

Der enzymatische und anti-oxidative Mechanismus des anti-atherogenen Enzyms Paraoxonase-2

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

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sebastian Altenhöfer
geb. in München
Mainz, 2010

Tag der mündlichen Prüfung, 26.05.2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1. EINLEITUNG.....	13
1.1 Arteriosklerose	13
1.1.1 7-Ketocholesterol	13
1.2 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen	14
1.2.1 Paraoxonase-1	15
1.2.2 Paraoxonase-2	16
1.2.3 Paraoxonase-3	18
1.3 ER-Stress	19
1.4 Oxidativer Stress	21
1.4.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	21
1.4.2 Oxidativer Stress und ROS in den Mitochondrien.....	22
1.4.3 Anti-oxidative Systeme	25
1.5 Zelltod	27
1.5.1 Apoptose.....	27
1.5.2 Autophagie	28
1.6 Kalzium-Homöostase	29
2 ZIELE DER ARBEIT	31
3 MATERIAL.....	32
3.1 Chemikalien	32
3.2 Verbrauchsmaterialien	33
3.3 Laborgeräte.....	33
3.4 Reagenzien und Kits.....	34
3.5 Enzyme und Standards	34
3.6 Antikörper	35
3.6.1 Primärantikörper.....	35
3.6.2 Sekundärantikörper	35
3.7 Plasmide	36
3.8 Oligonukleotide	36
3.8.1 Primer und Sonden	36
3.8.2 Oligonukleotide für RNA-Interferenz	38
3.9 Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien	38
3.10 Zelllinien und Medien für die Zellkultur.....	39
3.10.1 Zelllinien	39
3.10.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	40

3.11	Bakterien	40
4	METHODEN.....	41
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	41
4.1.1	HUVEC-Isolierung aus Nabelschnüren	41
4.1.2	Kultivierung eukaryoter Zellen	42
4.1.3	Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen.....	42
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Aussaat eukaryoter Zellen	43
4.1.5	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen.....	43
4.1.6	Stabile Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen	43
4.1.7	Transfektion von siRNA in eukaryote Zellen	44
4.1.8	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Chemilumineszenz und Fluoreszenzmessung	45
4.1.9	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Hochdruck-Säulenchromatografie (HPLC).....	45
4.1.10	Messung mitochondrialen Superoxids in eukaryoten Zellen mittels Durchflusszytometrie	46
4.1.11	Messung von Apoptosemerkmalen in eukaryoten Zellen mittels Durchflusszytometrie	46
4.1.12	Messung der Caspase-3/7-Aktivität in eukaryoten Zellen	47
4.1.13	Bestimmung der Zytotoxizität in eukaryoten Zellen.....	47
4.1.14	Konfokale Lasermikroskopie in lebenden Zellen	47
4.1.15	Immunzytochemie und konfokale Lasermikroskopie in fixierten Zellen	48
4.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	49
4.2.1	Restriktion von DNA	49
4.2.2	Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse von DNA	49
4.2.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	49
4.2.4	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	50
4.2.5	Ligation von DNA.....	50
4.2.6	Transformation von DNA in Bakterien.....	50
4.2.7	Plasmid-DNA-Präparation	50
4.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
4.2.9	Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion.....	51
4.2.10	3'RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends)	52
4.2.11	Extraktion der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen mit DNase-Verdau..	53
4.2.12	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	53
4.2.13	cDNA-Synthese mittels Reverser-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	53
4.2.14	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	54
4.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	55
4.3.1	Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen	55
4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	55
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	55
4.3.4	Proteinfärbung mit Coomassie-Blue	57
4.3.5	Western-Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen	57
4.3.6	Aufreinigung nativer Proteine mittels Nickel-NTA-Säulen.....	58
4.3.7	Messung von Superoxid in aufgereinigtem und rekombinantem humanem PON2	59
4.3.8	Messung von Wasserstoffperoxid in nativen Zelllysaten	59
4.3.9	Fraktionierung von Mitochondrien aus eukaryotischen Zellen.....	59

4.3.10	Submitochondriale Fraktionierung von Mitochondrien aus eukaryotischen Zellen	60
4.3.11	Fraktionierung von Mikrosomen aus eukaryotischen Zellen	60
4.3.12	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in isolierten Mitochondrien	61
4.3.13	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrienfraktionen und Mikrosomen	61
4.3.14	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrienmembranfraktionen...	61
4.3.15	Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität in eukaryotischen Zellen.....	61
4.3.16	Messung der Laktonase-Aktivität in Extrakten eukaryotischer Zellen	62
4.3.17	Koimmunopräzipitation	62
4.4	Statistik.....	63
5	ERGEBNISSE.....	64
5.1	Charakterisierung der anti-oxidativen Funktion von PON2	64
5.1.1	Spezifität der anti-oxidativen Aktivität von PON2	64
5.1.2	<i>In vitro</i> Analysen der anti-oxidativen Funktion von PON2	69
5.1.3	PON2 führt nicht zur Aktivierung der Superoxiddismutasen	71
5.1.4	PON2 lokalisiert in die Mitochondrien und vermindert die mitochondriale Superoxid-Produktion	73
5.1.5	Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 ist unabhängig von Cytochrom C	75
5.1.6	Die PON2 Überexpression vermindert die mitochondriale Superoxidbildung an Komplex-I und Komplex-III der Atmungskette.....	79
5.1.7	Der Einfluss von PON2 auf die Superoxidproduktion im ER	85
5.1.8	Punktmutationen von PON2.....	86
5.1.9	Identifizierung der Glykosylierungsstellen von PON2	88
5.1.10	Der Laktonase-Mechanismus und der Zusammenhang von enzymatischer und anti-oxidativer PON2 Aktivität	88
5.1.11	Zusammenhang von Laktonase-Aktivität und anti-apoptotischer Aktivität	95
5.2	PON2 schützt nicht vor 7-Ketocholesterol-vermitteltem Zelltod	96
5.2.1	7-Ketocholesterol induziert nicht den mitochondrialen Apoptoseweg	97
5.2.2	PON2 schützt nicht gegen 7-Ketocholesterol induzierten ER-Stress	99
5.2.3	Der Einfluss von PON2 auf 7-Ketocholesterol induzierten Zelltod	104
5.2.4	7-Ketocholesterol induziert Autophagie	106
5.2.5	Störungen der Kalzium-Homöostase regulieren die PON2-mRNA Expression..	112
6	DISKUSSION.....	117
6.1	Der Anti-oxidative Mechanismus von PON2	117
6.1.1	PON2 vermindert spezifisch intrazelluläres Superoxid	117
6.1.2	PON2 vermittelt seine anti-oxidative Funktion nicht über Cytochrom C oder Superoxiddismutasen	118
6.1.3	PON2 und Coenzym Q ₁₀	119
6.1.4	Anti-oxidative Effekte von PON2 außerhalb der inneren Mitochondrienmembran	121
6.2	Die Laktonase-Aktivität von PON2 ist unabhängig von der anti-oxidativen Aktivität	122
6.2.1	Die Histidin-Dyade His ¹¹⁴ – His ¹³³ ist für die Laktonase-Aktivität essentiell	122
6.2.2	Auswirkungen der Mutationen katalytisch-inaktiver Aminosäuren in PON2	124
6.2.3	Die Glykosylierung von Asn ²⁵⁴ und Asn ³²³ ist für die Laktonase-Aktivität von PON2 essentiell	126

6.2.4	Funktionelle Bedeutung des Serin- / Cystein ³¹¹ -Polymorphismus von PON2	126
6.3	7-Ketocholesterol	128
6.3.1	7-Ketocholesterol induziert nicht den mitochondrialen Apoptoseweg	128
6.3.2	7-Ketocholesterol-induzierter ER-Stress	129
6.3.3	7-Ketocholesterol induziert Apoptose-unabhängigen Zelltod in EA.hy 926-Zellen	131
6.3.4	7-Ketocholesterol-induziert Autophagie	131
6.4	Störung der Kalzium-Homöostase führt zum Abbau der PON2-mRNA	134
7	ZUSAMMENFASSUNG	137
8	LITERATURVERZEICHNIS	139
9	PUBLIKATIONSLISTE	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enzymatisch aktives Zentrum von PON1 ⁵⁰	16
Abbildung 2: Mitochondriale Elektronentransportkette.	23
Abbildung 3: DMNQ induziert vorwiegend Superoxid in humanen EA.hy 926 Zellen, welches durch L012 detektiert werden kann.	65
Abbildung 4: PON2 Überexpression reduziert die Superoxid-Produktion in EA.hy 926-Zellen.	66
Abbildung 5: PON2 Überexpression reduziert die Superoxid-Produktion in EA.hy 926-Zellen.	66
Abbildung 6: PON2 Überexpression reduziert nicht die Peroxynitrit-Produktion in EA.hy 926-Zellen.	67
Abbildung 7: DHR123 detektiert weder DMNQ-induziertes Superoxid, noch SIN-1- induziertes Wasserstoffperoxid.	68
Abbildung 8: PON2 überexprimierende EA.hy-926-Zellen zeigen schwächere H ₂ O ₂ - Degradation als naive EA.hy 926-Zellen.	69
Abbildung 9: Rekombinantes humanes PON2 kann Superoxid nicht vermindern.	70
Abbildung 10: Coomassie-Gel und Western Blot zur Kontrolle der PON2-His ₆ Anreicherung..	71
Abbildung 11: <i>In vitro</i> angereichertes PON2-Protein kann Superoxid nicht vermindern.	71
Abbildung 12: Die SOD-Aktivität in PON2-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen bleibt gegenüber naiven Zellen unverändert.	72
Abbildung 13: Die Verminderung der O ₂ ⁻ -Level durch PON2 führt nicht zu erhöhten Spiegeln an H ₂ O ₂	73
Abbildung 14: Immunofluoreszenzfärbung von PON2 in naiven EA.hy 926-Zellen.	74
Abbildung 15: PON2 Überexpression schützt EA.hy-Zellen vor Antimycin-induziertem mitochondrialem Superoxid.	75
Abbildung 16: Naive und PON2-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen unterscheiden sich nicht in ihrer Cytochrom C-Expression.	76
Abbildung 17: Koimmunopräzipitationen zeigen keine Interaktion von PON2 und Cytochrom C.	77
Abbildung 18: Herunterregulation von Cytochrom C durch siRNA beeinflusst nicht die anti- oxidative Aktivität von PON2.	78
Abbildung 19: Koimmunopräzipitationen zeigen keine Interaktion von PON2 mit Komplex III.	79
Abbildung 20: PON2 Überexpression vermindert die mitochondriale Superoxidbildung an Komplex-I und Komplex-III der Atmungskette.	80
Abbildung 21: Kontrolle der Mitochondrien-Fraktionierung im Western Blot.	81
Abbildung 22: Antimycin-stimulierte Mitochondrien aus PON2-überexprimierenden EA.hy- Zellen produzieren weniger Superoxid als jene aus naiven Zellen.	82
Abbildung 23: Intakte Mitochondrien und Mitochondrienfraktionen von PON2- überexprimierenden EA.hy 926-Zellen können extern zugeführtes Superoxid nicht vermindern.	83
Abbildung 24: Mitochondrienmembran-Fraktionen von PON2-überexprimierenden EA.hy 926 Zellen vermindern die Superoxidproduktion durch Reversen Elektronen Transfer.	84
Abbildung 25: Mitochondrienmembranen von naiven und PON2-überexprimierenden EA.hy- 926-Zellen zeigen keine Unterschiede in der α -Ketoglutarat-induzierten Superoxid- Produktion.	85
Abbildung 26: PON2 kann extern generiertes Superoxid in Mikrosomen nicht vermindern. .	86
Abbildung 27: Die Asparaginreste Asn ²⁵⁴ und Asn ³²³ sind die Glykosylierungsstellen von PON2.	88

Abbildung 28: Kontrolle der Expression von PON2-WT- / H ¹¹⁴ Q- / H ¹³³ Q- / S ³¹¹ C- / D ²⁶⁸ A- / N ^{254/323} A- / C ²⁸³ V-GFP-Fusionsproteinen im Western Blot.	90
Abbildung 29: Lokalisierung der PON2-Mutanten im ER.	91
Abbildung 30: Lokalisierung der PON2-Mutanten in den Mitochondrien.	92
Abbildung 31: Laktonase-Aktivität der verschiedenen PON2-Mutanten.	93
Abbildung 32: Deglykosylierung inhibiert die Laktonase-Aktivität von PON2.	94
Abbildung 33: Alle PON2-Mutanten besitzen anti-oxidative Aktivität.	95
Abbildung 34: PON2-H ¹¹⁴ Q- und -S ³¹¹ C Überexpression schützt vor Tunicamycin- und Staurosporin induzierter Apoptose.	96
Abbildung 35: 7-Ketocholesterol führt in EA.hy und EA.hy-PON2-HA-Zellen nicht zur Cardiolipinperoxidation.	98
Abbildung 36: Leichte Cytochrom C-Freisetzung nach 7-Ketocholesterol-Behandlung.	99
Abbildung 37: 7-Ketocholesterol induziert GRP78- und CHOP-, nicht aber NOX4-mRNA in Endothelzellen.	101
Abbildung 38: 7-Ketocholesterol induziert die CHOP-Induktion in HUVEC.	102
Abbildung 39: JNK-Inhibition oder Antioxidantien können die 7-KC-induzierte CHOP Expression nicht verhindern.	103
Abbildung 40: PON2-Überexpression verhindert nicht die 7-KC vermittelte CHOP-Expression.	103
Abbildung 41: 7-Ketocholesterol zeigte keine Caspase-3/7-Aktivierung in EA.hy und EA.hy-PON2-HA-Zellen.	104
Abbildung 42: PON2-Überexpression schützt EA.hy-Zellen nicht vor 7-KC-induziertem Zelltod.	105
Abbildung 43: 7-KC vermindert die PON2-mRNA-Expression tendenziell.	106
Abbildung 44: Zytotoxizität nach Rapamycin-, 3-Methyladenin- und 7-KC-Behandlung. ..	107
Abbildung 45: Autophagie-Inhibition konnte den 7-KC induzierten Zelltod nicht vermindern.	108
Abbildung 46: 7-KC führt zu Autophagosom-Bildung in EA.hy-Zellen.	109
Abbildung 47: 7-KC steigert die Autophagosomen-Bildung in EA.hy-Zellen.	110
Abbildung 48: Rapamycin vermindert den 7-KC-induzierten Zelltod.	111
Abbildung 49: Autophagie-Inhibition durch ATG5-siRNA vermindert den 7-KC induzierten Zelltod.	112
Abbildung 50: Störungen der Kalzium-Homöostase durch verschiedene Stimuli reduzieren die PON2-mRNA in EA.hy-Zellen.	113
Abbildung 51: Die 5'- und 3'UTR der PON2-mRNA beeinflussen nicht die Expression der Luziferase-mRNA.	114
Abbildung 52: Die PON2-mRNA-5'UTR vermittelt den mRNA-Abbau nach Thapsigargin.	115
Abbildung 53: Die kodierende Sequenz der PON2-mRNA wird durch Thapsigargin-Behandlung nicht beeinflusst.	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer und Sonden.....	37
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für RNA-Interferenz	38
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien.....	40
Tabelle 4: Zellzahl für Aussaat	43
Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele im BioRad Mini-Gel.....	56
Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im Peqlab Perfect-Blue L-Gel..	56
Tabelle 7: Aminosäure-Austausch-Mutationen von PON2	87

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetrasessigsäure
engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
etc.	lat.: <i>et cetera</i> (und die Übrigen)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
Firefly	engl.: Glühwürmchen
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRP 78	engl.: <i>glucose regulated protein of 78 kD</i>
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDL	engl.: <i>high density lipoproteinparticle</i>

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (engl.: <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	engl.: <i>low density lipoproteinparticles</i>
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	engl.: <i>messenger</i> -RNA
n	nano
NADH	Nikotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
o.g.	oben genannt
oxLDL	engl.: <i>oxidized low density lipoproteinparticles</i>
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> RT-PCR
RACE	engl.: <i>rapid amplification of complementary-DNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNS	engl.: <i>reactive nitrogen species</i>

ROS	engl.: <i>reactive oxygene species</i>
RT	Reverse Transkription
SMC	engl.: <i>smooth muscle cells</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
U	Uracil bzw. Units
u.a.	unter anderem
UPR	engl.: <i>unfolded protein response</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Arteriosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Folgen stellen die Haupttodesursache in westlichen Industrienationen dar. In den meisten Fällen liegen diesen Erkrankungen arteriosklerotische Gefäßveränderungen zugrunde. Arteriosklerose bezeichnet eine multifaktoriell bedingte systemische Erkrankung des Gefäßsystems, die durch Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion charakterisiert wird. Endotheliale Dysfunktion bezeichnet eine eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit des Blutgefäßes durch eine erhöhte Permeabilität des Endothels für Lipidpartikel und erniedrigtes Dilatationsvermögen der Gefäßmuskulatur. Verursacht werden diese Veränderungen im Gefäß durch vaskulären oxidativen Stress und damit einhergehende inflammatorische Prozesse ^{1, 2}. Dabei kommt es im Gefäß zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS), welche wiederum mit *low density lipoprotein*-(LDL-) Partikeln zu oxidierten oxLDL-Partikeln reagieren. Diese durchdringen das Endothel und akkumulieren im subendothelialen Raum. Vermehrte ROS-Bildung und Anreicherung von oxLDL wirken als proinflammatorische Stimuli und induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Seite des Endothels. Das wiederum erleichtert die Migration von T-Zellen und Monozyten durch das Endothel in den subendothelialen Raum, wo Monozyten zu Makrophagen ausdifferenzieren und das akkumulierte oxLDL mittels Endozytose aufnehmen. Die kontinuierliche Aufnahme des oxLDL führt schließlich zu einer Überladung der Makrophagen mit Lipidpartikeln und letztendlich zu deren Apoptose. Die apoptotischen Zellen werden jedoch nur unzureichend durch Phagozyten entfernt, so dass diese schließlich im subendothelialen Raum verbleiben ³. Aufgrund der histologischen Beschaffenheit der mit Lipiden überladenen Makrophagen spricht man bei dem eben beschriebenen Vorgang auch von Schaumzellbildung, dem ersten Anzeichen einer arteriosklerotischen Plaquebildung ⁴. Bei fortgeschrittener Plaquebildung kommt es durch die Verengung des Gefäßlumens oder durch das Abreißen einer Plaque (Plaqueruptur) zu vermindertem Blutdurchfluss und somit zu den fatalen Folgeerscheinungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall.

1.1.1 7-Ketocholesterol

7-Ketocholesterol (7-KC) gehört zur Gruppe der Oxysterole und bezeichnet ein an der C7-Position zum Keton oxidiertes Cholesterol-Molekül. Diese Oxidation erfolgt *in vivo* vornehmlich nicht enzymatisch vermittelt durch freie Radikale ^{5, 6}, die Aufnahme von 7-

Ketocholesterol aus der Nahrung über das Blut ist aufgrund der schnellen Metabolisierung in der Leber äußerst unwahrscheinlich ^{7, 8}. Unter pathophysiologischen Bedingungen wurde allerdings eine hohe Konzentration von Oxysterolen in arteriosklerotischen Läsionen gefunden. Unter diesen Oxysterolen zeigte 7-Ketocholesterol nach dem enzymatisch erzeugten 27-Hydroxycholesterol mengenmäßig den zweithöchsten Anteil. In den Läsionen konzentriert sich 7-KC vor allem in den Schaumzellen ⁹ und gelangte vermutlich als Bestandteil des oxLDLs, welches von Makrophagen aufgenommen wird, dorthin ¹⁰. Der hohe Anteil von 7-KC in Schaumzellen, sowie eine ganze Reihe pro-atherogener biologischer Eigenschaften lassen eine entscheidende Rolle von 7-KC in der Atherogenese vermuten. Dazu zählen vor allem die Hemmung des Cholesterol-Exports aus Zellen, Induktion der ROS-Bildung, Induktion von Apoptose und Störungen der Kalzium-Homöostase ^{6, 11, 12}. In den für die Bildung von arteriosklerotischen Plaques entscheidenden Gefäßwandzellen kann 7-KC Apoptose auslösen, darunter vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs – *smooth muscle cells*) ^{13, 14} aber auch in Endothelzellen ¹⁵. Andere Gruppen konnten durch 7-KC zwar ebenfalls Zelltod in SMCs detektieren, führten diesen jedoch auf einen komplexen Modus des Zelltods zurück, der nicht Apoptose-vermittelt war ¹⁶. Auch in humanen mikrovaskulären Endothelzellen wurde die Aktivierung mehrerer möglicher Zelltod-Signalwege beobachtet ¹⁷. Pedruzzi *et al.* führten die Induktion der Apoptose durch 7-KC auf eine Induktion der NADPH-Oxidase-4 (NOX4) zurück, die durch erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ER-Stress induziert und JNK aktiviert, um darüber den pro-apoptotischen Faktor CHOP zu induzieren ¹⁴. Ebenfalls in SMCs wurde ein verstärkender Effekt 7-Ketocholesteroles auf die TNF- α -Rezeptor vermittelte Apoptose gezeigt, der maßgeblich die Stabilität arteriosklerotischer Plaques reduzieren könnte ¹⁸. Außerdem wurde die 7-KC vermittelte Apoptose in neuronalen Zellen aus der Ratte auf den mitochondrialen Apoptose-Signalweg zurückgeführt ¹⁹. Erst kürzlich konnten erhöhte 7-KC Serumkonzentrationen in Patienten mit koronaren Herzkrankheiten beobachtet werden und somit einen direkten Zusammenhang zwischen Arteriosklerose und 7-KC herstellen ²⁰.

1.2 Die Proteinfamilie der Paraoxonasen

Die Proteinfamilie der Paraoxonasen (PON-Proteine) besteht aus den Mitgliedern PON1, PON2 und PON3 ²¹. Ihre Gene sind in einem Cluster auf Chromosom 7q21.3-22.1 lokalisiert ²². Alle drei PON-Proteine haben eine Größe von ~40 kDa und sind in Säugetieren hoch konserviert. So zeigen die Orthologe 79 – 95 %, die Paraloge ~ 65 % Sequenzhomologie auf

dem Aminosäurelevel²¹. Die Proteine weisen jedoch deutliche Unterschiede in Lokalisation, enzymatischer Aktivität und Regulation auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie auch unterschiedliche physiologische Funktionen ausüben. PON1 und PON3 werden vorwiegend in der Leber exprimiert. Während PON1 ausschließlich an HDL assoziiert im Serum zirkuliert²³⁻²⁵, konnten humanes PON2 und PON3 in einer Vielzahl von Geweben detektiert werden, wo sie vorwiegend intrazellulär agieren²⁶⁻²⁸. Ausschließlich in Caco-2-Zellen konnte bisher eine Sekretion von PON2 ins Darmlumen gezeigt werden, deren Funktion jedoch weiterhin unbekannt ist²⁹.

Der Name der Enzymfamilie ist auf PON1 zurückzuführen, welches durch die Fähigkeit das Organophosphat Paraoxon zu hydrolysieren charakterisiert wurde³⁰. Aufgrund der hohen Homologie zu PON1 wurden die später entdeckten Vertreter PON2 und PON3 ebenfalls als Paraoxonasen klassifiziert, obwohl PON2 keine und PON3 nur eine marginale Paraoxonase-Aktivität aufweist³¹. Allen PON-Proteinen gemeinsam ist eine Arylesterase- und Laktonase-Aktivität, wobei die einzelnen Enzyme in der Substratspezifität variieren^{31, 32}. Da die Laktonase-Aktivität bei allen Mitgliedern der PON-Familie am stärksten ausgeprägt ist und durch Strukturdaten untermauert wird, wird sie als die wichtigste enzymatische Aktivität angesehen. Endogene Substrate sind bisher nicht bekannt. Anhand von Mausmodellen konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass alle Mitglieder der PON-Familie anti-atherogene Eigenschaften besitzen³³⁻³⁶, die jedoch nach heutiger Ansicht eher durch eine anti-oxidative Aktivität als die enzymatische Laktonase-Aktivität bedingt sind.

1.2.1 Paraoxonase-1

PON1 wird vorwiegend in der Leber exprimiert und assoziiert mit HDL. Neben der namensgebenden Fähigkeit organische Phosphate zu hydrolysieren, bildet seine stärker ausgeprägte enzymatische Laktonase-Aktivität die wichtigste enzymatische Aktivität. Die Fähigkeit von PON1 die Oxidation von LDL *in vitro* zu verhindern³⁷⁻³⁹, lieferte erste Hinweise auf seine anti-atherogene Aktivität. Weitere Analysen zeigten, dass PON1 HDL und LDL vor Lipidperoxidation schützt, indem es bestimmte oxidierte Cholesterolester und Phospholipide in den oxidierten Lipoproteinen degradiert^{25, 39-44}. In Fallstudien konnte schließlich eine Korrelation von niedrigen PON1-Serumleveln mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden^{45, 46}. Polymorphismen im humanen PON1-Gen wurden in einigen Fallstudien ebenfalls mit Herzleiden in Verbindung gebracht⁴⁷. Im Tiermodell konnte anhand von PON1-*knockout*-Mäusen gezeigt werden, dass PON1 für den protektiven Effekt von HDL gegen die Oxidation von LDL essentiell ist und diese Mäuse ein zweifach erhöhtes Arteriosklerose-Risiko aufwiesen^{33, 48}.

Mäuse die hingegen PON1 überexprimierten waren deutlich resistenter gegen Arteriosklerose³⁴.

Erste Hinweise auf die Mechanismen der Arylesterase- / Paraoxonase-Aktivität und des LDL-Oxidation inhibierenden Effektes lieferte die Mutation der Aminosäure Cystein an Position 284 (Cys²⁸⁴). Wurde diese durch Alanin oder Serin ersetzt, verlor PON1 die Fähigkeit vor LDL-Oxidation zu schützen, behielt allerdings seine Arylesterase- und Paraoxonase-Aktivität⁴¹. Mit Veröffentlichung der Röntgenstruktur von PON1 bezweifelten die Autoren allerdings eine funktionelle Rolle von Cys²⁸⁴, da dieses im hydrophoben Kern des Proteins verborgen und somit für Substrate unerreichbar sei⁴⁹. Die zuvor beobachteten Effekte seien vielmehr auf eine generelle Destabilisierung der Gesamtproteinstruktur zurückzuführen. Tiefere Einblicke in den Mechanismus der Laktonase-Aktivität gelangen durch die gezielte Mutation spezifischer Aminosäuren im aktiven Zentrum von PON1. Dabei zeigte sich, dass eine Dyade aus Histidin-115 (His¹¹⁵) und Histidine-134 (His¹³⁴) zusammen mit einem katalytisch aktivem Calcium-Ion die Hydrolyse von Laktonen und Arylestern vermittelt, nicht jedoch die Hydrolyse von Phosphotriestern⁵⁰. In Folgestudien offenbarte sich, dass die Laktonase-Aktivität von PON1 für die anti-atherogenen Eigenschaften verantwortlich ist⁵¹.

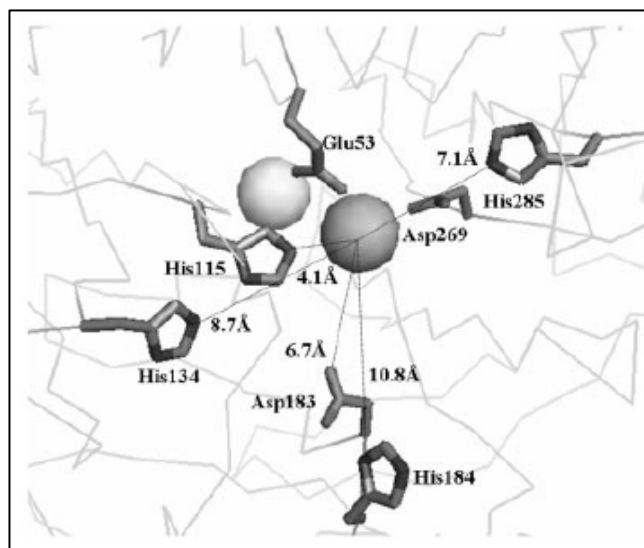


Abbildung 1: Enzymatisch aktives Zentrum von PON1⁵⁰.

1.2.2 Paraoxonase-2

Phylogenetische Analysen zeigten, dass PON2 vermutlich den evolutionär ältesten Vertreter der Paraoxonase-Enzyme darstellt und PON1 und PON3 sich wahrscheinlich durch Genduplikationen aus PON2 gebildet haben⁵². PON2 ist bisher weit weniger erforscht als PON1 und kann im Gegensatz zu diesem auch nicht in Lipoprotein-Partikeln nachgewiesen werden. Zwar wurde es intrazellulär in einer Vielzahl menschlicher Gewebe gefunden²⁶,

fehlte jedoch in einigem murinem Gewebe, wie Thymuszellen und Adipozyten²⁷. In humanen Gefäßwandzellen ist PON2 hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien lokalisiert, kann aber auch im periplasmatischen Raum und Nukleoplasma gefunden werden⁵³. Das PON2-Protein existiert in zwei glykosylierten Isoformen PON2-iso1 (~42 kDa) und PON2-iso2 (~38 kDa), die vermutlich durch Spleißen einer PON2 mRNA entstehen⁵³. Darauf deutet außerdem das Vorkommen verschieden langer PON2 mRNAs hin²². Ob sich die beiden Isoformen in ihrer Expression, Lokalisation und Funktion unterscheiden, ist bisher nicht bekannt.

Die wichtigste enzymatische Aktivität von PON2 ist die Laktonase-Aktivität, wohingegen die Paraoxonase-Aktivität fast gar nicht vorhanden ist bzw. weit unter der Aktivität von PON1 liegt³¹. Natürliche Substrate von PON2 sind bisher nicht bekannt. Interessanterweise ist PON2 jedoch in der Lage das N-3-oxododecanoyl-Homoserinlaktone (3oxoC12) zu hydrolysieren^{32, 54}. 3oxoC12 ist ein Schlüsselmolekül in der bakteriellen Kommunikation und spielt besonders im „quorum sensing“ von *Pseudomonas aeruginosa* eine wichtige Rolle. Dieses Gram-negative Bakterium infiziert besonders häufig immun-supprimierte Patienten, wie AIDS-Erkrankte, Patienten mit zystischer Fibrose oder Pneumonien in Form von vorwiegend nosokomialen Infektionen. Die Infektion kann zu schweren Komplikationen im Krankheitsverlauf bis hin zum Tod führen. Die *Pseudomonas*-Bakterien kommunizieren durch die Sekretion von 3oxoC12 und anderer Signalmoleküle und bilden einen Biofilm aus. Innerhalb dieses Biofilms besteht für die Bakterien ein gewisser Schutz vor anti-bakterieller Behandlung. Durch diese Zell-Zell-Kommunikation wird zudem die Virulenz des Bakteriums bestimmt. *Pseudomonas*-Bakterien, die durch Mutationen entweder kein 3oxoC12 sekretieren oder auf dieses nicht mehr reagieren konnten, wurden in Ratten oder Mäusen verstärkt abgebaut und bewirkten deutlich weniger Erkrankungen⁵⁵⁻⁵⁹. Diesbezüglich konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PON2 aufgrund seiner 3oxoC12 hydrolysierenden Aktivität vermutlich vor einer Infektion mit *P. aeruginosa* im Lungenepithel schützen könnte⁶⁰.

Genetische Polymorphismen (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) von PON2, insbesondere der SNP Ser³¹¹ oder Cys³¹¹, wurden mit kardiovaskulären Erkrankungen^{61, 62}, mikrovaskulären Komplikationen bei Diabetes^{63, 64} und Morbus Alzheimer^{65, 66} in Verbindung gebracht. Eine später durchgeführte Meta-Analyse konnte jedoch den Einfluss des Polymorphismus in Kodon 311 auf kardiovaskuläre Erkrankungen nicht bestätigen⁴⁷.

Auf molekularer Ebene liegen jedoch deutliche Kennzeichen einer potentiellen anti-arteriosklerotischen Wirkung von PON2 vor. Zellen mit einer PON2 Überexpression zeigen eine höhere anti-oxidative Aktivität und oxidieren LDL weniger effektiv als naive Zellen²⁶.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress, ein Initiationsfaktor der Arteriosklerose, die PON2-Expression in murinen Makrophagen erhöht⁶⁷. Die aufgrund dieser Erkenntnisse postulierte anti-atherogene Funktion konnte schließlich für Maus-PON2 gezeigt werden. So entwickelten PON2 defiziente Mäuse durch erhöhten oxidativen Stress deutlich größere arteriosklerotische Läsionen als Mäuse mit normaler PON2-Expression³⁵. Adenovirale Überexpression humaner PON2 in Mäusen erhöhte den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen, das anti-oxidative Potential des Serums und die anti-inflammatorische Wirkung von HDL. Dadurch zeigte sich, dass erhöhte PON2-Spiegel *in vivo* anti-arteriosklerotisch wirken⁶⁸. Eine Analyse arteriosklerotischer Plaques aus humanen Karotis-Arterien ergab deutlich niedrigere PON2-mRNA und Protein Spiegel als in Karotis-Segmenten gesunder Probanden⁶⁹. Die Mechanismen der anti-arteriosklerotischen Wirkung von PON2 wurden von Horke *et al.* in humanen Gefäßzellen untersucht⁵³. PON2 Überexpression wirkt dort anti-oxidativ und verringert zudem ER-Stress bedingte Apoptose⁵³. Anhand von PON2 defizienten Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die anti-oxidative Funktion von PON2 die Aktivität des mikrosomalen Enzyms Diacylglycerol-Acyltransferase 1 (DGAT1) moduliert⁷⁰. DGAT1 ist an der Fettsäuresynthese beteiligt, und somit an der Anreicherung von Triglyzeriden, die in Makrophagen zur Schaumzellenbildung führt⁷¹. Neben der ER-Stress-induzierten Apoptose, kann PON2 über seinen anti-oxidativen Mechanismus auch den intrinsischen Mitochondrien-vermittelten Signalweg der Apoptose vermindern⁷².

1.2.3 Paraoxonase-3

Wie PON1, wird PON3 hauptsächlich in der Leber und in geringen Mengen auch in der Niere exprimiert und kann an HDL assoziiert im Serum nachgewiesen werden.^{23, 25}. Deshalb wurde die Funktion von PON3 zunächst mit der des bereits besser untersuchten PON1 verglichen. So vermittelte aus Kaninchen isoliertes PON3 *in vitro* ebenfalls Schutz vor der LDL-Oxidation⁷³. Zusätzlich konnte dieser Effekt auch in Endothelzellen aus der Aorta beobachtet werden, wo PON3 außerdem bereits oxidierte LDL-Partikel inaktivieren konnte²⁴. So wurde PON3 eine mit PON1 vergleichbare anti-oxidative und somit anti-atherogene Funktion zugesprochen.

Im Gegensatz zu PON1, können jedoch nur sehr geringe Mengen PON3 im Serum nachgewiesen werden und es zeigte sich, dass nur 5% des exprimierten PON3 in die Blutbahn abgegeben werden, wohingegen dieser Anteil bei PON1 80% beträgt²⁸. Außer im Serum wurde auch intrazelluläres PON3 gefunden, dem aufgrund der geringen Serumkonzentration von PON3, möglicherweise eine wichtigere Rolle zukommt als bisher angenommen. Gestützt

wurde diese These durch Analysen in Mäusen die transgen humanes PON3 überexprimierten. In den Tieren assoziierte humanes PON3 weder mit humanem, noch mit murinem HDL, wodurch alle beobachteten Effekte auf das intrazelluläre PON3 zurückgeführt werden können⁷⁴. So wurde bei PON3 überexprimierenden Mäusen ein vermindertes Auftreten von Arteriosklerose und Adipositas in Begleitung eines reduzierten Lipidgehalts im Blut beschrieben⁷⁴. Um die anti-atherogenen Effekte von PON3 zu beschreiben, liegt daher für zukünftige Analysen ein Vergleich mit dem intrazellulären PON2 nahe.

1.3 ER-Stress

Eine Störung der Homöostase des endoplasmatischen Retikulums (ER), sogenannter ER-Stress, wirkt sich aufgrund der zentralen Rolle des ER in der Zelle entscheidend auf die Physiologie und das Überleben der Zelle aus. Vielfältige Faktoren können ER-Stress auslösen wie Störungen der zellulären Calcium- oder Redox-Homöostase, Hyper- oder Hypoglykämie, ein Mangel an Aminosäuren oder die unvollständige Faltung bzw. unvollständige post-translationale Modifikation von Proteinen. Die Zelle reagiert auf diese Faktoren mit dem ER-Stress Signalweg *unfolded protein response* (UPR), dessen Name auf die Akkumulation ungefalteter Proteine unter ER-Stress zurückzuführen ist. Ziel einer Aktivierung des UPRs ist das Überleben der Zelle zu gewährleisten und die Funktion des ER wieder herzustellen. Dazu werden die Protein-faltenden Chaperone transkriptionell induziert und die allgemeine Proteintranslation blockiert. Kann durch diese Maßnahmen der ER-Stress nicht bewältigt oder der auslösende Stimulus nicht behoben werden, führt der UPR die Zelle in die Apoptose.

Das ER ist entscheidend am Proteinstoffwechsel in der Zelle beteiligt. Sowohl an Lipide gebundene Proteine, als auch sekretorische Proteine werden nach ihrer Synthese im ER weiterverarbeitet und modifiziert. An den Ribosomen synthetisierte Proteine werden im ER durch Chaperone post-translational zu ihrer funktionellen, thermodynamisch günstigen dreidimensionalen Struktur gefaltet. Zahlreiche andere Enzyme führen zum Beispiel durch Ausbildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung andere post-translationale Modifikationen ein, so dass die Aufrechterhaltung der ER-Homöostase einen sehr hohen Energieaufwand erfordert. Entsprechend anfällig reagiert das ER auf Nährstoffmangel und Hypoxie, wie auch auf Änderungen der Lipidkomposition in der ER Membran, wie sie während der Atherogenese in Zellen des Gefäßsystems auftreten kann⁷⁵. All diese Störungen führen letztendlich zu gestörter Translation und Modifikation von Proteinen, die im ungefalteten oder fehlgefalteten Zustand im ER akkumulieren. Dies wiederum aktiviert den

UPR-Signalweg, der sich in drei verschiedene Signalkaskaden unterteilt ^{76, 77}. Die ungefalteten Proteine binden an das im ER lokalisierte Chaperon GRP78 (*glucose-regulated-protein of 78 kDa*), wofür dieses seine physiologischen Assoziationspartner PERK (*pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase*), ATF6 (*activated transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) entlässt ⁷⁷. Ausgehend von den drei Transmembranrezeptoren PERK, ATF6 und IRE1 wird das ER-Stress Signal in den Nukleus fortgeleitet um eine Veränderung der Genexpression herbeizuführen: Ein Ziel ist hierbei der sofortige Translations-Stopp, um den Nachschub an ungefalteten Proteinen zu unterbinden. Dadurch wird eine Überlastung des ER vermieden und die Chaperone erhalten mehr Zeit ungefaltete Proteine korrekt zu falten. Dieser von PERK ausgehende Signalweg führt zur Phosphorylierung von eIF2 α und bewirkt eine Translations-Inhibition und aktiviert den nuklearen Transkriptionsfaktor ATF4. Über den ATF6 und IRE1 vermittelten Signalweg werden vermehrt Chaperone und Enzyme zum Abbau der akkumulierten Proteine translatiert. Die Aktivierung des UPR ist somit als Versuch der Zelle zu verstehen, wieder eine physiologische post-translationale Protein-Modifikation zu gewährleisten und die fehlerhaft gefalteten Proteine abzubauen. Ist dies nicht möglich, so überwiegen die pro-apoptotischen Stimuli unter Aktivierung von CHOP und die Zelle geht in die Apoptose über.

Aufgrund der mannigfaltigen Aktivierungsmöglichkeiten von ER-Stress und des UPR, werden beide mit diversen Pathophysiologien in Verbindung gebracht, darunter Diabetes, Morbus Alzheimer, Krebs und Arteriosklerose. Da der UPR-Signalweg zu inflammatorischen Prozessen ² und in die Apoptose führen kann ⁴, könnte er die Bildung arteriosklerotischer Plaques fördern. Außerdem wurde gezeigt, dass der UPR in frühen und späten Stadien der Arteriosklerose aktiviert wird ⁷⁸ und in Endothelzellen durch Oxysterole induzierbar ist ⁷⁹.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass PON2 durch ER-Stress transkriptionell induziert wird und endotheliale Zellen vor UPR-induzierter Apoptose schützen kann ⁵³. Der molekulare Mechanismus dieses potentiell bedeutenden Effektes ist bisher nicht bekannt. Eine mögliche Beteiligung der anti-oxidativen Aktivität von PON2 liegt jedoch nahe, da ER-Stress oxidativen Stress verursacht. Um bei der Proteinfaltung Disulfidbrücken ausbilden zu können, befindet sich das ER-Lumen in einer einzigartigen oxidativen Umgebung. Dabei kann es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS; *reactive oxygen species*) in nicht unerheblichem Ausmaß kommen. Bis zu 25% des Gesamt-ROS-Produktion einer Zelle könnten durch oxidative Disulfidbrückenbildung während der Proteinfaltung bedingt sein ⁸⁰. Unklarheit herrscht noch über den Mechanismus der ROS-Bildung, doch wurden zwei Möglichkeiten vorgeschlagen. Während der oxidativen Disulfidbrückenknüpfung werden die

Elektronen der Cysteinreste des gefalteten Proteins auf die Thiolgruppen der Proteine Disulfid Isomerase (PDI) und ER-Oxidase1 (ERO1) übertragen, welche diese ihrerseits auf molekularen Sauerstoff übertragen und somit ROS generieren. Die zweite Hypothese sieht die Ursache in der Misspaarung von Thiolresten in Proteinen zu Disulfidbrücken, welche unter Glutathion-Oxidation wieder rückgängig gemacht werden. Jede Neuverknüpfung überträgt wieder Elektronen über PDI/ERO1 auf Sauerstoff und generiert ROS.

1.4 Oxidativer Stress

Die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (ROS / RNS) ist in aeroben Organismen unvermeidlich und ROS oder RNS wurden lange als zufällige und schädliche Nebenprodukte des aeroben Metabolismus oder als Komponenten der körpereigenen Immunabwehr gegen Mikroorganismen betrachtet. Inzwischen gibt es jedoch eine Vielzahl von Berichten, die eine Adaption des Metabolismus auf die Entstehung von ROS und RNS belegen und die Rollen der unterschiedlichen Moleküle und Radikale nicht nur als schädliche Metaboliten, sondern auch als Signalmoleküle in physiologischen Prozessen der Redox-Signalweiterleitung vorschlagen ⁸¹. Als Oxidativer Stress wird ein Ungleichgewicht aus exzessiver ROS- oder RNS-Freisetzung bei limitierter anti-oxidativer Verteidigung bezeichnet.

1.4.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Die Initiation der ROS-Bildung erfordert Elektronen, die unter physiologischen Bedingungen z.B. in der mitochondrialen Atmungskette oder durch Enzyme wie die NAD(P)H-Oxidasen aus NAD(P)H oder Xanthinoxidase gewonnen werden und dann auf molekularen Sauerstoff (O_2) zur Bildung von Superoxid (O_2^-) übertragen werden. Obwohl selbst kaum oxidierend, eher sogar reduzierend ⁸², stellt das unter physiologischem pH als Anion vorliegende Superoxid die initiale reaktive Sauerstoffspezies dar. Durch seine negative Ladung und den radikalischen Charakter besitzt es eine kurze Halbwertszeit und kann biologische Membranen nicht durchdringen. O_2^- wird enzymatisch von Superoxiddismutasen (SOD) zu je einem Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Wasser (H_2O) dismutiert ^{83, 84}, kann unter physiologischen Bedingungen aber auch nicht-enzymatisch zu H_2O_2 oder Singulett-Sauerstoff umgewandelt werden ⁸⁵. Wasserstoffperoxid wirkt oxidativ, kann biologische Membranen passieren, hat keinen radikalischen Charakter und ist deshalb wesentlich langlebiger als Superoxid. In Gegenwart von reduzierten Übergangsmetallen wie Eisen (Fe^{2+}) oder Kupfer (Cu^{1+}) kann H_2O_2 durch die Fenton-Reaktion in das hochreaktive Hydroxylradikal ($OH^\cdot$)

umgewandelt werden ⁸⁶. Das Hydroxylradikal ist äußerst reaktiv und kann nahezu alle Makromoleküle oxidieren. Um diese Reaktion zu verhindern wird H_2O_2 durch Katalase, Glutathionperoxidase oder Thioredoxinperoxidase zu zwei Molekülen Wasser dissoziiert. Im Falle der Glutathion- oder Thioredoxinperoxidase wird dabei Glutathion oder Thioredoxin oxidiert und anschließend unter Verwendung der Elektronen von NAD(P)H wieder zurückgewonnen.

In höheren Organismen wird Stickstoffmonoxid (NO) durch Oxidation eines Stickstoffatoms der Guanidin-Endgruppe eines Arginins synthetisiert ⁸⁷. Dieser Prozess wird abhängig vom Gewebe von einer der drei NO-Synthase-Isoformen katalysiert. Als initiale RNS kann auch NO entsprechend den Umgebungsbedingungen zum Nitrosoniumkation (NO^+), Nitroxyl-Anion (NO^-) oder mit Superoxid zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagieren ⁸⁸. Die physiologischen Funktionen von NO reichen von den vasodilatierenden Effekten im Endothel bis zur Immunabwehr gegen Mikroorganismen in den Makrophagen.

Pathophysiologisch ist vor allem die Reaktion von NO mit O_2^- zu Peroxynitrit relevant. Dieses peroxynitriert unspezifisch Proteine, Lipide und DNA und führt damit zu einer Entkopplung der eNOS von der Arginin-Oxidation, woraufhin diese die Elektronen unter Superoxidbildung auf molekularen Sauerstoff überträgt. Dieses bildet mit dem verbleibenden NO erneut Peroxynitrit und leitet den Zyklus erneut ein. Durch die Erniedrigung des Gehalts an vasodilatierendem NO und die oxidative Schädigung der Zellen ist dieser Effekt maßgeblich an der Atherogenese beteiligt. ^{89, 90}. Weiterhin führen ROS und RNS zu direkten oxidativen Schädigungen an DNA, Lipiden und Proteinen ^{91, 92} und sind zudem an der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt wie Diabetes Mellitus, Morbus Alzheimer, Krebs, inflammatorischen Prozessen und ischämischen Reperfusionsschäden ⁹³.

1.4.2 Oxidativer Stress und ROS in den Mitochondrien

Die mitochondriale Atmungskette gilt mit dem Gesamtprozess der oxidativen Phosphorylierung als einer der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies. Selbst unter Normalbedingungen der Zelle kommt es vor, dass Elektronen aus der Atmungskette unter Superoxidbildung direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen werden ^{86, 94}. Dieses Superoxid wird jedoch direkt von der MnSOD in der mitochondrialen Matrix oder der Cu/ZnSOD im Intermembranraum der Mitochondrien zu H_2O_2 und Wasser dismutiert.

Die Atmungskette (siehe Abbildung 2) beginnt mit der Übertragung zweier Elektronen von NADH auf den Flavinmononukleotid-Kofaktor (FMN) der „NADH: Coenzym Q Oxidoreduktase“ (NADH-Dehydrogenase), die auch als Komplex I der mitochondrialen Atmungskette bezeichnet wird. An der Coenzym Q-Reduktionsstelle des Komplex I werden

die Elektronen auf Ubiquinon (Q) übertragen und reduzieren dieses zum Ubiquinol (QH₂). Dieses Ubiquinol diffundiert in der inneren Mitochondrienmembran und wird am Q_o-Zentrum der „Coenzym Q: Cytochrom C Oxidoreduktase“ (Cytochrom C-Reduktase) oder auch Komplex III der Atmungskette unter Übertragung von zwei Elektronen zu Q oxidiert. Dabei wird das erste Elektron dieser Oxidation über das Rieske-Protein in Komplex III auf Cytochrom C übertragen, welches das Elektron zu Komplex IV der Atmungskette transportiert. Das zweite Elektron wird im Inneren des Proteins an die zweite Q-Bindestelle in Komplex III, dem Q_i-Zentrum transportiert. Dort reduziert es vorübergehend ein Ubiquinon (Q) zu einem Ubisemiquinon-Radikal, bis ein weiteres Elektron von einem weiteren QH₂ am Q_o-Zentrum, das Ubisemiquinon am Q_i-Zentrum zum Ubiquinol reduziert. Auf diese Weise wird unter Übertragung von zwei Elektronen aus zwei Ubiquinol-Molekülen auf Cytochrom C an Komplex III, ein Ubiquinol wieder hergestellt. Dieser Prozess ist auch unter dem Namen Q-Zyklus bekannt⁹⁵. Das Cytochrom C überträgt Elektronen auf den Komplex IV der Atmungskette, die „Cytochrom C: Sauerstoff Oxidoreduktase“ (Cytochrom C-Oxidase), der dann nach dem Erhalt von vier Elektronen molekularen Sauerstoff zu Wasser oxidiert. Während der ganzen Elektronenübertragungsprozesse wurden Protonen zum Aufbau eines Protonengradienten von der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran in den Intermembranraum gepumpt, um nun durch Komplex V (FoF1-ATP-Synthase) der Atmungskette in die Matrix zurückzufließen und die dabei entstehende Energie zur ATP-Synthese zu nutzen.

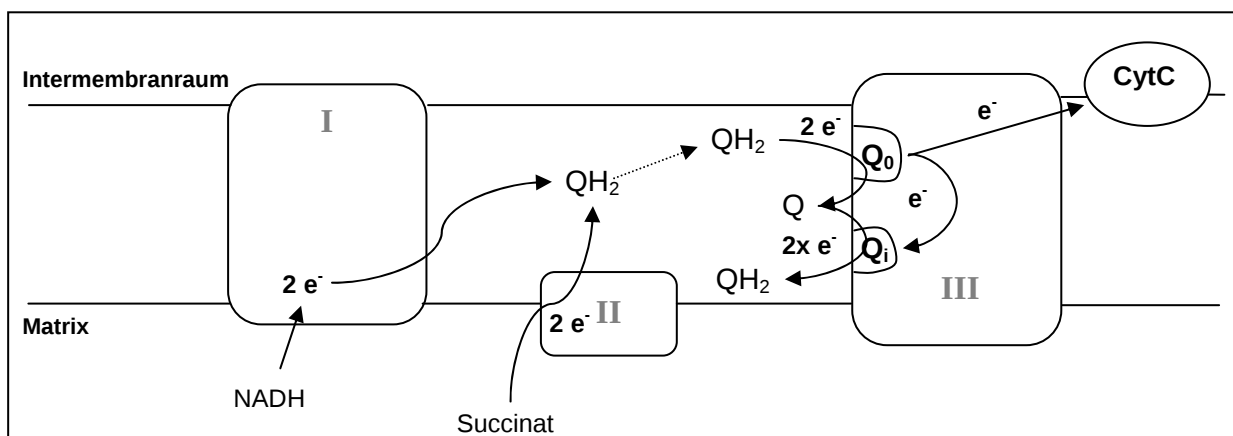


Abbildung 2: Mitochondriale Elektronentransportkette. Schematischer Ausschnitt der mitochondrialen Elektronentransportkette zwischen Komplex I und III ohne Darstellung der Protonenverschiebungen (Erklärungen siehe Text).

Unter normalen Umständen reagiert keiner der eben genannten mitochondrialen Elektronendonoren oder -transporter wie NADH/NADPH oder QH₂ mit molekularem Sauerstoff zu Superoxid, obwohl sie thermodynamisch dazu in der Lage wären. Die

Superoxidproduktion in der Atmungskette findet dagegen an den redox-aktiven prosthetischen Gruppen in den Komplexen der Atmungskette statt, wenn die o.g. Elektronentransporter wie QH₂ an diese binden und kinetische Faktoren die Ein-Elektronen-Reduktion von O₂ zu O₂⁻ fördern oder verhindern⁹⁶. Die Superoxidproduktion in der Atmungskette wurde lange Zeit den Komplexen I und III zugeschrieben⁹⁷⁻⁹⁹. Wenn Komplex III am Q_i-Zentrum durch Antimycin gehemmt wird, kann nur ein Elektron von QH₂, welches an das Q_o-Zentrum bindet über Komplex III an Cytochrom C abgegeben werden und lässt ein Ubisemiquinon-Radikal zurück, welches dort mit Sauerstoff zu Superoxid reagiert¹⁰⁰⁻¹⁰². Auf diese Weise produziert Komplex III große Mengen Superoxid, das an beide Seiten der inneren Mitochondrienmembran abgegeben wird^{97, 103-105}. Ohne Antimycin jedoch wird das Q_o-Zentrum nicht stabilisiert und es besteht nur eine sehr geringe Superoxidproduktion durch Komplex III¹⁰⁶. Auch wenn eine Superoxidproduktion unter physiologischen Bedingungen in gewissen Situationen an Komplex III möglich ist, so ist diese jedoch im Hinblick auf die Superoxidproduktion an Komplex I unter physiologischen Bedingungen vernachlässigbar⁹⁶. Zur Superoxidbildung an Komplex I kommt es entweder bei der Aufnahme der Elektronen von NADH oder bei der Reduktion von Ubiquinon zu Ubiquinol¹⁰⁷. Die Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff zur Superoxidbildung erfolgt dabei ausschließlich in die mitochondriale Matrix^{108, 109}. Der Komplex I-Inhibitor Rotenon bindet an die Q-Bindestelle des Komplexes, wodurch es zu einem Rückstau und deshalb zu einer Übertragung der Elektronen auf O₂ kommt^{99, 110}. Folglich wird die Superoxidbildung an Komplex-I durch jegliche Erhöhung des NADH/NAD⁺-Gleichgewichts gesteigert, wie z.B. bei Unterbrechungen der Atmungskette durch Protein-Funktionsverlust, Mutationen, Ischämie oder Cytochrom C Freisetzung^{101, 111}. Bei normaler oxidativer Phosphorylierung in der Atmungskette wird NADH ständig verbraucht, weshalb über diesen Mechanismus nur wenig Superoxid an Komplex I entstehen kann⁹⁹. Eine hohe Aktivität von Komplex II, welcher über Succinat aus dem Zitratzyklus das QH₂/Q-Verhältnis erhöht, führt zu einem reversen Elektronentransfer (RET) von QH₂ zurück zur Q-Bindungsstelle von Komplex I¹¹². Durch den hohen Anteil an QH₂ in der Membran wird die Elektronenübertragung aus Komplex I auf Q zur Bildung von weiterem QH₂ erschwert. Es kommt zur Bildung von radikalischen und nicht-radikalischen Semiquinon-Zwischenstufen, die wiederum ihre Elektronen auf O₂ unter Bildung von O₂⁻ übertragen¹¹²⁻¹¹⁴. Auch wenn der genaue Mechanismus der RET-induzierten Superoxidproduktion noch nicht geklärt ist, stellt sie die bisher höchste in Mitochondrien gemessene Superoxidproduktion dar^{112, 115, 116}.

Außerhalb der Mitochondrienmembran kann Superoxid in der mitochondrialen Matrix durch α -Ketoglutaratdehydrogenase (α KGDH) ^{117, 118} und in der äußeren Mitochondrienmembran durch Monoaminoxidase (MAO) ¹¹⁹ generiert werden. Diese Prozesse laufen unabhängig vom Q-Zyklus / Q-Pool ab ¹¹⁸.

Neben oxidativen Schäden, die Superoxid vor allem durch die Weiterreaktion zu anderen ROS oder RNS vermittelt, stellt die mitochondriale Superoxidproduktion einen Startpunkt des Apoptose-Signalwegs dar. Das an oder in der inneren Mitochondrienmembran produzierte Superoxid wird durch SODs zu H_2O_2 dismutiert, welches das Membranlipid Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran peroxidiert und damit die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien ermöglicht. Die auf diese Weise eingeleitete Apoptose kann im Falle einer Deregulation zu einer Vielzahl von Erkrankungen beitragen.

1.4.3 Anti-oxidative Systeme

Verschiedene anti-oxidative Enzym-Systeme kontrollieren das zelluläre Redox-Gleichgewicht. Unter den humanen Enzymen sind die Superoxiddismutasen (SOD) und Cytochrom C direkt zum Abbau von Superoxid befähigt. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird entstehendes Superoxid größtenteils, je nach Entstehungsort im Zytosol von Cu/ZnSOD (SOD1), in den Mitochondrien von MnSOD (SOD2) und extrazellulär durch EC-SOD (SOD3) zu je einem Molekül H_2O_2 dismutiert. Alle SOD-Varianten katalysieren die Dismutase über Redox-aktive Übergangsmetall-Zentren.

Unter mitochondrialem oxidativem Stress dissoziiert Cytochrom C, nachdem Cardiolipin durch H_2O_2 peroxidiert wird, von der inneren Mitochondrienmembran und ist als lösliches Protein im Intermembranraum der Mitochondrien zu finden ¹²⁰. In dieser löslichen Form kann Cytochrom C selbst anti-oxidativ wirken und O_2^- zu O_2 zurück oxidieren ^{121, 122}. Mit einer Eisen-Hämgruppe enthält auch Cytochrom C ein redox-aktives Übergangsmetall, was somit als Charakteristikum von Superoxid-vermindernden Enzymen aufgefasst werden kann. Neben der ebenfalls Eisen enthaltenden Katalase gibt es mit den Glutathion- und Thioredoxinperoxidasen noch zwei weitere wichtige H_2O_2 abbauende Enzyme. Diese reduzieren H_2O_2 indirekt zu zwei H_2O -Molekülen, wobei die Moleküle Glutathion oder Thioredoxin oxidiert werden. Mittels NADPH wird das oxidierte Glutathion bzw. Thioredoxin wieder reduziert und der Zyklus der Wasserstoffperoxid-Reduktion komplettiert. Glutathion stellt den Hauptabbauweg für H_2O_2 in den Mitochondrien dar. Es sind jedoch bisher keine Enzyme bekannt, die Superoxid alleine durch freie Cysteinreste, oder durch Hilfsmoleküle wie Glutathion abbauen können.

Anti-oxidative Effekte wurden auch für das in nahezu allen Zellmembranen gefundene Coenzym Q beobachtet ¹²³⁻¹²⁵. Diese anti-oxidative Rolle ist jedoch stark von der genauen Lokalisierung und dem jeweiligen Oxidationsstatus im Q-Zyklus abhängig. Als anti-oxidative Spezies tritt dabei das Ubiquinol (QH₂) in Erscheinung, welches in der Phospholipiddoppelschicht der Mitochondrien- oder Zellmembran die Lipidperoxidation verhindern kann ^{124, 125}, indem es deren radikalischen Redox-Zyklus unter Bildung eines Semiquinon-Radikals unterbricht. Dieses wird durch die Reaktion mit weiteren Semiquinon-Radikalen oder Vitamin E wieder zu QH₂ regeneriert. Beide Reaktionen sind in der Phospholipidschicht gegenüber der Reaktion mit Sauerstoff zu Superoxid favorisiert. Bestätigt wird diese anti-oxidative Rolle von QH₂ auch durch die Effekte des artifiziell in die Mitochondrien geleiteten Quinons Mito-Q ¹²⁶. Eine Reaktion des Semiquinon-Radikals mit molekularem Sauerstoff tritt nur an der Grenzfläche der Membran zur wässrigen Matrix oder Zytosol auf, oder wenn durch äußere Einflüsse, z.B. erhöhte ROS-Bildung, die Semiquinon-Radikalbildung begünstigt wird ¹²⁷. Letzteres dürfte am ehesten die Superoxidbildung an den Q-Bindungsstellen von Komplex I und III während der Atmungskette in der Mitochondrienmembran beschreiben.

In Zellen eingebracht kann die Substanzklasse der Quinone durch einen Redox-Zyklus-Prozess jedoch auch große Mengen ROS produzieren. Im Redox-Kreislauf (von engl. *redox-cycling*) wird eine Substanz initial zum Radikal reduziert, welches z.B. Sauerstoff zu Superoxid reduziert und damit eine Kettenreaktion auslöst in deren Verlauf die Ausgangssubstanz immer wieder in ihren Ursprungszustand zurück oxidiert wird und den Kreislauf von neuem initiiert. In dieser Arbeit wurde mit dem zytotoxischen 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ) intrazellulär Superoxid generiert. Der Redox-Zyklus des DMNQ wird durch Ein-Elektronen-Reduktion von NADPH über die Enzyme NADPH-Cytochrom P450-Reduktase an der ER-Membran oder NADH-Cytochrom b5-Reduktase an der äußeren Mitochondrienmembran initiiert ¹²⁸. Eine Beteiligung der mitochondrialen Atmungskette bei der DMNQ-induzierten Superoxidproduktion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die Inhibition von Komplex I durch Rotenon oder Komplex II durch TTFA, die DMNQ-induzierte Superoxid-Bildung verhinderten ¹²⁹. Alternativ kann der Redox-Zyklus des DMNQ auch im Zytosol mit einer Zwei-Elektronen-Reduktion durch das Enzym NADPH-Oxidoreduktase 1 (DT-Diaphorase) eingeleitet werden und produziert H₂O₂ anstatt Superoxid.

1.5 Zelltod

Während im programmierten Zelltod die Zellbestandteile kontrolliert abgebaut und von den benachbarten Zellen aufgenommen werden, werden im unprogrammierten Zelltod, der Nekrose, die Zellorganellen unkontrolliert zerstört und in die Umgebung freigesetzt. Die Unterscheidung der verschiedenen Zelltodsignalwege ist jedoch nicht immer eindeutig, da häufig mehrere Wege gleichzeitig aktiviert werden¹³⁰. Die Identifizierung des dominierenden Signalweges, der letztlich den eigentlichen Zelltod einleitet, ist experimentell schwierig¹³¹. Im Folgenden werden zwei für diese Arbeit wichtige Signalwege des programmierten Zelltodes beschrieben.

1.5.1 Apoptose

Im Laufe der Evolution haben multizelluläre Organismen einen Mechanismus entwickelt, beschädigte oder infizierte Zellen zu beseitigen um deren Ausbreitung zu verhindern und damit verbundene Schäden am Gesamtorganismus zu minimieren. Dieser programmierte Zelltod ist morphologisch durch das Schrumpfen der Zelle, Verdichtung des Nukleus, Zerstörung des Zytoskeletts, Chromatiden-Kondensation, Bildung von Membrans umschlossenen *apoptotic bodies* und DNA-Fragmentierung gekennzeichnet und wird als Apoptose bezeichnet. Die Reste der fragmentierten Zelle werden von Membranen umschlossen und als sogenannte apoptotische Vesikel von benachbarten phagozytischen Zellen aufgenommen. Die Aktivierung der Apoptose kann durch zahlreiche Stimuli über unterschiedliche Signalwege erfolgen. Die meisten sind jedoch von der Aktivierung der Caspase-Kaskade gekennzeichnet, an deren Ende die Aktivierung der Caspase-3/7 steht. Die Aktivierung der Caspase-3/7 stellt wahrscheinlich einen terminalen, nicht mehr umkehrbaren Schritt der Apoptose dar. Caspasen sind eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die im Zytosol der Zelle als inaktive Proenzyme vorliegen und durch proteolytische Spaltung aktiviert, eine Vielzahl von zellulären Proteinen und Substraten abbauen^{132, 133}. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade erfolgt hauptsächlich über den extrinsischen, Rezeptor-vermittelten oder den intrinsischen, mitochondrialen Weg. Der extrinsische Weg wird extrazellulär durch die Bindung von pro-apoptotischen Faktoren wie TRAIL, TNF- α und Fas an ihre entsprechenden Transmembranrezeptoren, auch Todesrezeptoren genannt, aktiviert und führt in der Zelle zur Formierung des DISC (*death-inducing-signalling-complex*). Dabei rekrutiert der Rezeptor die Fas-assoziierte-Todes-Domäne FADD (*Fas-associated death domain*) und die Procaspasen-8 und -10, wodurch diese aktiviert werden und wiederum die terminale Caspase-3 aktivieren¹³³. Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird dagegen über verschiedene intrazelluläre

Stimuli, z.B. den pro-apoptotischen Faktor CHOP, DNA-Schäden, UV-Strahlung und Zytostatika aktiviert und schließlich über die Mitochondrien vermittelt¹³³. Dort kommt es vermutlich durch die Störung der Atmungskette zur Bildung von O_2^- welches von der MnSOD zu H_2O_2 dismutiert wird. Durch diesen Stimulus wird die Peroxidaseaktivität vom Membran-assoziierten Cytochrom C aktiviert, welches die spezifische Peroxidation von Cardiolipin, einem Lipid der inneren Mitochondrienmembran katalysiert. Durch diese Peroxidation ändert Cardiolipin seine Konformation und entlässt das assoziierte Cytochrom C aus seiner Bindung an die innere Mitochondrienmembran^{134, 135}. Dieser Stimulus führt zur Öffnung der mitochondrialen Membran-Permeabilitäts-Pore in der äußeren Mitochondrienmembran und damit zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dieser Schritt kann durch die Interaktion von anti-apoptotischen Proteinen der Bax/Bcl-2-Familie mit der Mitochondrien-Membran-Permeabilitäts-Pore unterbunden, oder durch die pro-apoptotischen Proteine der Familie gefördert werden¹³⁶. Sofern ausreichend Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird, aktiviert dieses die Caspase-9 und bildet das sogenannte Apoptosom, welche schließlich weitere Caspasen (u.a. Caspase-3) aktiviert.

Die Apoptose ist ein zentraler Regulationspunkt der Gewebekonstruktion und in vielerlei Erkrankungen modifiziert. So zeichnen sich einige Erkrankungen durch einen übersteigerten Zellverlust aus (z.B. Arteriosklerose; Diabetes Typ-I; ALS), wohingegen beispielsweise bei Krebs eine zu geringe Apoptose-Rate ursächlich ist.

1.5.2 Autophagie

Autophagie ist ein vorwiegend zellprotektiver Signalweg, dessen Defekt mit Krebs und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Morbus Parkinson in Verbindung gebracht wird. Neben der Mikroautophagie, in der lysosomaler Verdau kleinerer Mengen zytosolischer Proteine stattfindet und der Chaperon-vermittelten Autophagie, die gezielt zytoplasmatische Proteine erkennt und mittels eines Proteinkomplexes ins Lysosom transferiert, meint der Begriff Autophagie vor allem den Prozess der Makroautophagie¹³⁷.

Autophagie kann in der Zelle durch Mangel an Nährstoffen und somit Mangel an Energie oder Mangel an Wachstumsfaktoren ausgelöst werden^{138, 139}. Auf diese Stimuli hin wird der Autophagie-Signalweg beispielsweise über Inhibition des mTOR-Proteins (*mammalian target of rapamycin*) eingeleitet, um die Wiederherstellung der Energieversorgung und somit das Überleben der Zelle sicher zu stellen. Die Initiation des Signalwegs führt zur Aktivierung einer Vielzahl von *Autophagy target genes* (ATGs), die wiederum zur Bildung einer Doppelmembran innerhalb der Zelle führt. Dieses sogenannte Autophagosom umschließt beschädigte Organellen, Proteinaggregate, mikrobiologische Pathogene oder auch ganze

Abschnitte des Zytosols einschließlich seiner Proteine. Während des Prozesses der Autophagosom-Bildung wird das Protein LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) vom proLC3 zum LC3-I prozessiert, welches im fertigen Autophagosom mit Phosphatidyl-Ethanolamin konjugiert als LC3-II vorliegt und einen verlässlichen Marker für komplettierte Autophagosomen darstellt¹⁴⁰. Komplettierte Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen zu Autolysosomen, welche zusammen mit ihrer Beladung proteolytisch degradiert werden. Die danach ins Zytosol entlassenen Bestandteile der degradierten Proteine und Organellen liefern Makromoleküle für die fortlaufende Proteinneusynthese an den Ribosomen und Substrate für die oxidative ATP-Synthese in den Mitochondrien. Auf diese Weise wird die Homöostase der Zelle durch Eigendegradation zellulärer Komponenten gewährleistet und das Überleben der Zelle sicher gestellt.

Ähnlich wie beim ER Stress, kann bei andauernder Stimulation jedoch auch die Autophagie den Zelltod verursachen¹³⁷. Da zunehmend klassische Merkmale der Autophagie, wie exzessive Vakuolisierung, in sterbenden Zellen gefunden wurden^{141, 142, 143}, hat sich für Autophagie der Begriff des Typ-II-Zelltods gegenüber dem Typ-I-Zelltod, der Apoptose, etabliert. Den Hauptunterschied stellt die Herkunft der lysosomalen Enzyme dar. Während diese bei der Apoptose aus den benachbarten phagozytischen Zellen stammen, die die apoptotischen Vesikel aufnehmen, benutzen die Zellen im autophagischen Zelltod ihre eigenen endogenen lysosomalen Enzymsysteme¹⁴⁴. Es wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert, ob Autophagie einen eigenen Zelltodmechanismus in Säugerzellen darstellt oder als Begleiterscheinung der Apoptose auftritt^{144, 145}, zumal beide Prozesse überlappende Anteile besitzen¹⁴⁶.

1.6 Kalzium-Homöostase

Die reife mRNA besitzt eine dreigeteilte Struktur, bestehend aus einer 5' untranslatierten Region (5'UTR), der kodierenden Sequenz (cds) und einer 3' untranslatierten Region (3'UTR). Die untranslatierten Regionen spielen eine essentielle Rolle in der post-transkriptionellen Regulation. Dies zeigt sich vor allem durch die Tatsache, dass Mutationen im Bereich der UTRs schwerwiegende pathophysiologische Folgen haben können¹⁴⁷. Diese Schlüsselrolle in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression nehmen die UTRs ein, indem sie den mRNA-Transport aus dem Zellkern, die Effizienz der Translation¹⁴⁸, die subzelluläre Lokalisation der mRNA¹⁴⁹ und die mRNA-Stabilität¹⁵⁰ beeinflussen. Die mRNA-Stabilität wird von spezifischen Sequenzen in der 3'UTR und 5'UTR zusammen mit

stabilisierenden oder destabilisierenden mRNA-Bindeproteinen reguliert. Kalzium (Ca^{2+})-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder seine Aufnahme ins ER durch die *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} Pumpe (SERCA) stellt einen zentralen Mechanismus der Signaltransduktion dar ¹⁵¹. Viele Proteinkinasen und Phosphatasen werden durch Kalzium reguliert ¹⁵²⁻¹⁵⁴. Diese wiederum können durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung auch die mRNA stabilisierenden oder destabilisierenden Proteine wie z.B. HuR und AUF1 regulieren ¹⁵⁵⁻¹⁶⁰, und somit Einfluss auf die mRNA-Stabilität nehmen.

Substanzen, die die intrazelluläre Kalzium-Homöostase stören, können somit indirekt Einfluss auf die mRNA-Stabilität und somit Expression bestimmter Proteine nehmen. Zu diesen Substanzen gehören u.a. der SERCA-Inhibitor Thapsigargin ¹⁶¹ und das *Pseudomonas aeruginosa*-Signalmolekül und PON2-Substrat 3oxoC12-HSL ¹⁶². Analysen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass PON2 Apoptose durch die ER-Stress auslösenden Substanzen Tunicamycin ⁵³ und DTT reduzieren kann, nicht jedoch durch den ER-Stress-Induktor Thapsigargin ¹⁶³.

Pathophysiologisch treten Störungen der Kalziumhomöostase u.a. bei Ischämischen-Reperusions-Verletzungen ¹⁶⁴ und beim durch Oxysterole induzierten Zelltod in Endothelzellen auf ¹⁶⁵.

2 Ziele der Arbeit

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zeigten, dass PON2 intrazellulär ROS und ER-Stress-induzierte Apoptose vermindern kann. Da beide Faktoren eine entscheidende Rolle in der humanen Atherogenese einnehmen, wäre eine pharmakologische Regulierung der Aktivität von PON2 interessant. Dafür ist es jedoch unerlässlich die genauen Mechanismen dieser Aktivitäten zu kennen. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Identität der von PON2 verminderten reaktiven Sauerstoff Spezies zu klären und schließlich die mechanistischen Zusammenhänge der unterschiedlichen Aktivitäten aufzuklären. In diesem Zuge sollte PON2 und deren unterschiedliche Aktivitäten subzellulär lokalisiert werden und der Mechanismus der anti-oxidativen Aktivität von PON2 weiter aufgeklärt werden. Dabei sollte auch analysiert werden, ob PON2 die ROS direkt oder mithilfe eines Kofaktors oder durch die Aktivierung eines anderen anti-oxidativen Enzyms vermindert.

In einem weiteren Ansatz sollte aufgedeckt werden, ob die enzymatische Laktonase-Aktivität von PON2 ursächlich ist für dessen anti-oxidative Funktion. Hierzu sollten Punktmutationen in PON2 eingebracht werden, um möglichst die enzymatische Aktivität auszuschalten und die Wirkung auf die weiteren Enzymfunktionen zu analysieren.

Im Verlaufe der Arbeit ergab sich, dass PON2 aufgrund seiner anti-oxidativen Wirkung auch anti-apoptotisch wirkt, was Grundlage seines anti-atherogenen Effekts sein könnte. Aus der Literatur war bekannt, dass das Oxysterol 7-KC in glatten Muskelzellen NOX4 induziert, was zur O_2^- -Bildung führt und Apoptose auslöst. Da jedoch vorherige Arbeiten der AG Horke ergaben, dass PON2 vor NOX4-induzierter ROS-Bildung schützt, und weil PON2 zudem anti-apoptotisch wirkt, wurde geprüft, über welchen Signalweg 7-KC Endothelzellen schädigt und ob PON2 auch hierbei eine Schutzfunktion zukommen könnte.

In diesen Analysen zu 7-Ketocholesterol und anderen Vorarbeiten der Gruppe zeigte sich, dass die PON2-mRNA durch Störungen der Kalzium-Homöostase destabilisiert wird. Die Aufklärung der Mechanismen hinter diesen verminderten mRNA-Mengen nach Störungen der Kalzium-Homöostase war ebenfalls Ziel dieser Arbeit.

3 Material

3.1 Chemikalien

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

A-G plus Agarose	Santa Cruz
Ampicillin	Roth
Actinomycin D	Sigma
5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlordihydro-fluoreszin-diacetat (Carboxy-H ₂ DCFDA)	Molecular Probes
A23187	Sigma
5-Cholesten-3 β -ol-7-one (7-Ketocholesterol)	Sigma
4,6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ)	Calbiochem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DL-Norleucin	Sigma
Dulbecco's PBS, steril	PAA
Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM)	Gibco
FCS	Perbio
G418 Sulphat, 50 mg/ml	PAA
Glutamax, 100 x	Gibco
Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (HAT), 50x	Gibco
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS) mit Kalzium und Magnesium, steril	PAA
Kanamycin	Roth
8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazin-1,4(2H, 3H)dion Sodium Salz (Chemilumineszenz-Probe, L-012), Luminolderivat	Wako Pure Chemical Industries Ltd.
Methanol	Roth
3-Methyladenin	Sigma

Na ⁺ Pyruvat	PAA
10-N-Nonyl-Acridinorange-bromid (NAO)	Invitrogen
N-3-oxododecanoyl-L-Homoserinlaktone	Sigma
Penicillin/Streptomycin, 100 x	PAA
ProLong Gold <i>Mounting</i> Lösung	Molecular Probes
SP600125	Sigma
Thapsigargin	Molecular Probes
Trypsin/EDTA, 10 x	PAA
Tunicamycin	Sigma
Xanthin	Sigma

3.2 Verbrauchsmaterialien

6-well-Platten	Greiner
12-well-Platten	Greiner
24-well-Platten	Greiner
96-well-Platten	Greiner
Zellkulturflaschen steril mit Filterdeckel (75 cm ² , 150 cm ²)	Greiner
Reaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Greiner
Protean Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare
Whatman-Papier	Whatman
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Entwickler- und Fixierlösung	Kodak

3.3 Laborgeräte

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
CO ₂ Inkubatoren CO-150 und Excella ECO-170	New Brunswick Scientific
FACS Aria Durchflusszytometer	BD Biosciences
FACSCalibur mit CellQuest Pro Software	BD Biosciences
Fluostar Optima Fluometer	BMG Labtechnologies

Gelelektrophoresekkammer, Perfect-Blue Doppelgelsystem L	Peqlab Biotechnologies
Gelelektrophoresekkammer, Mini-Protean-III	BioRad
iCycler	BioRad
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Mini-Transblot-Zelle, Mini-Protean-III	BioRad
Nanodrop	Peqlab Biotechnologies
Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell	BioRad
Thermomixer compact	Eppendorf
Zentrifuge J2-MC mit Rotor JA 25.50, JA 14	Beckmann

3.4 Reagenzien und Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Caspase-Glo™ 3/7 Assay Kit	Promega
CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay	Promega
DNA Blunting and Ligation Kit	Fermentas
RNase-freies DNase Set	OMEGA biotek
E.Z.N.A.™ Total RNA Kit	OMEGA biotek
FluoroCatalase™ Fluorescent Catalase Detection Kit	Cell Technology Inc
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems
Nanofektin™	PAA
PE-Annexin-V apoptosis detection kit I	BD Biosciences
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
SAINT-RED siRNA/RNAi-Delivery System	Synvolux Therapeutics
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent <i>Plus</i>	PerkinElmer
The Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for subcloning	Invitrogen

3.5 Enzyme und Standards

Collagenase B	Roche
Go-Taq® DNA Polymerase	Promega
PEG-Catalase	Sigma
PEG-SOD	Sigma
Xanthinoxidase	Sigma
100 bp-DNA-Leiter	Roth

1 kbp-DNA-Leiter	Roth
PageRuler Prestained Protein Leiter	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
rekombinantes humanes PON2	Genway

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

3.6 Antikörper

Alle hier benutzten Antikörper wurden generell in 5%igem Milchpulver in 1 x TBS mit 0,18 % Tween (siehe 3.9) verwendet.

3.6.1 Primärantikörper

monoklonaler α -human-Tubulin (1:2000)	Dianova
monoklonaler GAPDH (1:1000)	Santa Cruz
monoklonaler Cytochrom C (Klon 7H8.2C12; 1:1000)	BD Pharmingen
polyklonaler α -human-PON2 (rabbit; 1:2000)	Auftragssynthese ausgeführt durch Eurogentec
polyklonaler α -human-Lamin (goat; 1:1000)	Santa Cruz
monoklonaler LC3 (N-Terminus von LC3-B) (1:500)	NanoTools
polyklonaler ATG5 (rabbit; 1:1000)	Cell signalling
monoklonaler Komplex-III (Untereinheit Kern-2) (1:1000)	Mito-Sciences
polyklonaler Calnexin (H-70) (rabbit, 1:200)	Santa Cruz
monoklonaler HA-Antikörper (1:1000)	Sigma

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

3.6.2 Sekundärantikörper

anti-mouse IgG aus dem Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (1:20000)	Sigma
anti-rabbit IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5000)	Sigma
anti-goat IgG aus dem Esel, Peroxidase gekoppelt (1:5000)	Santa Cruz

anti-rabbit AlexaFluor-488 (donkey)

Molecular Probes

anti-mouse AlexaFluor-647 (goat)

Molecular Probes

3.7 Plasmide

pgl4.10[luc2]

Promega

pgl4-PON2-Promotor

Dieses Plasmid wurde durch Dr. S. Horke, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, kloniert und zur Verfügung gestellt.

pEF-1 α

Dieses Plasmid wurde durch Dr. M. Bros, Universitätsklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz kloniert und zur Verfügung gestellt.

pEGFP-N1

Clontech

pEGFP-PON2

Dr. S. Horke, s.o.

pEGFP-PON2-Mutanten

S. Altenhöfer

PON2-His₆

Dr. S. Horke, s.o.

3.8 Oligonukleotide

3.8.1 Primer und Sonden

Alle *Primer* und TaqMan-Sonden für PCR und qRT-PCR-Analysen (siehe Kapitel 4.2) wurden von MWG-Biotech bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert. Primer und Sonden für PON2, GRP78 und Nox4 wurden als vordesignierte Taqmansonden von Applied Biosystems bezogen.

Primer/Sonde	Sequenz (5' – 3')
PON2_H114Q_S	GGCCTCATTCAATCCACAGGGCATCAGCAC

PON2_H114Q_AS	GTGCTGATGCCCTGTGGATTGAATGAGGCC
PON2_H133Q_S	GTTGTAAACCAACCAGAATTCAAGAATACA
PON2_H133Q_AS	TGTATTCTTGAATTCTGGTTGGTTTACAAC
PON2_N254A_S	GGAAAAACACACTAATATGGCTTTAACTCAGTTGAAGG
PON2_N254A_AS	CCTTCAACTGAGTTAAAGCCATATTAGTGTGTTTTCC
PON2_D268A_S	CTGGATACACTGGTGGCTAATTTATCTATTGATCC
PON2_D268A_AS	GGATCAATAGATAAATTAGCCACCAGTGTATCCAGC
PON2_N269A_S	GATACACTGGTGGATGCTTTATCTATTGATCC
PON2_N269A_AS	GGATCAATAGATAAAGCATCCACCAGTGTATC
PON2_C283V_S	GGGACATCTGGGTAGTCGTCATCCTAATGGCC
PON2_C283V_AS	CCGAGGAAGGATCAATAGATAAATTATCCACCAGTGTATCC
PON2_S311C_S	CCAGAACATTCTATGTGAGAAGCCTACAGTG
PON2_S311C_AS	CACTGTAGGCTTCTCACATAGAATGTTCTGG
PON2_N323A_S	CTACAGTTTATGCCAACGCTGGGTCTGTTCTCC
PON2_N323A_AS	GGAGAACAGACCCAGCGTTGGCATAAACTGTAG
PON2_3RACE_for	GAGAGATCTAGACTCGTCAGAGGTTCTCCGCATCCAG
PON2_3RACE_rev	CATCCTGGTCGAGCTGGGGCCGGCCTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTG
PON2_3UTR_S	GACAGACATCTAGAATTGTACTTTTGGCATGAAAGTGCG
GAPDH_sense	CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG C
GAPDH_antisense	TGG CAT GGA CTG TGG TCA TGA G
GAPDH_Sonde	CCT GGC CAA GGT CAT CCA TGA CAA C
CHOP_sense	GACCTGCAAGAGGTCCTGTC
CHOP_antisense	CTCCTCCTCAGTCAGCCAAG
CHOP_Sonde	CACCACTCTTGACCCTGCTT
Luciferase_sense	TGCAAAAGATCCTCAACGTG
Luciferase_antisense	AATGGGAAGTCACGAAGGTG
Luciferase_Sonde	AAGACCGACTACCAGGGCTT
Renilla_sense	ATTGGTATGGGCAAATCAGG
Renilla_antisense	GGCCGACAAAAATGATCTTC
Renilla_Sonde	TCTTACTGCATGGTTTGAACCTCT

Tabelle 1: Verwendete Primer und Sonden

3.8.2 Oligonukleotide für RNA-Interferenz

siRNA	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Cytochrom C siRNA	GUACAUCCCUGGAACAAAA	Invitrogen
ATG-5 siRNA	GGAAUAUCCUGCAGAAGAA	Thermo Scientific
Kontroll-siRNA	unbekannte Zufalls-Sequenz ohne Zielstruktur mit einem G/C- Gehalt von etwa 40%	Invitrogen

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für RNA-Interferenz

3.9 Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien

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

Anodenpuffer I	300 mM TrisHCl pH 10.4, 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM TrisHCl pH 10.4, 20 % Methanol
Coomassie-Roti-Blue, 5x	Roth
Coomassie-Färbelösung, 1x	60 ml Wasser, 20 ml Methanol, 20 ml Roti-Blue 5x Lösung
Coomassie-Fixierlösung	79 ml Wasser, 1 ml o-Phosphorsäure 85 %, 20 ml Methanol
Coomassie-Waschlösung	25 ml Methanol, 75 ml Wasser
DNA-Ladepuffer, 6x	30 % Glycerin in H ₂ O, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol
Kathodenpuffer	25 mM TrisHCl pH 9.4, 40 mM DL-Norleucin, 0,05 % SDS
LB-Agar-Platten	40 g LB-Agar, 1000 ml Wasser, autoklaviert
LB-Agar-Platten mit Kanamycin	LB-Agarplatten, 30 µg/ml Kanamycin
LB-Agar-Platten mit Ampicillin	LB-Agarplatten, 10 µg/ml Ampicillin
Lysispuffer 3	200 mM NaCl, 100 mM TrisHCl pH 7.4, 2% Triton X-100, Proteaseinhibitor
Lysispuffer 3.2	200 mM NaCl, 100 mM TrisHCl pH 7.4, 1% Triton X-100

Mito-Puffer	210mM Mannitol, 70mM Sucrose, 10mM, HEPES pH7,5; 1mM EDTA, Proteaseinhibitor
Nitroblau Tetrazolium-Färbelösung	50 mM KPO ₄ pH 7.4, 275 µg/ml Nitrotetrazolium-blau, 65 µg/ml Riboflavin, 3.2 µl/ml TEMED
Proteaseinhibitor, 100x	Thermo Scientific
Sucrose-Puffer-I	20 mM Tris/HCl pH 7.2, 250 mM Sucrose, 2 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , Proteaseinhibitor
Sucrose-Puffer-II	10 mM Tris/HCl pH 7.2, 250 mM Sucrose, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , Proteaseinhibitor
TAE, 20x	50 mM Tris pH 7.4, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA
TB-Medium	50,8 g Terrific Broth-Trockenmedium, 4 ml Glycerin, 996 ml Wasser
TBS, 1x	1 M Tris pH 8, 5 M NaCl, 0,18 % Tween
SDS-Ladepuffer, 5x	250 mM TrisHCl pH 6.8, 0,5 M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS, 0,2 % Bromphenolblau + 1/20 Vol β-Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer, 5x	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
Wasser	ddH ₂ O

3.10 Zelllinien und Medien für die Zellkultur

3.10.1 Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Quelle / Hersteller
EA.hy 926	Humane immortalisierte Hybridzelllinie aus HUVEC und HeLa-Zellen	¹⁶⁶
EA.hy-PON2-GFP	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die	Dr. S. Horke

	PON2-GFP-Fusionsprotein exprimieren	
EA.hy-PON2-HA	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-HA-Fusionsprotein exprimieren	Dr. S. Horke
EA.hy-PON2-GFP-H ¹¹⁴ Q	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-GFP-H ¹¹⁴ Q-Fusionsprotein exprimieren	S. Altenhöfer
EA.hy-PON2-GFP-H ¹³³ Q	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-GFP-H ¹³³ Q-Fusionsprotein exprimieren	S. Altenhöfer
EA.hy-PON2-GFP-D ²⁶⁸ A	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-GFP-D ²⁶⁸ A-Fusionsprotein exprimieren	S. Altenhöfer
EA.hy-PON2-GFP-S ³¹¹ C	EA.hy-Zellen mit G418-Resistenzgen, die PON2-GFP-S ³¹¹ C-Fusionsprotein exprimieren	S. Altenhöfer
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	S. Altenhöfer
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzelllinie die das SV40 <i>large</i> T-Antigen exprimiert	Bereitgestellt von Dr. S. Horke

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

3.10.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

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

DMEM-Vollmedium für EA.hy und HEK-293T: 500 ml *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (1000 mg/l Glukose), 10 % FCS, 10 ml HAT, 5 ml Glutamax, 5 ml Na-Pyruvat 5 ml Penicillin/Streptomycin.

M199-Vollmedium für HUVEC: 500 ml M199 (+ Glutamax-I, + *Earle's*), 20 % FCS, 1 ml ECGS-H2 (Invitrogen), 5 ml Penicillin/Streptomycin.

Den stabil überexprimierenden EA.hy-Zelllinien, PON2-iso1-GFP / HA und PON2-iso1-Mutant-GFP, wurden 300 µg/ml G418 zum Medium zugegeben.

3.11 Bakterien

E. Coli-DH5α

New England Biolabs

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

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

4.1.1 HUVEC-Isolierung aus Nabelschnüren

Zur HUVEC-Isolierung wurden ausschließlich Nabelschnüre aus Sectio-Operation aus dem Vinzenz-Krankenhaus in Mainz verwendet. Bis zur Isolierung der Zellen wurden die Nabelschnüre in Earle's Medium 199 unter Zusatz von Penicillin / Strepomycin bei 4°C gelagert. Alle Arbeitsschritte zur Isolierung von HUVEC aus Nabelschnüren erfolgten unter einer Steril-Werkbank unter Verwendung steriler Gefäße, Lösungen und Präparationsbestecke.

Zu Beginn der Präparation wurden die Enden der Nabelschnur mit einem Skalpell abgeschnitten und die Vene mit einer Pinzette geweitet um von beiden Seiten der Nabelschnur eine Kanüle in das Venen-Lumen einzuführen. Mit Hilfe einer 20 ml Spritze wurde die Nabelschnur über die Kanülen von innen mehrfach mit PBS gespült, um sie so von Blut zu reinigen. Anschließend wurde die Nabelschnur über frische Spritzen mit 37°C vorgewärmter Collagenase B in Earle's Medium 199 befüllt und durch eine zweite Spritze am anderen Ende der Vene mehrfach mit Collagenase B-Lösung gespült. Durch schlussdichtes Sichern der Kanülen mit OP-Klemmen wurde das Auslaufen der Collagenase-Lösung aus der Nabelschnurvene verhindert. Nach 15-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C werden die Endothelzellen durch mehrfaches Hin- und Herspülen der Collagenase-Lösung mittels der beiden Spritzen und Massage der Nabelschnur abgelöst. Die Collagenase-Lösung, die den Hauptanteil der Endothelzellen enthält, wurde anschließend in ein steriles 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die Nabelschnurvene noch zweimal mit PBS durchspült, die Waschlösungen mit der Collagenase-Lösung vereint und die HUVECs durch 15-minütige Zentrifugation bei 800 x g, 4°C pelletiert. Das HUVEC-Pellet wurden anschließend in 5 ml HUVEC-Vollmedium resuspendiert und in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche eingesät. Am Folgetag wurden die angewachsenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiterkultiviert.

4.1.2 Kultivierung eukaryoter Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, EA.hy 926-Zellen bei 10%, HEK293T und HUVECS bei 5% CO₂-Begasung sowie 100% Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen mit Filtertop kultiviert. Die Kulturmedien aller Zelllinien wurden mit L-Glutamin (2mM), Pyruvat (1 mM) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) versetzt. EA.hy- und HEK-293T-Zellen wurden in DMEM-Vollmedium, dem zusätzlich 10% fötales Kälberserum (FCS – fetal calf serum) zugesetzt wurde inkubiert. Dem Medium für stabil transfizierte EA.hy-Zellen wurde zusätzlich G418 (300µg/ml) zugesetzt. HUVECs wurden in M199-Vollmedium, mit den o.g. Zusätzen und 20 % FCS und 0,2 % ECGS (*endothelial cell growth supplement*) in Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert.

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch ein- bis zweiminütige Inkubation mit 1,5 ml 0,5 %-iger Trypsinlösung im Brutschrank enzymatisch vom Boden der Kulturflasche abgelöst und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von frischem serumhaltigem Medium wieder unterbrochen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Erhaltung der Stammkultur wieder in die Kulturflasche zurück gegeben, während die restlichen Zellen je nach Bedarf eingefroren, verworfen oder in Zellkulturschalen bzw. well-Platten ausplattiert wurden.

4.1.3 Kryokonservierung und Auftauen eukaryoter Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen nach der Trypsininkubation in frischem Medium aufgenommen und in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 120 x g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in Vollmedium, das zusätzlich 10% DMSO enthielt, wieder aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein 1,5 ml-Kryo-Röhrchen überführt und zunächst bei –80°C eingefroren und schließlich zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (–196°C) überführt.

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

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat eukaryoter Zellen

Nach der enzymatischen Ablösung der Zellen aus der Zellkulturflasche (siehe Kapitel 4.1.4) wurden die Zellen in ein steriles 50 ml-Gefäß überführt und 10 µl der Suspension zur Bestimmung der Zellzahl auf das Zählraster einer Neubauerkammer aufgetragen. Anschließend wurden die vier Großquadrate im Zählraster der Kammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde mit zehn multipliziert und ergab die Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension. Die Zellen wurden dann in 96-, 24-, 12- oder 6-well-Platten unter Zugabe des entsprechenden Volumens an Vollmedium ausplattiert. Zellkulturplatten für HUVECs wurden vor der Aussaat, mit Gelatine:PBS (1:1) überschichtet, für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert und die Gelatinelösung wieder entfernt.

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturgefäß</u>	<u>Konfluenz</u>	<u>Zellzahl</u>
EA.hy 926	96-well-Platte	90 %	2×10^4
	24-well-Platte	50 %	5×10^4
	24-well-Platte	80 %	8×10^4
	24-well-Platte	100 %	1×10^5
	12-well-Platte	80 %	2×10^5
	6-well-Platte	80 %	$5,5 \times 10^5$
HUVEC	24-well-Platte	100 %	$1,2 \times 10^5$
HEK293T	6-well-Platte	80 %	5×10^5

Tabelle 4: Zellzahl für Aussaat

4.1.5 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen

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

Dafür wurden die Zellen für eine Konfluenz von 80 % ausplattiert und am Folgetag mit dem Transfektionsreagenz Nanofektin™ nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurde für 24-well-Platten je well ein 1 µg, für 12-well-Platten 2 µg und für 6-well-Platten 3 µg Plasmid-DNA verwendet. Das Verhältnis der DNA-Masse zum Volumen des Transfektionsreagenz betrug dabei jeweils 1:3,2.

4.1.6 Stabile Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen

Bei der stabilen Transfektion wird die exogene Plasmid-DNA dauerhaft in das Genom einer Zelle integriert, wodurch es an Tochterzellen weitergegeben wird. Die Selektion zwischen

transfizierten und nicht-transfizierten Zellen erfolgt mittels Selektionsmedium, welches ein Antibiotikum enthält. Das transfizierte Plasmid kodiert außer für das zu analysierende Gen, für ein Resistenzgen gegen das Selektionsantibiotikum, so dass Wildtyp-Zellen ohne Plasmid im Selektionsmedium absterben. Da beide Gene auf demselben Plasmid lokalisiert vorliegen, kann man davon ausgehen, dass die selektierten Zellen auch das transfizierte Gen enthalten.

Zur Transfektion wurden 5×10^5 EA.hy-Zellen pro well in 6-well-Platten zu einer Konfluenz von 80 % ausplattiert und am Folgetag mit dem Transfektionsreagenz Nanofektin™ entsprechend der Herstellerangaben mit pEGFP-PON2-iso1-Mutatanten-Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium der Zellen durch Medium mit Selektionsantibiotikum (300 µg/ml G418) ersetzt. In den Folgetagen wurde regelmäßig das Medium gewechselt, um abgestorbene Wildtyp-Zellen zu entfernen. Nach einiger Zeit bildeten sich Kolonien der transfizierten Zellen, die schließlich zusammengeführt und per FACS (*Fluorescent activated cell sorting*) angereichert wurden. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und durch zweimalige Zentrifugation bei $900 \times g$ (5 min, 4°C) und Resuspension in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert und durch einen Filtersiebdeckel in ein FACS-Röhrchen überführt. Abgestorbene Zellen wurden durch Zugabe von 2 µl Propidiumiodid zur Zellsuspension gefärbt, um sie während des Sortiervorgangs abtrennen zu können. Das Sortieren der Zellen wurde im Rahmen der FACS Core Facility der Institute für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz von J. Altmaier am FACS Vantage mit GFP-spezifischen Wellenlängen durchgeführt. Die Expression des transfizierten Gens wurde anschließend durch qRT-PCR und Western-Blot-Experimente überprüft.

4.1.7 Transfektion von siRNA in eukaryote Zellen

SiRNAs (*small interfering RNA*) sind 21-28 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs, die in eine Zelle eingebracht, an eine komplementäre mRNA-Sequenz binden. Durch diese Bindung bewirkt die siRNA den Abbau der komplementären mRNA durch den Dicer-Komplex und verhindert dadurch Translation und Genexpression. Durch Transfektion in eukaryotische Zellen eingebrachte spezifische siRNAs ermöglichen die Beobachtung der Effekte der verminderten Expression des entsprechenden Gens.

Für die Transfektion von siRNAs wurden am Vortag 5×10^4 Zellen in einer 24-well-Platte ausplattiert, so dass sie für die Transfektion einen Konfluenz von ~ 50 % aufwiesen. Dabei wurde siRNA mit einer Endkonzentration von 70 nM mit dem Transfektionsreagenz SAINT-

Red nach Anleitung des Herstellers in die Zellen eingebracht. Die nachfolgenden Analysen erfolgten zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach der siRNA Behandlung.

4.1.8 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Chemilumineszenz und Fluoreszenzmessung

Der intrazelluläre Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies wurde mit lipophilen, zellwandgängigen Farbstoffen bestimmt. Die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies führt zu einer Strukturänderung der Detektionsreagenzien, die daraufhin Chemilumineszenz oder veränderte Exzitations- oder Emissionswellenlängen zeigten. Diese Veränderungen wurden mit einem 96-well Mikrotiterplatten Lesegerät für Chemilumineszenz (Berthold-Technologies LB 960) bzw. Fluoreszenz (BMG Fluostar Optima) detektiert. Dazu wurden jeweils am Vortag 2×10^4 Zellen in 96-well-Platten ausplattiert. Vor der ROS-Messung wurden die Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen und zur Beladung mit dem Detektionsreagenz für 30 Minuten inkubiert. Außer bei der Verwendung des Luminolderivats L012 wurde das Detektionsreagenz nach der Beladung abgenommen, die Zellen erneut mit HBSS⁺⁺ gewaschen und mit einem ROS-induzierendem Reagenz behandelt. Anschließend wurde die ROS Bildung anhand des Anstiegs der Chemilumineszenz bzw. Fluoreszenz im Mikrotiterplatten Lesegerät dokumentiert.

Die Messung von Superoxid erfolgte entweder durch Chemilumineszenz mittels L-012 (40 μ M) oder dem Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenz-Indikator MitoSox-Red (1 μ M; Messung bei 405 / 580 nm), welche für 30 bzw. 20 Minuten in HBSS⁺⁺ auf die Zellen gegeben wurden. L-012 verblieb auf den Zellen, wohingegen die MitoSoxRed-beladenen Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen wurden. Die O₂⁻-Induktion erfolgte mit DMNQ (10 μ M) oder Antimycin A (15 μ M) in HBSS⁺⁺. Ähnlich wurde die Messung von Peroxynitrit durchgeführt: nach Beladung der Zellen mit Dihydrorhodamin-123 (5 μ M; 30 Min. in HBSS⁺⁺) wurde die Peroxynitrit-Bildung durch Stimulation mit SIN-1 (100 μ M; in HBSS⁺⁺) induziert und bei 500 / 540 nm detektiert.

4.1.9 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen durch Hochdruck-Säulenchromatografie (HPLC)

Die spezifische Messung von Superoxid erfolgte mit dem DNA-Interkalationsfarbstoff Dihydroethidium (DHE), welcher durch Superoxid das spezifische Produkt 2-Hydroxyethidium (2-HE) bildet, mit anderen ROS hingegen ein Ethidiumkation (E⁺). Durch die Auftrennung der unterschiedlichen Produkte mittels HPLC können die entstandenen Produkte differenziert detektiert werden.

Einen Tag vor der Messung wurden 6×10^5 Zellen in 6-*well*-Platten ausplattiert. Zur Messung wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten mit DHE (500 μM) in HBSS⁺⁺ vorinkubiert, in HBSS⁺⁺ gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit DHE (50 μM) und DMNQ (100 μM) in HBSS⁺⁺ behandelt. Zur Lyse wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Acetonitril überdeckt und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, erfolgte die eigentliche Lyse durch Ultraschall. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen HBSS⁺⁺ verdünnt und die DHE-Oxidationsprodukte durch zehnmütiges Vortexen extrahiert. Anschließend wurden die festen Zellstandteile abzentrifugiert und 200 μl des Überstands durch Dr. Andreas Daiber (II. Medizinische Klinik und Polyklinik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) der HPLC unterzogen¹⁶⁷.

4.1.10 Messung mitochondrialen Superoxids in eukaryoten Zellen mittels Durchflusszytometrie

Alternativ zur oben beschriebenen Methode im 96-*well*-Format, wurde mitochondriales Superoxid ebenfalls mittels FACS bestimmt. Hierzu wurde erneut MitoSox-Red verwendet, dessen Fluoreszenz bei 405 / 580 nm gemessen wurde. Das durch die Reaktion mit Superoxid entstehende 2-HE unterscheidet sich in der Fluoreszenz von E⁺, das im Gegensatz zu 2-HE bei 520 nm angeregt wird.

Zur Messung des mitochondrialen Superoxidgehalts in lebenden Zellen wurden 2×10^5 Zellen in 12-*well*-Platten ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit HBSS⁺⁺ gewaschen, für 20 Minuten mit Mito-HE (2 μM) inkubiert, erneut gewaschen und mit Antimycin in HBSS⁺⁺ (15 μM) behandelt. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Vollmedium aufgenommen und zweimal durch Zentrifugation (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspension in eiskaltem PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 400 μl PBS resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und in einem FACSAria cell sorter bei Ex/Em-Wellenlängen von 405/580 nm analysiert.

4.1.11 Messung von Apoptosemerkmalen in eukaryoten Zellen mittels Durchflusszytometrie

Apoptosemerkmale von Zellen, wie die Annexin-V-Bindung an die Zellmembran bei gleichzeitiger Messung der Einlagerung des nicht zellmembrangängigen Farbstoffs 7-Amino-Actinomycin und die Cardiolipinperoxidation, wurden per Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden 8×10^4 Zellen in 24-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag mit 7-Ketocholesterol in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen

mit Trypsin aus den Zellkulturschalen heraus gelöst, in Vollmedium aufgenommen und zweimal durch Zentrifugation (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspension mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Herstellerangaben mit Annexin-V-Phycoerythrin und 7-Amino-Actinomycin aus dem „Annexin-V apoptosis detection kit I“ (siehe Kapitel 3.4) gefärbt. Für die Bestimmung der Cardiolipinperoxidation wurden die Zellen nach der Behandlung für 30 min. mit 10-N-Nonyl-Acridinorange-bromid (NAO; 50 nM) inkubiert, einem Farbstoff, der nur an unoxidiertes Cardiolipin bindet. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin aus den Zellkulturschalen gelöst, ebenfalls in Vollmedium aufgenommen und durch zweimaliges Zentrifugieren (4 min, 350 x g, 4°C) und Resuspendieren in eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden alle Zellen in 2 %-igem Paraformaldehyd fixiert und mit einem FACSCalibur-Zytometer, welches mit CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgestattet war, analysiert. Dabei wurden jeweils 10.000 *events* für die entsprechenden Exzitations- / Emissionswellenlängen erfasst (PE=488/575 nm; 7-AAD=488/647 nm; NAO=488/525 nm).

4.1.12 Messung der Caspase-3/7-Aktivität in eukaryoten Zellen

2×10^4 Zellen wurden in 96-well-Platten ausplattiert und am Folgetag mit Tunicamycin, Staurosporin oder 7-Ketocholesterol in 40 µl Vollmedium behandelt. Nach 24 h wurden 40 µl Caspase-Glo-3/7 Reagenz hinzugegeben, welches ein zur Caspase-Aktivität proportionales Leuchtsignal induziert. Dies wurde mittels Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Lösungsmittel-behandelte Zellen dienten als Kontrolle.

4.1.13 Bestimmung der Zytotoxizität in eukaryoten Zellen

Die Zytotoxizität verschiedener Substanzen wurde anhand der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturüberstand mit dem CytoTOX-One Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden 2×10^4 Zellen in 96-well-Platten ausgesät und am Folgetag mit 7-Ketocholesterol oder Rapamycin für 24 h behandelt. Zur Bestimmung des Gesamt-LDH-Gehalts der Zellen wurden jeweils einige Proben unmittelbar vor der Messung nach Angaben des Herstellers lysiert.

4.1.14 Konfokale Lasermikroskopie in lebenden Zellen

8×10^4 stabil überexprimierende Zellen oder naive Zellen wurden in 4-fach Labtech-Kammern oder 24-well-Mikroskopie-Platten ausplattiert. Am Folgetag wurden naive Zellen nach Bedarf mit PON2-GFP-Fusionsprotein exprimierenden Plasmiden transient transfiziert (siehe Kapitel 4.1.5) und ~ 24 h nach Transfektion mit Dapi (1:1000), Draq5 (1:1000), Mito-

Tracker-orange (1:1000) oder ER-Tracker-red (1:2000) in HBSS⁺⁺ für 30 Minuten gefärbt, gewaschen und in HBSS⁺⁺ mikroskopiert. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein Zeiss LSM-710 mit ZEN2008 Software verwendet und die Zellen unter einem Plan/Apochromat 63x/1.4 oil DIC-Objektiv betrachtet. Dazu wurden die entsprechenden Wellenlängen sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen regelmäßig sicher gestellt.

Exzitations- / Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: Mito-Tracker-orange 551/576 nm, ER-Tracker-red 587/615 nm, Dapi 358/460 nm, eGFP 488/507 nm, Draq5 647/670 nm.

4.1.15 Immunzytochemie und konfokale Lasermikroskopie in fixierten Zellen

Um endogene Proteine in ihrer zellulären Umgebung zu beobachten, wurden diese mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. 8×10^4 Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten ausgesät, im Falle einer Behandlung am nächsten Tag mit Staurosporin oder 7-Ketocholesterol für verschiedene Zeitspannen behandelt und anschließend durch dreiminütige Inkubation in eiskaltem Methanol gefolgt von 30-sekündiger Inkubation in eiskaltem Aceton fixiert. Nach Rehydrierung in PBS mit 0,1 % Triton wurden die Zellen eine Stunde in 5 %-igem *goat serum* geblockt, dreimal gewaschen, eine Stunde mit proteinspezifischem Primärantikörper in PBS mit 0,1 % Triton inkubiert, dreimal gewaschen, eine Stunde mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper und Organellfarbstoffen behandelt, dreimal gewaschen und schließlich mit Einbettmedium auf einen Objektträger aufgebracht. Für Zellen, die mit einem spezifischen Antikörper gegen Cytochrom C als Primärantikörper behandelt wurden, wurde mit *goat-anti-mouse* AlexaFluor-488 (grün, Ex / Em 488 / 507 nm) als Sekundärantikörper und mit ToPro3 als Kernmarker (Ex / Em 642/661 nm) behandelt. Zellen die mit einem *rabbit*-PON2-Antikörper und *mouse*-Calnexin-Antikörper behandelt wurden, wurden vor der Fixierung mit Mito-Tracker-orange (Ex / Em 551 / 576 nm) beladen und erhielten *goat-anti-rabbit* AlexaFluor-488 (grün) und *goat-anti-mouse* AlexaFluor 647 (rot, Ex / Em 647 / 670 nm) als Sekundärantikörper. Die fixierten Zellen wurden unter Verwendung der entsprechenden Wellenlängen unter einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop betrachtet (siehe Kapitel 4.1.14).

4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 Restriktion von DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese erkennen eine spezifische palindromische Basenpaarsequenz und schneiden doppelsträngige DNA mit überhängenden oder glatten Enden. Restriktionen dienen der Charakterisierung von Plasmid-DNA und der Präparation von DNA-Fragmenten für Klonierungen. Beim analytischen Verdau wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Enzym unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen in einem Gesamtvolumen von 10 µl, je nach Herstellerangaben 2-16 Stunden inkubiert. Bei präparativen Restriktionen wurden 5-10 µg DNA eingesetzt und das Gesamtvolumen der Reaktion dementsprechend auf 50 µl angepasst. Die Charakterisierung der DNA bzw. die Überprüfung der Restriktion erfolgte anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese.

4.2.2 Agarosegel-Elektrophorese zur Analyse von DNA

Zur Überprüfung eines Restriktionsverdaus mit Fragmentlängen größer als 100 bp, wurden Agarosegele mit 0,7 % - 2% Agaroseanteil verwendet, wobei sich der Agaroseanteil nach den Fragmentgrößen richtete. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der Agarose wurde TAE-Puffer verwendet. Um die DNA anschließend auf dem Gel detektieren zu können, wurde dem Gel der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 ng/ml zugesetzt. Für die Elektrophorese wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und eine Spannung von 4-5 V/cm angelegt. Anschließend wurden die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und konnten durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe identifiziert werden.

4.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

4.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Um Salze und Proteine aus den DNA-Lösungen zu entfernen wurden 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und das Einfache des Volumens einer Tris-gesättigten Phenol/Chloroform-Lösung (Mischverhältnis 1:1) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und 5 Minuten mit 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt. Zur Fällung der DNA wurde mindestens eine Stunde bei –20°C inkubiert und die DNA anschließend durch 20-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, rezentrifugiert, getrocknet und in Aqua tridest. gelöst.

4.2.5 Ligation von DNA

Für Ligationen von geschnittener Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurde 50 ng linearisiertes Plasmid mit der entsprechenden Menge des Fragments, entsprechend den molekularen Verhältnissen von 1:1 bzw. 1:3 zusammen mit 1 µl T4-DNA-Ligase für 4 h bei Raumtemperatur ligiert.

4.2.6 Transformation von DNA in Bakterien

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 10 µl des Ligationsansatzes (siehe Kapitel 4.2.5) oder 1,5 µl des Mutagenese-PCR-Produkts mit 100 µl kompetenten DH5α-Bakterien (New England Biolabs) zunächst 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte dann durch Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C, worauf wieder zwei Minuten auf Eis inkubiert wurde. Zur Expression der Antibiotika-Resistenz wurden nun 400 µl TB-Medium zugefügt und für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann für eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert und in 100 µl TB-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde dann auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen, die nur das Wachstum solcher Bakterien zuließen, die auch das Resistenzgen enthaltende Plasmid aufgenommen hatten.

4.2.7 Plasmid-DNA-Präparation

Um DNA aus Bakterienklonen zu gewinnen, wurde diese, je nach gewünschter Menge aus einer 5 ml Bakterienkultur (DNA-Minipräparation) oder aus einer 50 ml Bakterienkultur (DNA-Midipräparation) präpariert. Minipräparationen wurden mit dem peqGOLD

PlasmidMiniprep-Kit I (Peqlab), Midipräparationen HiPure Plasmid Filter Midiprep-Kit (Invitrogen) jeweils entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Bei beiden Präparationen wurde das DNA-Pellet in sterilem destilliertem Wasser resuspendiert.

4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmiden mit spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden im iCycler (Biorad) unter Verwendung einer Taq-DNA-Polymerase (Peqlab) durchgeführt. Dabei wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

Reaktionsansatz (20 µl):

10 x PCR Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,88 µl
Primer-sense (20 pM/µl)	1 µl
Primer-antisense (20 pM/µl)	1 µl
Wasser	14,62 µl
Taq.	0,5 µl
DNA-Template	Volumen entsprechend 0,1 µg DNA

Reaktionsprofil:

Temperatur: Dauer:		
94°C	2 min.	Template Denaturierung
94°C	30 sec	Denaturierung
62°C	30 sec	annealing
68°C	1 min.	Elongation 40x
68°C	10 min.	Elongation
94°C	2 min.	Template Denaturierung

4.2.9 Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion

Durch Mutagenese-PCRs wurde die PON2-DNA-Sequenz, und somit die Kodierung für einzelne Aminosäuren im PON2-Protein verändert. Dazu wurden PCR-*Primer* designet, in denen die Kodons der auszutauschenden Aminosäuren durch den Austausch von ein oder zwei Basen so verändert wurden, dass sie für eine andere Aminosäure kodierten. Ausgehend von diesen Primern, die jeweils komplementär zu gegenüberliegenden Strängen des Ausgangsplasmids waren, wurde das Ausgangsplasmid durch eine DNA-Polymerase mit

besonders hoher Genauigkeit vom *forward*-Primer aus in 3'-Richtung und vom *reverse*-Primer aus in 5'-Richtung rundherum abgelesen und die mutierte Form amplifiziert. Anschließend wurde das Ausgangsplasmid durch Zugabe des Restriktionsenzym Dpn-I zum PCR-Ansatz verdaut. Die DpnI-Endonuklease verdaut ausschließlich methylierte DNA, so dass hierdurch spezifisch die *template*-DNA verdaut wird.

Alle Mutagenesen wurden mit dem „QuikChange II site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließend in superkompetente *E. Coli* transformierten Plasmide wurden in DNA-Minipräparationen isoliert und sequenziert.

Das Plasmid pEGFP-PON2-C283V wurde mit dem „Phusion Site-directed Mutagenesis Kit“ (Finnzymes) generiert. Dabei wurden Primer verwendet, die die Mutation trugen und deren Enden an benachbarte Basen auf dem Ausgangsplasmid hybridisierten. Die Ausgangssequenz wurde durch die DNA-Polymerase vom *forward*-Primer aus in 3'-Richtung und vom *reverse*-Primer aus in 5'-Richtung rundherum abgelesen und eine linearisierte Form des veränderten Plasmids amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wurden die beiden Enden des Amplifikats durch Zugabe von Quick-T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers ligiert, in kompetente *E. Coli* transformiert (siehe Kapitel 4.2.6) und in DNA-Minipräparationen (siehe Kapitel 4.2.7) isoliert und sequenziert.

4.2.10 3'RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends)

Die 3'RACE-PCR ist eine RT-PCR-Variante, die der Identifizierung des endogenen mRNA 3'-Endes inklusive der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) dient. Für diese RT-PCR kommen folgende zwei Primer zum Einsatz: ein *sense*-Primer, welcher an die bekannte kodierende Sequenz der mRNA bindet und ein *antisense*-oligo(dT)-Primer, welcher mit dem poly-(A)-Schwanz der mRNA hybridisiert.

Zur Identifizierung der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der PON2-mRNA wurde Total-mRNA aus EA.hy 926-Zellen in einer 3'RACE-PCR unter Verwendung des Superscript-II RT-PCR-Systems (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben amplifiziert. Als Primer wurden PON2_3'RACE_for und PON2_3'RACE_rev eingesetzt (Sequenz siehe Kapitel 3.8.1). Die entstandene cDNA wurde per Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und überhängende Enden durch zweistündige Inkubation bei 37°C mit Klenow-Enzym entsprechend der Herstellerangaben aufgefüllt („DNA Blunting and Ligation Kit“; siehe Kapitel 3.4). Das entstandene DNA-Fragment wurde durch Phenol/Chloroform-Fällung aufgereinigt (siehe Kapitel 4.2.4) und in den „zero-blunt pCR4-TOPO-Vektor“ kloniert. Dieser linearisiert vorliegende Vektor enthält eine kovalent gebundene Topoisomerase,

welche das Insert in den Vektor integriert. Dabei wurden der Ausgangsvektor und das Insert entsprechend der Herstellerangaben inkubiert und in *E. Coli* transformiert. Nach Mini-Präparation (Kapitel 4.2.7) der transformierten Plasmid-DNA wurde das Plasmid sequenziert. Aus diesem Plasmid wurde die PON2-3'UTR in einer weiteren PCR mit den Primern PON2_3'RACE_rev und PON2_3'UTR_s (Sequenz siehe Kapitel 3.8.1) heraus amplifiziert und nach Restriktion mit den Enzymen FseI und XbaI in das pGL4-PON2-Promoter-Plasmid an C-terminaler Position zur Luziferase-kodierenden Region eingesetzt und sequenziert. Somit steht die Expression des Luziferase-Gens in diesem Plasmid unter der Kontrolle des 2.4-kbp-PON2-Promoters und die Luziferase-mRNA wurde C-terminal mit der 3'UTR der endogenen PON2 mRNA fusioniert.

4.2.11 Extraktion der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen mit DNase-Verdau

Für die Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das „E.Z.N.A.TM Total RNA Kit“ verwendet. Dabei wurde grundsätzlich nach Angaben des Herstellers verfahren. Wenn mRNA aus zuvor transient transfizierten Zellen extrahiert werden sollte, wurde während der RNA-Extraktion ein DNaseI-Verdau durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen der mRNA mit der zuvor transfizierten Plasmid-DNA zu beseitigen. Dazu wurde das „RNase-free DNase-Set“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

4.2.12 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

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

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

Das Enzym Reverse-Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Mit ihrer Hilfe wird RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Diese dient als Ausgangsmaterial für die quantitative *real-time*-RT-PCR (siehe Kapitel 4.2.14). Alle RT-PCRs wurden mit dem

„High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei dem verwendeten Primermix handelt es sich, um einen *random-primer-mix*.

Reaktionsansatz (20 µl):

10 x PCR Puffer	2 µl
dNTPs (10 nM)	0,8 µl
10 x Primermix	2 µl
Wasser	6,2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNA (10 ng/µl)	8 µl

Reaktionsprofil:

25 °C	10 min
37 °C	2 h
85 °C	5 sec
4 °C	∞

4.2.14 Quantitative *real-time* PCR

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

Reaktionsansatz (20 µl):

5 x Puffer	4 µl
dNTPs (10 nM)	0,4 µl

Reaktionsprofil:

95 °C	1 min	1 x
95 °C	1 min	1 x

<i>sense</i> -Primer (10 pmol)	2 µl	95 °C	30 sec	} 45 x
<i>antisense</i> -Primer (10 pmol)	2 µl	60 °C	1 min	
<i>TaqMan</i> -Sonde (10 pmol)	2 µl	4 °C	∞	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl			
RNase-freies Wasser	7,5 µl			
cDNA	2 µl			

Der Ansatz für die PON2-, CHOP- und Nox4-mRNA unterschied sich geringfügig. Statt der aufgeführten 2 µl Primer wurde jeweils nur 1 µl eines vordesignierten Primer-Mixes (Applied Biosystems) verwendet, der sowohl *sense*- und *antisense*-Primer als auch die Sonde enthielt.

4.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

4.3.1 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen

Zur Präparation von Proteinextrakten aus EA.hy 926-Zellen wurde das Zellkultur-Medium abgesogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Lysispuffer-3 / 24-well zugegeben, 20 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert, die Zellen mechanisch abgelöst, gevortext und die Lysate schließlich zentrifugiert (20 min; 12.000 x g; 4°C). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration wie folgt bestimmt.

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentrationen in Gesamtzellextrakten wurden mit dem BCA-Test bestimmt. Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Durch die Reduktion des Komplexes zu Cu^{+} -Ionen entsteht mit Bicinchonininsäure (BCA) ein violetter Farbkomplex, dessen Adsorption bei 562 nm in einem Fluometer gemessen wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem „BCA™ Protein Assay Kit“ (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Eichung und als Vergleichsproben dienten BSA-Lösungen bekannter Konzentration.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von Proteinen wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ¹⁶⁸ verwendet. SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, wodurch diese denaturiert werden und ihre

Eigenladung durch die stark negative Ladung von SDS überdeckt wird. Da SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine bindet, weisen diese eine konstante Ladungsverteilung auf, wodurch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ebenfalls ihrem Molekulargewicht proportional ist.

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

	12% Trenngel	15% Trenngel	5 % Sammelgel
H ₂ O	3,3 ml	2,3 ml	2,2 ml
30 % BisAcrylamid	4,0 ml	5 ml	0,67 ml
1,5 M Tris, pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	---
0,5 M Tris, pH 6.8	---	---	1 ml
10%iges SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
10%iges APS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele im BioRad Mini-Gel

	12% Trenngel	15% Trenngel	5 % Sammelgel
H ₂ O	8,25 ml	5,75 ml	4,4 ml
30 % BisAcrylamid	10 ml	12,5 ml	1,34 ml
1,5 M Tris, pH 8.8	6,25 ml	6,25 ml	---
0,5 M Tris, pH 6.8	---	---	2 ml
10%iges SDS	0,25 ml	0,25 ml	0,08 ml
10%iges APS	0,25 ml	0,25 ml	0,08 ml
TEMED	0,01	0,01	0,01 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im Peqlab Perfect-Blue L-Gel

Die Polyacrylamid-Konzentrationen des Trenngels wurden dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins entsprechend gewählt, während die Konzentration des Sammelgels immer 5 % betrug. Durch die unterschiedlichen Vernetzungsgrade und pH-Werte werden die Proteine im Sammelgel vor dem Übergang ins Trenngel konzentriert. Die zuvor auf eine gemeinsame Konzentration eingestellten Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 5 x Laemmli-Auftragungspuffer versetzt und 5 min. bei 95°C im Heizblock denaturiert. Als Größenstandard wurde zusätzlich ein Proteinmarker mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1 x Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 140 V (ca. 1-2 h) bei Biorad-Minigelen und einer konstanten Stromstärke von 9 mA (ca. 16 h) bei den Gelen unter Verwendung des Peqlab-Systems.

4.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-Blue

Die Coomassie-Färbung ist eine Methode Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Der Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff färbt unspezifisch Proteine durch Anlagerung an basische Seitenketten der Aminosäuren. Dazu wurde das Polyacrylamidgel auf dem die Proteine aufgetrennt wurden, für 60 Minuten in Coomassie-Fixierlösung (siehe Kapitel 3.9) inkubiert und für 16 h in Coomassie-Färbelösung (siehe Kapitel 3.9) gefärbt. Anschließend wurde das Gel unter häufigem Wechsel der Coomassie-Entfärbelösung (siehe Kapitel 3.9) inkubiert, bis das Gel mit Ausnahme der Proteinbanden entfärbt war. Anhand der Coomassie-Gel-Färbung wurde die Reinheit und Quantität in humanen Zellen exprimierter und anschließend aufgereinigter Proteine überprüft.

4.3.5 Western-Blot: Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen

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

Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden verschiedene Transfersysteme verwendet. Proteine, die größer als 20 kDa waren, wurden mit einem Semidry-Blotsystem auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese zunächst 15 Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert und die Proteine dann mit dem Semidry-Blotsystem auf die Nitrozellulose übertragen. Dazu wurden auf der Anodenplatte zwei in Anodenpuffer I getränkte und zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman 3 MM Papiere aufeinander geschichtet auf die dann die ebenfalls in Anodenpuffer II äquilibrierte Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und dann vier in Kathodenpuffer getränkte

Whatman 3 MM Papiere geschichtet wurden. Transferiert wurde für 28 Minuten bei konstanten 3 mA/cm² SDS-Gel. Proteine, die kleiner als 20 kDa waren, wurden per Nassblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Mini Trans-Blot Zelle von Biorad entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen, wurde die Membran nach dem Transfer für eine Stunde in 5 %-igem Milchpulver in TBS/Tween inkubiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in einer Lösung des Primärantikörpers in 5 %-igem Milchpuffer auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde viermal mit TBS/Tween gewaschen und anschließend die Membran in einer Lösung des Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers in Blockierpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach erneuten Waschschritten mit TBS/Tween und TBS wurde der Blot mit Hilfe des ECL-Systems (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) im Chemi-Doc detektiert oder es wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der durch die freigesetzte Chemilumineszenz belichtet wurde.

4.3.6 Aufreinigung nativer Proteine mittels Nickel-NTA-Säulen

Zur Expression und Aufreinigung humanen PON2s wurde eine 6-well-Platte HEK293T-Zellen mit einem für PON2-His₆ kodierendem Plasmid transfiziert (siehe Kapitel 3.7). Eine zweite Platte HEK293T-Zellen wurde mit Transfektionsreagenz ohne Plasmid-DNA behandelt und als Kontrolle weiter behandelt wie transfizierte Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl Lysispuffer 3.2 unter nativen Bedingungen lysiert (siehe Kapitel 3.9). Um den Salzgehalt der Extrakte an die Bedingungen der Affinitätssäulen anzupassen wurden sie mit einem Volumen Ergänzungspuffer gemischt. Die Aufreinigung wurde mit Nickel-NTA-*spin-columns* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, und beruht auf der hohen Affinität der Histidin-Reste am überexprimierten PON2 zu den Ni-Ionen auf der Chromatographie-Säule. Die Säulen wurden beladen, je zweimal mit 500 µl Puffer W1 und W2 gewaschen und schließlich mit 300 µl Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden dann dreimal 30 min. gegen 500 ml PBS mit 1 mM CaCl₂ bei 4°C dialysiert und schließlich der Proteingehalt der Proben per BCA-Test bestimmt. Die Präsenz von PON2 in den Eluaten wurde per Western Blot nachgewiesen. Die Reinheit der PON2-Eluate wurde durch Coomassie-Färbung eines SDS-Gels überprüft.

4.3.7 Messung von Superoxid in aufgereinigtem und rekombinantem humanem PON2

Angereichertes PON2-His₆ (2,5 µg) oder das entsprechende Volumen an Eluaten aus untransfizierten HEK293T-Zellen (siehe Kapitel 4.3.6) wurden mit L012 (40 µM) und Xanthinoxidase (5 mU) in weißen 96-well-Platten vorgelegt. Anschließend wurde die Chemilumineszenz im Luminometer vor und nach der Injektion von Xanthin (200 µM Endkonzentration pro well) über 20 Minuten vermessen und die Superoxidproduktion auf den Messwert vor der Xanthininjektion bezogen. Alternativ wurden 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng und 100 ng rekombinantes humanes PON2 oder dieselbe Menge BSA mit L012 und Xanthinoxidase in weißen 96-well-Platten vorgelegt und auf dieselbe Art vermessen wie angereichertes PON2-His₆.

4.3.8 Messung von Wasserstoffperoxid in nativen Zelllysaten

Der Abbau von Wasserstoffperoxid wurde in nativen Lysaten aus naiven und PON2-HA überexprimierenden EA.hy-Zellen mit dem *Fluoro: Catalase Detection-Kit* bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Lysispuffer 3.2 lysiert (siehe Kapitel 3.9), und der Proteingehalt der Proben im BCA-Test bestimmt. Anschließend wurde das Volumen welches 20 µg Proteingehalt der Proben entspricht in einer schwarzen 96-well-Glasbodenplatte vorgelegt und für 60, 45, 30, 15 oder 0 min. mit 40 µM H₂O₂ behandelt. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Detektionsmix aus Farbstoff und Meerrettich-Peroxidase hinzugegeben und die Fluoreszenz nach 15 min. Inkubationszeit im Fluometer mit den Resorufin-spezifischen Wellenlängen Ex / Em 540 / 590 nm vermessen.

Alternativ wurde der H₂O₂-Gehalt in nativen Zelllysaten nach Superoxidinduktion mit Xanthin / Xanthinoxidase bestimmt. Dazu wurden wiederum 20 µg der Proben mit Xanthinoxidase und dem Detektionsmix im mitgelieferten Testpuffer vorgelegt und nach Xanthinzugabe im Fluometer über 1 h vermessen.

4.3.9 Fraktionierung von Mitochondrien aus eukaryotischen Zellen

Zur Zellfraktionierung wurden naive oder PON2 überexprimierende EA.hy-Zellen aus T175-Zellkulturflaschen mit 5 ml Trypsin abgelöst, mit 15 ml Vollmedium wieder aufgenommen und in einem 50 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (10 min; 900 x g; 4°C). Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS, wurde das Pellet in 3,5 ml Sucrose-Puffer-I resuspendiert und zum Aufschluss der Zellen viermal durch eine 26G-Kanüle passagiert, gefolgt von 10 Stößen in einem 3 ml-Glashomogenisator. Die Lyse der Zellen wurde mittels Trypitan-Blau-

Färbung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und solange wiederholt bis wenigstens ca. 80% der Zellen lysiert und somit Trypan-Blau positiv waren. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 x g (4°C), wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt, das Pellet in 500 µl Mito-Puffer resuspendiert und erneut fünf Minuten bei 1000 x g (4°C) zentrifugiert. Zur Fällung der Mitochondrien wurde der resultierende Überstand mit dem Überstand des vorigen Schritts vereint und zweimal 20 Minuten mit 10.000 x g (4°C) zentrifugiert, wobei die zytosolischen Zellbestandteile und Mikrosomen im Überstand zurück blieben. Das 1000 x g Pellet wurde in 1000 µl, das Mitochondrienpellet in 300 µl Mito-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert. Zur Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen wurde eine BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung vorgenommen und die Effektivität der Fraktionierung wurde in Western-Blot-Analysen überprüft. In der Regel konnten aus fünf T175-Zellkulturflaschen ca. 900 µg mitochondrialer Proteine gewonnen werden.

4.3.10 Submitochondriale Fraktionierung von Mitochondrien aus eukaryotischen Zellen

Nach der Zellfraktionierung wurde das halbe Volumen der Mitochondrienfraktionen (siehe Kapitel 4.3.9) fünf Sekunden mit Ultraschall behandelt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und 20 min. bei 10.000 x g (4°C) zentrifugiert. Die pelletierten Mitochondrienmembranfraktionen wurden mit 100 µl Mito-Puffer gewaschen und rezentrifugiert. Die Überstände enthielten die in der Mitochondrienmatrix enthaltenen Proteine. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Fraktionen im BCA-Test bestimmt.

4.3.11 Fraktionierung von Mikrosomen aus eukaryotischen Zellen

Zur Fraktionierung von Mikrosomen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurde der Überstand der 10.000 x g – Zentrifugation der Mitochondrienfraktionierung für 60 min. in der Ultrazentrifuge (4°C, 100.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand mit den zytosolischen Proteinen wurde abgenommen und das Mikrosomen enthaltende Pellet in 200 µl Sucrose-II-Puffer resuspendiert. Für die Analysen der anti-oxidativen Aktivität in den Mikrosomen wurde ein Teil der Mikrosomen-Suspension für 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Aus fünf T175-Zellkulturflaschen wurden auf diese Weise ca. 400 µg mikrosomale Proteine isoliert.

4.3.12 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in isolierten Mitochondrien

20 µg der Mitochondrienfraktionen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden mit Mito-HE (1 µM) in einer schwarzen 96-well Glasbodenplatte vorgelegt und direkt nach der Zugabe von Antimycin (15 µM) in Mito-Puffer im Fluometer mit 2-Hydroxyethidium-spezifischen Wellenlängen von Ex / Em 400/580 nm über 20 Minuten vermessen. Zur Auswertung wurden jeweils die Fluoreszenzwerte der unbehandelten Zellen subtrahiert und durch Subtraktion des jeweiligen Wertes zum Zeitpunkt null die Startpunkte der Fluoreszenzkurven angeglichen.

4.3.13 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrienfraktionen und Mikrosomen

Je 25 µg von intakten Mitochondrien, Mitochondrienmembran- und Mitochondrienmatrixfraktionen bzw. intakten oder lysierten Mikrosomen wurden mit MCLA (5 µM) und Xanthinoxidase (5 mU) beladen und die Chemilumineszenz vor und nach der Injektion von 50 µl Xanthin (Endkonzentration 200 µM) gemessen. Zur Auswertung wurde jeweils die Chemilumineszenz vor der Xanthinzugabe von den Werten nach der Zugabe subtrahiert.

4.3.14 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrienmembranfraktionen

20 µg der Mitochondrienmembranfraktionen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy-Zellen wurden mit MCLA (5 µM) in weißen 96-well-Glasbodenplatten vorgelegt und mit Succinat (5 mM), α-Ketoglutarat (5 mM) oder dem entsprechenden Volumen Mito-Puffer als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Direkt nach Zugabe der Reagenzien wurde die Chemilumineszenz über 120 Minuten im Luminometer vermessen.

4.3.15 Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität in eukaryotischen Zellen

Die Superoxiddismutase-Aktivität wurde zymografisch in Kooperation mit Dr. Heidrun Witan (Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) bestimmt ¹⁶⁹. Dazu wurden naive und PON2-überexprimierende EA.hy-Zellen in 12-well-Platten ausplattiert, mit Antimycin oder Staurosporin behandelt und nach sechs Stunden mit 100 µl Lysispuffer 3.2 lysiert. 20 µg Zelleextrakt wurden in einem nativen 15 %-igem

Polyacrylamidgel aufgetrennt und 45 Minuten bei Dunkelheit in Nitroblau Tetrazolium-Färbelösung (siehe Kapitel 3.9) inkubiert. Die Belichtung der Gele zum Entwickeln der Bandenfärbung erfolgte unter einem Flachbettscanner.

4.3.16 Messung der Laktonase-Aktivität in Extrakten eukaryotischer Zellen

Für die Messung der Laktonase-Aktivität wurden 1×10^5 naive, PON2-GFP-Wildtyp oder PON2-Mutant-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen für drei Minuten bei $900 \times g$ und 4°C pelletiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert. Die Messung der Laktonase-Aktivität anhand des Substrats N-(3-oxododecanoyl-L-Homoserinlaktone (3oxoC12) in den Zellpellets wurde von Dr. John F. Teiber (Dallas, USA) durchgeführt, wie bereits beschrieben⁵⁴.

4.3.17 Koimmunopräzipitation

Bei Koimmunopräzipitationen wird ein spezifisches Protein mit seinen assoziierten Interaktionspartnern mittels eines spezifischen Antikörpers aus einem Proteingemisch, wie es z.B. ein Zelllysate darstellt, gefällt. Dafür wurde je eine T175-Zellkulturflasche EA.hy-Zellen zwei Stunden mit HBSS⁺⁺ oder HBSS⁺⁺ mit Antimycin ($15 \mu\text{M}$) behandelt und anschließend mit Lysispuffer 3 (+PhosphoStop, Benzonase 25 U/ml) lysiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellkulturflaschen 20 min. bei 4°C geschüttelt und dann 20 min. bei $10.000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstands wurde im BCA-Test bestimmt, um dann $500 \mu\text{g}$ Protein aus unbehandelten oder behandelten Zellen mit Cytochrom C-Antikörper ($1 \mu\text{g}$) oder PON2-Antikörper ($2,5 \mu\text{g}$) für 30 min. auf Eis zu inkubieren, bevor je $25 \mu\text{l}$ A-G plus-Agarose pro Reaktionsgefäß hinzugegeben wurden um den Antikörper mit den daran gebundenen Proteinen zu fällen. Dazu wurden die Reaktionsgefäße über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am Folgetag wurden die Präzipitationsansätze 3 min. bei ca. $2.500 \times g$ zentrifugiert und der Überstand für Western Blot-Analysen aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 1 ml Lysispuffer 3 durch Invertieren resuspendiert und weitere 10 min. auf dem Überkopfschüttler bei 4°C rotiert. Dieser Vorgang wurde, jeweils nach Rezentrifugation, dreimal wiederholt, bevor das Pellet schließlich in $50 \mu\text{l}$ SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen wurde. Alle Fraktionen wurden bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE / Western-Blot analysiert.

4.4 Statistik

Zur Erstellung der in Kapitel 5 gezeigten Graphiken wurden die Programme *graph pad prism* 5.00, *Quantity One* 4.6.7 (Biorad) und *Zen 2009* (Zeiss) verwendet. Wo angegeben wurden die Maxima der Graphen mittels nichtlinearer bzw. linearer Regression auf statistische Signifikanz überprüft. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der übrigen Graphen erfolgte mittels 1-way oder 2-way ANOVA. Die Berechnungen wurden ebenfalls mit der Software *graph pad prism* 5.00 durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der anti-oxidativen Funktion von PON2

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die PON2 Expression mit der intrazellulären Bildung von ROS in verschiedenen humanen Zelllinien (EA.hy 926; HeLa) und primären Zellen (glatten Muskelzellen der Koronararterie; aortalen Adventitia-Fibroblasten) reziprok korrelierte^{26, 53}. In diesen Analysen wurde ROS entweder durch Gabe von H₂O₂, ox-PAPC, oder dem Quinon DMNQ induziert und mit dem Fluoreszin-Derivat cm-H₂DCFDA bzw. dem Luminol-Derivat L-012 gemessen. Spezifität, Mechanismen und Lokalisation der protektiven PON2 Aktivität blieben jedoch unbekannt und sollten daher in der folgenden Arbeit charakterisiert werden.

5.1.1 Spezifität der anti-oxidativen Aktivität von PON2

Um den Mechanismus der anti-oxidativen Aktivität von PON2 zu untersuchen, war es zunächst erforderlich die genaue reaktive Sauerstoff- oder Stickstoff-Spezies, die von PON2 vermindert wird herauszufinden. H₂DCFDA detektiert unspezifisch ROS und RNS, für L012 hingegen wurde eine Spezifität für die Messung von Superoxid beschrieben^{170, 171}. DMNQ induziert vornehmlich die intrazelluläre Bildung von Superoxid¹²⁸. Da eine PON2-Überexpression in EA.hy 926-Zellen DMNQ-induzierte ROS in Messungen mit L012 vermindern konnte⁵³, wurde zunächst überprüft ob unter diesen Bedingungen tatsächlich Superoxid gemessen wurde.

Dazu wurden naive EA.hy 926-Zellen vor der ROS-Messung für 24 h mit den zellpermeablen Enzymen PEG-Katalase (Cat) oder PEG-Superoxiddismutase (SOD) behandelt. Anschließend wurden die Zellen, wie in den Vorexperimenten, mit L012 beladen und die ROS-Bildung mit DMNQ stimuliert und anhand der Änderung der Chemilumineszenz verfolgt (Abbildung 3). Durch die Vorbehandlung mit SOD sollte ein durch Superoxid hervorgerufenen Signal im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich erniedrigt sein. Sollte das durch DMNQ induzierte Chemilumineszenz-Signal durch H₂O₂ verursacht werden, so sollten die Katalase-behandelten Zellen ein deutlich erniedrigtes Signal zeigen. Zellen, die mit SOD vorbehandelt wurden, zeigten eine Reduktion des ROS-Signals um circa zwei Drittel, wohingegen die Vorbehandlung mit Katalase das Signal nur geringfügig erniedrigte. Somit wurde gezeigt, dass L012 unter diesen Reaktionsbedingungen vorwiegend DMNQ-induziertes Superoxid detektiert, jedoch nur in geringem Maße H₂O₂. Dies impliziert, dass PON2, welche das Signal ähnlich wie SOD verminderte, die intrazellulären Superoxid-Spiegel reduziert.

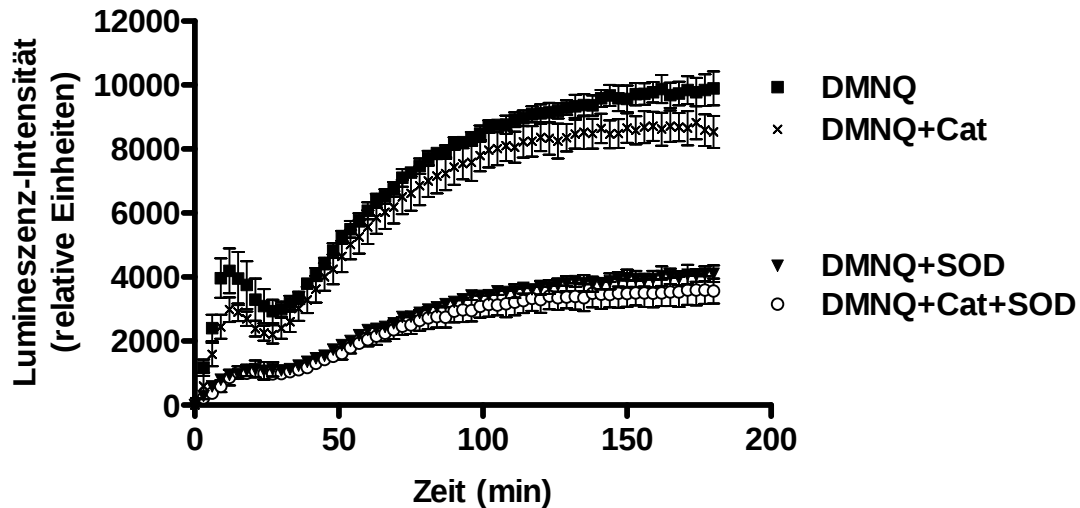


Abbildung 3: DMNQ induziert vorwiegend Superoxid in humanen EA.hy 926 Zellen, welches durch L012 detektiert werden kann. Unbehandelte und mit PEG-Katalase (Cat; 200 U/ml, 24h) oder PEG-Superoxiddismutase (SOD; 100 U/ml, 24h) vorbehandelte EA.hy 926-Zellen wurden mit dem ROS-Indikator L012 beladen. Anschließend wurden die Zellen mit DMNQ (10 μ M) behandelt und der Anstieg der Chemilumineszenz über 3h im Luminometer verfolgt. Repräsentative Darstellung aus drei unabhängigen Experimenten mit Vierfach-Werten als absoluter Anstieg der Chemilumineszenz (Mittelwert $\pm$ SEM).

Um diesen Hinweis zu belegen, wurde eine direkte Methode der Superoxidmessung herangezogen in Anlehnung an Zhao *et al.* ^{167, 172}. Die Detektion erfolgt dabei mit dem Farbstoff Dihydroethidium (DHE), der durch Superoxid spezifisch zu 2-Hydroxyethidium (2-HE), durch andere ROS jedoch zu Ethidium⁺ oxidiert wird. Die unterschiedlichen Oxidationsprodukte können durch HPLC aufgetrennt und detektiert werden.

Zunächst wurden naive oder PON2-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen mit DHE beladen und die Superoxidbildung mit DMNQ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und der Gehalt der Zellen an 2-Hydroxyethidium und Ethidium⁺ per HPLC bestimmt. Anhand der HPLC-Kurve wurde die geringere Menge an 2-Hydroxyethidium in den PON2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den naiven Zellen deutlich (Abbildung 4).

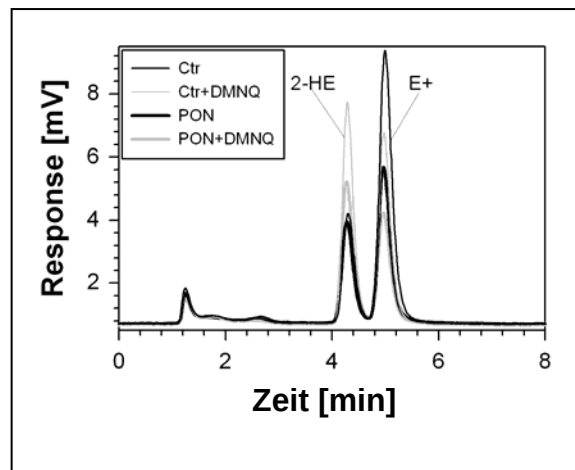


Abbildung 4: PON2 Überexpression reduziert die Superoxid-Produktion in EA.hy 926-Zellen. Naive (Ctr) und PON2-GFP überexprimierende (PON) EA.hy 926-Zellen wurden mit DHE (500 μ M) beladen und 2 h mit DMNQ (10 μ M) stimuliert. Anschließend wurde der intrazelluläre Gehalt des unspezifischen Oxidationsproduktes Ethidium (E^+) und des für Superoxid spezifischen Produktes 2-Hydroxyethidium (2-HE) durch HPLC bestimmt. Repräsentative Darstellung einer HPLC-Kurve.

In der quantitativen Zusammenfassung mehrerer Experimente konnte in naiven Zellen eine Erhöhung der 2-HE-Level nach DMNQ-Behandlung um ca. 32 Prozentpunkte beobachtet werden. In PON2-überexprimierenden Zellen hingegen konnte nach DMNQ-Behandlung kein Anstieg der 2-HE-Level nachgewiesen werden (Abbildung 5). Die PON2 Überexpression führt somit in EA.hy-Zellen zu einer signifikanten Senkung der DMNQ-induzierten Superoxid-Level.

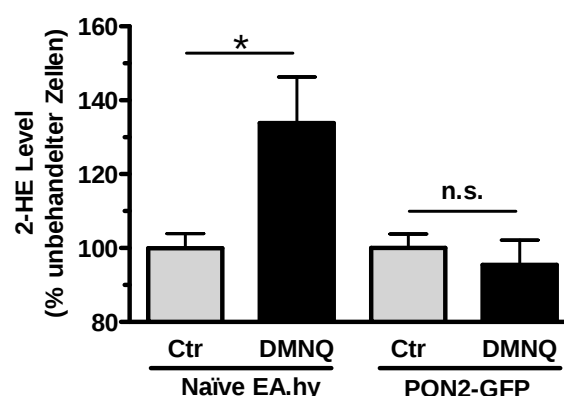


Abbildung 5: PON2 Überexpression reduziert die Superoxid-Produktion in EA.hy 926-Zellen. Gleiches Experiment wie Abbildung 4. Graphisch dargestellt ist eine Zusammenfassung von 12 – 14 unabhängigen Experimenten, jeweils bezogen auf unbehandelte Zellen des gleichen Typs (Mittelwert $\pm$ SEM *: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$; 2-way ANOVA).

Die Spezifität wurde nachfolgend geprüft, indem der Effekt der PON2 Überexpression auf andere ROS / RNS bestimmt wurde, die ebenfalls entscheidend an der Arteriosklerose-Entstehung beteiligt sind. Peroxynitrit wurde in naiven und PON2-GFP überexprimierenden

EA.hy 926-Zellen durch 3-Morpholino-Sydnonimin (SIN-1) induziert, einem Reagenz, welches enzymatisch Stickstoffmonoxid freisetzt, und dabei molekularen Sauerstoff zu Superoxid reduziert. Da beide Reaktionen zeitgleich am selben Ort ablaufen, reagieren Superoxid und Stickstoffmonoxid unverzüglich miteinander zu Peroxynitrit. Naive und PON2-überexprimierende EA.hy 926 Zellen wurden mit dem Peroxynitrit-Detektionsreagenz Dihydrorhodamin-123 (DHR123) beladen, die Peroxynitrit-Bildung mit SIN-1 induziert und der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit vermessen (Abbildung 6). Dabei bewirkte die PON2 Überexpression keine signifikante Verringerung der ONOO^- -Bildung.

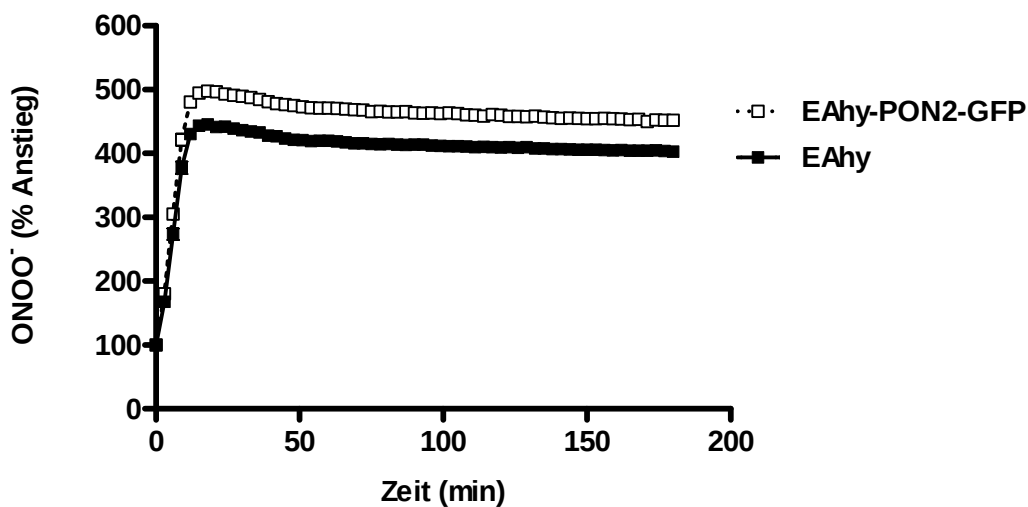


Abbildung 6: PON2 Überexpression reduziert nicht die Peroxynitrit-Produktion in EA.hy 926-Zellen. Naive und PON2-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit dem Peroxynitrit-Indikator Dihydrorhodamin-123 (5 μM) beladen und mit dem Peroxynitrit (ONOO^-) produzierendem Reagenz SIN-1 (100 μM) stimuliert. Anschließend wurde der Fluoreszenz-Anstieg über 3 h im Fluometer vermessen. Repräsentative Grafik aus vier unabhängigen Experimenten mit Sechsfach-Werten $\pm$ SEM, dargestellt als prozentualer Anstieg.

Sollte SIN-1 nach der simultanen Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Superoxid nicht wie erwartet Peroxynitrit bilden, könnte das in Abbildung 6 gemessene Signal ebenfalls durch Superoxid oder dessen Abbauprodukt H_2O_2 bedingt sein. Zur Überprüfung der Spezifität der Messung wurden naive EA.hy-Zellen mit DHR123 beladen und anschließend entweder mit einer Lösungsmittelkontrolle, SIN-1 oder DMNQ zur Superoxidbildung stimuliert. Während SIN-1 zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenz-Signals führte, konnte bei den DMNQ-behandelten wie bei den unbehandelten Zellen keine gesteigerte Signalintensität gemessen werden (Abbildung 7 links). Alternativ wurden naive EA.hy-Zellen 24 h mit PEG-Katalase vorbehandelt, mit DHR123 beladen und die ONOO^- -Bildung mit SIN-1 induziert. Die Katalase Vorbehandlung änderte jedoch nicht die Signalintensität nach SIN-1-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 7 rechts). Die Spezifität von DHR123 für SIN-1

induziertes ONOO^- wurde nachfolgend demonstriert, da DHR123 weder mit DMNQ-induziertem O_2^- reagierte, noch mit H_2O_2 .

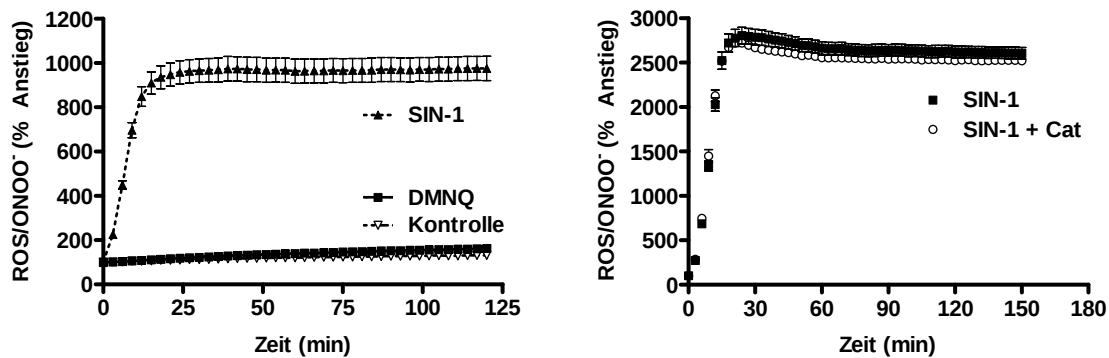


Abbildung 7: DHR123 detektiert weder DMNQ-induziertes Superoxid, noch SIN-1-induziertes Wasserstoffperoxid. Naive EA.hy 926-Zellen wurden, wie in Abbildung 6 mit DHR123 beladen und (links) mit SIN-1 bzw. dem Superoxid-Induktor DMNQ oder einer Lösungsmittel Kontrolle oder (rechts) mit SIN-1 ohne oder mit 24 h Vorbehandlung mit PEG-Katalase (Cat; 200 U/ml) behandelt. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis für drei unabhängige Experimente als prozentuale Steigerung der gemittelten Fluoreszenz-Intensität aus Dreifach-Werten über die Zeit (MW $\pm$ SEM).

Als weitere physiologisch und pathophysiologisch bedeutsame reaktive Sauerstoffspezies wurde der Effekt von PON2 auf Wasserstoffperoxid untersucht. Dazu wurden native Lysate von naiven und PON2 überexprimierenden EA.hy-Zellen für 60, 45, 30 und 15 min. mit H_2O_2 behandelt und die H_2O_2 -Level mit dem FluoroCatalase-Kit bestimmt. Die entstandene Änderung der Fluoreszenz wurde aufgezeichnet (Abbildung 8). Die Degradation des hinzugegebenen Wasserstoffperoxids erfolgte in den Lysaten exponentiell, wobei der Abbau in den Lysaten der naiven EA.hy-Zellen bis zu fünfmal schneller ablief, als in den Lysaten der PON2-überexprimierenden Zellen. Eine PON2-Überexpression zeigte gegenüber H_2O_2 keine anti-oxidativen Effekte in nativen Lysaten. PON2 vermindert also intrazelluläre Superoxid-, nicht aber Peroxynitrit- und Wasserstoffperoxid-Level.

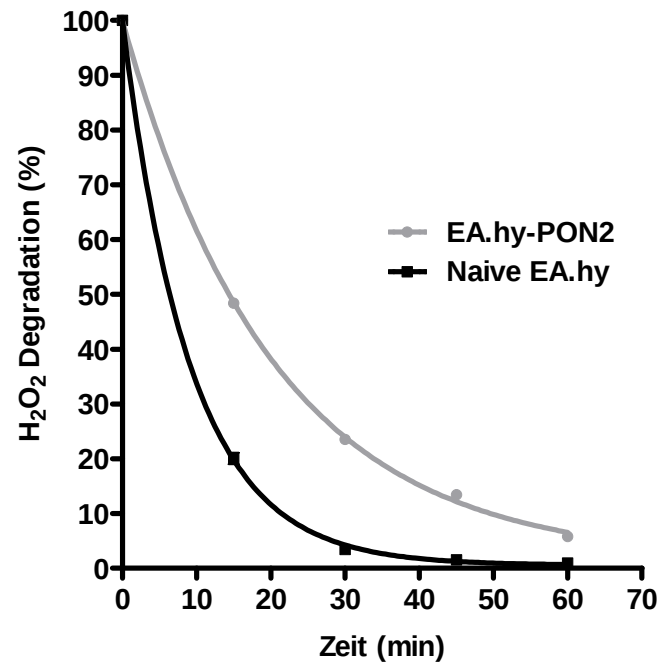


Abbildung 8: PON2 überexprimierende EA.hy 926-Zellen zeigen schwächere H₂O₂-Degradation als naive EA.hy 926-Zellen. Native Lysate aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden 60, 45, 30 oder 15 Minuten mit H₂O₂ (40 µM) behandelt und anschließend mit FluoroCat gefärbt. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten (MW +/- SEM). Die Kurven zeigen die prozentuale Degradation von H₂O₂ in den Proben und wurden durch nicht-lineare Regression berechnet. Die Einzelwerte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; 2-way ANOVA).

5.1.2 *In vitro* Analysen der anti-oxidativen Funktion von PON2

Bekannte Superoxid abbauende Enzyme wie Superoxiddismutase oder Cytochrom C besitzen jeweils eine prosthetische Gruppe mit Übergangsmetallen wie z.B. Mangan in der SOD2, Kupfer und Zink in der SOD1 oder die Eisen-Hämgruppe im Cytochrom C. Für PON2 konnte bisher weder eine prosthetische Gruppe noch die Anwesenheit von Übergangsmetallen gezeigt werden. Deshalb ist es fraglich ob PON2 seine Superoxid vermindernde Wirkung selbst oder eventuell durch die Aktivierung von Superoxid-abbauenden Enzymen oder Faktoren vermittelt. Bisher konnte die anti-oxidative Wirkung von PON2 nur in lebenden Zellen gezeigt werden. Um die Frage zu beantworten ob PON2 diese Wirkung direkt, z.B. über eine enzymatische Reaktion vermittelt, wurde in einem *in vitro* Experiment Superoxid mittels des Xanthin/Xanthinoxidase Systems produziert und mit L012 detektiert. Die Superoxidproduktion erfolgte jeweils in Anwesenheit von in Bakterien exprimiertem rekombinantem humanem PON2 (rhPON2) oder der äquivalenten Menge BSA als Kontrolle und wurde als Chemilumineszenz aufgezeichnet (Abbildung 9). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen rhPON2 und BSA beobachtet werden, was darauf

hindeuten könnte, dass PON2 entweder Cofaktoren für seine anti-oxidative Aktivität benötigt oder diese nur indirekt vermittelt oder aktiviert.

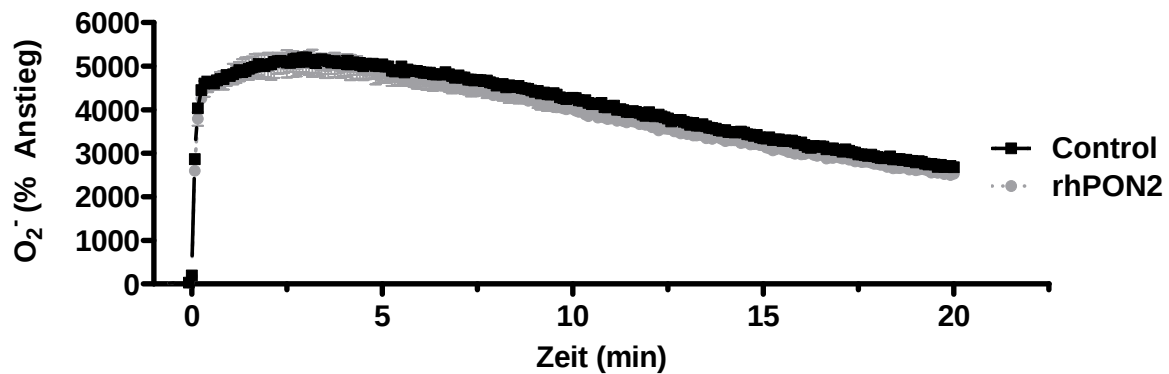


Abbildung 9: Rekombinantes humanes PON2 kann Superoxid nicht vermindern. Rekombinantes humanes PON2-Protein (rhPON2, 100 pg) oder die äquivalenten Menge BSA als Kontrolle wurden mit L012 und Xanthinoxidase (5 mU) beladen. Anschließend wurde Xanthin (200 µM) injiziert und der Anstieg der Chemilumineszenz über 20 Minuten vermessen. Repräsentative Darstellung eines von zwei Experimenten in Doppelwerten (MW +/- SEM). Das Ergebnis wurde mit Proteinmengen von einem und 10 pg, sowie einem, 10 und 100 ng reproduziert. Der Graph zeigt den prozentualen Anstieg der Chemilumineszenz nach Superoxidinduktion mit Xanthin.

In Bakterien exprimierte Proteine unterscheiden sich vor allem in den post-translationalen Modifikationen von in Säugerzellen exprimierten Proteinen. Da diese Modifikationen einen entscheidenden Einfluss auf Proteinaktivitäten haben können, sollte neben den Analysen mit rhPON2 ebenfalls Analysen mit in Säugerzellen exprimiertem PON2 durchgeführt werden. Dazu wurde ein mit einem His₆-tag markiertes humanes PON2 in humanen HEK293T-Zellen exprimiert und mittels Affinitätssäulenchromatographie im nativen Zustand angereichert. Die Aufreinigung wurde durch Auftragen der verschiedenen Fraktionen auf ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung (Abbildung 10, links) und Western Blot (Abbildung 10, rechts) überprüft. Dabei konnte in den beiden Eluatfraktionen noch eine Vielzahl von Proteinbanden durch die Coomassie-Färbung detektiert werden. Die starken PON2-Banden in den Eluatfraktionen nach der Entwicklung des Western Blots mit einem PON2-Antikörper zeigten eine deutliche Anreicherung von humanem PON2-His₆-Protein.

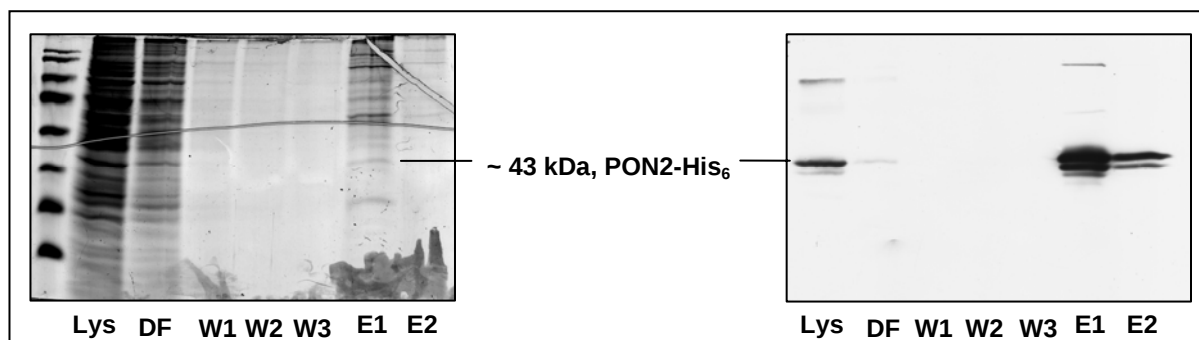


Abbildung 10: Coomassie-Gel und Western Blot zur Kontrolle der PON2-His₆ Anreicherung. HEK-293T-Zellen wurden mit einem pCRScript-PON2-His₆-Plasmid transfiziert, 24 h später unter nativen Bedingungen lysiert und durch NiNTA-Affinitätsäulenchromatographie aufgereinigt. Lysat (Lys), Säulendurchfluss (DF), drei Waschschritte (W1-W3) und die Fraktionen der beiden Eluierungsschritte (E1, E2) wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (links) oder auf eine Membran geblottet und die Proteinbanden mit einem Antikörper gegen humanes PON2 detektiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Gel von drei unabhängigen Experimenten.

Das auf diese Weise angereicherte, in Säugerzellen exprimierte PON2-Protein wurde, wie das in Bakterien exprimierte rhPON2, auf seine anti-oxidativen Eigenschaften in *in vitro* Experimenten mit Xanthin / Xanthinoxidase und L012 untersucht (Abbildung 11). Als Kontrolle wurden Eluate von untransfizierten Zellen in äquivalenten Volumina eingesetzt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Chemilumineszenz-Signal der PON2 angereicherten Eluate im Vergleich zur Kontrolle. In Säugerzellen exprimiertes angereichertes PON2-Protein kann durch Xanthin / Xanthinoxidase produziertes Superoxid nicht vermindern, was wiederum darauf hindeutet, dass PON2 Superoxid nicht selbstständig abbauen kann.

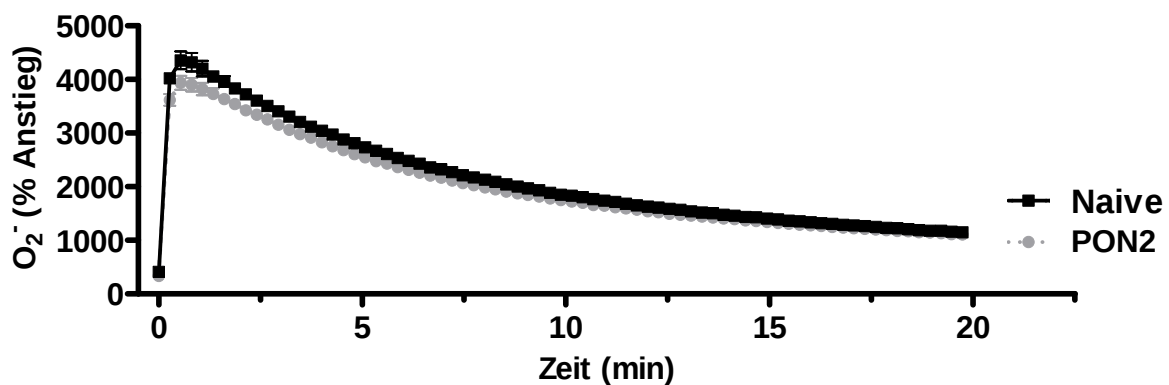


Abbildung 11: *In vitro* angereichertes PON2-Protein kann Superoxid nicht vermindern. Durch Affinitätsäulenchromatografie aus humanen HEK293T-Zellen aufgereinigtes HIS-markiertes PON2-Protein (2,5 µg) oder entsprechende Volumina von Kontroll-Eluaten aus HEK293T-Zellen wurden mit L012 und Xanthinoxidase (5 mU) beladen. Anschließend wurde Xanthin (200 µM) injiziert und der Anstieg der Chemilumineszenz über 20 Minuten vermessen. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten mit Dreifach-Werten (MW +/- SEM) ausgedrückt als prozentualer Anstieg der Chemilumineszenz nach Xanthin-Zugabe.

5.1.3 PON2 führt nicht zur Aktivierung der Superoxiddismutasen

Da isoliertes PON2 keine Superoxid-vermindernde Wirkung zeigte, sollte untersucht werden, ob PON2 die Superoxid-vermindernden Enzyme SOD1 im Zytosol oder SOD2 in den Mitochondrien aktiviert. Dafür wurden naive und PON2 überexprimierende EA.hy-Zellen mit dem Superoxid-Induktor DMNQ oder dem pro-apoptotischen Proteinkinase C-Inhibitor

Staurosporin behandelt, welches sekundäre ROS-Bildung in Mitochondrien verursacht. Die Zellen wurden nach der Behandlung lysiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die SOD-Aktivität wurde mittels Färbung des Gels in Nitrotetrazolium-Blau-Färbelösung sichtbar gemacht (Abbildung 12). Naive und PON2-überexprimierende EA.hy-Zellen zeigten keine Unterschiede in den SOD1- und SOD2-Aktivitäten. PON2 hat keinen Einfluss auf die Aktivität einer Superoxiddismutase, so dass diese nicht für die antioxidativen Effekte von PON2 verantwortlich sind.

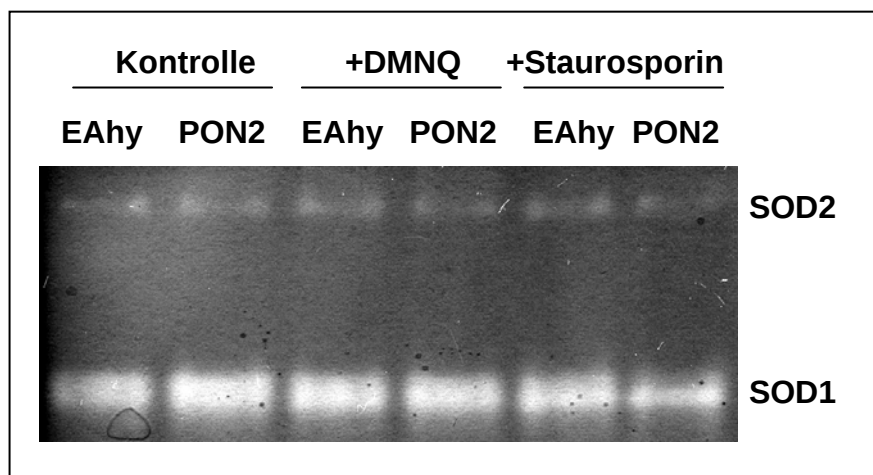


Abbildung 12: Die SOD-Aktivität in PON2-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen bleibt gegenüber naiven Zellen unverändert. Naive oder PON2-GFP überexprimierende EA.hy-Zellen wurden mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle, DMNQ (10 μ M, 2 h) oder Staurosporin (1 μ M, 16 h) behandelt und unter nativen Bedingungen lysiert. Jeweils 20 μ g der nativen Lysate wurden durch nicht-denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und die SOD-Aktivität durch Färbung des Gels detektiert. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives von zwei Gelen aus unabhängigen Experimenten.

Obwohl PON2 die endogene SOD1 / SOD2-Aktivität nicht änderte, sollte alternativ untersucht werden, ob die Verringerung der O_2^- Spiegel durch PON2 zu vermehrter H_2O_2 Bildung führte. Hierzu wurde in nativen Lysaten aus naiven Zellen (mit / ohne PEG-SOD Vorbehandlung) bzw. PON2-überexprimierenden Zellen mittels Xanthin / Xanthinoxidase O_2^- induziert und das entstehende H_2O_2 mit dem FluoroCat-Kit gemessen (Abbildung 13). Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Lysaten aus naiven und PON2-überexprimierenden Zellen, wobei jedoch die SOD Vorbehandlung erwartungsgemäß zu erhöhter H_2O_2 Bildung führte und somit den experimentellen Ansatz validierte.

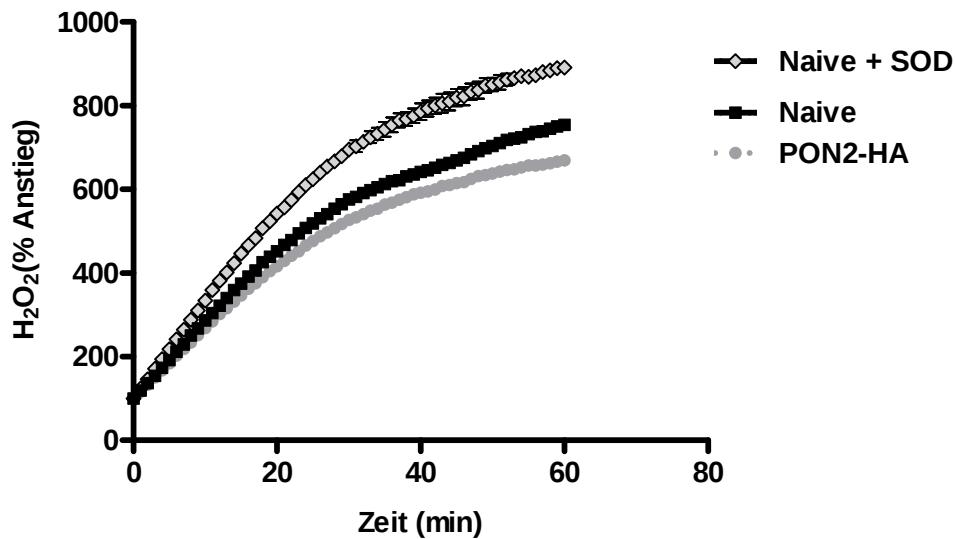


Abbildung 13: Die Verminderung der $O_2^{\cdot -}$ -Level durch PON2 führt nicht zu erhöhten Spiegeln an H_2O_2 . Native Lysate aus naiven und PON2-HA überexprimierenden EA.hy- 926-Zellen wurden mit Xanthinoxidase (5 mU) und FluoroCat beladen. Xanthin (200 μ M) wurde zur Superoxidinduktion hinzugegeben und die H_2O_2 -Produktion im Fluometer über 60 min vermessen. Der Graph zeigt den prozentualen Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit, bezogen auf den Zeitpunkt der Xanthinzugabe. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Dreifach-Werten (MW $\pm$ SEM).

5.1.4 PON2 lokalisiert in die Mitochondrien und vermindert die mitochondriale Superoxid-Produktion

Unter physiologischen Bedingungen findet die Hauptproduktion von Superoxid als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette statt^{94, 173}. Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PON2 vor DMNQ-induziertem Superoxid schützt. DMNQ ist ein *redox-cycling*-fähiges Reagenz, welches durch Wechselwirkung mit dem Enzym NADH-Cytochrom b-Reduktase Superoxid produziert¹²⁸. NADH-Cytochrom b-Reduktase lokalisiert unter anderem in der äußeren Mitochondrienmembran, weshalb der Schluss nahe liegt, dass PON2 möglicherweise neben dem Endoplasmatischen Retikulum auch in den Mitochondrien lokalisiert ist. In Übereinstimmung hiermit fand sich PON2 zu einem großen Anteil in mitochondrialen Fraktionen bei einer Zellfraktionierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation⁵³. Zur Überprüfung einer möglichen mitochondrialen Lokalisation wurde das endogene PON2 in naiven EA.hy-Zellen mit einem Antikörper gegen PON2, einem Mitochondrien-Marker-Farbstoff und einem Antikörper gegen das ER-Protein Calnexin angefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert (Abbildung 14 unten). Alternativ wurde die Lokalisation des PON2-GFP Fusionsproteins nach Transfektion in lebenden EA.hy-Zellen nach Vorbehandlung der Zellen mit einem Mitochondrien- und einem ER-Markerfarbstoff untersucht (Abbildung 14 oben). Anhand der deutlichen

Überlagerung von PON2 mit den ER- und Mitochondrienmarkern konnte klar erkannt werden, dass PON2 auch in den Mitochondrien lokalisiert vorliegt.

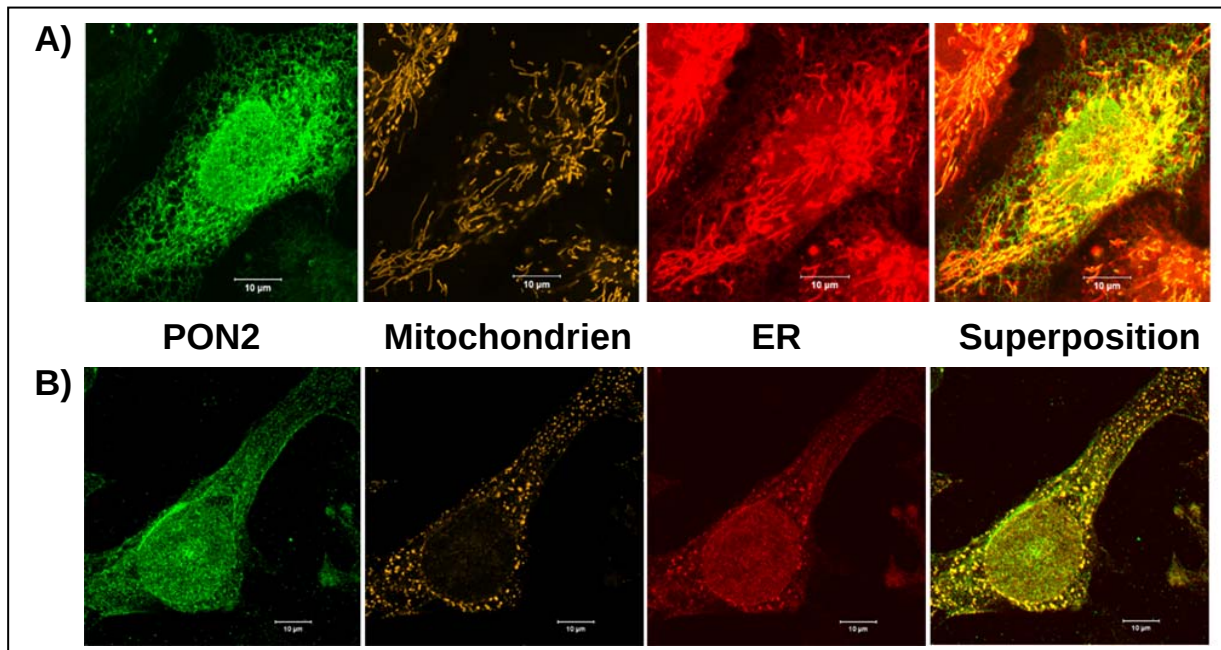


Abbildung 14: Immunofluoreszenzfärbung von PON2 in naiven EA.hy 926-Zellen. A) PON2-GFP überexprimierende EA.hy-Zellen wurden mit reduziertem Mito-Tracker-orange und ER-Tracker-Red beladen und unter einem konfokalem Mikroskop analysiert. B) Naive EA.hy 926-Zellen wurden mit reduziertem MitoTracker-orange beladen, fixiert und mit primären Antikörpern gegen humanes PON2 (sekundärer Antikörper: AlexaFluor 488, grün) und das humane ER-Protein Calnexin (sekundärer Antikörper: AlexaFluor 647, rot) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalem Mikroskop analysiert (Skalierung = 10 µm).

Um den Einfluss von PON2 auf mitochondriales Superoxid direkt zu überprüfen, wurde Antimycin A als Superoxid-Induktor verwendet. Antimycin inhibiert das mitochondriale Atmungskettenprotein Komplex III, woraufhin Superoxid auf beide Seiten der inneren Mitochondrienmembran freigesetzt wird⁹⁷. Die Detektion von mitochondrialem Superoxid erfolgte mit Mito-HE, einem Derivat des Dihydroethidiums (siehe Kapitel 5.1.1), welches durch eine Triphenylphosphin-Gruppe direkt in die Mitochondrien geleitet wird¹⁷⁴. Zur Messung wurden naive und PON2-HA überexprimierende EA.hy-Zellen mit Mito-HE beladen, mit Antimycin A oder einer Lösungsmittelkontrolle stimuliert und die Fluoreszenzänderung mit den 2-HE spezifischen Wellenlängen aufgezeichnet (Abbildung 15). Die Signalintensität der PON2-HA überexprimierenden Zellen lag dabei deutlich unter der Signalintensität der naiven Zellen. Die Überexpression von PON2 konnte also EA.hy-Zellen vor mitochondrialem Superoxid, welches durch die Hemmung der Atmungskette an Komplex III entstanden ist, schützen, bzw. die Bildung des Superoxids an Komplex III verhindern.

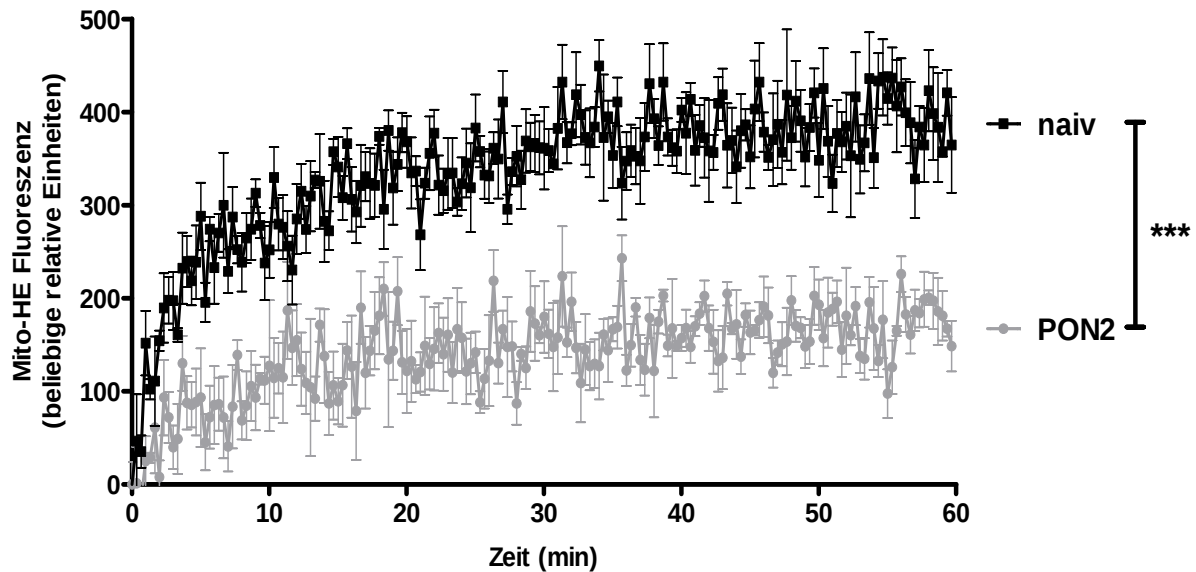


Abbildung 15: PON2 Überexpression schützt EA.hy-Zellen vor Antimycin-induziertem mitochondrialem Superoxid. Naive oder PON2-HA überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit Mito-HE (1 μ M) beladen, gewaschen und mit Antimycin A (15 μ M) behandelt. Anschließend wurde die Änderung der Fluoreszenz bei den Anregungs- / Emissionswellenlängen von 405/580 nm über 1 h am Fluometer verfolgt. Für die Darstellung wurden jeweils die Werte der unbehandelten Zellen von den Werten der Antimycin behandelten subtrahiert. Anschließend wurde durch Subtraktion des Wertes zum Zeitpunkt Null der Startwert beider Kurven angeglichen. Der Graph repräsentiert vier unabhängige Experimente mit Dreifach-Werten und zeigt den relativen Anstieg der Fluoreszenz (MW $\pm$ SEM; ***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

5.1.5 Der anti-oxidative Mechanismus von PON2 ist unabhängig von Cytochrom C

Das mitochondriale Enzym Cytochrom C kann unter bestimmten Umständen Superoxid-Level, bevorzugt im Intermembranraum der Mitochondrien, abbauen. Somit stellt Cytochrom C neben der SOD ein weiteres Enzym dar, über das PON2 seine anti-oxidative Wirkung vermitteln könnte. Da im Gegensatz zur SOD-Aktivität für die Messung der Cytochrom C-Aktivität keine verlässlichen Versuchsanordnungen verfügbar waren, wurde zunächst der Einfluss einer Überexpression von PON2 in EA.hy-Zellen auf die Expression von Cytochrom C untersucht. Dies geschah in Western Blot Experimenten mit verschiedenen Proteinmengen von Lysaten aus naiven und PON2-überexprimierenden Zellen (Abbildung 16). Cytochrom C wurde in beiden Zelllinien gleich stark exprimiert, d.h. die PON2-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Cytochrom C-Proteinexpression.

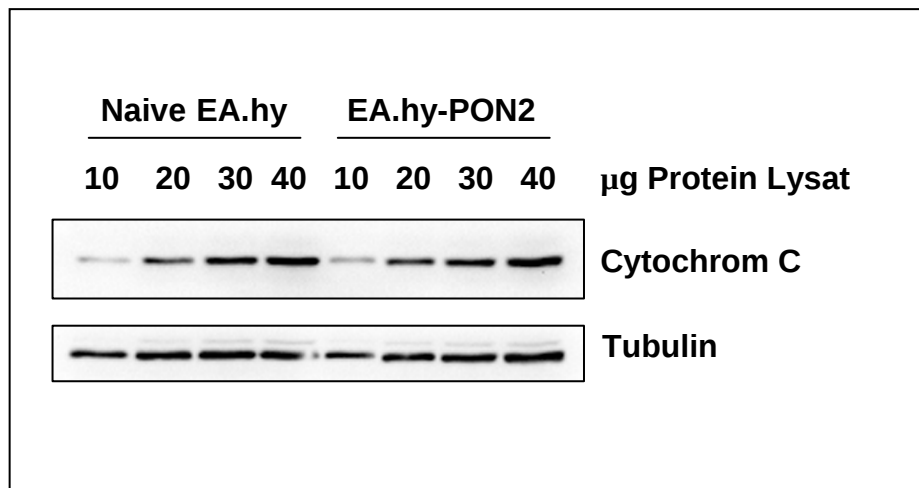


Abbildung 16: Naive und PON2-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen unterscheiden sich nicht in ihrer Cytochrom C-Expression. Lysate aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und die Proteine im Western Blot mit Antikörpern gegen Cytochrom C und α -Tubulin detektiert. Gezeigt wird ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Eine weitere Möglichkeit die anti-oxidative Aktivität von PON2 über Cytochrom C zu vermitteln wäre eine Protein-Interaktion der beiden Enzyme. Um zu untersuchen, ob PON2 möglicherweise an Cytochrom C assoziiert, wurden Koimmunopräzipitationsexperimente (CoIP) durchgeführt. Dazu wurden naive EA.hy-Zellen unbehandelt belassen oder mit dem Komplex III-Inhibitor Antimycin A stimuliert, da bei einer Hemmung der Atmungskette in den Mitochondrien Cytochrom C von der inneren Mitochondrienmembran dissoziiert und in den Intermembranraum wandert. Diese Dissoziation ist Voraussetzung für die Superoxidabbauende Wirkung von Cytochrom C¹²². Aus den Lysaten dieser Zellen wurden die Proteine entweder mit einem Antikörper gegen humanes Cytochrom C oder mit einem Antikörper gegen humanes PON2 gefällt. Ausgangsmaterial, Überstände und Präzipitate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und per Western-Blot mit Cytochrom C-Antikörper (Abbildung 17 oben) und PON2-Antikörper (Abbildung 17 unten) analysiert. Der mit Cytochrom C-Antikörper entwickelte Blot zeigte im Ausgangsmaterial und in den Überständen aller IPs eine deutliche Bande bei ca. 53 kDa, die der Bande für oligomeres Cytochrom C entsprach. Während diese Bande auch im Pellet der Cytochrom C-IP zu finden war und die Fällung von Cytochrom C belegte, konnte im Pellet der PON2-IP keine Cytochrom C-Bande gefunden werden. Bei der PON2-Fällung wurde Cytochrom C demnach nicht ko-präzipitiert. Dies traf sowohl für unbehandelte als auch für Antimycin behandelte Zellen zu.

Anschließend wurde dieselbe Western-Blot Membran mit einem Antikörper gegen PON2 entwickelt (Abbildung 17 unten). Im Ausgangslysate, im Pellet der PON2-IPs und im

Überstand der Cytochrom C-IP war die charakteristische PON2-Doppelbande bei ca. 42 kDa deutlich sichtbar. Im Überstand der PON2-IP war nur noch eine schwache PON2-Bande erkennbar, was zeigte, dass PON2 in der PON2-IP fast vollständig gefällt wurde. Auch im Pellet der Cytochrom C-IP wurde eine schwache Bande bei ca. 42 kDa detektiert, welche aber bereits bei der Entwicklung des Blots mit Cytochrom C-Antikörper zu sehen war und es sich deshalb vermutlich um eine unspezifische Bande handelte. Es war wiederum kein Unterschied zwischen den CoIPs der unbehandelten oder behandelten Zellen erkennbar.

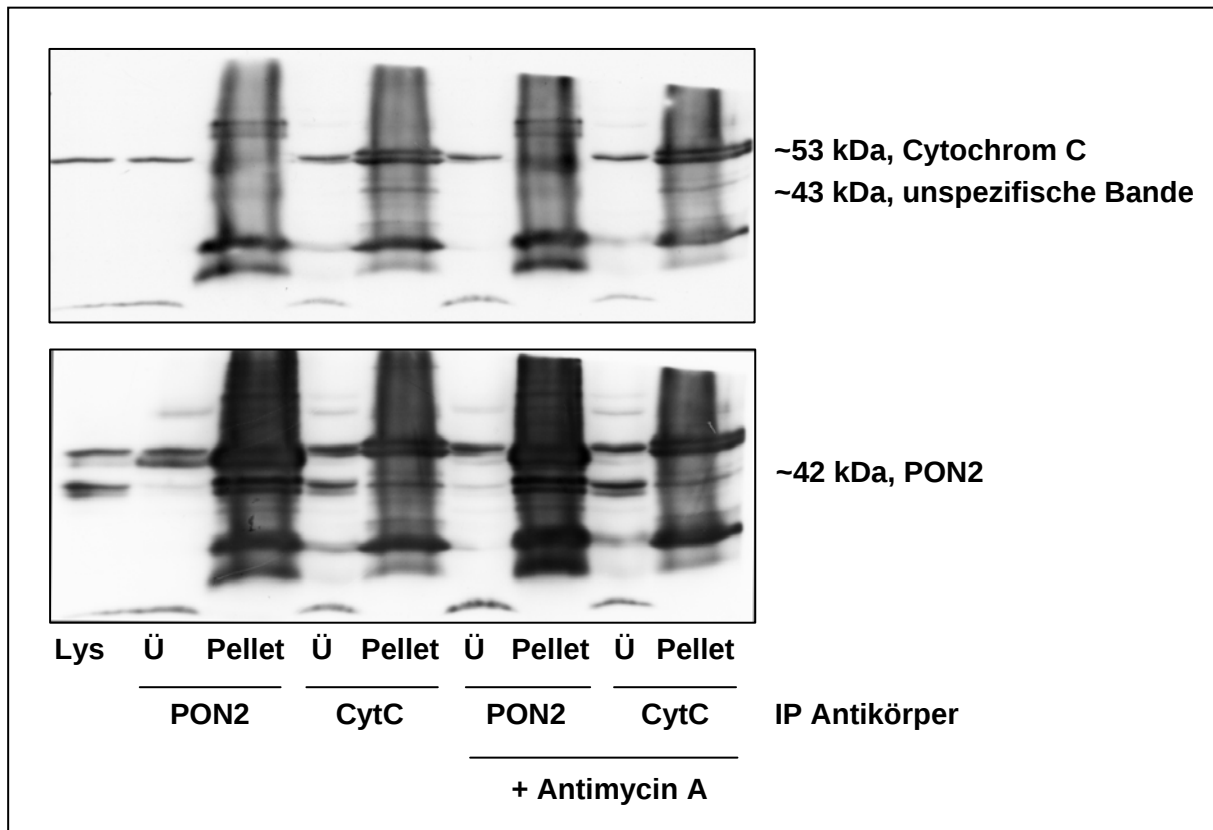


Abbildung 17: Koimmunopräzipitationen zeigen keine Interaktion von PON2 und Cytochrom C. Naive EA.hy-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 2 h mit Antimycin A (15 μ M) behandelt und mit Lysispuffer 3 lysiert. 500 μ g Protein aus dem Überstand der Lysate wurden mit Antikörpern gegen humanes PON2 oder Cytochrom C und Agarose-G über Nacht präzipitiert, am nächsten Tag pelletiert und anschließend das Ausgangslysat (Lys), der Überstand der Pellets (Ü) und das Pellet selbst auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern gegen humanes PON2 und Cytochrom C entwickelt. Repräsentative Darstellung eines von drei unabhängigen Experimenten.

Obwohl PON2 nicht die Cytochrom C Expression änderte und auch nicht mit diesem Protein interagierte, sollte letztlich untersucht werden, ob das Fehlen von Cytochrom C die Schutzfunktion von PON2 aufheben könnte. Dazu wurde die Expression von Cytochrom C durch RNA-Interferenz herunterreguliert. Mit Kontroll-siRNA oder Cytochrom C-siRNA behandelte naive und PON2-überexprimierende EA.hy-Zellen wurden dann mit Mito-HE beladen und die Superoxidbildung mit Antimycin stimuliert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen im FACS-Zytometer detektiert (Abbildung 18). In Antimycin

behandelten naiven EA.hy-Zellen wurde nach Cytochrom C-Herunterregulation eine 0,3-fach höhere Superoxidbildung beobachtet als in Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Dieser Effekt konnte in PON2-HA überexprimierenden Zellen nicht festgestellt werden, die Superoxidproduktion wurde dort durch die siRNA-Behandlungen nicht beeinflusst.

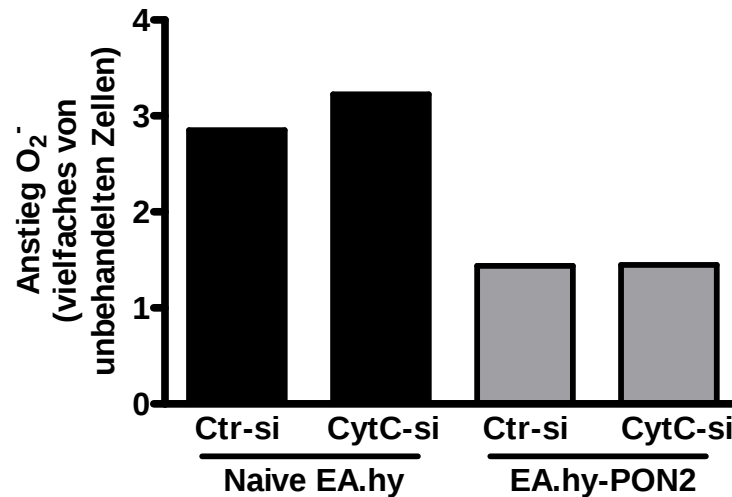


Abbildung 18: Herunterregulation von Cytochrom C durch siRNA beeinflusst nicht die anti-oxidative Aktivität von PON2. Naive und PON2-HA überexprimierende EA.hy-Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion von siRNA gegen Cytochrom C (CytC-si) oder einer Kontroll-siRNA (Ctr-si) mit Mito-HE (1 μ M) beladen, gewaschen und 2 h mit Antimycin A (15 μ M) oder einer Lösungsmittelkontrolle stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im FACS Aria-Zytometer mit den Anregungs- / Emissionswellenlängen 405 / 580 nm für das Superoxidspezifische 2-HE sortiert. Das Diagramm zeigt 2-HE positive Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen.

Somit legen drei unabhängige experimentelle Ansätze nahe, dass die anti-oxidative Wirkung von PON2 nicht über eine Modifikation von Cytochrom C erfolgt. Da PON2 jedoch Superoxid vermindern konnte, welches durch die Hemmung von Komplex III mit Antimycin produziert wurde, sollte überprüft werden, ob PON2 an Komplex III assoziiert vorliegt. Dazu wurden, wie schon in Abbildung 17, Antimycin behandelte und unbehandelte Lysate aus naiven EA.hy-Zellen lysiert und in einer Koimmunopräzipitation mit Antikörpern gegen den humanen Komplex III gefällt. Nach Analyse der CoIP im Western Blot mit dem Antikörper gegen Komplex III, zeigte sich eine deutliche Bande im Ausgangsmaterial, die im Überstand der IP nur sehr schwach zu erkennen, im Pellet aber sehr deutlich wurde (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu, konnten die PON2-Banden im Überstand der IP genauso deutlich erkannt werden wie im Ausgangsmaterial, im Pellet hingegen waren sie nicht zu detektieren. PON2 scheint nicht mit Komplex III zu assoziieren. Auch eine Inhibition von Komplex III durch Antimycin beeinflusste dieses Ergebnis nicht.

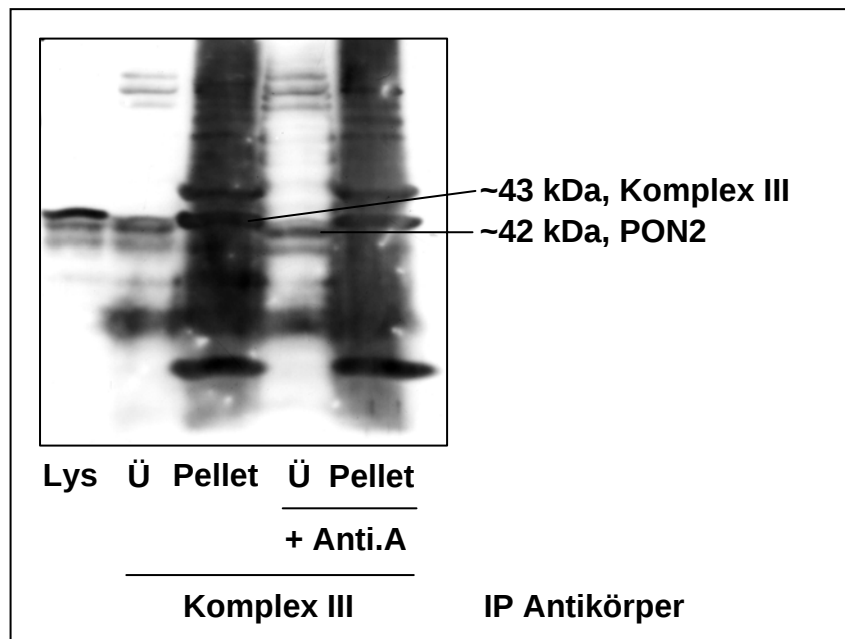


Abbildung 19: Koimmunopräzipitationen zeigen keine Interaktion von PON2 mit Komplex III. Ähnliches Experiment wie Abbildung 17 jedoch mit einem Antikörper gegen den humanen Komplex III. Ausgangslysat (Lys), Überstand der IP (Ü) und das IP-Pellet wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und nacheinander mit Antikörpern gegen humanes PON2 und Komplex III entwickelt. Darstellung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

5.1.6 Die PON2 Überexpression vermindert die mitochondriale Superoxidbildung an Komplex-I und Komplex-III der Atmungskette

PON2 überexprimierende EA.hy-Zellen zeigten weniger Antimycin-induzierte Superoxidinduktion als naive Zellen (siehe Abbildung 15). Die Antimycin bedingte Hemmung von Komplex III in der mitochondrialen Atmungskette führt zur Superoxidfreisetzung an beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran. Um die Rolle von PON2 in der Verminderung des mitochondrialen Superoxids weiter zu differenzieren, wurde der Komplex I-Inhibitor Rotenon eingesetzt, durch den Superoxid ausschließlich in die mitochondriale Matrix freigesetzt wird. Dazu wurden naive und PON2-HA überexprimierende EA.hy-Zellen mit Mito-HE beladen und mit Antimycin, Rotenon oder einer Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die entstandene Superoxidmenge wurde anhand der 2-HE positiven Zellen im FACS Aria ermittelt (Abbildung 20). In naiven EA.hy-Zellen konnte durch Rotenonbehandlung eine 1,7-fach, durch Antimycin A eine 3,5-fach höhere Signalintensität der naiven EA.hy-Zellen detektiert werden. In PON2 überexprimierenden Zellen hingegen wurde nach Rotenon- und Antimycin-Behandlung nur ein geringfügiger Anstieg der 2-HE-Signalintensität beobachtet. In PON2-HA überexprimierenden EA.hy-Zellen wurde nach Rotenon- und nach Antimycin-Behandlung also signifikant weniger Superoxid detektiert.

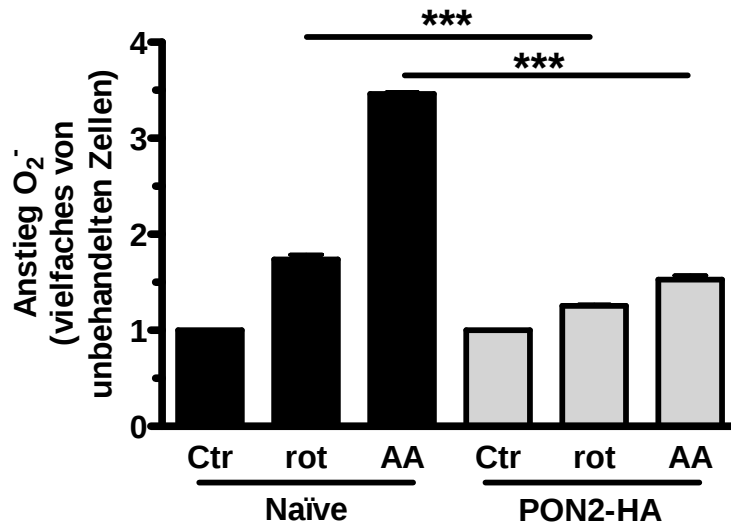


Abbildung 20: PON2 Überexpression vermindert die mitochondriale Superoxidbildung an Komplex-I und Komplex-III der Atmungskette. Naive oder PON2-HA überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden mit Mito-HE (2 μ M, 30 min) beladen, überschüssiges Mito-HE im Überstand entfernt und mit Antimycin A (15 μ M, 2 h), Rotenon (20 μ M, 2 h) oder Ethanol in äquivalenten Volumina als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurde der Gehalt der Zellen an Superoxid-spezifischem 2-Hydroxyethidium im FACS Aria mit den Anregungs- / Emissionswellenlängen von 405 / 580 nm bestimmt. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen repräsentativen Experimenten (MW $\pm$ SEM). Die Säulen drücken das Vielfache der Signalintensität Mito-HE-positiver Zellen aus, jeweils bezogen auf die Intensität unbehandelter Zellen (***: $p < 0,001$; 1-way-ANOVA).

Für detailliertere Analysen der Rolle von PON2 in den Mitochondrien war es erforderlich Mitochondrien direkt zu untersuchen. Dazu wurden naive und PON2-überexprimierende EA.hy-Zellen in drei Fraktionen aufgeteilt - eine Zellkernfraktion, eine Mitochondrienfraktion und eine Fraktion, in der Mikrosomen und zytosolische Proteine enthalten waren. Zur Kontrolle wurden die Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine Membran geblottet, um die in den Fraktionen enthaltenen Proteine mit verschiedenen Antikörpern zu detektieren (Abbildung 21). Der in den Mitochondrien lokalisierte Komplex III wurde in der Kernfraktion und in stärkerem Maße in der Mitochondrienfraktion detektiert, und diente maßgeblich als Erfolgskontrolle der Mitochondrienanreicherung. Die Komplex III-Bande in der Kernfraktion wurde durch Zellen bedingt, die während der Fraktionierung nicht aufgeschlossen wurden. In der zytosolischen Fraktion wurde Komplex III nicht detektiert. Bei Cytochrom C handelt es sich ebenfalls um ein Mitochondrienprotein, welches allerdings von beschädigten Mitochondrien ins Zytosol entlassen wird. Cytochrom C wurde in geringen Mengen in der Kernfraktion gefunden, hauptsächlich in den Mitochondrien und in sehr geringen Mengen in der zytosolischen Fraktion, wodurch gezeigt wurde, dass die isolierten Mitochondrien weitestgehend intakt waren. Endogenes PON2 wurde hauptsächlich in der Mitochondrienfraktion und zum Teil auch in der zytosolischen Fraktion gefunden, da in dieser noch das ER enthalten war. In den Fraktionen der PON2-HA überexprimierenden

Zellen waren die PON2-Banden deutlich stärker ausgeprägt als in den Fraktionen der naiven EA.hy-Zellen. Dem entsprechend konnten auch nur in den PON2-HA überexprimierenden Zellen Banden mit dem Antikörper gegen HA detektiert werden. Diese unterschieden sich im Expressionsverhältnis der Fraktionen untereinander nicht von der Expression der PON2-Banden. Das zytosolische Protein Tubulin wurde in geringem Maße in allen Fraktionen gefunden, wobei die stärkste Bande erwartungsgemäß in der Zytosolfraktion detektiert wurde. Lamin ist ein Kernprotein, welches auch in der Kernfraktion in der größten Menge vorkam. In der Mitochondrienfraktion wurde noch eine schwächere Lamin-Bande angezeigt, in der Zytosolfraktion kam es nicht mehr vor. Trotz kleiner Verunreinigungen anderer Fraktionen, bestand die Mitochondrien-Fraktion vorwiegend aus intakten Mitochondrien.

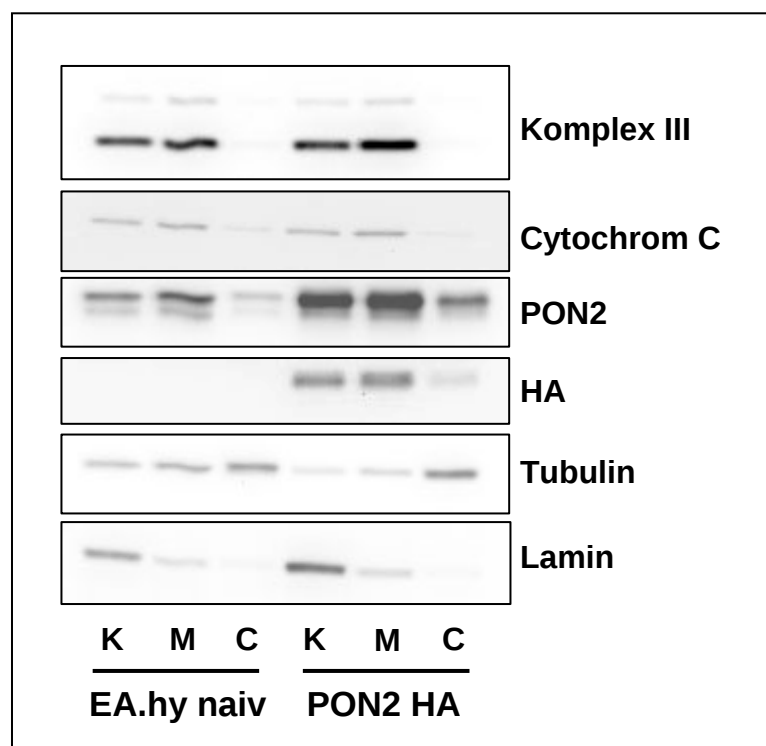


Abbildung 21: Kontrolle der Mitochondrien-Fraktionierung im Western Blot. Kern- (K), Mitochondrienfraktion (M) und Überstand der Mitochondrienfraktion mit Zytosol und Mikrosomen (C) aus naiven und PON2-HA überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit Antikörpern gegen Komplex III, Cytochrom C, PON2, HA, α -Tubulin und Lamin detektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Zunächst sollte überprüft werden, ob PON2 in angereicherten Mitochondrien aus naiven und PON2-HA überexprimierenden EA.hy-Zellen weiterhin Antimycin-induziertes Superoxid vermindern kann. Dazu wurden die Mitochondrien mit Mito-HE beladen, die Superoxidbildung mit Antimycin induziert und als Fluoreszenzänderung über die Zeit am Fluometer verfolgt (Abbildung 22). Die Fluoreszenz-Kurve der Mitochondrien aus naiven Zellen zeigte zu Beginn der Messung einen plötzlichen Anstieg, der sich zu einem

kontinuierlichem leichten Anstieg über die gesamte Messzeit entwickelte. Im Gegensatz dazu zeigte die Kurve der Mitochondrien aus PON2-überexprimierenden Zellen keine Steigung, bewegte sich somit gemittelt auf der Nulllinie und lag in der Stärke des Fluoreszenz-Signals damit auch signifikant unter den Werten der naiven Mitochondrien. Der Antimycin vermittelte Fluoreszenzanstieg lässt auf eine intakte Atmungskette und somit auf intakte Mitochondrien schließen. PON2 konnte seinen Schutz gegen Antimycin-induziertes Superoxid auch in isolierten Mitochondrien vermitteln.

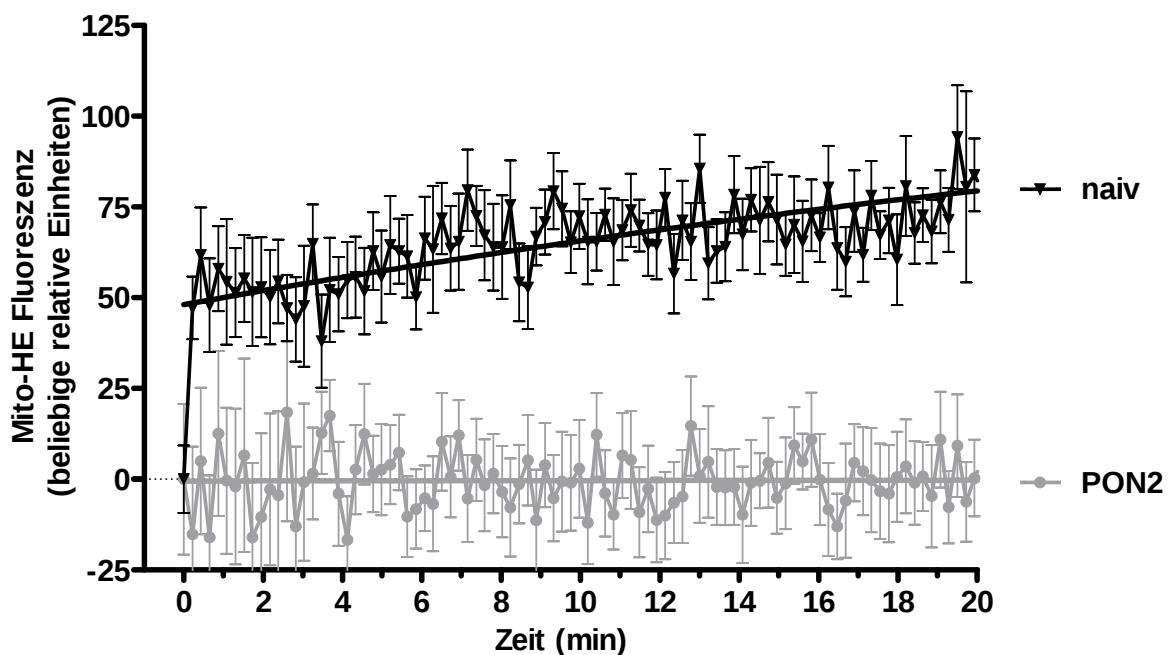


Abbildung 22: Antimycin-stimulierte Mitochondrien aus PON2-überexprimierenden EA.hy-Zellen produzieren weniger Superoxid als jene aus naiven Zellen. Mitochondrien angereicherte Fraktionen aus naiven und PON2-HA überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden mit Mito-HE (1 μ M) beladen, mit Antimycin (15 μ M) oder Ethanol als Lösungsmittelkontrolle stimuliert und die Änderung der Fluoreszenz mit für 2-HE spezifischen Wellenlängen von Ex/Em 405/580 nm über 20 min verfolgt. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten mit Dreifach-Werten (MW $\pm$ SEM). Es wurden jeweils die Fluoreszenzwerte der unbehandelten Mitochondrien subtrahiert und die Startpunkte der Kurven durch Subtraktion des Startwertes angeglichen. Dabei weicht die durch lineare Regression berechnete Steigung der naiven Zellen signifikant ($p < 0,0001$) von null ab, während sich die Steigung bei PON2-überexprimierenden Mitochondrien nicht von null unterscheidet ($p = 0,9442$).

PON2 schützt gegen die O_2^- Bildung in Mitochondrien, nicht aber gegen jene von Xanthin / Xanthinoxidase; daher wurde postuliert, dass PON2 zwar die Bildung von O_2^- vermindert, das einmal entstandene Radikal jedoch nicht abbauen kann. Dies wäre ein wichtiger funktioneller Unterschied z.B. zu SODs oder Vitaminen. Da es sich bei PON2 um ein membrangebundenes Protein handelt und es Superoxid vermindern konnte, welches auf der Matrixseite der Mitochondrien entsteht, war es wahrscheinlich, dass es an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert vorliegt. Um PON2 in seiner zellulären Umgebung zu

analysieren, aber trotzdem möglichst isoliert zu betrachten, wurden submitochondriale Fraktionen erstellt. Dazu wurden die Mitochondrien mit Ultraschall aufgeschlossen und die Matrix von der Membranfraktion durch Zentrifugation getrennt. Intakte Mitochondrien, Mitochondrienmembranfraktionen und Matrixfraktionen von naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy-Zellen wurden mit MCLA und Xanthinoxidase beladen und die Chemilumineszenz vor und nach der Zugabe von Xanthin direkt vermessen (Abbildung 23). Die Mitochondrienmembranen, in denen PON2 und die Atmungskette lokalisiert sind, zeigten eine um das doppelte erhöhte Superoxidinduktion im Vergleich zu intakten Mitochondrien. Die Superoxidinduktion in den Matrixfraktionen der Mitochondrien beider Zelltypen war dagegen die Hälfte reduziert, was durch die dort enthaltene SOD2 zu erklären ist. Da zwischen den Membran- und Matrixfraktionen von naiven und PON2-überexprimierenden Mitochondrien kein Unterschied in der Superoxidmenge zu beobachten war, deutete dies darauf hin, dass PON2 das extern entstandene Superoxid nicht abbauen konnte.

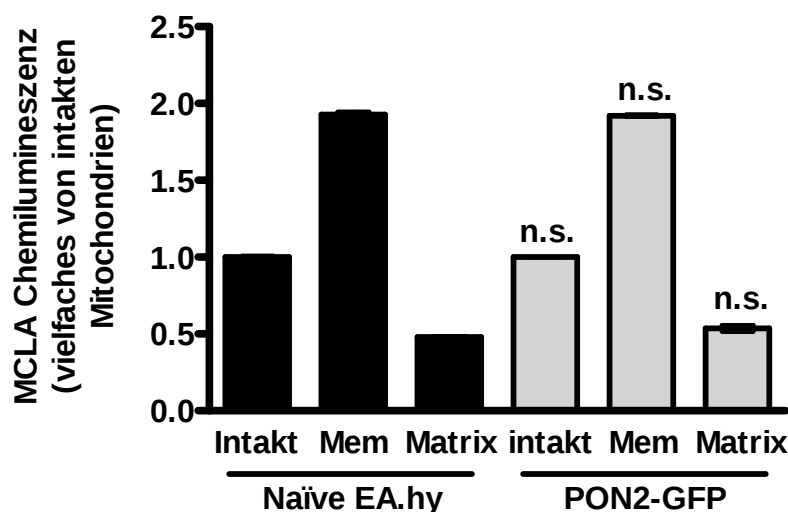


Abbildung 23: Intakte Mitochondrien und Mitochondrienfraktionen von PON2-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen können extern zugeführtes Superoxid nicht vermindern. Intakte Mitochondrien, mitochondriale Membran- und Matrixfraktionen (je 25 µg) wurden mit MCLA und Xanthinoxidase (5 mU) beladen und die Superoxidbildung mit Xanthin (200 µM) induziert. Für die Grafik wurden jeweils die Chemilumineszenz vor der Xanthin-Zugabe als Basislinie subtrahiert und die resultierenden Werte für jeden Zelltyp auf die Chemilumineszenz der intakten Mitochondrien bezogen. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives von vier unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten (MW +/- SEM) (n.s.: $p < 0,05$ je vs. Naive EA.hy; 1-way ANOVA).

Dementsprechend sollte PON2 die Superoxidproduktion selbst in der Atmungskette verhindern oder vermindern können. Um dies zu untersuchen wurden Mitochondrienmembranfraktionen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy-Zellen mit verschiedenen Stimulanzen der Atmungskette behandelt. Succinat wird von Komplex II der Atmungskette oxidiert, überträgt seine Elektronen auf Coenzym Q₁₀, welches

die Elektronen durch die Membran transportiert und wiederum dazu führt, dass durch reversen Elektronen Transfer (RET) an Komplex I molekularer Sauerstoff zu Superoxid reduziert wird. Die Mitochondrienmembranfraktionen beider Zellen wurden mit MCLA beladen, mit Succinat stimuliert und die Entwicklung der Chemilumineszenz am Luminometer verfolgt (Abbildung 24). Der Superoxid-Anstieg in Membranen PON2-überexprimierender Mitochondrien war allerdings nur halb so groß wie der Anstieg in naiven Mitochondrien. PON2 beeinflusst vermutlich also Komplex I, Komplex II oder den Elektronentransport in den Mitochondrien bzw. an der Grenze der Membran zur Matrix.

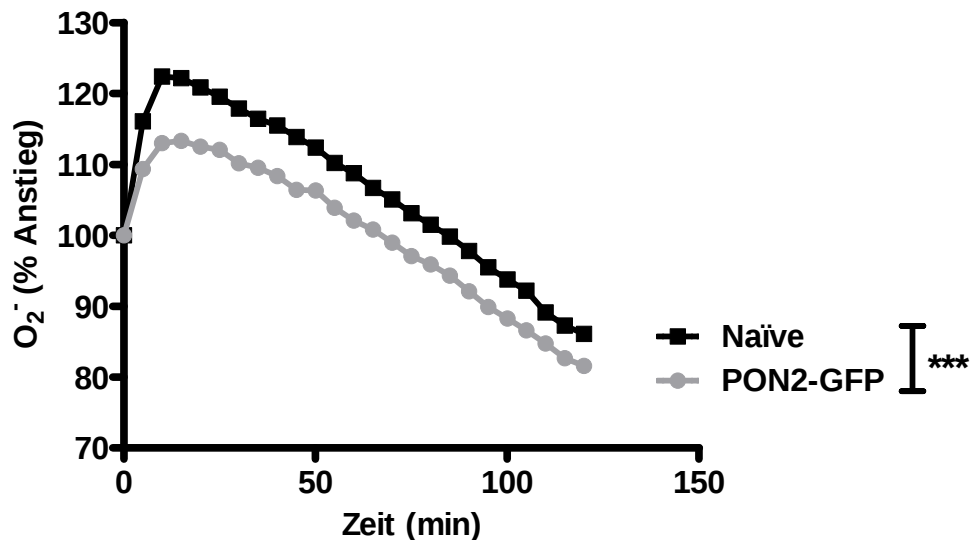


Abbildung 24: Mitochondrienmembran-Fractionen von PON2-überexprimierenden EA.hy 926 Zellen vermindern die Superoxidproduktion durch Reversen Elektronen Transfer. Mitochondrienmembran-Fractionen (20 µg) von naiven und PON2-GFP-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen wurden mit MCLA beladen, mit Succinat (5 mM) stimuliert und der Anstieg der Chemilumineszenz über 2 h im Luminometer vermessen. Die Grafik zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten (MW +/- SEM) und drückt den Anstieg der Superoxidproduktion nach Succinat-Zugabe aus (***: $p < 0,001$; 2-way-ANOVA).

Somit konnte gezeigt werden, dass PON2 die Superoxid-Produktion durch Rotenon in Komplex I, durch Antimycin in Komplex III und durch Succinat über Komplex II, Coenzym Q_{10} (CoQ) und Komplex I reduzieren kann. PON2's Fähigkeit die Superoxidbildung zu vermindern kann somit offensichtlich keinem bestimmten Enzym zugeordnet werden, so dass eine Modifikation des gemeinsamen Faktors Coenzym Q_{10} angenommen wird, welches als Elektronentransporter zwischen Komplex I und III in der Membran fungiert. Wenn die antioxidative Wirkung von PON2 auf einer Wechselwirkung mit CoQ in der inneren Mitochondrienmembran beruht, dürfte es die Superoxidbildung durch jene Stimuli nicht beeinflussen, welche außerhalb der Mitochondrienmembran wirken. Aus diesem Grund wurden Mitochondrienmembranfraktionen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden

EA.hy-Zellen mit MCLA beladen und mit α -Ketoglutarat behandelt. Eine α -Ketoglutarat-Behandlung stimuliert die Superoxid-Bildung durch α -Ketoglutaratdehydrogenase, welche von CoQ unabhängig an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran abläuft. Die Superoxidbildung wurde zeitabhängig am Luminometer verfolgt. Die Superoxidproduktion in Membranen PON2-überexprimierender Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Superoxidspiegeln, die von den naiven Membranen produziert wurden. Zusammenfassend zeigt der Kurvenverlauf, dass PON2 nicht gegen α -Ketoglutarat-induziertes Superoxid schützte.

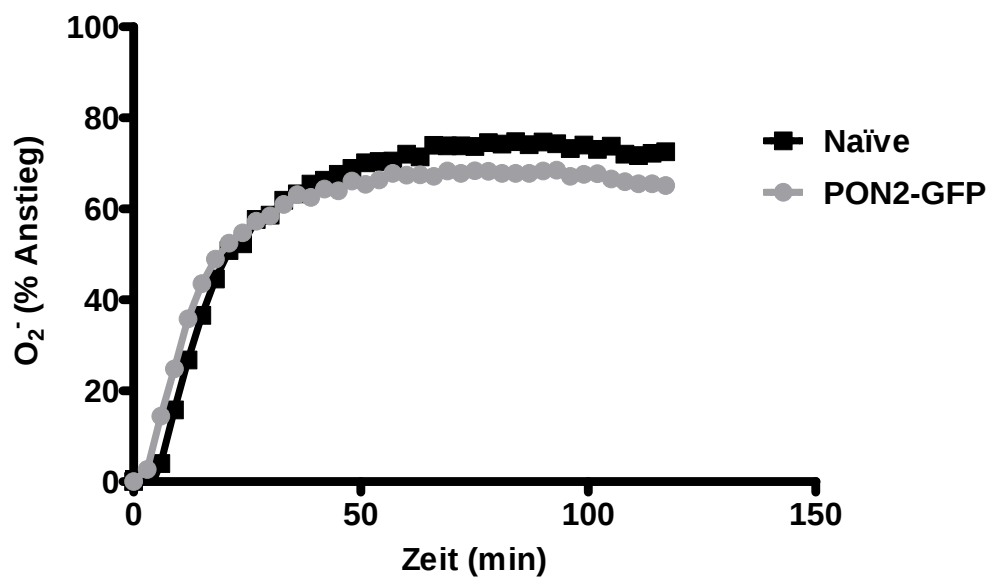


Abbildung 25: Mitochondrienmembranen von naiven und PON2-überexprimierenden EA.hy 926-Zellen zeigen keine Unterschiede in der α -Ketoglutarat-induzierten Superoxid-Produktion. Ähnliches Experiment wie Abbildung 24, jedoch wurden die Mitochondrienmembranfraktionen mit α -Ketoglutarat (5 mM) stimuliert. Grafik repräsentiert zwei unabhängige Experimente in Doppelwerten (MW $\pm$ SEM) und zeigt den prozentualen Anstieg der Chemilumineszenz nach α -Ketoglutarat-Zugabe nach Subtraktion der Kontrollwerte aus unbehandelten Mitochondrienmembranfraktionen.

Somit wurde gezeigt, dass PON2 der Superoxidbildung innerhalb der Atmungskette entgegenwirken und diese verhindern kann. Ein O_2^- -Radikal jedoch, welches nicht durch einen CoQ-abhängigen Prozess generiert wurde (wie oben durch X/XO oder α -KG gezeigt), kann nicht durch PON2 vermindert werden. Der wahrscheinlichste Mechanismus der Superoxidverminderung durch PON2 scheint deshalb eine Wechselwirkung mit CoQ oder eine indirekte Beeinflussung des Q-Pools zu sein.

5.1.7 Der Einfluss von PON2 auf die Superoxidproduktion im ER

Neben den Mitochondrien lokalisiert PON2 auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums⁵³ und auch dort konnte CoQ gefunden werden¹²³ und könnte den anti-oxidativen

Mechanismus von PON2 vermitteln. Oxidativer Stress entsteht im ER hauptsächlich durch Proteinfehlfaltungen und ER-assoziierte NOX4. Im ER ist bisher kein anti-oxidativer Prozess unter direkter Beteiligung von CoQ bekannt, deshalb kann die Superoxidentstehung auch nicht in ähnlichem Maße detailliert aufgeklärt werden wie in den Mitochondrien. Aus diesem Grund wurde untersucht ob PON2 in Mikrosomen durch X/XO generiertes Superoxid direkt abbauen kann. Dazu wurden Mikrosomen aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy-Zellen fraktioniert und in einem Teil der Fraktion die Mikrosomen durch Ultraschall aufgeschlossen. In diesen Fraktionen wurde die MCLA-Chemilumineszenz nach Induktion der Superoxidproduktion mit Xanthin / Xanthinoxidase im Luminometer vermessen (Abbildung 26). Dabei zeigte sich, dass PON2 weder in intakten noch in lysierten Mikrosomen den Superoxidgehalt senken konnte und bestätigt somit die Ergebnisse aus isolierten Mitochondrien. Folglich kann eine anti-oxidative Funktion von PON2 im ER hier nicht gezeigt werden, jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass PON2 im ER ebenso wie in den Mitochondrien lediglich die Entstehung von O_2^- verringern, nicht aber bereits gebildetes O_2^- abbauen kann.

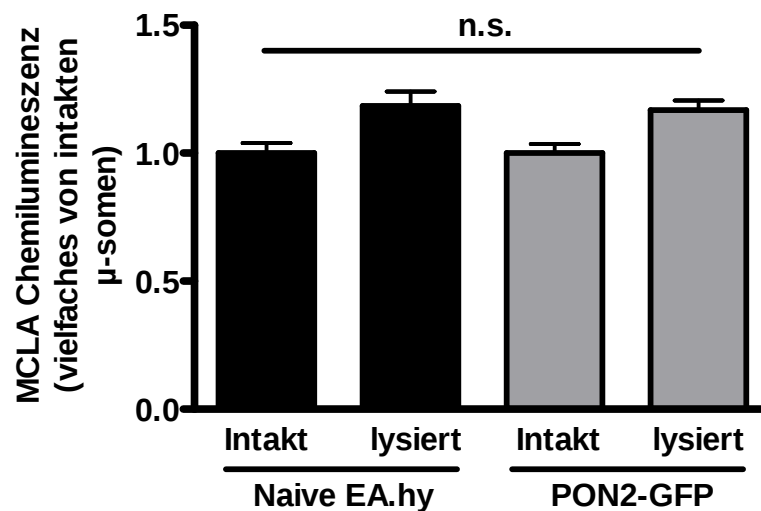


Abbildung 26: PON2 kann extern generiertes Superoxid in Mikrosomen nicht vermindern. Ähnliches Experiment wie Abbildung 23 jedoch mit Mikrosomen-Fractionen (μ -somen) aus naiven und PON2-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen. Die Säulen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten (MW $\pm$ SEM) nach Subtraktion der Chemilumineszenzwerte vor der Xanthinzugabe, bezogen auf die Werte aus intakten Mikrosomen (n.s.: $p > 0,05$ im Vergleich aller Säulen miteinander).

5.1.8 Punktmutationen von PON2

Die bisher am besten charakterisierte enzymatische Aktivität von PON2 ist eine Laktonase-Aktivität. Da die Laktonase-Aktivität von PON1 für dessen anti-atherogene Aktivität und die

verminderte Oxidation von LDL durch PON1 essentiell ist ⁴¹, konnte vermutet werden, dass diese bei PON2 ebenfalls für die anti-oxidative Aktivität verantwortlich ist. Durch die hohe Homologie auf dem Aminosäurelevel kann für PON2 eine ähnliche Struktur angenommen werden wie die von Harel *et al.* gefundene Struktur von PON1 ⁴⁹. Da PON2 keine redox-aktiven Metallionen enthält, sondern lediglich zwei Kalzium-Ionen im aktiven Zentrum bindet, erschien eine anti-oxidative Aktivität dieses aktiven Zentrums eher unwahrscheinlich. Durch die bisher in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass PON2 Superoxid nicht abbauen, sondern dessen Bildung in der inneren Mitochondrienmembran möglicherweise durch eine Wechselwirkung mit Coenzym Q₁₀ vermindert, erscheint eine Beteiligung des Mechanismus für die Laktonase-Aktivität an der anti-oxidativen Aktivität durchaus möglich. Khersonsky *et al.* ⁵⁰ konnten in einer Studie zu PON1, durch strukturelle und funktionelle Analysen den Mechanismus der Laktonase-Aktivität und die dafür verantwortlichen Aminosäurereste identifizieren. Angelehnt an diese Studie wurden deshalb die entsprechenden Aminosäuren aus dem putativen aktiven Zentrum oder anderen entscheidenden Positionen von PON2 identifiziert und durch nicht funktionelle Aminosäuren ersetzt. Plasmide, die das entsprechend mutierte PON2 als GFP-Fusionsprotein überexprimierten wurden stabil oder transient in EA.hy 926-Zellen transfiziert. Tabelle 7 gibt einen Überblick über alle eingeführten Mutationen von PON2.

Mutation	Abk.	Begründung	Expression
Histidin-114-Glutamin	H ¹¹⁴ Q	Kritische Histidin-Dyade für Laktonase / Esterase Aktivität von PON1	stabil
Histidin-133-Glutamin	H ¹³³ Q		stabil
Asparaginsäure-268-Alanin	D ²⁶⁸ A	Chelatierender Ligand für katalytisch aktives Kalzium-Ion in PON1	stabil
Asparagin-254-Alanin	N ²⁵⁴ A	putative Glykosylierungsstellen von PON2	transient
Asparagin-269-Alanin	N ²⁶⁹ A		transient
Asparagin-323-Alanin	N ³²³ A		transient
Asparagin-254+323-Alanin	N ²⁵⁴⁺³²³ A		transient
Cystein-283-Alanin/ Valin	C ²⁸³ A, C ²⁸³ V	Mögliche Beteiligung an anti- arteriosklerotischer Wirkung in PON1 ⁴¹	transient
Serin-311-Cystein	S ³¹¹ C	Natürlicher Polymorphismus	stabil

Tabelle 7: Aminosäure-Austausch-Mutationen von PON2

5.1.9 Identifizierung der Glykosylierungsstellen von PON2

PON2 liegt in Säugerzellen glykosyliert vor ⁵³. Da Glykosylierungen häufig Einfluss auf die Aktivität oder Lokalisierung eines Proteins haben, wurden zunächst mögliche Glykosylierungsstellen in PON2 identifiziert und durch nicht glykosylierbare Aminosäurereste ersetzt. Die entsprechenden Expressionsplasmide, welche für das Wildtyp- bzw. ein mutiertes PON2-EGFP-Fusionsprotein kodieren, wurden transient in EA.hy 926-Zellen transfiziert, lysiert und PON2 per Western Blot detektiert (Abbildung 27). Ein Teil der Proben wurde vor dem Auftragen auf das Gel enzymatisch deglykosyliert. Es zeigte sich, dass die Banden der PON2-Proteine in denen Asn²⁵⁴ und Asn³²³ ersetzt worden waren eine geringere Masse aufwiesen als die Bande des PON2-Wildtyp-Proteins. In beiden Fällen führte jedoch eine enzymatische Deglykosylierung zu einer weiteren Abnahme des Molekulargewichts der Proteine. Die Mutation einer Glykosylierungsstelle führte noch nicht zu einem vollständig unglykosyliertem PON2. Erst eine Doppelmutante in der sowohl Asn²⁵⁴ als auch Asn³²³ mutiert wurden, zeigte eine Bande, die auf gleicher Höhe wie die Bande des enzymatisch deglykosylierten Proteins zu finden war. Die Banden der PON2-Asn²⁶⁹-Mutante verhielten sich wie die Banden des PON2-WT-Proteins. Daraus kann geschlossen werden, dass PON2 an den Asparagin-Resten 254 und 323 glykosyliert wird.

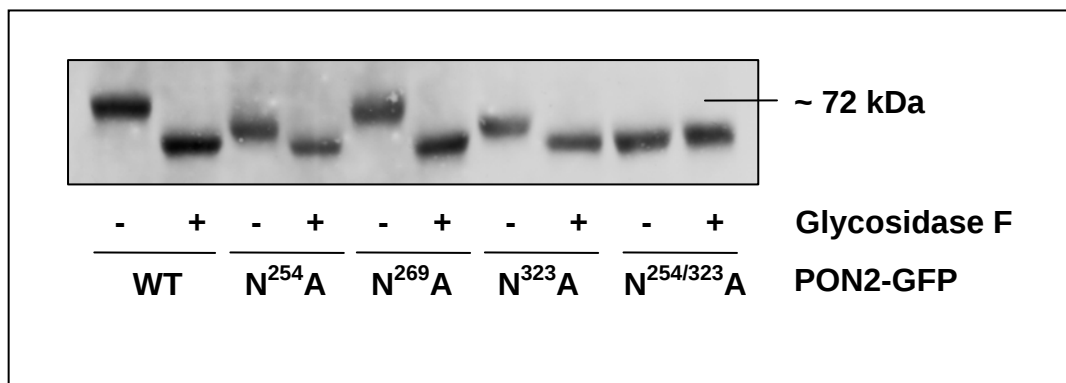


Abbildung 27: Die Asparaginreste Asn²⁵⁴ und Asn³²³ sind die Glykosylierungsstellen von PON2. Nach transienter Transfektion der angezeigten Varianten des pEGFP-iso1-PON2 Plasmids in EA.hy 926-Zellen wurden diese lysiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zuvor wurden zusätzlich 20 µg jeder Probe mit N-Glykosidase-F (2U) behandelt. Die Proteine wurden auf einem Western-Blot mit anti-PON2 Antikörper detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.10 Der Laktonase-Mechanismus und der Zusammenhang von enzymatischer und anti-oxidativer PON2 Aktivität

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, vermindert PON2 mit Superoxid einen Hauptinitiationsfaktor der Arterioskleroseentstehung, so dass die anti-arteriosklerotische Wirkung von PON2 auf seine Superoxid-vermindernde Wirkung zurückgeführt könnte. Mit

Cystein-283 wurde eine weitere Aminosäuremutation von PON2 eingeführt, da für dessen analoge Aminosäure in PON1 eine Beteiligung an der anti-arteriosklerotischen Aktivität von PON1 vermutet wurde⁴¹. Dementsprechend könnte Cys²⁸³ einen für die anti-oxidative Wirkung von PON2 verantwortlichen Aminosäurerest darstellen. Auch der Einfluss der bereits vorgestellten nicht glykosylierten Mutante PON2-N^{254/323}A auf die enzymatische Laktonase-Aktivität und anti-oxidative Aktivität sollte untersucht werden.

Die Plasmide in denen die möglicherweise für die Laktonase-Aktivität von PON2 verantwortlichen Aminosäuren (H¹¹⁴Q, H¹³³Q, D²⁶⁸A) oder eine Aminosäure entsprechend des natürlichen Polymorphismus (S³¹¹C) mutiert wurden, konnten stabil in EA.hy-Zellen transfiziert werden. Die Plasmide, die für PON2-GFP-N^{254/323}A und PON2-GFP-C²⁸³V kodierten wurden transient in EA.hy-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden jeweils Lysate aus den stabil transfizierten Zelllinien oder Lysate 24 h nach transienter Transfektion in Western-Blot Experimenten mit einem Antikörper gegen humanes PON2 analysiert (Abbildung 28 A). Die Expression der H¹¹⁴Q- und der S³¹¹C-Mutante von PON2 zeigte sich in der Stärke vergleichbar mit dem PON2-WT-Protein. Die H¹³³Q und die D²⁶⁸A-Mutante wurden deutlich schwächer als PON2-WT exprimiert. Bei den transient überexprimierten PON2-GFP-Fusionsproteinen wurden das PON2-GFP-N^{254/323}A- und PON2-GFP-Wildtyp-Protein vergleichbar stark exprimiert, das PON2-GFP-C²⁸³V-Protein dagegen wesentlich schwächer. Die densitometrische Auswertung der Expressionsstärke der einzelnen PON2-Mutanten, bezogen auf die Expression des PON2-GFP-Wildtyp-Proteins, bestätigte die Beobachtungen (Abbildung 28 B). Diese Unterschiede in der Expression wurden in allen nachfolgenden quantitativen Experimenten einbezogen, so dass Unterschiede in der Enzymaktivität nicht aus Differenzen im Proteingehalt entstehen.

Das PON2-Protein mit der Mutation der Asparaginsäure-268, deren Analogon in PON1 das katalytisch aktive Kalzium chelatiert, zeigte außerdem ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zum PON2-WT. Die Bande erschien ein wenig höher als die PON2-WT-Bande und wirkte voluminöser. Außerdem konnte eine nicht identifizierbare Bande knapp über den endogenen PON2-Banden detektiert werden, die in keiner der anderen PON2-Mutanten zu finden war und die bisher nicht erklärt werden konnte.

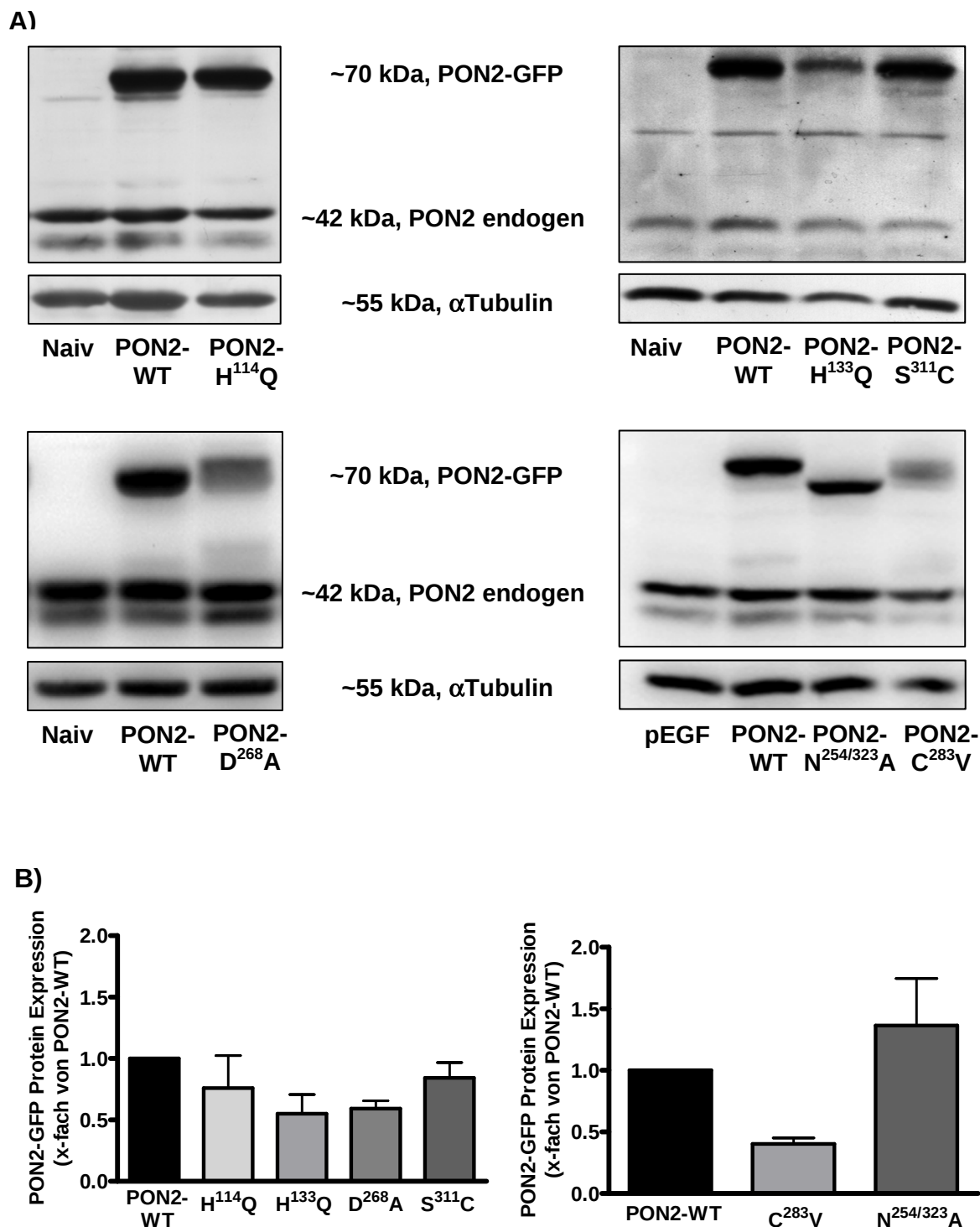


Abbildung 28: Kontrolle der Expression von PON2-WT- / H¹¹⁴Q- / H¹³³Q- / S³¹¹C- / D²⁶⁸A- / N^{254/323}A- / C²⁸³V-GFP-Fusionsproteinen im Western Blot. Lysate aus naiven, PON2-WT- / H¹¹⁴Q- / H¹³³Q- / S³¹¹C- / D²⁶⁸A-GFP überexprimierenden EA.hy 926-Zellen oder Lysate aus EA.hy 926-Zellen 24 h nach transienter Transfektion mit pEGFP-PON2-WT- / C²⁸³V- / N^{254/323}A-Plasmiden oder pEGFP-Plasmid zur Kontrolle wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern gegen humanes PON2 und α -Tubulin detektiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens vier unabhängigen Experimenten (A). Densitometrische Quantifizierung (B) der PON2-GFP-Fusionsprotein-Banden aus mindestens je vier unabhängigen Experimenten (MW $\pm$ SEM) bezogen auf die Expression des PON2-Wildtyps mittels QuantityOne-Software und Chemi-Doc (Biorad).

Um zu untersuchen, ob die Mutationen von PON2 die subzelluläre Lokalisierung des Proteins verändern, wurden die Zellen mit einem ER-spezifischen Farbstoff (Abbildung 29) oder einem Mitochondrien-Marker (Abbildung 30) gefärbt und die Lokalisierung der PON2-Mutanten als GFP-Fusionsproteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dabei zeigte sich, dass alle Mutationen enthaltenden PON2-GFP-Fusionsproteine im ER und in den Mitochondrien lokalisieren und sich somit nicht von der Lokalisation des PON2-Wildtyps unterscheiden.

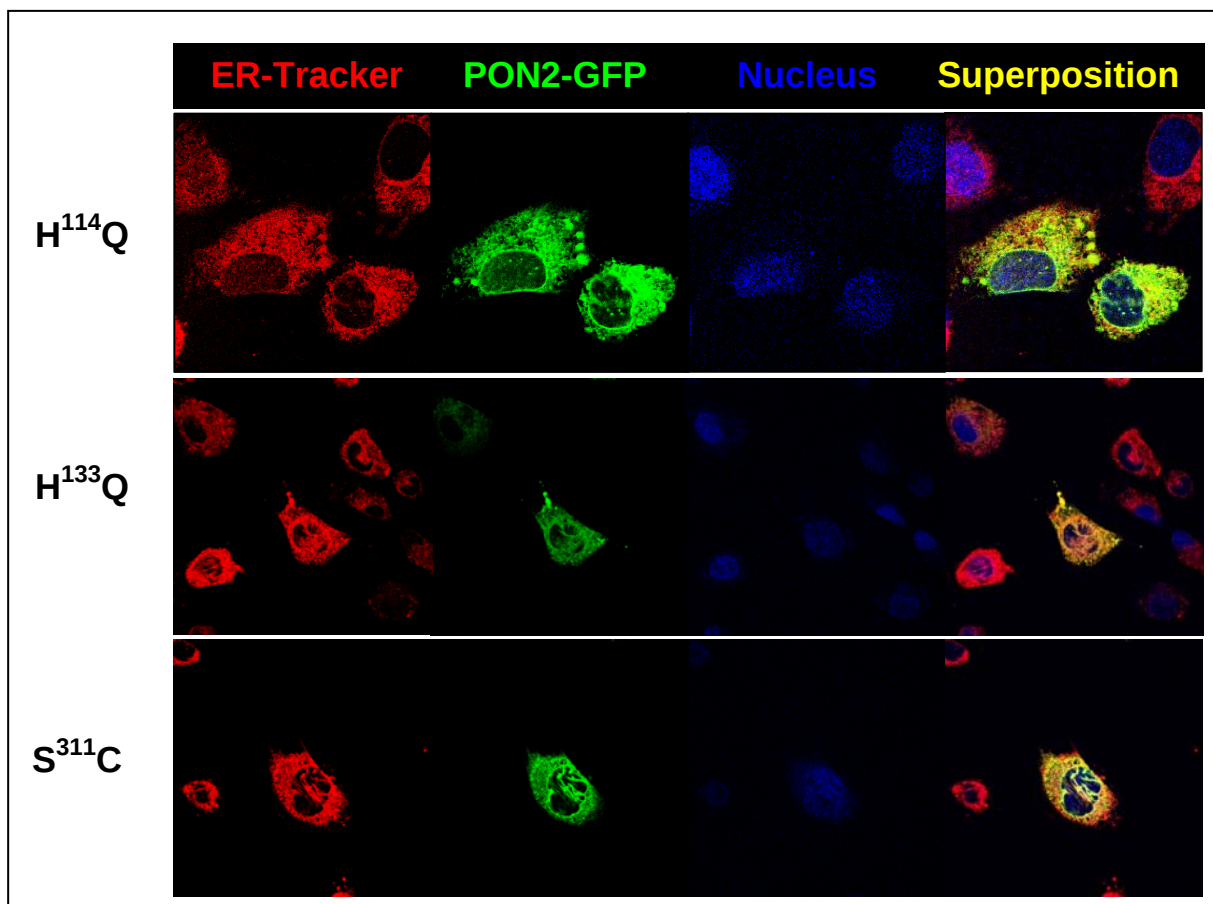


Abbildung 29: Lokalisierung der PON2-Mutanten im ER. PON2-H¹¹⁴Q / H¹³³Q / S³¹¹C – GFP stabil überexprimierende EA.hy-926-Zellen wurden in *Labtek-chamber*-Zellkulturplatten ausgesät, mit ER-Tracker-red (1:1000) und DAPI (1:1000) gefärbt und unter einem konfokalem Laserscan-Mikroskop betrachtet.

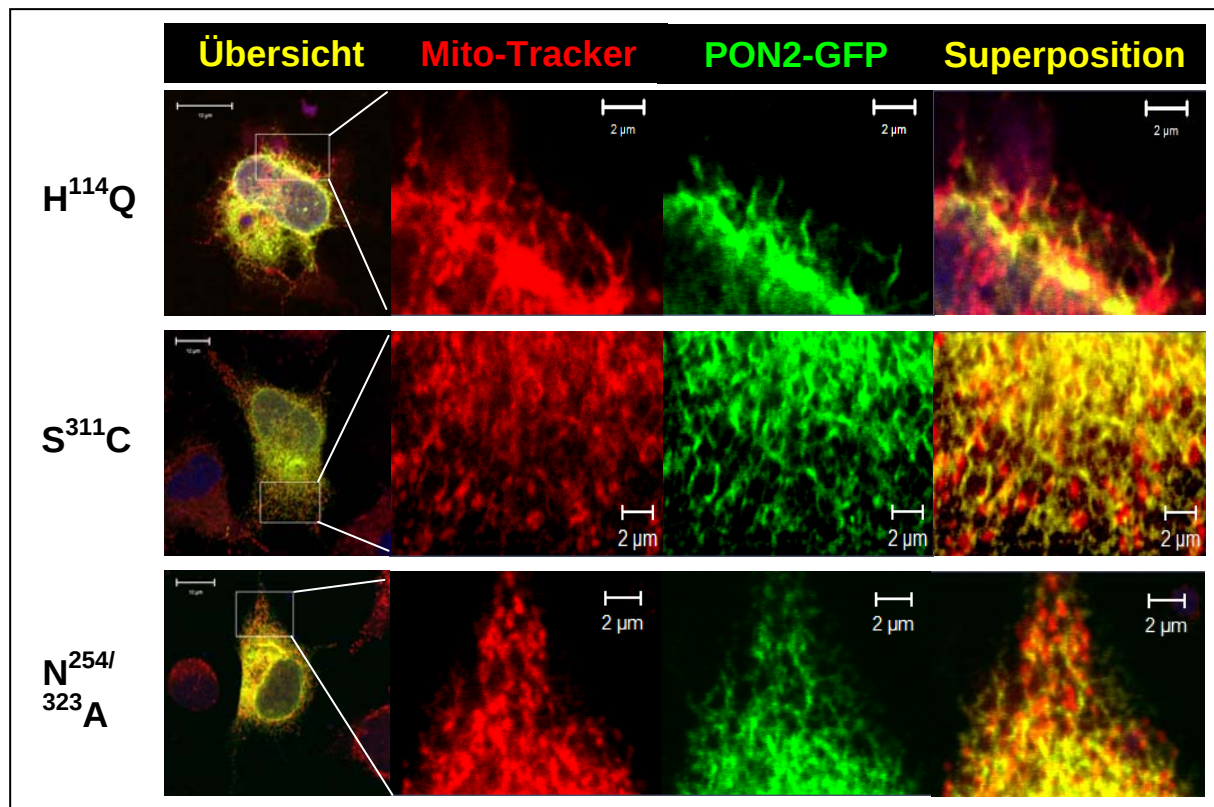


Abbildung 30: Lokalisierung der PON2-Mutanten in den Mitochondrien. Naive EA.hy 926-Zellen wurden transient mit eGFP-PON2-H¹¹⁴Q / S³¹¹C / N^{254/323}A transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit Mito-Tracker-orange (1:1000; in rot dargestellt) und Draq5 (1:1000; in blau dargestellt) gefärbt, fixiert und unter einem konfokalem Laserscan-Mikroskop betrachtet. Markierte Bereiche der Zellen wurden vergrößert dargestellt (Skalierung in Übersicht = 10 µm, Skalierung in Detailansichten = 2 µm).

Im Weiteren sollte nun der Einfluss dieser mutierten PON2-Proteine auf die enzymatische Laktonase-Aktivität von PON2 bestimmt werden. Da die zu His¹¹⁴, His¹³³ analogen Aminosäuren in PON1 für die Laktonase-Aktivität essentiell waren, konnte auch für die entsprechenden Mutationen in PON2 eine verminderte Laktonase-Aktivität erwartet werden. Das zu Asp²⁶⁸ analoge Aspartat in PON1 bindet ein katalytisch aktives Kalzium. Dieses Kalzium hatte in Modellrechnungen zwar keinen direkten Einfluss auf den Mechanismus der Lakton-Hydrolyse von PON1, spielte aber eine entscheidende Rolle für die Struktur des aktiven Zentrums¹⁷⁵. Durch den Austausch des Asp²⁶⁸ zum nicht Metall-koordinierendem Alanin, sollte die Struktur des aktiven Zentrums von PON2 verändert werden und eine Substratumsetzung durch das Enzym beeinträchtigt werden. Für die Messung der Laktonase-Aktivität der einzelnen PON2-Mutanten wurden Lysate aus den entsprechenden überexprimierenden EA.hy-Zellen verwendet. Als Substrat diente N-(3-oxododecanoyl) L-Homoserin-Lakton, welches das bisher am besten charakterisierte Substrat für PON2 darstellt. Die Analysen der Laktonase-Aktivität wurden von Dr. John Teiber mittels HPLC durchgeführt⁵⁴. Dabei zeigten PON2-WT überexprimierende EA.hy-926-Zellen gegenüber naiven EA.hy-Zellen eine um das 2,29-fache erhöhte Laktonase-Aktivität (Abbildung 31

links) nach stabiler Transfektion und eine 2-fach erhöhte Laktonase-Aktivität nach transients Transfektion (Abbildung 31 rechts). Wie erwartet ging diese erhöhte Laktonase-Aktivität in PON2-H¹¹⁴Q, PON2-H¹³³Q und PON2-D²⁶⁸A überexprimierenden EA.hy-Zellen deutlich bis auf den Level von naiven EA.hy-Zellen zurück. Die Überexpression des natürlich vorkommenden Polymorphismus PON2-S³¹¹C hingegen zeigte im Vergleich mit naiven EA.hy-Zellen eine 2,1-fach erhöhte Laktonase-Aktivität und unterschied sich damit nicht signifikant von der Aktivität der PON2-WT-Variante. Die C²⁸³V-Mutation von PON2 zeigte keine erhöhte Laktonase-Aktivität, was aufgrund der postulierten Verantwortlichkeit für den anti-oxidativen Mechanismus zu erwarten war. Auffallend war hingegen, dass die Überexpression der unglykosyliertem PON2-Mutante PON2-N^{254/323}A im Vergleich zu naiven Zellen ebenfalls keine erhöhte Laktonase-Aktivität zeigte. Die Glykosylierung scheint also für die Laktonase-Aktivität von PON2 essentiell zu sein.

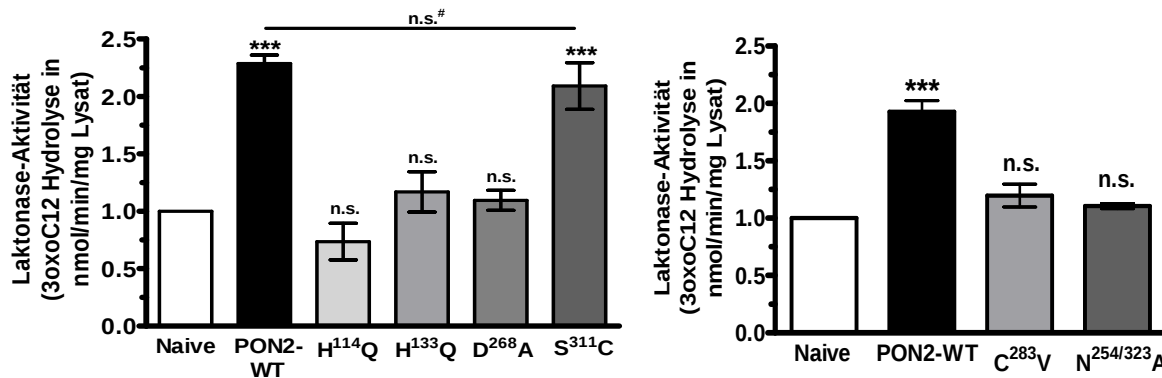


Abbildung 31: Laktonase-Aktivität der verschiedenen PON2-Mutanten. Die Laktonase-Aktivität wurde in Lysaten von naiven und PON2-WT oder PON2-Mutanten stabil (links) bzw. transient (rechts) überexprimierenden EA.hy 926-Zellen durch HPLC bestimmt. Gezeigt werden die absoluten Werte bezogen auf die Aktivität von naiven EA.hy 926-Zellen (links) bzw. bezogen auf die Aktivität von Zellen, die mit dem pEGFP-Plasmid (Naive) transfiziert wurden (rechts). Die Expression aller PON2-Varianten wurde in jedem Experiment quantifiziert, gegen α -Tubulin und anschließend relativ zu PON2-WT-GFP normalisiert. Die Säulen resultieren aus 4-12 unabhängigen Experimenten (MW $\pm$ SEM, ***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ vs. naive; n.s.#: $p > 0,05$ vs. PON2-WT; 1-way-ANOVA).

Durch die Mutationen der Aminosäuren oder die fehlende Glykosylierung könnte es allerdings auch zu einer veränderten Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins und somit auch des für die Laktonase-Aktivität verantwortlichen aktiven Zentrums gekommen sein. Unter solchen Umständen wäre das PON2-N^{254/323}A Protein zwar exprimiert worden, aber nicht funktionell. Deshalb wurden Lysate aus naiven EA.hy 926-Zellen mit N-Glykosidase-F deglykosyliert und anschließend die Laktonase-Aktivität gemessen (Abbildung 32). Wenn nicht die fehlende Glykosylierung, sondern eine Konformationsänderung des Proteins für die fehlende Laktonase-Aktivität des PON2-N^{254/323}A-Proteins verantwortlich gewesen wäre, sollte das enzymatisch deglykosylierte endogene PON2-Protein die gleiche Laktonase-

Aktivität aufweisen, wie das normal glykosylierte. Wie Abbildung 32 zeigt, verlieren Lysate aus naiven EA.hy-Zellen durch die Deglykosylierung an Laktonase-Aktivität. Somit konnte durch zwei verschiedene experimentelle Ansätze gezeigt werden, dass die Glykosylierung von PON2 für die Laktonase-Aktivität essentiell ist.

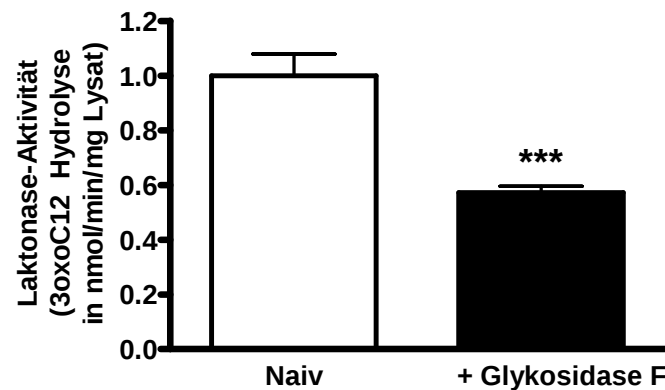


Abbildung 32: Deglykosylierung inhibiert die Laktonase-Aktivität von PON2. Lysate aus naiven EA.hy 926-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit N-Glykosidase-F (0,1 U/μg Protein) deglykosyliert. Anschließend wurde die Laktonase-Aktivität durch HPLC-Analysen bestimmt. Die Säulen zeigen die Laktonase-Aktivität in absoluten Werten, bezogen auf die Aktivität von naiven, unbehandelten EA.hy-Zellen. Repräsentative Darstellung aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifach-Werten (MW +/- SEM; ***: p<0,001).

Anschließend wurde analysiert, ob das Fehlen der enzymatischen Aktivität (z.B. in H¹¹⁴Q, H¹³³Q etc.) die anti-oxidative Aktivität von PON2 beeinflusst. Dazu wurden naive und PON2-WT oder PON2-Mutanten überexprimierende EA.hy-Zellen mit L012 beladen, die Superoxidbildung mit DMNQ stimuliert und der Anstieg der Chemilumineszenz am Luminometer verfolgt (Abbildung 33 links). Während die ROS-Bildung in naiven Zellen über die Zeit um das 10-fache Anstieg, konnte die Überexpression des Wildtyps von PON2 diesen Anstieg um ca. die Hälfte reduzieren. Die PON2-H¹¹⁴Q, -H¹³³Q und -D²⁶⁸A überexprimierenden EA.hy-Zellen, welche trotz Überexpression keine erhöhte Laktonase-Aktivität zeigten, reduzierten die Superoxidbildung jedoch ähnlich stark wie die PON2-WT überexprimierenden Zellen. Auch die PON2-S³¹¹C überexprimierenden Zellen unterschieden sich in der anti-oxidativen Aktivität nicht von den anderen PON2-Mutanten überexprimierenden Zellen. Auch nach transienter Expression führte das PON2-WT-Protein zu einer starken Reduktion der Superoxidbildung (Abbildung 33 rechts). Das potentiell nicht mehr anti-oxidative PON2-C²⁸³V zeigte jedoch die gleiche Reduktion der Superoxidbildung wie das PON2-WT-Protein. Es konnte also keine für die anti-oxidative Aktivität verantwortliche Aminosäure in PON2 identifiziert werden. Auch das unglykosylierte PON2-N^{254/323}A verlor seine anti-oxidative Aktivität nicht, sondern verminderte die Superoxidproduktion in ähnlicher Effizienz wie das PON2-WT-Protein. Die Glykosylierung

war zwar für die Laktonase-Aktivität essentiell, nicht jedoch für die anti-oxidative Aktivität von PON2. Alle etablierten PON2-Mutationen überexprimierenden Zellen behielten die Fähigkeit Superoxid abzubauen. Der anti-oxidativen Aktivität von PON2 scheint demnach nicht die Laktonase-Aktivität zugrunde zu liegen, es scheint sich vielmehr um zwei unabhängige Mechanismen zu handeln. Außerdem konnte kein Unterschied der polymorphen S³¹¹ bzw. C³¹¹ PON2-Varianten gefunden werden.

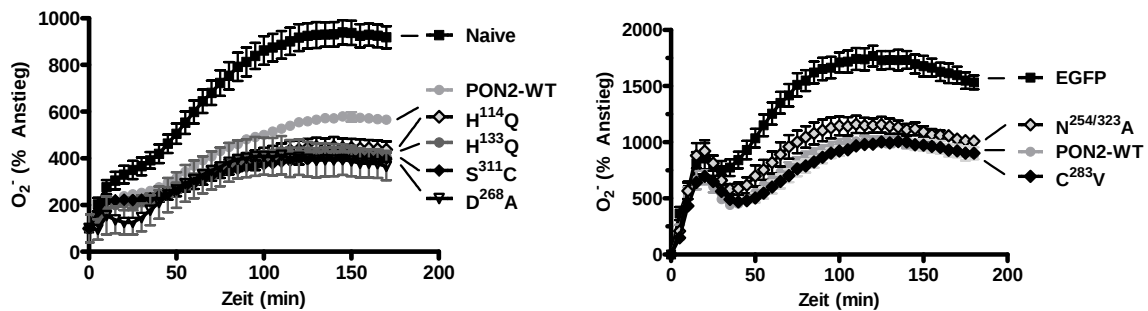


Abbildung 33: Alle PON2-Mutanten besitzen anti-oxidative Aktivität. EA.hy 926-Zellen wurden mit pEGFP, pEGFP-PON2-WT, pEGFP-PON2-N^{245/323}A und pEGFP-PON2-C²⁸³V transfiziert und 24 h später in 96-well-Platten umgesetzt. 24h später wurden diese Zellen (rechts) oder naive und PON2-WT oder PON2-Mutanten stabil überexprimierende EA.hy 926-Zellen (links) mit L012 beladen und die Superoxid-Bildung mit DMNQ (10 μ M) stimuliert. Anschließend wurde der prozentuale Anstieg der Chemilumineszenz über 3 h vermessen. Die Kurven repräsentieren 4-14 unabhängige Experimente in Vierfach-Werten (MW $\pm$ SEM). Die Kurvenmaxima wurden durch nicht-lineare Regression berechnet und sind statistisch signifikant ($p < 0,05$ vs. Naive oder EGFP).

5.1.11 Zusammenhang von Laktonase-Aktivität und anti-apoptotischer Aktivität

Mitochondriales Superoxid wird in der Regel von der mitochondrialen SOD2 zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. Bei einer exzessiven Superoxidfreisetzung steigt somit auch der Wasserstoffperoxidspiegel in den Mitochondrien stark an, welches das spezifische Mitochondrienmembranlipid Cardiolipin oxidiert. Dadurch dissoziiert Cytochrom C von der inneren Mitochondrienmembran, gelangt ins Zytosol und leitet dort weitere Schritte der Apoptose ein. Da PON2 die mitochondriale Superoxidbildung vermindert und weiterhin bekannt ist, dass PON2 anti-apoptotisch wirkt, ist es wahrscheinlich, dass der anti-apoptotischen Aktivität von PON2 eher die anti-oxidative Aktivität als die Laktonase-Aktivität zugrunde liegt. Um diese These zu überprüfen wurde in oben beschriebenen Zellen Apoptose durch Behandlung mit Tunicamycin, einem Inhibitor der Protein-N-Glykosylierung, bzw. durch Behandlung mit Staurosporin, einem PKC Inhibitor ausgelöst. Zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurde die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Abbildung 34 zeigt, dass Tunicamycin und Staurosporin Konzentrations-abhängig die Caspase-3 Aktivität und somit die Apoptose induzieren. Diese konnte sowohl durch Überexpression von PON2-WT, als

auch gleichermaßen von allen getesteten PON2-Mutationen ($H^{114}Q$, $S^{311}C$) signifikant verringert werden. Da $PON2-H^{114}Q$ keine Laktonase-Aktivität, wohl aber anti-oxidative Aktivität aufweist, kann geschlussfolgert werden, dass letztere der anti-apoptotischen Aktivität zugrunde liegt. Die anti-oxidative und anti-apoptotische Aktivität sind somit unabhängig von der Laktonase-Aktivität von PON2.

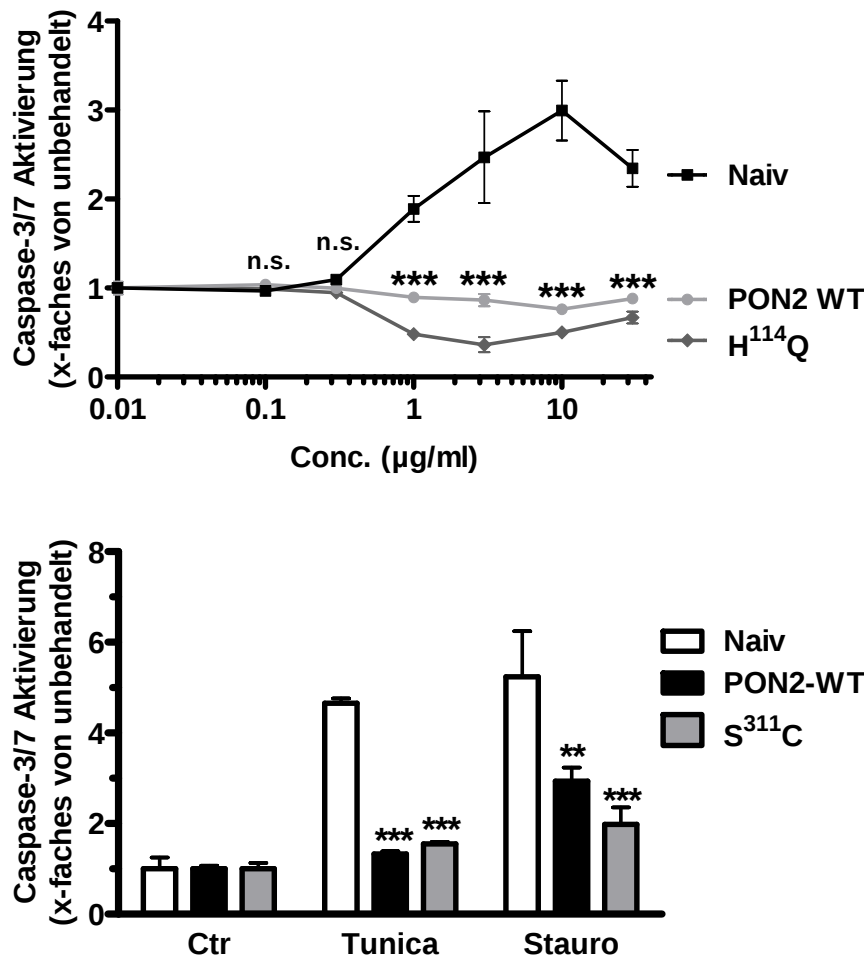


Abbildung 34: PON2- $H^{114}Q$ - und - $S^{311}C$ Überexpression schützt vor Tunicamycin- und Staurosporin induzierter Apoptose. Naive, PON2-WT, PON2- $H^{114}Q$ (oben) und PON2- $S^{311}C$ überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden 16 h mit den angegebenen Konzentrationen Tunicamycin (Tunica, 1 µg/ml; oben) oder 24 h mit Tunicamycin und Staurosporin (Stauro, 0,3 µM; unten) behandelt. Anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mit dem CaspaseGlo-Kit am Luminometer aufgezeichnet und zur Darstellung auf die Caspase-Aktivität von unbehandelten Zellen bezogen. Der Graph repräsentiert acht unabhängige Experimente mit Dreifach-Werten (MW $\pm$ SEM; n.s.: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $P < 0,001$; oben: PON2-WT und PON2- $H^{114}Q$ vs. Naiv; unten: jeweils vs. Naiv; 2-way-ANOVA).

5.2 PON2 schützt nicht vor 7-Ketocholesterol-vermitteltem Zelltod

7-Ketocholesterol (7-KC) ist ein Hauptbestandteil der pro-arteriosklerotischen oxLDLs (*oxidized low density lipoproteins*) und konnte in arteriosklerotischen Plaques in hohen Konzentrationen gemessen werden ⁹. In Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (*smooth muscle*

cell – SMC) induziert 7-KC die NOX4-Expression und erhöht damit die intrazelluläre ROS-Produktion und Apoptose ¹⁴. Da 7-KC auch in Endothelzellen Zelltod auslöst und PON2 potentiell gegen NOX4-induziertes Superoxid und Apoptose schützen kann, wurde eine protektive Funktion von PON2 gegen 7-KC-vermittelte Effekte in Endothelzellen vermutet und geprüft.

5.2.1 7-Ketocholesterol induziert nicht den mitochondrialen Apoptoseweg

Wie bereits beschrieben (Abbildung 34) schützt eine PON2-Überexpression Endothelzellen vor Staurosporin- oder Tunicamycin-induzierter Apoptose. In der Arbeitsgruppe konnte vor Kurzem gezeigt werden ⁷², dass PON2 dies erreicht, indem es Superoxid in den Mitochondrien vermindert und dadurch die Cardiolipinperoxidation inhibiert. 7-Ketocholesterol wiederum führte zur ROS-vermittelten Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol von U937-Zellen ¹⁷⁶, welche normalerweise über die Cardiolipinperoxidation eingeleitet wird. Somit erschien eine Schutzfunktion von PON2 gegen 7-Ketocholesterol-induzierte Apoptose wahrscheinlich. Um dies zu untersuchen wurden naive und PON2-überexprimierende EA.hy-Zellen 24 h mit steigenden Konzentrationen 7-Ketocholesterol behandelt, mit N-Acridinorange (NAO) gefärbt und mittels FACS analysiert. NAO ist ein Farbstoff, der spezifisch an Cardiolipin bindet, jedoch ausschließlich in seiner nicht-peroxidierten Form. Eine Linksverschiebung der Signalkurve im FACS zeigt verminderte Bindung des Farbstoffs und somit eine vermehrte Peroxidation von Cardiolipin an. 7-Ketocholesterol zeigte in Konzentrationen bei denen in vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen Apoptose detektiert wurde ¹⁴ in EA.hy-Zellen und PON2-überexprimierenden EA.hy-Zellen keine Linksverschiebung und somit keine Cardiolipinperoxidation (Abbildung 35). Dieses Resultat zeigt, dass der mitochondriale Apoptoseweg nicht aktiviert wurde und dementsprechend PON2 auf diesem Weg keine Schutzfunktion gegenüber den Effekten von 7-Ketocholesterol vermitteln konnte.

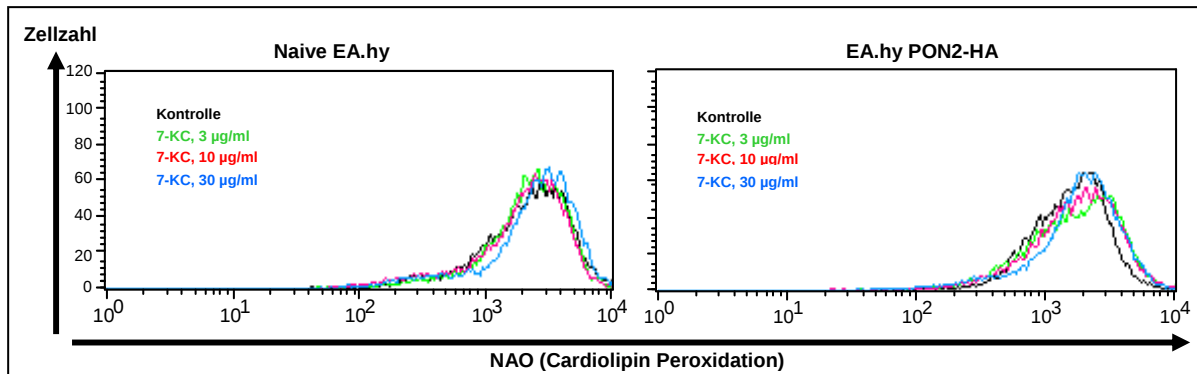


Abbildung 35: 7-Ketocholesterol führt in EA.hy und EA.hy-PON2-HA-Zellen nicht zur Cardiolipinperoxidation. Naive und PON2-HA-überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen 7-KC behandelt, mit 10-N-nonyl-Acridinorange-bromid (NAO) gefärbt und im FACSCalibur Zytometer analysiert (Ex/Em = 488/525 nm). Cardiolipinperoxidation verhindert die NAO-Bindung und führt zu einer Linksverschiebung der Signalkurve. Die Grafik zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

Um einen weiteren experimentellen Ansatz zur Analyse dieses Signalweges heranzuziehen, sollte die Cytochrom C-Freisetzung, als Cardiolipinperoxidations-abhängiger Effekt durch 7-Ketocholesterol direkt untersucht werden. Dazu wurden naive EA.hy-Zellen für verschiedene Zeitspannen mit 7-Ketocholesterol oder Staurosporin als Positivkontrolle behandelt, fixiert und mit einem Antikörper gegen Cytochrom C und einem Kernmarker-Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert (Abbildung 36). In unbehandelten Zellen war das grün gefärbte Cytochrom C ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert, und zeichnete deren Struktur deutlich ab. Mit steigender Zeit der Staurosporin-Behandlung wurde Cytochrom C zunehmend aus den Mitochondrien freigesetzt und war nach 16-stündiger Behandlung mit Staurosporin diffus über das gesamte Zytosol verteilt. Mitochondriale Strukturen waren nicht mehr zu erkennen. Nach achtstündiger Behandlung mit 7-KC hingegen waren diese noch deutlich zu sehen und im Zytosol wurde nur ein kleiner Anteil des Cytochrom C gefunden. Selbst nach 16 h Behandlung mit 7-Ketocholesterol waren noch nicht alle mitochondrialen Strukturen in der Zelle verschwunden, wenn auch ein z.T. diffuses Cytochrom C Signal im Zytosol vorlag. Dies ist vermutlich durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zu erklären, durch die lösliches Cytochrom C aus dem Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt wurde. Dies ist jedoch nicht vergleichbar mit den Ergebnissen zu Staurosporin, welches die Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C, inklusive des Cardiolipin-gebundenen Pools, stark induzierte. Es ist zu vermuten, dass 7-KC nicht zur Freisetzung des Cardiolipin-gebundenen Cytochrom C Pools führt, sondern nur das lösliche Cytochrom C aus Intermembranraum freisetzt, welches nicht ausreicht, um die Apoptosom-Bildung zu induzieren. Nach 16-stündiger 7-KC-Behandlung konnte außerdem die Bildung kleinerer

Vakuolen beobachtet werden, welche möglicherweise die Bildung von Autophagie-Vesikeln anzeigt.

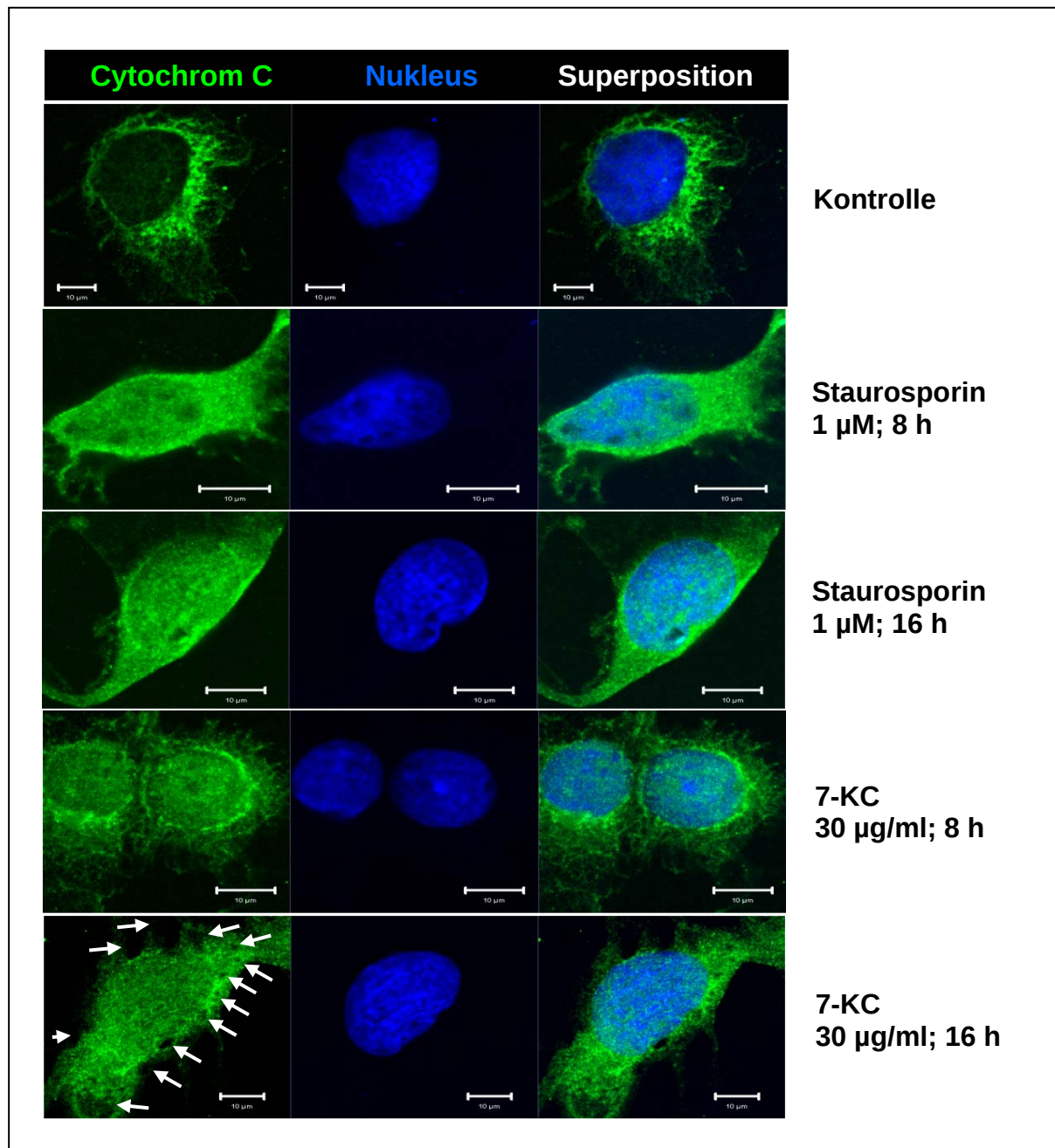


Abbildung 36: Leichte Cytochrom C-Freisetzung nach 7-Ketocholesterol-Behandlung. Naive EA.hy 926-Zellen wurden für 8 h und 16 h mit Staurosporin (1 μM) oder 7-KC (30 $\mu\text{g/ml}$) behandelt, fixiert und mit dem Kernmarkerfarbstoff ToPro3 (blau) und einem Antikörper gegen humanes Cytochrom C (sekundärer Antikörper: AlexaFluor 488, grün) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Mikroskop analysiert (Skalierung = 10 μm). Vakuolen wurden mit Pfeilen markiert.

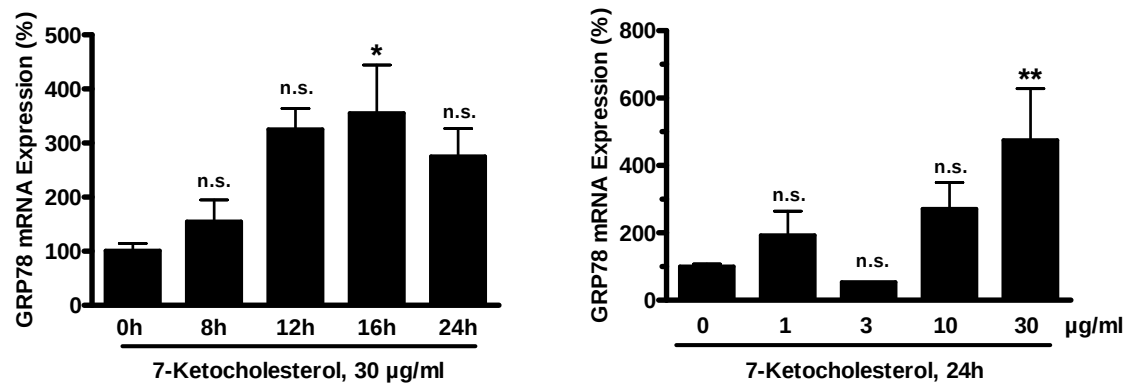
5.2.2 PON2 schützt nicht gegen 7-Ketocholesterol induzierten ER-Stress

Da PON2 nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch im ER lokalisiert vorliegt, könnte es dennoch Schutz vor 7-KC induziertem Zelltod vermitteln. So ist bekannt, dass eine

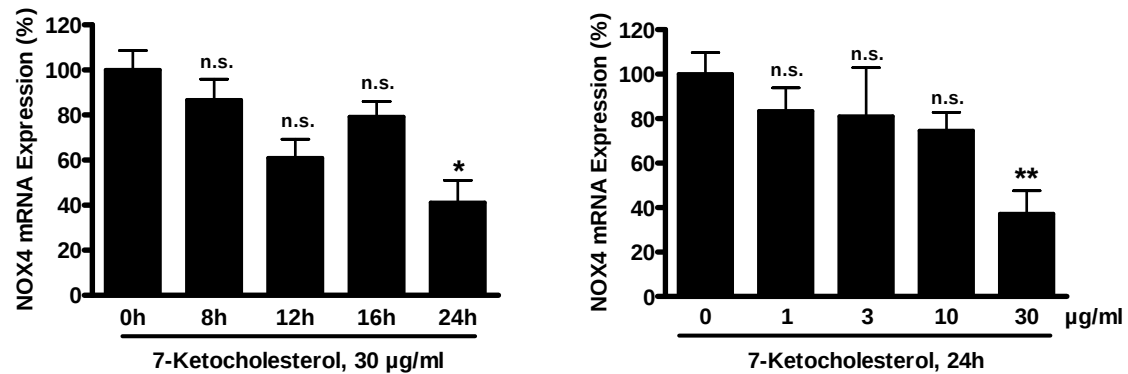
Anreicherung von freiem Cholesterin im ER den *Unfolded Proteine Response*-Signalweg (UPR) aktiviert ¹⁷⁷. In vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (SMC, *smooth muscle cell*) induzierte 7-Ketocholesterol den UPR via GRP78, welches über JNK wiederum das Superoxid-produzierende Enzym Nox4 aktivierte und schließlich zu einer Erhöhung der CHOP-Expression führte ¹⁴. Diese Befunde liefern mehrere Hinweise auf eine potentielle Schutzfunktion von PON2 gegen 7-KC-induzierten Zelltod in EA.hy-Zellen. So wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass PON2 die JNK-vermittelte Induktion des proapoptotischen Faktors CHOP durch ER-Stress induzierende Substanzen reduzieren konnte. Die Superoxid vermindernde Wirkung von PON2 in den Mitochondrien wurde bereits in dieser Arbeit gezeigt und aufgrund seiner Lokalisation läge eine ähnliche Wirkung im ER nahe. Dazu wurde zunächst anhand der mRNA-Expression von GRP78, NOX4 und CHOP untersucht, ob 7-KC in Endothelzellen ebenfalls den UPR aktiviert. Dazu wurden EA.hy 926-Zellen unterschiedlich lange mit 7-Ketocholesterol und primäre HUVECs (*human umbelical vein endothelial cells* = Endothelzellen aus der Nabelschnurvene) für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen 7-KC behandelt, die mRNA aus den Zellen extrahiert und die mRNA-Expressionen mittels quantitativer *real-time*-PCR (qRT-PCR) ermittelt (Abbildung 37). In EA.hy-Zellen nahm die Expression der GRP78-mRNA zwar über die Zeit tendenziell zu, war aber nur nach 16 h signifikant. In HUVECs zeigte sich ein ähnliches Bild. Nur bei der hohen Dosis 7-KC für 24 h zeigte sich eine signifikante Verfünffachung der GRP78-mRNA. In Endothelzellen konnte nur eine leichte GRP78-Induktion auf dem mRNA-Level beobachtet werden, weshalb eine Aktivierung dieses UPR-Zweigs durch 7-KC in Endothelzellen eher kritisch zu betrachten war. So zeigten Analysen aus der Arbeitsgruppe, dass z.B. Thapsigargin in EA.hy-Zellen bis zu 4000 % GRP78-mRNA induzierte ¹⁶³ und Tunicamycin (1 µg/ml, 6h) ca. 1800 % (unveröffentlicht). Für die NOX4-mRNA Expression wurde in EA.hy-Zellen zeitabhängig ein leichter Rückgang um ca. die Hälfte beobachtet, der nach 24 h signifikant war. Derselbe Effekt konnte konzentrationsabhängig in HUVECs beobachtet werden. Hier wurde 24 h nach der 7-KC-Behandlung in hohen Dosen nur noch ca. 40 % der NOX4-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert. Im Gegensatz zu SMCs, wo Pedruzzi *et al.* ¹⁴ eine dreifache Induktion der NOX4-mRNA nach 7-KC Behandlung detektierten, wurde in Endothelzellen sogar ein Rückgang der NOX4-mRNA nach der Behandlung mit 7-KC beobachtet. Bei der CHOP-mRNA zeigte sich ein zeit- und konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression in EA.hy-Zellen, der nach 16 h Behandlung mit 30 µg/ml 7-KC signifikant war. Im Vergleich mit der CHOP-Induktion durch Tunicamycin, die ca. das 60-fache der basalen CHOP-mRNA Expression betrug, fiel die

CHOP-Expression nach 7-KC mit einer ca. 10-fachen Erhöhung im Bezug zur Basalexpression wesentlich geringer aus.

A)



B)



C)

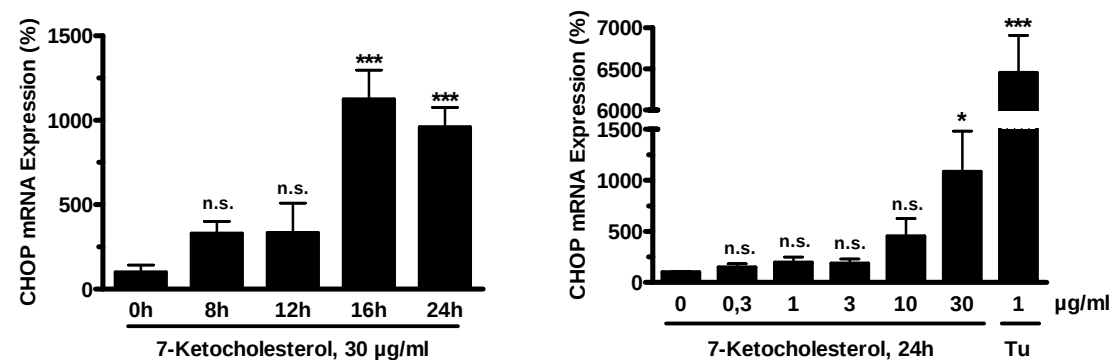


Abbildung 37: 7-Ketocholesterol induziert GRP78- und CHOP-, nicht aber NOX4-mRNA in Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen (links) wurden verschieden lang mit 7-KC (30 µg/ml), HUVEC (rechts) für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen 7-KC behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen präpariert und der Anstieg der Expression von GRP78- (A), NOX4- (B) und CHOP-mRNA (C) nach 7-KC-Behandlung mittels qRT-PCR auf die mRNA-Expression von unbehandelten Zellen bezogen. Die konzentrationsabhängige CHOP-Induktion (C rechts) wurde ebenfalls in EA.hy 926-Zellen gemessen. Dort wurde zum Vergleich ein repräsentatives Ergebnis der CHOP-mRNA-Induktion nach Tunicamycin (1µg/ml, 16 h) eingefügt. Die Diagramme zeigen eine Zusammenfassung von 1-2 unabhängigen Experimenten in Dreifach-Werten (MW +/- SEM; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$ vs. 0h 7-KC bzw. vs. 0 µg/ml 7-KC; 1-way-ANOVA).

In HUVECs hingegen konnte nach einer 24-stündigen Behandlung mit 30 µg/ml 7-KC eine ca. 45-fache Erhöhung der CHOP-mRNA detektiert werden, ein Effekt der die CHOP-Expression in EA.hy-Zellen nach demselben Stimulus deutlich übersteigt (Abbildung 38).

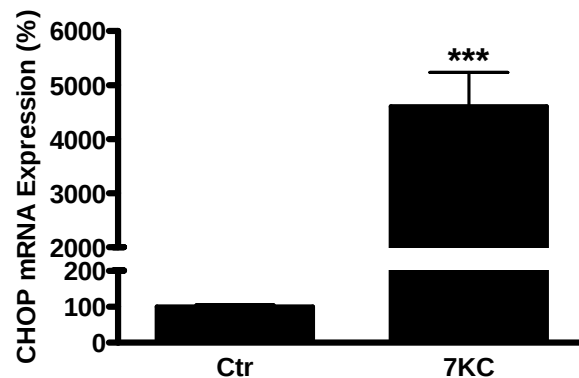


Abbildung 38: 7-Ketocholesterol induziert die CHOP-Induktion in HUVEC. HUVECs wurden 24 h mit 30 µg/ml 7-Ketocholesterol (7KC) oder Ethanol behandelt, die RNA extrahiert und die Expression der mRNA mit CHOP-spezifischen Primern in qRT-PCR-Analysen bestimmt. Einzelnes Experiment in Dreifach-Werten (***: $p > 0.001$ vs. Ctr; 1-way-ANOVA).

Da PON2 die JNK-vermittelte CHOP-Induktion in EA.hy-Zellen vermindern konnte und die NOX-4-vermittelte CHOP-Induktion in SMCs nach 7-KC-Behandlung von JNK initiiert wurde, sollte untersucht werden, ob die 7-Ketocholesterol-induzierte CHOP-Expression in Endothelzellen ebenfalls JNK-abhängig ist. Im Einklang mit einer JNK-Aktivierung durch oxidativen Stress¹⁷⁸, zeigten Analysen der AG Horke eine verminderte CHOP-Induktion in EA.hy-Zellen nach Vorbehandlung mit intrazellulär wirkenden Antioxidantien. Der Effekt dieser Antioxidantien wurde ebenfalls auf die 7-KC vermittelte CHOP Induktion in EA.hy-Zellen untersucht. Dazu wurden EA.hy-Zellen mit NAC, PEG-SOD oder einem JNK-Inhibitor beladen und für 24 h mit 7-KC behandelt. Die Analyse der CHOP mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR (Abbildung 39). Es zeigte sich, dass keine der Vorbehandlungen eine signifikante Auswirkung auf die CHOP-mRNA Expressionsrate nach 7-KC-Behandlung hatte. 7-Ketocholesterol induzierte die CHOP-Expression offensichtlich unabhängig von ROS oder JNK.

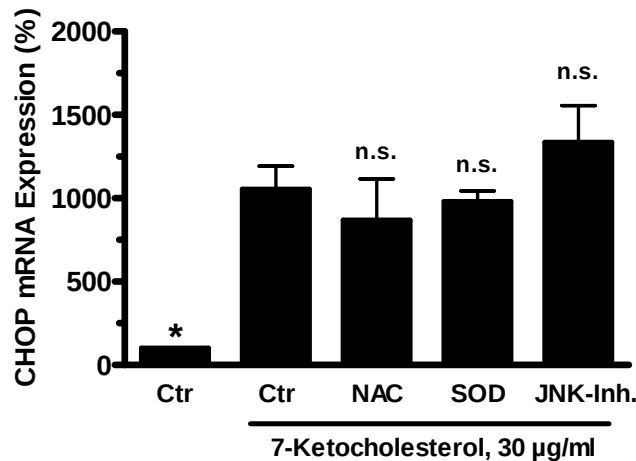


Abbildung 39: JNK-Inhibition oder Antioxidantien können die 7-KC-induzierte CHOP Expression nicht verhindern. EA.hy 926-Zellen wurden 24 h vor der 7-KC-Behandlung mit NAC (10 mM) oder PEG-SOD (100 U/ml) oder 1 h vor 7-KC-Behandlung mit dem JNK-Inhibitor SP600126 (10 µM) beladen und anschließend für 24 h mit 7-KC inkubiert (30 µg/ml). Der mRNA-Gehalt der Zellen wurde mittels qRT-PCR mit CHOP-spezifischen qRT-PCR-Primern bestimmt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt und zeigt den prozentualen Anstieg der CHOP-mRNA bezogen auf unbehandelte Zellen in Dreifach-Werten (MW $\pm$ SEM; *: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$ vs. 7-KC behandelte Zellen; 1-way-ANOVA).

Dementsprechend war es fraglich ob PON2 überhaupt einen Einfluss auf die CHOP-Induktion durch 7-KC hätte. Deshalb wurden naive und PON2-überexprimierende Zellen für 24 h mit 7-KC behandelt und anschließend die CHOP-mRNA-Expression mittels qRT-PCR-Analysen untersucht (Abbildung 40). Dabei zeigte sich, dass die CHOP-Induktion in PON2-überexprimierenden Zellen nicht signifikant erniedrigt wurde.

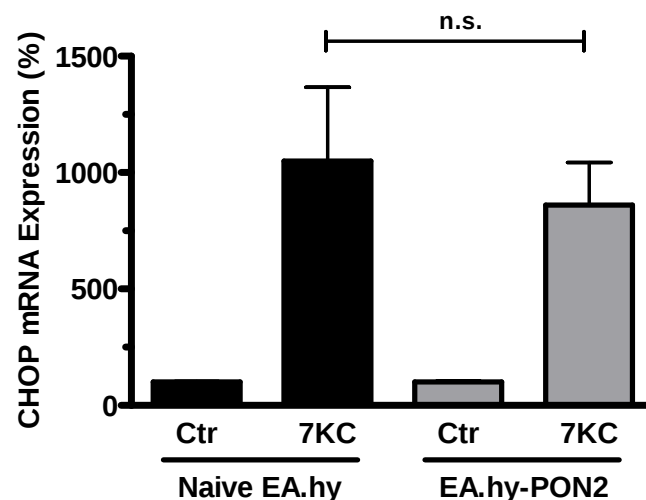


Abbildung 40: PON2-Überexpression verhindert nicht die 7-KC vermittelte CHOP-Expression. Gleiches Experiment wie in Abbildung 39 mit naiven und PON2-überexprimierenden EA.hy-Zellen, jedoch ohne Vorbehandlung der Zellen. Die Säulen zeigen den prozentualen Anstieg des CHOP-mRNA Gehalts jeweils bezogen auf unbehandelte Zellen. Für die Darstellung wurden fünf unabhängige Experimente in Doppel- bis Dreifach-Werten zusammengefasst und mit Fehlerbalken (SEM) abgebildet (n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA).

7-Ketocholesterol aktivierte zwar die CHOP-Expression in Endothelzellen, eine Beteiligung von GRP78, JNK oder NOX4 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine PON2-Überexpression konnte EA.hy-Zellen keinen Schutz vor der 7-Ketocholesterol-induzierten CHOP-Aktivierung vermitteln.

5.2.3 Der Einfluss von PON2 auf 7-Ketocholesterol induzierten Zelltod

Um zu untersuchen ob 7-Ketocholesterol in Endothelzellen Apoptose auslöst und ob PON2 diese vor 7-KC-induziertem Zelltod schützen kann, wurde die Caspase-Aktivierung nach verschiedenen Konzentrationen 7-Ketocholesteroles in naiven und PON2 überexprimierenden EA.hy 926-Zellen untersucht (Abbildung 41). Dabei konnte in naiven EA.hy-Zellen nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Caspase-Aktivierung auf das ca. 1,6-fache von unbehandelten Zellen festgestellt werden. Diese relativ geringe Aktivierung wurde zudem nach 7-Ketocholesterol-Behandlung in niedrigen Dosen festgestellt. Bei Konzentrationen von 3 – 30 µg/ml konnte keine Caspase-Aktivierung mehr detektiert werden. Dementsprechend konnte in PON2-überexprimierenden Zellen keine Erniedrigung der Caspase-Aktivierung beobachtet werden. Die Konzentrationskurve bewegte sich zwar unter der der Kurve für naive Zellen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. So aktivierte 7-Ketocholesterol in keiner der beiden Zelllinien Caspase-3 oder -7. Dieses Resultat war besonders auffallend, da bei Betrachtung der mit hohen Dosen 7-Ketocholesterol behandelten Zellen unter dem Lichtmikroskop der Zelltod objektiv morphologisch zu erkennen war.

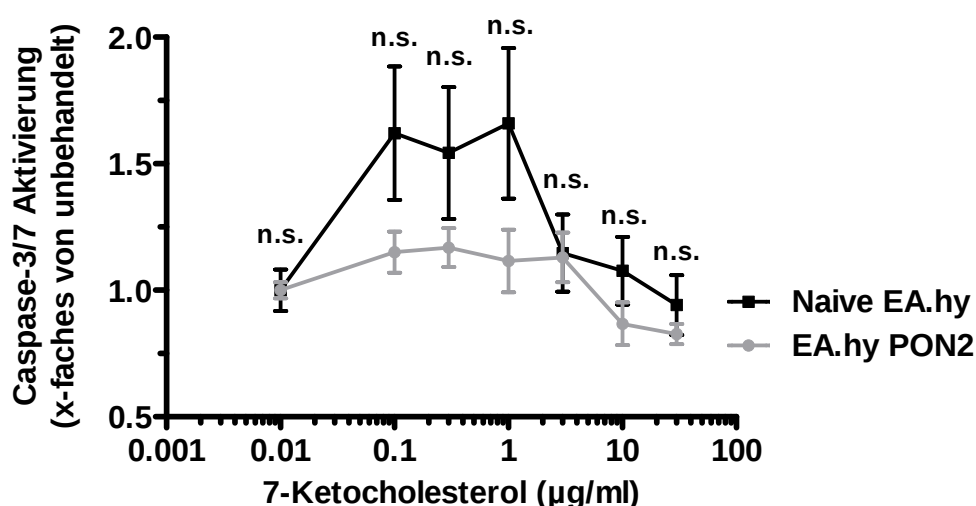


Abbildung 41: 7-Ketocholesterol zeigte keine Caspase-3/7-Aktivierung in EA.hy und EA.hy-PON2-HA-Zellen. Naive und PON2 überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen 7-Ketocholesterol behandelt, gefolgt von der Bestimmung der Caspase-3/7 Aktivität. Der Graph zeigt ein repräsentatives von vier unabhängigen Experimenten mit Dreifach-Werten (MW +/-SEM; n.s.; $p > 0,05$ vs. entsprechende EA.hy-PON2-Werte; 2-way-ANOVA).

Da es sich bei Caspase-3 um eine terminale Caspase im apoptotischen Signalweg handelt, deutete ihre fehlende Aktivierung durch 7-Ketocholesterol auf einen anderen Zelltodmechanismus als Apoptose hin. Um Apoptose als Zelltodsignalweg in diesem Falle auszuschließen wurde der Zelltod mit einer weiteren Methode analysiert. Dazu wurden erneut naive und PON2 überexprimierende EA.hy-Zellen für 24 h mit steigenden Konzentrationen 7-Ketocholesterol behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V-PE, einem Protein welches an die Oberfläche von apoptotischen Zellen bindet, und 7-AAD, einem Ausschluss-Farbstoff, der nur durch bereits permeabilisierte Zellmembranen in die Zellen gelangen kann, gefärbt. Die Zellen wurden schließlich im FACS-Zytometer analysiert (Abbildung 42). Dabei veränderte sich der Anteil der Annexin-V-positiven (Quadrant unten rechts), und somit frühapoptotischen naiven EA.hy-Zellen mit steigender 7-Ketocholesterolkonzentration nur marginal von 3% auf 6%. Der Anteil der 7-AAD positiven, und somit spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen hingegen verfünffachte sich mit steigender 7-Ketocholesterolkonzentration (oben rechts). In den PON2-überexprimierenden Zellen stieg der Anteil der frühapoptotischen Zellen mit steigender 7-KC-Konzentration unwesentlich höher von 3% auf 13%. Die nekrotischen oder spätapoptotischen Zellen stiegen ähnlich stark an, wie die naiven Zellen von 7% auf 31%. Gegen Apoptose als Zelltodmechanismus sprach erneut, dass zwar bei den hohen Konzentrationen von 7-KC ein hoher Anteil an spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen gefunden wurde, bei niedrigen Konzentrationen aber kein erhöhter Anteil an frühapoptotischen Zellen. Wie schon bei der Caspase-Aktivitätsmessung konnte die PON2-Überexpression keinen Schutz vor dem 7-KC-induzierten Zelltod vermitteln.

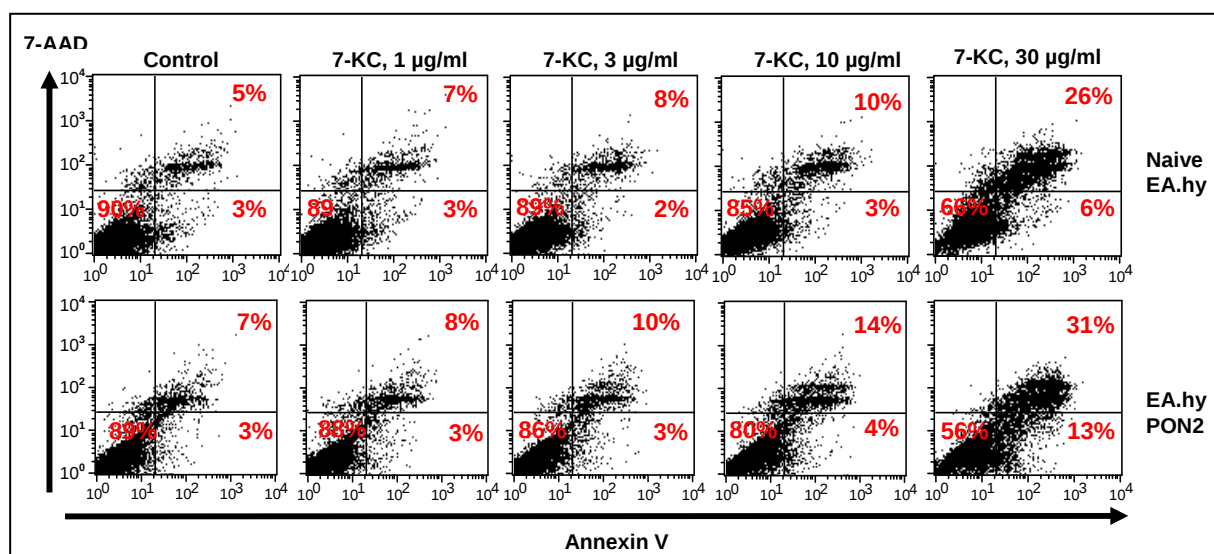


Abbildung 42: PON2-Überexpression schützt EA.hy-Zellen nicht vor 7-KC-induziertem Zelltod. Naive und PON2-GFP überexprimierende EA.hy 926-Zellen wurden 24 h mit den angegebenen Konzentrationen 7-Ketocholesterol behandelt, mit Annexin-V/PE und 7-AAD gefärbt und im FACSCalibur mit den entsprechenden

Ex / Em-Wellenlängen (PE=488/575 nm; 7-AAD=488/647 nm) detektiert. Prozentuale Auswertung bezogen auf 10.000 gemessene Zellen. Die Abbildung repräsentiert eins von vier unabhängigen Experimenten.

Die Hinweise, dass 7-Ketocholesterol in EA.hy-Zellen nicht Apoptose, sondern eine andere Art des Zelltods auslöst, erklären möglicherweise auch die fehlende Schutzfunktion von PON2. Allerdings könnte 7-Ketocholesterol auch einen direkten Einfluss auf die Expression von PON2 haben. Deshalb wurden naive EA.hy-Zellen unterschiedlich lange mit 7-Ketocholesterol oder HUVECs für 24 h mit 30 µg/ml 7-KC behandelt und die mRNA-Expression von PON2 mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 43). Dabei konnte zwar eine leichte Abnahme der PON2-mRNA in EA.hy-Zellen gemessen werden, die allerdings nur nach 12 h signifikant war. Der 12 h Wert scheint aber eher eine Ausnahme zu sein. Zusammenfassend sinkt die PON2-mRNA-Expression auf ungefähr 71 % des basalen Expressionslevels. In HUVECs hingegen konnte nach 24-stündiger Behandlung mit 30 µg/ml 7-KC ein deutlicher Rückgang der PON2-mRNA auf 32 % des Ausgangswertes beobachtet werden, was auch die in den EA.hy-Zellen beobachteten Trends bekräftigte.

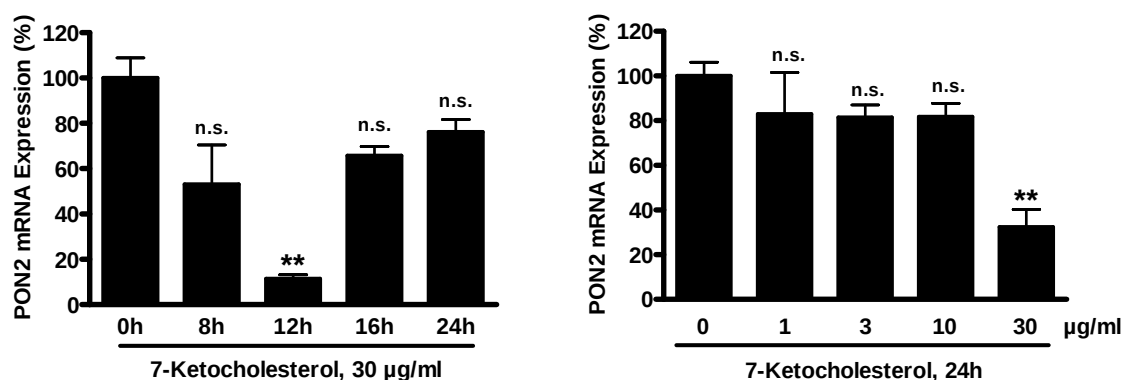


Abbildung 43: 7-KC vermindert die PON2-mRNA-Expression tendenziell. Gleiches Experiment wie Abbildung 37 mit PON2-spezifischen qRT-PCR-Primern mit RNA aus EA.hy 926 (links) und HUVECs (rechts) (**: $p < 0,01$, n.s.: $p > 0,05$ vs. 0h 7-KC; 1-way-ANOVA).

5.2.4 7-Ketocholesterol induziert Autophagie

Bei der Analyse der Cytochrom C-Freisetzung nach 7-KC Behandlung (siehe Abbildung 36) konnte bereits die Bildung von Vakuolen beobachtet werden, wie sie beim Prozess der Makroautophagie auftreten. Ob der durch 7-KC ausgelöste Zelltod mit Autophagie in Verbindung steht, wurde durch den Einsatz verschiedener Stimulantien und Inhibitoren der Autophagie untersucht. Zunächst wurden deshalb 7-Ketocholesterol selbst, der Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin (3-MA) und der Autophagie-Induktor Rapamycin auf ihre zelltoxischen Eigenschaften hin überprüft. Die Zytotoxizität wurde anhand der Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase im Zellüberstand bestimmt, ein zytoplasmatisches Protein,

welches nur bei Schädigung der Zellmembran in den Zellüberstand übergehen kann. Die Zytotoxizität von 7-KC und Rapamycin wurde in naiven EA.hy-Zellen nach Vorbehandlung mit oder ohne 3-MA gemessen und auf die Aktivität der gesamten in den Zellen vorhandenen Laktatdehydrogenase bezogen (Abbildung 44). Dadurch ist die Laktatdehydrogenase-Aktivität im Überstand zum Anteil der toten Zellen proportional. Nach zweitägiger 7-KC-Behandlung waren ca. 74 % der EA.hy-Zellen tot. Jedoch starben auch 40 % der unbehandelten Zellen, vermutlich durch Nährstoffmangel im Rahmen der 48-stündigen Inkubationszeit in geringen Volumina des Mediums. Autophagie-Induktion durch Rapamycin konnte den Anteil der toten Zellen auf 32 % senken, wohingegen die Hemmung der Autophagie durch 3-MA diesen Anteil auf ca. 59 % steigerte. Da Autophagie als protektiver Mechanismus bei Nährstoffmangel beschrieben wurde, war dieses Ergebnis zu erwarten. Interessanterweise erhöhte die Induktion von Autophagie mit Rapamycin in Zellen, in denen Autophagie zuvor durch 3-MA inhibiert wurde den Anteil der toten Zellen auf ca. 70 %. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Rapamycin den Zelltod verringert, 3-MA und 7-KC den Anteil der toten Zellen erhöhen und somit offenbar alle Substanzen die erwartete Wirkung zeigen.

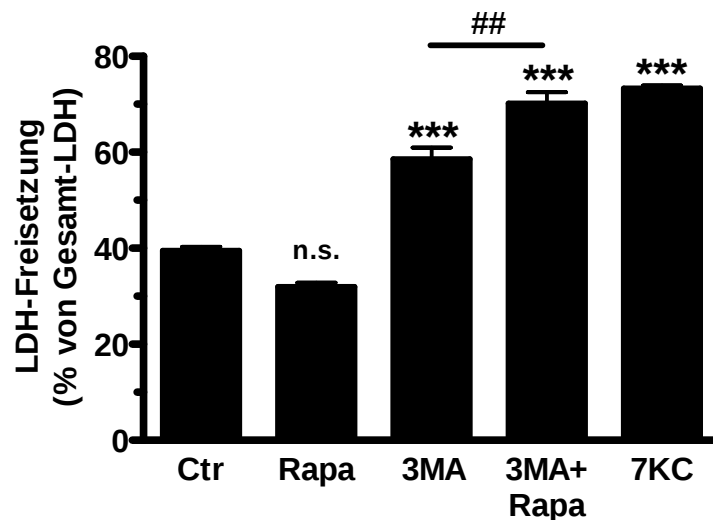


Abbildung 44: Zytotoxizität nach Rapamycin-, 3-Methyladenin- und 7-KC-Behandlung. EA.hy 926-Zellen wurden 3 h mit 3-Methyladenin (3MA, 5 mM) beladen oder unbehandelt belassen und anschließend 48 h mit Rapamycin (Rapa, 2 μ M) oder 7-Ketocholesterol (7KC, 30 μ g/ml) behandelt. Die Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität) wurde nach Zugabe des CytotoxONE-Substrats im Fluometer vermessen und auf die Werte der jeweiligen Zellen bezogen, die vor der Substratzugabe lysiert wurden. Das Diagramm zeigt ein Experiment in Dreifach-Werten $\pm$ SEM (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Ctr; #: $p < 0,01$ vs. 3MA; 1-way-ANOVA).

Wie sich nun die Hemmung der Autophagie auf den 7-Ketocholesterol-induzierten Tod von EA.hy-Zellen auswirkt, wurde durch Kombination der 7-KC-Behandlung mit 3-MA-Vorbehandlung anhand des Zytotoxizitäts-Tests untersucht (Abbildung 45). Dabei zeigte sich bereits nach 24h eine deutliche Erhöhung an toten Zellen durch 7-KC-Behandlung, die durch

die 3-MA-Vorbehandlung nicht signifikant verändert wurde. Die 3-MA Vorbehandlung von Zellen, die anschließend nicht mit 7-KC behandelt wurden, führte nach 24 h zu keiner signifikanten Änderung gegenüber ganz unbehandelten Zellen. Bei dem im Vergleich zum Vorexperiment kürzen Zeitraum hatte die Autophagie-Hemmung offenbar noch keine Auswirkung auf das Überleben der Zellen.

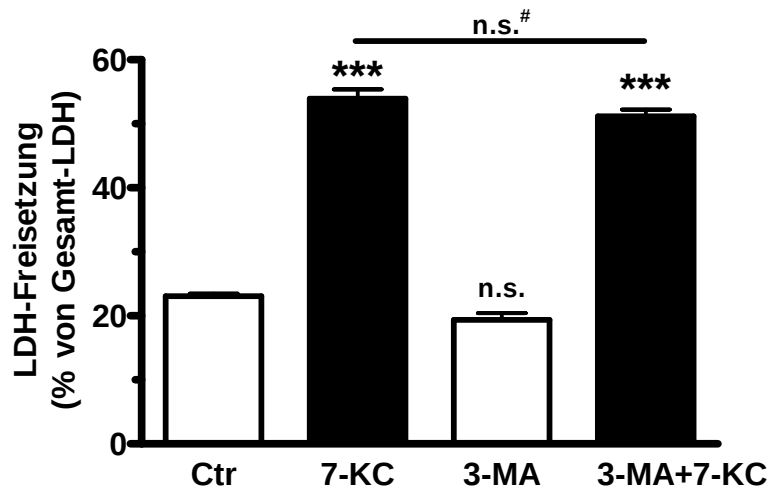


Abbildung 45: Autophagie-Inhibition konnte den 7-KC induzierten Zelltod nicht vermindern. EA.hy 926-Zellen wurden mit oder ohne 3-MA-Vorbehandlung (3 h, 5 mM) für 24 h mit 7-KC (30 µg/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde die Zytotoxizität wie in Abbildung 44 bestimmt. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifach-Werten (MW $\pm$ SEM; ***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Ctr; n.s.#: $p > 0,05$ vs. 7-KC; 1-way-ANOVA).

Die bei der Cytochrom C-Freisetzung beobachteten Vakuolen, deuten jedoch auf eine Aktivierung der Autophagie hin. Deshalb wurde zunächst analysiert, ob es sich bei den durch 7-KC bedingten Vakuolen tatsächlich um Autophagosomen handelte. Während der Doppelmembranbildung der Autophagosomen wird das Protein LC3 exprimiert und im Laufe der Vakuolenschließung von LC3-I zu LC3-II prozessiert. Dieses Protein wurde durch transiente Transfektion eines LC3-GFP-Plasmids als GFP-Fusionsprotein in EA.hy-Zellen überexprimiert. Zur Induktion der Autophagie wurden die transfizierten Zellen für 16 h unter Nährstoffentzug oder mit 7-KC inkubiert. Anschließend wurde das GFP-Signal mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop analysiert (Abbildung 46). In unbehandelten transfizierten EA.hy-Zellen konnte das GFP-Signal nur schwach und diffus detektiert werden. In den Zellen, die unter Nährstoffmangel inkubierten konnten mehrere Vakuolen beobachtet werden, die aufgrund der Spezifität von LC3 für Autophagosomenmembranen als Autophagosomen identifiziert wurden. Ebenso deutlich war die Autophagosom-Bildung in den 7-KC behandelten Zellen zu detektieren.

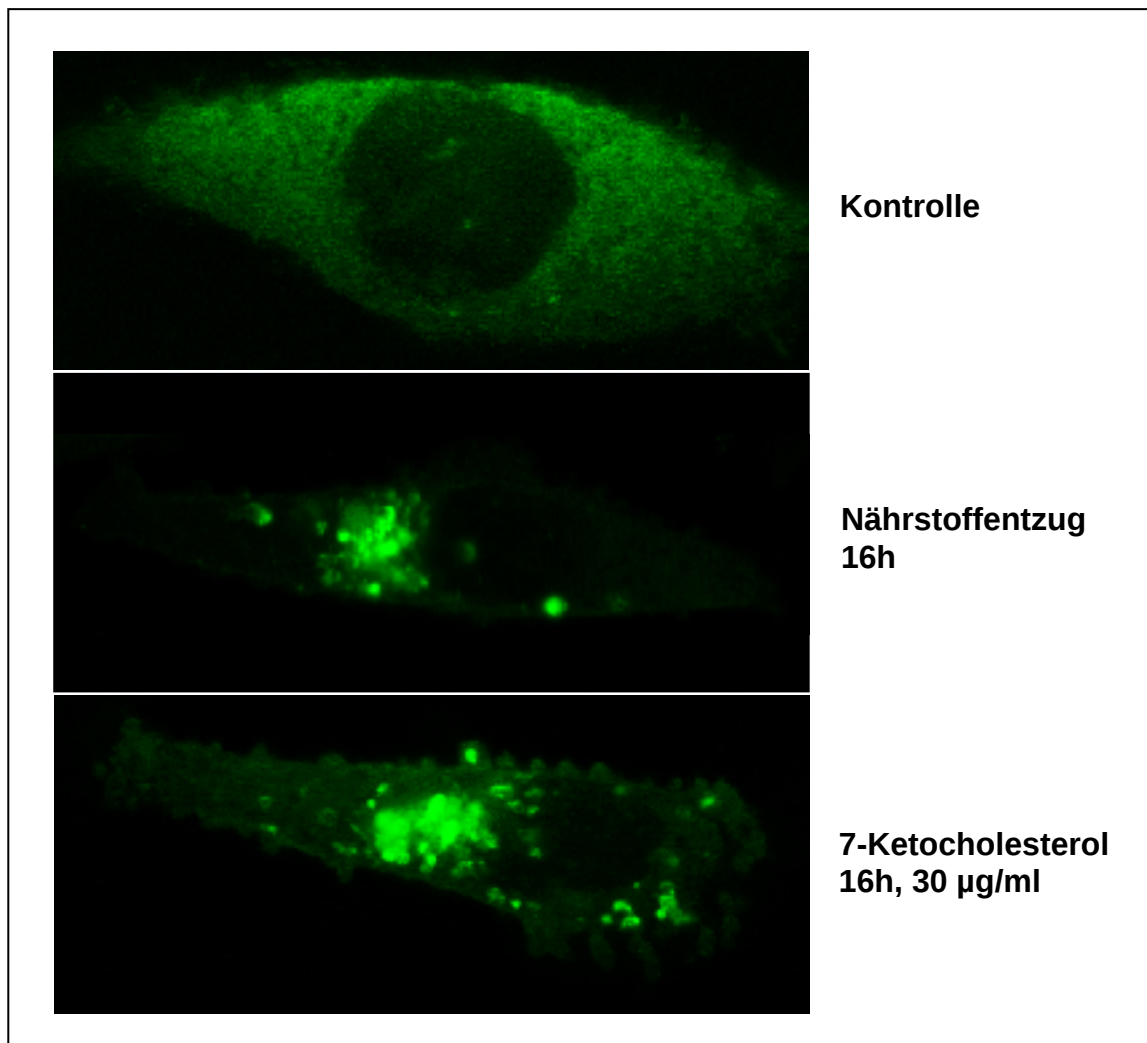


Abbildung 46: 7-KC führt zu Autophagosom-Bildung in EA.hy-Zellen. EA.hy 926-Zellen wurden mit einem LC3-GFP-Plasmid transfiziert und 24 h später für 16 h mit 7-KC (30 µg/ml) behandelt oder in HBSS⁺⁺ inkubiert. Anschließend wurden die lebenden Zellen unter einem konfokalem Laser-Scan-Mikroskop analysiert.

Die angewandte Technik erlaubt die Darstellung der Bildung von Autophagosomen, kann jedoch die Prozessierung von LC3-I zu LC3-II nicht darstellen. Deshalb wurden Lysate aus EA.hy-Zellen, die entweder mit steigenden Konzentrationen von 7-KC oder steigende Zeitspannen mit 30 µg/ml 7-KC oder Rapamycin (2 µM) behandelt wurden, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Blotten mit einem Antikörper gegen humanes LC3 analysiert (Abbildung 47). Dabei zeigte sich sowohl zeit-, als auch konzentrationsabhängig für 7-KC und Rapamycin behandelte Zellen eine Steigerung in der Stärke der LC3-II Proteinbande. Zeitabhängig konnte auch eine Reduktion der LC3-I Bandenstärke beobachtet werden, bei den konzentrationsabhängigen Lysaten dagegen konnte die LC3-I-Bande fast gar nicht detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass 7-KC die Autophagosomen-Bildung aktiviert, also offensichtlich Autophagie auslösen kann. Auch die als Kontrolle für die Autophagie-Induktion Rapamycin behandelten Zellen zeigten einen

Anstieg der LC3-II-Bande, jedoch war die Expressionsstärke bzw. der Gehalt an LC3-II in diesen Zellen wesentlich geringer als in den 7-KC behandelten Zellen.

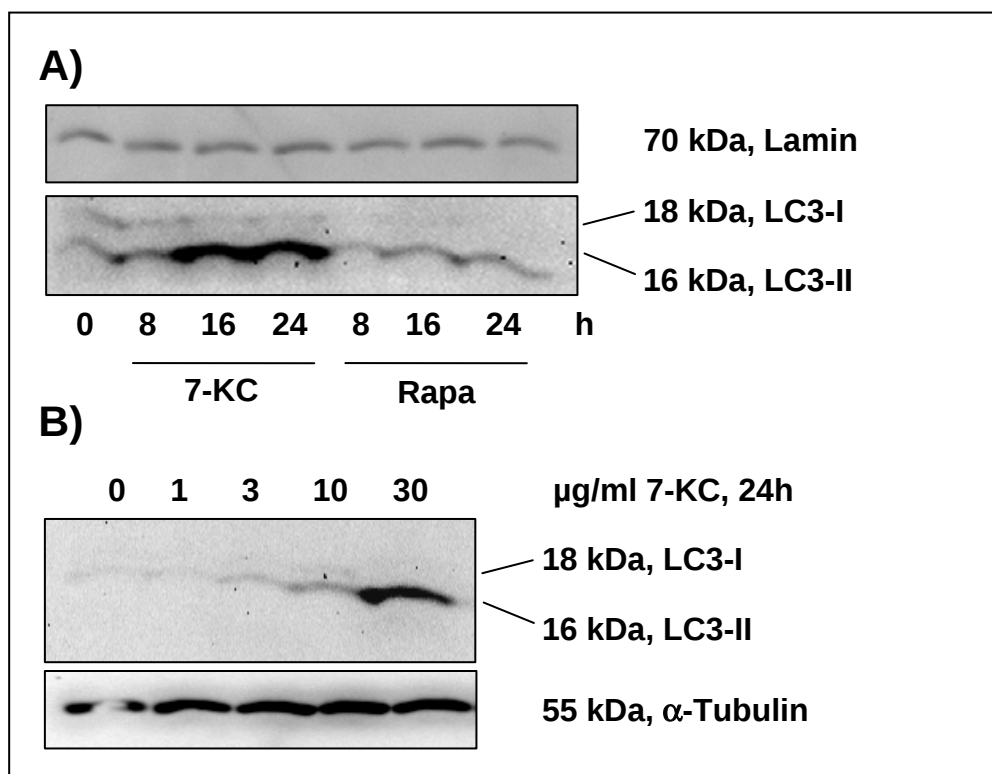


Abbildung 47: 7-KC steigert die Autophagosomen-Bildung in EA.hy-Zellen. Lysate aus EA.hy-Zellen wurden (A) für 0, 8, 16 oder 24h mit 7-KC (30 µg/ml) oder Rapamycin (Rapa, 2 µM) oder (B) für 24h mit 0, 1, 3, 10, 30 µg/ml 7-KC behandelt, lysiert und per SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden auf Membranen geblottet und mit einem Antikörper gegen humanes LC3 und Lamin oder α -Tubulin analysiert. Gelbilder zeigen jeweils eins von drei unabhängigen Experimenten.

Da möglicherweise durch 7-Ketocholesterol Autophagie aktiviert wurde, diese aber nicht die Ursache für das Zellsterben darstellt, besteht auch die Möglichkeit, dass die Autophagie in diesem Fall die Zelle vor dem Zelltod bewahren soll. Wäre dies der Fall würde die Induktion von Autophagie in Zellen, die gleichzeitig mit 7-KC behandelt würden, das Ausmaß oder die Geschwindigkeit des Zelltods reduzieren. Würde Autophagie nach 7-KC-Behandlung als ausführender Zelltodmechanismus auftreten, müsste die gleichzeitige Behandlung mit einem Autophagie-Induktor entsprechend das Ausmaß oder die Geschwindigkeit des Zelltods erhöhen. Dies wurde an EA.hy-Zellen mit dem Autophagie-Induktor Rapamycin untersucht. Dazu wurden die Zellen 24 h mit 7-KC, Rapamycin oder beidem behandelt und anschließend die LDH-Aktivität im Überstand gemessen (Abbildung 48). Wie schon in den vorigen Experimenten führte die 7-KC-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg an toten Zellen. Während sich die Rapamycin-Behandlung alleine nach 24 h noch nicht signifikant auswirkte, reduzierte sie die Anzahl an toten Zellen von den Zellen, die mit 7-KC-behandelt wurden um

10 Prozentpunkte. Daraus lässt sich schließen, dass Autophagie in diesem Falle eher als Schutzmechanismus dienen dürfte.

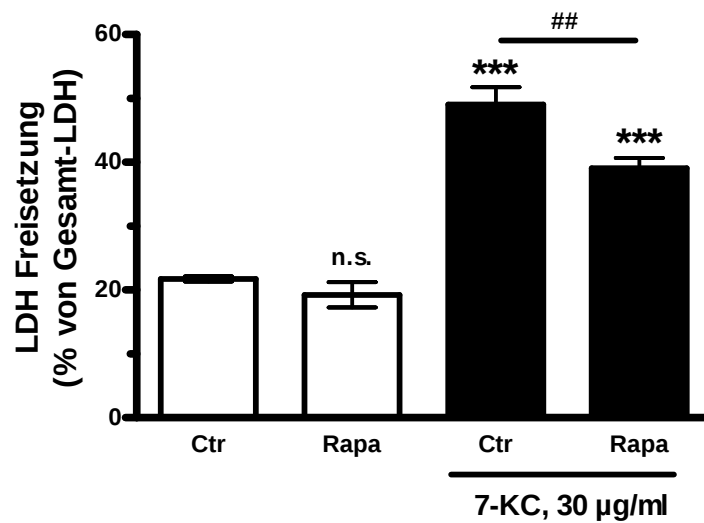


Abbildung 48: Rapamycin vermindert den 7-KC-induzierten Zelltod. Gleiches Experiment wie Abbildung 44 jedoch wurden Zellen mit 7-KC und Rapamycin gleichzeitig behandelt und die Zytotoxizität bereits nach 24 h Behandlungszeit gemessen. Der Graph zeigt eine repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten in Dreifach-Werten (MW +/- SEM; ***: $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ vs. Ctr; ##: $p < 0,01$ vs. Ctr + 7-KC; 1-way-ANOVA).

Im Umkehrschluss müsste die Inhibition der Autophagie den Zelltod nach 7-KC-Behandlung verstärken. Da eine Vorbehandlung mit dem Autophagie-Inhibitor 3-MA weder diesen Effekt, noch den gegenteiligen erzielt hat, wurde ein alternativer Weg der Autophagie-Inhibition gewählt. Durch RNA-Interferenz wurde das für die Autophagie-Einleitung essentielle Protein ATG5 herunterreguliert und anschließend der 7-KC induzierte Zelltod durch Annexin-V-PE / 7-AAD-Färbung in FACS-Analysen gemessen (Abbildung 49). Dazu wurden EA.hy-Zellen mit siRNA gegen ATG5 oder einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und nach zwei Tagen für die Überprüfung der Herunterregulation lysiert oder für 24 h mit 7-KC behandelt. Die Lysate wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen humanes ATG5 und GAPDH entwickelt. Dabei zeigte sich eine deutliche Herunterregulation der ATG5-Expression, wohingegen die Kontroll-siRNA behandelten Zellen ATG5 vergleichbar zu unbehandelten Zellen exprimieren. Die mit 7-KC behandelten Zellen wurden nach 24 h mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt, fixiert und das Ausmaß des Zelltods in FACS-Analysen vermessen. Wie in den vorigen Experimenten erhöhte die 7-KC-Behandlung deutlich die Zahl der spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen, während die Zahl der frühapoptotischen Zellen in unbehandelten verglichen mit 7-KC behandelten Zellen nur um jeweils 1-2 %-Punkte schwankte. Im Vergleich der Kontroll-siRNA behandelten mit den ATG5-siRNA behandelten Zellen konnte allerdings nach 7-KC-Behandlung eine signifikante Erniedrigung der

nekrotischen / spätapoptotischen Zellen durch die ATG5-siRNA-Behandlung festgestellt werden. Im Gegensatz zum Zytotoxizitätstest nach Vorbehandlung mit 3-MA, hatte die Inhibition der Autophagie einen lindernden Effekt auf den 7-KC-induzierten Zelltod.

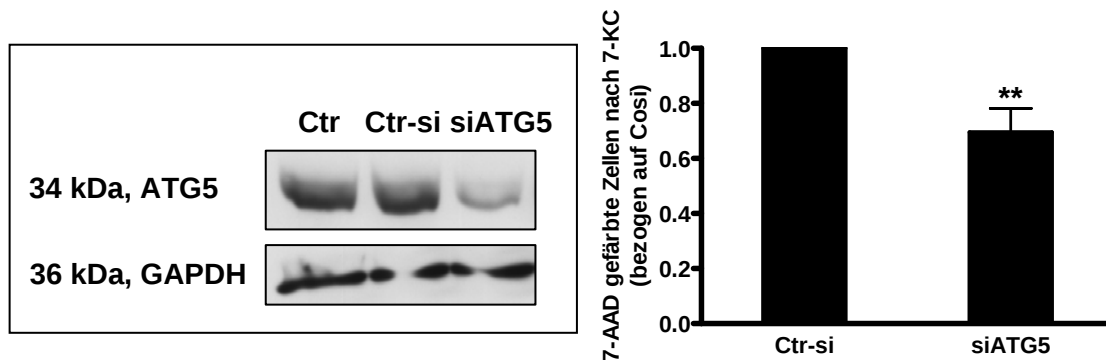


Abbildung 49: Autophagie-Inhibition durch ATG5-siRNA vermindert den 7-KC induzierten Zelltod. EA.hy 926-Zellen wurden mit siRNA gegen ATG5 (siATG5) und unspezifischer siRNA (Ctr-si) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für Western Blot Analysen lysiert oder für 24 h mit 7-KC (30 µg/ml) behandelt. Die Lysate wurden per SDS-Gelelektrophorese getrennt, auf eine Membran geblotet und mit Antikörpern gegen humanes ATG5 und humane GAPDH analysiert (links). Die 7-KC behandelten Zellen wurden mit Annexin-V/PE und 7-AAD gefärbt und im FACSCalibur-Zytometer mit den entsprechenden Ex / Em-Wellenlängen (PE=488/575 nm; 7-AAD=488/647 nm) detektiert. Auswertung des prozentualen Anteils 7-AAD positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen bezogen auf 10.000 gemessene Events. Darstellung als relativer Anstieg der 7-AAD-positiven Zellen durch 7-KC-Behandlung, bezogen auf den Anstieg Ctr-si-transfizierter Zellen. Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung von fünf unabhängigen Experimenten (MW +/- SEM; **: p<0,01 vs. ctr-si).

PON2 kann Endothelzellen nicht gegen 7-KC induzierten Zelltod schützen, da dieser nicht über den intrinsischen Apoptose-Signalweg über Mitochondrien ausgelöst wird. Stattdessen induziert 7-KC Zelltod über einen bisher nicht geklärten Mechanismus, dem die Auslösung von Autophagie zugrunde liegt, oder bei dem parallel Autophagie ausgelöst wird. PON2 scheint damit spezifisch vor zwei Formen der Apoptose zu schützen: Vor der ER-Stress vermittelten und vor Apoptose, die über eine Erhöhung des Superoxid-Gehalts in den Mitochondrien Cardiolipin peroxidiert und damit Cytochrom C freisetzt und die Caspase-Kaskade aktiviert.

5.2.5 Störungen der Kalzium-Homöostase regulieren die PON2-mRNA Expression

Ihre anti-apoptotische Wirkung bildet höchstwahrscheinlich die Basis für die anti-arteriosklerotischen Effekte der PON2. Eine spezifische pharmakologische Regulierung könnte deshalb therapeutisch interessant sein. Bisher sind jedoch keine Substanzen bekannt, die die Expression, die Aktivität oder Stabilität des PON2-Proteins beeinflussen können.

Trotz PON2-Promoter-Aktivierung durch Thapsigargin, konnte PON2 nicht gegen die Thapsigargin-induzierte Caspase-Aktivierung schützen ¹⁶³, was auf eine Regulierung der Aktivität von PON2 durch Thapsigargin hindeutete. Um die Eigenschaften dieser Regulierung zu untersuchen, wurde zunächst der Effekt von Thapsigargin auf die PON2-mRNA Expression untersucht. Dabei wurde der Effekt von Thapsigargin mit dem Effekt von anderen Kalzium-Haushalt störenden Reagenzien verglichen, darunter auch das PON2-Substrat 3oxoC12-Homoserinlaktat ¹⁶² und das Kalzium-Ionophor A23187. Dazu wurden EA.hy-Zellen 16 h mit Thapsigargin, 3oxoC12 oder A23187 behandelt und die Expression der PON2-mRNA durch qRT-PCR-Analysen bestimmt (Abbildung 50). Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der PON2-mRNA auf ca. 40 % des Basalwertes nach den Behandlungen mit allen Kalzium-Haushalt beeinflussenden Reagenzien. Die Reduktion der PON2-mRNA zwischen den einzelnen Substanzen unterschied sich nicht signifikant.

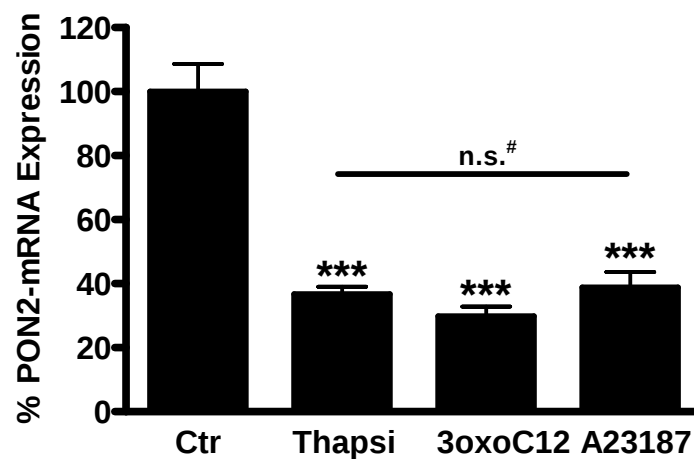


Abbildung 50: Störungen der Kalzium-Homöostase durch verschiedene Stimuli reduzieren die PON2-mRNA in EA.hy-Zellen. EA.hy 926-Zellen wurden für 16h mit Thapsigargin (Thapsi; 10 nM), N-(3-oxo-Dodecanoyl)-L-Homoserin-Laktat (3oxoC12; 100 µM), dem Kalzium-Ionophor A23187 (10 µM) oder unbehandelt belassen. Nach Extraktion der mRNA wurden die mRNA-Expression mit spezifischen Primern für PON2 durch qRT-PCR überprüft. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung mehrerer unabhängiger Experimente (n = 4-5, MW +/- SEM) jeweils bezogen auf die PON2-mRNA-Expression von unbehandelten Zellen (***: p<0,001 vs. Ctr; n.s.#: p>0,05 Thapsi vs. 3oxoC12 vs. A23187; 1-way-ANOVA).

Reduzierte mRNA-Expression bei deutlicher Aktivierung des entsprechenden Promoters deutet stark auf Regulation der PON2 mRNA-Stabilität durch Kalzium hin. Arbeiten dieser Gruppe belegten zudem einen aktiven Abbau der PON2-mRNA nach Thapsigargin-Behandlung ¹⁶³. Die mRNA gliedert sich dabei in drei Bereiche, die ein Kalzium-sensitives Element enthalten könnten, die 5'- oder 3' untranslatierten Regionen (5'- bzw. 3'UTR) oder den kodierenden Bereich (cds; *coding sequence*). Um den entsprechenden, für die Destabilisierung der mRNA verantwortlichen Teil der mRNA zu identifizieren, musste zunächst die 3'UTR in einer 3'RACE-PCR kloniert werden (siehe Kapitel 4.2.10).

Anschließend wurden die UTRs in Plasmide kloniert, die unter Kontrolle des PON2-Promoters für die *firefly*-Luziferase kodierten. Dabei enthielt ein Plasmid die 5'UTR von PON2 zwischen dem Promoter und der cds, ein zweites die 3'UTR hinter der Luziferase-cds und ein drittes sowohl die 5'UTR als auch die 3'UTR von PON2 (Abbildung 51 A). Um durch qRT-PCR-Analysen die Expression der Luziferase-mRNA unter Kontrolle der PON2-UTRs zu quantifizieren, wurden diese Plasmide zusammen mit einem *renilla*-Luziferase exprimierendem Plasmid in EA.hy 926-Zellen transfiziert und anschließend die RNA extrahiert. Um Verunreinigungen der präparierten mRNA durch die transfizierte Plasmid-DNA zu vermeiden, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt und dieser erfolgreich kontrolliert. Die Fusion der *firefly*-Luziferase mRNA mit der 5'- und / oder 3'-UTR der endogenen PON2-mRNA änderten weder deren Expression noch Stabilität (Abbildung 51, B).

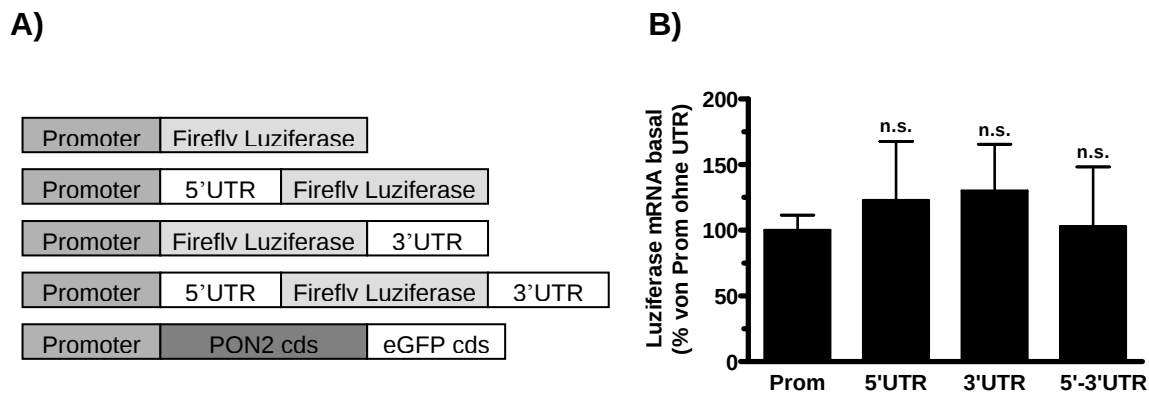


Abbildung 51: Die 5'- und 3'UTR der PON2-mRNA beeinflussen nicht die Expression der Luziferase-mRNA. A) Schematische Darstellung der pGL4-PON2-prom/UTR-Konstrukte. B) pGL4-PON2-prom-5'UTR, -3'UTR, -5'-3'UTR oder pGL4-PON2-prom wurden mit einem *renilla*-Plasmid zur Kontrolle in EA.hy-Zellen transfiziert und 24 h nach Transfektion die mRNA extrahiert und ein DNase-Verdau durchgeführt. Mit spezifischen Primern gegen Luziferase und *renilla* wurde die mRNA-Expression in qRT-PCR Analysen bestimmt. Die Werte wurden auf die jeweiligen *renilla*-Werte normiert und auf die pGL4-PON2-prom transfizierten Zellen bezogen. Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente (je n=2) +/-SEM (n.s.: p>0,05 vs. Prom; 1-way-ANOVA).

Um den Bereich der mRNA zu identifizieren, der auf die Kalziumstörung durch Thapsigargin reagiert, wurden die in Abbildung 51 transfizierten Zellen, 24 h nach der Transfektion mit Thapsigargin behandelt und die mRNA-Expression der Luziferase per qRT-PCR bestimmt (Abbildung 52 links). Dabei zeigten die Zellen, die mit dem 5'UTR-enthaltendem Plasmid transfiziert wurden eine Reduktion der mRNA nach Thapsigargin auf 80 % des Basalwertes. Nach der Transfektion von Plasmiden, die nur Promoter oder Promoter und 3'UTR enthielten, wurde die Luziferase-mRNA deutlich induziert. Die Anwesenheit der PON2-3'UTR veränderte diese Induktion nicht. In Zellen die neben dem Promoter die 5'- und die 3'UTR enthielten, waren die Schwankungen über die verschiedenen Experimente so groß, dass keine

Aussage getroffen werden konnte. Die Destabilisierung einer unspezifischen mRNA durch die PON2-5'UTR, deutete stark darauf hin, dass diese auch die PON2-mRNA nach Thapsigargin destabilisieren kann. Um zu zeigen, dass dieser Effekt durch die PON2-5'UTR spezifisch von Reagenzien ausgeübt wird, die den Kalziumhaushalt stören, wurden dieselben Experimente mit dem ebenfalls ER-Stress auslösendem Reagenz Tunicamycin wiederholt (Abbildung 52 rechts). Tunicamycin konnte zwar den PON2-Promoter induzieren, die Induktion unterschied sich aber nicht signifikant von den Induktionen in Zellen, die neben dem Promoter noch die 5'- oder 3'UTR enthielten. Da die PON2-5'UTR zu einem spezifischen Thapsigargin-vermittelten, und somit Kalzium-abhängigen Abbau einer unspezifischen mRNA führte, kann geschlussfolgert werden, dass diese auch für den Abbau der PON2-mRNA nach Thapsigargin verantwortlich ist.

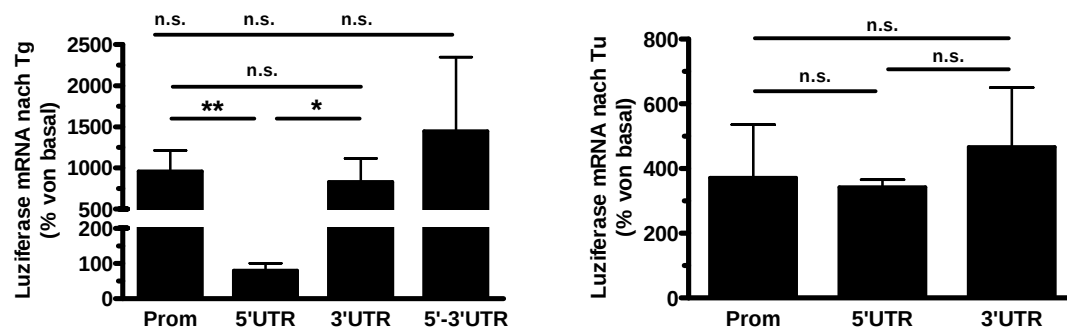


Abbildung 52: Die PON2-mRNA-5'UTR vermittelt den mRNA-Abbau nach Thapsigargin. Links: Gleiches Experiment wie Abbildung 51 jedoch wurden die Zellen 24 h nach Transfektion zusätzlich für 16 h mit Thapsigargin (Tg; 10 nM) oder DMSO zur Kontrolle behandelt. Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten (je n=2) +/- SEM (**: p<0,01; *: p<0,05; n.s.: p>0,05; 1-way-ANOVA). Rechts: Gleiches Experiment wie links, statt Thapsigargin wurden die Zellen für 16 h mit Tunicamycin (Tu; 10 µg/ml). Das Diagramm repräsentiert drei unabhängige Experimente mit Dreifach-Werten (MW +/- SEM; n.s.: p>0,05; 1-way-ANOVA).

Um zu überprüfen, ob auch der kodierende Bereich der PON2-mRNA durch Thapsigargin abgebaut wird, wurden die Experimente in EA.hy-PON2-GFP überexprimierenden EA.hy-Zellen mit qRT-PCR-Primern gegen PON2-GFP-mRNA wiederholt. Diese Zellen enthalten nur die kodierende Sequenz von PON2 ohne die UTR-Bereiche. Die Zellen wurden vor der Thapsigargin-Behandlung mit Actinomycin D behandelt um die Transkription zu inhibieren, da das PON2-GFP-Protein unter Kontrolle des CMV-Promoters steht, welcher durch Thapsigargin induziert werden kann und das Ergebnis verfälschen würde. In den qRT-PCR Analysen der PON2-mRNA (Abbildung 53) zeigte sich nach der Transkriptionsinhibition durch Actinomycin D ein leichter Rückgang der mRNA-Expression. Durch die zusätzliche Behandlung von Actinomycin D-behandelten Zellen mit Thapsigargin wurde die mRNA-Expression nur unwesentlich und nicht signifikant vermindert. Die kodierende Sequenz der PON2-mRNA vermittelt nicht den Abbau der PON2-mRNA durch Thapsigargin-Behandlung.

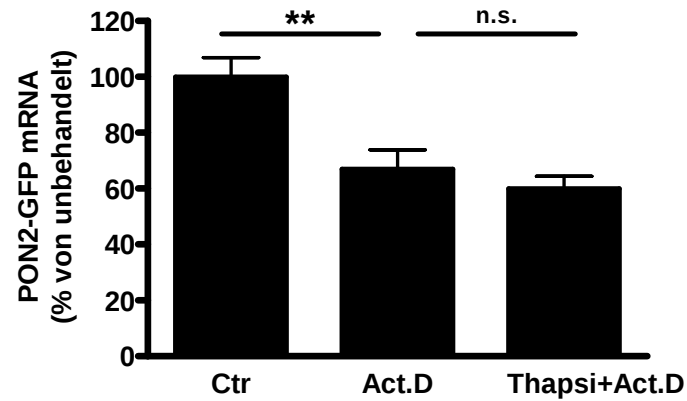


Abbildung 53: Die kodierende Sequenz der PON2-mRNA wird durch Thapsigargin-Behandlung nicht beeinflusst. EA.hy-PON2-GFP-Zellen wurden unbehandelt belassen oder 16 h mit Actinomycin D (Act.D; 5 µg/ml) alleine oder Actinomycin D und Thapsigargin (Thapsi; 10 nM) behandelt. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die PON2-mRNA mit spezifischen qRT-PCR Primern gegen PON2-GFP analysiert. Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente mit dreifach-Werten $\pm$ SEM (**: $p < 0,01$; n.s.: $p > 0,05$; 1-way-ANOVA).

Die nur 32 bp lange PON2-5'UTR enthält offenbar ein Kalzium-sensitives Element über welches die PON2-mRNA destabilisiert wird und dementsprechend auch nicht mehr transkribiert werden kann. Folglich führt dies zu verminderten PON2-Protein-Leveln und somit auch zum Verlust der von PON2 ausgeübten Aktivitäten.

6 Diskussion

6.1 *Der Anti-oxidative Mechanismus von PON2*

6.1.1 PON2 vermindert spezifisch intrazelluläres Superoxid

Während die ROS-Bildung in Organismen lange Zeit hauptsächlich mit schädlichen Effekten in Verbindung gebracht wurde, zeigte sich in jüngerer Zeit immer häufiger eine Beteiligung von ROS und RNS an physiologischen Signaltransduktionswegen¹⁷⁹. Diese These wird außerdem von klinischen Studien unterstützt in denen sogar eine erhöhte Mortalität nach Behandlung mit Antioxidantien in hohen Dosen beobachtet wurde¹⁸⁰⁻¹⁸². Ein erhöhtes anti-oxidatives Potential in der Zelle vermittelt also nicht ausschließlich positive Effekte, sondern variiert mit Intensität und Zelltyp. Auch die genaue Lokalisierung der anti-oxidativen Wirkung und die reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies die letztendlich abgebaut wird, sowie die Produkte dieses Abbaus spielen eine wichtige Rolle bei der Beurteilung von Veränderungen im intrazellulären anti-oxidativen Potential. Für PON2 konnten mehrfach anti-oxidative Effekt gezeigt werden^{26, 35, 53, 183}, doch beschäftigte sich keine dieser Studien mit der genauen Lokalisation, Spezifität oder Einbettung in Signalweiterleitungsprozesse dieser anti-oxidativen Aktivität. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PON2 spezifisch den intrazellulären Gehalt an Superoxid, nicht aber an Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid vermindern kann. Superoxid gilt als initiale reaktive Sauerstoffspezies, die selbst nur sehr kurzlebig ist und wenig schädliche Effekte auf Zellbestandteile vermittelt. Durch ihren Abbau zu H₂O₂ oder ihrer Reaktion mit NO zu Peroxynitrit bedingt es jedoch die Bildung von schädlicheren ROS / RNS. Im Hinblick auf die Entstehung von Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion stellt sich gerade die Bildung von Peroxynitrit auf zweierlei Weise problematisch dar. Zum einen peroxynitriert Peroxynitrit selbst unspezifisch Proteine und beeinträchtigt dabei deren Funktion, wodurch Zellen in die Apoptose geführt werden können. Zum anderen verringert es während seiner Bildung die Bioverfügbarkeit des Vasodilators NO. Auch der Abbau von Superoxid zum langlebigen und Zellmembran-gängigen H₂O₂ ist nicht weniger problematisch, da dieses in den Mitochondrien Cardiolipin peroxidieren kann und damit die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien induzieren kann, einen der Hauptstimuli für die Apoptose-Aktivierung in der Zelle. Die Apoptose von Endothelzellen und Makrophagen trägt auch erheblich zur Bildung von arteriosklerotischen Plaques bei. Die Fähigkeit von PON2 spezifisch Superoxid zu vermindern könnte seine in Mäusen beobachtete anti-arteriosklerotische Wirkung erklären¹⁸⁴.

6.1.2 PON2 vermittelt seine anti-oxidative Funktion nicht über Cytochrom C oder Superoxiddismutasen

Studien in SOD1- oder SOD2-defizienten Mäusen zeigten, dass mitochondriales Superoxid wesentlich schädlicher ist, als zytosolisches oder extrazelluläres Superoxid¹⁸⁵. So verstarben SOD2^{-/-}-Mäuse bereits im Neugeborenenzustand aufgrund von Kardiomyopathien und Defekten im Zitratzyklus sowie in der Elektronentransportkette und zeigten außerdem ein vermindertes Mitochondrienmembranpotential und erhöhte Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien. Schließlich führten vermehrte oxidative Schäden in den Mitochondrien zu einer geringeren Zellzahl und somit zu Fehlfunktionen in gewissen Gewebsteilen¹⁸⁶. PON2-defiziente Mäuse zeigten diesen Phänotyp nicht³⁵, jedoch wurde bisher noch nicht untersucht inwiefern sich murine und humane Zellen in subzellulärer Lokalisation, Expression und Superoxidspezifität unterscheiden. Für humane Endothelzellen konnte in früheren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe⁵³ und in dieser Arbeit eine Lokalisation im ER und in den Mitochondrien gezeigt werden. Da eine PON2-Defizienz zumindest in Mäusen keine derartig dramatischen Effekte zeigt wie eine SOD2-Defizienz, kann davon ausgegangen werden, dass PON2 auch in humanen Zellen nicht den Stellenwert von SOD2 im anti-oxidativen System der Zelle einnimmt. PON2 enthält im Gegensatz zu SOD auch keine redox-aktiven Übergangsmetalle und kann folglich, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, Superoxid nicht direkt abbauen, sondern verhindert vielmehr dessen Produktion in der Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran. Die Möglichkeit, dass PON2 die Aktivität der SOD2 in den Mitochondrien erhöht, wurde durch zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze in dieser Arbeit ausgeschlossen. PON2 und SOD2 ergänzen sich also im anti-oxidativen System der Mitochondrien. Dass PON2 gegenüber dem viel essentielleren SOD2 auch physiologisch oder pathophysiologisch relevant sein könnte, wurde jüngst gezeigt. So reduziert PON2 durch die Verminderung von mitochondrialem Superoxid den mitochondrialen Weg der Apoptose, ein Mechanismus, den sich auch einige Tumorzellarten zunutze machen⁷². Bezüglich der anti-arteriosklerotischen Wirkung wäre eine erhöhte Aktivität oder Expression von PON2 wünschenswert. Dies könnte im Hinblick auf erhöhte PON2-Level in einigen Tumorgeweben⁷² jedoch nachteilig sein und zu unerwünschten Wirkungen führen. Für eine mögliche pharmakologische Regulation der PON2-Expression oder -Aktivität, ist die Kenntnis der dahinter stehenden Mechanismen essentiell.

Ein möglicher Mechanismus der Reduktion des Superoxidgehalts an der inneren Mitochondrienmembran, ohne dabei H₂O₂ freizusetzen, wäre eine Rückoxidation des Superoxids zu molekularem Sauerstoff durch Cytochrom C. Dieses vermittelt seine anti-

oxidative Wirkung allerdings erst wenn es von der inneren Mitochondrienmembran dissoziiert im Intermembranraum der Mitochondrien vorliegt¹²². In dieser Arbeit konnte allerdings weder eine erhöhte Expression von Cytochrom C durch PON2 festgestellt werden, noch konnte eine Verminderung des Cytochrom C-Gehalts in der Zelle durch RNA-Interferenz den Superoxid vermindern Effekt einer PON2-Überexpression reduzieren. Eine Verminderung des Cytochrom C-Gehalts in der Zelle beeinträchtigt die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien jedoch beträchtlich, wodurch die Messungen eventuell nicht den Zustand unter normalen physiologischen Bedingungen wiedergaben. Auch in Koimmunopräzipitationen zeigte sich keine Wechselwirkung oder Assoziation von PON2 mit Cytochrom C. Eine Interaktion der beiden Proteine kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da bei *in vitro* Untersuchungen der Proteininteraktionen unter den Lysebedingungen eine Bindung der Interaktionspartner eventuell wieder gelöst worden wäre. Gegen einen Mechanismus in dem PON2 seine anti-oxidative Wirkung über Cytochrom C vermittelt, spricht auch der Befund, dass eine PON2-Überexpression die durch Rotenon induzierte Superoxidproduktion reduzieren kann. Rotenon führt zur Superoxidproduktion durch Komplex I an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran, Cytochrom C hingegen assoziiert an der Intermembranseite der inneren Membran an Komplex III. Eine Assoziation mit Komplex III konnte für PON2 nicht nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von möglichen Artefakten bei Immunopräzipitationsreaktionen, wie Lysebedingungen, Interferenz durch den Antikörper selbst oder einer geringen Stabilität der Interaktion, kann eine Assoziation von PON2 mit Komplex III nicht endgültig ausgeschlossen werden.

6.1.3 PON2 und Coenzym Q₁₀

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PON2 spezifisch die Superoxidbildung an der inneren Mitochondrienmembran vermindern kann. Isolierte Mitochondrienmembranen aus PON2-überexprimierenden Zellen konnten dabei Succinat-induziertes Superoxid vermindern, nicht aber α -Ketoglutarat-induziertes. Succinat dient als Substrat für Komplex II der Atmungskette, welcher Elektronen auf CoQ überträgt und somit den generellen Umsatz an Elektronen in der Atmungskette erhöht. Dadurch wiederum wird auch die Superoxidbildung in der Atmungskette gesteigert, wobei gegenwärtig noch kontrovers diskutiert wird, ob diese Superoxidbildung durch Komplex III oder reversen Elektronentransfer zu Komplex I bedingt ist^{96, 187, 188}. Mit der Reduktion der Superoxidbildung nach Hemmung von Komplex I durch Rotenon und Komplex III durch Antimycin, konnte PON2 die Entstehung von ROS an zwei unterschiedlichen Positionen in der Mitochondrienmembran vermindern. Durch die Inhibition

von Komplex III mit Antimycin wurde die Superoxidbildung an dessen QH₂-Bindestelle Q_o in der inneren Mitochondrienmembran über ein Semiquinon-Radikal induziert. Durch die Succinat-Behandlung wurde reverser Elektronentransfer in der Atmungskette zu Komplex I aktiviert. In diesem wird O₂⁻ nicht in der FMN-Gruppe von Komplex I produziert, sondern an der ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran gelegenen Komplex I-Q-Bindestelle ⁹⁶. Als Mechanismus wurde die Bildung kritischer Semiquinon-Radikale vorgeschlagen, die Elektronen direkt auf O₂ übertragen können ^{96, 112-114}. Sowohl die Befunde nach der Succinat-Behandlung, als auch die Befunde nach der Rotenon- oder Antimycin-Behandlung deuten darauf hin, dass die anti-oxidative Wirkung von PON2 durch eine Wechselwirkung mit oder Beeinflussung von Coenzym Q₁₀ (CoQ) vermittelt wird. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass PON2 an einen der Atmungsketten-Komplexe bindet, doch da CoQ für den Elektronentransfer zwischen Komplex I und III verantwortlich ist, findet sich in diesem Transporter die einzige Gemeinsamkeit der Superoxidquellen, die durch PON2 beeinflusst wurden.

Durch α -Ketoglutarat kann α -Ketoglutaratdehydrogenase (α KGDH) in der mitochondrialen Matrix unabhängig von CoQ Superoxid produzieren ¹¹⁷. Die in dieser Arbeit gemessene Superoxidbildung in Mitochondrienmembranen nach α -Ketoglutarat ist vermutlich durch die Assoziation der α KGDH an die Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran bedingt, wenn auch kleinere Verunreinigungen der Membranfraktion mit Matrixproteinen nicht ausgeschlossen werden können. PON2 beeinflusste diese von CoQ unabhängige Superoxidbildung nicht, sondern konnte nur die Superoxid-Generation aus CoQ-abhängigen Reaktionen vermindern. Die Rolle von CoQ bezüglich oxidativen Stresses in der inneren Mitochondrienmembran ist jedoch bipolar. Während es in der lipophilen Mitochondrienmembran anti-oxidativ wirkt, kann es an den Grenzflächen der Membran zur wässrigen Mitochondrienmatrix oder nach Initiation eines Redox-Zyklus durch andere ROS pro-oxidativ wirken und die Bildung von Superoxid fördern ¹²⁷. So kann nicht gesagt werden, ob PON2 die Superoxidproduktion, welche durch die pro-oxidative Aktivität von CoQ bedingt wird, vermindert oder ob CoQ die anti-oxidativen Effekte von PON2 vermittelt. Um die Rolle von Coenzym Q₁₀ in der PON2-vermittelten anti-oxidativen Aktivität aufzuklären, müsste das genaue Verhältnis der radikalischen Zwischenstufen einer CoQ-Oxidation in EPR-Analysen bestimmt werden. Ob PON2 möglicherweise die Rolle eines Isolators einnimmt, dessen Aufgabe es ist den Kontakt von radikalischen Zwischenstufen von CoQ mit Sauerstoff zu vermeiden um dadurch eine Superoxid-Produktion zu verhindern, könnte durch strukturelle Analysen geklärt werden. Die Möglichkeit einer solchen Isolationswirkung von

Proteinen wurde zwar theoretisch erarbeitet, konkrete Beispiele sind bisher allerdings nicht bekannt^{96, 189}. Eine Lokalisation von PON2 in der inneren Mitochondrienmembran konnte zwar funktionell gezeigt werden, doch könnten detaillierte Analysen der submitochondrialen Lokalisation und Orientierung durch Elektronenmikroskopie und biochemische Charakterisierung entscheidend zur Aufklärung des anti-oxidativen Mechanismus von PON2 beitragen. Eine Matrix-gerichtete Orientierung von PON2 könnte den Kontakt von radikalischen CoQ-Zwischenstufen mit der wässrigen Phase der Matrix unterbinden und auf diese Art die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid durch CoQ-Radikale verhindern.

6.1.4 Anti-oxidative Effekte von PON2 außerhalb der inneren Mitochondrienmembran

Diese Arbeit konzentrierte sich besonders auf den Mechanismus der anti-oxidativen Wirkung von PON2 in den Mitochondrien. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter ER-Stress im Endoplasmatischen Retikulum gewinnt jedoch zunehmend an Bedeutung¹⁹⁰. Da PON2 im ER lokalisiert vorliegt und seine Expression durch ER-Stress aktiviert wird, sollte in Folgeanalysen auch eine mögliche anti-oxidative Wirkung von PON2 unter ER-Stress untersucht werden. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass PON2, wie in den Mitochondrien, extern zugeführtes Superoxid nicht vermindern kann. Da CoQ jedoch auch in der Membran des ER vorkommt¹⁹¹, ist eine anti-oxidative Wirkung von PON2 durch eine Wechselwirkung mit CoQ in Mikrosomenmembranen durchaus wahrscheinlich. Auch die Superoxid-vermindernde Wirkung nach DMNQ-Induktion deutet auf eine mögliche Wirkung von PON2 in der ER-Membran hin. Generell konnten alle in dieser Arbeit beobachteten anti-oxidativen Effekte auf Wechselwirkungen mit Quinonen zurückgeführt werden. Der Superoxid produzierende Redox-Zyklus des Quinons DMNQ wird durch Ein-Elektronen-Reduktion durch Enzyme wie NADPH-Cytochrom P450-Reduktase in der Membran des ER oder NADH-Cytochrom b5-Reduktase in der äußeren Mitochondrienmembran initiiert. Um die Verminderung der Superoxidbildung durch PON2 an der äußeren Mitochondrienmembran und im ER untersuchen zu können, müsste nicht nur, wie bereits erwähnt, die Orientierung von PON2 an der inneren Mitochondrienmembran geklärt werden, sondern auch die bisher erfolgten Analysen mit DMNQ auf isolierte Mitochondrien und Mikrosomen ausgeweitet werden. ROS-Messungen in isolierten Mikrosomen gestalten sich jedoch technisch deutlich anspruchsvoller als in isolierten Mitochondrien, da bisher keine spezifischen ROS-Induktoren und Detektoren für das ER zur Verfügung stehen. Bereits die Isolation stellt deutlich höhere

Anforderungen an die Aufreinigung intakter Mikrosomen und gestaltet sich durch geringe Ausbeuten schwierig.

Die Verminderung von Superoxid, welches durch einen Redox-Zyklus entsteht, könnte auch auf eine direkte Interferenz von PON2 mit diesem Redox-Zyklus zurückzuführen sein. Dazu müsste der Effekt von PON2 auf Superoxid, welches durch alternative Redox-Zyklus-fähige Quinone wie Menadion produziert wird untersucht werden. Auch *in vitro*-Analysen mit rhPON2 oder angereichertem PON2-His₆, in denen der Redox-Zyklus durch DMNQ mit einem Elektronendonator wie NADH oder NADPH angeregt wird, könnten einen direkten Einfluss von PON2 auf den Redox-Zyklus in Quinonen analysieren.

6.2 Die Laktonase-Aktivität von PON2 ist unabhängig von der anti-oxidativen Aktivität

6.2.1 Die Histidin-Dyade His¹¹⁴ – His¹³³ ist für die Laktonase-Aktivität essentiell

PON1 ist das bisher am besten untersuchte PON-Protein. Während für PON1 eine Kristallstruktur beschrieben wurde, anhand derer diverse mechanistische Eigenschaften abgeleitet wurden ⁴⁹⁻⁵¹, ist über PON2 und PON3 weitaus weniger bekannt. Auch wenn Unterschiede in der Substratspezifität und Lokalisierung bzw. Sekretion der PONs beschrieben wurden ^{31, 44}, deutet ihre Homogenität auf dem Aminosäurelevel auf ähnliche enzymatische Mechanismen hin. Die für die enzymatische Laktonase-Aktivität von PON1 verantwortliche Histidin-Dyade konnte auch in PON2 identifiziert werden und scheint auch dort für die enzymatische Laktonase-Aktivität essentiell zu sein. In dieser Arbeit konnte in PON2-Varianten, in denen jeweils His¹¹⁴ oder His¹³³ durch Mutation ausgetauscht worden war, keine Laktonase-Aktivität mehr festgestellt werden. In Zellen, die PON2-H¹¹⁴Q überexprimierten, konnte sogar geringere Laktonase-Aktivität als in naiven Zellen beobachtet werden. Dies könnte entweder durch einen inhibierenden Effekt des überexprimierten mutierten PON2-Proteins auf die Aktivität der endogenen PON2 erklärt werden oder durch eine Substratbindung durch die mutierte Form, in der allerdings keine Hydrolyse des Substrats erfolgen kann. Letztere Hypothese deutet auch auf einen enzymatischen Mechanismus hin, bei dem die Histidin-Reste direkt an der Hydrolyse beteiligt sind und nicht nur an der Substratbindung im aktiven Zentrum, wie es für die Paraoxonase-Aktivität von PON1 postuliert wurde ¹⁹². Wie auch bei His¹¹⁵ in PON1 zeigte die Mutation des His¹¹⁴ in PON2 geringere Laktonase-Aktivität als die Mutation des His¹³³ bzw. His¹³⁴ in PON1 ⁵⁰.

PON1 vermittelt seine anti-arteriosklerotischen Eigenschaften über eine Bindung an HDL von wo aus es die Oxidation von LDL verhindern und Cholesterin Efflux aus Makrophagen steigern kann. Obwohl die His¹¹⁵ und His¹³⁴ PON1-Mutanten an HDL banden, zeigten sie keine anti-atherogenen Eigenschaften mehr, so dass diese auf die Laktonase-Aktivität zurückgeführt wurden^{44 51}. PON2 dagegen kann im Serum nicht detektiert werden und bindet nach bisherigem Erkenntnisstand nicht an HDL. Trotzdem zeigte eine PON2-Überexpression in Mäusen eine deutlich verminderte LDL-Oxidation und erhöhte ebenfalls den Cholesterin Efflux aus Makrophagen⁶⁸. Die einzige erwähnenswerte enzymatische Aktivität in PON2 ist die Laktonase-Aktivität, allerdings konnten auch für PON2 anti-oxidative Effekte gezeigt werden. In Anlehnung an die oben genannten Befunde aus Studien an PON1 konnte vermutet werden, dass auch PON2 seine anti-oxidativen Eigenschaften über die Laktonase-Aktivität vermittelt. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass PON2 seine anti-oxidative, Superoxid-vermindernde Aktivität trotz aufgehobener Laktonase-Aktivität in His¹¹⁴ und His¹³³-Mutanten unverändert ausüben kann. In PON2 scheinen die Laktonase- und die anti-oxidative Aktivität voneinander unabhängig, d.h. über unterschiedliche Mechanismen abzulaufen. Welche der beiden Aktivitäten von PON2 die anti-atherogenen Effekte vermittelt, bleibt in *in vivo* Analysen zu klären. PON2 hingegen liegt im Gegensatz zu PON1 intrazellulär vor, weshalb eine extrazelluläre Verminderung der LDL-Oxidation durch die Laktonase-Aktivität nicht infrage kommt. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass PON2 unabhängig von der Laktonase-Aktivität die Superoxidbildung vermindert, welche einen Hauptinitiationsfaktor der Atherogenese darstellt, könnte auch die anti-oxidative Aktivität von PON2 für die anti-atherogene Aktivität verantwortlich sein. Diese Möglichkeit wird durch den Befund gestärkt, dass die Reduktion der Superoxidbildung in den Mitochondrien auch für die vorher gezeigten anti-apoptotischen Eigenschaften von PON2 überexprimierenden Endothelzellen verantwortlich ist⁷². Apoptose spielt sowohl bei der Initiation, als auch bei der Manifestierung der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle. Der Initiation der Arteriosklerose liegt häufig eine endotheliale Dysfunktion oder der apoptotische Verlust des Endothels zugrunde, welche durch oxidativen Stress und die damit einhergehenden inflammatorischen Prozesse entstehen. Diese inflammatorischen Prozesse beinhalten auch die über NOX-vermittelte Makrophagendifferenzierung, bei der PON2 möglicherweise kompensatorisch hochreguliert wird⁶⁷. Aus diesen Gründen erscheint die Beteiligung der anti-oxidativen Aktivität von PON2 an deren anti-arteriosklerotischen Wirkung wesentlich wahrscheinlicher als die Beteiligung der davon unabhängigen Laktonase-Aktivität.

Es gibt allerdings keine Belege, dass die mutierten PON2-Proteine in der Zelle richtig gefaltet vorliegen. Die Expression und Lokalisation zeigt sich zwar im Vergleich zur PON2-GFP-Wildtyp Überexpression unverändert, doch dient dies allenfalls als Hinweis auf eine korrekte Faltung. Generell gilt es beim spezifischen Austausch von Aminosäuren in Proteinen einige Probleme zu beachten um mögliche Fehlinterpretationen auszuschließen^{193, 194}. Für mechanistische Studien werden Aminosäuren generell durch Aminosäuren ähnlicher Größe und Polarität ersetzt, welche aber nicht in der Lage sind, die entsprechende katalytische Funktion zu vermitteln. Auf diese Weise sollte der Effekt der Mutation möglichst lokal auf die entsprechende Aminosäure begrenzt bleiben. Allerdings können auch bei geringen Änderungen der Aminosäuren globale Effekte wie Veränderungen durch geringere Expression, Fehlfaltung oder Inaktivierung des Proteins nicht ausgeschlossen werden. Die lokalen von den globalen Effekten der Mutationen zu trennen gestaltet sich häufig schwierig¹⁹⁵. In dieser Arbeit konnte auf die Vorarbeiten durch Khersonsky *et al.* zurückgegriffen werden, die für diverse auch in dieser Arbeit für PON2 verwendeten Mutationen an PON1 Aminosäurebibliotheken anlegten⁵⁰. In dieser Arbeit wurden entsprechende Aminosäuren durch solche ersetzt, die sich auch in der e.g. Studie zu PON1 bewährt haben.

6.2.2 Auswirkungen der Mutationen katalytisch-inaktiver Aminosäuren in PON2

Für alle PONs konnte eine Kalzium-Abhängigkeit ihrer enzymatischen Aktivität gefunden werden⁵⁴. Asp²⁶⁹ bindet das katalytisch aktive Kalzium im PON1-Protein⁵⁰. Eine Mutation dieses Aminosäurerestes führte zu einer vollständig depletierten Laktonase-Aktivität von PON1, was die Autoren auf eine generelle Störung der Struktur des aktiven Zentrums oder einer generellen Störung der Proteinfaltung oder der Expression zurückführten. Die Mutation des analogen Aspartats für PON2 (Asp²⁶⁸) in dieser Arbeit führte ebenfalls zur Depletion der Laktonase-Aktivität des überexprimierten Proteins in EA.hy-Zellen. Das katalytisch aktive Kalzium, welches nach der Mutation entweder gar nicht mehr, mit veränderter Stabilität oder an veränderter Position gebunden wird, ist auch für die Laktonase-Aktivität von PON2 essentiell. Da die Banden des PON2-GFP-D²⁶⁸A Proteins im Western Blot jedoch deutliche Unterschiede zum PON2-WT-GFP-Protein in der elektrophoretischen Mobilität zeigten, sind generelle Effekte auf die Expression oder Faltung nicht auszuschließen. Erstaunlicherweise waren jedoch auch Zellen, die diese möglicherweise nicht mehr korrekt gefaltete PON2-Variante überexprimierten, immer noch in der Lage die intrazelluläre Superoxidproduktion zu vermindern. Diese Eigenschaft konnte durch keine der in dieser Arbeit eingeführten

Mutationen depletiert werden, was entweder argumentativ die vorgeschlagene Eigenschaft von PON2 als Isolator in der Mitochondrienmembran stärkt oder für eine einfache Wechselwirkung des PON2-Proteins mit einem Quinon spricht. Für eine solche Wechselwirkung dürfte nach den Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit kein komplexeres aktives Zentrum bzw. keine komplexere Aktivität des Proteins nötig sein. So könnte zum Beispiel schon die Aufnahme eines Elektrons durch einen Tyrosin-, Cystein- oder Methioninrests einen Redoxzyklus unterbrechen, wie er bei DMNQ¹²⁸ oder CoQ-Semiquinon-Radikalen⁹⁶ beobachtet wurde. Ob Aminosäurereste in PON2 vorhanden sind, die fähig wären ein Elektron aufzunehmen und die dabei entstehende radikalische Form durch entsprechende benachbarte Aminosäurereste zu stabilisieren, könnte nur durch die Aufklärung der 3D-Struktur von PON2 untersucht werden. Die für PON1 existierende Struktur eignet sich nur unzureichend für derartige Überlegungen, da für PON1 diese Superoxid-vermindernden Eigenschaften bisher nicht explizit gezeigt werden konnten. Für die Laktonase-Aktivität von PON2 kann der gleiche Mechanismus wie bei PON1 angenommen werden.

Aviram *et al.* zeigten, durch Mutationen von Cystein²⁸⁴, dass dieses in PON1 für die Verminderung der LDL-Oxidation essentiell ist⁴¹. Nach Aufklärung der Kristallstruktur zeigte sich jedoch, dass dieser Cystein-Rest im hydrophoben Kern des Proteins verborgen liegt und deshalb höchst unwahrscheinlich die anti-oxidative Aktivität beeinflussen könnte⁴⁹. Da sich im bisherigen Verlauf dieser Arbeit für PON2 ein anderer anti-oxidativer Mechanismus abzeichnete als für PON1 und bis jetzt nicht klar ist wie sehr sich das PON2-Protein strukturell vom PON1-Protein unterscheidet, wurde der Einfluss des Cys²⁸³ von PON2 auf den anti-oxidativen Mechanismus im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde das Cystein entweder durch Alanin oder durch Valin ersetzt. Es zeigte sich jedoch, dass PON2-GFP-C²⁸³A in den Zellen nicht exprimiert wurde, weshalb alle Analysen mit der C²⁸³V-Variante durchgeführt wurden. Während diese PON2-Variante ihre anti-oxidative Aktivität behielt, zeigte sie keine Laktonase-Aktivität mehr. Da der entsprechende Cystein-Rest vermutlich auch bei PON2 im hydrophoben Kern des Proteins verborgen liegt, ist eine direkte Beteiligung am Mechanismus der Laktonase-Aktivität äußerst unwahrscheinlich. Vielmehr dürften globale Effekte der Mutation auf die Proteinfaltung oder die Struktur des aktiven Zentrums die Depletion der Laktonase-Aktivität bedingen. Dass diese PON2-Variante trotzdem anti-oxidative Aktivität vermitteln konnte, deutet erneut auf einen einfachen Mechanismus hin, bei dem jedoch nicht das Cys²⁸³ an einer möglichen Elektronenaufnahme beteiligt ist.

6.2.3 Die Glykosylierung von Asn²⁵⁴ und Asn³²³ ist für die Laktonase-Aktivität von PON2 essentiell

Die PON-Proteine liegen in der Zelle glykosyliert vor. So konnte auch für PON2 gezeigt werden, dass es glykosyliert vorliegt⁵³, nicht aber an welcher Position. In dieser Arbeit wurden durch Mutationen von Asn²⁵⁴ und Asn³²³ diese als Glykosylierungsstellen identifiziert und der Einfluss auf die Laktonase-Aktivität und die anti-oxidative Aktivität untersucht. Während in unglykosyliertem PON1 die Laktonase-Aktivität um ca. 50 % zurückgeht¹⁹⁶, zeigte PON2-GFP-N^{254/323}A überhaupt keine Laktonase-Aktivität mehr. Dieses Ergebnis wurde jüngst von Stoltz *et al.* in CHO-Zellen, ebenfalls nach Mutation der entsprechenden Asparagine zu Glutaminen, bestätigt¹⁹⁷. Dass die in den unglykosylierten Mutanten beobachteten Effekte tatsächlich durch die fehlende Glykosylierung und nicht durch eine Fehlfaltung oder veränderte Lokalisierung der unglykosylierten Proteine bedingt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden. Deshalb erfolgte in dieser Arbeit eine Validierung der Laktonase-Aktivitäts-Messungen in Lysaten aus EA.hy-Zellen, die nachträglich enzymatisch deglykosyliert wurden. Die beobachtete erniedrigte Laktonase-Aktivität von un- oder deglykosyliertem PON2 könnte durch schlechtere Substratbindung infolge von strukturellen Veränderungen bedingt sein. Neben den Asparaginresten-253 und -323 enthält PON2 noch zwei weitere Asparaginreste an den Positionen 226 und 269. In PON1 befinden sich diese zum Zentrum des β -Faltblattpropellers gerichtet, wo eine Glykosylierung sehr unwahrscheinlich wäre. Nachdem Asn-254, -323 und -269 untersucht wurden, wurde auf eine Analyse des letzten Asparagins verzichtet, da die N^{254/323}A-Mutante bereits vollständig deglykosyliert vorlag. Wie auch in allen anderen PON2-Varianten hatte die fehlende Glykosylierung keinen Einfluss auf die anti-oxidative Aktivität von PON2.

6.2.4 Funktionelle Bedeutung des Serin- / Cystein³¹¹-Polymorphismus von PON2

Die Rolle des natürlichen PON2-Polymorphismus der Aminosäure 311 wird weiterhin kontrovers diskutiert. Während eine Meta-Analyse diverser klinischer Studien zum Serin- / Cystein-Polymorphismus der Aminosäure 311 in PON2 keine Effekte des Polymorphismus auf kardiovaskuläre Erkrankungen finden konnte⁴⁷, wurde in einer Studie zu den molekularen Effekten des Polymorphismus ein starker Einfluss auf die Laktonase-Aktivität des Proteins gefunden¹⁹⁷. In dieser Studie zeigte das transient überexprimierte PON2-Cys³¹¹ verminderte Laktonase-Aktivität von 3oxoC12 in CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) im Vergleich zu transient überexprimiertem PON2-Ser³¹¹. 3oxoC12 gilt nach bisherigem Erkenntnisstand als

das beste Substrat für PON2⁵⁴ und wird als Signalmolekül von *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien unter pathophysiologischen Bedingungen vor allem in der Lunge gefunden. Deshalb konzentrierten sich Stoltz *et al.* auf Atemwegsepithelzellen von menschlichen Spendern und fanden in Zellen, die homozygot für PON2-Cys/Cys³¹¹ waren eine deutlich erniedrigte Laktonase-Aktivität¹⁹⁷. In den hier vorliegenden Analysen dieser Arbeit wurden anhand des Vergleichs von PON2-Serin³¹¹ und PON2-Cystein³¹¹ überexprimierenden humanen Endothelzellen die Effekte des Polymorphismus eher im Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Atemwegsepithelzellen konnte in den Endothelzellen kein Unterschied in der 3oxoC12-Laktonase-Aktivität der beiden PON2-Varianten gefunden werden. Dies ist wahrscheinlich eher durch die Anwendung unterschiedlicher Messverfahren, als durch zellspezifische Effekte zu erklären. Während in dieser Arbeit die 3oxoC12-Hydrolyse direkt als initiale Enzymaktivität gemessen wurde, verwendeten Stoltz *et al.* ein Bio-Assay in dem die Laktonase-Aktivität zeitabhängig bestimmt wurde. Selbst wenn Stoltz *et al.* Recht haben sollten und PON2-Cys³¹¹ 3oxoC12 langsamer hydrolysiert als PON2-Ser³¹¹, konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede in der anti-oxidativen oder anti-apoptotischen Aktivität festgestellt werden. Da nach den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit die anti-oxidative und anti-apoptotische Aktivität von der Laktonase-Aktivität unabhängig sind, und die erstgenannten höchstwahrscheinlich auch für die anti-atherogenen Effekte verantwortlich sind, erklärt diese Feststellung auch auf molekularer Basis die Erkenntnisse der Metastudie von Wheeler *et al.*, die keine Effekte des PON2-Ser/Cys³¹¹-Polymorphismus auf kardiovaskuläre Erkrankungen feststellen konnte⁴⁷.

Zwar konnten in dieser Arbeit mehrere Aminosäurereste substituiert werden, die die Laktonase-Aktivität depletierten, jedoch keine einzige, die die anti-oxidative Aktivität beeinflusste. Die Laktonase-Aktivität wurde generell durch Aminosäuremutationen, welche die Gesamtproteinstruktur oder die Struktur des aktiven Zentrums beeinträchtigten könnten inhibiert, die anti-oxidative Aktivität blieb jedoch davon unbeeinflusst. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die voneinander unabhängigen Laktonase-Aktivität und anti-oxidative Aktivität von PON2, über dasselbe aktive Zentrum im Protein vermittelt werden. So könnte beispielsweise auch eine post-translationale Inaktivierung der Laktonase-Aktivität¹⁸³ die anti-oxidative Aktivität regulieren. Für eine mögliche pharmakologische Regulierung wäre die Unabhängigkeit der anti-oxidativen Aktivität von der Laktonase-Aktivität essentiell. Immunsupprimierte Patienten, wie z.B. Krebspatienten unter Chemotherapie, sind besonders anfällig für *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen. Für diese wäre eine Herunterregulation der anti-oxidativen und anti-apoptotischen Aktivität von PON2

in den Tumorzellen wünschenswert bei der die Laktonase-Aktivität erhalten bleibt. Dadurch könnte die 3oxoC12-vermittelte Virulenz der *Pseudomonas*-Bakterien deutlich vermindert werden. Bisher sind jedoch keine Substanzen bekannt, die eine Aktivität oder Expression von PON2 in jeglicher Form beeinflussen können.

6.3 7-Ketocholesterol

6.3.1 7-Ketocholesterol induziert nicht den mitochondrialen Apoptoseweg

7-Ketocholesterol ist ein Hauptbestandteil von oxLDL, von dem zytotoxische Eigenschaften in Zellen der Gefäßwand bekannt sind, die in starkem Zusammenhang mit der pro-arteriosklerotischen Wirkung von oxLDL stehen ^{9, 20}.

Für 7-Ketocholesterol wurde in glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur (SMCs) eine Steigerung des apoptotischen Zelltods gezeigt, die über eine Induktion des UPR-Signalwegs, JNK, NOX4, CHOP und eine Caspase-Aktivierung vermittelt wird ¹⁴. Damit spezifizierten die Autoren die Signalwege, die in SMCs nach 7-KC-Behandlung zu Apoptose führen und die bereits mehrfach zuvor deskriptiv berichtet wurden ^{13, 198, 199}. Auch in primären Endothelzellen (HUVEC) und anderen Gefäßwandzellen konnte durch die TUNEL-Methode, DNA-Fragmentierung und das Auffinden von fragmentierten und kondensierten Nuklei 7-KC-induzierte Apoptose gefunden werden ¹³. Dabei unterließen es die Autoren jedoch gerade bei HUVECs genau zwischen den Effekten von 7-Hydroxycholesterol und 7-Ketocholesterol zu unterscheiden und zeigten nicht für alle Messungen die notwendigen Kontrollen, um den Zelltodmodus zweifelsfrei als Apoptose zu identifizieren. Martinet *et al.* hingegen fanden Hinweise in SMCs, die gegen eine eindeutige Klassifizierung des 7-KC induzierten Zelltods als Apoptose sprachen, sondern eher auf eine komplexe Verzahnung verschiedener Zelltodwege hindeuteten ¹⁶.

Aufgrund der Signalwege, die 7-Ketocholesterol in SMCs induzierte ¹⁴, war es wahrscheinlich, dass PON2 diese pro-apoptotische Stimulation verringern und dadurch SMCs oder andere Gefäßwandzellen gegen 7-KC induzierten Zelltod schützen könne. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass PON2 ER-Stress induzierte Apoptose vermindern kann, indem es die JNK-vermittelte CHOP-Induktion und schließlich den mitochondrialen Apoptoseweg verringerte ⁷². In dieser Arbeit zeigte sich allerdings, dass 7-Ketocholesterol nicht diesen mitochondrialen Apoptoseweg auslöst. Zwar konnte nach 7-KC-Behandlung ein gewisser Anteil an Cytochrom C im Zytosol gefunden werden, doch da die Freisetzung des an die

innere Mitochondrienmembran assoziierten Cytochroms C, und somit des Hauptteils der Menge an Cytochrom C, noch nicht freigesetzt wurde, reichte der Stimulus vermutlich noch nicht für eine Caspase-Aktivierung aus. Eine Caspase-Aktivierung konnte dementsprechend in EA.hy-Zellen nach 7-KC-Behandlung nicht gefunden werden. Außerdem erfordert eine Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran die Peroxidation von Cardiolipin, welches nach der Peroxidation eine Konformationsänderung durchläuft und das gebundene Cytochrom C entlässt^{134, 135}. In EA.hy-Zellen, sowie in PON2-überexprimierenden EA.hy-Zellen konnte 7-KC jedoch Cardiolipin nicht peroxidieren, wodurch ein Hauptmerkmal der mitochondrialen Apoptose-Initiation ausblieb. Das mit steigender Zeit der 7-KC Behandlung zunehmend mehr ins Zytosol entlassene Cytochrom C stammt vermutlich aus dem Intermembranraum und konnte durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran freigesetzt werden. Um zu überprüfen, dass Cardiolipin wirklich nicht peroxidiert wurde, und die Messung nicht zum falschen Zeitpunkt oder mit den falschen Konzentrationen an 7-KC stattfand, müssen noch weiterführende Analysen mit verschiedenen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 7-KC durchgeführt werden. Der lipophile Charakter von 7-KC dirigiert dieses häufig in die Lipidschichten von Zell- und Organellenmembranen⁹, wodurch sich deren physikalischen Eigenschaften ändern. Dabei können sich auch Funktion und Struktur von membranassoziierten Proteinen ändern, so dass nach 7-KC Behandlung durchaus eine Cytochrom C-Freisetzung von der inneren Mitochondrienmembran ohne vorherige Cardiolipinperoxidation möglich scheint. Dies könnte erklären, dass in dieser Arbeit nach 7-KC-Behandlung eine leichte Cytochrom C-Freisetzung, jedoch keine Cardiolipinperoxidation gefunden werden konnte.

Da der für die Messung der Cardiolipinperoxidation verwendete Farbstoff N-Acridinorange, welcher an natives, nicht aber an peroxidiertes Cardiolipin bindet, ebenfalls lipophilen Charakter und lange lipophile Seitenketten trägt, könnte das 7-KC mit dem Farbstoff selbst assoziieren und durch falsch-negative Ergebnisse die Cardiolipinperoxidation verdecken. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da dazu ein hoher Überschuss 7-KC in der Zelle vorliegen müsste, um jegliche Bindung von NAO an Cardiolipin zu unterbinden.

6.3.2 7-Ketocholesterol-induzierter ER-Stress

Nachdem 7-KC in EA.hy-Zellen keine mitochondriale Apoptose auslösen konnte, vor der PON2 Schutz vermittelt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von 7-KC auf die Expression von verschiedenen ER-Stress Proteinen auf mRNA-Ebene untersucht. Dies erscheint sinnvoll, da PON2 vor ER-Stress induzierter Apoptose schützen konnte⁵³ und bereits gezeigt wurde, dass Cholesterin oder 7-KC den UPR in Makrophagen und SMCs aktivieren kann^{14, 177}. Im

Gegensatz zu SMC¹⁴ konnte in Endothelzellen keine Induktion, sondern eher eine Verringerung der NOX4-mRNA beobachtet werden. Da NOX4 das am stärksten in Endothelzellen exprimierte NOX-Protein ist²⁰⁰, wäre eine ähnliche Regulierung wie in SMCs wahrscheinlich gewesen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Endothelzellen anstatt der NOX4 möglicherweise ein anderes Homolog der NOX-Familie in den Signalweiterleitungsprozess eingeschaltet ist. Auch die GRP78-mRNA wurde in Endothelzellen durch 7-KC nur leicht (4-5-fach) induziert. Nach Behandlung mit den bekannten ER-Stress Induktoren Thapsigargin und Tunicamycin konnten in dieser Arbeitsgruppe GRP78-mRNA Steigerungen in EA.hy-Zellen um das 18-fache nach Tunicamycin und das 40-fache nach Thapsigargin gemessen werden. Im Falle von 7-KC kann also nur von einer leichten Aktivierung des UPR gesprochen werden. Pedruzzi *et al.* konnten auf Proteinebene eine Verdreifachung der GRP78-Level messen. Ob die in dieser Arbeit gefundene Steigerung der mRNA-Level in Endothelzellen auf Proteinlevel übertragen wird, sollen weiterführende Experimente zeigen. Sofern die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER durch den aktivierten UPR Signalweg nicht beseitigt werden kann, kommt es unter anderem zu einer andauernden und ansteigenden Stimulation des pro-apoptotischen Faktors CHOP, welcher schließlich die Apoptose der Zelle initiiert²⁰¹. Während die GRP78-mRNA schwach induziert wurde, konnte in EA.hy-Zellen ein deutlicher Anstieg der CHOP-mRNA nach 7-KC-Behandlung beobachtet werden. Dieser war zwar in EA.hy-Zellen verglichen mit der CHOP-mRNA-Induktion nach Tunicamycin-Behandlung geringer, zeigte sich jedoch in HUVECs wesentlich stärker. Auch in diesem Fall müssen Daten zur Proteinexpression die mRNA-Analysen ergänzen, doch lässt sich zumindest eine Beteiligung von CHOP am 7-KC induzierten Zelltod vermuten. PON2 verringerte die Tunicamycin-induzierte CHOP Expression, indem es die Aktivierung (=Phosphorylierung) der C-Jun N-terminalen Kinase JNK verringerte. In den hier durchgeführten Experimenten mit 7-KC jedoch konnte weder der JNK-Inhibitor SP600125 noch die PON2 Überexpression eine verringerte CHOP Induktion bewirken. Folglich scheint CHOP über die anderen Signalwege des UPR – PERK, IRE1 oder ATF6 – induziert zu werden. Da PON2 diese Signalwege nicht beeinflusst⁷², lässt sich erklären, warum eine PON2 Überexpression nicht gegen 7-KC induzierten Zelltod schützen konnte.

6.3.3 7-Ketocholesterol induziert Apoptose-unabhängigen Zelltod in EA.hy 926-Zellen

Die beobachtete mäßige Cytochrom C-Freisetzung in 7-KC behandelten Zellen genügte nicht, die Caspase-3/7 in EA.hy 926-Zellen zu aktivieren. Dieses Resultat ist in Anbetracht der vorliegenden Studien zur 7-Ketocholesterol induzierten Apoptose überraschend^{13, 14, 17, 198, 199} und sollte, um experimentelle Fehler auszuschließen, nochmals in Western Blot-Experimenten bezüglich der Procaspase-3-Prozessierung analysiert werden. Zudem sollte die Caspase-3/7 Aktivität auch in HUVECs untersucht werden, da der apoptotische Charakter des Zelltods in der immortalisierten Zelllinie möglicherweise verloren ging. So löste oxLDL in HUVECs Apoptose aus, aber einen Nekrose-ähnlichen Zelltod in der HUVEC-basierten Hybridoma-Zelllinie EA.hy 926²⁰². Auch eine zweite, von Caspase unabhängige Methode zur Erfassung der Apoptose, die Annexin-V- / 7-AAD-Färbung, zeigte keine Apoptose, allerdings einen deutlichen Anstieg des Zelltods in EA.hy-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen 7-Ketocholesterol. Erneut konnte eine PON2-Überexpression die Zellen nicht vor Zelltod schützen. Auch diese Analysen sollten zusätzlich in primären HUVECs durchgeführt werden. Ein Einfluss von PON2 muss dann durch RNA-Interferenz-Experimente untersucht werden, da eine stabile PON2-Überexpression in HUVECs nicht möglich ist. Nachdem PON2 in dieser Arbeit die Effekte von 7-KC nicht beeinflusste, konnte gezeigt werden, dass 7-KC allerdings die PON2-mRNA-Expression beeinflusste. Die PON2-mRNA-Expression reduzierte sich sowohl tendenziell in EA.hy-Zellen als auch deutlich signifikant in HUVECs nach einer höheren Dosis 7-KC. Dies erklärt sich vermutlich in der Tatsache, dass 7-KC den zytosolischen Kalziumgehalt, durch eine Steigerung des Kalzium-Influges, erhöht^{9, 12}. Wie in dieser Arbeit gezeigt, enthält die 5'-UTR der PON2-mRNA ein Kalzium-sensitives Element, über welches die PON2-mRNA destabilisiert wird. Auf diese Art vermitteln auch Thapsigargin, 3oxoC12 und das Kalzium-Ionophor A23187 ihre PON2-mRNA destabilisierende Wirkung¹⁶³.

Die Ursache für die fehlende protektive Funktion von PON2 gegen 7-Ketocholesterol induzierten Zelltod liegt also entweder im induzierten Zelltodsignalweg, gegen den PON2 nicht zu schützen vermag oder an der Kalzium vermittelten Degradation von PON2-mRNA und -Protein, oder beidem.

6.3.4 7-Ketocholesterol-induziert Autophagie

Nachdem durch die Laserscan-Mikroskop-Immunofluoreszenz-Aufnahmen (LSM) für die Cytochrom C-Freisetzung nach 7-KC-Behandlung in EA.hy-Zellen Autophagosomen

ähnliche Vakuolen beobachtet wurden, konnte ihre Bildung nach 7-KC-Behandlung durch die Einbindung von extern zugeführtem LC3-GFP am LSM gezeigt werden. Da das transfizierte LC3-GFP-Plasmid jedoch für Maus-LC3 kodierte, wurde die für die Autophagosomen-Bildung typische LC3-I / LC3-II Konversion¹⁴⁰ nach 7-Ketocholesterol und Rapamycin-Behandlung in Western-Blot-Experimenten gezeigt. Obwohl sehr hohe Dosen Rapamycin verwendet wurden, zeigten sich in den 7-KC behandelten Zellen deutlich stärkere LC3-II-Banden als in den Rapamycin behandelten. Rapamycin zeigte in niedrigeren Dosen schon nach 2 h LC3-Konversion²⁰³. Die schwache Konversion könnte durch den langen Inkubationszeitraum von 16 h bedingt sein, in dem die Autophagosomen bereits mit dem Lysosom zum Autolysosom verschmolzen sein könnten und sich anschließend wieder aufgelöst hätten. Dass dies in 7-Ketocholesterol behandelten Zellen noch nicht geschehen ist, könnte darauf hindeuten, dass in 7-Ketocholesterol behandelten Zellen die Verschmelzung der Autophagosomen mit den Lysosomen oder der Abbau der Autolysosomen inhibiert ist. Dies könnte auch erklären, dass in den 7-Ketocholesterol-behandelten Zellen der LC3-Gehalt stark zunimmt, während LC3-II in den Rapamycin-behandelten Zellen über dieselbe Zeit kaum akkumulieren kann. In weiterführenden Analysen könnte der Abbau der Autophagosomen durch Pepstatin A und E64d in 7-KC behandelten Zellen gehemmt werden um die eben genannte These zu überprüfen.

Die Rolle von Autophagie als Zelltod- oder Zellrettungsmechanismus wird bis heute kontrovers diskutiert, und kann bis dato nicht eindeutig geklärt werden¹⁴⁶. Auch in SMCs wurde nach 7-KC-Behandlung Autophagie beobachtet, und als Zelltodmechanismus diskutiert¹⁶, die Autoren konnten jedoch keine eindeutigen Hinweise auf einen autophagischen Zelltod finden. Vielmehr scheint es sich beim 7-KC induzierten Zelltod um einen komplexen Modus des Zelltods zu handeln, dessen genaue Abläufe noch weiter zu klären bleiben. Diese Befunde zeigen sich über verschiedene Gefäßwandzellen wie SMCs¹⁶ aber auch mikrovaskuläre Endothelzellen¹⁷ und Aorten-Endothelzellen in dieser Arbeit. Zwar konnten einige Hinweise auf Zelltod durch Makroautophagie gefunden werden, doch gerade für Säugerzellen sind viele Befunde umstritten, die Autophagie als Zelltodmechanismus postulieren¹⁴⁵. Um zu überprüfen ob es sich tatsächlich um autophagischen Zelltod handelt empfiehlt es sich, zunächst zu analysieren ob die Zellen überhaupt sterben, ob Autophagie induziert wird, und ob eine Induktion der Autophagie den Zelltod steigert bzw. eine Inhibition der Autophagie den Zelltod mindert¹⁴⁵. Neben der Analyse des 7-KC induzierten Zelltodes in EA.hy-Zellen durch Färbung mit dem Ausschluss-Farbstoff 7-AAD, wurde der Zelltod im experimentell weniger aufwendigen Zytotoxizitätstest getestet. Dabei zeigte sich, dass eine 48 h-Inkubation

ohne Mediumwechsel bereits Zelltod auslösen konnte, der vermutlich durch Nährstoffmangel bedingt ist. In Zellen unter Nährstoffmangel wird Autophagie ausgelöst um die Zellen weiter mit überlebenswichtigen Metaboliten zu beliefern. Wie im Zytotoxizitätstest gezeigt, erhöht sich das Zellsterben dramatisch wenn Autophagie durch den Inhibitor 3-Methyladenin (3-MA) gehemmt wird, bzw. reduziert sich, wenn Autophagie zusätzlich durch Rapamycin aktiviert wird. Werden die Zellen mit 3-MA und Rapamycin behandelt erhöht sich die Anzahl der toten Zellen. 3-MA hemmt die Bildung von Autophagosomen¹⁴⁶, so dass die Rapamycin-induzierte Autophagie die Zellen nicht mit neuen Metaboliten versorgen kann und diese absterben. Da der 7-KC-induzierte Zelltod durch eine Inhibition der Autophagie durch 3-MA nicht erniedrigt werden konnte, kann zunächst davon ausgegangen werden, dass 7-KC zwar Autophagie induziert, diese aber nicht den Mechanismus des Zelltodes darstellt. 3-MA hemmt allerdings neben Autophagie noch eine Reihe weiterer Zelltod-relevanter Prozesse, wie die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions Pore, sowie die Phosphorylierung von JNK und p38-Kinasen²⁰⁴, so dass die Effekte nach 3-MA Behandlung nicht zwingend auf Autophagie-Inhibition zurück geführt werden können. Im Umkehrschluss lieferte allerdings eine Autophagie-Induktion durch Rapamycin, die protektive Effekte gegen 7-KC induzierten Zelltod zeigte, erste Hinweise, dass Autophagie nach 7-KC Behandlung zum Schutz der Zellen aktiviert wurde und nicht um diese zu töten. Im Gegensatz dazu konnte die Inhibition der Autophagie mit siRNA gegen ATG5 (*autophagy related gene 5*) den 7-KC induzierten Zelltod deutlich vermindern. Das spräche wiederum gegen eine schützende Funktion der Autophagie nach 7-KC-Behandlung, wie man nach den Ergebnissen der Zytotoxizitätsmessung mit Rapamycin und 7-KC vermuten konnte, und für die Autophagie als Zelltodmechanismus nach 7-KC-Behandlung. Dem experimentellen Ansatz der RNA-Interferenz kann aufgrund der höheren Spezifität sicherlich mehr Gewicht zugesprochen werden, als der Einsatz des Autophagie-Inhibitors. Die Interpretation gestaltet sich aber generell schwierig, da der Prozess der Autophagie bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist und die beteiligten Faktoren und Proteine offenbar neben der Autophagie noch in diversen anderen Signalwegen beteiligt sind. So konnte erst kürzlich ATG5/ATG7-unabhängige Makroautophagie entdeckt werden²⁰⁵ aber auch Beteiligungen von ATG5 an nicht autophagischen aber apoptotischen Signalwegen wurde berichtet²⁰⁶. Neben seiner Rolle in der vermutlich zytoprotektiven Autophagie sensibilisiert ATG5 Zellen gegenüber Zelltod-induzierenden Substanzen²⁰⁷, wodurch der in dieser Arbeit beobachtete zytoprotektive Effekt nach ATG5-Herunterregulation in 7-KC behandelten Zellen erklärt werden könnte. In

Mäusehirnen und -lebern führte eine Inhibition der Autophagie zur Akkumulation von Proteinaggregaten, die ebenfalls zur Induktion von Zelltod führten^{208, 209}.

7-KC-Behandlung löst in EA.hy 926-Zellen Autophagie aus und führt die Zellen in den Tod. Weitere Analysen sind nötig, um die genaue Rolle der Autophagie im 7-KC vermittelten Zelltod zu klären. Ob Autophagie nach 7-Ketocholesterol das Überleben oder den Tod der Zellen vermittelt, ist dabei gerade im Hinblick auf arteriosklerotische Plaques besonders interessant. Der Tod weiterer Gefäßwandzellen würde unweigerlich zu einer Destabilisierung der Plaques führen, wohingegen das Überleben der Zellen die Stabilität der Plaques sichern könnte. So ist beispielsweise bekannt, dass ein Verlust der Autophagie in vaskulären SMCs zum Verlust von Collagen Type I führt, einem Faktor der die Plaquestabilität kritisch beeinflusst²¹⁰. Die in arteriosklerotischen Plaques gefundenen 7-Ketocholesterol-Mengen erreichen wiederum durchaus die hier und in den meisten Veröffentlichungen verwendeten Konzentrationen. Auch wenn PON2 keinen Einfluss auf den 7-Ketocholesterol induzierten Zelltod zeigte, stellt der Mechanismus dieses Zelltods ein interessantes Feld der kardiovaskulären Forschung dar.

6.4 Störung der Kalzium-Homöostase führt zum Abbau der PON2-mRNA

Diverse Substanzen, die alle zur Störung der Kalzium-Homöostase der Zelle führen, reduzierten die PON2-mRNA- und Proteinmenge. Es war allerdings unklar, welche RNase-Aktivität für diesen Abbau verantwortlich war. Von Kalzium ist bekannt, dass es RNA-Stabilität durch stabilisierende oder destabilisierende RNA-Bindeproteine wie HUR oder AUF1 regulieren kann¹⁵¹. Diese Proteine binden an die untranslatierten Regionen der mRNA und zeigen dadurch Übereinstimmung mit der Beobachtung dieser Arbeit, dass die Kalzium-sensitive PON2-mRNA-Degradation über die 5'-UTR vermittelt wird. Der Effekt der 5'UTR von PON2 auf die unspezifische Luziferase-mRNA war jedoch deutlich geringer als die Degradation der endogenen PON2-mRNA nach zytosolischem Kalzium-Influx. So könnten zusätzliche Faktoren oder Strukturen in der nativen Sequenz der PON2-mRNA den destabilisierenden Effekt der 5'-UTR nach Kalzium-Stimulus noch verstärken. In der PON2-GFP-Sequenz, die keine PON2-UTRs enthielt konnte ein zytosolischer Kalzium-Influx die mRNA jedoch nicht reduzieren. Die Sequenz der PON2-5'UTR-mRNA wurde nicht per RACE-PCR ermittelt, sondern den öffentlich zugänglichen Datenbanken entnommen. Sollte die tatsächliche 5'UTR sich in der Länge von der Sequenz in der Datenbank unterscheiden,

könnten auch mehrere Kalzium-sensible Elemente enthalten sein. Dementsprechend sind weitere Effekte der 5'UTR auf die Proteinexpression von PON2 nicht auszuschließen.

Wie 7-Ketocholesterol, führte auch die Behandlung mit anderen Substanzen, die die intrazelluläre Kalzium-Homöostase störten, zur Destabilisierung der PON2-mRNA in EA.hy-Zellen und nach zwei bis drei Tagen auch zu einer reduzierten PON2-Proteinexpression. Gerade im Fall des 3oxoC12 ist dies besonders bedeutend, da 3oxoC12 gleichzeitig das Haupts substrat für PON2 darstellt. So kann PON2 das von *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien als Signalmolekül verwendete 3oxoC12 hydrolysieren und damit die Virulenz der Bakterien verringern, wird aber gleichzeitig durch den von 3oxoC12 induzierten Kalzium-Influx durch den Abbau seiner mRNA in der Expression behindert. Zudem konnte in neuesten Analysen dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch der Proteinabbau und die Enzymaktivität durch Kalzium und 3oxoC12 beeinträchtigt werden^{54, 163, 183}. Doch nicht nur in dieser Hinsicht gestaltet sich Kalzium-Sensitivität von PON2 problematisch. So kommt es bei der Reperfusion nach einer Hirnischämie zu einem massiven Kalzium-Einstrom ins Zytosol unter Aktivierung von Calpainen, welche wiederum die Degradation des PON2-Proteins bewirken¹⁶³. Begleitet wird dieser Reperfusions-bedingte Kalzium-Einstrom von starker Superoxid-Freisetzung und durch die Reaktion mit Stickstoffmonoxid von der Bildung von Peroxynitrit, welches zu Protein-Nitrosylierung und Lipidperoxidation führt. Da PON2 in Endothelzellen spezifisch Superoxid vermindern kann, könnte die Kalzium-regulierte Degradation von PON2-mRNA und PON2-Protein zur ROS-Freisetzung bei der Reperfusion beitragen. Die 7-Ketocholesterol-induzierte Störung der Kalzium-Homöostase, die in SMCs bereits vier Minuten nach 7-KC-Zugabe gemessen werden konnte¹⁴, könnte auch die Ursache für den Abbau der PON2-mRNA und vermutlich auch des Proteins nach 7-KC-Behandlung sein.

Die anti-apoptotische Aktivität von PON2 könnte jedoch auch die Resistenz einiger Tumorarten gegenüber Zytostatika induzierter Apoptose vermitteln⁷². In diesen könnte wiederum die Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Einstroms zur Degradation von PON2 beitragen und auf diese Weise die Zellen empfänglicher für Apoptose machen. Damit wären Pharmaka, welche spezifisch in Tumorzellen die Kalzium-Homöostase stören könnten, ein potentieller Ansatzpunkt der pharmakologischen Forschung. Dabei müsste ein Effekt der Pharmaka auf das Endothel der Blutgefäße jedoch vermieden werden, um schädliche Nebenwirkungen zu unterbinden, wie sie bei der ischämischen Reperfusion auftreten. Aufgrund der vielfältigen Effekte, die eine Störung der Kalzium-Homöostase in der Zelle bewirkt, kann eine spezifische Herunterregulation der intrazellulären PON2-Spiegel auf diese

Weise wahrscheinlich nicht erreicht werden. Für eine spezifische Regulation des intrazellulären PON2-Gehalts sind weitere Analysen erforderlich.

7 Zusammenfassung

Das humane Enzym PON2 ist in eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse involviert und ist durch zwei Funktionen gekennzeichnet - eine enzymatische Laktonase-Aktivität und eine anti-oxidative Aktivität. Durch die Laktonase-Aktivität hydrolysiert PON2 vorwiegend das bakterielle Signalmolekül 3oxoC12. PON2 ist als Bestandteil des angeborenen Immunsystems anzusehen und trägt wahrscheinlich zur Immunabwehr gegen Infektionen mit den human-pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien bei. Durch die anti-oxidative Aktivität vermindert PON2 oxidative Schäden und verringert redox-abhängige pro-apoptotische Stimulation. Diese einzigartige Funktion von PON2 ist jedoch ambivalent zu betrachten, da hohe PON2-Spiegel zwar Arteriosklerose reduzieren können, aber im Verdacht stehen Tumorzellen zu stabilisieren.

In dieser Arbeit wurden die noch unbekannten Mechanismen und der Zusammenhang der enzymatischen und der anti-oxidativen Aktivität analysiert. In diesem Rahmen wurde gezeigt, dass PON2 spezifisch die Superoxidfreisetzung an Komplex I und III der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran reduzieren kann. PON2 veränderte dabei weder die Aktivitäten der Superoxiddismutasen noch die Cytochrom C-Expression. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass PON2 O_2^- nicht direkt abbaut, sondern vielmehr dessen Bildung verhindert. Diese Erkenntnisse implizieren, dass PON2 die anti-oxidative Aktivität über eine Beeinflussung des Quinon-Pools vermittelt. Anhand von verschiedenen Punktmutationen konnte gezeigt werden, dass die Histidinreste-114 und -133 für die Laktonase-Aktivität essentiell sind. Weiterhin wurden die Glykosylierungsstellen von PON2 identifiziert und gezeigt, dass die Glykosylierung, nicht aber der natürliche Polymorphismus Ser/Cys³¹¹ für die Laktonase-Aktivität von Bedeutung ist. Von besonderer Bedeutung ist, dass keine dieser Mutationen die anti-oxidative Aktivität beeinflusste, wodurch erstmals die Unabhängigkeit der beiden Funktionen von PON2 gezeigt werden konnte.

Es war bekannt, dass PON2 gegen intrinsische und ER-Stress-induzierte Apoptose schützt. Die Spezifität der anti-oxidativen / anti-apoptotischen Wirkung wurde hier an einem weiteren pathophysiologischen Modell untersucht. 7-Ketocholesterol (7-KC) ist der Hauptbestandteil des pro-arteriosklerotischen oxLDL und verursacht in Zellen des Gefäßsystems ER-Stress, oxidativen Stress und Apoptose. Unerwarteterweise konnte PON2 Endothelzellen nicht gegen den 7-KC-induzierten Zelltod schützen. Mehrere unabhängige experimentelle Ansätze belegen, dass 7-KC in Endothelzellen im Gegensatz zu Gefäßmuskelzellen den Zelltod über Autophagie und nicht über ER-Stress oder intrinsische Apoptose bewirkt. Weiterhin führt 7-

KC, wie auch 3oxoC12 und Thapsigargin zu einem Abbau der PON2-mRNA, die über die 5'UTR der PON2-mRNA vermittelt wird. Diese Arbeit vermittelt detaillierte mechanistische Einsichten in die Funktionen von PON2, die für ihre Rolle bei Arteriosklerose, in der körpereigenen Immunabwehr und bei Krebs entscheidend sind.

8 Literaturverzeichnis

1. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42(6):1075-1081.
2. Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21763-21772.
3. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(11):2255-2264.
4. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1256-1261.
5. Hodis HN, Crawford DW, Sevanian A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1991;89(2-3):117-126.
6. Smith LL, Johnson BH. Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med*. 1989;7(3):285-332.
7. Lyons MA, Samman S, Gatto L, Brown AJ. Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol in vivo: implications for dietary oxysterols. *J Lipid Res*. 1999;40(10):1846-1857.
8. Lyons MA, Maeda N, Brown AJ. Paradoxical enhancement of hepatic metabolism of 7-ketocholesterol in sterol 27-hydroxylase-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1581(3):119-126.
9. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;142(1):1-28.
10. Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(3-4):369-375.
11. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol*. 1996;34(2):193-211.
12. Zhou Q, Wasowicz E, Kummerow FA. Failure of vitamin E to protect cultured human arterial smooth muscle cells against oxysterol-induced cytotoxicity. *J Am Coll Nutr*. 1995;14(2):169-175.
13. Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(5):1190-1200.
14. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10703-10717.
15. Lizard G, Moisan M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J Pathol*. 1997;183(3):330-338.
16. Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light

- chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(12):2296-2301.
17. Luthra S, Dong J, Gramajo AL, Chwa M, Kim DW, Neekhra A, Kuppermann BD, Kenney MC. 7-Ketocholesterol activates caspases-3/7, -8, and -12 in human microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* 2008;75(3):343-350.
 18. Lee HS, Chang JS, Baek JA, Chung MY, Lee HC, Rhim BY, Sok DE, Rho MC, Kim YK, Kim K. TNF-alpha activates death pathway in human aorta smooth muscle cell in the presence of 7-ketocholesterol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(4):1093-1099.
 19. Kim YJ, Lee CS. Tyrosine Kinase Inhibitor AG126 Reduces 7-Ketocholesterol-Induced Cell Death by Suppressing Mitochondria-Mediated Apoptotic Process. *Neurochem Res.* 2009.
 20. Hitsumoto T, Takahashi M, Iizuka T, Shirai K. Clinical significance of serum 7-ketocholesterol concentrations in the progression of coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(4):363-370.
 21. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33(3):498-507.
 22. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998;213(1-2):149-157.
 23. Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Human liver paraoxonase (PON1): subcellular distribution and characterization. *J Biochem Mol Toxicol.* 1998;12(1):61-69.
 24. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):542-547.
 25. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):129-135.
 26. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44444-44449.
 27. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(2):146-157.
 28. Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res.* 2007;100(8):1104-1105.
 29. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(3):336-344.
 30. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta.* 2005;352(1-2):37-47.
 31. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46(6):1239-1247.

32. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys*. 2007;461(1):24-29.
33. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394(6690):284-287.
34. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002;106(4):484-490.
35. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29491-29500.
36. Ng CJ, Bourquard N, Hama SY, Shih D, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1368-1374.
37. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1991;286(1-2):152-154.
38. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2882-2891.
39. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1581-1590.
40. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(7):831-842.
41. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(10):1617-1624.
42. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11(4):383-388.
43. 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(27):24473-24481.
44. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(2):83-106.
45. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):2441-2447.
46. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation*. 2003;107(22):2775-2779.

47. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004;363(9410):689-695.
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(23):17527-17535.
49. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(5):412-419.
50. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7649-7656.
51. 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(11):7657-7665.
52. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(1):78-88.
53. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007;115(15):2055-2064.
54. Teiber JF, Horke S, Haines DC, Chowdhary PK, Xiao J, Kramer GL, Haley RW, Draganov DI. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun*. 2008;76(6):2512-2519.
55. Hoffmann N, Rasmussen TB, Jensen PO, Stub C, Hentzer M, Molin S, Ciofu O, Givskov M, Johansen HK, Hoiby N. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun*. 2005;73(4):2504-2514.
56. Lesprit P, Faurisson F, Join-Lambert O, Roudot-Thoraval F, Foglino M, Vissuzaine C, Carbon C. Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(11):1478-1482.
57. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun*. 2000;68(7):4331-4334.
58. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun*. 1999;67(11):5854-5862.
59. Wu H, Song Z, Givskov M, Doring G, Worlitzsch D, Mathee K, Rygaard J, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *lasI* and *rhII* quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology*. 2001;147(Pt 5):1105-1113.
60. Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis AJ, Bourquard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L852-860.

61. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998;62(1):36-44.
62. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis.* 2001;154(3):641-649.
63. Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J. Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes. *Diabetologia.* 2001;44(1):104-107.
64. Mackness B, McElduff P, Mackness MI. The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. *J Intern Med.* 2005;258(4):363-368.
65. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, Boda K, Marki-Zay J, Kalman J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):110-112.
66. Erlich PM, Lunetta KL, Cupples LA, Huyck M, Green RC, Baldwin CT, Farrer LA. Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 2006;15(1):77-85.
67. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(12):2052-2063.
68. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab.* 2006;89(4):368-373.
69. Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, Del Guercio L, Carbone F, Mazzaccara C, Morgante A, D'Armiento FP, D'Armiento M, Porcellini M, Sacchetti L, Bracale G, Salvatore F. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):594-600.
70. Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J Lipid Res.* 2009;50(5):870-879.
71. Shih DM, Lusis AJ. The roles of PON1 and PON2 in cardiovascular disease and innate immunity. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(4):288-292.
72. Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Amort J, Pautz A, H. L, Forstermann U, Horke S. Protector or traitor: a role for Paraoxonase-2 in apoptosis resistance. *submitted.* 2010.
73. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33435-33442.
74. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res.* 2007;100(8):1200-1207.
75. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* 2006;13(3):374-384.
76. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 2006;66(2 Suppl 1):S102-109.
77. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-789.

78. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005;111(14):1814-1821.
79. Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He A, Truong A, Baruch-Oren T, Berliner JA, Kirchgesner TG, Lusis AJ. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):2490-2496.
80. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*. 2004;164(3):341-346.
81. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
82. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(2):535-543.
83. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol*. 1990;39(3):399-405.
84. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978;201(4359):875-880.
85. Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15649-15654.
86. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527-605.
87. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153(3):1251-1256.
88. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258(5090):1898-1902.
89. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-1714.
90. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(6):338-349.
91. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, Uchida K, Kurokawa K. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett*. 1998;437(1-2):24-28.
92. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):335-344.
93. Valdivia A, Perez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordan J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem*. 2009;65(2):195-208.
94. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys*. 1996;29(2):169-202.
95. Crofts AR, Holland JT, Victoria D, Kolling DR, Dikanov SA, Gilbreth R, Lhee S, Kuras R, Kuras MG. The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc(1) complex account for the function of a dimeric complex? *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7-8):1001-1019.
96. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
97. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49064-49073.

98. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(4):347-366.
99. Votyakova TV, Reynolds IJ. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 2001;79(2):266-277.
100. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1977;180(2):248-257.
101. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80(5):780-787.
102. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1985;237(2):408-414.
103. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5557-5563.
104. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4127-4135.
105. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44784-44790.
106. Forman HJ, Azzi A. On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB J.* 1997;11(5):374-375.
107. Sazanov LA. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry.* 2007;46(9):2275-2288.
108. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7607-7612.
109. Hirst J, King MS, Pryde KR. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):976-980.
110. Takeshige K, Minakami S. NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J.* 1979;180(1):129-135.
111. Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett.* 2006;580(26):6105-6108.
112. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 2004;279(38):39414-39420.
113. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J.* 2002;368(Pt 2):545-553.
114. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29(1):89-95.
115. Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(30):22040-22051.

116. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*. 2004;382(Pt 2):511-517.
117. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 2004;24(36):7779-7788.
118. Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*. 2004;24(36):7771-7778.
119. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(2):200-214.
120. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*. 2000;351(Pt 1):183-193.
121. Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP. Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 6):1312-1315.
122. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*. 1998;423(3):275-280.
123. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1271(1):195-204.
124. Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem*. 1966;241(19):4353-4356.
125. Frei B, Kim MC, Ames BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4879-4883.
126. James AM, Sharpley MS, Manas AR, Frerman FE, Hirst J, Smith RA, Murphy MP. Interaction of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J Biol Chem*. 2007;282(20):14708-14718.
127. James AM, Smith RA, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys*. 2004;423(1):47-56.
128. Watanabe N, Forman HJ. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;411(1):145-157.
129. Tchivilev I, Madamanchi NR, Vendrov AE, Niu XL, Runge MS. Identification of a protective role for protein phosphatase 1gamma against oxidative stress-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283(32):22193-22205.
130. Northington FJ, Zelaya ME, O'Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, Hagberg H, Ferriero DM, Martin LJ. Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience*. 2007;149(4):822-833.
131. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P,

- Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16(8):1093-1107.
132. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997;91(4):443-446.
 133. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118.
 134. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova, II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):223-232.
 135. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1259-1263.
 136. Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:214-217.
 137. Martinet W, Agostinis P, Vanhoecke B, Dewaele M, De Meyer GR. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* 2009;116(9):697-712.
 138. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Guterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2007;9(2):218-224.
 139. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 2005;120(2):237-248.
 140. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovacs AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, Lopez-Otin C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoka K, Mautner J, Meijer AJ, Melendez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Munz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nurnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider

- C, Seglen PO, Seleverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F, Talbot NJ, Talloczy Z, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcategui NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zabirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4(2):151-175.
141. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004;304(5676):1500-1502.
 142. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):505-510.
 143. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*. 2004;263(1-2):55-72.
 144. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004;306(5698):990-995.
 145. White E. Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy*. 2008;4(4):399-401.
 146. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ*. 2009;16(1):12-20.
 147. Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med*. 2000;6(6):637-641.
 148. van der Velden AW, Thomas AA. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(1):87-106.
 149. Jansen RP. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):247-256.
 150. Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7025-7028.
 151. Misquitta CM, Chen T, Grover AK. Control of protein expression through mRNA stability in calcium signalling. *Cell Calcium*. 2006;40(4):329-346.
 152. Bell O, Gaberman E, Kilav R, Levi R, Cox KB, Molkentin JD, Silver J, Naveh-Many T. The protein phosphatase calcineurin determines basal parathyroid hormone gene expression. *Mol Endocrinol*. 2005;19(2):516-526.
 153. Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz JA. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol*. 2000;151(1):1-14.
 154. Santa-Coloma TA. Anp32e (Cpd1) and related protein phosphatase 2 inhibitors. *Cerebellum*. 2003;2(4):310-320.
 155. Hajarnis S, Schroeder JM, Curthoys NP. 3'-Untranslated region of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA contains multiple instability elements that bind AUF1. *J Biol Chem*. 2005;280(31):28272-28280.
 156. Blum JL, Samarel AM, Mestrlil R. Phosphorylation and binding of AUF1 to the 3'-untranslated region of cardiomyocyte SERCA2a mRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2543-2550.
 157. Sommer S, Cui Y, Brewer G, Fuqua SA. The c-Yes 3'-UTR contains adenine/uridine-rich elements that bind AUF1 and HuR involved in mRNA decay in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(3):219-229.

158. Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal*. 2004;16(10):1113-1121.
159. Sirenko O, Bocker U, Morris JS, Haskill JS, Watson JM. IL-1 beta transcript stability in monocytes is linked to cytoskeletal reorganization and the availability of mRNA degradation factors. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(4):328-339.
160. Sirenko OI, Lofquist AK, DeMaria CT, Morris JS, Brewer G, Haskill JS. Adhesion-dependent regulation of an A+U-rich element-binding activity associated with AUF1. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3898-3906.
161. Treiman M, Caspersen C, Christensen SB. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(4):131-135.
162. Shiner EK, Terentyev D, Bryan A, Sennoune S, Martinez-Zaguilan R, Li G, Gyorke S, Williams SC, Rumbaugh KP. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling. *Cell Microbiol*. 2006;8(10):1601-1610.
163. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, Kruger M, Li H, Forstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homeostasis. *Biochem J*. 2008;416(3):395-405.
164. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 2000;179(S 1-2):1-33.
165. Zhou Q, Wasowicz E, Handler B, Fleischer L, Kummerow FA. An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2000;149(1):191-197.
166. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3734-3737.
167. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(16):5727-5732.
168. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
169. Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM. Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum Mol Genet*. 2008;17(10):1373-1385.
170. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, Kleschyov AL, Munzel T. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(1):101-111.
171. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, Kleschyov AL, Munzel T. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic Res*. 2004;38(3):259-269.
172. 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 Radic Biol Med*. 2003;34(11):1359-1368.
173. Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett*. 1996;397(1):7-10.

174. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15038-15043.
175. Tavori H, Khatib S, Aviram M, Vaya J. Characterization of the PON1 active site using modeling simulation, in relation to PON1 lactonase activity. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(15):7504-7509.
176. Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguët C, Bessède G, Lemaire S, Solary E, Gambert P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J*. 1998;12(15):1651-1663.
177. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003;5(9):781-792.
178. Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(6):928-939.
179. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(10):1713-1765.
180. Linnane AW, Kios M, Vitetta L. The essential requirement for superoxide radical and nitric oxide formation for normal physiological function and healthy aging. *Mitochondrion*. 2007;7(1-2):1-5.
181. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2004;364(9441):1219-1228.
182. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):37-46.
183. Horke S, Witte I, Altenhofer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Forstermann U, Xiao J, Kramer GL, Haines DC, Chowdhary PK, Haley RW, Teiber JF. Paraoxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochem J*. 2006;426(1):73-83.
184. Reddy ST, Devarajan A, Bourquard N, Shih D, Fogelman AM. Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):405-408.
185. Wallace DC. Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet*. 2001;106(1):71-93.
186. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2278-2283.
187. Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A. Succinate is the controller of O₂/H₂O₂ release at mitochondrial complex I : negative modulation by malate, positive by cyanide. *J Bioenerg Biomembr*. 2009;41(4):387-393.
188. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:37-52.
189. Moser CC, Farid TA, Chobot SE, Dutton PL. Electron tunneling chains of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1096-1109.

190. Shimizu Y, Hendershot LM. Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2317-2331.
191. Kalen A, Norling B, Appelkvist EL, Dallner G. Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1987;926(1):70-78.
192. Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM. Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. *FEBS J*. 2005;272(9):2225-2230.
193. Peracchi A. Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(8):497-503.
194. Plapp BV. Site-directed mutagenesis: a tool for studying enzyme catalysis. *Methods Enzymol*. 1995;249:91-119.
195. Fersht AR, ed. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. 3rd ed. New York: W. H. Freeman & Co.; 1999.
196. Josse D, Xie W, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry*. 1999;38(9):2816-2825.
197. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusi AJ, Zabner J. A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35564-35571.
198. Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(3):928-934.
199. Miyashita Y, Shirai K, Ito Y, Watanabe J, Urano Y, Murano T, Tomioka H. Cytotoxicity of some oxysterols on human vascular smooth muscle cells was mediated by apoptosis. *J Atheroscler Thromb*. 1997;4(2):73-78.
200. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2004;109(2):227-233.
201. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):381-389.
202. Claise C, Edeas M, Chaouchi N, Chalas J, Capel L, Kalimouttou S, Vazquez A, Lindenbaum A. Oxidized-LDL induce apoptosis in HUVEC but not in the endothelial cell line EA.hy 926. *Atherosclerosis*. 1999;147(1):95-104.
203. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2008;181(3):497-510.
204. Tolkovsky AM, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*. 2002;84(2-3):233-240.
205. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009;461(7264):654-658.
206. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(10):1124-1132.
207. Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20722-20729.

- 208.** Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-889.
- 209.** Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-884.
- 210.** Jia G, Cheng G, Agrawal DK. Autophagy of vascular smooth muscle cells in atherosclerotic lesions. *Autophagy*. 2007;3(1):63-64.

9 Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Orginalarbeiten:

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhöfer S, Krüger M, Li H, Förstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against ER stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium-homeostasis. *Biochemical Journal*. 2008; 416 (3), 395-405.

Horke S, Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Goldeck M, Förstermann U, Xiao J, Kramer GL, Haines DC, Chowdhary PK, Haley RW, Teiber JF. Paraoxonase 2 is downregulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *Biochemical Journal*. 2010; 426 (1), 73-83.

Altenhöfer S, Witte I, Wilgenbus P, Teiber JF, Förstermann U, Horke S. Paraoxonase-2 reduces intracellular superoxide levels independent of its lactonase activity. *Journal of Biological Chemistry* in Revision.

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Pautz A, Li H, Förstermann U, Horke S. Protector or traitor: A role for paraoxonase-2 in apoptosis resistance. *Journal of Cell Science* submitted.

Abstracts:

Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Strand D, Förstermann U, und Horke S. Paraoxonase-2 reduces intracellular superoxide levels independent of its lactonase activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 377:R77

Horke S, Altenhöfer S, Witte I, Wilgenbus P, Förstermann U. Counter-regulation of paraoxonase-2 expression by endoplasmic reticulum stress and disturbance of Ca²⁺-homeostasis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 377:R183

Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Strand D, Förstermann U, und Horke S; Paraoxonase-2 reduces intracellular superoxide levels independent of its lactonase activity. 3rd international conference on paraoxonases, Los Angeles 2008.

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhöfer S, Krüger M, Li H, Förstermann U. Oppositional regulation of paraoxonase-2 expression by endoplasmic reticulum stress and disturbance of calcium-homeostasis. 3rd international conference on paraoxonases, Los Angeles 2008.

Horke S, Altenhöfer S, Witte I, Wilgenbus P, Förstermann U; Teiber JF. One way to escape mammalian host defence: the pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal 3OC12 inactivates human paraoxonase-2. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 379:R75

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Förstermann U, Horke S. When the protector becomes the traitor: PON2 weakens pro-apoptotic stimuli by its anti-oxidative mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 379:R76.

Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Daiber A, Förstermann U, und Horke S; Paraoxonase-2 reduces intracellular superoxide levels independent of its lactonase activity. The EMBO Meeting, Amsterdam 2009.

Horke S, Altenhöfer S, Witte I, Wilgenbus P, Förstermann U, Teiber JF. Pseudomonas aeruginosa knows how to defend: The human enzyme PON2 reduces pyocyanine-induced oxidative stress, but is inactivated by autoinducer 3OC12. The EMBO Meeting, Amsterdam 2009.

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Förstermann U, Horke S. When the protector becomes the traitor: Anti-apoptotic function of human PON2 by reduction of CHOP and mitochondrial O₂⁻. The EMBO Meeting, Amsterdam 2009.

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Förstermann U, Horke S. The pivotal role of superoxide: PON2 reduces apoptosis by impeding both CHOP induction at the ER and excess superoxide at the mitochondria. 17th European Cell Death Organisation Euroconference, Paris 2009.

Witte I, Alenhöfer S, Wilgenbus P, Förstermann U, Horke S. Cell type matters: 7-ketocholesterol induces autophagy but not apoptosis in vascular endothelial cells. 17th European Cell Death Organisation Euroconference, Paris 2009.

Alenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Förstermann U, und Horke S; Two functions of one enzyme: The lactonase activity of PON2 is independent from its anti-oxidative and anti-apoptotic role. *European Journal of Cell Biology* [Suppl 60] 89:S2-12.

Witte I, Alenhöfer S, Wilgenbus P, Förstermann U, Horke S. New role for an anti-atherosclerotic enzyme: PON2 confers apoptosis resistance and is overexpressed in tumors. *European Journal of Cell Biology* [Suppl 60] 89:MS13-1.

Alenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Förstermann U, und Horke S. Two functions of one enzyme: the lactonase activity of PON2 is independent from its anti-oxidative and anti-apoptotic role. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 381:R67.

Witte I, Alenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Förstermann U, Horke S. New role for an anti-atherosclerotic enzyme: PON2 confers apoptosis resistance and is overexpressed in tumors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl 1] 381:R335.