) aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde mit dem ROS-Marker CM-H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt. Mittels FACS wurde die Intensität der CM-H<sub>2</sub>DCFDA-Fluoreszenz der Plättchen bestimmt. Der ROS-Gehalt ist im Graphen als Anteil der CM-H<sub>2</sub>DCFDA-positiven Plättchen von allen detektierten Plättchen im PRP dargestellt; Mittelwert ± SEM. \* p=0,0347; Mann Whitney Test.



#### 5.6.4 Der intrazelluläre pH-Wert von Thrombozyten ist in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert

Aus jüngsten Studien der Arbeitsgruppe ging hervor, dass PON2 durch die enzymatische Hydrolyse des Laktons 3OC12 (N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone) eine saure Verbindung generiert, was in Summe den mitochondrialen bzw. cytoplasmatischen pH-Wert erniedrigt.<sup>75</sup> Zwar sind die natürlichen Substrate von PON2 unbekannt, dennoch ist somit über die enzymatische Aktivität eine Beeinflussung des intrazellulären pH-Werts durch PON2 denkbar. Da der pH-Wert die Aktivität von Plättchen beeinflusst,<sup>110</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Pon2-Defizienz *in vivo* eine Änderung des Thrombozyten pH-Werts induziert.

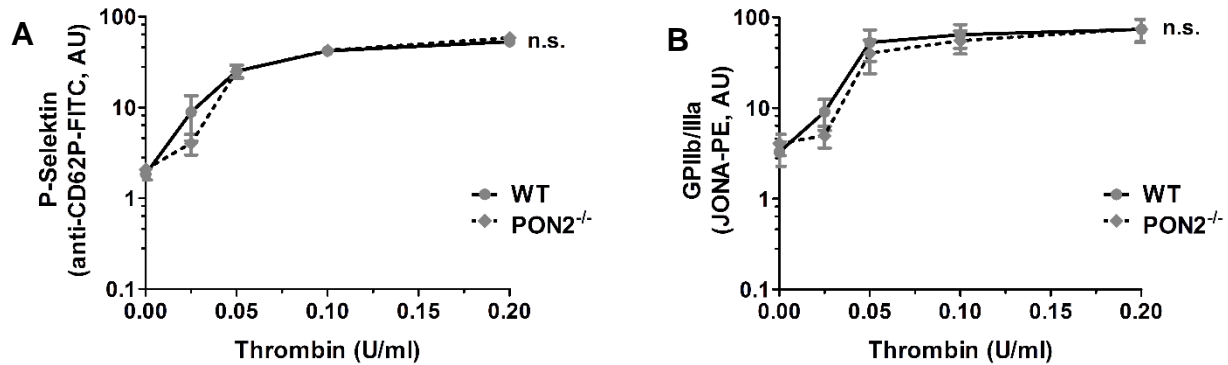
Durchflusszytometrische Analysen, bei denen mithilfe des fluoreszenten pH-Wert Indikators SNARF-4 der intrazelluläre pH-Wert von Plättchen im Plättchen-reichen Plasma von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem von WT Mäusen verglichen wurde, zeigten keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 5-30). PON2 scheint daher basal den intrazellulären pH-Wert der Thrombozyten nicht zu beeinflussen.



**Abbildung 5-30: Pon2-Defizienz verursacht keine Änderung des intrazellulären Thrombozyten pH-Werts.** Isolierte Thrombozyten aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurden dem pH-Wert Indikator SNARF-4 beladen. Die pH-abhängige Wellenlängenverschiebung der Emission in saurem (580 nm) und basischem (660 nm) Milieu wurde durch die Messung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten (660/580 nm) mittels FACS bestimmt (n=9-10). Eine Erhöhung der Fluoreszenzratio (660/580 nm) zeigt eine Erhöhung des intrazellulären pH-Werts an. Mittelwert ± SEM. n.s., nicht signifikant; t-Test.

#### 5.6.5 Thrombozytäre Aktivierungsmarker sind in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert

Thrombozyten reagieren in Antwort auf aktivierende Stimuli, wie z. B. Thrombin, mit einer gesteigerten P-Selektin-Expression sowie mit der Aktivierung des Integrins GPIIb/IIIa auf deren Oberfläche.<sup>111, 112</sup> Dies ermöglicht die Adhäsion von Plättchen an der Gefäßwand, die Interaktion mit Leukozyten und die Plättchenaggregation.



**Abbildung 5-31: Die Expression der Aktivierungsmarker P-Selektin und aktiviertes GPIIb/IIIa sind auf Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen unverändert.** Plättchen-reiches Plasma aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde mit verschiedenen Thrombin-Konzentrationen (0,025-0,200 U/ml) stimuliert oder blieb unbehandelt und wurde mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gegen thrombozytäre Aktivierungsmarker gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von **(A)** P-Selektin und **(B)** aktiviertem GPIIb/IIIa auf den Plättchen in Abhängigkeit der Thrombin-Stimulation quantifiziert (n=7). Mittelwert ± SEM. n.s., nicht signifikant; 2-way ANOVA mit *Bonferroni multiple comparison test*.

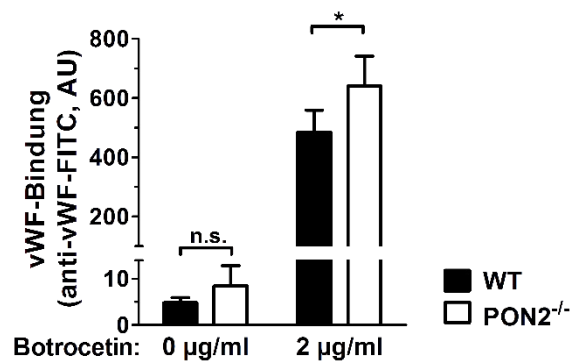
Um zu prüfen, ob die Expression dieser Aktivierungsmarker auf der Oberfläche Pon2-defizienter Thrombozyten verändert ist, wurde Plättchen-reiches Plasma aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit steigenden Konzentrationen von Thrombin stimuliert und mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern gegen P-Selektin und gegen aktiviertes GPIIb/IIIa gefärbt. Anhand der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Aktivierungsmarker war kein Unterschied zwischen Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen festzustellen (Abbildung 5-31 A-B). Eine erhöhte P-Selektin-Expression und Integrin-Aktivierung auf Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen in Antwort auf Thrombin ist daher auszuschließen.

### 5.6.6 vWF bindet verstärkt an Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen

Das Glykoprotein vWF, welches im Plasma sowie in der Gefäßwand vorkommt, nimmt aufgrund seiner Wechselwirkung mit verschiedenen Faktoren im Prozess der Blutgerinnung eine wichtige und multifunktionale Rolle ein. vWF vermittelt die Bindung zwischen den Blutplättchen und der Gefäßwand und dient in der plasmatischen Gerinnung als Trägerprotein für den Gerinnungsfaktor FVIII.<sup>6</sup> Nach Aktivierung der Gerinnung bindet vWF außerdem verstärkt an aktivierte Plättchen.<sup>113</sup> Da aufgrund des pro-koagulatorischen Phänotyps der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse (siehe 5.1) und des vergrößerten Plättchenvolumens (siehe 5.6.2) eine erhöhte Thrombozyten-Aktivität vermutet wurde, wurde die vWF-Bindungskapazität der Plättchen aus Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen bestimmt.

Plättchen reiches Plasma (PRP) aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde mit Botrocetin behandelt oder blieb unbehandelt. Botrocetin diente der Induktion der Bindung von vWF an den

Glykoproteinrezeptor GPIIb. Anschließend wurde mithilfe eines fluoreszenz-konjugierten anti-vWF Antikörpers die vWF-Bindung an die Thrombozyten im PRP durchflusszytometrisch bestimmt. Die FACS Analyse zeigte eine deutlich verstärkte vWF-Bindung an Plättchen von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zur WT Kontrolle. Schon unter basalen Bedingungen war eine tendenziell erhöhte vWF-Bindung an Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten zu erkennen (p=0,117), was sich nach Stimulation mit Botrocetin durch eine signifikante Zunahme der Bindungskapazität bestätigte (Abbildung 5-32). Demnach lässt sich schlussfolgern, dass trotz unveränderter Aktivierungsmarker in Reaktion auf Thrombin (siehe 5.6.5) eine erhöhte Plättchen-Aktivität in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen vorliegt.



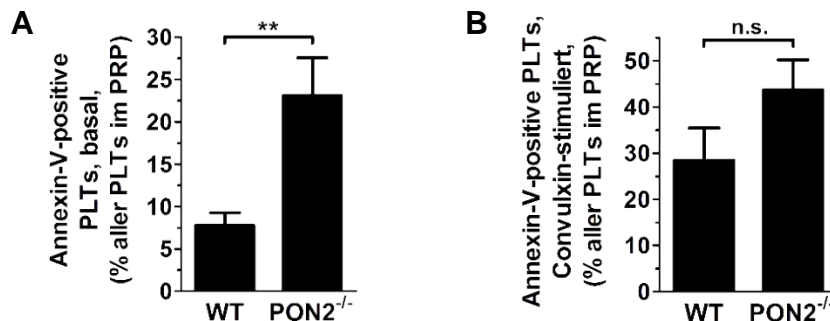
**Abbildung 5-32: Die Bindung von vWF an Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten ist nach Botrocetin-Stimulation erhöht.** Aus Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde Plättchen-reiches Plasma (PRP) isoliert und mit 2 µg/ml Botrocetin stimuliert oder blieb unbehandelt. Die Thrombozyten im PRP wurden mit einem Fluoreszenz-gekoppelten anti-vWF Antikörper gefärbt und auf die vWF-Bindungskapazität *ex vivo* (basal, 0 µg/ml Botrocetin) sowie nach bindungsinduzierender Stimulation (2 µg/ml Botrocetin) mittels FACS untersucht (n=5). Mittelwert ± SEM. \* p=0,0367; n.s. nicht signifikant; t-Test.

### 5.6.7 Die gerinnungsaktivierende Funktion der Thrombozyten ist von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression abhängig

Für einen effektiven Reaktionsablauf der plasmatischen Gerinnungskaskade ist die Anwesenheit von speziellen Phospholipidmembranstrukturen notwendig. Wie bereits unter 5.2.5 beschrieben, dient insbesondere Phosphatidylserin (PS) in der Plasmamembran als Katalysator der enzymatischen Gerinnungskaskade, da es die Bindung von Gerinnungsfaktoren ermöglicht und dadurch deren Aktivierung begünstigt. PS wird vor allem an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten bereitgestellt. Infolge der Thrombozytenaktivierung z. B. durch die Bindung von Thrombin oder Kollagen, erhöht sich der Anteil des auf der Oberfläche exponierten PS um ein Vielfaches und hat eine deutliche Steigerung der gerinnungsaktivierenden Funktion der Thrombozyten zur Folge.<sup>69</sup> Da Pon2<sup>-/-</sup> ECs PS verstärkt exponierten (siehe 5.2.5) und anhand der verstärkten vWF-Bindung ein aktivierter Plättchen-Phänotyp in Pon2<sup>-/-</sup> Tieren zu vermuten war

(siehe 5.6.6), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob auch  $Pon2^{-/-}$  Thrombozyten vermehrt PS auf der Zelloberfläche tragen. Dies würde eine stark gerinnungsaktivierende Funktion darstellen.

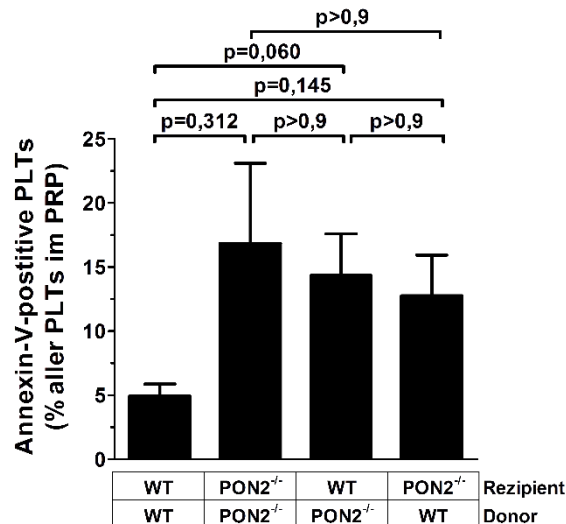
Zur Untersuchung der PS-Externalisierung auf Thrombozyten unter basalen Bedingungen und nach Plättchen-Aktivierung wurde Plättchen-reiches Plasma aus  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen, welches entweder unstimuliert blieb oder mit Convulxin behandelt wurde, mit Fluoreszenzgekoppeltem Annexin V gefärbt. Das Ausmaß der Annexin V-Bindung an PS der Plasmamembran von Thrombozyten wurde anschließend mittels FACS ermittelt. Dabei fiel auf, dass die Thrombozyten aus  $Pon2^{-/-}$  Mäusen *ex vivo* ohne Zugabe aktivierender Agonisten bereits signifikant mehr PS exponierten als Thrombozyten aus WT Mäusen (Abbildung 5-33 A). In Antwort auf die Stimulation mit Convulxin, welches den Plättchen-Agonisten Collagen simulierte, war die PS-Exposition auf  $Pon2^{-/-}$  Plättchen gegenüber WT Plättchen ebenfalls tendenziell erhöht, was jedoch statistisch nicht signifikant war ( $p=0,133$ ; Abbildung 5-33 B). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die  $Pon2$ -Defizienz eine basal erhöhte prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten bewirkt. Eine zusätzliche Stimulation potenzierte die erhöhte PS-Exposition gegenüber der Kontrolle nicht.



**Abbildung 5-33:  $Pon2^{-/-}$  Thrombozyten zeigen unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Phosphatidylserin-Exposition.** Aus Citrat-Vollblut präpariertes Plättchen-reiches Plasma (PRP) von  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen blieb unbehandelt oder wurde mit 50 ng/ml Convulxin stimuliert und wurde mit Fluoreszenz-konjugiertem Annexin V gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Ausmaß der Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin (PS) der Thrombozyten-Plasmamembran **(A)** unter basalen Bedingungen sowie **(B)** nach Convulxin-Stimulation bestimmt ( $n=7-8$ ). Die gemessenen PS-Expositionen sind in den Graphen als Anteil Annexin V-positiver Plättchen (PLTs) aller detektierter PLTs im PRP dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*  $p=0,0071$ ; n.s., nicht signifikant; t-Test.

Nachfolgend wurde differenziert, ob die basal erhöhte pro-koagulatorische Aktivität der  $Pon2^{-/-}$  Thrombozyten endogen bestimmt wird oder z. B. von endothelialer Stimulation abhängt. Um dies beantworten zu können, wurde die PS-Exposition auf Plättchen von Knochenmarkstransplantierten chimären Mäusen analysiert (siehe 4.4.8, und wie bereits angewendet in 5.3 und 5.5.2). Somit konnte die Funktion der Thrombozyten der Funktion der Gefäßwand gegenübergestellt werden. Die  $Pon2^{-/-}$  Transplantationskontrollen zeigten tendenziell eine erhöhte

PS-Externalisierung, was jedoch aufgrund einer hohen Varianz nicht signifikant war (Abbildung 5-34). Interessanterweise konnte zwischen den reziprok transplantierten Chimären keine Differenz festgestellt werden. Da beide Chimären eine gegenüber dem WT erhöhte PS-Exposition zeigten (Abbildung 5-34), scheint sowohl die Pon2-Defizienz in den Plättchen als auch jene in der Gefäßwand die pro-koagulatorische Aktivität der Thrombozyten in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen auszulösen.

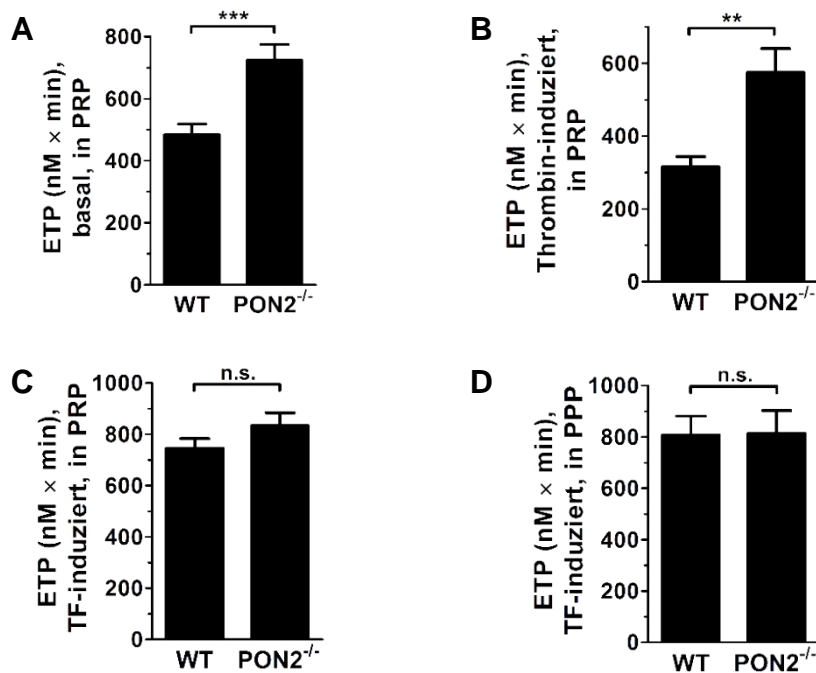


**Abbildung 5-34: Die erhöhte Phosphatidylserin-Exposition auf Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen ist abhängig von vaskulären und thrombozytären Effekten.** Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurde aus Citrat-Vollblut von Knochenmark-transplantierten Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen präpariert und mit Fluoreszenz-konjugiertem Annexin V gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Ausmaß der Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin (PS) der Thrombozyten-Plasmamembran unter basalen Bedingungen bestimmt (n=7-8). Die gemessenen PS-Expositionen sind in den Graphen als Anteil Annexin V-positiver Plättchen (PLTs) aller detektierter PLTs im PRP dargestellt; Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* und exakten p-Werten (*multiplicity adjusted p values*).

### 5.6.8 Die Thrombozyten-vermittelte Thrombingenerierung ist von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression abhängig

Als Folge der Bindung von Gerinnungsfaktoren an die PS-exponierende Oberfläche von aktivierten, pro-koagulatorischen Thrombozyten wird die enzymatische Reaktionskaskade maßgeblich stimuliert, wodurch eine große Menge an Thrombin generiert wird. Diese Anhäufung von Thrombin durch die Aktivität der Gerinnungsfaktorkomplexe auf der Zelloberfläche wird als *thrombin burst* bezeichnet (siehe 1.1.3).<sup>102</sup> Ob demensprechend eine erhöhte Thrombingenerierung mit der verstärkten thrombozytären PS-Externalisierung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe 5.6.7) einhergeht, wurde im Folgenden verifiziert.

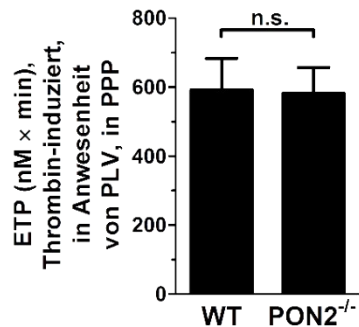
*In vitro* kann die Thrombingenerierung durch die *calibrated automated thrombography* (CAT) untersucht werden. So wurde mittels dieser Methode in Plättchen-reichem und Plättchen-armem Plasma (PRP; PPP) aus *Pon2*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen die Thrombingenerierung basal sowie Thrombin- und TF-induziert gemessen. Das Ausmaß der Thrombingenerierung wurde als endogenes Thrombinpotential (ETP) bestimmt, welches der Fläche unter der im CAT-Assay gemessenen Thrombinkonzentrations-Zeit-Kurve entspricht. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die basale als auch die Thrombin-stimulierte Plättchen-vermittelte Thrombinbildung im PRP von *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen deutlich erhöht ist (Abbildung 5-35 A-B). Im Gegensatz dazu war TF-induzierte Thrombingenerierung im PRP sowie im PPP gegenüber dem WT unverändert (Abbildung 5-35 C-D).



**Abbildung 5-35: Die basale und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in Plättchen-reichem Plasma ist in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht.** Plättchen-reiches Plasma (PRP) sowie Plättchen-armes Plasma (PPP) wurde aus Citrat-Vollblut von *Pon2*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen präpariert. Mittels *calibrated automated thrombography* wurde im PRP die (A) basale ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte), (B) die Thrombin-induzierte (Thrombin +  $\text{Ca}^{2+}$ ) und (C) *Tissue Factor* (TF)-induzierte (TF +  $\text{Ca}^{2+}$ ) Thrombingenerierung gemessen (n=7-13). Gleichermaßen wurde (D) in PPP die TF-induzierte (TF +  $\text{Ca}^{2+}$ ) Thrombin-Generierung bestimmt (n=7-8). Die Thrombingenerierung ist als endogenes Thrombinpotential, was der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht, dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\* p= 0,0007; \*\* p=0,0034; n.s., nicht signifikant; t-Test.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine verstärkte Aktivität der kontaktabhängigen plasmatischen Gerinnungsfaktoren festgestellt (siehe 5.1.2). Zur Überprüfung ob die erhöhte Aktivität der intrinsischen Gerinnungsfaktoren am erhöhten ETP in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen beteiligt sind, wurde die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PPP in der Anwesenheit von Phospholipidvesikeln

bestimmt. Die Phospholipidvesikel ersetzen dabei die Funktion der Plättchen, wodurch ausschließlich die Rolle der im Plasma befindlichen Gerinnungsfaktoren in der Thrombinbildung widerspiegelt wurde. Da sich dies im PPP von  $Pon2^{-/-}$  Mäusen nicht von der WT Kontrolle unterschied (Abbildung 5-36), konnte eine Rolle der intrinsischen Gerinnungsfaktoren ausgeschlossen werden.



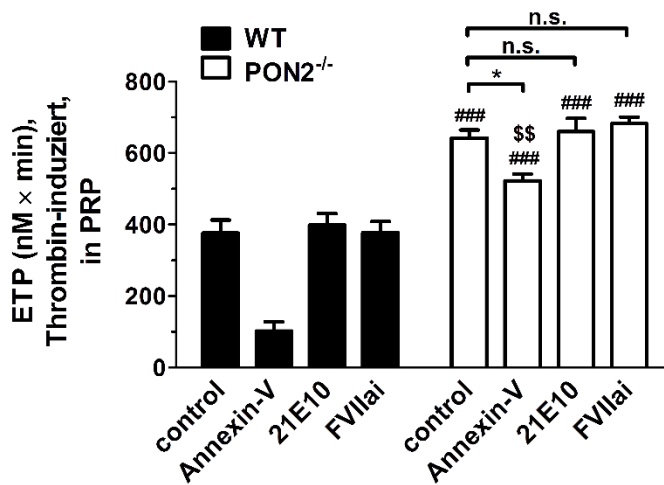
**Abbildung 5-36: Das erhöhte Thrombinpotential im Plättchen-reichen Plasma von  $Pon2^{-/-}$  Mäusen ist nicht auf eine verstärkte Aktivierung von kontaktabhängigen Gerinnungsfaktoren zurückzuführen.** Plättchen-armes Plasma (PPP) wurde aus Citrat-Vollblut von  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen präpariert und mit Phospholipidvesikeln (PLV) versetzt. Mittels *calibrated automated thrombography* wurde die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung gemessen ( $n=7$ ). Die Thrombingenerierung ist als endogenes Thrombinpotential, was der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht, dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. n.s., nicht signifikant; t-Test.

Aufgrund der zentralen Funktion von *Tissue Factor* (TF) als Initiator der Gerinnung sowie der in dieser Arbeit beschriebenen verstärkten TF-Aktivität auf  $Pon2^{-/-}$  ECs (siehe 5.4.2) wurde analysiert, ob TF auf der Oberfläche von  $Pon2^{-/-}$  Thrombozyten zum erhöhten ETP beiträgt. Dies wurde überprüft, indem das PRP im Vorfeld der CAT-Messung mit dem TF-blockierenden 21E10 Antikörper oder mit inhibitorischem FVIIa (FVIIai) inkubiert wurde. Weder die 21E10- noch die FVIIai-vermittelte TF-Inhibition auf Plättchen bewirkte eine Normalisierung der im  $Pon2^{-/-}$  PRP erhöhten Thrombingenerierung (Abbildung 5-37), was für eine vom Thrombozyten TF unabhängige Thrombingenerierung im PRP von  $Pon2^{-/-}$  Mäusen spricht.

Da, wie bereits erläutert, PS auf der Oberfläche von Thrombozyten substantiell zur Generierung von Thrombin beiträgt und eine erhöhte PS-Exposition auf  $Pon2^{-/-}$  Plättchen festgestellt wurde (siehe 5.6.7), erfolgte die Messung des ETP außerdem nach Präinkubation des PRP mit PS-blockierenden Annexin V. Dies diente der Aufklärung des möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen der PS-Exposition und der Thrombingenerierung durch  $Pon2^{-/-}$  Plättchen. Annexin V reduzierte das ETP im  $Pon2^{-/-}$  PRP signifikant im Vergleich zu unbehandeltem  $Pon2^{-/-}$  PRP, jedoch führte die PS-Inhibition nicht zu einer kompletten Normalisierung des ETPs auf WT Niveau (Abbildung 5-37). Dies lässt vermuten, dass die PS-Externalisierung zur verstärkten



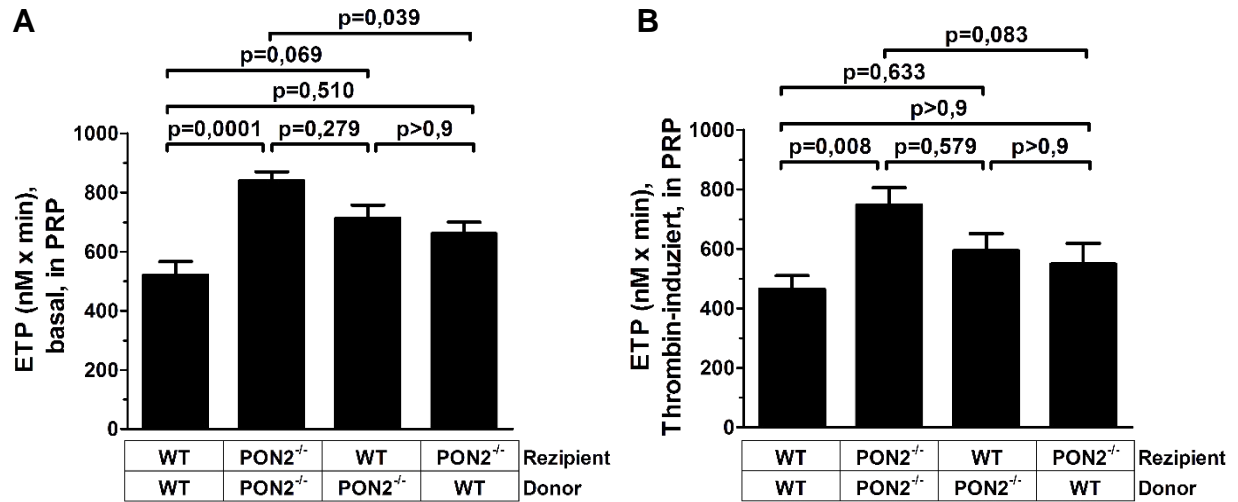
Thrombozyten-vermittelten Thrombinbildung in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen beträgt, aber nicht alleinig dafür verantwortlich ist.



**Abbildung 5-37: Das erhöhte Thrombinpotential im Plättchen-reichen Plasma von  $Pon2^{-/-}$  Mäusen ist teilweise Phosphatidylserin-vermittelt und unabhängig von Thrombozyten TF.** Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurde aus Citrat-Vollblut von  $Pon2^{-/-}$  und WT Mäusen präpariert und die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung im PRP mittels *calibrated automated thrombography* gemessen, wobei das PRP mit Phosphatidylserin-blockierendem Annexin V, mit anti-mouse Tissue Factor (TF) Antikörper 21E10 oder TF-inhibierendem FVIIai inkubiert wurde oder unbehandelt blieb ( $n=6-7$ ). Die Thrombingenerierung ist als endogenes Thrombinpotential, was der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht, dargestellt; Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p<0,01$  vs. angegebene Gruppe; ###  $p<0,001$  vs. gleichermaßen behandelter WT Kontrolle; \$\$  $p<0,01$  vs. unbehandelter WT Kontrolle; n.s., nicht signifikant; 1-way ANOVA mit *Bonferroni's multiple comparison test*.

Die vorangegangenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erhöhte pro-koagulatorische Aktivität der Plättchen in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen nicht nur durch die  $Pon2$ -Defizienz in den Thrombozyten selbst, sondern auch durch externe Signale induziert wird. Um den Einfluss der thrombozytären  $PON2$ -Expression von dem der vaskulären  $PON2$ -Expression auf die Thrombingenerierung im PRP zu differenzieren, wurde das ETP im PRP von Knochenmark-transplantierten Mäusen gemessen (siehe 4.4.8). Die  $Pon2^{-/-}$  Transplantationskontrollen zeigten, wie erwartet, eine signifikant erhöhte basale und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung verglichen mit den WT Kontrollen (Abbildung 5-38 A-B), was die Ergebnisse aus Abbildung 5-35 bestätigte. Die Untersuchung der reziproken Chimären ergab sowohl für die WT Rezipienten mit  $Pon2^{-/-}$  BM als auch für die  $Pon2^{-/-}$  Rezipienten mit WT BM ein intermediäres ETP, welches zwischen dem WT und  $Pon2^{-/-}$  Level lag (Abbildung 5-38 A-B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Plättchen-abhängige Effekte alleine nicht ausreichen, um die erhöhte Thrombingenerierung in  $Pon2^{-/-}$  Mäusen zu verursachen, sondern vielmehr, dass sowohl thrombozytäre als auch Plättchen-unabhängige, vaskuläre Effekte dazu beitragen.

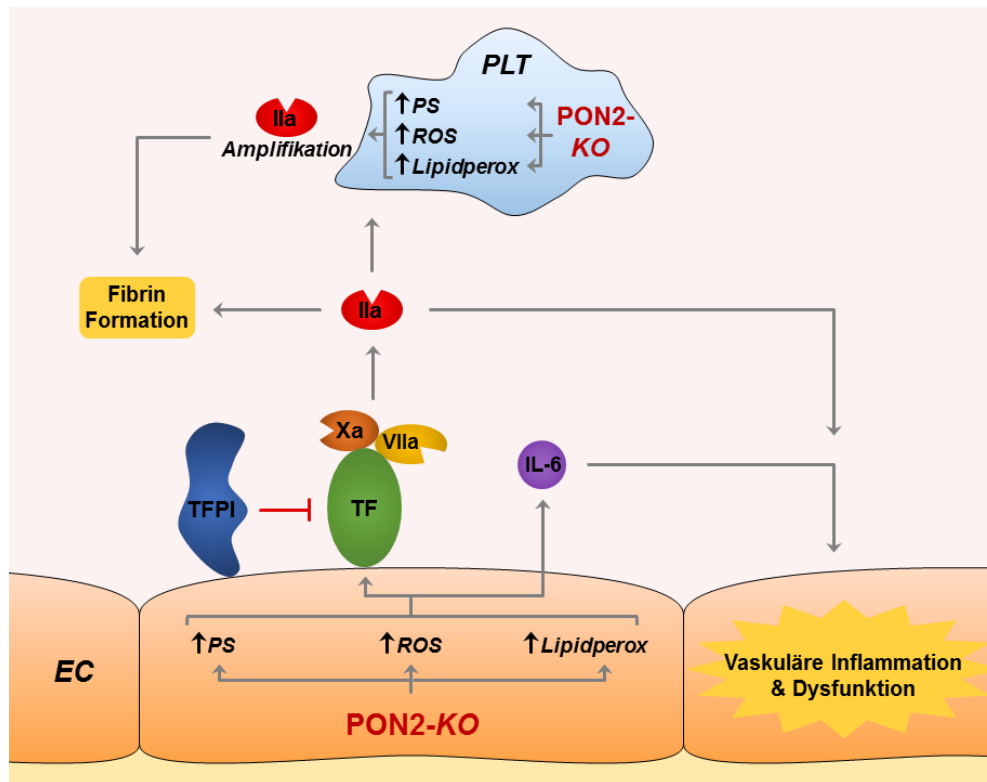




**Abbildung 5-38: Die Plättchen-vermittelte Thrombingenerierung ist abhängig von der vaskulären und thrombozytären PON2-Expression.** Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurde aus Citrat-Vollblut von Knochenmark-transplantierten Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen präpariert und (A) basale und (B) die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung im PRP mittels *calibrated automated thrombography* gemessen (n=12-14). Die Thrombingenerierung ist als endogenes Thrombinpotential, was der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht, dargestellt; Mittelwert ± SEM. Kruskal Wallis Test mit *Dunn's multiple comparison test* und exakten p-Werten (*multiplicity adjusted p values*).

## 6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle der PON2 in der Blutgerinnung charakterisiert. Bisherige Studien zeigten, dass PON2 zentral in pathologische Prozesse des kardiovaskulären Systems, wie z. B. der Arteriosklerose, involviert ist.<sup>52, 53</sup> Jedoch blieb bislang eine mögliche Funktion der PON2 im hämostatischen System völlig unbekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine wesentliche Funktion der PON2 in der endothelialen Gerinnungsregulation und in damit verbundenen Redox-abhängigen und inflammatorischen Signalwegen in der Gefäßwand sowie in Thrombozyten. In Abbildung 6-1 ist der vorgeschlagene Mechanismus der durch Pon2-Defizienz induzierten Gerinnungsaktivierung zusammenfassend dargestellt, der anhand der Erkenntnisse dieser Arbeit aufgestellt wurde und im Folgenden diskutiert wird.



**Abbildung 6-1: Schematische Illustration der vorgeschlagenen Endothel-abhängigen und Plättchen-vermittelten Prozesse, welche die Aktivierung der Blutgerinnung sowie die vaskulären Entzündungsprozesse im Pon2<sup>-/-</sup> Modell induzieren.** Pon2-Defizienz (PON2-KO) im Endothel (EC) induziert eine erhöhte reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion, Phosphatidylserin (PS)-Exposition sowie Lipidperoxidation (Lipidperox) und bewirkt dadurch eine verstärkte endotheliale TF-Aktivität, welche zusätzlich durch eine verminderte endotheliale TFPI-Expression verstärkt wird. Die pro-koagulatorische TF-Aktivität (TF-FVIIa/FXa) führt zu einer erhöhten Thrombin(IIa)-Generierung, Fibrin-Bildung und Plättchen (PLT)-Aktivierung. Pon2-Defizienz in den PLTs unterstützt die verstärkte Gerinnungsreaktion durch Redox-abhängige Prozesse. Der EC-vermittelte erhöhte IL-6 Plasmaspiegel bewirkt einen systemischen pro-inflammatorischen Status, welcher zur verstärkten Gerinnungsreaktion sowie zur endothelialen Dysfunktion beitragen könnte.

## 6.1 PON2 reguliert die koagulatorische Aktivität des Endothels

Die in dieser Arbeit angewendeten experimentellen *in vitro* und *in vivo* Ansätze deckten neue Signalwege auf, durch welche die endothelial exprimierte PON2 die Aktivität von *Tissue Factor* (TF) auf Endothelzellen (ECs) und damit die Gerinnungsreaktion reguliert. Die essentielle Rolle des Endothels in der PON2-vermittelten Gerinnungsregulation wurde durch zwei verschiedene *in vivo* Modelle aufgeklärt. Zum einen konnte der pro-koagulatorische Phänotyp der *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäuse durch die genetische, Cre-vermittelte Rekonstitution der endothelialen und hämatopoetischen PON2 normalisiert werden. Dieses Modell schloss hepatische Effekte bzw. solche von hepatisch-sekretierten Faktoren nahezu aus. Zum anderen reichte in Knochenmarks-transplantierten Chimären die hämatopoetische PON2-Expression nicht aus, um die Gerinnung zu normalisieren. Deshalb konnte ein möglicher überwiegender Beitrag von zirkulierenden hämatopoetischen Zellen, wie z. B. den Thrombozyten, an der verstärkten Gerinnung der *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäuse ausgeschlossen werden. Da außerdem das *Pon2*<sup>-/-</sup> Endothel eine erhöhte TF-Aktivität im Vergleich zum WT aufwies und die Applikation von anti-TF Antikörpern den *Pon2*<sup>-/-</sup>-induzierten pro-koagulatorischen Phänotyp normalisierte, ist auf eine zentrale Rolle des endothelialen TF-Signalwegs in der Gerinnungsregulation durch PON2 zurückzuschließen.

Obwohl die Expression von TF auf ECs durch pathologische Stimuli induziert werden kann<sup>11, 98</sup> und *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäuse pro-inflammatorische Cytokine verstärkt exprimierten, zeigten *Pon2*<sup>-/-</sup> ECs keine signifikante Änderung des endothelialen TF mRNA- oder Proteingehalts, wohl aber eine Änderung der TF-Aktivität. Demnach scheint PON2 nicht die TF-Expression, sondern die post-transkriptionelle Regulation von TF zu beeinflussen. Wie bereits 1975 durch Maynard et al. gezeigt, kommt TF auf der Zelloberfläche in einem ruhenden Zustand vor.<sup>114</sup> Spätere Studien lieferten Beweise, dass TF tatsächlich in zwei Formen mit unterschiedlicher koagulatorischer Aktivität auf der Zelloberfläche existiert.<sup>115</sup> Zudem wurde gezeigt, dass der TF-Expressionslevel und die TF-FVIIa-Bindung nicht ausnahmslos mit der pro-koagulatorischen Aktivität linear korrelieren.<sup>116</sup> Auf der Grundlage dieser und weiterer Studien ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass die gerinnungsfördernde Aktivität von TF v. a. post-transkriptionell durch die Umwandlung der kryptischen Form von TF in die vollständig gerinnungsaktive Form von TF reguliert wird, was als „*TF decryption*“ bezeichnet wird. Durch welche Mechanismen dies vermittelt wird, ist bislang nicht vollständig geklärt. Neuerdings wird die Redox-abhängige Ausbildung einer Disulfid-Bindung zwischen dem Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup> als ein möglicher TF-Aktivitäts-

induzierender Mechanismus diskutiert.<sup>117, 118</sup> Des Weiteren belegten eine Reihe von Studien, dass die Anwesenheit von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche eine Schlüsselrolle in der TF-Aktivierung einnimmt.<sup>119-122</sup> In Anbetracht der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten erhöhten ROS-Produktion und verstärkten PS-Externalisierung der Pon2<sup>-/-</sup> ECs, könnte PON2 normalerweise die endotheliale TF-Aktivität durch den Schutz vor oxidativem Stress und vor der Externalisierung von PS regulieren (Abbildung 6-1). PON2 ist in den Mitochondrien lokalisiert und vermindert die Produktion von Superoxid, möglicherweise durch die Bindung an Coenzym Q10 der mitochondrialen Atmungskette, was die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoffmoleküle an Komplex I und III verhindert.<sup>37, 39, 40</sup> Somit könnte PON2 durch diese anti-oxidative Funktion die Redox-abhängige Regulation der TF-Aktivierung beeinflussen, z. B. über den Redox-Status der TF Disulfid-Bindung. Vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Überexpression von PON2 in ECs, welche mit ROS-induzierende Substanzen stimuliert wurden, nicht nur die Superoxid-Produktion vermindert, sondern auch die Externalisierung von PS reduziert.<sup>21, 39</sup> Da oxidierende Sauerstoffspezies die PS-Externalisierung induzieren,<sup>123</sup> ist ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen der erhöhten ROS-Bildung und der folglich verstärkten PS-Externalisierung von Pon2<sup>-/-</sup> EC naheliegend. Interessant in diesem Zusammenhang ist außerdem, dass PON2 durch die Verminderung der mitochondrialen Superoxid-Produktion vor dem apoptotischen Zelltod schützt.<sup>39</sup> Im Hinblick darauf wird eine mögliche Redox-abhängige PS-Externalisierung als Ursache der erhöhten TF-Aktivität in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zusätzlich durch Studien unterstützt, die belegten, dass PS der Oberfläche von apoptotischen Zellen eine TF-abhängige pro-koagulatorische Aktivität verleiht.<sup>124</sup> Darüber hinaus bewirkt die PS-Externalisierung in pro-apoptotischen Zellen von arteriosklerotischen Plaques eine erhöhte TF-Aktivität, was zur Plaque-Thrombogenizität beiträgt.<sup>125</sup> Da darüber hinaus wahrscheinlich auch an der Atherogenese, also der Plaque-Entstehung, beteiligt ist,<sup>126</sup> ist an dieser Stelle zu vermuten, dass die beschriebene anti-atherogenen Funktion von PON2<sup>52, 53</sup> z. T. auch durch die Regulation der TF-Aktivität vermittelt sein könnte (siehe 6.4).

Zusätzlich zur Funktion in den Mitochondrien wurde von Hagmann et al. eine anti-oxidative Rolle von PON2 in der Plasmamembran beschrieben. In Antwort auf oxidativen Stress transloziert PON2 von den Mitochondrien bzw. vom Endoplasmatischen Retikulum in die Plasmamembran und inhibiert die Peroxidation von Phospholipiden der Plasmamembran.<sup>22</sup> Bekanntermaßen können freie Radikale, wie das Hydroxyl-Radikal, welches z. B. aus Hydrogenperoxid im Zuge der Dismutase-vermittelten Abbaureaktion von Superoxid entsteht, die Lipide

von Zellmembranen oxidieren. Dies führt in einer Kettenreaktion zur Lipidperoxidation.<sup>127</sup> Lipidperoxidationsprodukte induzieren die PS-Exposition und steigern dadurch die zelluläre TF-Aktivität.<sup>128</sup> Folglich könnte der vaskuläre oxidative Stress, verursacht durch die vermehrte Superoxid-Produktion, im Pon2<sup>-/-</sup> Endothel in einer verstärkten Lipidperoxidation resultieren und damit die endotheliale pro-koagulatorische Aktivität von TF begünstigen (Abbildung 6-1). Schließlich wären also zwei verschiedene Mechanismen denkbar, durch die PON2 der TF *decreation* entgegenwirkt: (1.) PON2 verhindert durch die Inhibition der mitochondrialen Superoxid-Produktion, dass PS verstärkt externalisiert wird; (2.) PON2 vermindert die Externalisierung von PS, indem sie die Peroxidation von Lipiden in der Plasmamembran hemmt.

Um zu klären, ob die PS-Externalisierung tatsächlich für die verstärkte TF-Aktivität auf Pon2<sup>-/-</sup> ECs ausschlaggebend ist, wären weitere Analysen notwendig. Anhand inhibitorischer Studien mittels PS-blockierendem Annexin V könnte die Rolle von PS auf der endothelialen Zelloberfläche genauer beleuchtet werden. Außerdem wäre es interessant aufzudecken, ob und welcher der beschriebenen PON2-vermittelten protektiven Mechanismen gegen oxidativen Stress für die TF-Aktivitätsregulierung verantwortlich ist. Man geht derzeit davon aus, dass PON2 zwei unabhängige Aktivitäten aufweist: die enzymatische (Laktonase)-Aktivität und die anti-oxidativ wirkende Funktion mit z. T. noch unklaren Mechanismen. Altenhöfer et al. demonstrierten, dass die Wirkung von PON2 auf die mitochondriale Superoxidproduktion von der enzymatischen Aktivität unabhängig ist.<sup>37</sup> Die Hemmung der Lipidperoxidation ist jedoch von der enzymatischen Hydrolyse-Aktivität von PON2 abhängig.<sup>22</sup> Deshalb wäre es möglich durch die Transfektion von Pon2<sup>-/-</sup> ECs mit einer PON2-Mutante (z.B. PON2-H<sup>114</sup>Q), welche keine enzymatische Aktivität aufweist aber vor Superoxid-Produktion schützt,<sup>37</sup> aufzuklären, welcher Mechanismus für die Regulation der TF-Aktivität ausschlaggebend ist.

Ferner wird die pro-koagulatorische TF-Aktivität durch *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) reguliert. TFPI ist ein von ECs exprimiertes Membranprotein, welches durch die Interaktion mit FXa den TF-FVIIa-Komplex inhibiert und dadurch die FXa-Produktion hemmt.<sup>129</sup> Daher verleiht TFPI der endothelialen Zelloberfläche eine potente anti-koagulatorische Funktion. Die Expressionsstudien dieser Arbeit ergaben, dass der endotheliale Tfpi mRNA-Gehalt in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Kontrollen signifikant erniedrigt ist. Daher könnte eine geringere Expression des TF-Inhibitors zur verstärkten TF-Aktivität beitragen (Abbildung 6-1). Zudem zeigten jüngste Studien, dass ROS die Aktivität von TFPI in ECs signifikant reduzieren. Dies ist

auf eine ROS-induzierte Strukturänderung im TFPI-Protein zurückzuführen, welche die Wechselwirkung mit FXa vermindert.<sup>130</sup> Dieser Befund unterstreicht die essentielle Rolle von endothelialen Redox-Prozessen in der Regulation der Blutgerinnung und lässt eine verminderte TFPI-Aktivität im pro-oxidativen Pon2<sup>-/-</sup> Endothel vermuten, was zu dessen pro-koagulatorischen Aktivität beitragen könnte. Ob neben der reduzierten Expression tatsächlich auch eine ROS-abhängige eingeschränkte Aktivität von TFPI in Pon2<sup>-/-</sup> vorliegt, wäre in Folgestudien zu klären.

Neben der beschleunigten Fibrinbildung und Blutungsstillung in den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen deuteten die Untersuchungen dieser Arbeit auf eine gegenüber dem WT basal erhöhte Thrombinkonzentration im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma hin. Dies könnte sehr wahrscheinlich aus der verstärkten endothelialen TF-FVIIa-vermittelten FXa Produktion resultieren (Abbildung 6-1). Thrombin wird über zwei verschiedene Reaktionsarme der Gerinnungskaskade aktiviert, der extrinsischen und intrinsischen Gerinnung (siehe 1.1.2, Abbildung 1-2). Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten anhand der PT- und aPTT Messungen sowohl eine verstärkte Aktivität des extrinsischen TF-abhängigen Weges als auch des intrinsischen Weges. Da für diese *in vitro* Gerinnungszeitmessungen isoliertes Plasma eingesetzt wurde, das durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen wurde, gingen keine zellulären Komponenten bzw. ein nur sehr geringer Anteil an Thrombozyten in die Messung ein. Die dennoch verkürzte plasmatische PT und aPTT der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse könnte dadurch erklärt werden, dass die plasmatischen Gerinnungsfaktoren durch das pro-koagulatorische Endothel voraktiviert wurden oder möglicherweise gerinnungsfördernde zelluläre Mikropartikel im Plasma der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse vorhanden waren. Neben Thrombozyten und Leukozyten stellen auch aktivierte ECs eine bedeutende Quelle der Mikropartikel dar. Die Freisetzung dieser endothelialen Mikropartikel wird u. a. durch die Bindung von Thrombin an endotheliale PAR-Rezeptoren induziert.<sup>131</sup> Da die äußere Membranschicht der Mikropartikel sowohl TF als auch PS exponiert und dadurch Gerinnungsproteasen gebunden und aktiviert werden, tragen Mikropartikel maßgeblich zur Initiation und Amplifikation der plasmatischen Gerinnungsreaktion bei.<sup>132, 133</sup> In diesem Sinne könnten im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma Thrombin-induzierte endotheliale Mikropartikel an der verkürzten PT und aPTT mitwirken. Folgestudien sollten daher die Auswirkung der Pon2-Defizienz auf die Formation und die pro-koagulatorische Aktivität von Mikropartikeln adressieren und damit überprüfen, ob sich die PON2-vermittelte Modulation der endothelialen TF-Aktivität auch auf EC-abstammendes TF auf Mikropartikel auswirkt. Eine signifikant verstärkte Gerinnungsfaktoraktivität zeigte sich in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen anhand der Gerinnungsfaktormangel-Plasma Tests für FVII, FIX und FXI, also nur für Faktoren des intrinsischen Weges.

Interessanterweise werden alle drei Faktoren über amplifizierende Feedback-Loops durch TF oder Thrombin aktiviert (siehe 1.1.2, Abbildung 1-2). TF-FVIIa-Komplex aktiviert FIX,<sup>134</sup> die Aktivierung von FVIII und FXI wird durch Thrombin induziert.<sup>135, 136</sup> In Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen könnte also die TF-FVIIa- und Thrombin-vermittelte Voraktivierung dieser intrinsischen Faktoren über die beschriebenen Feedbackloops zur beschleunigten aPTT beitragen.

Zusammenfassend ist anhand der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der miteinbezogenen Literatur folgender Endothel-abhängiger Mechanismus der Gerinnungshemmung durch PON2 vorzuschlagen: Durch die anti-oxidative Wirkungsweise verhindert PON2 in ECs, dass PS externalisiert wird und schützt damit vor der TF Aktivierung. Die anti-oxidative Funktion bewirkt außerdem eine erhöhte endotheliale TFPI-Expression/-Aktivität, was zusätzlich die Aktivität von TF hemmt. Dadurch inhibiert PON2 die TF-FVIIa/FXa-vermittelte Thrombinbildung, was eine verminderte Aktivierung der intrinsischen Gerinnungsfaktoren zur Folge hat. Durch diese Prozesse könnte PON2 im Falle der Gerinnungsaktivierung durch pathologische Stimuli einen potenten anti-koagulatorischen Effektor darstellen.

## **6.2 PON2 kontrolliert endotheliale Entzündungsprozesse sowie die Endothelfunktion**

In den letzten Jahren wiesen Forschungserkenntnisse zunehmend auf eine bidirektionelle Beziehung zwischen der Blutgerinnung und der Inflammation hin.<sup>96</sup> Pro-inflammtorische Cytokine, wie z. B. IL-6 und TNF- $\alpha$ , welche u. a. von aktivierten ECs produziert werden, wirken als gerinnungsfördernde Stimuli, in dem sie die Expression pro-koagulatorischer Faktoren, wie TF und FVIII, stimulieren.<sup>10, 137, 138</sup> Umgekehrt induziert die Gerinnungsreaktion inflammatorische Prozesse v. a. über die Thrombin-vermittelte Aktivierung von Protease-aktivierter Rezeptoren (PAR) und via Freisetzung entzündungsfördernder Faktoren im Zuge der Exozytose von Plättchen-Granula.<sup>139-141</sup> Auf diese Weise können sich die Gerinnung und die vaskuläre Inflammation durch eine positive Rückkoppelung wechselseitig verstärken und damit die Entstehung von thrombotischen oder arteriosklerotischen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems fördern.

Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe zeigten, dass PON2 in EA.hy 296-Zellen vor Pyocyanin (PCN)-vermitteltem oxidativen Stress und vor PCN-induzierter IL-8 Produktion schützt.<sup>142</sup> Dies lässt vermuten, dass PON2 durch seine anti-oxidative Funktion wichtige anti-

inflammatorische Eigenschaften besitzt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen unterstützen diese Hypothese. Pon2-Defizienz *in vivo* löste eine pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels aus und hatte eine verstärkte vaskuläre bzw. EC-vermittelte IL-6 Sekretion zur Folge. Dass vaskuläre Zellen und nicht Blutzellen für den erhöhten IL-6 Spiegel verantwortlich sind, wurde anhand von Knochenmark-transplantierten Chimären gezeigt. Dabei reichte die PON2-Expression in Blutzellen nicht aus, um die IL-6 Plasmakonzentration zu normalisieren, wohingegen eine wildtypische PON2-Expression in der Gefäßwand zu einer Senkung des IL-6 Spiegels führte. Da außerdem die erhöhte ROS-Produktion im Falle von Pon2-Defizienz für die Gefäßwand und im Speziellen für das Endothel *in vivo* bestätigt wurde, könnten die erhöhten IL-6 Level eine Folge der erhöhten ROS-Produktion in Pon2<sup>-/-</sup> ECs darstellen (Abbildung 6-1). Dies wird durch Studien bekräftigt, die demonstrierten, dass ROS die zelluläre IL-6 Produktion stimuliert.<sup>143, 144</sup> Die Inhibition der mitochondrialen ROS-Produktion dagegen reduzierte die IL-6 Synthese, was darauf hindeutet, dass ROS in die physiologische IL-6 Synthese wenigstens teilweise und / oder indirekt involviert sind.<sup>145</sup>

Die pro-thrombotische Funktion von IL-6 im hämostatischen System wurde anhand einer Reihe von Untersuchungen belegt. IL-6 verschiebt das hämostatische Gleichgewicht in Richtung eines gerinnungsfördernden Status, in dem es die Expression pro-koagulatorischer Faktoren, wie TF, Fibrinogen und vWF, induziert und die plasmatische Konzentration von Gerinnungsinhibitoren reduziert.<sup>137, 146-148</sup> Zudem kann eine Endotoxin-induzierte Thrombingenerierung *in vivo* durch die Inhibition von IL-6 deutlich abgeschwächt werden.<sup>149</sup> In Anbetracht dieser Befunde ist eine IL-6-vermittelte inflammationsinduzierte Gerinnung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen denkbar. In wieweit IL-6 tatsächlich an der Pon2<sup>-/-</sup>-induzierten Gerinnungsaktivierung beteiligt ist, könnte in Folgestudien durch die Behandlung von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen mit anti-IL-6 Antikörpern überprüft werden.

Unter Berücksichtigung der bidirektionalen Beziehung zwischen der Inflammation und Gerinnung könnte der erhöhte IL-6 Plasmaspiegel in den Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen auch aus der verstärkten pro-koagulatorischen Funktion des Endothels resultieren (Abbildung 6-1). Interessanterweise zeigten Studien an einem *in vivo* Mausmodell der Sichelzellanämie, welche mit einer erhöhten Thromboseneigung und einer chronischer Gefäßentzündung assoziiert ist, dass EC-spezifischer TF den plasmatischen IL-6 Spiegel erhöht.<sup>150</sup> Hinsichtlich der Funktion von TF in der Inflammation auf der einen und der Gerinnung auf der anderen Seite zeigten jüngste Untersuchungen, dass TF möglicherweise als dualer Rezeptor fungiert.<sup>118</sup> Zum einen wirkt TF pro-koagulatorisch



durch die Bindung und Aktivierung von FVII und folglich der Generierung von FXa. Zum anderen fördert der Gerinnungsinitiationskomplex TF-FVIIa/FXa auf ECs zusammen mit EPCR (*endothelial protein C receptor*) die vaskuläre Inflammation, indem über PAR2-abhängige Signalwege der plasmatische IL-6 Level erhöht wird.<sup>151</sup> In Übereinstimmung hiermit könnte neben der verstärkten TF-Aktivität außerdem die reduzierte endotheliale TFPI-Expression in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer weniger ausgeprägten Inhibition des TF-FVIIa/FXa Komplexes auf ECs führen, was eine verstärkte Thrombin- und Fibrinogenierung sowie einen gesteigerten IL-6 Level zur Folge haben könnte.

Das pro-inflammatorische Genexpressionsprofil des Pon2<sup>-/-</sup> Endothels wies im Vergleich zu den WT Kontrollen einen signifikant erhöhten mRNA-Gehalt des Komplement-Rezeptors C5aR auf. Zwischen dem Komplementsystem als Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems und der plasmatischen Gerinnungskaskade bestehen diverse Wechselwirkungen. Beispielsweise aktiviert Thrombin das Anaphylatoxin C5,<sup>152</sup> so dass C5 in seiner aktiven Form (C5a) über den Rezeptor C5aR seine biologische Funktion ausüben kann, wie z. B. die Erhöhung der Endothel-permeabilität.<sup>153</sup> Der aktivierte Komplementfaktor C5a wiederum fördert die Gerinnungs-initiation, indem er die TF-Aktivität auf ECs und Neutrophilen über C5aR induziert.<sup>154, 155</sup> Demzufolge könnte im Pon2<sup>-/-</sup> Mausmodell die erhöhte endotheliale C5aR-Expression möglicherweise zur verstärkten TF-Aktivität auf ECs beitragen.

Zusätzlich zur erhöhten IL-6 Plasmakonzentration zeigte sich im Pon2<sup>-/-</sup> Plasma eine erhöhte Konzentration des Chemokins CCL22 (*macrophage-derived chemokine*, MDC). Wie auch für IL-6 ließ sich anhand der Knochenmarkstransplantationsexperimente nachweisen, dass die PON2-Expression in zirkulierenden Blutzellen der chimären Tiere nicht ausreichte, um die erhöhte CCL22 Plasmakonzentration der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zu reduzieren. Wohl aber war der plasmatische CCL22 Gehalt in WT Chimären mit Pon2-defizienten Blutzellen normalisiert. Eine CCL22 Produktion durch ECs war jedoch nicht nachweisbar, was eine Funktion des Endothels in der verstärkten CCL22 Synthese bei Pon2-Defizienz *in vivo* als weniger wichtig erscheinen lässt. Bekanntermaßen wird CCL22 hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und ist für die Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Entzündung zuständig.<sup>156</sup> Sowohl bei Makrophagen als auch bei dendritischen Zellen handelt es sich um Leukozyten, die im Zuge ihrer Differenzierung in unterschiedliche Gewebe einwandern und dort ihre Funktion als antigen-präsentierende Zelle für das Immunsystem oder als Cytokin- und Chemokin-sezernierende Zelle

zur Rekrutierung anderer Immunzellen ausüben. Im Gewebe residierende Makrophagen und dendritische Zellen haben eine Lebensspanne von mehreren Wochen, Makrophagen können sogar mehrere Monate im Gewebe überleben.<sup>157, 158</sup> Dementsprechend könnten aus dem Rezipienten stammende Gewebsmakrophagen in den Knochenmark-transplantierten Pon2<sup>-/-</sup> Chimären mit WT BM für die verstärkte CCL22 Produktion verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, wäre es sinnvoll mittels Genexpressionstudien den CCL22 mRNA- bzw. Proteingehalt in ECs im Vergleich zu Aorta-Proben von Pon2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen zu ermitteln. Studien zur Untersuchung der Rolle von Makrophagen in der Arteriosklerose-Entwicklung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten bereits, dass Pon2<sup>-/-</sup> Makrophagen erhöhten oxidativen Stress aufweisen, pro-inflammatorisch sind und dass die Rekonstitution von Makrophagen-PON2 die Arteriosklerose abschwächt.<sup>53, 159</sup> In diesem Zusammenhang stellt CCL22 einen interessanten Kandidaten dar, der durch PON2 möglicherweise über Redox-abhängige Prozesse reguliert wird und über die Sezernierung aus Makrophagen, die vom Blutstrom in die Gefäßwand einwandern, bei der Arteriosklerose-Entwicklung eine Rolle spielt.

Nicht nur der Arteriosklerose, sondern auch thrombotischen Erkrankungen liegt häufig vaskulärer oxidativer Stress und eine damit einhergehende inflammatorische Aktivierung des Endothels zugrunde, welche in einer endothelialen Dysfunktion resultiert.<sup>160</sup> Diese ist charakterisiert durch eine erhöhte Permeabilität des Endothels sowie ein erniedrigtes Dilatationsvermögen der Gefäßmuskulatur. In Übereinstimmung damit zeigten Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse neben der pro-oxidativen, -inflammatorischen und -koagulatorischen Aktivierung des Endothels eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation. Zudem wurde in HUVECs nach PON2-*knockdown* sowohl basal als auch nach Thrombin-Stimulation eine verstärkte Expression der Myosin Leichte Ketten Kinase (MYLK) festgestellt, was zu einer erhöhten Endothelpermeabilität *in vivo* beitragen könnte.<sup>161</sup> Zusätzlich könnte eine erhöhte C5aR Expression auf dem Pon2-defizienten Endothel über die Bindung des Komplementfaktors C5a, wie bereits oben erwähnt, die Permeabilität des Endothels steigern.<sup>153</sup> Da pro-koagulatorische und pro-inflammatorische Stimuli synergistisch auf die Beeinträchtigung der Endothelintegrität wirken,<sup>162</sup> ist es wahrscheinlich, dass in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen der erhöhte Plasmagehalt an Thrombin und an inflammatorischen Faktoren die endotheliale Dysfunktion verursachen. Weiterhin zeigten Studien, dass IL-6 die endothelabhängige Vasodilatation verschlechtert und die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen induziert.<sup>163, 164</sup> Dies deutet darauf hin, dass PON2 möglicherweise über die EC-abhängige Regulation der IL-6 Produktion und Thrombingenerierung die Endothelfunktion kontrolliert

(Abbildung 6-1). Die in dieser Arbeit beschriebene Normalisierung der endothelialen Dysfunktion durch die anti-TF Behandlung der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse weist außerdem darauf hin, dass PON2 über die Regulation des TF-VIIa/FXa Gerinnungsinitiationskomplexes auf ECs möglicherweise die IL-6 Produktion und damit die Endothelfunktion beeinflusst. Dies sollte jedoch in Folgestudien anhand der Messung der endothelabhängigen Vasodilatation in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen nach anti-IL-6 Behandlung und anhand der Bestimmung des plasmatischen IL-6 Gehalts nach anti-TF Behandlung verifiziert werden.

Zusammenfassend stellt sich die anti-inflammatorische Wirkung von PON2 im Zusammenhang mit deren Gerinnungsregulation vermutlich wie folgt dar: Die anti-oxidative Funktion von PON2 im Endothel schützt vor der Stress-induzierten Expression pro-inflammatorischer Faktoren, wie IL-6, was die Induktion pro-koagulatorischer Faktoren vermindert. Die durch PON2 reduzierte TF-Aktivität und erhöhte TFPI-Expression/-Aktivität trägt zu einer verminderten IL-6 Produktion bei, was der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirkt.

### **6.3 Die thrombozytäre PON2 ist an der Regulation der Gerinnung beteiligt – ist dafür jedoch nicht essenziell**

Die Ergebnisse der Gerinnungszeitmessungen von Knochenmark-transplantierten Mäusen belegten, dass die hämatopoetische PON2-Expression alleine nicht ausreicht, um die verstärkte Gerinnungsreaktion in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zu normalisieren. Dieser Befund schloss die Thrombozyten als primären Auslöser des pro-koagulatorischen Phänotyps der Pon2-Defizienz *in vivo* aus. Die weiteren Analysen dieser Arbeit wiesen auf einen primär endothelabhängigen Mechanismus der Gerinnungsregulation durch PON2 hin (siehe 6.1 und 6.2). Nichtsdestotrotz tragen Thrombozyten substantiell zur Blutgerinnung bei. Als Haupteffektorzellen der primären Hämostase sorgen sie durch die Adhäsion und Aggregation für die Ausbildung eines primären Thrombus, der zusammen mit dem Fibrinnetzwerk einen stabilen Thrombus zur letztendlichen Blutungsstillung formt (siehe 1.1.1). Zudem spielen Thrombozyten in der Amplifikation und Propagation der Thrombingenerierung eine essentielle Rolle, indem sie die Bindung und Aktivierung der Gerinnungsproteasen ermöglichen (siehe 1.1.3). In Übereinstimmung mit letzterem wurde in der vorliegenden Arbeit eine deutlich verstärkte Thrombingenerierung in Plättchen-reichem Plasma (PRP) von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT PRP festgestellt.

Im Gegensatz zum beschriebenen EC-abhängigen Signalweg (siehe 6.1), scheint TF auf Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen nicht in die verstärkte Thrombingenerierung involviert zu sein, da die Inhibition von TF auf Plättchen durch anti-TF Antikörper oder durch den inhibitorischen FVIIa das gemessene endogene Thrombinpotential nicht änderte. Vielmehr scheint die verstärkte Plättchen-vermittelte Thrombingenerierung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen direkt aus der signifikant erhöhten PS-Exposition auf Pon2<sup>-/-</sup> Plättchen zu resultieren. In Übereinstimmung damit bewirkte Annexin V durch Blockierung von PS auf der Plättchenoberfläche einen signifikanten Rückgang des endogenen Thrombinpotentials im Vergleich zu unbehandelten Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten. Ursächlich für die PS-Externalisierung auf Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten könnte oxidativer Stress sein, da im Pon2<sup>-/-</sup> Mausmodell nicht nur in der Gefäßwand, sondern auch in Thrombozyten eine verstärkte ROS-Produktion vorlag. Zudem wird der mögliche kausale Zusammenhang zwischen dem erhöhten intrazellulären ROS-Spiegel und PS-Anteil auf der Plättchenoberfläche durch Befunde unterstützt, die demonstrierten, dass mitochondriale Mechanismen und ROS die PS-Externalisierung in Plättchen induzieren.<sup>165</sup>

An dieser Stelle ist auch die von Hagmann et al. charakterisierte inhibitorische Wirkung von PON2 auf die Peroxidation von Plasmamembranlipiden in Betracht zu ziehen.<sup>22</sup> Wie bereits unter 6.1 im Zusammenhang mit den endothelialen Signalwegen diskutiert, könnte auch in Thrombozyten die vermehrte ROS-Produktion die Peroxidation von Lipiden der Plasmamembran induzieren.<sup>127</sup> Da die Behandlung von Blutzellen mit oxidierenden Substanzen die Lipidperoxidation induziert, dadurch PS externalisiert wird und dies mit einer Hyperkoagulabilität einhergeht,<sup>166</sup> könnte in Pon2<sup>-/-</sup> Thrombozyten eine verstärkte Lipidperoxidation zur PS-Externalisierung beitragen und damit die pro-koagulatorische Aktivität der Plättchen fördern. Ferner ist in diesem Kontext interessant, dass aktivierte pro-oxidative Plättchen auch die Lipidperoxidation von Plasmalipiden fördern,<sup>167</sup> was erneut eine Verbindung zwischen der Funktion von PON2 in der Gerinnung zu der in der Atherogenese beleuchtet.

Zwar reduzierte die Annexin V-vermittelte PS-Blockierung auf den Plättchen die Thrombingenerierung in Pon2<sup>-/-</sup> PRP signifikant, dennoch blieb trotz PS-Inhibition ein signifikant erhöhtes Thrombinpotential im Vergleich zur WT Kontrolle bestehen. Diese Beobachtung zeigt, dass die verstärkte Thrombingenerierung im PRP von Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen nicht ausschließlich über die Externalisierung von PS reguliert wird. Darüber hinaus verdeutlichten die Messungen des endogenen Thrombinpotentials im PRP von Knochenmark-transplantierten Chimären, dass Pon2-Defizienz

in Thrombozyten nicht ausreicht, um den pro-koagulatorischen Plättchenphänotyp zu induzieren. Ähnlich wie bei der PS-Inhibition zeigten sowohl die WT Chimären mit Pon2<sup>-/-</sup> Blutzellen als auch die Pon2<sup>-/-</sup> Chimären mit WT Blutzellen einen intermediären Level an generiertem Thrombin im PRP, welches zwischen der WT und der Pon2<sup>-/-</sup> Kontrolle lag. Daher scheinen auch externe, Thrombozyten-unabhängige Stimuli, welche möglicherweise von der Gefäßwand stammen, die Plättchen-vermittelte Thrombingenerierung in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen zu stimulieren.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse also dafür, dass zwei verschiedene Signalwege die pro-koagulatorische Plättchenaktivität in Pon2<sup>-/-</sup> Mäusen induzieren: (1.) Die Pon2-Defizienz in den Plättchen per se bewirkt über Redox-abhängige Signalwege, d.h. durch erhöhte mitochondriale ROS-Produktion und / oder verstärkte Lipidoxidation, dass PS externalisiert wird und die plasmatischen Gerinnungsfaktoren binden und aktiviert werden können; (2.) Plättchen-unabhängige, externe Signale, die vom pro-koagulatorischen Pon2<sup>-/-</sup> Endothel stammen, induzieren die verstärkte Gerinnungsaktivität der Plättchen (Abbildung 6-1). Die Befunde dieser Arbeit legen nahe, dass letzteres v. a. durch eine endotheliale TF-abhängige Aktivierung von Thrombin vermittelt wird. Dass der zweite dieser beiden Signalwege außerdem von vorrangiger Bedeutung ist, wird anhand der Gerinnungszeitanalyse der chimären Mäuse belegt. Diese schlossen eine primäre Funktion der Thrombozyten in der verstärkten Gerinnungsreaktion der Pon2<sup>-/-</sup> Mäuse aus, was die Relevanz eines PON2-vermittelten *EC-to-platelet signalings* betont.

### **6.4 Die Bedeutung der Ergebnisse für zukünftige Forschungsrichtungen und die mögliche Rolle der PON2 in der gerinnungshemmenden Therapie**

Interessanterweise zeigten die Gerinnungszeitstudien dieser Arbeit, dass der pro-koagulatorische Phänotyp in Weibchen des Pon2-defizienten Mausmodells stärker ausgeprägt ist als in Männchen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression und Funktion der PON2 zeigten bereits Giordano et al. auf. Diese Studie belegte, dass neuronale Zellen von weiblichen WT Mäusen deutlich mehr PON2 exprimieren als die von Männchen und dass dies auf einer Östradiol-abhängigen Regulation beruht.<sup>168</sup> Unter der Annahme, dass dieser geschlechtsspezifische Unterschied in der PON2-Expression auch in den Zellen des kardiovaskulären Systems vorliegt, könnte demnach also zwischen WT und Pon2<sup>-/-</sup> Weibchen ein größerer Unterschied in der PON2-Expression bestehen als zwischen WT und Pon2<sup>-/-</sup> Männchen.

Dies könnte die größere Differenz in den Gerinnungszeiten zwischen den Genotyp-Gruppen im weiblichen Geschlecht erklären. Hinweise darauf liefert auch der Vergleich der Gerinnungszeiten der WT Weibchen mit denen der WT Männchen. Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe ergaben ebenfalls geschlechtsabhängige Effekte im *Pon2*<sup>-/-</sup> Mausmodell. Untersuchungen des hämatopoetischen Systems der Milz deuteten auf einen Defekt in der Entwicklung von B-Zellen innerhalb der Milz hin, welcher ausschließlich bei weiblichen *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen zur Ausbildung einer Splenomegalie führte (Dissertation, Julianna Amort, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2012). Zukünftige Untersuchungen sollten eine mögliche Hormon-regulierte Expression von PON2 in verschiedenen Geweben adressieren und in diesem Zusammenhang die Ursachen dieser geschlechtsspezifischen Pathologien ergründen.

Horke et al. belegten, dass PON2 vor der mitochondrialen ROS-Produktion schützt.<sup>21</sup> Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse weisen darauf hin, dass PON2 durch die Verminderung von ROS *in vivo* als Modulator der Gerinnung fungiert. Um dies letztendlich zu verifizieren, werden aktuell *Pon2*-defiziente Mäuse mit dem Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) behandelt, welches über das Trinkwasser verabreicht wird. Damit kann der erhöhte ROS-Gehalt im Gewebe dieser Tiere normalisiert und folglich die Auswirkung auf den Gerinnungsphänotyp analysiert werden. Erste Untersuchungen im Rahmen dieses experimentellen Ansatzes ergaben verlängerte Gerinnungszeiten der NAC-behandelten Mäuse im Vergleich zu unbehandelten *Pon2*<sup>-/-</sup> Tieren (nicht gezeigt), was die Redox-abhängige Gerinnungsregulation durch PON2 bestätigen würde. Im Rahmen eines aus dieser Arbeit hervorgehenden Folgeprojekts wird dieses experimentelle Vorgehen weiterverfolgt.

Da oxidativer Stress die Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen fördert, erscheint eine anti-oxidative Behandlung als eine vielversprechende Strategie zur Prävention vaskulärer Ereignisse oder zur Langzeittherapie von Patienten mit hohem kardiovaskulären Risiko. In einer Vielzahl von klinischen Studien wurde die Gabe von Antioxidantien zur Reduzierung des Risikos für primäre oder sekundäre kardiovaskuläre Ereignisse bzw. zur Reduzierung der kardiovaskulären Mortalität untersucht.<sup>169</sup> Nur sehr wenige, z. T. nicht ausreichend kontrollierte Studien ergaben, dass Antioxidantien, wie Vitamin C oder Vitamin E, einen positiven Nutzen haben können.<sup>170-172</sup> Der Großteil der Studien zeigte jedoch keinen Nutzen in der Reduzierung des kardiovaskulären Risikos oder deutete sogar auf eine Zunahme der kardiovaskulären Morbidität hin.<sup>173-176</sup> Dies weist darauf hin, dass die Inhibition von

Radikalen durch hochdosierte Antioxidantien (*radical scavenging*) und damit eine unspezifische Hemmung von oxidativen Signalwegen für die Behandlung bzw. Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen nicht hilfreich ist.<sup>177</sup> Stattdessen sollte die selektive Modulation von pro-oxidativen pathologischen Prozessen als therapeutischer Ansatz angestrebt werden. Daher bildet die Erforschung von spezifischen molekularen und zellulären Mechanismen ROS-vermittelter Signale in kardiovaskulären Pathologien die Grundlage für neue Therapiestrategien. In diesem Zusammenhang und auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit könnte PON2 zukünftig für selektive anti-oxidative Ansätze zur Gerinnungshemmung relevant werden. Um die mögliche protektive Funktion von PON2 bei thrombotischen Erkrankungen zu testen, wäre die Etablierung eines PON2-überexprimierenden Mausmodells bedeutsam. Damit könnte die PON2-Überexpression als Therapiestrategie im Gerinnungsmanagement überprüft werden. Darüber hinaus könnten die in dieser Arbeit aufgedeckten Redox-regulierten und inflammatorischen Signalwege dazu beitragen, andere neuartige Zielstrukturen für anti-thrombotische Therapien zu identifizieren.

Des Weiteren erschließt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit eine interessante Verbindung zur Rolle der PON2 in der Atherogenese. Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die bekannte anti-atherogene bzw. anti-arteriosklerotische Wirkung von PON2 nicht nur auf eine Modulation der Makrophagenaktivität zurückzuführen ist,<sup>53</sup> sondern dass außerdem eine anti-inflammatorische und anti-koagulatorische Funktion im Endothel von Bedeutung ist. Dies wird zudem durch Befunde von Fortunato et al. unterstützt, die zeigten, dass Plaques von Arteriosklerose-Patienten mit erhöhtem Thrombose-Risiko im Vergleich zu gesunden Gefäßen eine stark reduzierte PON2 mRNA- und Proteinexpression aufweisen und dass dies primär auf den Verlust von endothelial exprimierter PON2 zurückzuführen ist.<sup>51</sup> Bekanntermaßen trägt das Gerinnungssystem, z. B. durch die verstärkte TF-Expression in arteriosklerotischen Läsionen, zur Plaque-Thrombogenizität bei.<sup>178, 179</sup> Aber nicht nur die Thrombose als Folge der Plaque-Ruptur ist in diesem Kontext relevant. Gerinnungsfaktoren, insbesondere TF im Komplex mit FVIIa und FXa, stimulieren außerdem pro-atherogene Signalwege, die u. a. die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten an das Endothel sowie die Migration von glatten Muskelzellen induzieren (siehe 1.3).<sup>180-184</sup> Da TF also pro-atherogen wirkt und TF essentiell zur verstärkten Gerinnung der *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäuse beitrug, sollten zukünftige Studien prüfen, ob die TF-Inhibition in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen auch vor der Entstehung der Arteriosklerose unter *high fat-diet* schützt. Neueste Studien zeigten, dass die Inhibition von Gerinnungsfaktoren tatsächlich als therapeutische Strategie zur

Behandlung und Prävention von Arteriosklerose in Betracht zu ziehen ist.<sup>185-188</sup> Die Hemmung von Thrombin oder von FXa durch direkte orale Antikoagulantien (Dabigatran, Pradaxa®; Rivaroxaban, Xarelto®), welche derzeit für die Behandlung von Thrombosen und für die primäre oder sekundäre Thrombose-Prävention eingesetzt werden, bewirken in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen einen Rückgang der Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Plaques sowie z. T. eine Verminderung von oxidativem Stress.<sup>186, 188</sup>

Zusammenfassend geben die Ergebnisse dieser Arbeit neue Hinweise auf die molekularen Wechselwirkungen zwischen dem hämostatischen System und der Arteriosklerose sowie auf durch PON2 regulierte Redox- und Entzündungssignalwege, die möglicherweise neue Zielmechanismen für anti-thrombotische und anti-arteriosklerotische Interventionen darstellen könnten.



## 7 Zusammenfassung

Oxidativer Stress und die inflammatorische Aktivierung des Endothels sowie der Thrombozyten fördern die Blutgerinnung. Paraoxonase-2 (PON2), ein anti-oxidatives Protein mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, ist zentral in pathologische Prozesse des kardiovaskulären Systems involviert, was anhand einer signifikant reduzierten PON2-Expression in humanen arteriosklerotischen Plaques sowie anhand eines deutlich erhöhten Arteriosklerose-Risikos in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen verdeutlicht wird. Jedoch waren bislang die Mechanismen, welche dieser vaskulären Pathophysiologie zugrunde liegen, nur unvollständig geklärt. Da die Blutgerinnung maßgeblich zu kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt, wurde vermutet, dass PON2 die Blutgerinnung reguliert und dadurch über Redox-vermittelte, inflammatorische Mechanismen pathophysiologische Prozesse im Gefäßsystem kontrolliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass *Pon2*-Defizienz *in vivo* zu einer verstärkten Gerinnung führt, was sich durch signifikant verkürzte Gerinnungszeiten, erhöhte Gerinnungsfaktoraktivitäten und eine verstärkte pro-koagulatorische Thrombozytenaktivität im Vergleich zum WT äußerte. Konfokale Mikroskopie, Durchflusszytometrie, Genexpressionsstudien und Vasorelaxationsmessungen deckten verstärkten oxidativen Stress in der Gefäßwand sowie ein pro-inflammatorisches und dysfunktionales Endothel in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen unter basalen Bedingungen auf. Eine verstärkte Entzündungsreaktion in *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde außerdem anhand einer gesteigerten IL-6 Plasmakonzentration festgestellt. Knochenmark-transplantierte Chimäre demonstrierten, dass diese Entzündungsreaktion primär von *Pon2*<sup>-/-</sup> vaskulären bzw. endothelialen Zellen herrührt. *Pon2*<sup>-/-</sup> Endothelzellen zeigten zusätzlich im Vergleich zum WT eine signifikant verstärkte *Tissue Factor* (TF)-Aktivität. In Übereinstimmung damit normalisierte die TF-Inhibition *in vivo* den pro-koagulatorischen Phänotyp der *Pon2*<sup>-/-</sup> Mäuse. Selbige Normalisierung wurde durch die genetische Rekonstitution von PON2 in Endothel- und Blutzellen sowie durch die PON2-Expression in der Gefäßwand von transplantierten Chimären erreicht, was eine endothelabhängige TF-vermittelte Gerinnungsregulation durch PON2 aufzeigt.

Insgesamt wurde durch diese Arbeit PON2 als ein wichtiges gerinnungshemmendes Protein identifiziert sowie PON2-vermittelte Redox-abhängige und inflammatorische Mechanismen aufgedeckt. Diese liefern neue Hinweise auf die protektive Funktion von PON2 in kardiovaskulären Erkrankungen und auf mögliche neue Therapiestrategien.

## 8 Literatur

1. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359:938-949
2. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011;364:1746-1760
3. Kleinegris MC, Ten Cate-Hoek AJ, Ten Cate H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122:557-566
4. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or traitors: The roles of pon2 and pon3 in atherosclerosis and cancer. *Journal of lipids.* 2012;2012:342806
5. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93:327-358
6. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine.* 2002;8:1227-1234
7. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964;145:1310-1312
8. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:104-107
9. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989;134:1087-1097
10. Bevilacqua MP, Poher JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: Characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:4533-4537
11. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *The Journal of clinical investigation.* 1998;101:1899-1904
12. Rao LV, Pendurthi UR. Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2012;10:2242-2253
13. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor viia complex: Procoagulant activity, regulation, and multitasking. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2007;5:1097-1105
14. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor viia. *Blood reviews.* 2003;17 Suppl 1:S1-5
15. Spronk HM, ten Cate H, van der Meijden PE. Differential roles of tissue factor and phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thrombosis research.* 2014;133 Suppl 1:S54-56
16. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in lipid research.* 2003;42:423-438
17. Levi M, ten Cate H, van der Poll T. Endothelium: Interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med.* 2002;30:S220-224
18. 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
19. 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

20. Martinelli N, Consoli L, Girelli D, Grison E, Corrocher R, Olivieri O. Paraoxonases: Ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. *Advances in clinical chemistry*. 2013;59:65-100
21. 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
22. Hagmann H, Kuczkowski A, Ruehl M, Lamkemeyer T, Brodesser S, Horke S, Dryer S, Schermer B, Benzing T, Brinkkoetter PT. Breaking the chain at the membrane: Paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *FASEB J*. 2014;28:1769-1779
23. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Forstermann 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. *Cell Death Differ*. 2012;19:1549-1560
24. Draganov DI. Human pon3, effects beyond the hdl: Clues from human pon3 transgenic mice. *Circulation research*. 2007;100:1104-1105
25. Draganov DI. Lactonases with organophosphatase activity: Structural and evolutionary perspectives. *Chemico-biological interactions*. 2010;187:370-372
26. 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. *Journal of lipid research*. 2005;46:1239-1247
27. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;461:24-29
28. 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. *Infection and immunity*. 2008;76:2512-2519
29. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free radical biology & medicine*. 2012;52:556-592
30. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free radical biology & medicine*. 2013;61:473-501
31. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2000;17:171-180
32. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004;58:39-46
33. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: An update. *Archives of toxicology*. 2012;86:1649-1665
34. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS letters*. 1991;286:152-154
35. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (pon1) is essential for pon1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2006;281:7657-7665
36. 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
37. 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
38. 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
  39. 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
  40. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:341-351
  41. Li H, Horke S, Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in pharmacological sciences.* 2013;34:313-319
  42. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104:129-135
  43. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *The Journal of clinical investigation.* 1995;96:2882-2891
  44. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein a-i promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (pon-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem.* 2001;276:24473-24481
  45. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against ldl oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase allozymes q and r. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1617-1624
  46. 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. *The Journal of clinical investigation.* 1998;101:1581-1590
  47. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:284-287
  48. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein e knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000;275:17527-17535
  49. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002;106:484-490
  50. Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, Fu X, Wagner MA, Besler C, Gerstenecker G, Zhang R, Li XM, DiDonato AJ, Gogonea V, Tang WH, Smith JD, Plow EF, Fox PL, Shih DM, Lusis AJ, Fisher EA, DiDonato JA, Landmesser U, Hazen SL. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and hdl form a functional ternary complex. *The Journal of clinical investigation.* 2013;123:3815-3828
  51. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, Morgante A, D'Armiento FP, D'Armiento M, Porcellini M, Sacchetti L, Bracale G, Salvatore F. Decreased

- paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:594-600
52. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Mol Genet Metab.* 2006;89:368-373
53. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-b-containing lipoproteins: Anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem.* 2006;281:29491-29500
54. 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
55. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circulation research.* 2007;100:1200-1207
56. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg.* 2012;114:275-285
57. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, Kassak P, Van Oerle R, Winckers K, Govers-Riemslog JW, Hamulyak K, Hackeng TM, Daemen MJ, ten Cate H, Spronk HM. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation.* 2010;122:821-830
58. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009;82:392-403
59. ten Cate H. Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis. *Thrombosis research.* 2012;129 Suppl 2:S38-40
60. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-cre transgenic mice: A new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology.* 2001;230:230-242
61. Sobczak M, Dargatz J, Chrzanowska-Wodnicka M. Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2010
62. van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nature protocols.* 2008;3:1085-1091
63. Dormann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The gpIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood.* 2000;96:2469-2478
64. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology & medicine.* 2003;34:1359-1368
65. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y. A new sensitive chemiluminescence probe, I-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 1993;193:554-559
66. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized dcfda and flow-cytometry. *Methods in molecular biology.* 2010;594:57-72
67. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-selectin glycoprotein ligand 1 (psgl-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med.* 2000;191:1413-1422

68. Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS letters*. 2000;477:1-7
69. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88:186-193
70. Segawa K, Nagata S. An apoptotic 'eat me' signal: Phosphatidylserine exposure. *Trends in cell biology*. 2015;25:639-650
71. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of pcr-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (hotshot). *BioTechniques*. 2000;29:52, 54
72. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*. 1997;245:154-160
73. Ju J, Glazer AN, Mathies RA. Energy transfer primers: A new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. *Nature medicine*. 1996;2:246-249
74. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227:680-685
75. Horke S, Xiao J, Schutz EM, Kramer GL, Wilgenbus P, Witte I, Selbach M, Teiber JF. Novel paraoxonase 2-dependent mechanism mediating the biological effects of the pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule n-(3-oxo-dodecanoyl)-l-homoserine lactone. *Infection and immunity*. 2015;83:3369-3380
76. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Munzel T, Forstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:2536-2544
77. Wu Z, Siuda D, Xia N, Reifenberg G, Daiber A, Munzel T, Forstermann U, Li H. Maternal treatment of spontaneously hypertensive rats with pentaerythritol tetranitrate reduces blood pressure in female offspring. *Hypertension*. 2015;65:232-237
78. Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2x7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:2932-2944
79. Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. Critical role of the tie2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity*. 1998;9:677-686
80. Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*. 2006;107:358-366
81. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, Ferrara JL. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor h antigens and endotoxin. *Blood*. 1996;88:3230-3239
82. Tchaikovski SN, BJ VANV, Rosing J, Tans G. Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5:2079-2086
83. Jurk K, Lahav J, H VANA, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9:2278-2290
84. Libregts SF, Gutierrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, Ozgur Z, Philipsen S, Nolte MA. Chronic ifn-gamma production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an irf-1/pu.1 axis. *Blood*. 2011;118:2578-2588

85. Chan JY, Kwong M, Lo M, Emerson R, Kuypers FA. Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45nfe2-deficient mice. *Blood*. 2001;97:2151-2158
86. Muller J, Becher T, Braunstein J, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Potzsch B. Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes. *Angewandte Chemie*. 2011;50:6075-6078
87. Gorlach A. Redox regulation of the coagulation cascade. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1398-1404
88. Herkert O, Djordjevic T, BelAiba RS, Gorlach A. Insights into the redox control of blood coagulation: Role of vascular nadph oxidase-derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:765-776
89. Pfeiler S, Massberg S, Engelmann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thrombosis research*. 2014;133 Suppl 1:S35-37
90. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-264
91. Vanhauwe JF, Thomas TO, Minshall RD, Tiruppathi C, Li A, Gilchrist A, Yoon EJ, Malik AB, Hamm HE. Thrombin receptors activate g(o) proteins in endothelial cells to regulate intracellular calcium and cell shape changes. *J Biol Chem*. 2002;277:34143-34149
92. Minami T, Abid MR, Zhang J, King G, Kodama T, Aird WC. Thrombin stimulation of vascular adhesion molecule-1 in endothelial cells is mediated by protein kinase c (pkc)-delta-nf-kappa b and pkc-zeta-gata signaling pathways. *J Biol Chem*. 2003;278:6976-6984
93. Tyurina YY, Shvedova AA, Kawai K, Tyurin VA, Kommineni C, Quinn PJ, Schor NF, Fabisiak JP, Kagan VE. Phospholipid signaling in apoptosis: Peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology*. 2000;148:93-101
94. Popescu NI, Lupu C, Lupu F. Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood*. 2010;116:993-1001
95. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010;38:S26-34
96. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004;109:2698-2704
97. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nature medicine*. 1996;2:209-215
98. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1986;163:740-745
99. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost*. 2014;111:590-597
100. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free radical biology & medicine*. 2004;37:1304-1316
101. Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Human liver paraoxonase (pon1): Subcellular distribution and characterization. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 1998;12:61-69
102. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1381-1389
103. Vannucchi AM. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Intern Emerg Med*. 2010;5:177-184
104. Li W, Morrone K, Kambhampati S, Will B, Steidl U, Verma A. Thrombocytopenia in mds: Epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies. *Leukemia*. 2015

105. Colkesen Y, Muderrisoglu H. The role of mean platelet volume in predicting thrombotic events. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012;50:631-634
106. Senaran H, Ileri M, Altinbas A, Kosar A, Yetkin E, Ozturk M, Karaaslan Y, Kirazli S. Thrombopoietin and mean platelet volume in coronary artery disease. *Clinical cardiology*. 2001;24:405-408
107. Thompson CB, Jakubowski JA, Quinn PG, Deykin D, Valeri CR. Platelet size as a determinant of platelet function. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1983;101:205-213
108. van der Loo B, Martin JF. Megakaryocytes and platelets in vascular disease. *Bailliere's clinical haematology*. 1997;10:109-123
109. Del Principe D, Frega G, Savini I, Catani MV, Rossi A, Avigliano L. The plasma membrane redox system in human platelet functions and platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost*. 2009;101:284-289
110. Marumo M, Suehiro A, Kakishita E, Groschner K, Wakabayashi I. Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *Thrombosis research*. 2001;104:353-360
111. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Biol Chem*. 1991;266:7345-7352
112. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*. 1992;80:143-152
113. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:395-424
114. Maynard JR, Heckman CA, Pitlick FA, Nemerson Y. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *The Journal of clinical investigation*. 1975;55:814-824
115. Le DT, Rapaport SI, Rao LV. Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem*. 1992;267:15447-15454
116. Ploplis VA, Edgington TS, Fair DS. Initiation of the extrinsic pathway of coagulation. Association of factor VIIa with a cell line expressing tissue factor. *J Biol Chem*. 1987;262:9503-9508
117. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry*. 2006;45:12020-12028
118. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13932-13937
119. Bach R, Rifkin DB. Expression of tissue factor procoagulant activity: Regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:6995-6999
120. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman MR. Tissue factor de-encryption: Ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1999;10:201-210
121. Neuenschwander PF, Bianco-Fisher E, Rezaie AR, Morrissey JH. Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: Enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1995;34:13988-13993
122. Shaw AW, Pureza VS, Sligar SG, Morrissey JH. The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting. *J Biol Chem*. 2007;282:6556-6563
123. Tyurina YY, Serinkan FB, Tyurin VA, Kini V, Yalowich JC, Schroit AJ, Fadeel B, Kagan VE. Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation. *J Biol Chem*. 2004;279:6056-6064



124. Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;75:281-289
125. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999;99:348-353
126. Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A, Hatakeyama K, Kisanuki A, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: Recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost*. 1998;80:506-511
127. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;57:715S-724S; discussion 724S-725S
128. Vatsyayan R, Kothari H, Pendurthi UR, Rao LV. 4-hydroxy-2-nonenal enhances tissue factor activity in human monocytic cells via p38 mitogen-activated protein kinase activation-dependent phosphatidylserine exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1601-1611
129. Broze GJ, Jr., Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor vii-tissue factor complex also inhibits factor xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood*. 1988;71:335-343
130. Cimmino G, Cirillo P, Ragni M, Conte S, Uccello G, Golino P. Reactive oxygen species induce a procoagulant state in endothelial cells by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2015;40:186-192
131. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: Identification of a novel pathway involving rock-ii activation by caspase-2. *Blood*. 2006;108:1868-1876
132. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1:2561-2568
133. Abid Hussein MN, Boing AN, Biro E, Hoek FJ, Vogel GM, Meuleman DG, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thrombosis research*. 2008;121:865-871
134. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor ix by the reaction product of tissue factor and factor vii: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5260-5264
135. Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor xi independent of factor xii. Factor xi is activated by thrombin and factor xia in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem*. 1991;266:7353-7358
136. Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors v and viii: Structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood*. 1988;71:539-555
137. Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotsch M, Schomig A. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3399-3405
138. Stirling D, Hannant WA, Ludlam CA. Transcriptional activation of the factor viii gene in liver cell lines by interleukin-6. *Thromb Haemost*. 1998;79:74-78
139. Jones A, Geczy CL. Thrombin and factor xa enhance the production of interleukin-1. *Immunology*. 1990;71:236-241
140. Cirino G, Cicala C, Bucci MR, Sorrentino L, Maraganore JM, Stone SR. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J Exp Med*. 1996;183:821-827

141. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein e. *Nature medicine*. 2003;9:61-67
142. Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Forstermann U, Teiber JF, Horke S. Paraoxonases-2 and -3 are important defense enzymes against pseudomonas aeruginosa virulence factors due to their anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *Journal of lipids*. 2012;2012:352857
143. Yoshida Y, Maruyama M, Fujita T, Arai N, Hayashi R, Araya J, Matsui S, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M. Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1999;276:L900-908
144. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, Sack MN, Kastner DL, Siegel RM. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in tnfr1-associated periodic syndrome (traps). *J Exp Med*. 2011;208:519-533
145. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British journal of anaesthesia*. 2013;110:472-480
146. Amrani DL. Regulation of fibrinogen biosynthesis: Glucocorticoid and interleukin-6 control. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 1990;1:443-446
147. Burstein SA, Peng J, Friese P, Wolf RF, Harrison P, Downs T, Hamilton K, Comp P, Dale GL. Cytokine-induced alteration of platelet and hemostatic function. *Stem cells*. 1996;14 Suppl 1:154-162
148. Niessen RW, Lamping RJ, Jansen PM, Prins MH, Peters M, Taylor FB, Jr., de Vijlder JJ, ten Cate JW, Hack CE, Sturk A. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on hepg2 cells and in baboons. *Thromb Haemost*. 1997;78:1088-1092
149. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med*. 1994;179:1253-1259
150. Chanrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang JG, Parise LV, Kirchhofer D, Key NS, Pawlinski R. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood*. 2012;120:636-646
151. Sparkenbaugh EM, Chanrathammachart P, Mickelson J, van Ryn J, Hebbel RP, Monroe DM, Mackman N, Key NS, Pawlinski R. Differential contribution of fxa and thrombin to vascular inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood*. 2014;123:1747-1756
152. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of c5a in the absence of c3: A new complement activation pathway. *Nature medicine*. 2006;12:682-687
153. Liu ZM, Zhu SM, Qin XJ, Cheng ZD, Liu MY, Zhang HM, Liu DX. Silencing of c5a receptor gene with sirna for protection from gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. *Molecular immunology*. 2010;47:1325-1333
154. Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1997;77:394-398
155. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD. A novel c5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol*. 2006;177:4794-4802
156. Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (mdc, ccl22) production. *Critical reviews in immunology*. 2002;22:105-114

157. Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A. The prolonged life-span of alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;38:380-385
158. Kamath AT, Henri S, Batty F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*. 2002;100:1734-1741
159. Devarajan A, Grijalva VR, Bourquard N, Meriwether D, 3rd, Imaizumi S, Shin BC, Devaskar SU, Reddy ST. Macrophage paraoxonase 2 regulates calcium homeostasis and cell survival under endoplasmic reticulum stress conditions and is sufficient to prevent the development of aggravated atherosclerosis in paraoxonase 2 deficiency/apoe<sup>-/-</sup> mice on a western diet. *Mol Genet Metab*. 2012;107:416-427
160. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237:208-219
161. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: Role of myosin light chain phosphorylation. *Journal of cellular physiology*. 1995;163:510-522
162. Tirupathi C, Naqvi T, Sandoval R, Mehta D, Malik AB. Synergistic effects of tumor necrosis factor-alpha and thrombin in increasing endothelial permeability. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281:L958-968
163. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2364-2367
164. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Bohm M, Nickenig G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin ii type 1 receptor. *Circulation research*. 2004;94:534-541
165. Choo HJ, Saafir TB, Mkumba L, Wagner MB, Jobe SM. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2946-2955
166. Jain SK. In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76:281-286
167. Gorog P, Kovacs IB. Lipid peroxidation by activated platelets: A possible link between thrombosis and atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1995;115:121-128
168. Giordano G, Tait L, Furlong CE, Cole TB, Kavanagh TJ, Costa LG. Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression. *Free radical biology & medicine*. 2013;58:98-108
169. Morris CD, Carson S. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: A summary of the evidence for the u.S. Preventive services task force. *Annals of internal medicine*. 2003;139:56-70
170. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin c intake and mortality among a sample of the united states population. *Epidemiology*. 1992;3:194-202
171. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin e consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*. 1993;328:1444-1449
172. Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin e and vitamin c supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: The established populations for epidemiologic studies of the elderly. *The American journal of clinical nutrition*. 1996;64:190-196
173. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin e supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:154-160

174. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Haukka JK, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, Heinonen OP. Effects of alpha tocopherol and beta carotene supplements on symptoms, progression, and prognosis of angina pectoris. *Heart*. 1998;79:454-458
175. Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of us male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine*. 2002;162:1472-1476
176. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1996;334:1156-1162
177. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in cardiovascular therapy: Panacea or false hope? *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2015;2:29
178. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95:594-599
179. Ardissino D, Merlini PA, Bauer KA, Bramucci E, Ferrario M, Coppola R, Fetiveau R, Lucreziotti S, Rosenberg RD, Mannucci PM. Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques. *Blood*. 2001;98:2726-2729
180. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor x-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor viia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:5255-5260
181. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor-factor viia-specific up-regulation of il-8 expression in mda-mb-231 cells is mediated by par-2 and results in increased cell migration. *Blood*. 2004;103:3029-3037
182. Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor viia complex. *Thromb Haemost*. 1997;78:1138-1141
183. Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*. 1999;163:5064-5069
184. Wang X, Gjernes E, Prydz H. Factor viia induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line. *J Biol Chem*. 2002;277:23620-23626
185. Pingel S, Tiyerili V, Mueller J, Werner N, Nickenig G, Mueller C. Thrombin inhibition by dabigatran attenuates atherosclerosis in apoe deficient mice. *Archives of medical science : AMS*. 2014;10:154-160
186. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in apoe-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2015;242:639-646
187. Preusch MR, Ieronimakis N, Wijelath ES, Cabbage S, Ricks J, Bea F, Reyes M, van Ryn J, Rosenfeld ME. Dabigatran etexilate retards the initiation and progression of atherosclerotic lesions and inhibits the expression of oncostatin m in apolipoprotein e-deficient mice. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:5203-5211
188. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, Kostakis A, Liapis CD. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein e-deficient mice : Dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2012;26:367-374

## Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

### **Originalarbeiten:**

Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Döhrmann M, Xia N, Li H, Ruf W, Horke S. Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. 2016, *Circulation Research*, in review.

Krüger M, Amort J, Wilgenbus P, Helmstädter JP, Grechowa I, Ebert J, Tenzer S, Moergel M, Witte I, Horke S. The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/ $\beta$ -catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. 2016, *Oncotarget*, doi: 10.18632.

### **Vorträge:**

Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Xia N, Li H, Ruf W, Horke S. Paraoxonase-2 regulates blood coagulation through endothelial redox-signaling and inflammation. 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th International Conference on Paraoxonases, Elche, Alicante, Spain, 2015.

### **Abstracts:**

Ebert J, Wilgenbus P, Horke S. Paraoxonase-2 regulates blood coagulation through endothelial redox-signaling and inflammation. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Scientific Sessions (ATVB), San Francisco, CA, USA, 2015.

Ebert J, Wilgenbus P, Horke S. Paraoxonase-2 regulates blood coagulation through endothelial redox-signaling and inflammation. 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th International Conference on Paraoxonases, Elche, Alicante, Spain, 2015.

Ebert J, Wilgenbus P, Horke S. The anti-oxidative enzyme PON2 modulates endothelial and platelet function in blood coagulation. 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT), Hannover, 2014.

Ebert J and Horke S. Paraoxonase-2: A novel modulator of coagulation. 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT), Halle / Saale, 2013.

## Lebenslauf

### ***Persönliche Angaben***

Name                      Julia Ebert  
Geburtsdatum            01. Februar 1988  
Geburtsort               Mainz  
Staatsangehörigkeit    deutsch

### ***Promotion***

04/2013 – 03/2016    Promotion am Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz und Institut für Pharmakologie, Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege / PD Dr. Sven Horke, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Fachbereich Biologie)

### ***Hochschulstudium***

10/2007 – 02/2013    Studium der Biologie (Diplom), Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Note: 1,0 / mit Auszeichnung)  
05/2012 – 02/2013    Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie, Arbeitsgruppe Zell- und Redox-Signalwege / PD Dr. Sven Horke, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Fachbereich Biologie); Thema: Die Rolle der Paraoxonase-2 in endothelialen und Thrombozyten-vermittelten Blutgerinnungsprozessen  
02/2012 – 05/2012    Diplom Prüfungen: Genetik, Immunologie, Molekulare Biophysik

### ***Schulbildung***

03/2007                 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5), Bingen am Rhein

### ***Stipendium***

11/2014 – 11/2015    Doctoral Candidate Fellowship durch das Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz und das Bundesministerium für Bildung und Forschung

# Danksagung

xxx

