

Einfluss von WRN und WRN-assoziierten und – unabhängigen Basenexzisionsreparaturfaktoren auf Endothelzellfunktionen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kathrin Laarmann

aus Kirn

Düsseldorf, Juli 2019

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Gerhard Fritz
2. Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Werner-Syndrom Protein	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des Werner-Syndrom Proteins	2
1.1.1.1 DNA metabolische Prozesse.....	3
1.1.1.2 DNA-Reparatur	3
1.1.2 Mutationen des Werner-Syndrom Gens	4
1.1.3 Das Werner-Syndrom - altersassoziierte Symptome und Alterungsmodell.....	4
1.1.4 WRN und physiologische Alterung	6
1.2 Entstehung und Reparatur von DNA-Basenschäden	7
1.2.1 Entstehung von DNA-Basenschäden durch ROS und alkylierende Agenzien ...	7
1.2.2 Behebung von DNA-Basenschäden durch BER.....	9
1.3 Aufbau von Blutgefäßen	12
1.4 Endothelzellfunktionen und deren Dysregulation	13
1.4.1 Internalisierung von oxidiertem LDL	14
1.4.2 Endotheliale Zellmigration und Angiogenese	15
1.4.3 Leukozyten-Endothel Adhäsion und Inflammation.....	17
1.4.4 Barrierefunktion und vaskuläre Permeabilität	19
1.4.5 Stimulation purinergere Rezeptoren und erhöhte Ca ²⁺ -Freisetzung	20
1.5 Atherosklerose.....	21
1.5.1 Endotheliale Dysfunktion und die Initiation atherogener Prozesse	21
1.5.2 Manifestierung und Progression der Atherosklerose	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Kits	26
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur	29
2.1.6 Primäre Zellen und Zelllinien.....	29
2.1.7 Enzyme.....	29
2.1.8 Primer	29
2.1.9 Primäre und sekundäre Antikörper.....	30

2.1.9.1	Primäre Antikörper	30
2.1.9.2	Sekundäre Antikörper.....	31
2.1.10	Sonstiges.....	31
2.1.11	Lösungen und Puffer.....	32
2.1.12	Inhibitoren	34
2.1.13	siRNAs.....	34
2.1.14	Software	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellkultur	35
2.2.1.1	Zellkultivierung	35
2.2.1.2	Zellzahlbestimmung	36
2.2.1.3	Transfektion (RNA-Interferenz)	36
2.2.1.4	Zell-Behandlung	37
2.2.1.5	Viabilität und Toxizität	37
2.2.1.5.1	Alamar Blue Assay.....	37
2.2.1.5.2	Neutralrot Assay	38
2.2.1.5.3	LDH Assay.....	38
2.2.1.5.4	MTT Assay.....	39
2.2.1.6	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies.....	39
2.2.1.7	Zell-Zell Adhäsion	39
2.2.1.8	Endotheliale Zellmigration	40
2.2.1.9	Vaskuläre Permeabilität	40
2.2.1.10	Aufnahme von modifiziertem LDL.....	41
2.2.1.11	ATP-Gehalt	41
2.2.1.12	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung.....	42
2.2.1.13	Seneszenz	42
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.2.1	RNA-Isolierung.....	43
2.2.2.2	RNA-Konzentrationsmessung	43
2.2.2.3	cDNA Synthese.....	43
2.2.2.4	Quantitative Real-time PCR	44
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.2.3.1	Protein-Isolierung	45
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.2.3.3	Western Blot Analyse	46
2.2.4	Zytochemische Methoden.....	47
2.2.4.1	pH3-Färbung.....	47
2.2.4.2	F-Aktin Färbung	47

2.2.5	Statistische Auswertung.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Untersuchungen des Einflusses von WRN auf die Viabilität und auf endothelzellspezifische Funktionen	49
3.1.1	siRNA-vermittelter WRN- <i>kd</i>	50
3.1.2	Einfluss von WRN auf die Viabilität	50
3.1.3	Einfluss von WRN auf Endothelzellfunktionen: Ca ²⁺ -Freisetzung, acLDL- Aufnahme, Permeabilität, Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration	52
3.1.4	Analyse der mRNA- und Proteinexpression spezifischer Endothelzellenfaktoren	59
3.1.5	Einfluss von WRN auf Seneszenz.....	60
3.2	Untersuchungen des Einflusses von BER-Faktoren auf endothelzell-spezifische Funktionen.....	63
3.2.1	<i>Knockdown</i> der BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1	63
3.2.2	Einfluss der BER-Faktoren auf Endothelzellfunktionen: Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration.....	65
3.2.3	Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren in Abhängigkeit von ausgewählten BER-Faktoren	68
3.3	Untersuchungen des Einflusses von tBHQ und MMS auf die Viabilität und auf endothelzellspezifische Funktionen	69
3.3.1	Bestimmung schwach toxischer und moderat toxischer Konzentrationen von tBHQ und MMS.....	69
3.3.2	Untersuchung des Einflusses von tBHQ auf die Viabilität und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.....	71
3.3.3	Einfluss der tBHQ- und MMS-Behandlung auf Endothelzellfunktionen von WRN- und BER- <i>kd</i> Zellen: acLDL-Aufnahme, Ca ²⁺ -Freisetzung, Permeabilität, Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration	73
3.3.4	Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren nach Behandlung mit tBHQ und MMS in Abhängigkeit einzelner BER-Faktoren.....	79
3.3.5	Untersuchung des Aktivierungsstatus von Faktoren der DNA- Schadensantwort in WRN- <i>knockdown</i> Zellen.....	81
4	Diskussion	83
4.1	Einfluss von WRN auf Viabilität und Endothelzellfunktionen	83
4.1.1	Einfluss von WRN auf die Viabilität von Endothelzellen	84
4.1.2	Modulation endothelzellspezifischer Funktionen in Abhängigkeit von WRN	85
4.1.3	WRN-abhängige Induktion der Expression von endothelzellspezifischen Faktoren	91
4.1.4	Einfluss von WRN auf die Seneszenz	92
4.2	Einfluss einzelner Basenexzisionsreparaturfaktoren auf Endothelzellfunktionen.....	95
4.2.1	<i>Knockdown</i> -Effizienz einzelner BER-Faktoren	96
4.2.2	Modulation der Zell-Zell Adhäsion, Migration und mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren durch <i>knockdown</i> einzelner BER-Faktoren	96

4.3	Einfluss von tBHQ und MMS auf die Viabilität und auf Endothelzellfunktionen	100
4.3.1	Vergleich der Viabilität von Endothelzellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung sowie Induktion der ROS-Bildung und Expression von HO1 nach tBHQ-Behandlung	101
4.3.2	Vergleich der Modulation von Endothelzellenfunktionen in Abhängigkeit von WRN und BER-Faktoren nach tBHQ- und MMS-Behandlung.....	102
4.3.3	Wirkung von tBHQ und MMS auf die Expression endothelzellspezifischer Fakoren	107
4.3.4	Vergleich der Aktivierung der DNA-Schadensantwort nach tBHQ- oder MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN	108
5	Ausblick	111
6	Zusammenfassung	114
7	Literaturverzeichnis.....	117
8	Anhang	144
8.1	Weitere Abbildungen	144
8.2	Auflistung der den Abbildungen zugrunde liegenden Daten.....	145
8.3	Publikationen	151
8.4	Danksagung.....	152
8.5	Eidesstattliche Erklärung.....	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: WRN besteht aus mehreren funktionellen Einheiten.	2
Abbildung 1-2: Bildung von DNA-Basenschäden durch (A) tBHQ und (B) MMS.	8
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der „ <i>long-patch</i> “ BER.	11
Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand.	12
Abbildung 1-5: Endothelzellfunktionen in der Übersicht.	14
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel Adhäsion.	18
Abbildung 3-1: Schema zum Ablauf der Untersuchung von Endothelzellfunktionen.	49
Abbildung 3-2: <i>Knockdown</i> von WRN mit Hilfe der RNA-Interferenz.	50
Abbildung 3-3: Einfluss von WRN auf die Viabilität von Endothelzellen.	51
Abbildung 3-4: Untersuchungen der Ca ²⁺ -Freisetzung und der Aufnahme von acLDL in Abhängigkeit von WRN.	52
Abbildung 3-5: Permeabilitätsuntersuchungen von WRN- <i>kd</i> und wildtypischen EA.hy926 Zellen und HUVEC.	53
Abbildung 3-6: Analyse der Zell-Zell Adhäsion in Abhängigkeit von WRN.	54
Abbildung 3-7: Einfluss von WRN auf die endotheliale Zellmigration.	56
Abbildung 3-8: Untersuchung des mitotischen Index konfluenter Endothelzellen.	57
Abbildung 3-9: F-Aktin-Organisation, mRNA-Expression und Proteinexpression migrationsassoziiierter Faktoren in Abhängigkeit des WRN-Status.	58
Abbildung 3-10: Analyse der mRNA- und Proteinexpression endothelzellspezifischer Faktoren.	60
Abbildung 3-11: Einfluss von WRN auf die Seneszenz von Endothelzellen.	62
Abbildung 3-12: Proteinanalyse der Seneszenzmarker p16 und p21.	62
Abbildung 3-13: <i>Knockdown</i> von APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 mittels RNA-Interferenz.	64
Abbildung 3-14: Analyse der Zell-Zell Adhäsion von EA.hy926 Zellen und HUVEC mit <i>kd</i> einzelner BER-Faktoren.	65
Abbildung 3-15: Untersuchung der endothelialen Zellmigration hinsichtlich des Einflusses ausgewählter BER-Faktoren.	67
Abbildung 3-16: Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren in BER- <i>kd</i> Zellen.	68
Abbildung 3-17: Schema zum Ablauf der Experimente mit Substanzbehandlung.	69
Abbildung 3-18: Viabilität nach tBHQ- und MMS-Behandlung.	70
Abbildung 3-19: Viabilität von WRN- <i>kd</i> Zellen nach tBHQ-Behandlung.	71
Abbildung 3-20: Analyse der Bildung zellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nach tBHQ-Behandlung.	72
Abbildung 3-21: Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression antioxidativer Faktoren nach tBHQ-Behandlung.	72
Abbildung 3-22: Aufnahme von acLDL nach tBHQ- oder MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.	73
Abbildung 3-23: Ca ²⁺ -Freisetzung nach tBHQ-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.	74
Abbildung 3-24: Einfluss von tBHQ auf die Permeabilität von WRN- <i>kd</i> und Wt HUVEC.	74
Abbildung 3-25: Analyse der Zell-Zell Adhäsion nach <i>kd</i> von WRN oder einzelnen BER-Faktoren und nach Inkubation mit tBHQ und MMS.	75
Abbildung 3-26: Endotheliale Zellmigration in Abhängigkeit von WRN und/oder einzelnen BER-Faktoren nach Behandlung mit tBHQ und MMS.	77
Abbildung 3-27: Zellulärer ATP-Gehalt nach Behandlung mit tBHQ und MMS.	78
Abbildung 3-28: Analyse der mRNA- und Proteinexpression migrationsassoziiierter Faktoren nach Genotoxin-Behandlung.	79
Abbildung 3-29: Analyse der mRNA- und Proteinexpression endothelzellspezifischer Faktoren nach Genotoxin-Behandlung.	80

Abbildung 3-30: Aktivierung von an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine nach Behandlung mit tBHQ oder MMS.	82
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des postulierten Einflusses von WRN auf Endothelzellfunktionen.	94
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Einflusses von APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 auf die Adhäsion und Migration.....	100
Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Einflusses von tBHQ auf Endothelzellfunktionen in Abhängigkeit von WRN.	109
Abbildung 8-1: Western Blot Analysen nach <i>knockdown</i> von WRN und einzelnen BER-Faktoren.....	144
Abbildung 8-2: Western Blot Analysen zur Bestimmung der höchsten <i>knockdown</i> Effizienz.	144

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Auflistung der Primer.	30
Tabelle 2-2: Reaktionsansatz cDNA Synthese.	44
Tabelle 2-3: Reaktionsbedingungen während der cDNA Synthese.....	44
Tabelle 2-4: Reaktionsansatz quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	45
Tabelle 2-5: Reaktionsbedingungen quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	45
Tabelle 3-1: Schwach und moderat zytotoxische Konzentrationen von tBHQ und MMS 24 h nach Behandlung.	70
Tabelle 8-1: Restproteingehalte von WRN und einzelnen BER-Faktoren nach Transfektion.	145
Tabelle 8-2: WRN-abhängige Ca ²⁺ -Freisetzung nach tBHQ-Behandlung.	145
Tabelle 8-3: Daten zur Untersuchung des Einflusses von WRN und/oder tBHQ auf die Permeabilität.	145
Tabelle 8-4: Daten zur Aufnahme von acLDL in Abhängigkeit der WRN-Expression.....	145
Tabelle 8-5: Daten zur Zell-Zell Adhäsion in Abhängigkeit der Expression von WRN oder einzelnen BER-Faktoren.	146
Tabelle 8-6: Daten zur Zellmigration von WRN- bzw. BER-Faktor- <i>kd</i> Zellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung.	146
Tabelle 8-7: ATP-Gehalt von WRN- <i>kd</i> Zellen basal und nach tBHQ-oder MMS-Behandlung.	147
Tabelle 8-8: Daten zur Bestimmung des mitotischen Index in Abhängigkeit von WRN.	147
Tabelle 8-9: Daten zur mRNA-Expression von WRN bzw. BER-Faktor- <i>kd</i> Zellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung.	148
Tabelle 8-10: Daten zur WRN-assoziierten Seneszenz.	149
Tabelle 8-11: Viabilität von WRN- <i>knockdown</i> Zellen.....	150
Tabelle 8-12: Daten zur Viabilität von Endothelzellen nach MMS-Behandlung.	150
Tabelle 8-13: Daten zur Viabilität nach tBHQ- und MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.	151
Tabelle 8-14: Daten zur Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit tBHQ.	151

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	<i>volume-volume percentage</i> ; Volumenprozent
% (w/v)	<i>mass-volume percentage</i> ; Gewichtsprozent
AB	Alamar Blue
<i>Actb</i>	β-Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
AP	apurin/apyrimidin
AP1	Aktivatorprotein 1
APE1	<i>apurinic/apyrimidinic endonuclease 1</i>
ApoE ^{-/-}	<i>atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	<i>actin related proteins 2/3</i>
ATM	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Serin/Threonin-Kinase <i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
Autoparylierung	Autopoly(ADP)ribosylierung
BER	Basenexzisionsreparatur
BK	Bradykinin
BLM	Bloom-Syndrom Protein
bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
C	Cystein
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CCL2, <i>Ccl2</i>	<i>Cysteine-Cysteine motif chemokine ligand 2</i> ; Cystein-Cystein Chemokinligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>
<i>Cdh5</i>	Cadherin 5, VE-Cadherin
CDK	cyclin dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNS
CHK	Checkpointkinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cu ²⁺	Kupfer-Ion
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DiIAcLDL	<i>1,1-dioctadecyl-3,3,3-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated LDL</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid
dRP	Desoxyribosephosphat

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron
ECGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>
ECGS2	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDHF	<i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
EDN1, <i>Edn1</i>	Endothelin 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
eNOS (NOS3), <i>Nos3</i>	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> ; extrazellulär regulierte Kinase 2
E-Selektin <i>et al.</i>	endotheliales Selektin <i>et alii</i> ; und andere
F	Phenylalanin
F	<i>forward</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
Fapy	Formamidpyrimidin
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
Fe ²⁺	Eisen(II)-Ionen
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
G2-Phase	<i>gap 2-Phase</i>
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
GAPDH, <i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i> ; Guaninnukleotid-Austauschfaktoren
<i>Gpx1</i>	Glutathionperoxidase 1
GTPase	Guanosintriphosphat hydrolysierende Enzyme
H3	Histon 3
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
γH2AX	H2A histone family, member x an Serin139 phosphoryliert
HCAEC	<i>human coronary artery endothelial cells</i>
HCl	Salzsäure
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1	<i>hypoxia inducible factor 1</i> ; Hypoxie-induzierter Faktor 1
HO1, <i>Ho1</i>	Hämoxygenase 1
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	<i>homologous recombination</i> ; homologe Rekombination
HRDC	<i>helicase and RNaseD C-terminal</i>
HSaVEC	<i>human saphenous vein endothelial cells</i>
HUAEC	<i>human umbilical artery endothelial cells</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Nabelschnurvenenendothelzellen
IC	<i>inhibitory concentration</i> , inhibitorische Konzentration

ICAM, <i>Icam</i>	<i>intercellular adhesion molecule</i> , Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IL	Interleukin
iNOS/NOS2	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositoltriphosphat
K	Kaninchen
KAP1	<i>KRAB-associated protein 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
<i>kd</i>	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KDR/ <i>Kdr</i>	<i>kinase insert domain receptor</i>
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Kon	Kontrolle
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
L	Leucin
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i> ; Lipoprotein geringer Dichte
LIG1	Ligase 1
LOX1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1</i>
L-Selektin	Lymphozyten Selektin
M	Maus
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSR1	Makrophagen-spezifischer Scavenger Rezeptor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate je biologischem Replikat
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadeninukleotid
NADH	Nikotinamidadeninukleotid-Hydrat
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NEIL1	<i>Nei like DNA Glycosylase 1</i>
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NF-κB	<i>nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> , Kernlokalisationssequenz
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH Oxidase
NR	Neutralrot
Nrf2	<i>nuclear factor, erythroid 2 like 2</i>

NS siRNA	<i>Nonsilencing siRNA</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
O ₂ ⁻	Superoxidradikale
OGG1	8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1
·OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
oxLDL	oxidiertes LDL
8-oxo-dG	7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin
p-	phospho
p16	CDK-Inhibitor 2A
p21	CDK-Inhibitor 1
p38	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
p53	Tumorsuppressorprotein
PAI1	<i>plasminogen activator inhibitor</i> , Plasminogenaktivator Inhibitor
PARP1	Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase 1
Parylierung	Poly(ADP)ribosylierung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween20 [®]
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PECAM	<i>platelet and endothelial cell adhesion molecule</i>
PGI ₂	Prostacyclin
pH3	Serin 10 phosoryliertes Histon H3
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PLAT/tPA, <i>Plat/tpa</i>	<i>tissue-type plasminogen activator</i> ; gewebespezifischer Plasminogenaktivator
Polβ	Polymerase-β
PoMiCs	<i>post mitotic cellular senescence</i> , post-mitotische zelluläre Seneszenz
PP _i	anorganischem Diphosphat
prolif.	Proliferierend
P-Selektin	<i>platelet selectin</i> , Thrombozyten-Selektin
PTK2/FAK	Proteintyrosinkinase 2 / fokale Adhäsionskinase
P2XR	P2X-Ionenkanal-Rezeptoren
P2YR	P2Y G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
R	Arginin
R	<i>reverse</i>
RAC, <i>Rac</i>	<i>Rac family small GTPase</i>
RECQL	<i>RecQ like helicases</i>
RHOA, <i>RhoA</i>	<i>Ras homolog family member A</i>
RISC Komplex	<i>RNA-induced silencing Complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA-interference</i> , RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNS	<i>reaktive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reaktive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A2
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	Raumtemperatur
RTS	Rothmund-Thomson-Syndrom
SA-βG	seneszenzassoziierte β-Galactosidase

SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>Sele</i>	E-Selektin
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i> ; Einzelnukleotid-Polymorphismus
SR	Scavenger Rezeptoren
SUMOyliert	<i>small ubiquitin-related modifier</i> , kleiner Ubiquitin-verwandter Modulator
T	Thymin
tBHQ	tertiär-Butylhydrochinon
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween20 [®]
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM1, <i>Vcam1</i>	<i>vascular cellular adhesion molecule 1</i> ; vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> ; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
<i>Vim</i>	Vimentin
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
WAVE	<i>WASp-family verprolin-homologous protein</i>
WRN	Werner-Syndrom Protein
<i>Wrn</i>	Werner-Syndrom Gen; Gen, welches für WRN codiert
WRNi	WRN Inhibitor
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y	Tyrosin
Z	Ziege

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit 39 % die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, Erhebung 2015). Dabei gingen im Jahr 2015 13,8 % und 4,4 % der Todesfälle auf einen akuten Myokardinfarkt bzw. einen Schlaganfall zurück und 2,8 % starben in Folge einer zerebrovaskulären Erkrankung (Statistisches Bundesamt, Erhebung 2015).

Unter dem Begriff Herz-Kreislauf-Erkrankungen werden alle Erkrankungen des Herzens und des Blutgefäßsystems zusammengefasst. Daher zählt auch die Atherosklerose zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sie wird umgangssprachlich als Arterienverkalkung bezeichnet und ist u. a. durch eine Akkumulation von Fetten in der Innenseite der Gefäße sowie durch Gefäßverhärtung gekennzeichnet (Falk, 2006). Dies kann zu Gefäßverengungen führen und infolge zu Verringerungen des Blutflusses. Atherosklerose ist eine still fortschreitende Erkrankung, deren Symptome, meist durch die Entstehung einer Thrombose, im Erwachsenenalter auftreten. Klinische Komplikationen können je nach Lokalisation zur Erkrankung der koronaren Herzkranzgefäße, der Blutgefäße im Gehirn oder zu peripheren arteriellen Verschlusskrankungen führen. Dies kann einen Herzinfarkt, einen Schlaganfall und sogar den Verlust von Gliedmaßen zur Folge haben, da das jeweilige Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen unterversorgt ist. Des Weiteren kann es zu einer Unterversorgung von Organen kommen. Atherosklerotische Veränderungen in der Niere können Nierenfunktionsstörungen zur Folge haben, die unter Umständen zu Nierenversagen führen. Zu den Risikofaktoren gehören Rauchen, ungesunde Ernährung, Stress und einen Mangel an Bewegung. Genetische Faktoren können ebenfalls zur Entstehung einer Atherosklerose beitragen (Barquera *et al.*, 2015; Herrington *et al.*, 2016). Ein Beispiel hierfür ist das Werner-Syndrom. Werner-Syndrom Patienten haben eine Mutation im Werner-Syndrom Gen (*Wrn*), die zum Funktionsverlust oder zum vorzeitigen Abbau des Werner-Syndrom Proteins (WRN) führt. Ein häufiges Symptom des Werner-Syndroms ist die frühe Entstehung einer Atherosklerose, deren Folgen bereits vorzeitig zum Tod dieser Patienten führen können (Tsianakas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2013).

1.1 Werner-Syndrom Protein

Im Folgenden werden der Aufbau, die Funktion sowie Mutationen der WRN-Helikase und deren phänotypische Auswirkungen im Menschen näher erläutert.

1.1.1 Aufbau und Funktion des Werner-Syndrom Proteins

WRN gehört zur Familie der RecQ Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Helikasen. In Säugetieren sind fünf homologe RecQ Proteine bekannt: *RecQ like helicases* (RECQL) 1, RECQL2 (WRN), RECQL3 (Bloom-Syndrom Protein, BLM), RECQL4 (Rothmund-Thomson-Syndrom, RTS) und RECQL5 (Gray *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1995; Oshima *et al.*, 2018). Alle Mitglieder der RecQ-Familie besitzen eine Adenosintriphosphat- (ATP) abhängige 3'→5' Helikase mit ATPase-Domäne (Marino *et al.*, 2013; Kitano, 2014). Die fünf humanen RecQ Helikasen unterscheiden sich durch das Vorhandensein oder Fehlen weiterer Domänen (Matsuno *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu allen anderen RecQ Helikasen besitzt WRN am Amino- (N-) Terminus eine 3'→5' Exonuklease. Des Weiteren besteht WRN aus einer RecQ Carboxy- (C-) terminalen Domäne, mit der das Protein an die DNA bindet. Darauf folgt die HRDC- (*helicase and RNaseD C-terminal*) Domäne und eine Kernlokalisationssequenz (NLS), die sich am C-terminalen Ende des Proteins befindet und für die Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus verantwortlich ist (Abbildung 1-1) (Marino *et al.*, 2013; Kitano, 2014).



Abbildung 1-1: WRN besteht aus mehreren funktionellen Einheiten.

WRN ist eine ca. 162 kDa große DNA-Helikase bestehend aus 1432 Aminosäuren und ist aus mehreren funktionellen Einheiten zusammengesetzt. Am N-terminalen Ende ist die Exonuklease-Domäne (hellgrün) lokalisiert. Daran schließt die Helikase- (dunkelgrün) und die RQC-Domäne (gelb) an. Die HRDC-Domäne (blau) und die Kernlokalisationssequenz (NLS) (orange) befinden sich am C-terminalen Ende von WRN (modifiziert nach Hu *et al.*, 2005; Kitano *et al.*, 2010). C-: Carboxy; HRDC-Domäne: *helicase and RNaseD C-terminal* Domäne; N-: Amino; RQC: RecQ.

Die WRN-Exonuklease wurde zuerst 1997 von Moser und Mushegian beschrieben (Moser *et al.*, 1997; Mushegian *et al.*, 1997). In den darauf folgenden Jahren wurden die Domänen von WRN intensiv untersucht. Dabei fand man eine Reihe von Substraten der WRN-Exonuklease, die die Beteiligung von WRN an der DNA-Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur implizierten (von Kobbe *et al.*, 2003 a; Kitano *et al.*, 2010, von Kobbe *et al.*, 2003 b; Kitano *et al.*, 2007; Brosh *et al.*, 2002). Untersuchungen von Kitano *et al.* zeigten, dass die HRDC-Domäne *in vitro* keine DNA-Bindungseigenschaften besitzt. Daher dient sie vermutlich der Interaktion von WRN mit Proteinbindungspartnern (Kitano *et al.*, 2007). Andere Untersuchungen zeigten, dass die HRDC-Domäne wichtig für das Erkennen von Laser-induzierten sowie durch Mitomycin und Methylmethansulfonat (MMS) entstandenen DNA-Schäden ist (Samanta *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2005).

Die ATPase Domäne bindet und hydrolysiert ATP und ist somit die treibende Kraft für die ATP-abhängige DNA-Helikase (Gray *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997a). Letztere prozessiert ungewöhnliche DNA-Strukturen, die durch ihre sperrigen Formen die Replikation behindern. Es handelt sich dabei, ähnlich der Exonuklease-Substrate, um *Holliday* Struktur, *Bubble* Duplex und Guanin-Quadruplex DNA (Brosh *et al.*, 2002; Shen and Loeb, 2001).

1.1.1.1 DNA metabolische Prozesse

WRN trägt durch seine Beteiligung an diversen DNA metabolischen Prozessen wie der Transkription, Replikation und Rekombination sowie an der DNA-Reparatur und der Telomer-Erhaltung maßgeblich zu der Integrität der genomischen Stabilität bei (Larsen und Hickson, 2013). Mutationen in RECQL2 (WRN), RECQL3 (BLM), RECQL4 (RTS) rufen monogene Erkrankungssyndrome hervor, was die Wichtigkeit dieser Helikasen für die Erhaltung des Genoms unterstreicht. Die Beteiligung von WRN an verschiedenen DNA metabolischen Prozessen wird durch zahlreiche Studien belegt (Balajee *et al.*, 1999; Rodríguez-López *et al.*, 2002; Harrigan *et al.*, 2006; Shamanna *et al.*, 2016). So zeigte die Studie einer amerikanischen Arbeitsgruppe um Balajee und Bohr, dass lymphoblastoide Werner-Syndrom Zellen mit einer homozygoten WRN-Mutation eine um 40-60 % verringerte Transkriptionseffizienz im Vergleich zur Transkription von Zellen aus gesunden Kontrollgruppen mit intaktem WRN aufwiesen (Balajee *et al.*, 1999). WRN mutierte Fibroblasten wiesen im Vergleich zu normalen Lungenfibroblasten eine veränderte Prozessierung der normalen bidirektionalen DNA-Replikation auf, was zu der Bildung einer asymmetrischen Replikationsgabel führte (Rodríguez-López *et al.*, 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass humane Fibroblasten nach einer WRN-Depletion und anschließender Behandlung mit MMS oder Hydroxycarbamid längere Zeit benötigten, um den Zellzyklus zu beenden als ihre WRN-profiziente Kontrollgruppe (Sidorova *et al.*, 2008).

1.1.1.2 DNA-Reparatur

WRN ist an der Reparatur verschiedener DNA-Schäden beteiligt. Doppelstrangbrüche werden meist durch ionisierte Strahlung oder DNA quervernetzende Agenzien verursacht und durch die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) und homologe Rekombination (HR) repariert. HR und NHEJ unterscheiden sich in der Prozessierung der DNA-Doppelstrangbrüche. Bei der HR wird ein neuer DNA-Doppelstrang synthetisiert. Als Vorlage für den neuen Strang dient das Schwesterchromatid (Thompson und Schild, 2001). Die Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs findet daher nach erfolgter Replikation, in der Synthese- oder G2-Phase des Zellzyklus, statt. Im Gegensatz dazu werden beim NHEJ beide Enden der DNA-Bruchstellen zurückgeschnitten und im Anschluss ligiert. NHEJ findet während des gesamten Zellzyklus statt. Der initiale Schritt des NHEJ-Reparaturweges ist die Erkennung der DNA-Enden durch das Enzym KU Heterodimer KU70/80 (Haber, 2000; Lieber, 2008). Das Protein KU70 bindet am N-Terminus von WRN und stimuliert dessen Exonuklease-Aktivität, was auf eine Beteiligung von WRN an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur hindeutet (Cooper *et al.*, 2000; Karmakar *et al.*, 2002). WRN interagiert mit dem *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) Komplex, welcher ebenfalls am NHEJ beteiligt ist.

Darüber hinaus wiesen Shamanna und Kollegen, die Aktivierung des klassischen NHEJ-Weges durch die Helikase- und Exonuklease-Aktivität von WRN nach (Shamanna *et al.*, 2016). Des Weiteren war das NHEJ in WRN-*knockdown* (-*kd*) Zellen insgesamt vermindert (Shamanna *et al.*, 2016). WRN ist ebenfalls an der Reparatur von DNA-Schäden durch HR beteiligt, da es mit dem Replikationsprotein A2 (RPA) an DNA-Doppelstrangbrüchen kolo-kalisiert. RPA stimuliert zudem die Helikase-Aktivität von WRN (Brosh *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2001).

Die am häufigsten auftretenden DNA-Schäden sind Basenmodifikationen, da sie durch eine Vielzahl von Stoffen endogenen und exogenen Ursprungs hervorgerufen werden können. Dabei handelt es sich um DNA-Läsionen, die u. a. durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), alkylierende Agenzien oder ionisierte Strahlung entstehen. Beschädigte Basen werden durch Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt. Während der BER bindet WRN an die Stelle des DNA-Schadens, um die doppelsträngige DNA zu entwinden und interagiert dabei mit Faktoren der BER (Brosh *et al.*, 2001 b; Ahn *et al.*, 2004). Eine detaillierte Erläuterung der BER erfolgt an anderer Stelle (Abschnitt 1.2.2).

1.1.2 Mutationen des Werner-Syndrom Gens

Das Werner-Syndrom ist eine monogene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Bisher sind 85 verschiedene Mutationen im humanen *Wrn* bekannt, die sich über den ganzen Genlocus erstrecken. Dabei handelt es sich um *Splicing*, *Missense* sowie *Nonsense* Mutationen und genomische Umlagerungen. Viele Mutationen betreffen das C-terminale Ende des Proteins, was häufig zu dessen Verkürzung und somit zum Verlust der NLS führt. Dies verhindert, dass WRN zu seinem Bestimmungsort, dem Nukleus, gelangt und resultiert in einem Funktionsverlust des Proteins (Matsumoto *et al.*, 1997; Yamabe *et al.*, 1997). Andere Mutationen führen zu Proteininstabilität, was einen Abbau von WRN zur Folge hat (Huang *et al.*, 2006; Tadokoro *et al.*, 2013; Uhrhammer *et al.*, 2006). Oft handelt es sich um komplexe Heterozygotie, bei der auf beiden Allelen unterschiedliche Mutationen vorhanden sind. Dabei befindet sich auf einem Allel eine Nullmutation, wohingegen auf dem anderen Allel eine *Missense*-Mutation vorliegt. Den Phänotyp betreffend, sind komplex heterozygote Werner-Syndrom Patienten von denen mit homozygoter Nullmutation nicht unterscheidbar (Huang *et al.*, 2006).

1.1.3 Das Werner-Syndrom - altersassoziierte Symptome und Alterungsmodell

Wie zuvor beschrieben, hat ein Funktionsverlust von WRN weitreichende Folgen für die Zelle und führt zu genomischer Instabilität. Die Auswirkungen dieses Funktionsverlusts auf den Phänotyp beschreibt das Werner-Syndrom, das in diesem Abschnitt dargestellt wird.

Das Werner-Syndrom wurde zum ersten Mal 1904 von dem deutschen Mediziner Otto Werner im Rahmen seiner Dissertation mit dem Titel „Über Katarakt in Verbindung mit Sklerodermie“ beschrieben. Es wird als segmentales Progerie-Syndrom bezeichnet, da mehrere Organe betroffen sind. Das Werner-Syndrom zeichnet sich durch das Auftreten einiger altersassoziiierter Erkrankungen sowie altersunabhängiger Symptome aus (Kudlow *et al.*, 2007; Dreesen und Stewart, 2011). Ein typischer Krankheitsverlauf des Werner-Syndroms beginnt mit dem Ausbleiben eines Wachstumsschubs während der Pubertät und einer daraus resultierenden Kleinwüchsigkeit. Ergrauen und ein früher Verlust des Haupthaars treten ab dem 20. Lebensjahr auf. Im Alter von ca. 25 Jahren kommt es zu pathologischen Hautveränderungen. Die Haut wirkt straff oder, durch den Verlust des subkutanen Gewebes, atrophisch. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur Sklerodermie (Bindegewebsverhärtung), zu einer Hyperkeratose (Verhornung), zu Ulzerationen insbesondere im Bereich des Fußknöchels, und zu Pigmentstörungen. Es treten Kalzifikationen des Weichteilgewebes, insbesondere der Achillessehne und Veränderungen der Stimme auf (Takemoto *et al.*, 2013). Im Alter zwischen 30 und 40 Jahren kommt es vermehrt zu altersassoziierten Erkrankungen wie bilateralen Katarakten und Diabetes mellitus Typ II. Nach dem 40. Lebensjahr entwickeln Werner-Syndrom Patienten Osteoporose der Fingerknochen und Zehenknochen, während bei physiologisch alternden Menschen meist die Wirbelsäule von Osteoporose betroffen ist. Außerdem kommt es zu Fehlfunktionen des Immunsystems, Demenz, Atherosklerose, wobei hauptsächlich die Koronargefäße betroffen sind sowie zu einer erhöhten Krebsinzidenz (Tsianakas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 1999). Bei den Krebserkrankungen handelt es sich meist um seltene, aber multiple Tumoren mit mesenchymalem Ursprung wie beispielsweise Sarkome des Weichteilgewebes, Osteosarkome, Melanome und Schilddrüsenkarzinome. Dies unterscheidet sich von den Krebsarten, die während des normalen Alterns gehäuft auftreten. Hier handelt es sich meist um Karzinome epithelialen Ursprungs. Zu den Kardinal- oder Leitsymptomen des Werner-Syndroms gehören bilaterale Katarakte, dermatologische Veränderungen, Kleinwuchs und vorzeitiges Ergrauen, Haarverlust sowie elterliche Vererbbarkeit oder betroffene Geschwister und Verwandte (Martin *et al.*, 1999; Tsianakas *et al.*, 2007, Takemoto *et al.*, 2013). Aufgrund des späten Einsetzens der Erkrankung während der Adoleszenz und der verschiedenartigen Symptome wird das Werner-Syndrom erst mit durchschnittlich 37 Jahren diagnostiziert und manche phänotypischen Merkmale, wie die Kleinwüchsigkeit, werden erst im Nachhinein auf die Erkrankung zurückgeführt (Huang *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2013). Durch eine verbesserte medizinische Versorgung ist die durchschnittliche Lebenserwartung in dem Zeitraum von 1966 bis 2004 von 38 Jahren auf 53 Jahre gestiegen (Goto und Matsuura, 2008). Die Patienten sterben häufig an den Folgen von Herzinfarkten und Krebserkrankungen.

Auf Sardinien und in Japan liegt die Prävalenz bei 1:50.000 (Sato *et al.*, 1999). Dies beruht vermutlich auf dem Gründereffekt (Saha *et al.*, 2013). In anderen Ländern liegt die Prävalenz bei 1-9:1.000.000. Die beim Werner-Syndrom auftretenden altersassoziierten Erkrankungen unterscheiden sich von Erkrankungen, die im Laufe der normalen Alterung auftreten. Die Nützlichkeit des Werner-Syndroms als Modell zur Untersuchung von Alterungsprozessen wird durch eine Studie von Kyng und seinen Kollegen unterstützt (Kyng *et al.*, 2003). Sie untersuchten die globale Genomexpression von 6912 Genen, isoliert aus Fibroblasten von Patienten mit Werner-Syndrom, normalen jungen und alten Spendern und verglichen diese miteinander. Dabei zeigten 6,3 % der Gene eine signifikante Veränderung der Expression in Fibroblasten mit mutiertem WRN oder Fibroblasten von alten Spendern, wenn man sie mit Fibroblasten junger Spender verglich. 91 % der Gene zeigten eine ähnliche Expression in Werner-Syndrom und normalen alten Fibroblasten. 3 % der Gene waren ausschließlich in Werner-Syndrom Fibroblasten und 6 % in normalen, alten Fibroblasten reguliert. Die Analyse zeigte, dass die Expressionsmuster von Werner-Syndrom Fibroblasten denen von normalen, alten Fibroblasten ähneln (Kyng *et al.*, 2003). Ähnliche Expressionsmuster von Werner-Syndrom Zellen und normal gealterten Fibroblasten zeigten sich nach einer DNA-schädigenden Behandlung mit γ -Strahlung oder ultravioletter Strahlung (Kyng *et al.*, 2005).

1.1.4 WRN und physiologische Alterung

WRN scheint bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen während der physiologischen Alterung von Bedeutung zu sein. Darauf deuten die Ergebnisse mehrerer Studien hin, in denen der Einfluss von nicht-synonymen Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) im *Wrn*-Gen auf die Entstehung von Gefäß-erkrankungen untersucht wurde. Im Rahmen einer großangelegten dänischen Bevölkerungsstudie wurde die Kausalität von in *Wrn* auftretenden Polymorphismen und dem Auftreten von Schlaganfällen sowie Myokardinfarkten untersucht. Aus den Ergebnissen der Studie resultierte ein um 13 % erhöhtes Risiko einen Schlaganfall zu erleiden, wenn die Leucin(L)1074Phenylalanin(F) Variante auftrat und eine um 12 % erhöhte Wahrscheinlichkeit, wenn der Cystein(C)1367Arginin(R) Genotyp vorlag (Christoffersen *et al.*, 2017). Zwei weitere Studien zeigten, dass der C1367R Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, assoziiert ist (Ye *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 1999). Studien von Castro *et al.* und Bohr *et al.* konnten dies nicht bestätigen (Castro *et al.*, 1999; Bohr *et al.*, 2004). Die Studie von Bohr *et al.* zeigte darüber hinaus, dass der C1367R Polymorphismus, trotz seiner Nähe zur Kernlokalisationssequenz, keinen Einfluss auf die Translokation von WRN in den Nukleus hat (Bohr *et al.*, 2004).

Polymorphismen im *Wrn*-Gen beeinflussen die Interaktion von WRN mit Bindungspartnern, die enzymatische Aktivität von WRN und die Sensitivität von Fibroblasten gegenüber

genotoxischen Noxen. So zeigte die Arbeitsgruppe um Gagné und Lebel, dass WRN mit L1074F und C1367R Polymorphismen, im Vergleich zum nativen WRN, eine höhere Affinität zu Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) aufwies (Gagné *et al.*, 2016). Des Weiteren wies die Exonuklease der nativen Variante eine geringere Aktivität auf als die des Polymorphismus (Gagné *et al.*, 2016). Werner-Syndrom Fibroblasten, die L1074F und C1367R überexprimierten, waren weniger sensitiv gegenüber Hydrochinon und Wasserstoffperoxid als die Werner-Syndrom Fibroblasten, die die native Variante überexprimierten.

1.2 Entstehung und Reparatur von DNA-Basenschäden

Die DNA wird durch genotoxische Agenzien endogenen und exogenen Ursprungs geschädigt. Endogene Noxen sind meist Abbauprodukte des zellulären Metabolismus. Exogene Ursachen sind u. a. ionisierende Strahlung, Umweltnoxen und die Exposition mit ultraviolettem (UV) Licht (Téoule, 1987). Dabei kommt es zu für das jeweilige Genotoxin typischen DNA-Schäden, die, abhängig von der Art des Schadens, zur Aktivierung spezifischer Reparaturmechanismen führen. Zur Aktivierung der BER kommt es meist nach dem Auftreten von Basenmodifikationen durch beispielsweise ROS und alkylierende Agenzien.

1.2.1 Entstehung von DNA-Basenschäden durch ROS und alkylierende Agenzien

Es sind annähernd 100 verschiedene oxidative Basenschäden bekannt. In der humanen Zelle entstehen täglich ca. 10^4 - 10^5 Basenschäden (Adelman *et al.*, 1988). Dabei handelt es sich um oxidative Schäden, Alkylierungen, Desaminierung, Depurinierung oder Depyrimidierung, die durch Oxidanzien, Alkylanzien und durch Hydrolyse hervorgerufen werden (Feig *et al.*, 1994). Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, tertiär-Butylhydrochinon (tBHQ) und MMS, wird im Folgenden die Schädigung der DNA durch Oxidanzien und Alkylanzien näher beschrieben. tBHQ wird als Nahrungsmittelzusatz zur Konservierung von Fetten und Ölen sowie Fisch verwendet und hat in sehr geringen Konzentrationen eine antioxidative Wirkung (Chen, 1999; EFSA, 2016). In höheren Konzentrationen wirkt tBHQ zytotoxisch und DNA schädigend, da es ROS generiert (Gharavi *et al.*, 2007; Eskandani *et al.*, 2014).

ROS sind vorwiegend endogenen Ursprungs. Sie entstehen als Produkte der Elektronentransportkette während der zellulären Respiration und bei inflammatorischen Prozessen (Taylor *et al.*, 1995; Trenam *et al.*, 1990; Fantel *et al.*, 1995). ROS bildende Enzyme sind Lipoxygenasen, Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidasen (NOX) und Xanthin Oxidasen (Cross *et al.*, 1984; Edderkaoui *et al.*, 2005; Kou *et al.*, 2008). ROS entstehen auch durch die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS/NOS3), was die Bildung von Peroxinitrit zur Folge hat. Die bekanntesten reaktiven

Sauerstoffspezies sind Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$). Das hochreaktive Hydroxylradikal wird durch die Fenton-Reaktion von H_2O_2 mit Eisen(II)-Ion (Fe^{2+}) oder Kupfer(II)-Ion (Cu^{2+}) gebildet (Birben *et al.*, 2012). Es reagiert mit Doppelbindungen der DNA-Basen, zieht Wasserstoffatome von Methylgruppen der Thymine ab und greift das Zuckerphosphatrückgrat an. Durch letzteres entstehen Einzelstrangbrüche, die anders als beschädigte Basen, durch Einzel- oder Doppelstrangbruchreparatur behoben werden (Birben *et al.*, 2012; Pham *et al.*, 2013). Am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten tBHQ ist die Entstehung von ROS dargestellt (Abbildung 1-2A). Häufige durch Hydroxylierung entstehende Basenmodifikationen sind Formamidpyrimidin (Fapy) und 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin (8-oxo-dG). Eine Fapy-Base entsteht durch die Öffnung des Imidazolrings von Adenin (FapyA) oder Guanin (FapyG) und führt zur Bildung eines fragmentierten Purins. 8-oxo-dG wird durch Hydroxylierung des C8-Restes eines Guanins gebildet, wodurch ein gesättigter Imidazolring entsteht (Kalam *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu ROS sind Alkylanzien meist auf exogene Quellen zurückzuführen. Sie kommen u. a. im Zigarettenrauch und in Chemotherapeutika vor oder stammen aus der Industrie. Alkylanzien sind elektrophil und reagieren mit den nukleophilen Ringnitrogenen. Sie fügen eine Alkylgruppe hinzu. Das Alkylanz MMS führt zur Bildung von N7-Methylguaninen und N3-Methylguaninen (Abbildung 1-2B) (Pascucci *et al.*, 2005; Lawley und Shah, 1972).

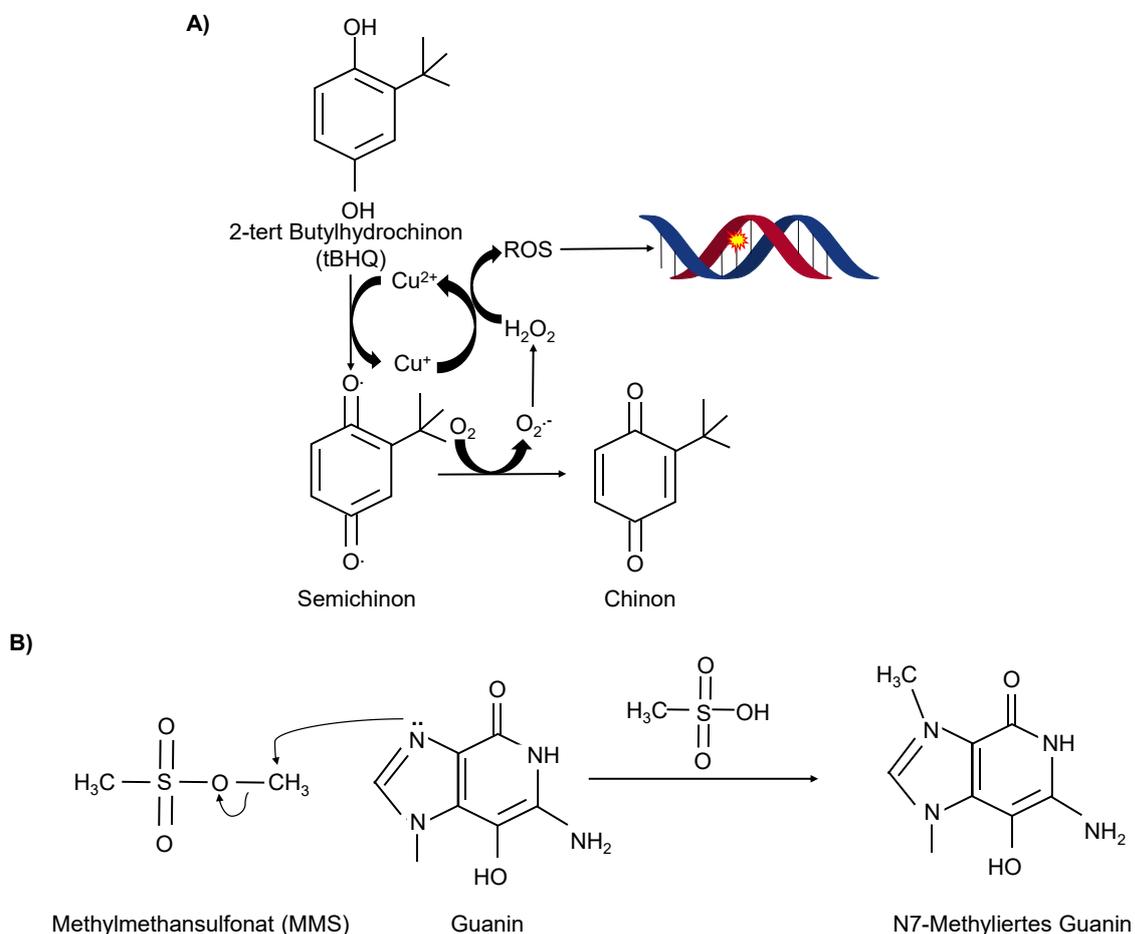


Abbildung 1-2: Bildung von DNA-Basenschäden durch (A) tBHQ und (B) MMS.

A) Zunächst erfolgt die Elektronenübertragung (e^-) von tBHQ auf ein Kupfer-Ion (Cu^{2+}), wodurch Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird. Das aus dieser Reaktion hervorgehende Semichinon-Radikal reduziert molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxidanionen (O_2^-), welche durch die Reaktion mit der oxidierten Form des Enzyms Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt werden. H_2O_2 und Cu^+ bilden im Anschluss durch die Fenton-Reaktion Hydroxylradikale (ROS), die DNA-Schäden hervorrufen können. B) Durch eine nukleophile Substitutionsreaktion wird die Methylgruppe von MMS auf Guanin übertragen. Es entsteht u. a. das Methyladdukt N7-Methylguanin. tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; MMS: Methylmethansulfonat; e^- : Elektron; $Cu(I)$ und $Cu(II)$: Kupfer-Ionen; ROS: reaktive Sauerstoffspezies. (Modifiziert nach Budiawan und Widiastuti, 2015; Pommier und Diasio, 2006).

1.2.2 Behebung von DNA-Basenschäden durch BER

Die BER kann entsprechend der Anzahl der beteiligten Kernproteine in vier Schritte unterteilt werden: 1) Erkennen und Entfernen der beschädigten Base durch eine läsionsabhängige DNA-Glykosylase; 2) Schneiden des DNA-Rückgrats durch eine apurine/apyrimidine (AP)-Endonuklease oder DNA-AP-Lyase; 3) Auffüllen des Spaltes mit Hilfe einer DNA-Polymerase und 4) Verknüpfung der Fragmente durch eine DNA-Ligase (Abbildung 1-3).

Abhängig von der Art des Basenschadens erfolgt die Initiation der Reparatur mit der Exzision der Base durch eine schadensspezifische DNA-Glykosylase. Das bifunktionelle Enzym 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1 (OGG1) detektiert die Basenschäden 8-oxo-dG und FapyC. Ein Substrat der *Nei like DNA Glycosylase 1* (NEIL1) ist u. a. FapyG. Monofunktionelle DNA-Glykosylasen schneiden N-glykosidische Bindungen, um die Base zu entfernen. Es entsteht eine abasische Stelle, die potentiell mutagen ist. Bifunktionelle DNA-Glykosylasen entfernen die Base und spalten zusätzlich das DNA-Rückgrat mit Hilfe einer DNA-AP-Lyase (Karahalil *et al.*, 1998). In diesem Schritt der BER bindet WRN über seine RecQ-Domäne an NEIL1 und stimuliert deren enzymatische Aktivität. Die bifunktionelle NEIL1 entfernt daraufhin die beschädigte Base durch ihre DNA-Glykosylase-Aktivität und schneidet mit Hilfe der DNA-Lyase das DNA-Rückgrat (Popuri *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2007).

Nach dem Entfernen der Base durch eine monofunktionelle DNA-Glykosylase schneiden AP-Endonukleasen das DNA-Rückgrat 5' zur AP-Stelle. Während *Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1* (APE1) an die AP-Stellen bindet, bildet es einen Komplex mit WRN, was dessen Helikase-Aktivität hemmt (Ahn *et al.*, 2004).

Abhängig von der Anzahl der beschädigten Basen werden nach der Prozessierung durch DNA-Glykosylasen und AP-Endonukleasen zwei verschiedene Reparaturwege eingeschlagen: die „*short-patch*“ BER, bei der ein einzelnes Nukleotid ausgetauscht wird oder die „*long-patch*“ BER, bei der mindestens zwei Nukleotide aber meist 6-13 Nukleotide ersetzt werden (Matsumoto *et al.*, 1994; Frosina *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Klungland und Lindhal, 1997). Die Wahl des Reparaturweges ist außerdem von der Spezifität der Glykosylase, vom Zelltyp und den verfügbaren BER-Faktoren abhängig. Da WRN an der „*long-patch*“ Reparatur beteiligt ist, wird im Folgenden dieser Reparaturweg näher beschrieben (Abbildung 1-3).

Im ersten Schritt der „*long-patch*“ BER werden DNA-Polymerase- β , *flap endonuclease 1* (FEN1) und Ligase1 zur abasischen Stelle rekrutiert. WRN entwindet zunächst mit Hilfe seiner

Helikase-Aktivität die DNA. Der dabei entstandene DNA-Überhang wird durch FEN1, welche durch WRN stimuliert wird, geschnitten (Brosh *et al.*, 2001 b; Ahn *et al.*, 2004). Die WRN-Exonuklease agiert kooperativ mit der Polymerase- β (Harrigan *et al.*, 2006; Harrigan *et al.*, 2007). Mit Hilfe seiner 5'-Desoxyribophosphatase-Aktivität spaltet die DNA-Polymerase- β das terminale 5'-Desoxyribosephosphat (5'dRP) der AP-Stelle, um die spätere Ligation zu ermöglichen. Die Polymerase- β , deren Aktivität von WRN über seine Helikase-Aktivität stimuliert wird, polymerisiert den fehlenden Strang (Harrigan *et al.*, 2003).

Die Lücke zwischen altem und neuem Nukleotidstrang wird durch Ligase1 oder Ligase3 verknüpft (Harrigan *et al.*, 2006; Harrigan *et al.*, 2007).

Durch die Entstehung von Purinbasenschäden wird der PARP1-abhängige BER-Weg aktiviert (Reynolds *et al.*, 2015; Dantzer *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2001). PARP1 fungiert als Sensor für DNA-Schäden und interagiert mit Faktoren der BER, z. B. mit WRN. Das zunächst unmodifizierte PARP1 bildet mit WRN einen Komplex und inhibiert die Helikase- und Exonuklease-Aktivität von WRN, um unkontrollierte DNA-Entwindung zu vermeiden und somit die genomische Stabilität zu wahren (von Kobbe *et al.*, 2004 a; Li *et al.*, 2004). Nach Erkennung von DNA-Schäden durch PARP1 und dessen Bindung an die beschädigte DNA kommt es zu einer Autoparylierung (Autopoly(ADP)ribosylierung) von PARP1. PARP1 ist nun in der Lage, weitere an der Schadensantwort beteiligte Faktoren zu parylieren und somit zur Stelle des DNA-Schadens zu rekrutieren. Das parylierte PARP1 löst sich von der DNA und von WRN, was die Aktivierung von WRN zur Folge hat (Khadka *et al.*, 2015). In Abwesenheit von WRN findet ebenfalls eine Autoparylierung von PARP1 statt; allerdings ist die Parylierung und somit die Rekrutierung von nukleären Proteinen zum Ort des DNA-Schadens durch die fehlende Komplexbildung von WRN mit PARP1 vermindert. Dies führt zu einer Akkumulation von DNA-Schäden (von Kobbe *et al.*, 2003 b).

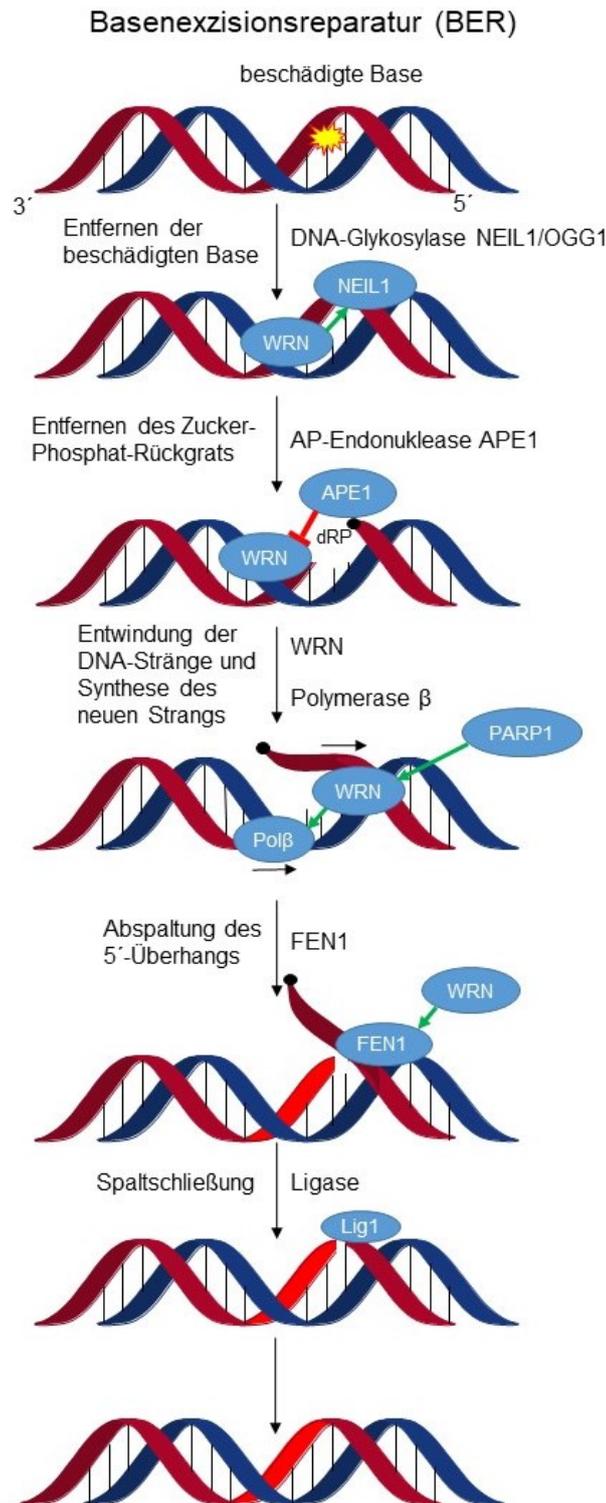


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der „long-patch“ BER.

Beschädigte Basen werden durch schadensspezifische DNA-Glykosylasen, wie NEIL1 oder OGG1, detektiert und entfernt. Dabei wird die DNA-Glykosylase-Aktivität von NEIL1 durch WRN stimuliert. Die Endonuklease APE1 inhibiert WRN, um eine vorzeitige Entwindung der DNA zu vermeiden, und spaltet das Zucker-Phosphat-Rückgrat. Es entstehen 5'-Desoxyribosephosphat (5' dRP) Gruppen. Im nächsten Schritt entwindet WRN, aktiviert durch die Dissoziation des WRN/PARP1-Komplexes, die DNA und trennt die DNA-Doppelstränge. Gleichzeitig stimuliert WRN das Enzym Polymerase- β , das die Strangneusynthese katalysiert. Durch Stimulation der Endonuklease FEN1 durch WRN wird der entstandene 5'-Überhang gespalten. Die Spaltschließung erfolgt durch das Enzym Ligase 1. APE1: *apurinic/aprimidinic endonuclease*; FEN1: *flap endonuclease 1*; Lig1: Ligase1; Pol β : Polymerase- β ; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase 1; WRN: Werner-Syndrom Protein. (Abbildung in Anlehnung an Brosh *et al.*, 2013; Brosh und Bohr, 2007)

1.3 Aufbau von Blutgefäßen

Während der Embryogenese werden Blutgefäße aus dem Mesoderm gebildet. Große Blutgefäße, wie Arterien und Venen, sind von innen nach außen wie folgt aufgebaut. Die Tunica intima (Intima) bildet die innerste Schicht (Abbildung 1-4). Sie setzt sich aus dem einschichtigen Endothel zusammen, welches der Basallamina aufsitzt und in direktem Kontakt mit dem Blutkreislauf steht. Darauf folgt das *Stratum subendotheliale*, eine Extrazellulärmatrix mit wenigen Zellen. Sie ist ebenfalls Bestandteil der Intima. Die *Membrana elastica interna* ist arterienspezifisch und besteht aus elastischen Fasern. Sie trennt die Intima von der nächsten Gefäßschicht, der Tunica media (Media). Die Media setzt sich aus glatten Muskelzellen und der Extrazellulärmatrix zusammen und reguliert den Gefäßwiderstand. In arteriellen Gefäßen schließt sich die *Membrana elastica externa* an die Media an, die durch ihre zusätzlichen Fasern für eine erhöhte Elastizität sorgt. Es folgt die Tunica adventitia (Externa). Sie besteht aus Bindegewebe mit elastischen und kollagenen Fasern und ist mit Nerven, Lymph- und Blutgefäßen durchsetzt. Die Adventitia/Externa sorgt für die Einbettung ins Gewebe. Kleine Blutgefäße wie Kapillaren und Sinusoide bestehen lediglich aus der Intima und werden von Perizyten umschlossen, die u. a. die Bildung vaskulärer Verzweigungen und die Differenzierung von Endothelzellen regulieren (Faller und Schünke, 2008; Alberts *et al.*, 2002). Die Dichte von Endothelzellen unterscheidet sich dabei innerhalb der verschiedenen Kapillaren. Kontinuierliche Kapillaren bestehen aus einer geschlossenen Endothelzellschicht, die ausschließlich die Passage von kleinen Molekülen zulässt. Fenestrierte Kapillare besitzen zwischen den Endothelzellen Poren, die für kleine Proteine durchlässig sind. Sie kommen vorwiegend in endokrinen Drüsen, im Darm und der Bauchspeicheldrüse vor. Sinusoide besitzen zusätzlich eine fenestrierte Basallamina und sind für größere Proteine durchlässig (Lüllmann-Rauch und Asan, 2009).

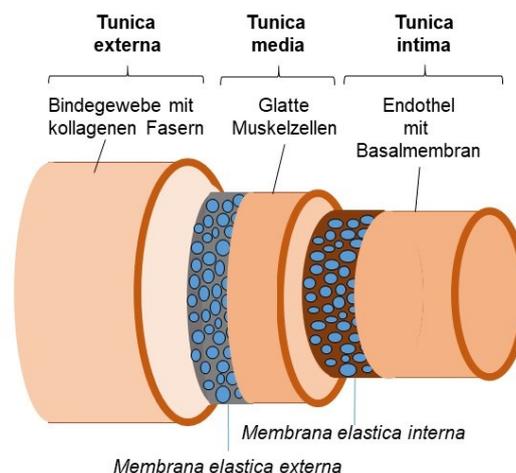


Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand.

Die innerste, dem Blutkreislauf zugewandte Schicht, ist die Intima, bestehend aus dem Endothelium. Daran schließen sich Media und Adventitia an. Die arterienspezifische *Membrana elastica interna* und die *Membrana elastica externa* verleihen der Arterienwand zusätzliche Elastizität.

(Abb. in Anlehnung an <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/histologie>)

1.4 Endothelzellfunktionen und deren Dysregulation

Endothelzellen kleiden das gesamte Gefäßsystem von Arterien, Venen und Haargefäßen aus. Sie bilden eine physikalische Barriere zwischen Blutkreislauf und Gewebe und regulieren die Transmigration von Immunzellen zum Ort der Inflammation sowie den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothelium nicht adhäsiv. Kommt es zu einer Inflammation exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, ICAM1; vaskuläres Adhäsionsmolekül 1, VCAM1; endotheliales Selektin, E-Selektin) auf ihrer Oberfläche, wodurch Leukozyten am Endothelium adhären und ins Gewebe transmigrieren (Abbildung 1-5). Um die Transmigration der Leukozyten zu erleichtern, erhöht sich die Permeabilität des Endotheliums (Patibandla *et al.*, 2009). Eine weitere Eigenschaft von Endothelzellen ist die Fähigkeit den Blutdruck durch Sezernierung vasoreaktiver Substanzen (z. B. NO, Prostacyclin, Endothelin 1) zu regulieren (Sandoo *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 1988). Scherstress und Entzündungen modifizieren die Bildung dieser Faktoren (Wu *et al.*, 1988).

Unter physiologischen Bedingungen sind Endothelzellen durch die Ausschüttung anti-koagulativer Substanzen antithrombotisch und gewährleisten somit die Fluidität des Blutes. Bei einer Gefäßverletzung adhären Thrombozyten an dem beschädigten Endothelium. Bestimmte Plasmaproteine (Gerinnungsfaktoren), bei denen es sich meist um Serinproteasen handelt, werden proteolytisch gespalten und aktiviert. Das lösliche Plasmaprotein Fibrinogen wird durch die Serinprotease Thrombin zu unlöslichem Fibrin umgewandelt, wodurch es zu einer Aggregation von Thrombozyten kommt. Durch die Aktivierung der Serinprotease Thrombin und die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin bildet sich ein stabiler Thrombus (Hallbach, 2011). Sobald die Wundheilung abgeschlossen ist, wird der Fibrinthrombus durch die Serinprotease Plasmin abgebaut (Fibrinolyse). Dieser Prozess wird von Endothelzellen durch die Expression des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (*tissue-type plasminogen activator*, PLAT/tPA) vermittelt. Bei PLAT handelt es sich um eine Serinprotease, welche die Umwandlung des inaktiven Proenzym Plasminogen in die aktive Serinprotease Plasmin katalysiert und somit Fibringerinnsel löst. Die Aktivität von PLAT wird durch den Plasminogenaktivator Inhibitor (*plasminogen activator inhibitor*, PAI1) reguliert (Grulich-Henn und Müller-Berghaus, 1990).

Endothelzellen sind in der Lage zu migrieren und sind an der *de novo* Synthese (Vaskulogenese) sowie an dem Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) und an der Reparatur der beschädigten Gefäßwand beteiligt (Abbildung 1-5) (Michaelis, 2014).

Endothelzellen regulieren die Proliferation glatter Muskelzellen durch Ausschüttung von mitogenen (z. B. Endothelin 1, EDN1) oder wachstumshemmenden Substanzen (z. B. NO) (Alberts *et al.*, 1994; Sarkar *et al.*, 1997). In der gesunden Gefäßwand verhalten sich glatte

Muskelzellen ruhend, während sie nach Schädigung des Endothels oder während einer Atherosklerose zu proliferieren beginnen (Scott-Burden und Vanhoutte, 1994).

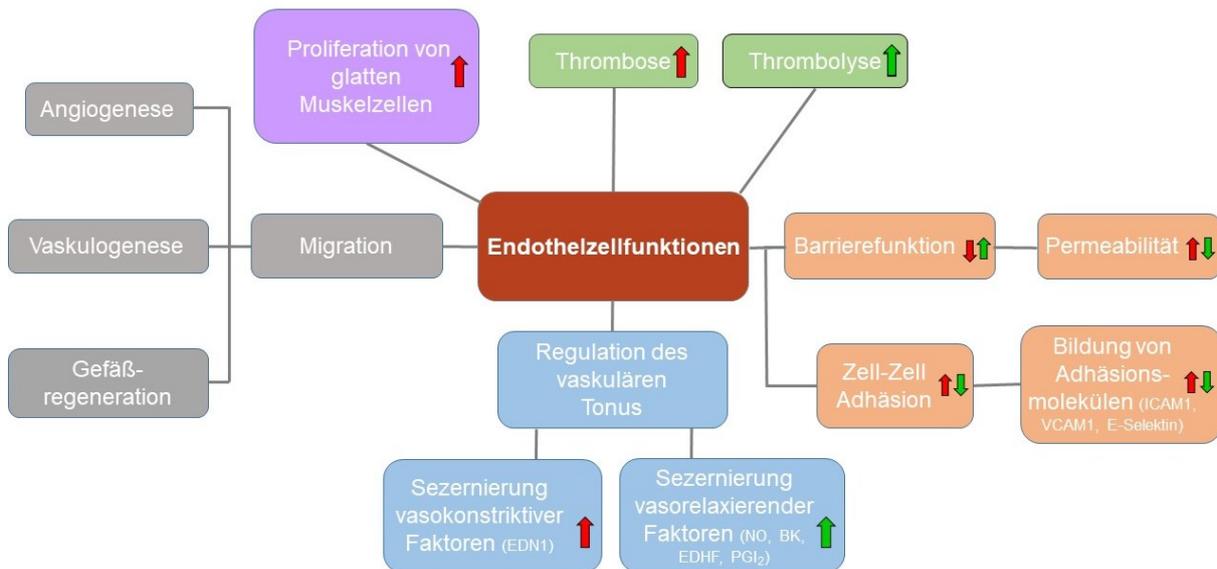


Abbildung 1-5: Endothelzellfunktionen in der Übersicht.

Endothelzellen besitzen eine Vielzahl spezifischer Funktionen, die die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase sicherstellen. Das Endothelium fungiert als Barriere (zwischen Blutkreislauf und Interstitium), deren Hyperpermeabilität mit Inflammation assoziiert ist. Während einer Inflammation bilden Endothelzellen Adhäsionsmoleküle und präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche, wodurch sie die Transmigration von Immunzellen ins Gewebe vermitteln. Endothelzellen regulieren durch Bildung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren den Blutdruck und nehmen Einfluss auf die Proliferation von glatten Muskelzellen. Zudem sind Endothelzellen an der Neubildung von Gefäßen beteiligt und sind essentiell für die Regeneration beschädigter Gefäße. Rote Pfeile kennzeichnen die Regulation bei Endotheldysfunktion. Grüne Pfeile stellen die Regulation gesunder Endothelzellen dar. NO: Stickstoffmonoxid; BK: Bradykinin; EDHF: *Endothelium derived hyperpolarizing factor*; PGI₂: Prostacyclin, EDN1: Endothelin 1.

1.4.1 Internalisierung von oxidiertem LDL

Die Internalisierung des Lipoproteins geringer Dichte (*low-density lipoprotein*, LDL) führt unter bestimmten Voraussetzungen zur Aktivierung und Dysfunktion des Endotheliums. LDL dient normalerweise als Transportvehikel von lipophilen Substanzen (Cholesterin, Phospholipiden, Triglyceriden) aus der Leber in den extrahepatischen Raum. LDL bindet an LDL-Rezeptoren auf der Zellmembran und wird durch Endozytose aufgenommen. Im Zytosol fusionieren die mit LDL-beladenen Transportvesikel mit den Lysosomen, in denen LDL anschließend abgebaut und dessen Rezeptoren recycelt werden (Goldstein und Brown, 1976).

Durch freie Radikale, Übergangsmetallionen und Lipoxygenasen werden LDL-Moleküle modifiziert bzw. oxidiert, und somit in ihrer Gesamtladung negativ, was zu einer Veränderung der Rezeptor-vermittelten Interaktion führt (Morel *et al.*, 1983). Oxidiertes LDL (oxLDL) wird, anders als das unmodifizierte LDL, durch die Bindung an *Scavenger* Rezeptoren (SR) endozytotisch internalisiert und lysosomal abgebaut (Moriwaki *et al.*, 1998). Die SR-vermittelte Internalisierung führt zur Aktivierung einer inflammatorischen Signalkaskade. SR sind eine Superfamilie membrangebundener Rezeptoren, die bei Eukaryoten in 10 Familien (A-J) eingeteilt werden. Sie regulieren Signalwege, die am Fettstoffwechsel und der Zellproliferation

sowie an der Entstehung von Atherosklerose und Krebs beteiligt sind. Neben oxLDL sind endogene Proteine und Pathogene sowie apoptotische Zellen weitere Liganden dieser Rezeptoren. SR werden unter normalen Bedingungen von Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen gering exprimiert. Vermehrtes Auftreten von oxLDL, inflammatorischen Molekülen oder die Exposition mit Superoxidradikalen aktivieren die mRNA-Expression des *lectin-like oxidized LDL receptor 1* (LOX1) SR (Morawietz *et al.*, 2001). Die ligandenstimulierte Signaltransduktion unterscheidet sich je nach SR-Familie und ist abhängig von der Bindung spezifischer Liganden. Die Bindung von oxLDL an verschiedene SR und die Aktivierung pathophysiologischer Signalwege war Gegenstand vieler Untersuchungen. So zeigte eine Studie, dass SR-A1^{0/0} Mäuse 50-70 % weniger modifiziertes LDL in die Zellen aufnehmen und proportional dazu weniger atherosklerotische Läsionen entwickelten (Suzuki *et al.*, 1997 a; Kamada *et al.*, 2001). Der SR *cluster of differentiation 36* (CD36) (Klasse B2-SR) hingegen interagiert mit Integrinen, aktiviert die fokale Proteintyrosinkinase 2 / Adhäsionskinase (PTK2/FAK) und moduliert die Zell-Adhäsion und endotheliale Zellmigration. Die durch CD36 aktivierten Vav-Proteine fungieren als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für *Ras homolog family member* (RHO) und *Rac family small GTPase 1* (RAC1), die die Aktinmodellierung und Migration vermitteln (Park *et al.*, 2012). Der LOX1 SR (SR-E1) aktiviert nach Stimulation die proinflammatorische Signaltransduktion, was zu einer Aktivierung von *nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells* (NF- κ B) und somit zur Expression proinflammatorischer Gene führt (Khaidakov *et al.*, 2011). Neben der Aktivierung verschiedener Signalwege kommt es durch die Aktivierung von SR zur Bildung von ROS. Bindet oxLDL an LOX1 stimuliert das die Bildung von ROS und führt zu oxidativen DNA-Schäden und einem reduzierten NO-Gehalt (Sun *et al.*, 2011; Cominacini *et al.*, 2003). Die Signalkaskade, die durch die Bindung von oxLDL an den LOX1 Rezeptor ausgelöst wird und zur Atherosklerose beiträgt, ist an anderer Stelle beschrieben (Abschnitt 1.5.1).

1.4.2 Endotheliale Zellmigration und Angiogenese

Angiogenese ist als Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen definiert und unterscheidet sich somit von der *de novo* Synthese von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung, der Vaskulogenese. Die Angiogenese setzt die Fähigkeit von Zellen voraus zu migrieren und zu proliferieren. Dabei migrieren die Zellen im Kollektiv. Endotheliale Zellmigration ist an essentiellen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Im adulten Organismus findet Angiogenese bei Entzündungen statt oder dient der Blutversorgung von Tumoren. Endotheliale Zellmigration ist zudem bei der Reparatur beschädigter Gefäße zu beobachten.

Unter physiologischen Bedingungen und je nach Gewebetyp befinden sich Endothelzellen in adultem Gewebe meist in einem Ruhezustand mit geringem migratorischem und proliferativem

Potential (Schwartz und Benditt, 1977; Schwartz *et al.*, 1981; Hobson und Denekamp, 1984). Bei einem erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarf, der durch die bereits vorhandenen Blutgefäße nicht gedeckt werden kann, werden Endothelzellen aktiviert und die Angiogenese setzt ein. Zunächst wird eine einzelne Zelle angeregt, die zu migrieren beginnt. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) bindet dabei am *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) und verstärkt die Expression von Delta like 4, welches an den Notch-Rezeptor der Nachbarzellen bindet und deren Aktivierung vermittelt (Gerhardt *et al.*, 2003; Suchting *et al.*, 2007; Hellström *et al.*, 2007). Durch die Bindung von VEGF-A an seinen Tyrosinkinase Rezeptor *kinase insert domain receptor* (KDR) wird die physiologische und pathophysiologische Angiogenese initiiert. Außerdem stimuliert die Aktivierung von KDR die vaskuläre Permeabilität (Sirois und Edelman, 1997; Abhinand *et al.*, 2016).

Während der Angiogenese wandern Endothelzellen (Pionierzellen) stimuliert durch Wachstumsfaktoren, durch gerichtete Migration zur beschädigten Stelle (Yoshida *et al.*, 1996; Kanazawa *et al.*, 2010; Vitorino und Meyer, 2008). Sie geben das migratorische Signal an die Folgezellen weiter (Gerhardt *et al.*, 2003). Die Migration der Folgezellen wird durch Zell-Verbindungen (vaskulär-endotheliales- (VE) Cadherin, α -Catenin) und ungerichtete Motilität sichergestellt (Adams *et al.*, 1996; Vitorino und Meyer, 2008). In der Pionierzelle kommt es zunächst zu einer Zellpolarisation in der Zellfront (zur Migrationsrichtung), die durch die kleine Rho-GTPase *cell division cycle 42* (CDC42) reguliert wird. Dies beinhaltet die Neuausrichtung des Mikrotubulus-Organisationszentrums und des Golgi Apparates durch CDC42 in Migrationsrichtung (Palazzo *et al.*, 2001; Etienne-Manneville *et al.*, 2001).

Am Leitsaum entstehen Protrusionen bestehend aus Lamellipodien und Filopodien. Bei Lamellipodien handelt es sich um blattförmige Zellausläufer aus einem dicht gepackten Netzwerk aus Aktinfilamenten, an deren Spitze Filopodien lokalisiert sein können. Filopodien sind kleine, antennenartige Ausläufer. Während CDC42 an der Filopodienextension beteiligt ist, wird die Aktinpolymerisation in Lamellipodien durch RAC vermittelt. Zunächst akkumuliert Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) in der Zellfront. Es kommt zur Aktivierung von RAC über PIP3-abhängige Guaninnukleotid austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEF) (Nobes und Hall, 1995; Carretero-Ortega *et al.*, 2010). RAC bindet an *WASP-family verprolin-homologous protein* (WAVE) und aktiviert es. WAVE wiederum aktiviert den *Actin related proteins 2/3* (Arp2/3) Komplex und vermittelt somit die Lamellipodienextension (Ponti *et al.*, 2004; Mullins *et al.*, 1998). CDC42 aktiviert das Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein (WASP) und vermittelt somit die Aktinpolymerisierung der Filopodien (Higgs und Pollard, 2000; Yamazaki *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2003). Formine und Proteine der Spire Familie sind ebenfalls an der Extension der Protrusionen beteiligt, indem sie Filamentverlängerungen ohne

Verzweigungen bilden (Yang *et al.*, 2007). Das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) bildet ebenfalls lange Filamente.

Zellen adhären über fokale Adhäsionskomplexe an der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Fokale Adhäsionskomplexe bestehen hauptsächlich aus Integrinen, bei denen es sich um Transmembranrezeptoren handelt. Die meisten Integrine binden an Glykoproteine (Lamine, Kollagen) der extrazellulären Matrix (Kramer *et al.*, 1990). Während der Migration werden am Leitsaum neue Adhäsionskomplexe gebildet, die die Zelle an der extrazellulären Matrix anheften. Im hinteren Teil der Zelle werden fokale Adhäsionskomplexe abgebaut um die Fortwärtsbewegung der Zelle zu gewährleisten. Die Bildung stabiler fokaler Adhäsionskomplexe verlangsamt die Migration der Zelle (Michaelis, 2014).

1.4.3 Leukozyten-Endothel Adhäsion und Inflammation

Unter normalen Bedingungen ist das Endothel nicht adhäsiv, da es anti-adhäsiv wirkende Moleküle wie Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) und Prostacyclin exprimiert (Lefer und Lefer, 1996; Kubes *et al.*, 1991; Bouma *et al.*, 1996). Kommt es zu einer Entzündung, wird das Endothel aktiviert und produziert ROS, was zu einer transkriptionsabhängigen Expression und Synthese von Adhäsionsmolekülen durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Aktivatorprotein 1 (AP1) führt (Cooper *et al.*, 2002). Das hat zu Folge, dass immunkompetente Zellen aus dem Blutkreislauf zur Stelle der Inflammation ins Gewebe rekrutiert werden.

Leukozyten nähern sich durch die Expression des endothelzellspezifischen VCAM1 der Gefäßwand an und werden schließlich „eingefangen“ (Abbildung 1-6). Durch die vermehrte Expression und Präsentation von Lektin-ähnlichen Glykoproteinen (Selektine) auf der endothelialen Zellmembran entstehen schwache Leukozyten-Endothel Interaktionen mit zunächst geringer Affinität. Leukozyten rollen entlang des Endotheliums und verlangsamen dabei zunehmend ihre Fließgeschwindigkeit. Selektine vermitteln diesen Schritt. Dabei wird E-Selektin endothelzellspezifisch gebildet, während Thrombozyten-Selektin (*platelet selectin*, P-Selektin) sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen exprimiert wird. Leukozyten bilden konstitutiv Lymphozyten-Selektin (L-Selektin) und interagieren mit endothelalem P- und E-Selektin (Ma *et al.*, 1994). Durch die Freisetzung von Chemokinen durch Endothelzellen und das inflammatorische Gewebe werden Leukozyten aktiviert (Hillyer *et al.*, 2003). Die Leukozyten-Integrine haben nun einen höheren Affinitätsstatus und interagieren mit den temporär exprimierten Adhäsionsmolekülen ICAM1, ICAM2 und VCAM1 der Endothelzellen, wodurch die Leukozyten an das Endothel adhären (Myers *et al.*, 1992). Die transkriptionelle Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen wird durch Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine initiiert. Phosphoinositid-3-Kinasen und Vav-Proteine, die ebenfalls die Permeabilität und die Aktinmodellierung kontrollieren, stabilisieren die Leukozyten an der Endothelzellwand und sorgen für deren großflächige Anhaftung. ICAM1

vermittelt nun das Kriechen der Leukozyten entlang des Endotheliums. Die Liganden-Rezeptor-Bindungen führen schließlich zu einem stabilen Arrest der Leukozyten am Endothelium (Sanz *et al.*, 1997). Die parazelluläre Migration ins Subendothelium erfolgt durch das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (*platelet and endothelial cell adhesion molecule*, PECAM), während die transzelluläre Migration durch ICAM1 vermittelt wird (Sanz *et al.*, 1999; Henseleit *et al.*, 1994). PECAM wird konstitutiv exprimiert und wird, im Gegensatz zu ICAM1 und VCAM1, nicht durch Zytokine hochreguliert (Ma *et al.*, 1994). Die parazelluläre Migration von Leukozyten wird durch eine erhöhte Permeabilität des Endotheliums erleichtert, indem VCAM1 die Phosphorylierung von VE-Cadherin, die zum Abbau von Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) führt, aktiviert. Dieser Signalweg beinhaltet die Aktivierung der Rho-GTPase RAC, einer regulatorischen Komponente von NOX, dessen Aktivierung zur Bildung von ROS führt, die wiederum PTK2 aktivieren (Ley, 2013). Diese phosphorylieren den Tyrosinrest Y658 von VE-Cadherin und vermitteln so den Abbau der Adhäsionsverbindungen. Eine durch ICAM1 aktivierte RHO GTPase führt zur Bildung von Stressfasern und einer Aktivierung von Proteinkinase C, was ebenfalls eine Hyperpermeabilität zur Folge hat (Poston *et al.*, 1992; Allingham *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007).

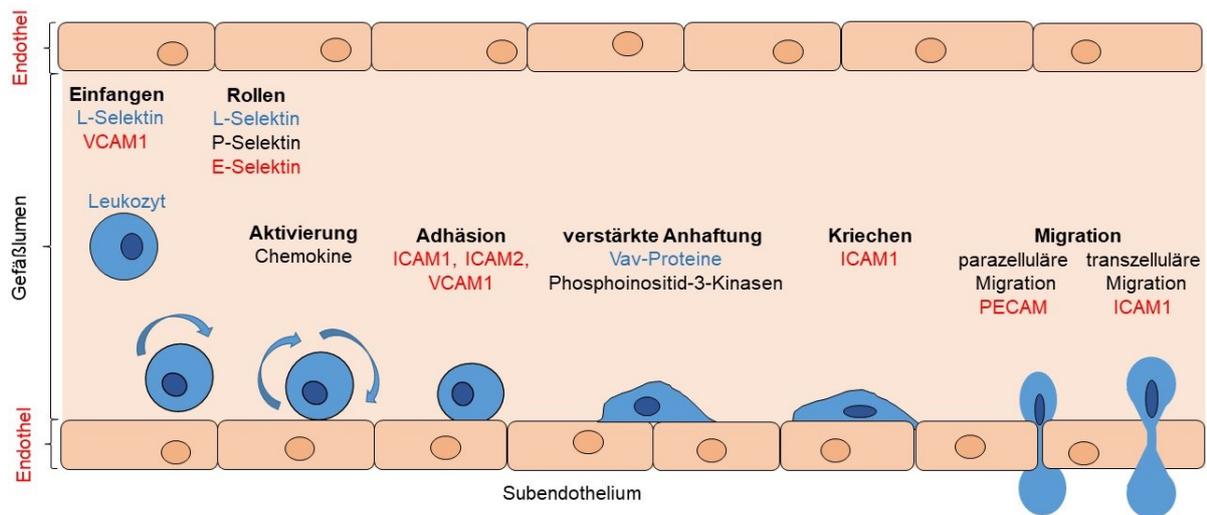


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel Adhäsion.

Inflammatorische Moleküle stimulieren die Bildung des endothelzellspezifischen VCAM1, wodurch sich Leukozyten dem Endothelium annähern (Einfangen). Im nächsten Schritt kommt es mit Hilfe von Selektinen zu schwachen Leukozyten-Endothel Interaktionen und zum Rollen der Leukozyten entlang des Endothels. Die Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine führt zu einer erhöhten Bindung von Leukozyten-Integrinen an endothelzellspezifische Adhäsionsmoleküle (ICAM1, ICAM2, VCAM1), was für eine Adhäsion der Leukozyten am Endothel sorgt. Vav-Proteine und Phosphoinositid-3-Kinasen vermitteln eine flächige Anhaftung der Leukozyten am Endothel. ICAM1 vermittelt das intravaskuläre Kriechen der Leukozyten. Die Migration erfolgt entweder parazellulär mit Hilfe von PECAM oder transzellulär durch ICAM1. Rote Schrift: endothelzellspezifische Moleküle. Blaue Schrift: leukozytenspezifische Moleküle. Phosphoinositid-3-Kinasen und P-Selektin werden sowohl vom Endothel als auch von Leukozyten gebildet. E-Selektin: endotheliales Selektin; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; L-Selektin: Lymphozyten-Selektin; PECAM: *platelet and endothelial cell adhesion molecule*; P-Selektin: *platelet selectin*; Vcam: *vascular cellular adhesion molecule*. (Abb. modifiziert nach Ley *et al.*, 2007)

1.4.4 Barrierefunktion und vaskuläre Permeabilität

Das Endothel stellt eine natürliche Barriere zwischen Blutstrom und Interstitium dar. Im gesunden Endothel wird die Stabilität dieser Barriere durch intakte Zell-Zell Verbindungen aufrechterhalten, die physikalischem und chemischem Stress in Form von Scherstress und ROS ausgesetzt sind (Galley *et al.*, 2004). Die Permeabilität des Endotheliums wird durch Veränderungen des Zytoskeletts, der Zell-Zell Verbindungen und der Anhaftung an der extrazellulären Matrix modelliert. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es zu einer Hyperpermeabilität und einem unkontrollierten Eintritt von Plasmaproteinen (z. B. Albumin) aus dem Blut in das umliegende Gewebe (Stasek *et al.*, 1992). Eine erhöhte vaskuläre Permeabilität wird durch Entzündungsmediatoren, Pathogene und aktivierte Monozyten stimuliert. Das Endothel wird parazellulär durch Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) und Schlussleiste (lateinisch: *Zonula Occludens*) zusammengehalten. Größere Gefäße haben offene Zellkontakte (Luissint *et al.*, 2012; Krouwer *et al.*, 2012). Sie bilden Kanäle und somit eine direkte Verbindung zwischen dem Zytosol zweier Zellen. Daher dienen sie dem schnellen Austausch von Signalmolekülen wie Calcium-Ionen (Ca^{2+}) und haben weniger Einfluss auf die Barrierefunktion. Des Weiteren kann das Endothelium in spezialisierten Geweben wie Leber und Milz *per se* große Poren (diskontinuierliches und fenestrisches Endothel) ausbilden (Abschnitt 1.3). Adhäsionsverbindungen sind für größere Plasmaproteine wie Albumin (Molekulargewicht: 69 kDa) undurchlässig (Stasek *et al.*, 1992). Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist VE-Cadherin, das über Transmembrandomänen an das VE-Cadherin einer anderen Zelle bindet. Über Catenine ist VE-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft. Die Stabilität des VE-Cadherin-Catenin-Zytoskelett-Komplexes ist essentiell für die Barrierefunktion des Endotheliums (Tharakan *et al.*, 2012; Sawant *et al.*, 2011). Weniger häufig kommen Schlussleisten vor. Sie treten vor allem in spezialisierten Geweben wie in der Blut-Hirn-Schranke auf und sind nur für sehr kleine Moleküle durchlässig (< 1 kDa). Die Porengröße (und somit die Durchlässigkeit) wird durch die Zusammensetzung der *junctions* bestimmt. Eine Reihe von Faktoren induzieren Hyperpermeabilität. Dazu zählen Thrombin, Histamin sowie die Zytokine Interleukin 4 (IL4) und Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor und ROS (Hippenstiel *et al.*, 1998; Skaria *et al.*, 2016; Ashina *et al.*, 2015; Sawant *et al.*, 2013). Hyperpermeabilität ist zudem mit Alterung assoziiert (Pelegri *et al.*, 2007; Blau *et al.*, 2012; Di *et al.*, 2016). Die Entstehung von Peroxynitrit aus NO verringert die Aktivität von NOS3 und erhöht die Permeabilität durch Abbau der Adhäsionsverbindungen (Zhang *et al.*, 2005).

1.4.5 Stimulation purinergere Rezeptoren und erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung

Die Aktivierung purinergere Rezeptoren führt zur Freisetzung von Calcium-Ionen. Ca^{2+} ist ein *second messenger*, der eine Vielzahl zellulärer Mechanismen moduliert. Dazu gehören vaskulärer Tonus, Permeabilität sowie die Regulation der Synthese und Ausschüttung von NO, PLAT, dem Von-Willebrand-Faktor und Prostacyclin (Kohn *et al.*, 1995; Martikainen und Isaacs 1990; Leavesley *et al.*, 1993; Dumas de la Roque *et al.*, 2017; Di *et al.*, 2016).

Unterschieden werden die adenosinbindenden P1-Rezeptoren und P2-Rezeptoren, deren Liganden ATP, Adenosindiphosphat (ADP) und Uridintriphosphat (UTP) sind. P2-Rezeptoren werden unterteilt in P2X-Ionenkanal-Rezeptoren (P2XR) und P2Y G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (P2YR) (Di Virgilio *et al.*, 2012). Letztere sind Bestandteil der Membran von Endothelzellen (P2Y₁R, P2Y₂R und P2Y₆R). Die Stimulation von P2Y₂R durch seine Liganden führt zur Aktivierung der Phospholipase C, die Inositoltriphosphat (IP₃) generiert. IP₃ induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Bindung an IP₃-Rezeptoren, was in einer verstärkten Umstrukturierung des Zytoskeletts und einer veränderten Zellmorphologie resultiert. Die Stimulation des P2Y₂R führt ebenfalls zum Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum (Liang *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde der purinerge G-Protein-gekoppelte Rezeptor P2Y untersucht. Unter physiologischen Bedingungen setzen beschädigte Zellen oder aktivierte Blutplättchen Nukleotide frei, die an P2YR binden und diesen aktivieren. Besonders die Aktivierung des P2Y₂R hat einen Einfluss auf die Entwicklung endothelialer Dysfunktionen. So wiesen Atherosklerose-sensitive (*atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient*, ApoE^{-/-}) Mäuse mit P2Y₂R-Defizienz keine Fettstreifen-Läsionen (*fatty streak lesions*) auf (Chen *et al.*, 2017). Des Weiteren wurden atherosklerotische Plaques in atherosklerosesensitiven, P2Y₂R-defizienten Mäusen durch verminderte Einwanderung von Makrophagen stabilisiert (Qian *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). Durch die Bindung extrazellulärer Nukleotide an P2Y₂R war die Expression des entzündungsassoziierten Faktors VCAM1 hochreguliert (Seye *et al.*, 2003) und P2Y₂R-defiziente humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) migrierten im Wundheilungsversuch langsamer (Sathanoori *et al.*, 2017). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass eine Stimulation von HUVEC mit ATP in einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Mengen resultierte, was u. a. zur Phosphorylierung und Aktivierung von FAK führte. Die Aktivierung von FAK hatte eine Umordnung des Zytoskeletts und die Initiation der Migration zur Folge (Kaczmarek *et al.*, 2005; Cary *et al.*, 1998).

1.5 Atherosklerose

Im Folgenden wird dargelegt welche Einflussfaktoren die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen und diese manifestieren.

1.5.1 Endotheliale Dysfunktion und die Initiation atherogener Prozesse

Die Pathogenese der Atherosklerose ist ein multifaktorieller Prozess, an dessen Anfang Veränderungen des arteriellen Endothels stehen. Diese führen zu einem Ungleichgewicht einer Reihe gegenläufiger Faktoren (Vasodilatoren und Vasokonstriktoren, pro- und antiinflammatorische Substanzen, Oxidanzien und Antioxidanzien) und manifestieren sich schließlich zur endothelialen Dysfunktion.

Das vasorelaxierende NO und der potente Vasokonstriktor EDN1 werden von Endothelzellen gebildet und dienen primär der Regulation des Gefäßtonus. Eine Disbalance dieser beiden Faktoren kann eine Fehlfunktion des Endothels zur Folge haben. Unter diesen Bedingungen ist die Bioverfügbarkeit oder Synthese von NO vermindert, während EDN1 verstärkt exprimiert wird (Cerrato *et al.*, 2012; Barton *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1991). NO wird in Endothelzellen normalerweise konstitutiv durch NOS3 gebildet. Eine verringerte Bioverfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin, einem essentiellen Kofaktor von NOS3, kann zur Entkopplung der NOS3 führen. NOS3 trägt dann zur Bildung von ROS in Form von Superoxidanionen bei, die mit NO zu reaktivem Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren (Zou *et al.*, 2002; Balligand *et al.*, 2009). Durch die verringerte Bioverfügbarkeit von NO kommt es zur Vasokonstriktion und Hypertension. Ein initiales Ereignis, dass zum Ungleichgewicht von NO und EDN1 führt, ist die Bindung von oxLDL an seinen Rezeptor (LOX1). Dies hat die Bildung von Superoxidanionen zur Folge und führt zu einer verringerten Produktion von NO sowie zur Aktivierung von NF- κ B (Cominacini *et al.*, 2000). Letztere führt zu einer vermehrten Expression von EDN1 (Sakurai *et al.*, 2004; Quehenberger *et al.*, 2000).

Darüber hinaus werden, durch die Bindung von oxLDL an LOX1, Endothelzellen aktiviert, die daraufhin proatherogene Faktoren (Matrix-Metalloproteasen und Cystein-Cystein Chemokinligand 2 (CCL2/MCP1)) freisetzen. Dies führt zur Monozytenanhaftung und Differenzierung. Monozyten werden rekrutiert und transmigrieren aus dem Blutstrom in die Intima, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren und proinflammatorische Zytokine ausschütten, die weitere Monozyten anlocken (Takei *et al.*, 2001; Erl *et al.*, 1998). Durch die Aufnahme von Lipiden werden sie zu fettbeladenen Schaumzellen, sterben und bilden einen lipidreichen, nekrotischen Kern (Zhu *et al.*, 2011). Oberhalb des nekrotischen Kerns kann sich durch die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima eine fibröse Kappe bilden, die den nekrotischen Kern umschließt. Dies ist die Grundlage zur Entstehung atherosklerotischer Plaques (Chen *et al.*, 2001 a; Xu *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011).

Proinflammatorische Prozesse sind ein entscheidender Faktor bei der Entstehung und Ruptur atherosklerotischer Plaques. Entzündliche Prozesse und oxidativer Stress sind Atherosklerosemarker, die eng miteinander verknüpft sind (Balligand *et al.*, 1994; MacMicking *et al.*, 1995). Während einer Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung von plasmamembranständigen Oxidasen (z. B. NADPH-Oxidase) durch proinflammatorische Stimuli (Zytokine), wodurch ROS gebildet werden. ROS aktivieren entzündungsassoziierte, redoxsensitive Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B. Die Expression von ICAM1 und VCAM1 ist ebenfalls mit der NADPH-Oxidase assoziiert (Barbieri *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011 a; Li *et al.*, 2018). Um zelluläre Strukturen, wie Proteine, DNA und Lipide vor ROS zu schützen, gibt es zelleigene antioxidativ wirkende Enzyme, wie die Superoxid-Dismutase, Katalase und das Glutathion-S-Transferase-System (McCord und Fridovich, 1969; Kirkman *et al.*, 1999). Diese Schutzmechanismen wirken bis zu einem gewissen Grad ebenfalls ROS-assoziierten, proatherogenen Prozessen entgegen (Cominacini *et al.*, 2000).

Das Chemokin CCL2 vermittelt während einer Entzündung die Migration von immunkompetenten Zellen wie Monozyten und Lymphozyten aus dem Blutkreislauf ins Gewebe. Es wird vom vaskulären Endothelium und glatten Muskelzellen exprimiert und lockt Monozyten an. CCL2 hat einen direkten Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose und wird verstärkt in atherosklerotischen Plaques exprimiert (Nelken *et al.*, 1991).

1.5.2 Manifestierung und Progression der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische und altersassoziierte Erkrankung der Gefäße mit Einlagerung von Fetten in die Subintima der Gefäßwand, durch die es zur Arterienverengung kommt. Ein wichtiges Ereignis bei der Entstehung einer Atherosklerose stellt u. a. die Internalisierung von oxidiertem LDL durch *Scavenger* Rezeptoren (Abschnitt 1.4.1) dar, die eine proinflammatorische Antwort hervorruft. Die Folge sind Ablagerungen von Lipiden in der Intima und deren daraus resultierende Verdickung. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer nekrotischen Debris und zur Zerstörung der Intima. Es bildet sich eine fibröse Kappe über dem lipidreichen Kern unterhalb des Endothels. Eine Plaqueläsion entsteht. Durch die Akkumulation proteolytischer Enzyme, die die fibröse Kappe des Fibroatheroms langsam zersetzen, wird das fibröse Gewebe dünn und instabil, was schließlich zum Abreißen des Plaques und zur Entstehung eines Thrombus' führt. Instabile Plaques zeichnen sich, im Gegensatz zu stabilen Plaques, durch eine akute Entzündungsreaktion aus. Sie entwickelt sich zu Atheromen (Talgzyste), die zum Gefäßverschluss führen können (Aziz und Yadav, 2016; Singh *et al.*, 2002; Falk, 2006). Die atherosklerotische Gefäßwand zeichnet sich durch eine erhöhte Dicke und verminderte Zellularität, durch vermehrten Kollageneinbau sowie einer Verringerung des Elastin, aus. Durch die geringere Elastizität kommt es zu einem erhöhten systolischen und einem verringerten diastolischen Blutdruck (Falk, 2006).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Atherosklerose der Koronargefäße führt zu Myokardinfarkten und ist neben Krebserkrankungen die häufigste Todesursache von Patienten mit defektem *Wrn* (Takemoto *et al.*, 2013). Atherosklerose ist auf eine Fehlfunktion von Endothelzellen zurückzuführen und durch inflammatorische Prozesse gekennzeichnet, die zu einer Akkumulation von ROS führen (Xu *et al.*, 2013). Folglich kommt es zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichts zu Gunsten der oxidativen Seite. Daher ist atherosklerotisches Gewebe durch ein prooxidatives Milieu gekennzeichnet (Balligand *et al.*, 1994; Darville und Eizirik, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen von Werner-Syndrom Patienten sensitiv gegenüber exogenen DNA-schädigenden Agenzien sind und somit eine erhöhte Sensitivität gegenüber Umwelteinflüssen aufweisen (Monti *et al.*, 1992). Exogene und endogene ROS führen zu DNA-Basenschäden, die durch die BER behoben werden. Es ist bekannt, dass WRN direkt und indirekt an der BER beteiligt ist. Dabei interagiert WRN mit Faktoren der „*long-patch*“ BER und bindet an die DNA, um diese zu entwinden (Harrigan *et al.*, 2006).

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass WRN ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktionen unter basalen Bedingungen und nach oxidativem Stress ist.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von WRN auf Endothelzellfunktionen, die einen Hinweis auf die Entstehung von Atherosklerose bei Werner-Syndrom Patienten geben soll. Dazu sollten immortalisierte Endothelzell-ähnliche Zellen (EA.hy926), sowie primäre endotheliale Zellen (HUVEC) als *in vitro* Modelle verwendet werden. Nach dem *knockdown* (*kd*) von WRN mittels RNA-Interferenz (RNAi) sollten WRN-deplitierte Zellen im Vergleich zu Mock-transfizierten Wildtyp (Wt) Zellen hinsichtlich ihrer Endothelzellfunktionen vergleichend untersucht werden. Die Bedeutsamkeit der DNA-Helikase Funktion von WRN für die Endothelzellfunktionen sollte unter Verwendung eines WRN-Helikase Inhibitors (NSC617145) untersucht werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, inwieweit die *Kds* einzelner WRN-assoziiierter und nicht-assoziiierter Faktoren der BER einen Effekt auf Endothelzellfunktionen haben, die dem des WRN-*kd* ähneln. *Kds* ausgewählter BER-Faktoren sollten ebenfalls durch RNAi-vermittelte Herunterregulation erreicht werden. Weiterhin sollten die Zellen in Abhängigkeit von WRN oder einzelner BER-Faktoren mit schwach oder moderat toxischen Konzentrationen des Oxidanz tBHQ und des Alkylanz MMS behandelt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob dies dazu führt, dass mögliche basale Effekte auf Endothelzellfunktionen verstärkt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absauganlage MINI-VAC ECO	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Bestrahlungsgerät Gammacell® 1000 Elite	Best Theratronics Ltd., Vancouver, Kanada
Blottingsystem Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
CFX™ <i>Real-time</i> PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
CoolCell® Einfrierbehältnis	BioCision, Kalifornien, USA
CO ₂ -Inkubator Serie CB	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
ChemiDoc™ Touch	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Eismaschine SPR-80	NordCap®, Bremen, Deutschland
Fluoreszenzlampe HBO50	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Fluoreszenzlampe X-Cite Series 120Q	Excelitas Technologies Corp., Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzlampe Olympus U-RFL-T	Olympus, Shinjuku, Japan
Fluoreszenzmikroskop CKX 41	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus, Shinjuku, Japan
Gelelektrophoresegerät Mini	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Heizblock Drybath System	Starlab, Hamburg, Deutschland
Heizplatte/Magnetrührer Combimag Ret	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Kühlzentrifuge MIKRO 200R	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Mikroliterpipetten Pipetman classic 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA

Mikrotiterplattenlesegerät Infinite [®] F200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Mikrotiterplattenlesegerät NOVOSTAR	BMG Lab Technologies, Offenburg, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise [™]	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Milli-Q [®] Advantage A10 System	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Mini-Rocker-Shaker MR-1	Biosan, Riga, Lettland
Mini-Vac power Vacuum System	Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland
Multichannel Research plus Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoVue [™] Plus Spectrophotometer	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Netzgerät PowerPac [™] Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
QIAcube	Qiagen, Hilden, Deutschland
Radiometer Copenhagen PHM93	BioSurplus, San Diego, Kalifornien, USA
Roto-Shake Genie [®]	Scientific Industries Inc., New York, USA
Sonifiziergerät EpiShear [™] Probe sonicator	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler Biometra T-Personal	Biometra, Göttingen, Deutschland
Waage 3716MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad W22	GK Sondermaschinenbau GmbH, Arnsdorf, Deutschland
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus [™] Multifuge [™] X1	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge PerfectionSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
12-Well Platten	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
96-Well Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Deckgläser 18x18 mm	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA
Einfrierröhrchen Cryo.s™	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Filterspitzen 10 µl, 20 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Mehrzweckröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spitzen Braun Injekt 5 ml	B. Braun Melsungen AG
Serologische Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen, 35 mm, 60 mm	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

2.1.3 Kits

Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	Hoffmann – La Roche, Basel, Schweiz
HCS Mitotic Index Kit	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

High-capacity cDNA Reverse Transcription	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] Mini	Qiagen, Hilden, Deutschland
SensiMix SYBR [®] Hi-ROX	Bioline, London, UK
In Vitro Permeability Kit	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Luminescent ATP Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK
Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

2.1.4 Chemikalien

APS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DMF	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA

KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA
Methylenblau	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na-Acetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na-Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	VWR International GmbH, Radnor, Pennsylvania, USA
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neutralrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Oregon Green [®] 488 Bapta-1 AM	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
tBHQ	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
humanes TNF α	PeproTech, Princeton, New Jersey, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
----------	------------------------------------

2.1.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DMEM ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ECGM2	Promocell, Heidelberg, Deutschland
ECGS	Promocell, Heidelberg, Deutschland
FCS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HAT Zusatz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.6 Primäre Zellen und Zelllinien

HUVEC	Promocell, Heidelberg, Deutschland
EA.hy926	Universität von North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA
HT-29	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.1.7 Enzyme

RNase	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DNase-freie RNase	RNase-free DNase Set; Qiagen, Hilden, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.8 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) designiert. Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Eine Ausnahme stellen *Edn1*, *Plat* und *Icam1* dar, die von Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) synthetisiert wurden.

Tabelle 2-1: Auflistung der Primer.

Gen	Primersequenz Forward (5'-3')	Primersequenz Reverse (5'-3')	NM Nummer
<i>Icam1</i>	TACACGGTGAGGAAGGTT	AAGAAGATAGCCAACCAATGT	NM_000201.2
<i>Vcam1</i>	TGTCATTGAGGATATTGGAA	ATAACTGTATTCTTGGGTGAT	NM_001078.3
<i>Sele</i>	GCTATGACTTATGATGAG	ATTCCAATCCAGTAATAAC	NM_000450
<i>Nos3</i>	GTCCAGAGGCTGCAAGGATT	AAGAAACAGGAAGCGGGTGG	NM_000603.4
<i>Nos2</i>	GGAGGAGATGCTGGAGATGG	ATCCCCGCAAACATAGAGGT	NM_000625.4
<i>Ccl2</i>	CTATAGAAGAATCACCAGCAG	CTAGGGGAAAATAAGTTAGCTG	NM_002982.3
<i>Plat</i>	CTATAGAAGAATCACCAGCAG	TCCGGCAGTAATTATGTTTG	NM_000930.4
<i>Edn1</i>	GGAGAATTTACTTCCCACAAG	TCTCCATAATGTCTTCAGCC	NM_001168319.1
<i>Kdr</i>	GACAACTATCTCACACATCG	TTTCATCAGGGTAACTCCAG	NM_001159920.1
<i>Ho1</i>	CAACAAAGTGCAAGATTC	AGAAAGCTGAGTGTAAGG	NM_002133
<i>Gpx1</i>	GCCAAGAACGAAGAGATT	TCGAAGAGCATGAAGTTG	NM_000581
<i>Wm</i>	AAGATGTGCTGTAGAAGAA	TCGTAACATACACAATGGA	NM_000553.4
<i>Rac1</i>	ATCAGTTACACAACCAAT	CGTAATCTGTCATAATCTTC	NM_006908
<i>RhoA</i>	CCGATGTTATACTGATGTG	ACAGAAATGCTTGACTTC	NM_001664
<i>Vim</i>	GGACCAGCTAACCAACGACA	TCCTCCTGCAATTTCTCCCG	NM_003380.4
<i>Cdh5</i>	ATGCGGCTAGGCATAGCATT	TGTGACTCGGAAGAACTGGC	NM_001795.4
<i>Ptk2</i>	GCTCCCTTGCATCTTCCAGT	TCTTGAGGAGCTCTGGGGAA	NM_001352699.1
<i>Actb</i>	TGGCATCCACGAAACTAC	GTGTTGGCGTACAGGTCTT	NM_001101.3
<i>Gapdh</i>	CATGAGAAGTATGACAACAG	ATGAGTCCTTCCACGATA	NM_001289745.1

F: forward; R: reverse.

2.1.9 Primäre und sekundäre Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

β-Aktin (C4)	M	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
APE1	K	1:500	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
EDN1 (C-7)	M	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
NOS3 (C-11)	M	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
ERK2 (C-14)	K	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
FEN1	K	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
PTK2 (B-8)	M	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
GAPDH	K	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
pH3 (S10)	K	1:50	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
γH2AX (S139)	M	1:500	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
ICAM1 (G-5)	M	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
PARP1	K	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
NEIL1	K	1:500	Abcam, Cambridge, UK
pCHK1 (S345)	K	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
pCHK2 (T68)	K	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
pKAP1 (S824)	M	1:1000	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, AL, USA

p16 (F-12)	M	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
p21	K	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
pp53 (S46)	K	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
OGG1	K	1:500	Abcam, Cambridge, UK
RAC1	M	1:500	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
RHOA	K	1:500	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
VE-Cadherin	K	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Vimentin	M	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
WRN	M	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HO1	K	1:1000	Abcam, Cambridge, UK

M: Maus; K: Kaninchen.

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

anti-M IgG, Peroxidase- konjugiert	Z anti-M	1:2000	Rockland Immunochemicals, Limerick, Pennsylvania, USA
anti-K IgG, Peroxidase- konjugiert	Z anti-K	1:2000	Rockland Immunochemicals, Limerick, Pennsylvania, USA
Alexa Fluor 488®	Z anti-M	1:500	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

K: Kaninchen; M: Maus; Z: Ziege.

2.1.10 Sonstiges

Glasflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Nitrozellulosemembran Amersham™	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
LDL, Dil acetylated	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
LipofectamineRNAiMAX®	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Öl (Immersion Oil Type-F)	Olympus, Shinjuku, Japan
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc
RNase Inhibitor RiboLock	Thermo Fisher Scientific, Inc.,

	Waltham, Massachusetts, USA
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield®	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Zellschaber	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich

2.1.11 Lösungen und Puffer

Blotting-Puffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
ECL-Lösung	2 ml Lösung A 100 mM Tris-HCl pH 8,6 50 mg Luminol in 200 ml 20 µl Lösung B 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO 3 µl H ₂ O ₂ (30 %)
PBS (pH 7,4)	2 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBS mit hohem Salzgehalt	2 mM KH ₂ PO ₄ 400 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS 0,3 % (v/v) TritonX-100
Ponceau S Lösung	1,5 g/l Ponceau S 5 ml/l Essigsäure
Resazurinlösung	1 ml Resazurinstocklösung 9999 ml NaCl/P _i -Puffer
Resazurinstocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethylformamid

Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 1 ml 1,5 M Tris-Base pH 6,8 5,5 ml MilliQ-H ₂ O 160 µl SDS 10 % 80 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %
SDS Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
TBS	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngel (6 %)	4 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 10,4 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 160 µl TEMED 10 %
Trenngel (10 %)	6,7 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 7,8 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %
Trenngel (12 %)	8 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 6,5 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %
Trenngel (15 %)	10 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8 4,5 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS 10 % 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED 10 %

Krebs-HEPES-Puffer (5x)	118,6 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	4,2 mM	NaHCO ₃
	11,7 mM	C ₆ H ₁₂ O ₆
	10 mM	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₄ S
CaCl ₂ -MgSO ₄ -Stammlösung (1 M)	1 M	CaCl ₂
	1 M	MgSO ₄
Oregon Green Lösung (3 µM)	3 µl	Oregon Green
	3 µl	1 % Pluronic F-127 20 % (w/w)
	2 ml	KHP (1x)
Neutralrot-Inkubationslösung	10 %	1 M HEPES (pH 7,4)
	10 %	Neutralrot-Stocklösung (0,1 % Neutralrot in H ₂ O, 2 Tropfen Eisessig)
	80 %	Medium
Neutralrot-Fixierlösung	1 % (v/v)	Formaldehyd
	1 % (w/v)	CaCl ₂ in H ₂ O
Neutralrot-Extraktionslösung	50 % (v/v)	Ethanol
	1 % (v/v)	Essigsäure in H ₂ O

2.1.12 Inhibitoren

NSC617145 (WRN-Helikase Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
AZD2281 (Olaparib, PARP1 Inhibitor)	ApexBio, Houston, Texas, USA

2.1.13 siRNAs

AllStars negative Control siRNA (1027280)	Qiagen, Hilden, Deutschland
APE1 FlexiTube siRNA (SI02663353)	Qiagen, Hilden, Deutschland
FEN1 FlexiTube siRNA (SI03038959)	Qiagen, Hilden, Deutschland
NEIL1 FlexiTube siRNA (SI00136584)	Qiagen, Hilden, Deutschland
OGG1 FlexiTube siRNA (SI03085943)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PARP1 FlexiTube siRNA (SI02662996)	Qiagen, Hilden, Deutschland

WRN Stealth siRNA (HSS111385)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
-------------------------------	---

2.1.14 Software

Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
cellSens Dimension	Olympus, Shinjuku, Japan
cellSens Standard	Olympus, Shinjuku, Japan
i-control 1.8 (Infinite® F200)	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
ImageJ 1.483	National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
Image Lab™ Touch Software	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
MS Office	Redmond, Washington, USA
GraphPad Prism 5.01	Graphpad, La Jolla, Kalifornien, USA
Zen 2012	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
ChemBioDraw Ultra 13	PerkinElmer Informatics, Cambridge, MA, USA

2.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellkulturmethoden sowie molekularbiologische, proteinchemische, zytochemische und statistische Methoden angewendet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultivierung

Die humane, immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 wurde in *Dulbeccos's modified Eagle's medium* (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Da es sich um eine Hybridzelllinie handelt, wurde dem Medium ein Hypoxanthin-, Aminopterin-, Thymidin- (HAT) Zusatz beigefügt, der zur post-fusionalen Selektionierung diente. Die primären humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (ECGM2) kultiviert, welches mit *Endothelial Cell Growth Supplement* (ECGS), einem hypothalamischen Rinderextrakt, angereichert wurde. Die humane, immortalisierte Karzinomzelllinie HT-29 wurde ausschließlich für die Durchführung des Zell-Zell Adhäsionsversuchs benötigt und in *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂

angereicherter und befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Zur Inkulturnahme von eingefrorenen Zellen wurden diese in 15 ml Medium aufgetaut, in eine Zellkulturflasche (75 cm²) überführt und das Medium nach Adhärenz der Zellen (6 h, 37°C, 5 % CO₂) gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das restliche Medium mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) entfernt und die Zellen mit Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) von der Zellkulturflasche gelöst. In dem Medium enthaltenes FCS diente zum Abstoppen der Reaktion. Nach dem Zentrifugieren (220 x g, 2 min, 21°C) erfolgte die Kultivierung in frischem Medium. EA.hy926 Zellen wurden von Passage 19 bis 36, HT-29 Zellen von Passage 28 bis 36 und HUVEC von Passage 4 bis 9 verwendet. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte unter langsamer Temperatursenkung (-1°C/min) und unter Verwendung des CoolCell[®] Einfrierbehältnisses. Das Einfriermedium setzte sich aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 40 % FCS und 50 % Zell-Medium-Suspension zusammen. Zunächst wurden die Zellen bei -80°C langsam eingefroren und nach 24 h in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels verbesserter Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension luftblasenfrei in die Kammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop wurden alle Zellen der Großquadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl berechnete sich wie folgt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} * 10^4 * \text{Verdünnung} * \text{Volumen}$$

2.2.1.3 Transfektion (RNA-Interferenz)

Eine synthetisch hergestellte *small interfering RNA* (siRNA) mit einer Länge von 21 bis 22 Nukleotiden entspricht einem Sequenzausschnitt des auszuschaltenden Zielgens. Sie bindet durch die negative Ladung ihres Phosphatrückgrades an die im Transfektionsreagenz enthaltenen kationischen Lipide, welche durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Die doppelsträngige siRNA bindet an den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Daraufhin folgt die Entwindung und Separation der Doppelstränge. Die einzelsträngige, von der Zelle synthetisierte *messenger RNA* (mRNA), welche komplementär zur einzelsträngigen siRNA ist, bindet an dieser und wird abgebaut (Martinez, 2002).

Die Transfektion von EA.hy926 Zellen und HUVEC erfolgte 48 h nach Aussaat in 6 cm Schalen. Vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl Transfektionsreagenz LipofectamineRNAiMAX[®] mit 10 nM (APE1, FEN1, NEIL1, OGG1, WRN) siRNA bzw. 20 nM (PARP1) siRNA in DMEM, ohne Zusatz von FCS und Penicillin/Streptomycin, inkubiert. NS (*Nonsilencing*) siRNA diente als Negativkontrolle. Nach 20 min Inkubationszeit war die Komplexbildung zwischen kationischen Lipiden und siRNA

abgeschlossen und das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Inkubator kultiviert, bevor sie zur Versuchsdurchführung in für den jeweiligen Versuch spezifische Zellkultur-Formate umgesetzt wurden.

2.2.1.4 Zell-Behandlung

Um oxidativen Stress auszulösen und DNA-Schäden hervorzurufen, die durch BER behoben werden, wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC für 24 h (und 72 h) mit dem Oxidans tBHQ dauerbehandelt. Aufgrund seiner Unlöslichkeit in Wasser wurde tBHQ in DMSO (< 0,1 %) gelöst. Als Kontrolle wurde DMSO als Lösemittelkontrolle ins Medium gegeben. Da Alkylanzien ebenfalls DNA-Schäden verursachen, die durch BER behoben werden, wurden die Endothelzellen mit dem Alkylanz MMS ebenfalls für 24 h (und 72 h) behandelt. MMS wurde in H₂O gelöst. In Abhängigkeit der Endpunkte wurden zur Stimulation von entzündungsassoziierten Reaktionen wie der vaskulären Hyperpermeabilität oder der Zell-Zell Adhäsion und der transkriptionellen Hochregulierung von inflammationsassoziierten Faktoren EA.hy926 Zellen und HUVEC mit 100 ng/ml TNF α (19 h, 37°C, 5 % CO₂) oder 10 ng/ml TNF α (2 h, 37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Die mit TNF α behandelten Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Bestrahlung von EA.hy926 Zellen und HUVEC erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷-Quelle in dem Bestrahlungsgerät Gammacell® 1000 Elite. Bestrahlte Zellen wurden bei der Untersuchung der Seneszenz als Positivkontrolle mitgeführt. Des Weiteren wurde die Helikase-Aktivität von WRN pharmakologisch gehemmt. Dazu wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC 48 h vor Versuchsbeginn mit 0,5, 1,0 und 5,0 μ M des WRN Inhibitors NSC617145 inkubiert (Aggarwal *et al.*, 2013). Für Migrationsversuche wurden EA.hy926 Zellen 2 h vor Versuchsbeginn und während des Versuchs mit 50 μ M des PARP1 Inhibitors Olaparib (AZD2281) inkubiert (Senra *et al.*, 2011).

2.2.1.5 Viabilität und Toxizität

Zur Messung der Viabilität wurden, unter Verwendung von 96-Well Platten, Wildtyp und WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC für 24 h (und 72 h) dauerhaft mit verschiedenen tBHQ oder MMS-Konzentrationen (50-400 μ M) behandelt. Im Anschluss wurden verschiedene Endpunkte gemessen, die auf die zelluläre Viabilität bzw. Zytotoxizität schließen lassen. Verwendete Lösungen und Puffer sind in Abschnitt 2.1.11 aufgeführt.

2.2.1.5.1 Alamar Blue Assay

Die Alamar Blue Lösung ist eine oxidierte, blaue, nicht-fluoreszierende Resazurinlösung (7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid), die durch viable und metabolisch aktive Zellen zu

reduziertem, rötlichem, fluoreszierendem Resorufin (7-Hydroxyphenoxazin-3-on) umgewandelt wird (O'Brien *et al.*, 2000).

Es wurden 100 µl einer mit DMEM (ohne Zusätze und Phenolrot) verdünnten 44 µM Resazurinlösung auf die Zellen pipettiert und inkubiert (90 min, 37°C, 5 % CO₂). Die Fluoreszenz (Exzitation: 535 nm, Emission: 590 nm) wurde mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Infinite® F200 gemessen (Integrationszeit: 20 µs, Blitze: 5, Verstärkung: 25). Je nach Versuch wurden Kontrollzellen mit NS siRNA und/oder der Lösemittelkontrolle oder ausschließlich mit NS siRNA behandelt.

2.2.1.5.2 Neutralrot Assay

Der schwach kationische Neutralrot-Farbstoff diffundiert durch die Plasmamembran und bindet an anionische Moleküle der Lysosomen. Lebende Zellen sind dazu in der Lage den pH-Gradienten aufrechtzuerhalten, der die Zelle dazu befähigt Neutralrot aufzunehmen und die Freisetzung ins Medium, während eines Waschschrilles, zurückzuhalten. Durch eine saure Lösung wird Neutralrot aus der Zelle extrahiert. Die Menge des Farbstoffs korreliert dabei mit der Anzahl lebender Zellen (Repetto *et al.*, 2008).

Zunächst wurde das Medium von den Zellen entfernt und zur Durchführung des Laktatdehydrogenase (LDH) Tests (Abschnitt 2.2.1.5.3) in eine andere 96-Well Platte überführt. Es wurden 200 µl der frisch angesetzten Neutralrot-Inkubationslösung auf die Zellen gegeben und inkubiert (60 min, 37°C, 5 % CO₂). Bei lichtmikroskopischer Betrachtung zeigten die Zellen eine deutliche Rotfärbung. Nach dem Entfernen der Inkubationslösung wurden 100 µl einer Fixierlösung auf die Zellen gegeben, die sofort wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der rote Farbstoff mittels Extraktionslösung gelöst (15 min, RT, unter Schütteln). Die Absorption wurde mit dem Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

2.2.1.5.3 LDH Assay

Das Prinzip des LDH Tests beruht auf der erhöhten Freisetzung der zytosolischen LDH in den extrazellulären Raum durch Zellen mit lysierter Plasmamembran. Dabei setzt LDH Pyruvat und Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) zu Lactat und Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid (NADH) um. Es entsteht rotes Formazan, dessen Absorption gemessen wird (Decker und Lohmann-Matthes, 1988).

Die Untersuchung des LDH-Gehalts im Medium wurde mit dem „Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)“-Kit von Roche durchgeführt. Zur Messung der LDH wurde die LDH-Lösung entsprechend des Volumens des Mediumüberstandes zugegeben und inkubiert (30 min, 37°C,

5 % CO₂). Im Anschluss wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm mit Hilfe des Plattenlesegeräts Sunrise gemessen.

2.2.1.5.4 MTT Assay

NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen reduzieren das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu unlöslichem, violetterem Formazan. Die Intensität der Blaufärbung bzw. der Absorption lässt Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität und somit auf die Vitalität der Zellen zu (Mosmann, 1983).

Zur Durchführung des Tests wurden 20 µl MTT Lösung (5 mg/1 ml PBS) zu 100 µl Medium pipettiert und abhängig von der Dauer der Formazanbildung inkubiert (30-40 min, 37°C, 5 % CO₂). Nach der Bildung von Formazannadeln wurde der Überstand abgenommen und das Formazan mit 100 µl DMSO gelöst (15 min RT, unter Schütteln). Die Absorption wurde mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

2.2.1.6 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Die Substanz 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) diffundiert in die Zelle und wird dort durch zelluläre Esterasen zu nicht-fluoreszierendem H₂DCF deacetyliert. In der Zelle gefangen, wird H₂DCF, proportional zur Menge der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, welches fluoresziert und somit detektiert werden kann (Wang und Roper, 2014). Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Menge der ROS.

Die Messung der Entstehung von zellulären ROS in EA.hy926 Zellen und HUVEC erfolgte im 96-Well Format im Anschluss an die 24-stündige Dauerbehandlung mit schwach toxischen oder moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen. EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden mit 100 µM H₂DCFDA inkubiert (20 min, 37°C, 5 % CO₂). Die Fluoreszenz (Exzitation: 485 nm; Emission: 535 nm) wurde mit dem Tecan Infinite® F200 Plattenlesegerät gemessen (Integrationszeit: 20 µs; Blitze: 5; Verstärkung: 25).

2.2.1.7 Zell-Zell Adhäsion

Zur Untersuchung des Einflusses von WRN sowie der ausgewählten BER-Faktoren auf Entzündungsprozesse, an denen Endothelzellen durch Sekretion inflammatorischer Faktoren maßgeblichen beteiligt sind, wurde die Zell-Zell Adhäsion untersucht.

Dazu wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC in 96-Well Platten ausgesät und für 24 h mit tBHQ, MMS, der jeweiligen Lösemittelkontrolle oder für 2 h mit 10 ng/ml TNFα behandelt. HT-29 Zellen wurden mit 2,5 µM des membranpermeablen Calcein-Acetoxy-methylester (-AM) angefärbt (30 min, 37°C, lichtgeschützt). Nach Eintritt in die Zelle wird Calcein-AM durch

intrazelluläre Esterasen zu fluoreszierendem Calcein hydrolysiert. Es wurde eine Zellsuspension mit 1×10^4 fluoreszenzmarkierter HT-29 Zellen/Well auf die EA.hy926 oder HUVEC Ein-Zell-Schicht (*Monolayer*) pipettiert und inkubiert (60 min, 37°C, 5 % CO₂). Im Anschluss wurden die nicht adhärenen HT-29 Zellen durch Waschen mit PBS vorsichtig entfernt (Nübel *et al.*, 2004). Die Messung erfolgte mittels Mikrotiterplattenlesegerät Tecan Infinite® F200 (Exzitation: 496 nm; Emission: 516 nm; Integrationszeit: 500 µs; Blitze: 10; Ruhepause: 2 ms). Die Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder erfolgte mit dem Olympus Axiovert 40 CFL Mikroskop.

2.2.1.8 Endotheliale Zellmigration

Die Untersuchung der endothelialen Zellmigration erfolgte mit Hilfe des Wundheilungs Assays. Die Fähigkeit der Endothelzellen, nach *kd* von WRN und verschiedenen BER-Faktoren sowie nach Substanzbehandlung zu migrieren, wurde in einer 6-Well Platte untersucht. Der konfluente, einzellige HUVEC oder EA.hy926 Zellrasen wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze geritzt, so dass eine Verletzung des Zellrasens entstand. Das Verschließen der „Wunde“ mit der Zeit, stellt ein Maß für die Migrationsaktivität dar. Die Zellen wurden während der Migrationszeit je nach Bedingung mit tBHQ, MMS oder der Lösemittelkontrolle inkubiert (8 h, 37°C, 5 % CO₂). Des Weiteren wurden EA.hy926 Zellen mit 1 µM oder 10 µM des WRN Inhibitors NSC617145 inkubiert. Direkt nach der Verletzung (0 h), 4 h und 8 h nach der Verletzung wurden lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem Olympus Axiovert 40 CFL Mikroskop aufgenommen (van der Meer *et al.*, 2010). Die Fläche des unbewachsenen Abschnitts wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt.

2.2.1.9 Vaskuläre Permeabilität

Veränderungen der vaskulären Permeabilität von WRN-profizienten und *-kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden mit dem „In Vitro Vascular Permeability Assay“-Kit von Merck Millipore untersucht. Dabei wachsen die Zellen auf einer semipermeablen Membran, in der sogenannten *Insert*-Platte. In Abhängigkeit der Ausbildung von Adhäsionsverbindungen, die die Dichte der Endothelbarriere regulieren, kann mehr oder weniger eines Fluoreszenzfarbstoffs durch die Zellzwischenräume der einlagigen Zellschicht dringen. Der durch die Zellzwischenräume hindurch getretene Fluoreszenzfarbstoff wird aufgefangen und dessen Fluoreszenzintensität gemessen. Letztere korreliert mit der vaskulären Permeabilität.

WRN-profiziente und WRN-defiziente EA.hy926 Zellen (1×10^5) und HUVEC ($0,5 \times 10^5$) wurden in das *Insert* ausgesät. Um eine 100 %ige Konfluenz und eine vollständige Ausbildung der Zell-Zell Verbindung zu erreichen, wurden die Zellen 72 h inkubiert (37°C, 5 % CO₂); anschließend erfolgte die Behandlung mit tBHQ. Die Zellen wurden 48 h nach Aussaat nachtransfiziert, um den *kd* von WRN sicherzustellen. Als Positivkontrolle erfolgte eine

Dauerbehandlung mit 100 ng/ml TNF α für 19 h. Um die Durchlässigkeit der Zellschicht zu untersuchen, wurden 75 μ l einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Dextran Lösung auf den Zellrasen pipettiert und die Platte inkubiert (20 min, RT, lichtgeschützt). Die durch die Zellzwischenräume hindurch getretene Fluoreszenzlösung wurde in einer Auffangplatte gesammelt. Die Fluoreszenz wurde mittels Tecan Infinite[®] F200 (Exzitation: 284 nm; Emission: 535 nm) gemessen (Integrationszeit: 1000 μ s; Blitze: 5; Verstärkung: 20).

2.2.1.10 Aufnahme von modifiziertem LDL

Die Endozytose von modifiziertem, insbesondere oxLDL erfolgt über bestimmte Rezeptoren, deren Aktivierung eine Entzündungskaskade auslöst und die an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind.

In diesem Versuch wurde der Einfluss von WRN und tBHQ beziehungsweise MMS auf die Aufnahme von modifiziertem LDL untersucht. OxLDL stimuliert die Sauerstoffradikalbildung. Um den Eintrag von weiteren ROS zu vermeiden und rein basale Effekte bzw. Effekte von tBHQ oder MMS messen zu können, wurde für den Versuch acetyliertes LDL (acLDL) verwendet. Dieses bindet an die gleichen Rezeptoren wie oxLDL. Die Messung der Aufnahme von modifiziertem LDL wurde im 96-Well durchgeführt. Dazu wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC mit 10 μ g/ml fluoreszenzmarkiertem *1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated* LDL (DilAcLDL) inkubiert (4 h, 37°C, 5 % CO₂). Nicht aufgenommenes acLDL wurde durch das Waschen mit PBS entfernt. Die Fluoreszenzmessung wurde im Tecan Infinite[®] F200 durchgeführt (Exzitation: 554 nm; Emission: 571 nm; Integrationsszeit: 500 μ s; Blitze: 5).

2.2.1.11 ATP-Gehalt

Um zu überprüfen, ob WRN einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion und somit einen Einfluss auf den bioenergetischen Status der Zelle hat, wurden zelluläre ATP-Mengen mit Hilfe des „Luminescent ATP Detection Assay“ Kit von Abcam untersucht. Um den intrazellulären ATP-Gehalt zu messen, werden die Zellen zunächst lysiert und der ATPase-abhängige Abbau von ATP inhibiert. Die eigentliche Messung des ATP-Gehalts beruht auf der Zugabe von D-Luciferin und Luciferase welches mit ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin umgesetzt wird. Dabei entsteht neben Adenosinmonophosphat (AMP), anorganischem Diphosphat (PP_i) und CO₂ ebenfalls Licht, welches gemessen wird und proportional zum ATP-Gehalt ist (<https://www.abcam.com>).

Der Versuch erfolgte im 96-Well Format. Dazu wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC mit WRN siRNA transfiziert, replatiert und mit verschiedenen tBHQ- oder MMS-Konzentrationen behandelt. Zum Lysieren der Zellen und zur Stabilisierung von ATP wurde ein Lysepuffer (Bestandteil des Kits) zugegeben (5 min, 700 rpm schüttelnd, RT). Nach Zugabe der

Substratlösung (Bestandteil des Kits) wurde der Ansatz vermischt (5 min, 700 rpm schüttelnd, RT), gefolgt von einer Inkubationsphase (10 min, RT, lichtgeschützt). Im Anschluss wurde die Lumineszenz mittels Tecan Infinite® F200 gemessen (Dauer: 4 sec; Amplitude: 5 mm; Integrationszeit: 5000 ms).

2.2.1.12 Intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung

Die Proliferation und Migration endothelialer Zellen wird u. a. durch deren Ca^{2+} -Freisetzung z. B. aus dem ER reguliert (Martini *et al.*, 2010). Ein möglicher Einfluss von WRN und tBHQ auf die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} wurde untersucht. Das Messprinzip beruht auf der Inkubation der Zellen mit einem membranpermeablen Ca^{2+} -Indikator. Kommt es zur intrazellulären Ausschüttung von Ca^{2+} bindet dieses an den Indikator, wodurch es zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals kommt.

Der Versuch wurde im 96-Well-Format durchgeführt. Zunächst wurden die konfluenten Zellen mit Krebs-HEPES-Puffer (KHP) gewaschen und anschließend mit einer Lösung bestehend aus 3 μ M des Ca^{2+} -Indikators Oregon Green® 488 Bapta-1-AM sowie Pluronic® F-127 und KHP-Puffer inkubiert (1 h, 37°C, 5 % CO_2). Nach Entfernen der Oregon Green-Lösung wurden 180 μ l KHP-Puffer auf die Zellen gegeben. Zur Stimulation der Ca^{2+} -Freisetzung wurde eine Reagenzienplatte vorbereitet, die mit in KHP-Puffer verdünntem ATP (Endkonzentration von ATP: 10 μ M) und dem KHP-Puffer bestückt war (Kassack *et al.*, 2002). Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit NOVOstar, einem Plattenlesegerät mit Pipettierfunktion, wobei zu jedem Well sequentiell in KHP verdünntes ATP oder die KHP Pufferkontrolle pipettiert und mit einer Messdauer von 30 s die Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} gemessen wurde (Exzitation: 485 nm; Emission: 538 nm).

2.2.1.13 Seneszenz

Die Messung der replikativen Seneszenz beruht auf der Blaufärbung seneszenten Zellen durch die Hydrolyse des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) mittels seneszenzassoziiertes β -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindole, welches zu 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo oxidiert wird (Dimri *et al.*, 1995).

Die Seneszenz von WRN-profizienten und WRN-*kd* HUVEC und EA.hy926 Zellen wurde 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte HUVEC und EA.hy926 Zellen mit 10 Gy bestrahlt und 72 h nach Bestrahlung ebenfalls hinsichtlich ihrer Seneszenz untersucht. Nach einer Transfektionszeit von 48 h wurde das Medium gewechselt. Der Versuch wurde mit dem „Senescence β -Galactosidase Staining“-Kit von Cell Signaling in 35 mm Schalen durchgeführt. Vor Beginn wurde die β -Galaktosidase Färbelösung angesetzt. Dazu wurde X-Gal in Dimethylformamid (DMF) gelöst (20 mg/ml, 20 x Stocklösung). Die Färbelösung setzte sich aus weiteren im Kit enthaltenen Komponenten

zusammen. Entsprechend der Anleitungen des Kits wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums einmal mit PBS gewaschen und mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) immobilisiert (15 min, RT). Im Anschluss wurde die Fixierlösung entfernt und der Zellrasen zweimal mit PBS gespült. In jede Schale wurde 1 ml der β -Galactosidase Färbelösung gegeben und in einem Trockeninkubator (16 h, 37°C, kein CO₂) inkubiert. Lichtmikroskopische Bilder wurden mit dem Olympus Axiovert 40 CFL Mikroskop aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet. Pro Bedingung wurden ≥ 500 Zellen gezählt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Nach dem Absaugen des Mediums und dem Waschen mit PBS wurden zuvor transfizierte bzw. behandelte Endothelzellen mit 350 μ l eines Puffers, bestehend aus 306 μ l RLT Puffer (entnommen aus RNeasy[®] Mini Kit) und 44 μ l Dithiothreitol (DTT) inkubiert und anschließend unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und lysiert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit und der QIAcube Workstation nach dem Protokoll „*Purification of total RNA from animal tissues and cells including DNase digestion*“ von Qiagen isoliert. Vor der RNA Aufreinigung wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Das RNeasy Mini Kit beinhaltet Säulen, an deren Silikamembran vorwiegend mRNA bindet, die durch mehrere Waschschrte gereinigt und schließlich in RNase-freiem H₂O eluiert wird.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoVue™ Plus Spectrophotometer gemessen. Das Absorptionsmaximum von RNA hat seine spezifische optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Reinheit der Probe errechnet sich somit aus dem Quotienten beider optischer Dichten (260 nm/280 nm) und sollte 2,0 bzw. 2,0 bis 2,2 betragen. Die isolierte mRNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 cDNA Synthese

Die *complementary DNA* (cDNA) Synthese wurde mit Hilfe des „*High-capacity cDNA Reverse Transcription*“ Kits durchgeführt. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase Reverse Transkriptase, unter Verwendung von *Random-Hexamer-Primern*. Bei letzterem handelt es sich um die Mischung aller möglichen Kombinationen von Basen eines hexameren Nukleotids, welches an zufälligen RNA-Abschnitten komplementär bindet.

Es wurden 2000 ng isolierte mRNA pro Reaktionsansatz verwendet, wobei abhängig von der im Eluat enthaltenen Menge bis zu 10 µl RNA-Eluat in den Ansatz pipettiert wurden. Des Weiteren wurde RT-Puffer, Desoxynukleotid (dNTP) Mix (100 mM), RT Random Hexamer-Primer, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor und Nuklease-freies Wasser in den vom Hersteller empfohlenen Volumina (Tabelle 2-2) hinzu pipettiert. Die cDNA Synthese wurde im Thermo-Cycler von Biometra durchgeführt (Tabelle 2-3). Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 2-2: Reaktionsansatz cDNA Synthese.

Komponente	Volumen [µl]
RNA (2000 ng)	1,3-10
10X Puffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuklease-freies H ₂ O	0-11,9
Insgesamt pro Reaktionsansatz	20,0

Tabelle 2-3: Reaktionsbedingungen während der cDNA Synthese.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Primer Annealing	25	10
DNA-Polymerisation	37	120
Enzym Deaktivierung	85	5
Lagerung	4	∞

2.2.2.4 Quantitative Real-time PCR

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mit dem CFX96™ *Real-time* Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) Detektions-System und dem „SensiMix SYBR® Hi-ROX“ Kit. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der quantitativen Erfassung der synthetisierten cDNA nach jedem Zyklus, die dem Maß der mRNA-Expression eines Gens entspricht. Dabei bindet SYBR® *green* an doppelsträngige DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Die nach jeder Elongation gemessene Fluoreszenz korreliert mit der DNA-Menge. Der im Versuch verwendete Reaktionsansatz beinhaltete synthetisierte cDNA, den jeweiligen genspezifischen *Forward* und *Reverse* Primer und SensiMix SYBR® Hi-ROX. Mit sterilem PCR Wasser wurde der Reaktionsansatz auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt (Tabelle 2-4). Als Referenzgene dienten Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*Gapdh*) und β-Aktin (*Actb*). Die quantitative *Real-time* PCR wurde unter den in Tabelle 2-5 aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Schritte, bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, wurden in 44 Amplifizierungszyklen

wiederholt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Ermittlung von ΔCt und $\Delta\Delta Ct$. Der *threshold cycle* (Ct) Wert gibt den Beginn der exponentiellen Phase an, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übertrifft. Für die Auswertung wurde sowohl das Mittel des Ct-Wertes des Zielgens, als auch das des Referenzgens ermittelt. Um ΔCt zu berechnen, wurde der Ct-Wert des Ziel-Gens von dem des Referenzgens für jede Versuchsbedingung subtrahiert. Anschließend wurde $\Delta\Delta C$ durch den Quotient der beiden Gruppen, Kontrolle und behandelt, errechnet (Rao *et al.*, 2013). Daraus ergibt sich folgende

$$\text{Formel: } 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{\text{Expression (behandelt)}}{\text{Expression (Kontrolle)}}$$

Dieser Wert wurde mit Hilfe der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software ermittelt. PCR Produkte mit spezifischer Schmelzkurve und weniger als 34 Zyklen wurden in die Auswertung miteinbezogen. Die quantitative *Real-time* Analyse wurde mit Primern durchgeführt, die die mRNA-Expression der folgenden Gene widerspiegeln: *Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Nos3*, *Nos2*, *Ccl2*, *Plat*, *Edn1*, *Kdr*, *Ho1*, *Gpx1*, *Ptk2*, *Rac1*, *Cdh5*, *Vim*, *RhoA* und *Wrn*, deren Primersequenzen im Materialenteil (Abschnitt 2.1.8) zu finden sind.

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz quantitative *Real-time* PCR.

Komponente	Menge
cDNA (20 ng)	20 ng
Forward Primer	0,25 μ M
Reverse Primer	0,25 μ M
SensiMix SYBR [®] Hi-ROX	1x
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20 μ l
Insgesamt pro Reaktionsansatz	20,0

Tabelle 2-5: Reaktionsbedingungen quantitative *Real-time* PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Polymeraseaktivierung	95	10:00
Denaturierung	95	0:15
Primerhybridisierung	55	0:15
Elongation	72	0:17

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Protein-Isolierung

Die Gesamtproteinisolierung erfolgte mittels Roti[®]-Load Proteinauftragspuffer aus 6-Well Platten oder 6 cm Schalen. Das im Roti[®]-Load Proteinauftragspuffer enthaltende anionische SDS (*sodium dodecyl sulfat*, Natriumdodecylsulfat) führt zu einer Denaturierung der Proteine und überlagert durch seine Anlagerung deren Eigenladung mit negativer Ladung. Es wurden 200 μ l mit H₂O verdünnter Roti[®]-Load-Lösung auf die Zellen gegeben (5 min, auf Eis), diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Gefäßboden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall mit einer hohen Amplitude. Dazu wurden die Zellen

auf Eis sonifiziert (Amplitude 50 %; 5 Pulse je 1 s Puls; 1 s Pause). Im Anschluss wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10.000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine der Zellen wurden nach Molekulargewicht durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurden die Proteine denaturiert und eine Negativladung erzeugt (Abschnitt 2.2.3.1.). Aufgrund dessen wandern die Proteine anhand ihres Molekulargewichts und unabhängig ihrer eigenen Ladung und dreidimensionalen Struktur durch das Gel. Somit wandern Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht schneller zur Anode als die mit einem höheren Molekulargewicht. Die Gelmatrix ist aus mehreren Komponenten zusammengesetzt. Durch Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid werden lineare Ketten bzw. Querverbindungen ausgebildet. Ammoniumpersulfat (APS) ist für die Polymerisation verantwortlich, die durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert wird. Die Proteine wurden denaturiert (95°C, 5 min) und auf das Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist im Materialteil (Abschnitt 2.1.11) aufgeführt. Nach Auftragung wurden die Proteine unter Verwendung des SDS Laufpuffers mittels Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-Systems elektrophoretisch aufgetrennt. In einem 5 %igen Sammelgel wurde das Gesamtprotein bei einer Stromstärke von 15 mA konzentriert und im 8-15 %igen Trenngel bei 35 mA pro Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden 7 µl des Proteinmarkers PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder aufgetragen.

2.2.3.3 Western Blot Analyse

Dieses Prinzip basiert auf der Detektion von Proteinen durch die Bindung spezifischer, primärer Antikörper, die monoklonal oder polyklonal über ein, beziehungsweise mehrere, Epitope an das Zielprotein binden. Die Detektion erfolgt über den sekundären Antikörper. Der Proteintransfer der im SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.3.2) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels *Wet* Blot Elektrophoresemethode und mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Cell Systems (kleine Proteine: 90 min, 300 mA; große Proteine: 16 h, 100 mA). Zur Überprüfung der Proteinimmobilisierung an der Membran wurde diese anschließend mit Ponceau S (Abschnitt 2.1.11) angefärbt und mit Tris-gepufferter Salzlösung (*Tris-buffered saline*, TBS) nach Dokumentation entfärbt (5 min, RT, unter Schwenken). Zur Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in 5 % fettreduziertem Milchpulver, gelöst in TBST (TBS mit Tween20®), inkubiert (2 h, RT). Im Anschluss wurde die Membran mit TBST gewaschen und mit einem für das Zielprotein spezifischem, primären Antikörper

inkubiert (16 h, 4°C, 1:500 – 1:1000). Nach dem Waschen mit TBST wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper in 5 % fettreduziertem Milchpulver/TBST oder 5 % Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA)/TBST verdünnt und inkubiert (2 h, RT, 1:2000). Ein Sekundärantikörper, der als signalgebende Komponente mit einer Peroxidase gekoppelt war, wurde verwendet. Das Substrat für die Peroxidase war Luminol. Zur Sichtbarmachung des Proteins wurde die Membran in einer *enhanced chemiluminescence* (ECL) Chemilumineszenzlösung (Abschnitt 2.1.11) inkubiert (1 min, RT). Als Ladekontrollen dienten β -Aktin, GAPDH und extrazellulär regulierte Kinase 2 (ERK2). Die Lumineszenz-Intensität wurde mittels Chemidoc™ Touch detektiert und mit Hilfe von ImageJ quantifiziert.

2.2.4 Zytochemische Methoden

2.2.4.1 pH3-Färbung

Der mitotische Index der Zellen wurde bestimmt, um den Proliferationsstatus zu überprüfen. Dazu wurde spezifisch an Serin 10 phosphoryliertes Histon 3 (pH3) detektiert, das während der Mitose phosphoryliert wird. Somit lassen sich pH3-positive Zellen als proliferativ einordnen. Zur Untersuchung des mitotischen Index wurde das „HCS Mitotic Index“ Kit verwendet. EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden auf Deckgläschen ausgesät. Konfluente oder subkonfluente (Kontrolle) Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd auf den Deckgläschen fixiert (15 min, RT). Die Inkubation der fixierten Zellen mit Methanol (-20°C, 16 h) diente zur Permeabilisierung. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 % BSA/PBST (PBS mit Tween20®) inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren (1 h, RT). Die Inkubation mit einem in PBST verdünnten H3 Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer (1:500, 4°C, 16 h). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit PBS mit hohem Salzgehalt (2 min, RT) inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen (5 min, RT). Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (Ziege anti-Kaninchen) (1:500, 2 h, RT). Nach dem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Vectashield eingedeckelt und versiegelt. Fluoreszenzbilder wurden mit dem Olympus BX43 Mikroskop aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet. Pro Bedingung wurden ≥ 100 Zellen gezählt. Nicht-konfluente Zellen dienten als Positivkontrolle.

2.2.4.2 F-Aktin Färbung

Um die Auswirkung des WRN-*kd* auf das Aktin-Zytoskelett und die damit verbundene endotheliale Zellmigration darzustellen, wurden EA.hy926 Zellen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Phalloidin ist ein zyklisches Peptid und Toxin des Pilzes *Amanita phalloides*, welches sich an filamentöses Aktin anlagert und dessen Depolymerisation verhindert (Dancker *et al.*, 1975).

Zu den Analysezeitpunkten wurden die Zellen mit 4 % frisch angesetztem Paraformaldehyd/PBS inkubiert (15 min, RT, unter Schütteln). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Aceton behandelt (5 min, RT). Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit FITC markiertem Phalloidin (40 min, RT) inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit DAPI-haltigem Vectashield eingedeckelt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Olympus BX43 Mikroskop.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm oder + Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde, je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen, mit dem zweiseitig, ungepaarten *Student's t-Test*, *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) mit Dunnett's Korrektur für multiple Vergleiche oder dem *Two-way ANOVA* mit Bonferroni *post-hoc* Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden für den *Student's t-Test* mit „*“, *One-way ANOVA* mit „#“ und *Two-way ANOVA* mit „‡“ gekennzeichnet. Bei einem Wert von $p \leq 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Sofern nicht anders angegeben, wurden mit NS siRNA und DMSO behandelte oder unbehandelte Zellen (Kon) als Kontrolle verwendet.

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit verwendete Fusionszelllinie EA.hy926 ist ein Hybrid aus humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) und der permanenten A549 Zelllinie, die aus dem humanen Lungenkarzinom isoliert wurde (Edgell *et al.*, 1983). EA.hy926 Zellen zeigen Charakteristika von primären Endothelzellen. Sie bilden den Von-Willebrand-Faktor und zeigen eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1), vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (VCAM1) und E-Selektin nach Stimulation mit TNF α (Thornhill *et al.*, 1993). Des Weiteren wurden in dieser Arbeit HUVEC verwendet. HUVEC werden aus der humanen Nabelschnurvene isoliert und sind ein gut etabliertes *in vitro* Modell zur Untersuchung von spezifischen Endothelzellfunktionen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der basalen Effekte des Werner-Syndrom Proteins (WRN) sowie ausgewählter Basenexzisionsreparatur- (BER) Faktoren auf Endothelzellfunktionen untersucht. EA.hy926 und HUVEC, wurden, nach *knockdown* (kd) von WRN oder einzelnen BER-Faktoren (*apurinic/aprimidinic endonuclease 1*, APE1; *Nei like DNA Glycosylase 1*, NEIL1; *flap endonuclease 1*, FEN1; Poly(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase 1, PARP1; 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1, OGG1) und nach Agensbehandlung, hinsichtlich ihrer Endothelzellfunktionen untersucht. Um das prooxidative Milieu in der atherosklerotischen Gefäßwand nachzubilden, wurden beide Endothelzelltypen mit schwach oder moderat toxischen Konzentrationen des Oxidans tertiär-Butylhydrochinon (tBHQ) inkubiert. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass die Funktionalität sowie die Vitalität dieser Zellen erhalten blieben. Im Anschluss wurde der Effekt auf die Endothelzellen untersucht. Die Inkubation mit tBHQ diente zudem der Generierung von DNA-Schäden, die normalerweise durch die oben genannten BER-Faktoren und WRN repariert werden. Um substanzklassenspezifische Unterschiede zu untersuchen, die den gleichen DNA-Reparaturweg aktivieren wie Oxidanzien, wurden die Zellen selektiv für einige Endpunkte mit dem Alkylanz Methylmethansulfonat (MMS) inkubiert.

3.1 Untersuchungen des Einflusses von WRN auf die Viabilität und auf endothelzellspezifische Funktionen

Alle Versuche wurden nach dem gleichen zeitlichen Ablauf durchgeführt (Abbildung 3-1).

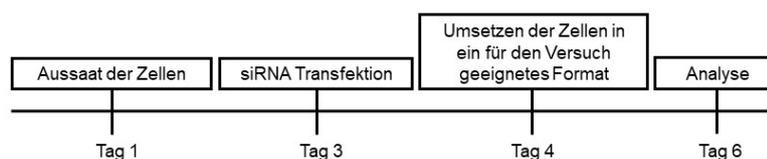


Abbildung 3-1: Schema zum Ablauf der Untersuchung von Endothelzellfunktionen.

48 h nach Aussaat der Zellen wurde die Transfektion mit unterschiedlichen siRNAs durchgeführt. Die Zellen wurden entsprechend der Anforderungen des Experiments erneut ausgesät. Nach weiteren 48 h wurde die jeweilige Analyse durchgeführt. siRNA: *small interfering RNA*.

3.1.1 siRNA-vermittelter WRN-*kd*

Um Effekte von WRN auf endothelzellspezifische Funktionen zu untersuchen, wurde zunächst ein WRN-*kd* mittels RNA-Interferenz durchgeführt. EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden mit 10 nM WRN-spezifischer siRNA inkubiert und der WRN-Proteingehalt mittels Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 3-2A). In EA.hy926 Zellen wird, im Vergleich zu mit *Nonsilencing* (NS) siRNA behandelten Zellen, ein WRN-Restproteingehalt von 23 % detektiert. In HUVEC wird 36 % WRN, im Vergleich zu mit NS siRNA behandelten Zellen, detektiert. Dieses Ergebnis wurde mittels quantitativer *Real-time* PCR verifiziert (Abbildung 3-2B). Auf mRNA-Ebene werden 17 % *Wrn* mRNA in EA.hy926 Zellen und 59 % *Wrn* mRNA in HUVEC jeweils im Vergleich zu mit NS siRNA behandelten Zellen nachgewiesen.

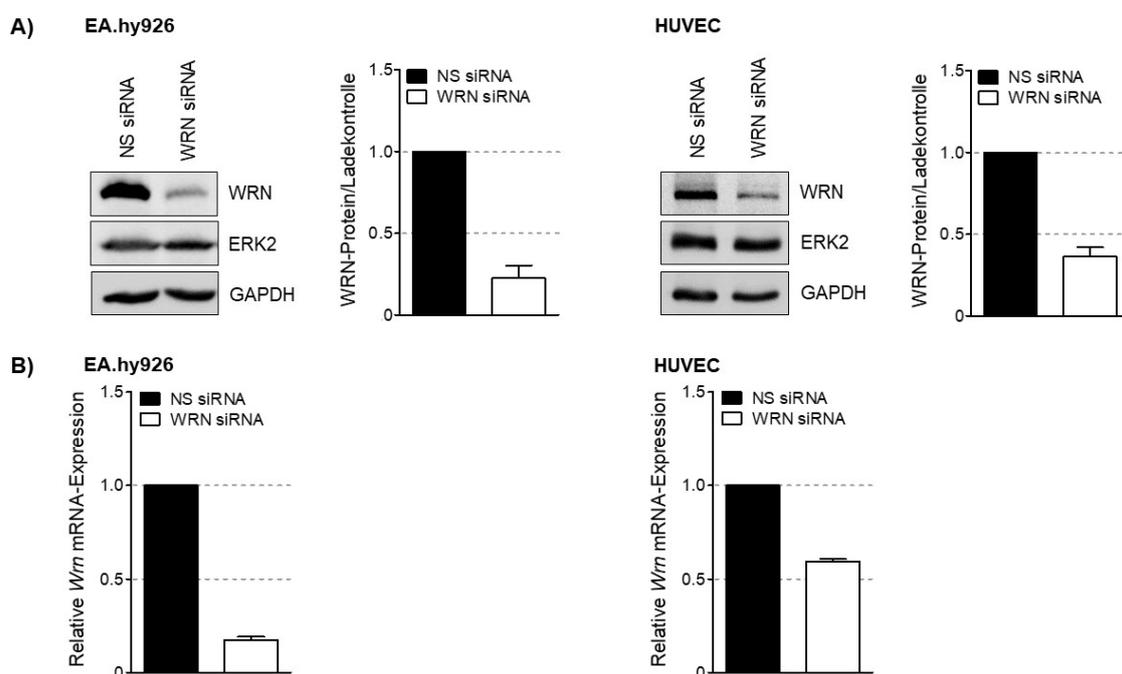


Abbildung 3-2: Knockdown von WRN mit Hilfe der RNA-Interferenz.

EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden für 24 h mit 10 nM NS siRNA oder 10 nM WRN siRNA inkubiert. A) Im Anschluss wurde die *kd* Effizienz auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Proteingehalte von ERK2 und GAPDH dienten als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Blots und die Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$) als Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0). B) Zur Untersuchung der *kd* Effizienz auf mRNA-Ebene wurde eine quantitative *Real-time* PCR durchgeführt. Als interner Standard der mRNA-Analyse dienten *Actb* und *Gapdh*. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM) relativ zur mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ($n = 3$, $N = 2$). *Actb*: β -Aktin; ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; GAPDH/*Gapdh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

3.1.2 Einfluss von WRN auf die Viabilität

Um zu analysieren, ob eine reduzierte Verfügbarkeit von WRN Einfluss auf die Viabilität von EA.hy926 Zellen und HUVEC hat, wurden verschiedene metabolische Endpunkte 48 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle dienten mit NS siRNA behandelte Zellen. Es wurden folgende metabolische Endpunkte bestimmt: Reduktion von Resazurin zu Resorufin (Alamar Blue Assay); Reduktion von MTT zu Formazan (MTT Assay); Binden und Zurückhalten des

Neutralrot-Farbstoffs durch die Lysosomen vitaler und intakter Zellen (Neutralrot Assay); Aktivität der von toten Zellen ins Medium abgegebenen Lactatdehydrogenase (LDH Assay). Die Versuche zeigen eine verminderte Reduktion von Resazurin zu Resorufin (Abbildung 3-3A) bei EA.hy926 Zellen nach WRN-*kd* und eine verminderte Fähigkeit von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen Neutralrot zurückzuhalten (Abbildung 3-3C). Der WRN-*kd* hat keinen Einfluss auf die Dehydrogenase-Aktivität von EA.hy926 Zellen im MTT Assay (Abbildung 3-3B). In Abwesenheit von WRN weisen HUVEC eine erhöhte mitochondriale Aktivität im Alamar Blue Assay auf, zeigen aber eine signifikant verminderte Dehydrogenase-Aktivität im MTT Assay (Abbildungen 3-3A und 3-3B). Diese Effekte sind jedoch nur schwach ausgeprägt. Das Zurückhalten von Neutralrot durch HUVEC ist WRN-*kd* unabhängig (Abbildung 3-3C). Der WRN-Status hat keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität (Abbildung 3-3D) der untersuchten Endothelzellen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass WRN zwar die metabolische Aktivität moduliert, aber im Rahmen dieser Versuche, nicht zu einem signifikant erhöhten Zelltod führt.

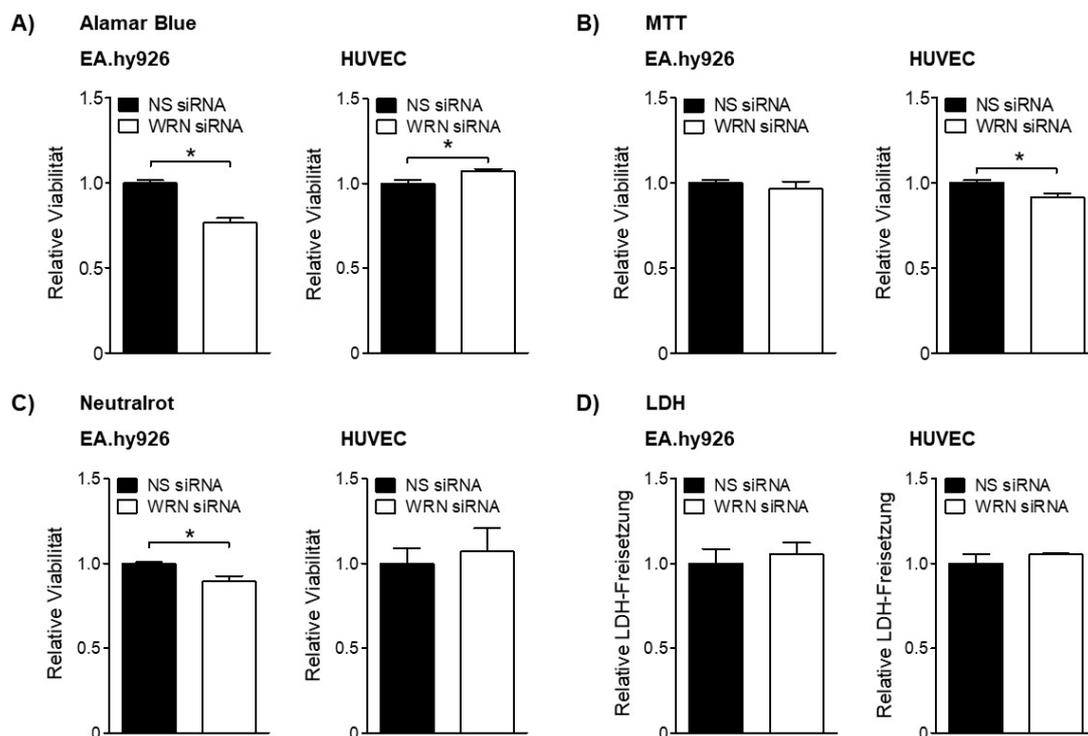


Abbildung 3-3: Einfluss von WRN auf die Viabilität von Endothelzellen.

EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden bezüglich ihrer Viabilität mit Hilfe des A) Alamar Blue B) MTT und C) Neutralrot Assays, sowie der Zytotoxizität mittels des D) LDH Assays untersucht. NS siRNA behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten ($n = 3$, $N = 3$) für B), C) und D) und vier unabhängige Experimente in Quadruplikaten ($n = 4$, $N = 4$) für A). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; WRN: Werner-Syndrom Protein.

3.1.3 Einfluss von WRN auf Endothelzellfunktionen: Ca²⁺-Freisetzung, acLDL-Aufnahme, Permeabilität, Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration

Endothelzellen besitzen besondere Eigenschaften, die für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität essentiell sind und bei einer Dysfunktion zu Atherosklerose führen können. Im Folgenden wurde der Einfluss von WRN auf verschiedene Endothelzellfunktionen analysiert. Zunächst wurde das Potential intrazelluläres Ca²⁺ nach Stimulation mit ATP freizusetzen untersucht. Die Ca²⁺-Freisetzung ist in EA.hy926 Zellen WRN-unabhängig, während ein signifikanter Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen in WRN-*kd* HUVEC zu verzeichnen ist (Abbildung 3-4A). Die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Endothelzellen ist ein wichtiger Prozess in der Pathogenese der Artherosklerose. Um zu untersuchen, ob WRN einen Einfluss auf die Aufnahme von modifiziertem LDL hat, wurden WRN-*kd* und Wildtyp (Wt) EA.hy926 Zellen und HUVEC mit acLDL inkubiert. Der Versuch zeigt in keiner der beiden Endothelzelltypen eine signifikante Veränderung der Aufnahme von acLDL (Abbildung 3-4B). Tendenziell ist die acLDL-Aufnahme bei beiden Endothelzelltypen nach WRN-*kd* leicht vermindert.

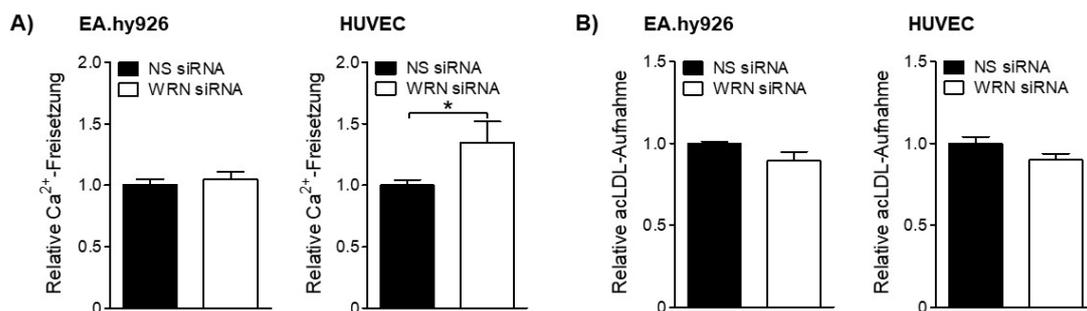


Abbildung 3-4: Untersuchungen der Ca²⁺-Freisetzung und der Aufnahme von acLDL in Abhängigkeit von WRN.

A) EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden mit ATP stimuliert und die Ca²⁺-Freisetzung wurde gemessen. Als Kontrolle dienten mit NS siRNA behandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten (n = 3, N = 3). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05. B) EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden für 4 h mit Dil acetyliertem LDL inkubiert. Die mit NS siRNA behandelten Zellen dienten als Kontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten (n = 3, N = 2). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05. Ca²⁺: Calcium-Ionen; Dil: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat; LDL: *low-density lipoprotein*, Lipoprotein geringer Dichte; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; WRN: Werner-Syndrom Protein.

Endothelzellen haben eine Barrierefunktion und regulieren die Durchlässigkeit von Molekülen unterschiedlicher Größe. Eine erhöhte Permeabilität wird beispielsweise durch die Behandlung der Zellen mit TNFα erzielt. Weder ein WRN-*kd* noch die Behandlung mit TNFα haben einen Effekt auf die Permeabilität der EA.hy926 Ein-Zell-Schicht (*Monolayer*) (Abbildung 3-5A), wohingegen die TNFα-Behandlung und der WRN-*kd* die Permeabilität der HUVEC *Monolayer* in gleichem Maße erhöht (Abbildung 3-5B). Somit trägt WRN zur Integrität der Barrierefunktion der HUVEC *Monolayer* bei.

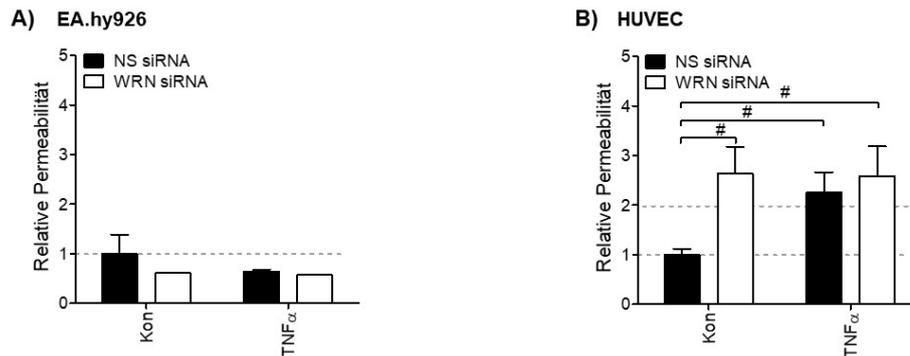


Abbildung 3-5: Permeabilitätsuntersuchungen von WRN-kd und wildtypischen EA.hy926 Zellen und HUVEC.

A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden auf einer Membran ausgesät. Die Permeabilität der Ein-Zell-Schicht wurde 72 h nach Aussaat gemessen, indem ein Fluoreszenz-Farbstoff auf die Zell-Schicht gegeben wurde. Dabei korreliert die Menge der durch die Ein-Zell-Schicht hindurch gelaufenen Fluoreszenzlösung mit der Permeabilität der Ein-Zell-Schicht. Zellen, die 19 h vor Permeabilitätsmessung mit TNF α dauerbehandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ($n = 2$, $N = 2$) für EA.hy926 Zellen und vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten ($n = 4$, $N = 2$) für HUVEC. One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Kon: Kontrolle; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; TNF α : Tumornekrosefaktor alpha; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

Von immunologischer Relevanz ist die Eigenschaft von Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren und somit im Blut zirkulierende Zellen aus dem Blutstrom an sich zu heften und deren Transmigration ins Gewebe zu vermitteln. Im Folgenden wurde die Zell-Zell Adhäsion von fluoreszenzmarkierten HT-29 Zellen an die Ein-Zell-Schicht von EA.hy926 Zellen oder HUVEC untersucht. Bei der HT-29 Zelllinie handelt es sich um eine Karzinomzelllinie, die in der Lage ist an das Endothelium zu adhären. Als Positivkontrolle wurde die *Monolayer* vor Durchführung des Versuchs mit TNF α behandelt. WRN-profiziente Zellen dienen als Kontrolle. Weder die Abwesenheit von WRN noch die Inkubation mit TNF α hat einen Effekt auf die Zell-Zell Adhäsion von EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-6A). Bei HUVEC mit vermindertem WRN-Gehalt ist die Zell-Zell Adhäsion signifikant erhöht (Abbildung 3-6A). Eine stark induzierte Adhäsion von HT-29 Zellen an HUVEC ist nach der Behandlung mit TNF α zu verzeichnen. Diese ist unabhängig vom WRN-Status. Des Weiteren wurde überprüft, ob diese Endothelfunktion abhängig von der WRN-Helikase-Aktivität war (Abbildung 3-6B). Dazu wurde die Ein-Zell-Schicht vor Durchführung des Zell-Zell Adhäsions-Versuchs, mit verschiedenen Konzentrationen des WRN Inhibitors NSC617145 behandelt, welcher die WRN-Helikase-Aktivität spezifisch hemmt. Die Auswertung des Versuchs zeigt keinen signifikanten Einfluss der WRN-Helikase-Aktivität auf die Zell-Zell Adhäsion in HUVEC und EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-6B). Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel nicht adhäsiv (Abschnitt 1.4.3). WRN unterstützt diese anti-adhäsiven Eigenschaften von HUVEC, unabhängig von dessen Helikase-Aktivität.

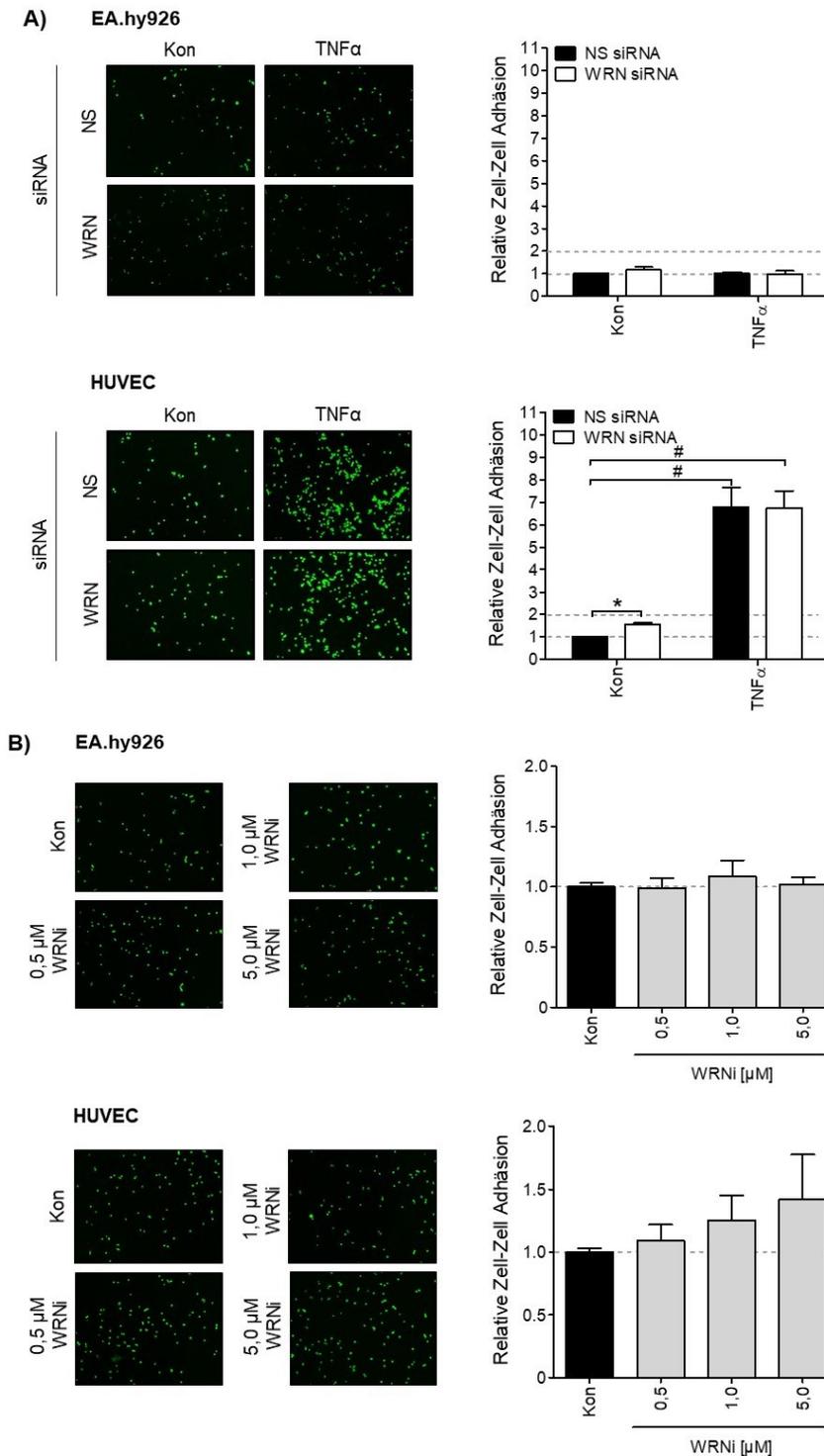
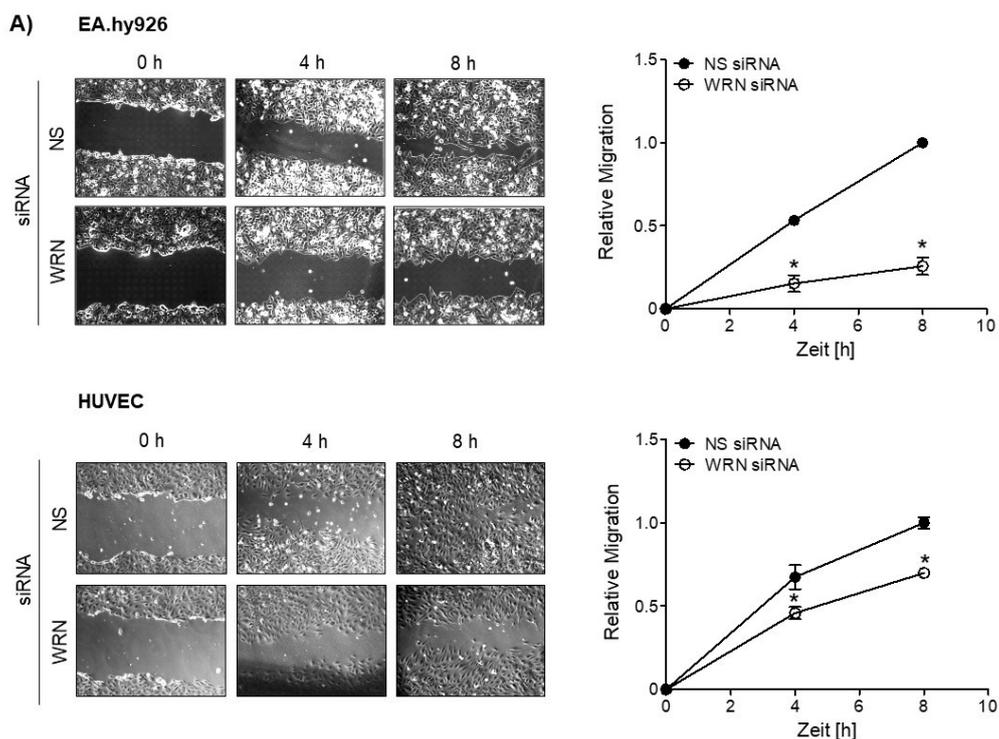


Abbildung 3-6: Analyse der Zell-Zell Adhäsion in Abhängigkeit von WRN.

Die Adhäsion fluoreszenzmarkierter HT-29 Zellen an der Ein-Zell-Schicht von WRN-*kd* oder Wildtyp EA.hy926 Zellen oder HUVEC wurde gemessen. A) Als Positivkontrolle dienten EA.hy926 Zellen und HUVEC, die vor Durchführung des Versuchs für 2 h mit TNF α behandelt wurden. Gezeigt sind repräsentative Bilder und Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten (n = 3, N = 4). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-Way ANOVA # $p \leq 0,05$. B) EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden vor dem Adhäsionsversuch mit 0,5 μ M, 1,0 μ M oder 5,0 μ M des WRN-Helikase Inhibitors NSC 617145 behandelt. Als Kontrolle dienten WRN-profiziente unbehandelte Zellen. Dargestellt sind repräsentative Bilder und Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten (n = 3, N = 4). Kon: Kontrolle; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; TNF α : Tumornekrosefaktor alpha; WRNi: WRN-Helikase Inhibitor; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

Da die Migration von Endothelzellen bei der Reparatur von beschädigten Gefäßen von Bedeutung ist, wurde im Folgenden der Einfluss von WRN auf die endotheliale Zellmigration mit Hilfe des „Wundheilungsversuchs“ untersucht. Dabei wurde gemessen wie schnell eine „Wunde“ durch Migration geschlossen wird. Die Ergebnisse des Versuchs zeigen eine stark inhibitorische Wirkung eines verminderten WRN-Gehalts auf die Migration von EA.hy926 Zellen und HUVEC nach 8 h Regeneration. Hierbei ist die Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen um 75 % und die Migration von WRN-*kd* HUVEC um 40 % reduziert (Abbildung 3-7A). Der hemmende Effekt eines WRN-*kd* auf die Migration der untersuchten Endothelzellen ist nach 24 h Migrationszeit noch immer sichtbar (Abbildung 3-7C). Um zu analysieren, ob die verminderte Migrationsfähigkeit der WRN-*kd* EA.hy926 Zellen auf eine fehlende WRN-Helikase-Aktivität zurückzuführen ist, wurden EA.hy926 Zellen vor Beginn des Wundheilungsexperiments mit dem WRN-Helikase Inhibitor NSC 617145 inkubiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die Migrationsfähigkeit dieser Zellen durch Hemmung der Helikase nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 3-7B). Daraus resultiert, dass die Anwesenheit von WRN, nicht aber die enzymatische Aktivität der WRN-Helikase, wichtig für die Migration von EA.hy926 Zellen ist.

Zellmigration ist ein Prozess, der Energie benötigt. Um zu untersuchen, ob die verlangsamte Migration von WRN-*kd* Endothelzellen auf einer verminderten Verfügbarkeit von Energie beruht, wurde die intrazelluläre ATP-Konzentration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen im Vergleich zu WRN-Wt EA.hy926 Zellen gemessen. Aus den Ergebnisse der Messung resultiert kein signifikanter Unterschied der ATP-Menge in An- oder Abwesenheit von WRN (Abbildung 3-7D). Die Hemmung der Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen ist demnach nicht auf verminderte ATP-Konzentrationen zurückzuführen.



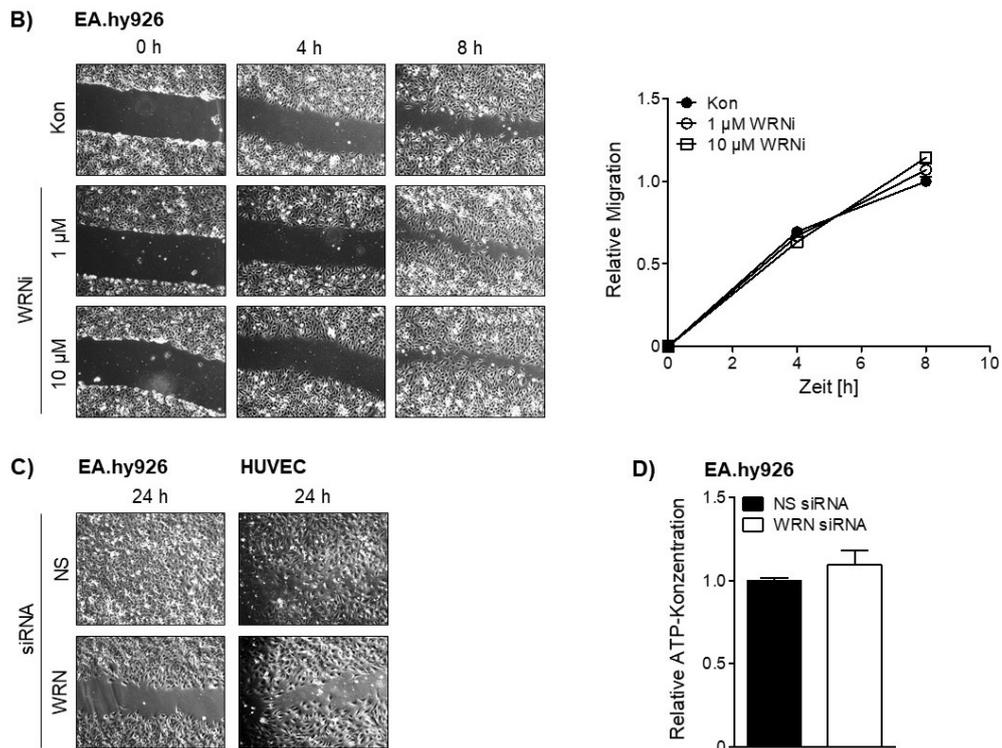


Abbildung 3-7: Einfluss von WRN auf die endotheliale Zellmigration.

A) Die Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und WRN-*kd* HUVEC wurde 0 h, 4 h und 8 h nach Verletzung der Ein-Zell-Schicht im Vergleich zu WRN-profizienten Zellen gemessen. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Migration und die quantitative Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten ($n = 2$, $N = 3$), die als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zur mit NS siRNA behandelten Kontrolle dargestellt sind. Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. B) Gezeigt sind repräsentative Bilder und die quantitative Analyse des „Wundheilungsversuchs“ von EA.hy926 Zellen, die zuvor mit verschiedenen Konzentrationen des WRN-Helikase Inhibitors NSC617145 behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus einem Versuch durchgeführt im Triplikate ($n = 1$, $N = 3$). C) Dargestellt sind Bilder des „Wundheilungsversuchs“ nach 24 h Migrationszeit aus einem Versuch durchgeführt im Triplikate ($n = 1$, $N = 3$). D) Der ATP-Gehalt von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen wurde mittels Lumineszenz-Messung ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten ($n = 4$, $N = 2$). ATP: Adenosintriphosphat; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; WRNi: WRN-Helikase Inhibitor; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

Um einen proliferativen Effekt auszuschließen, der das für die Migration gemessene Ergebnis beeinflussen könnte, wurde der mitotische Index der Endothelzellen mit Hilfe des mitose-spezifischen Markers pH3 bestimmt. Als Positivkontrolle dienten proliferierende mit NS siRNA behandelte Zellen. Aus den Resultaten des Versuchs geht hervor, dass die konfluente Ein-Zell-Schicht beider Endothelzelltypen einen geringeren Anteil an pH3-positiven Zellen aufweist als die proliferierenden Kontrollzellen (Abbildung 3-8A und 3-8B). Dieses Ergebnis war WRN-unabhängig. Die Spaltschließung im „Wundheilungsversuch“ (Abbildung 3-7) wird somit nicht durch einen proliferativen Effekt beeinflusst, sondern ist auf Migration zurückzuführen.

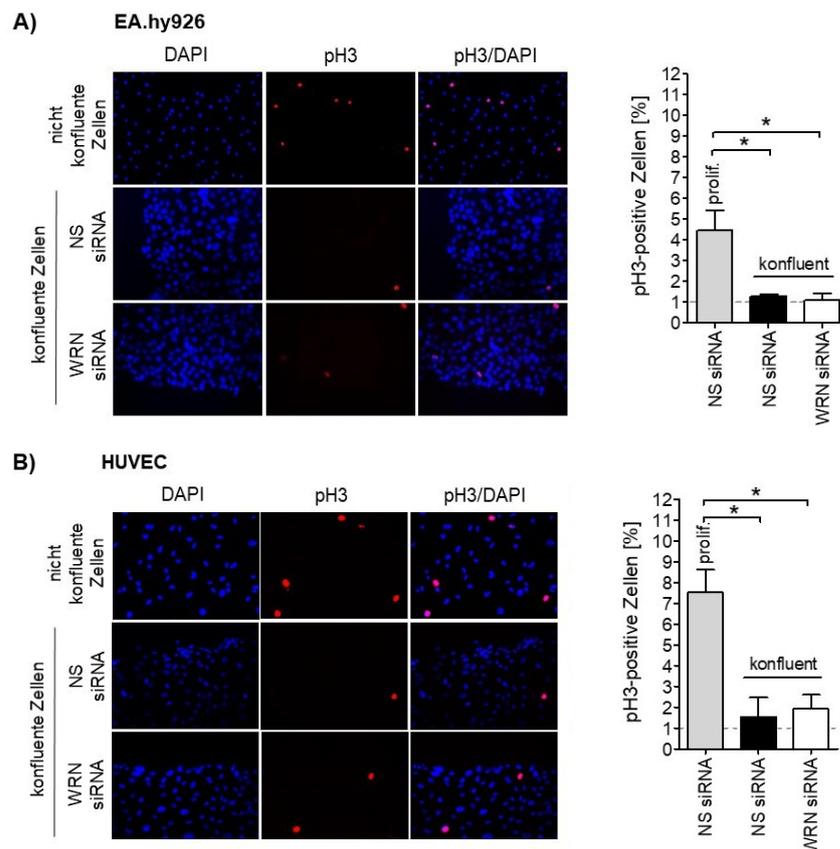


Abbildung 3-8: Untersuchung des mitotischen Index konfluenter Endothelzellen.

Phosphoryliertes Histon 3 (pH3) der mit NS siRNA oder WRN siRNA behandelten konfluente A) EA.hy926 Zellen oder B) HUVEC wurden nach einer 8 h Migrationszeit angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Proliferierende Zellen des jeweiligen Zelltyps dienten als Kontrolle. Dargestellt sind repräsentative Bilder und die quantitative Analyse als Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3, N = 1). Pro Bedingungen wurden ≥ 100 Zellen gezählt. Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; prolif.: proliferierend; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

Möglicherweise geht die starke Hemmung der endothelialen Zellmigration von WRN-*kd* Zellen mit einer Umlagerung des Zytoskeletts einher. Daher wurde das filamentöse Aktin (F-Aktin) der EA.hy926 Zellen mit FITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt (Abbildung 3-9A). Die am Rand der Verletzung lokalisierten WRN-reduzierten Pionierzellen weisen eine starke Polarisierung und die Ausbildung länglicher Lamellipodien in Richtung der „Wunde“ auf. Bei einer nativen WRN Expression bilden Pionierzellen hingegen vergleichsweise kurze und zugleich breitere Lamellipodien aus. Um genauer zu analysieren, worin der Grund für den Unterschied in der Morphologie zwischen migrierenden WRN-*kd* Zellen und Wt Endothelzellen liegt und warum erstere langsamer migrieren, wurde die mRNA-Expression und der Proteingehalt verschiedener auf die Migration einflussnehmender Faktoren untersucht. Dazu zählen das Intermediarfilament Vimentin, welches Migration und Adhäsion reguliert (Ivaska *et al.*, 2007), und VE-Cadherin, das ein wesentlicher Bestandteil von Adhäsionsverbindungen ist und somit die Aufrechterhaltung der vaskulären Barriere sicherstellt (Navarro *et al.*, 1998). Aus der Analyse resultiert eine WRN-unabhängige mRNA-Expression von *Cdh5* (VE-Cadherin) in beiden Endothelzelltypen, während die mRNA-Expression von *Vim* (Vimentin) ausschließlich

in EA-hy926 Zellen signifikant vermindert ist (Abbildung 3-9B). Der Proteingehalt von Vimentin und CDH5 ist durch einen WRN-*kd* in EA.hy926 Zellen und HUVEC im Vergleich zum Wt nicht verändert (Abbildung 3-9C). Zwei weitere wichtige Faktoren der Migration sind RAC1 und RHOA. Während RAC1 Einfluss auf die Direktionalität der endothelialen Zellmigration nimmt (Higgs und Pollard, 2000; Yamazaki *et al.*, 2007), beeinflusst RHOA das Loslösen der Zelle von deren Substrat an dem, der Migrationsrichtung entgegengesetzten, hinteren Zellende (Spiering und Hodgson, 2001; Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). Aus dem Ergebnis der Untersuchungen geht hervor, dass die mRNA-Expression, nicht aber die Proteinexpression, von *RhoA* in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen signifikant vermindert ist (Abbildungen 3-9B und 3-9C). WRN hat keinen Effekt auf die mRNA-Expression und den Proteingehalt von *RhoA*/RHOA in HUVEC (Abbildungen 3-9B und 3-9C). Während die mRNA-Expression von *Rac1* in beiden Endothelzelltypen nach WRN-*kd* unverändert bleibt, ist die RAC1 Proteinkonzentration in WRN-*kd* Zellen vermindert (Abbildungen 3-9B und 3-9C). Ein weiterer wichtiger Faktor migrierender Zellen ist die Proteintyrosinkinase 2 (PTK2). PTK2 ist in fokalen Adhäsionskomplexen lokalisiert, die die Zelle mit ihrem Substrat, der extrazellulären Matrix, verankert. In WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC ist die mRNA-Expression von *Ptk2* signifikant erhöht, wogegen der Proteingehalt von PTK2 in beiden Endothelzelltypen verringert ist (Abbildungen 3-9B und 3-9C). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass WRN die Morphologie migrierender Zellen beeinflusst und die mRNA- und Proteinexpression von an der Migration beteiligten Faktoren spezifisch modelliert.

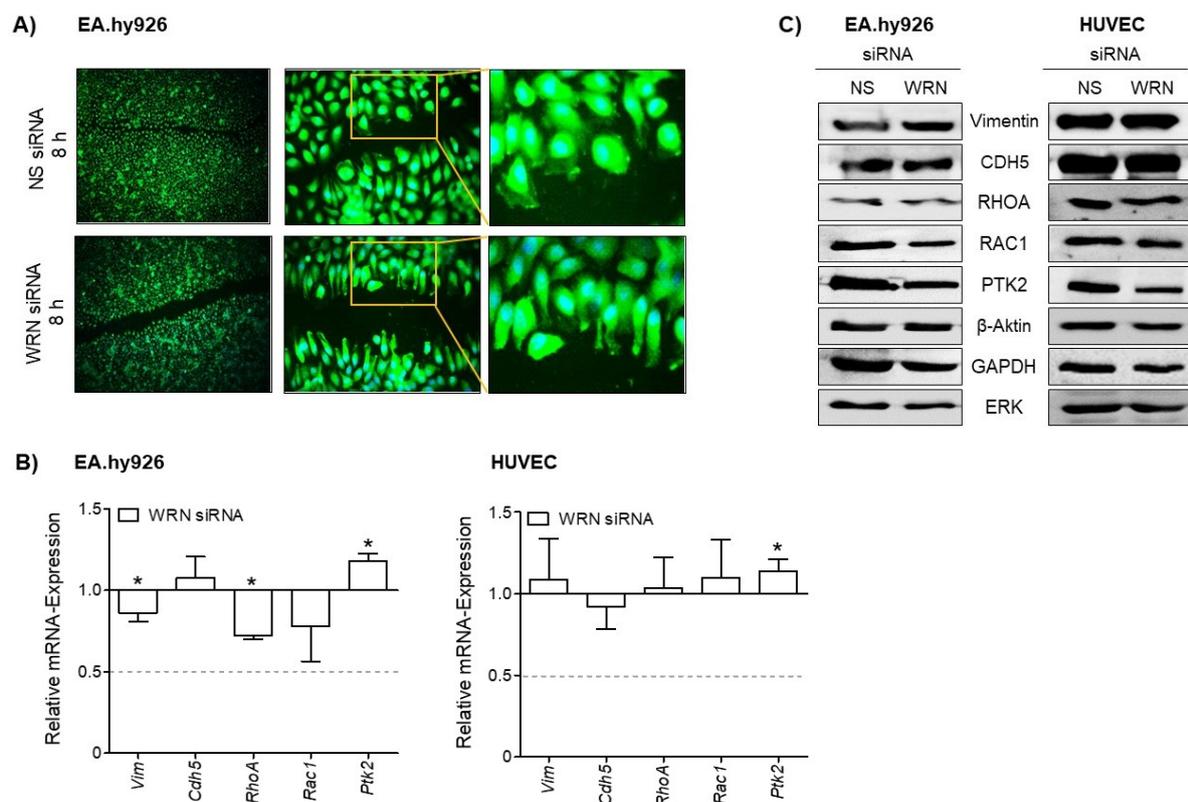


Abbildung 3-9: F-Aktin-Organisation, mRNA-Expression und Proteinexpression migrationsassoziiierter Faktoren in Abhängigkeit des WRN-Status.

A) Nach Transfektion der EA.hy926 Zellen mit WRN siRNA oder NS siRNA wurde F-Aktin mittels FITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus zwei unabhängigen Versuchen. B) Die mRNA-Analyse migrationsassoziierter Faktoren wurde mittels quantitativer *Real-time* PCR durchgeführt. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA behandelten Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten (n = 3, N = 2). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05. C) Die Proteinmenge migrationsassoziierter Faktoren wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. β-Aktin, GAPDH und ERK2 dienten als Ladekontrollen. Dargestellt sind repräsentative Blots aus zwei unabhängigen Versuchen (n = 2). ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; *Ptk2/PTK2*: Proteintyrosinkinase2; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; NS siRNA: *Nonsilencing small interfering RNA*; *RAC1/Rac1*: Rac family small GTPase 1; *RHOA/RhoA*: *Ras homolog family member A*; *VE-Cadherin/Cdh5/CDH5*: vaskulär-endotheliales Cadherin; *Vim*: Vimentin; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein *small interfering RNA*.

3.1.4 Analyse der mRNA- und Proteinexpression spezifischer Endothelzellenfaktoren

Der Einfluss von WRN auf die mRNA-Expression und Proteinmenge von Faktoren, die in verschiedene endothelzellspezifische Prozesse involviert sind, wurde mittels quantitativer *Real-time* PCR bzw. Western Blot Analyse untersucht. Zunächst wurde die mRNA-Expression der Zell-Zell Adhäsionsmoleküle *Sele* (E-Selektin), *Icam1* und *Vcam1* analysiert. Daraus ergibt sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *Sele* in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-10A). WRN hat keinen Effekt auf die Expression der Adhäsionsmoleküle *Icam1* und *Vcam1* in diesen Zellen, während die mRNA-Expression von *Sele*, *Icam1* und *Vcam1* in WRN-*kd* HUVEC signifikant erhöht ist (Abbildung 3-10A). Im Wt beider Endothelzelltypen ist die Proteinkonzentration von ICAM1 gering (Abbildung 3-10B). ICAM1 ist nach Behandlung mit TNFα oder durch verminderte WRN Expression induziert, wobei der Effekt in WRN-*kd* HUVEC im Vergleich zu dem in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen stärker ist (Abbildung 3-10B). WRN hat keinen Effekt auf die mRNA-Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen *Nos2* und *Nos3* in EA.hy926 Zellen und HUVEC. Der Proteingehalt von NOS3 ist ebenfalls unabhängig vom WRN-Status (Abbildung 3-10B). In WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC sind *Ccl2* und *Plat* verstärkt exprimiert (Abbildung 3-10A). Während ein WRN-*kd* keinen Effekt auf die mRNA-Expression von *Edn1* hat, ist die Menge von EDN1 auf Proteinebene in WRN-*kd* Zellen im Vergleich zu TNFα behandelten und mit NS siRNA behandelten EA.hy926 Zellen und HUVEC leicht erhöht (Abbildungen 3-10A und 3-10B). Die mRNA-Expression von *Kdr* (*Vegfr*) ist nicht signifikant erhöht. Die Gen- und Proteinexpression der primären HUVEC ist stärker induziert, dennoch sind die Ergebnisse zwischen HUVEC und EA.hy926 Zellen qualitativ ähnlich, was die Relevanz der Ergebnisse untermauert.

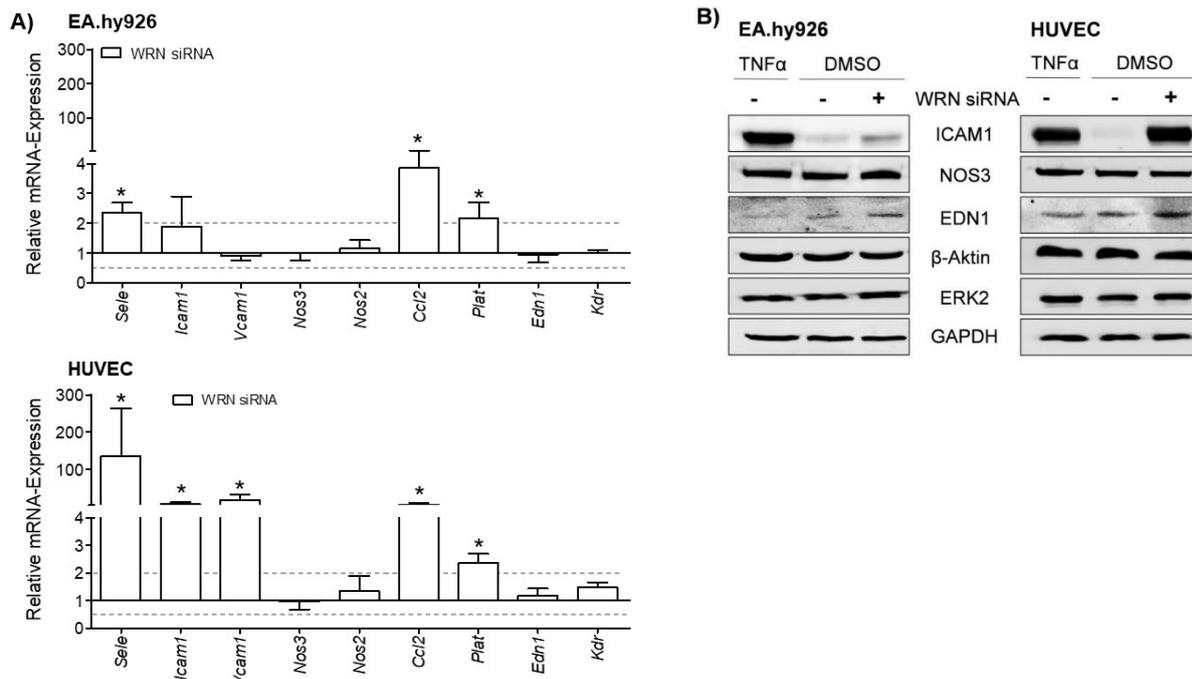


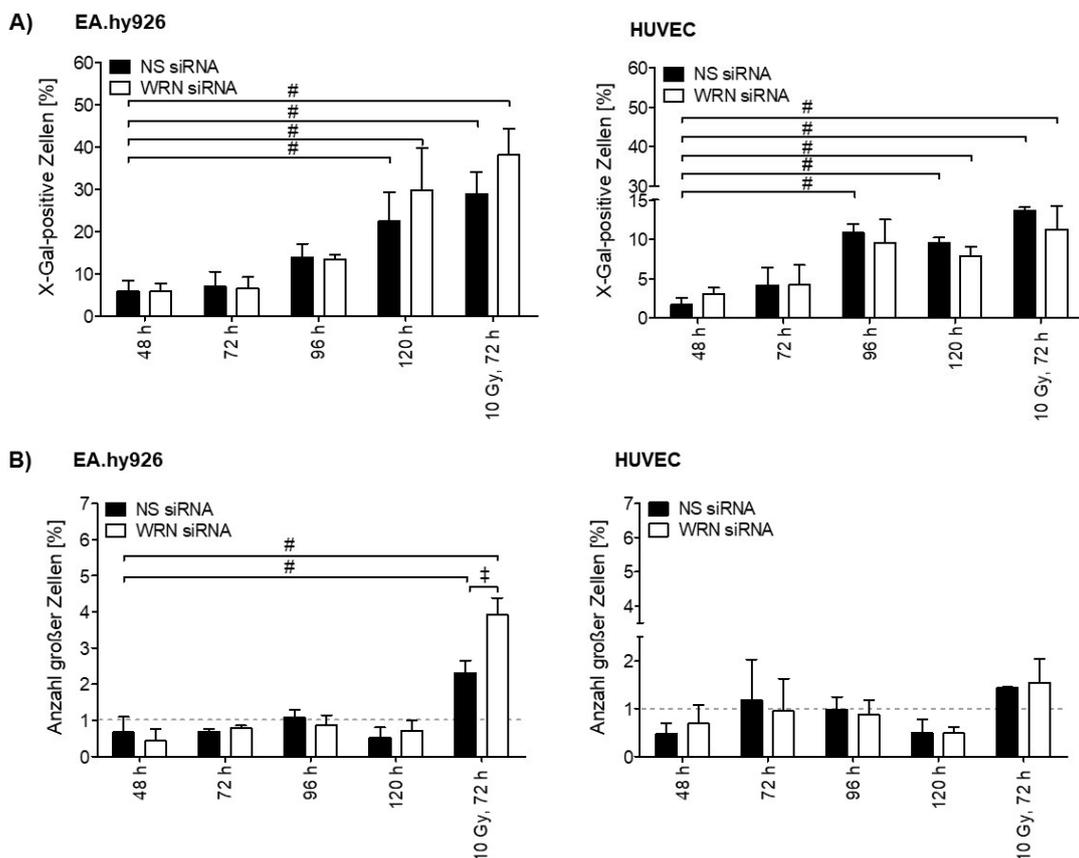
Abbildung 3-10: Analyse der mRNA- und Proteinexpression endothelzellspezifischer Faktoren.

A) Zur Analyse der mRNA-Expression wurde nach Transfektion von EA.hy926 Zellen und HUVEC mit NS siRNA oder WRN siRNA eine quantitative *Real-time* PCR durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit NS siRNA behandelt wurden. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA behandelten Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten (n = 3, N = 2). Die mRNA-Expression von *Sele*, *Plat*, *Kdr* in EA.hy926 Zellen wurde in zwei unabhängigen Versuchen in Duplikaten durchgeführt (n = 2, N = 2). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05. B) Untersucht wurde die Proteinmenge endothelzellspezifischer Faktoren. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Ladekontrollen dienten β-Aktin, ERK2 und GAPDH. *Ccl2*: *C-C motif chemokine ligand 2*; C-C Chemokinligand 2; DMSO: Dimethylsulfoxid; *EDN1/Edn1*: Endothelin 1; *NOS3/Nos3*: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; *GAPDH/Gapdh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; *ICAM1/Icam1*: *intercellular adhesion molecule 1*; *Nos2*: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; *Plat*: *tissue-type plasminogen activator*, gewebespezifischer Plasminogenaktivator; TNFα: Tumornekrosefaktor alpha; *Vcam1*: *vascular cellular adhesion molecule 1*; *Kdr*: *vascular endothelial growth factor receptor 2*; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

3.1.5 Einfluss von WRN auf Seneszenz

Werner-Syndrom Patienten altern vorzeitig und entwickeln früh typische Altersassoziierte Erkrankungen, zu denen auch die Atherosklerose zählt. Um zu untersuchen, ob Zellen mit verminderter WRN Expression vermehrt zelluläre Seneszenz aufweisen, wurde die Aktivität der seneszenzassoziierten β-Galactosidase (SA-βG) untersucht, deren Substrat X-Gal sich nach hydrolytischer Spaltung blau färbt. Bestrahlte Zellen dienten als Positivkontrolle. In EA.hy926 Zellen und HUVEC ist zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen WRN-*kd* und WRN-Wt Zellen erkennbar (Abbildung 3-11A). Eine erhöhte Seneszenz ist 120 h nach Transfektion und 72 h nach Bestrahlung mit 10 Gy in WRN-Wt und WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC zu beobachten. In HUVEC konnte bereits 96 h nach Transfektion in Wt, aber nicht in WRN-*kd* Zellen, ein signifikanter Anstieg der Seneszenz gemessen werden (Abbildung 3-11A). Insgesamt zeigen EA.hy926 Zellen einen höheren Anteil seneszenten Zellen im Vergleich zu HUVEC (Abbildung 3-11A). Eine flächige und/oder amorphe Form von

Zellen sowie vergrößerte Zellkerne können Anzeichen für Seneszenz sein (Parrinello *et al.*, 2003; Chen und Ames, 1994; Chen *et al.*, 2001b). Daher wurde zusätzlich zum SA- β G-Versuch die Zell-Morphologie (Abbildung 3-11B) untersucht. Nach Entstehung von DNA-Schäden durch Bestrahlung ist der Anteil von EA.hy926 Zellen mit vergrößerter Morphologie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (NS siRNA, 48 h) signifikant erhöht (Abbildung 3-11B). Dabei weisen WRN-*kd* EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung einen signifikant höheren Anteil an vergrößerten Zellen auf als die bestrahlten WRN-Wt EA.hy926 Zellen (Abbildungen 3-11B und 3-11C). In HUVEC sind keine signifikanten Unterschiede in der Zellgröße zu verzeichnen (Abbildungen 3-11B und 3-11C). Diese Ergebnisse zeigen, dass WRN unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Seneszenz der hier untersuchten Endothelzellen hat. WRN-*kd* EA.hy926 Zellen weisen nach DNA-Schädigung vermehrt Seneszenzmerkmale auf.



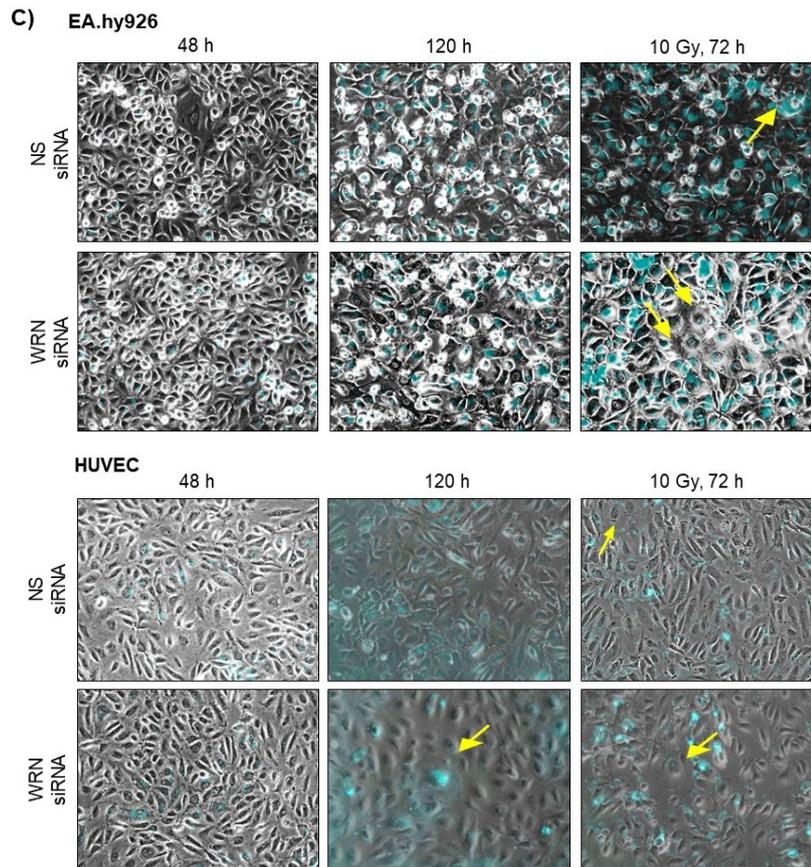


Abbildung 3-11: Einfluss von WRN auf die Seneszenz von Endothelzellen.

Zur Analyse der Wirkung von WRN auf die Seneszenz wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC mit WRN siRNA behandelt. Mit NS siRNA behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Als Positivkontrolle dienten bestrahlte Zellen (10 Gy, 72 h). Pro Bedingung wurden ≥ 500 Zellen gezählt und daraus die Anzahl der A) X-Gal-positive Zellen sowie B) die Anzahl der vergrößerten Zellen 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$, $N = 1$) nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h und von zwei unabhängigen Experimenten bei bestrahlten Zellen (10 Gy, 72 h). One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$; Two-way ANOVA $\#p \leq 0,05$. C) Repräsentative Bilder aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen zeigen blau gefärbte X-Gal-positive Zellen. Gelbe Pfeile markieren exemplarisch das Auftreten vergrößerter Zellen. NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA; X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression der Seneszenzmarker CDK-Inhibitor 2A (p16) und CDK-Inhibitor 1 (p21) analysiert (Abbildung 3-12). WRN-*kd* EA.hy926 Zellen exprimieren mehr p16 und p21 als die WRN-profiziente Kontrollzellen, was auf eine erhöhte Seneszenz der Zellen in Abwesenheit von WRN hindeutet (Abbildung 3-12). In HUVEC, die mit WRN siRNA behandelt wurden, ist der p21 Proteingehalt leicht erhöht, wobei p16 nicht detektierbar war.

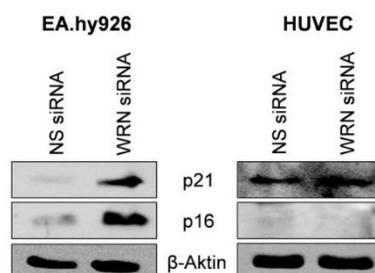


Abbildung 3-12: Proteinanalyse der Seneszenzmarker p16 und p21.

Die Analyse des Proteingehalts der seneszenzassoziierten Faktoren p16 und p21 wurde, nach Transfektion von EA.hy926 Zellen und HUVEC mit NS siRNA oder WRN siRNA, mittels Western Blot Analysen untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Versuchen. NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; p16: CDK Inhibitor 2A; p21: CDK Inhibitor 1; WRN: Werner-Syndrom Protein.

3.2 Untersuchungen des Einflusses von BER-Faktoren auf endothelzell-spezifische Funktionen

Während der BER interagiert WRN mit den BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1 und PARP1. Daher wurde in diesem Abschnitt der Einfluss dieser WRN-abhängigen Faktoren, sowie der Einfluss des WRN-unabhängigen BER-Faktors OGG1, auf die Funktionalität von Endothelzellen untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob ein *kd* der genannten BER-Faktoren einen mit WRN-*kd* vergleichbaren Effekt auf Endothelzellen zeigt und somit die BER einen wichtigen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktionen hat. Der Ablauf der Experimente entsprach dem in Abbildung 3-1.

3.2.1 *Knockdown* der BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1

Zunächst wurde, wie bereits bei den Versuchen mit WRN, ein *kd* des jeweiligen BER-Faktors mit der für ihn spezifischen siRNA durchgeführt. Es ergeben sich für EA.hy926 Zellen folgende Restprotein-Mengen: APE1: 8 %, FEN1: 25 %, NEIL1: 14 %, PARP1: 34 %; OGG1: 23 % (Abbildung 3-13). In HUVEC wurden meist geringere *kd*-Effizienten erreicht, woraus höhere Restproteingehalte resultieren. Es ergeben sich für den Restproteingehalt nach dem *kd* der BER-Faktoren folgende Werte: APE1: 41 %, FEN1: 59 %, NEIL1: 25 %, PARP1: 13 %, OGG1: 22 % (Abbildung 3-13). Zusätzlich zu den *kds* der BER-Faktoren wurden in EA.hy926 Zellen WRN-BER-Faktor-Doppel-*kds* durchgeführt.

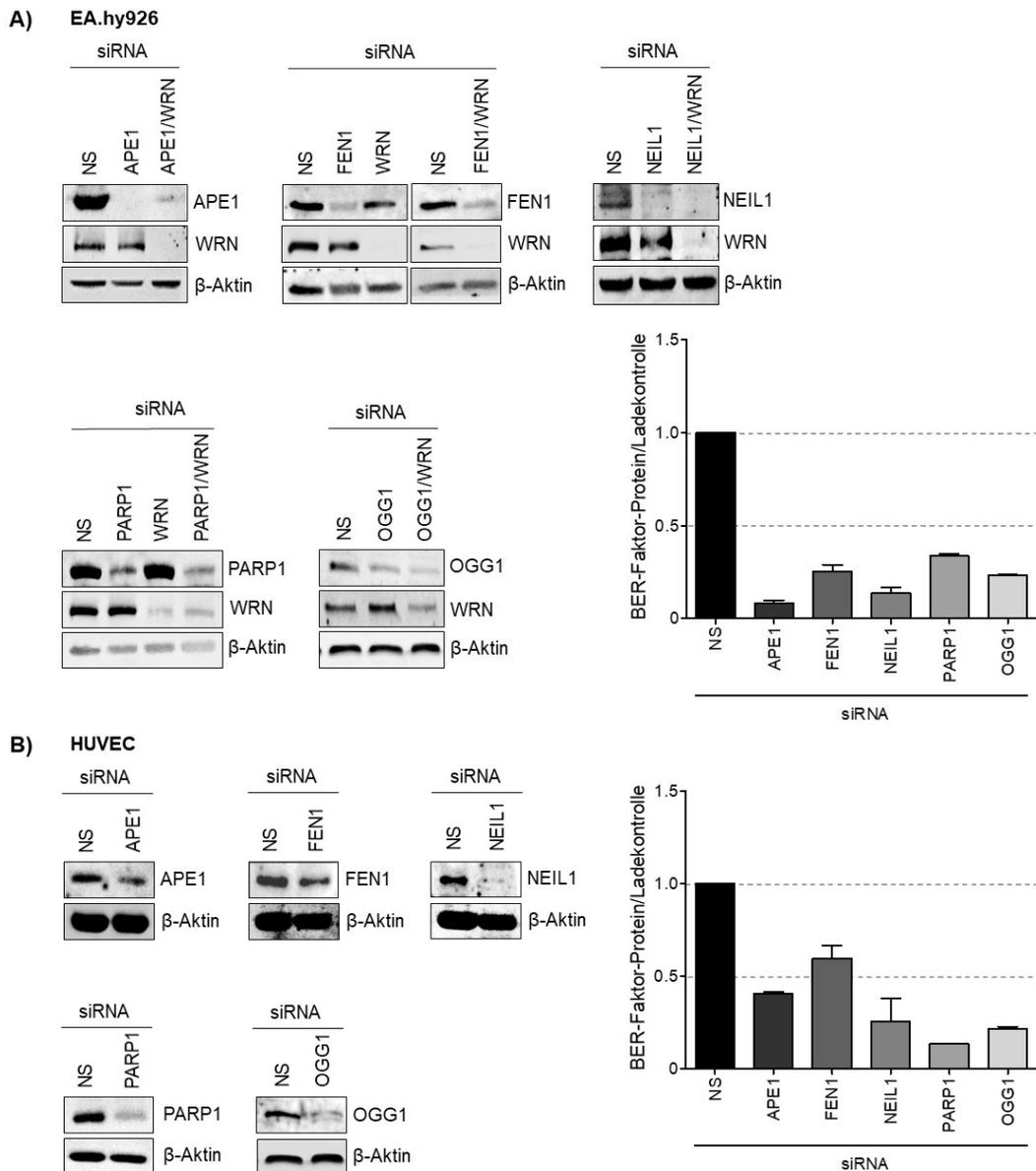


Abbildung 3-13: Knockdown von APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 mittels RNA-Interferenz.

A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden mit NS siRNA oder 10 nM APE1-, FEN1-, NEIL1- oder OGG1-spezifischer siRNA inkubiert. Zur Durchführung des PARP1-kd wurden die Zellen mit 20 nM PARP1-spezifischer siRNA inkubiert. Zusätzlich wurde in EA.hy926 Zellen ein WRN-BER-Faktor-Doppel-kd mit den zuvor beschriebenen siRNA-Konzentrationen für die jeweiligen BER-Faktoren und 10 nM WRN-spezifischer siRNA durchgeführt. Nach 24 h Inkubation wurde die *kd* Effizienz auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Proteinexpression von β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zu sehen sind repräsentative Blots aus 2 unabhängigen Experimenten ($n = 2$) sowie deren Quantifizierung. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus zwei unabhängigen Experimenten. APE1: *apurinic/apyrimidinic endonuclease*; BER: Basenexzisionsreparatur; FEN1: *flap endonuclease 1*; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

3.2.2 Einfluss der BER-Faktoren auf Endothelzellfunktionen: Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration

Die vorherigen Versuche mit EA.hy926 Zellen zeigen keinen Einfluss von TNF α oder WRN auf die Zell-Zell Adhäsion, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der bei HUVEC gemessenen Zell-Zell Adhäsion steht (Abbildung 3-6). Daran anlehnend wurde im Folgenden überprüft, welchen Einfluss die in der vorliegenden Arbeit betrachteten BER-Faktoren auf die Zell-Zell Adhäsion haben. Aus den Untersuchungen resultiert, dass sowohl in EA.hy926 Zellen als auch in HUVEC die Adhäsion von HT-29 Zellen an Zellen mit reduziertem OGG1 Proteingehalt erhöht ist, wohingegen die verminderte Expression der WRN-abhängigen BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1 oder PARP1 keinen Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion hat (Abbildungen 3-14A und 3-14B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit des WRN-unabhängigen OGG1 der Zell-Zell Adhäsion entgegen wirkt. Es hat eine stärkere anti-adhäsive Wirkung als WRN.

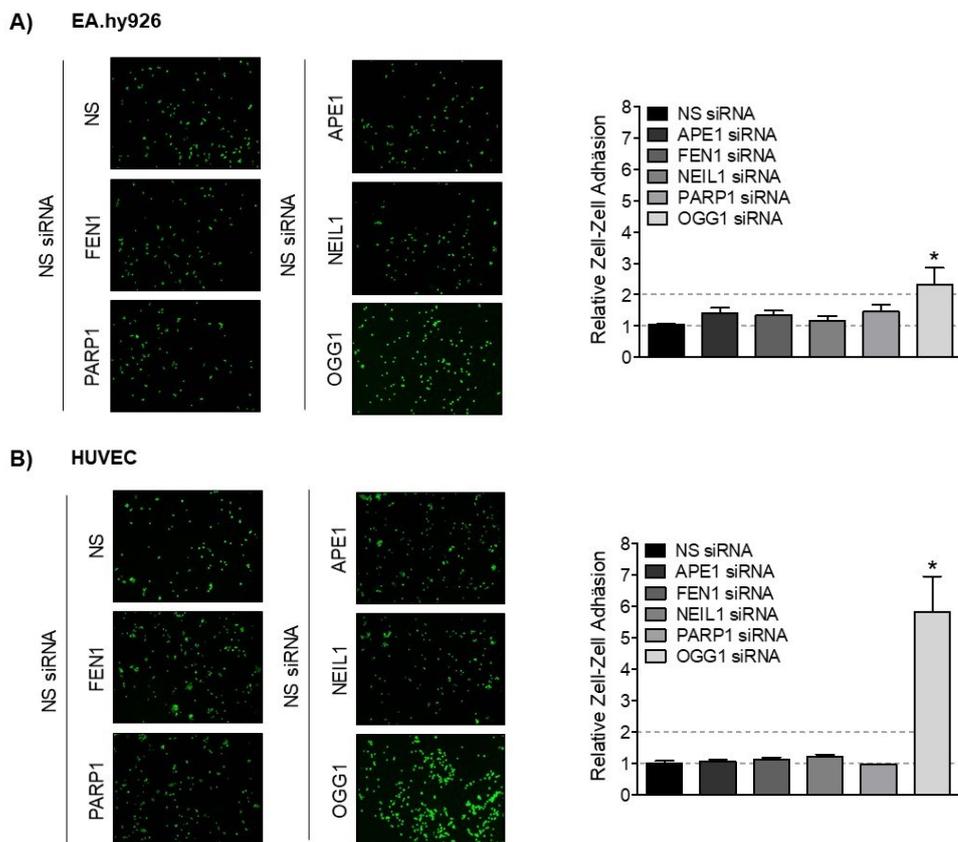
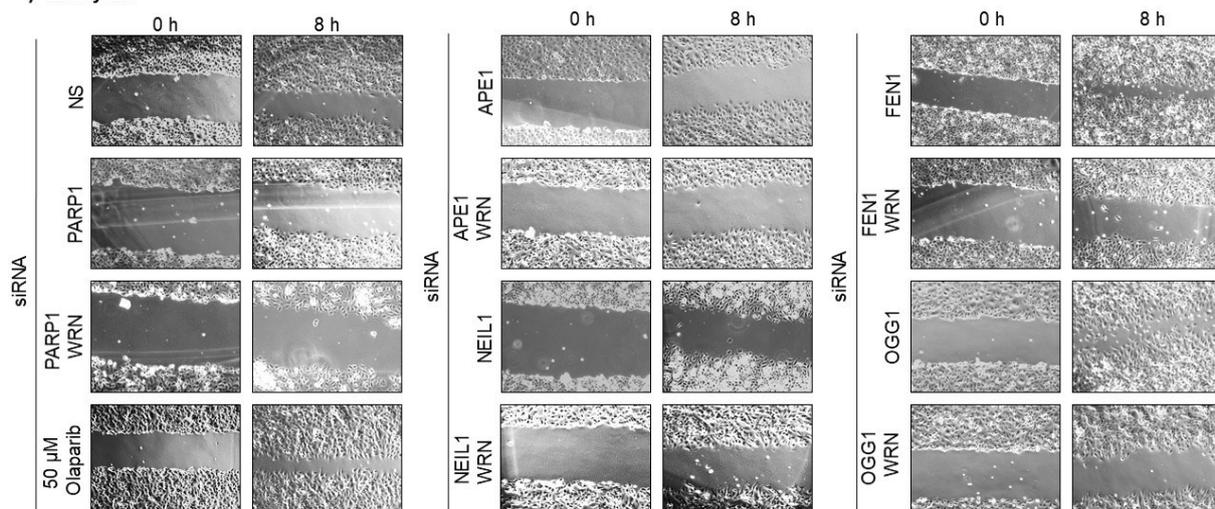


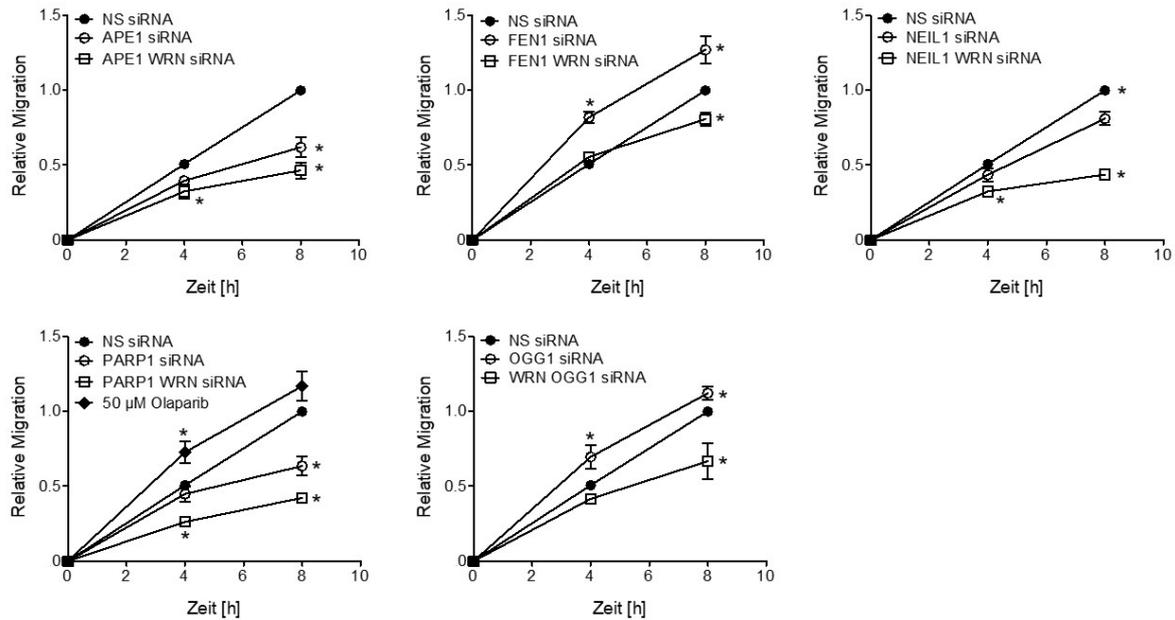
Abbildung 3-14: Analyse der Zell-Zell Adhäsion von EA.hy926 Zellen und HUVEC mit *kd* einzelner BER-Faktoren.

Die Adhäsion von Calcein-AM gefärbten HT-29 Zellen an die Ein-Zell-Schicht von APE1-, FEN1-, NEIL1-, PARP1- und OGG1-*kd* A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurde fluorimetrisch analysiert. Als Kontrolle dienten mit NS siRNA behandelte Zellen. Dargestellt sind repräsentative Bilder sowie die Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus vier unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten (n = 4, N = 4) für APE1-, FEN1-, NEIL1- oder PARP1-*kd* EA.hy926 und drei unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten (n = 3, N = 4) für OGG1-*kd* EA.hy926 Zellen. Bei HUVEC handelt es sich um drei unabhängige Experimente in Triplikaten (n = 3, N = 3) für APE1-, FEN1-, NEIL1- oder PARP1-*kd* HUVEC und zwei unabhängige Experimente in Triplikaten (n = 2, N = 3) für OGG1-*kd* HUVEC. Student's *t*-Test *p \leq 0,05. APE1: *apurinic/apurimidinic endonuclease*; FEN1: *flap endonuclease 1*; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Der Migrationsversuch, welcher zeigt, dass WRN die endotheliale Zellmigration von EA.hy926 Zellen und HUVEC unterstützt (Abbildung 3-7), wurde mit BER-*kd* Endothelzellen wiederholt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die WRN-assoziierten Faktoren APE1, FEN1, NEIL1 oder PARP1 sowie der WRN-unabhängige Faktor OGG1 einen ähnlichen Einfluss auf die Migration haben wie ein WRN-*kd*. Zusätzlich wurde untersucht, in wie weit ein gleichzeitiger *kd* von WRN und einem BER-Faktor die Migration von EA.hy926 Zellen beeinflusst. Die Beobachtungen zeigen eine verlangsamte Zellmigration nach *kd* von APE1-, NEIL1- und PARP1 in EA.hy926 Zellen und HUVEC (Abbildungen 3-15A und 3-15B). Der PARP1 Inhibitor Olaparib hat keinen hemmenden Effekt auf die Migration (Abbildung 3-15A). Eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit ist in EA.hy926 Zellen nach dem *kd* von FEN1 und OGG1 zu beobachten (Abbildung 3-15A). Dies gilt auch für die Migration der OGG1-*kd* HUVEC, nicht aber für FEN1-*kd* HUVEC, deren Migrationsgeschwindigkeit der der Kontrolle gleicht (Abbildung 3-15B). Ein WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* mit einem der untersuchten BER-Faktoren in EA.hy926 Zellen führt zu einer stärkeren Hemmung der Migration im Vergleich zur Migration von EA.hy926 Zellen mit *kd* von APE1, NEIL1 oder PARP1. Der WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* mit FEN1-*kd* oder OGG1-*kd* wirkt stark inhibitorisch auf die Migration von EA.hy926 Zellen im Vergleich zu der Migration der mit NS siRNA behandelten Kontrollzellen. Zusammenfassend zeigt sich, dass WRN im Vergleich zu den anderen hier untersuchten BER-Faktoren die Migration am stärksten unterstützt. BER-Faktoren beeinflussen die Migration unterschiedlich. Ähnlich wie WRN, unterstützen APE1, NEIL1 und PARP1 die Migration, während diese durch FEN1 und OGG1 gehemmt wird. Die unterschiedlichen Effekte auf die Migration sind bei beiden Endothelzelltypen zu beobachten (ausgenommen FEN1).

A) EA.hy926





B) HUVEC

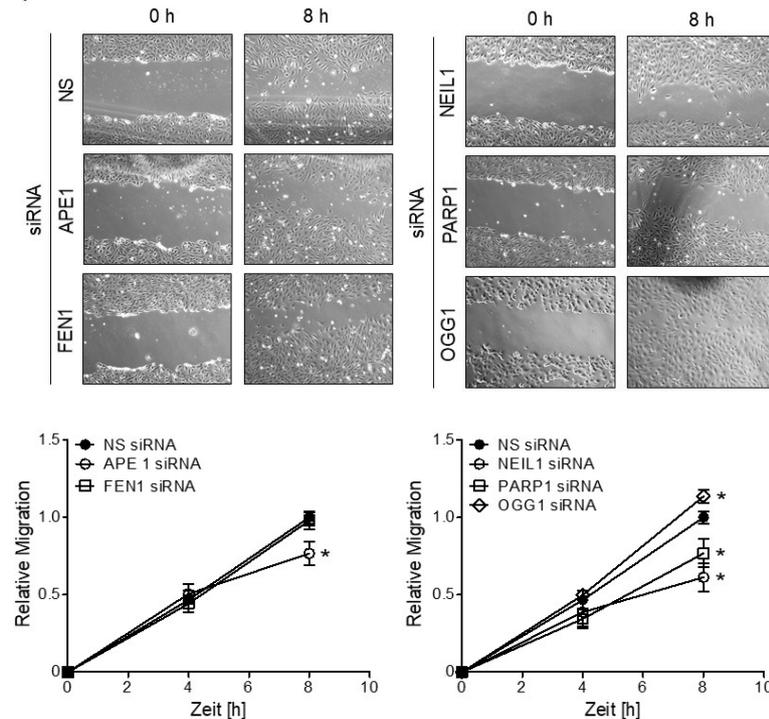


Abbildung 3-15: Untersuchung der endothelialen Zellmigration hinsichtlich des Einflusses ausgewählter BER-Faktoren.

A) Die Migration von APE1-, FEN1-, NEIL1-, PARP1- und OGG1-*kd* EA.hy926 Zellen und deren Doppel-*kd* mit WRN, sowie B) die Migration von APE1-, FEN1-, NEIL1-, PARP1- und OGG1-*kd* HUVEC wurde 0 h, 4 h und 8 h nach „Verletzung“ der Ein-Zell-Schicht gemessen. EA.hy926 Zellen wurden mit 50 μ M des PARP1 Inhibitors Olaparib inkubiert und die Migration wurde direkt nach „Verletzung“ sowie und 4 h und 8 h danach analysiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder der endothelialen Zellmigration. Die quantitativen Analysen zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0). Die Migration der APE1- und NEIL1-*kd* Zellen und deren WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* wurde in zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten ($n = 2$, $N = 3$) untersucht. Bei der Analyse der Migration von Zellen mit PARP1- und OGG1-*kd* wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten ($n = 3$, $N = 3$) und beim WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* ein Experiment in Triplikaten durchgeführt ($n = 1$, $N = 3$). Bei der Untersuchung der Migration von HUVEC handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Triplikaten ($n = 3$, $N = 3$) bei APE1-, FEN1-, NEIL1- und PARP1-*kd* Zellen. Bei OGG1-*kd* HUVEC wurden zwei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt ($n = 2$, $N = 3$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. APE1: *apurinic/apyrimidinic endonuclease*; FEN1: *flap endonuclease 1*; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; NS siRNA: *Nonsilencing siRNA*; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

3.2.3 Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren in Abhängigkeit von ausgewählten BER-Faktoren

Zur Untersuchung des Einflusses der WRN-assoziierten und WRN-unabhängigen BER-Faktoren auf die mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren wurde eine quantitative *Real-time* PCR durchgeführt. Keiner der untersuchten Faktoren ist auf mRNA-Ebene durch den *kd* der BER-Faktoren in EA.hy926 Zellen reguliert (Abbildung 3-16A). Im Gegensatz zu den WRN-assoziierten BER-Faktoren, die keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der untersuchten Faktoren in HUVEC haben, resultiert der *kd* des WRN-unabhängigen BER-Faktors OGG1 in HUVEC in einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von *Sele*, *Icam1*, *Vcam1*, *Ccl2* und *Kdr* (Abbildung 3-16B). Tendenziell unterscheiden sich die mRNA-Expressionsmuster der endothelzellspezifischen Faktoren nach *kd* einzelner BER-Faktoren in EA.hy926 Zellen von denen der HUVEC (Abbildungen 3-16A und 3-16B). Aus dem *kd* des WRN-unabhängigen BER-Faktors OGG1 resultiert ein ähnliches Expressionsprofil wie nach dem *kd* von WRN in HUVEC (Abbildungen 3-10A und 3-16B).

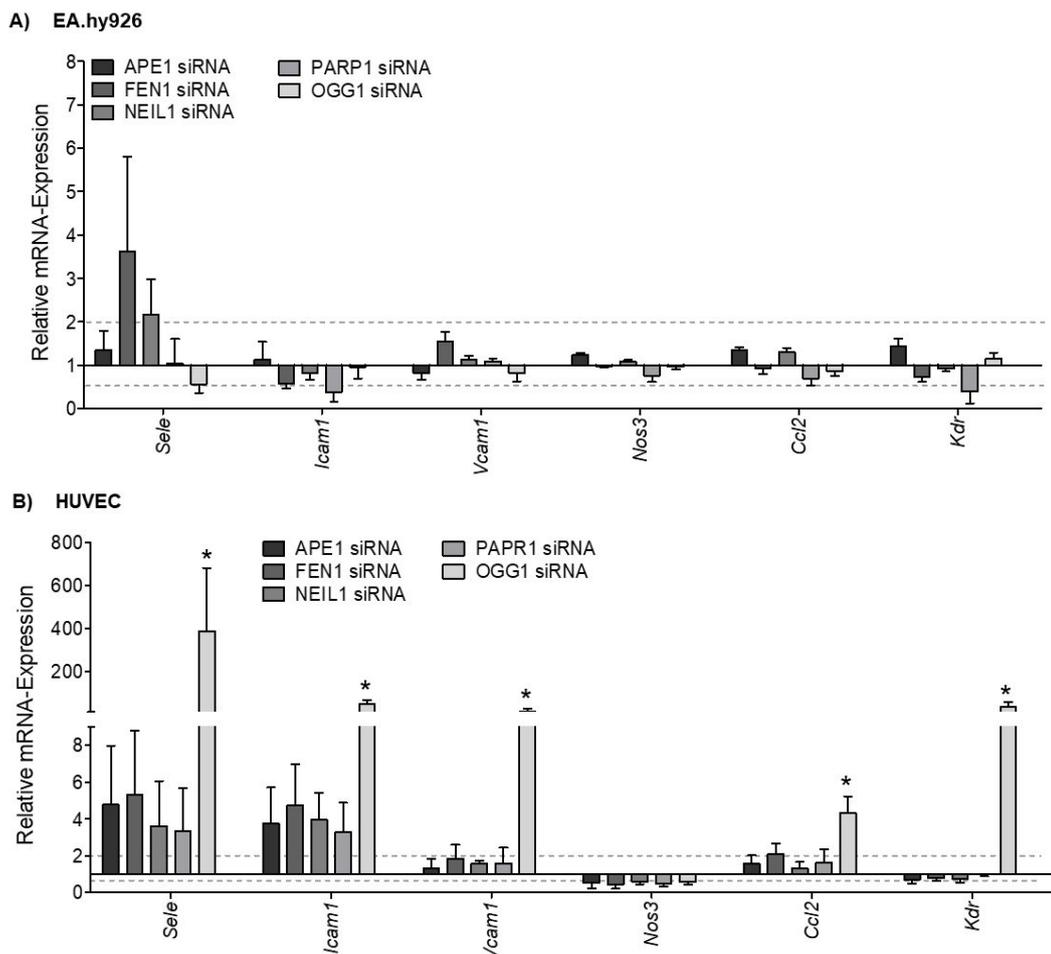


Abbildung 3-16: Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren in BER-*kd* Zellen.

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde 48 h nach Transfektion von A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC mit APE1-, FEN1-, NEIL1-, PARP1- oder OGG1-spezifischer siRNA eine quantitative *Real-time* PCR durchgeführt. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA behandelten Zellen normiert. Kontrollzellen wurden mit NS siRNA behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) mit drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten (n = 3, N = 2). Student's *t*-Test **p* ≤ 0,05. APE1: *apurinic/pyrimidinic endonuclease*; *Ccl2*: *C-C motif chemokine ligand 2*, C-C

Chemokininligand 2; *Nos3*: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, *FEN1*: *flap endonuclease 1*; *Nos2*: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; *Icam1*: *intercellular adhesion molecule 1*; *Kdr*: *vascular endothelial growth factor receptor 2*; *NEIL1*: *Nei like DNA Glycosylase 1*; NS siRNA: *Nonsilencing siRNA*; *OGG1*: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; *PARP1*: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; *Plat*: *tissue-type plasminogen activator*, gewebe-spezifischer Plasminogenaktivator; *Vcam1*: *vascular cellular adhesion molecule 1*; *Sele*: E-selektin.

3.3 Untersuchungen des Einflusses von tBHQ und MMS auf die Viabilität und auf endothelzellspezifische Funktionen

Während in den vorherigen Kapiteln die basalen Effekte auf die Funktionalität von Endothelzellen nach *kd* von WRN und anderen BER-Faktoren untersucht wurde, wird im folgenden Abschnitt der Einfluss eines Oxidans und eines Alkylans auf die Funktionalität von Wildtyp Zellen im Vergleich zu *kd* Zellen analysiert.

Atherosklerose ist durch eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zu Gunsten von ROS gekennzeichnet, die zu DNA-Basenschäden führen können. Um das prooxidative Milieu einer Atherosklerose nachzustellen, wurden konfluente Endothelzellen über einen Zeitraum von 24 h mit dem Oxidans tBHQ behandelt und die Viabilität (zusätzlich nach 72 h gemessen) und Funktionalität dieses Zelltyps untersucht. Ergänzend wurde der Einfluss von MMS, welches ebenfalls Basenschäden verursachen kann, auf ausgewählte Endpunkte analysiert. Die Zellen wurden ebenfalls 24 h mit MMS (für die Viabilität zusätzlich 72 h) inkubiert.

Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden alle Experimente nach dem gleichen Versuchsschema durchgeführt (Abbildungen 3-17).



Abbildung 3-17: Schema zum Ablauf der Experimente mit Substanzbehandlung.

Nach Aussaat der Zellen wurde die Transfektion nach einer Erholungsphase von 48 h durchgeführt. Die Zellen wurden entsprechend den Anforderungen des Experiments erneut ausgesät. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für 24 h (bei der Untersuchung der Viabilität zusätzlich für 72 h) mit tBHQ oder MMS behandelt. Im Anschluss an die Vorbehandlung erfolgte die Analyse des entsprechenden Endpunktes. siRNA: *small interfering RNA*.

3.3.1 Bestimmung schwach toxischer und moderat toxischer Konzentrationen von tBHQ und MMS

Zunächst wurde die Sensitivität von Wt-Endothelzellen bezüglich einer Behandlung mit tBHQ oder MMS untersucht (Abbildung 3-18). Nach tBHQ-Behandlung beträgt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bei EA.hy926 Zellen 200 μ M tBHQ (24 h), während die IC_{50} bei HUVEC 150 μ M tBHQ (24 h) beträgt. Es handelt sich hierbei um die Konzentration, die benötigt wird, um 50 % der Zellen zu inhibieren. Dies deutet darauf hin, dass HUVEC im Vergleich zu EA.hy926 Zellen sensitiver gegenüber tBHQ sind. Bei EA.hy926 Zellen beträgt die IC_{50} nach MMS-Behandlung 300 μ M, die bei HUVEC beträgt > 200 μ M (Abbildungen 3-18A und 3-18B).

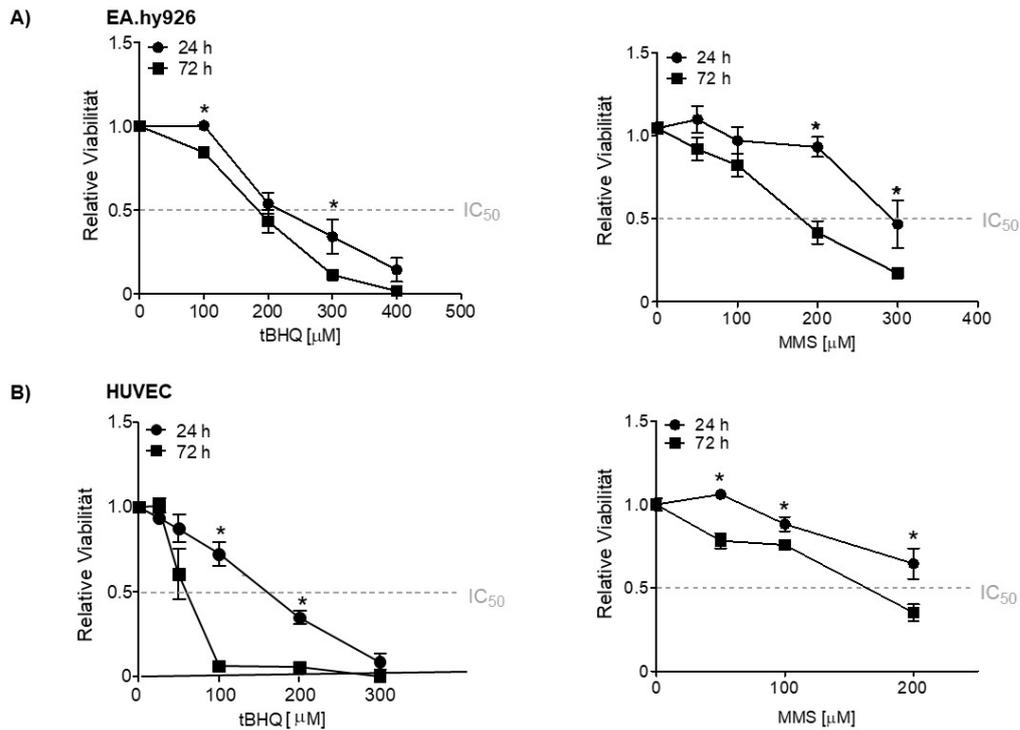


Abbildung 3-18: Viabilität nach tBHQ- und MMS-Behandlung.

A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden mit verschiedenen tBHQ- oder MMS-Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h und 72 h wurde die Viabilität der Endothelzellen mittels Alamar Blue Assay gemessen. Als Kontrollen dienten mit DMSO behandelte (für tBHQ) bzw. unbehandelte (für MMS) Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zur entsprechenden Kontrolle (= 1.0) aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten ($n = 3$, $N = 3$) für die Versuche mit EA.hy926 Zellen und HUVEC nach tBHQ-Behandlung, und aus vier unabhängigen Versuchen in Duplikaten ($n = 4$, $N = 2$) für HUVEC behandelt mit MMS. Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. DMSO: Dimethylsulfoxid; IC: *inhibitory concentration*, inhibitorische Konzentration; MMS: Methylmethansulfonat; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon.

Anhand der Dosis-Wirkungskurven von tBHQ und MMS (Abbildung 3-18) wurden die Konzentrationen zur Behandlung der Endothelzellen für alle weiteren Analysen festgelegt. Da die Funktionalität der Zellen in weiterem Verlauf untersucht werden sollte, war eine weitestgehende Erhaltung der Vitalität der Endothelzellen von Bedeutung. Folglich wurden jeweils eine schwach zytotoxische und eine moderat zytotoxische Konzentration von tBHQ und MMS nach 24 h Inkubation für die weiteren Analysen gewählt. Diese Konzentrationen sind der Tabelle 3-1 zu entnehmen.

Tabelle 3-1: Schwach und moderat zytotoxische Konzentrationen von tBHQ und MMS 24 h nach Behandlung.

Die Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungskurve aus Abbildung 3-18 bestimmt und beziehen sich auf die 24 h Behandlung mit MMS oder tBHQ.

EA.hy926		Substanz	HUVEC	
schwach zytotoxisch	moderat zytotoxisch		schwach zytotoxisch	moderat zytotoxisch
100 µM	160 µM	tBHQ	60 µM	120 µM
100 µM	200 µM	MMS	100 µM	200 µM

3.3.2 Untersuchung des Einflusses von tBHQ auf die Viabilität und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Inwieweit tBHQ in Abhängigkeit von WRN die Viabilität von Endothelzellen beeinflusst, wurde mit Hilfe des Alamar Blue Assays untersucht. Dazu wurden WRN-*kd* Endothelzellen und mit NS siRNA behandelte Kontrollzellen mit verschiedenen Konzentrationen von tBHQ behandelt. WRN-*kd* HUVEC und EA.hy926 Zellen zeigen nach 24 h eine erhöhte Sensitivität gegenüber tBHQ-Behandlung im Vergleich zu WRN-profizienten Zellen (Abbildungen 3-19A und 3-19B).

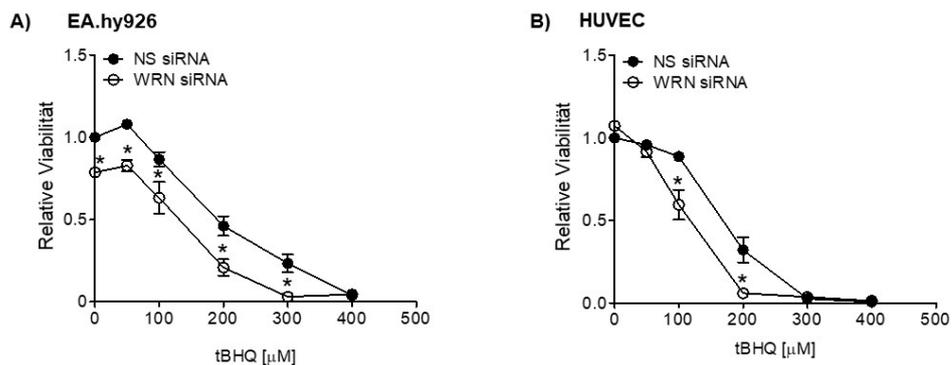


Abbildung 3-19: Viabilität von WRN-*kd* Zellen nach tBHQ-Behandlung.

WRN-*kd* A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden mit verschiedenen tBHQ-Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h wurde die Viabilität der Endothelzellen mittels Alamar Blue Assay gemessen. Als Kontrollen dienten mit DMSO behandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes relativ zur Kontrolle (= 1.0) aus vier unabhängigen Versuchen in Quadruplikaten ($n = 4$, $N = 4$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$. DMSO: Dimethylsulfoxid; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon.

Zur Messung des oxidativen Stresses in EA.hy926 Zellen und HUVEC nach Behandlung mit schwach und moderat zytotoxischen tBHQ-Konzentrationen wurde die intrazelluläre Bildung von ROS gemessen. Dazu wurde der fluorogene Stoff DCFDA, der in die Zelle diffundiert, durch zelluläre Esterasen deacetyliert und anschließend durch ROS zu dem fluoreszierenden DCF oxidiert wird, fluorimetrisch gemessen. Nach Behandlung mit moderat zytotoxischen tBHQ-Konzentrationen ist die Menge an ROS in EA.hy926 Zellen um das ca. 1,4-fache (Abbildung 3-20A) und in HUVEC um das ca. 1,6-fache (Abbildung 3-20B), im Vergleich zu mit DMSO und NS siRNA behandelten Zellen, tendenziell erhöht. Die ROS-Menge ist in WRN-*kd* Zellen im Vergleich zu den jeweiligen WRN-Wt Zellen tendenziell, aber nicht signifikant, vermindert.

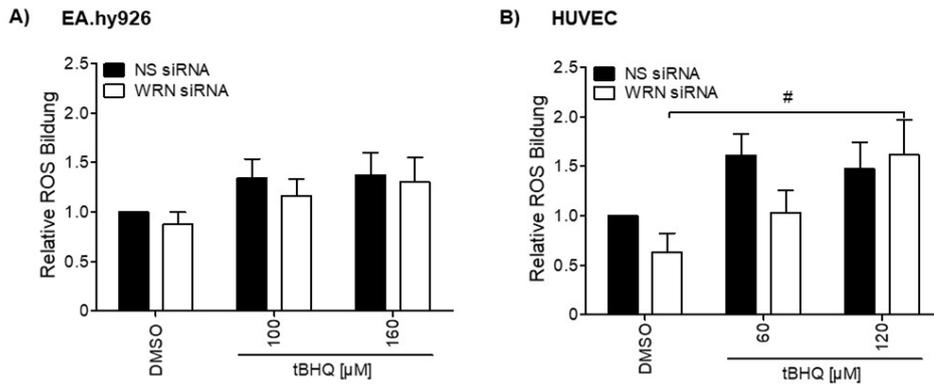


Abbildung 3-20: Analyse der Bildung zellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nach tBHQ-Behandlung.

WRN-*kd* A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden für 24 h mit schwach und moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen behandelt, anschließend mit DCFDA inkubiert und die Fluoreszenz gemessen. Als Kontrollen dienten mit DMSO behandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zur Kontrolle (= 1.0) aus zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ($n = 2$, $N = 2$). One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. DCFDA: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat; DMSO: Dimethylsulfoxid; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; ROS: *reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom protein siRNA.

Zur Untersuchung der Bildung antioxidativer Faktoren als Reaktion auf die tBHQ-Behandlung wurde die mRNA-Expression von *Gpx1* und *Ho1* untersucht (Abbildung 3-21A). Im Gegensatz zur Genexpression von *Gpx1*, ist die Genexpression von *Ho1* nach tBHQ-Behandlung in beiden Zelltypen stark induziert, wobei die Expressionslevel in HUVEC um ein vielfaches höher sind als in EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-21A). Die Expression von HO1 nach tBHQ-Behandlung ist ebenfalls auf Proteinebene induziert (Abbildung 3-21B). WRN hat in beiden Zelltypen keinen Einfluss auf die Expression von *Ho1*/HO1 (Abbildung 3-21). *Gpx1* wird ausschließlich in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen nach tBHQ-Behandlung vermindert exprimiert (Abbildung 3-21A).

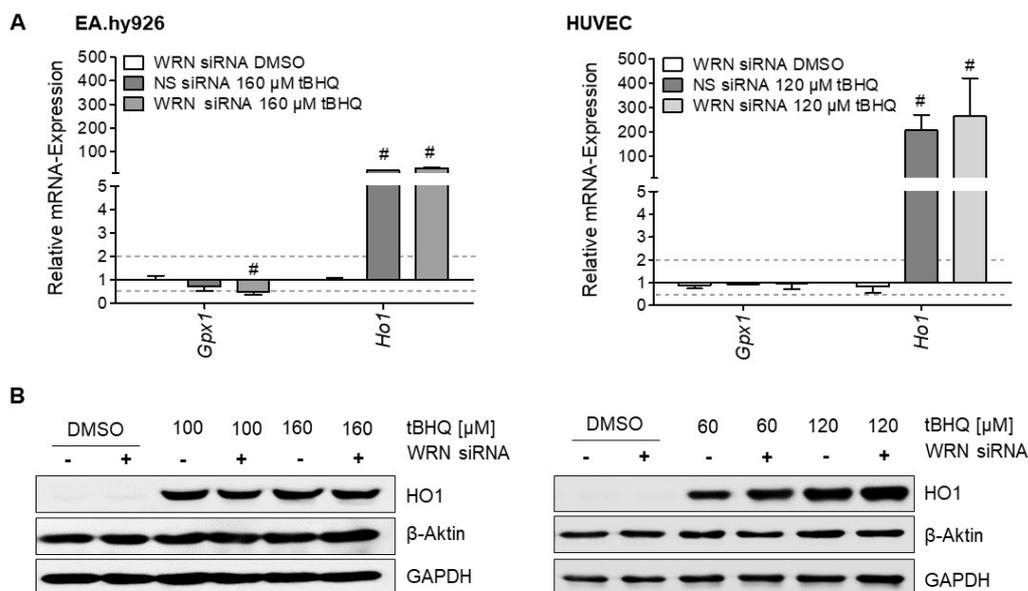


Abbildung 3-21: Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression antioxidativer Faktoren nach tBHQ-Behandlung.

Mit WRN oder NS siRNA behandelte Zellen wurden für 24 h mit schwach toxischen oder moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen inkubiert. A) Die mRNA-Expression von *Gpx1* und *Ho1* wurde mittels quantitativer *Real-time* PCR untersucht. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA behandelten Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen (= 1.0)

aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten ($n = 3$, $N = 2$). One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$. B) Dargestellt sind repräsentative Western Blots. β -Aktin und GAPDH dienten als Ladekontrolle. *Actb*: β -Aktin; DMSO: Dimethylsulfoxid; *GAPDH/gapdh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; *Gpx1*: Glutathionperoxidase 1; *HO1/Ho1*: Hämoxigenase 1; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

3.3.3 Einfluss der tBHQ- und MMS-Behandlung auf Endothelzellfunktionen von WRN- und BER-*kd* Zellen: acLDL-Aufnahme, Ca^{2+} -Freisetzung, Permeabilität, Zell-Zell Adhäsion und Endothelzellmigration

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die schwach und moderat zytotoxischen tBHQ- und MMS-Konzentrationen Einfluss auf die Aufnahme von acLDL durch WRN-Wt und WRN-*kd* Endothelzellen hatten. In EA.hy926 Zellen wirkt vor allem die Inkubation mit MMS inhibitorisch auf die Aufnahme von acLDL (Abbildung 3-22A). In HUVEC zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt auf die Aufnahme von acLDL durch die Behandlung mit tBHQ (Abbildung 3-22B). Ein reduzierter WRN-Gehalt wirkt sich weiter hemmend auf die Aufnahme von acLDL nach tBHQ-Behandlung in HUVEC aus, während ein WRN-*kd* in EA.hy926 Zellen die Aufnahme von acLDL nach Behandlung mit 160 μ M tBHQ verbessert.

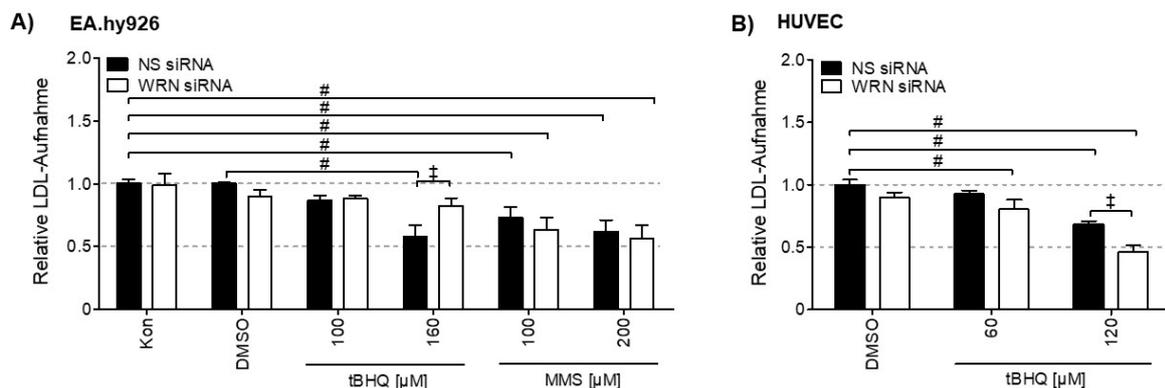


Abbildung 3-22: Aufnahme von acLDL nach tBHQ- oder MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.

Nach 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von tBHQ oder MMS wurden WRN-*kd* A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC mit acetyliertem LDL (acLDL) inkubiert und im Anschluss die LDL-Aufnahme gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt in Duplikaten ($n = 3$, $N = 2$). One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$; Two-way ANOVA $\ddagger p \leq 0,05$. DMSO: Dimethylsulfoxid; Kon: Kontrolle; LDL: *low-density lipoprotein*; MMS: Methylmethansulfonat; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Die Freisetzung intrazellulärer Calcium-Ionen wurde in WRN-profizienten und WRN-*kd* Endothelzellen nach Behandlung mit tBHQ untersucht. Die Ca^{2+} -Freisetzung ist in Wt EA.hy926 Zellen nach tBHQ-Behandlung signifikant verringert und somit tBHQ-abhängig (Abbildung 3-23A). TBHQ hat keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von Ca^{2+} in wildtypischen HUVEC (Abbildung 3-23B).

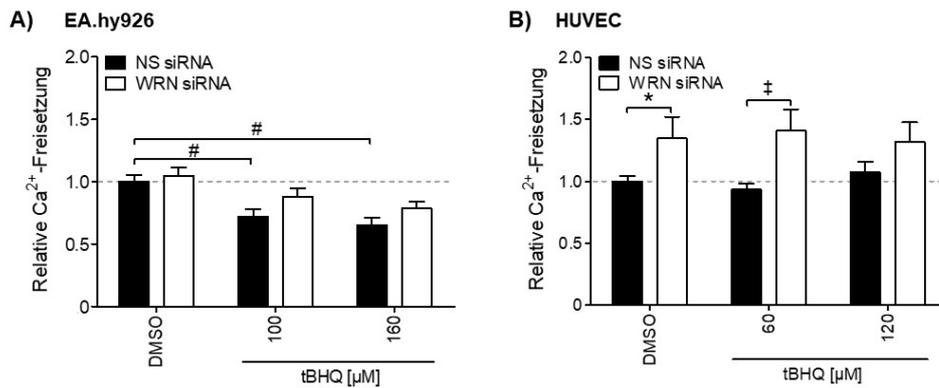


Abbildung 3-23: Ca²⁺-Freisetzung nach tBHQ-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.

Mit WRN oder NS siRNA behandelte Zellen wurden für 24 h mit schwach oder moderat zytotoxischen tBHQ-Konzentrationen inkubiert. Nach Stimulation mit ATP wurde die Ca²⁺-Freisetzung über eine Dauer von 30 s gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit A) EA.hy926 Zellen durchgeführt in Duplikaten (n = 3, N = 2) und drei unabhängigen Versuchen mit B) HUVEC durchgeführt in Triplikaten (n = 3, N = 3). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05; Two-way ANOVA †p ≤ 0,05. ATP: Adenosintriphosphat; Ca²⁺: Calcium; DMSO: Dimethylsulfoxid; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Die Behandlung von WRN-*kd* HUVEC mit schwach zytotoxischen oder moderat zytotoxischen tBHQ-Konzentrationen ergibt keine signifikante Veränderung der Permeabilität im Vergleich zu WRN-*kd* HUVEC, die nicht mit tBHQ behandelt wurden (Abbildung 3-24). Die Permeabilität in Anwesenheit von WRN liegt nach Behandlung mit der moderat toxischen Konzentration zwischen der der Kontrolle und der nach TNFα-Behandlung und ist lediglich tendenziell erhöht. Es kann geschlussfolgert werden, dass tBHQ, wenn überhaupt, eher einen geringen Effekt auf die Permeabilität von HUVEC hat, der weitestgehend WRN-unabhängig ist.

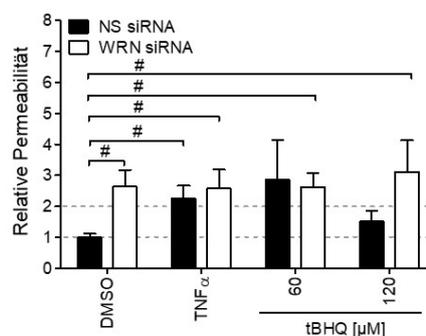


Abbildung 3-24: Einfluss von tBHQ auf die Permeabilität von WRN-*kd* und Wt HUVEC.

HUVEC wurden auf einer permeablen Membran ausgesät. Die Intensität des Fluoreszenz-Farbstoffes, der durch die HUVEC *Monolayer* trat, wurde gemessen und war proportional zur Permeabilität. Zellen, die 19 h vor Permeabilitätsmessung mit TNFα behandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Zudem wurden Zellen für 24 h mit schwach oder moderat zytotoxischen tBHQ-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) relativ zu mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen (= 1.0) aus vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten (n = 4, N = 2). One-way ANOVA #p ≤ 0,05. NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; TNFα: Tumornekrosefaktor alpha; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Des Weiteren wurde der Einfluss beider Agenzien auf die Adhäsion von HT-29 Zellen an die Endothel Ein-Zell-Schicht untersucht (Abbildung 3-25). MMS vermindert die Zell-Zell Adhäsion WRN-profizienter, nicht aber WRN-reduzierter EA.hy926 Zellen, während tBHQ ausschließlich Einfluss auf die Adhäsion WRN-reduzierter Zellen nach Behandlung mit schwach toxischen tBHQ-Konzentrationen hat (Abbildung 3-25A). Des Weiteren induzieren moderat zytotoxische tBHQ-Konzentrationen die Zell-Zell Adhäsion von HT-29 Zellen an WRN-*kd* HUVEC um das

8-fache und an WRN-Wt HUVEC um das 6-fache. Nach Behandlung von HUVEC mit schwach toxischen MMS-Konzentrationen ist die Zell-Zell Adhäsion von WRN-*kd* Zellen im Vergleich zu WRN-profizienten Zellen signifikant erhöht (Abbildung 3-25A). Nach *kd* einzelner BER-Faktoren ist die Adhäsion von HT-29 Zellen an die EA.hy926 Ein-Zell-Schicht bereits basal um das Doppelte erhöht (Abbildung 3-25B). Während tBHQ vor allem in APE1- und PARP1-*kd* EA.hy926 Zellen zu einer verstärkten Adhäsion führt, hat MMS keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion dieser Zellen (Abbildung 3-25B). In BER-*kd* HUVEC ist durch die Behandlung mit tBHQ keine signifikante Änderung in der Zell-Zell Adhäsion zu verzeichnen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zell-Zell Adhäsion vor allem durch tBHQ stimuliert wird.

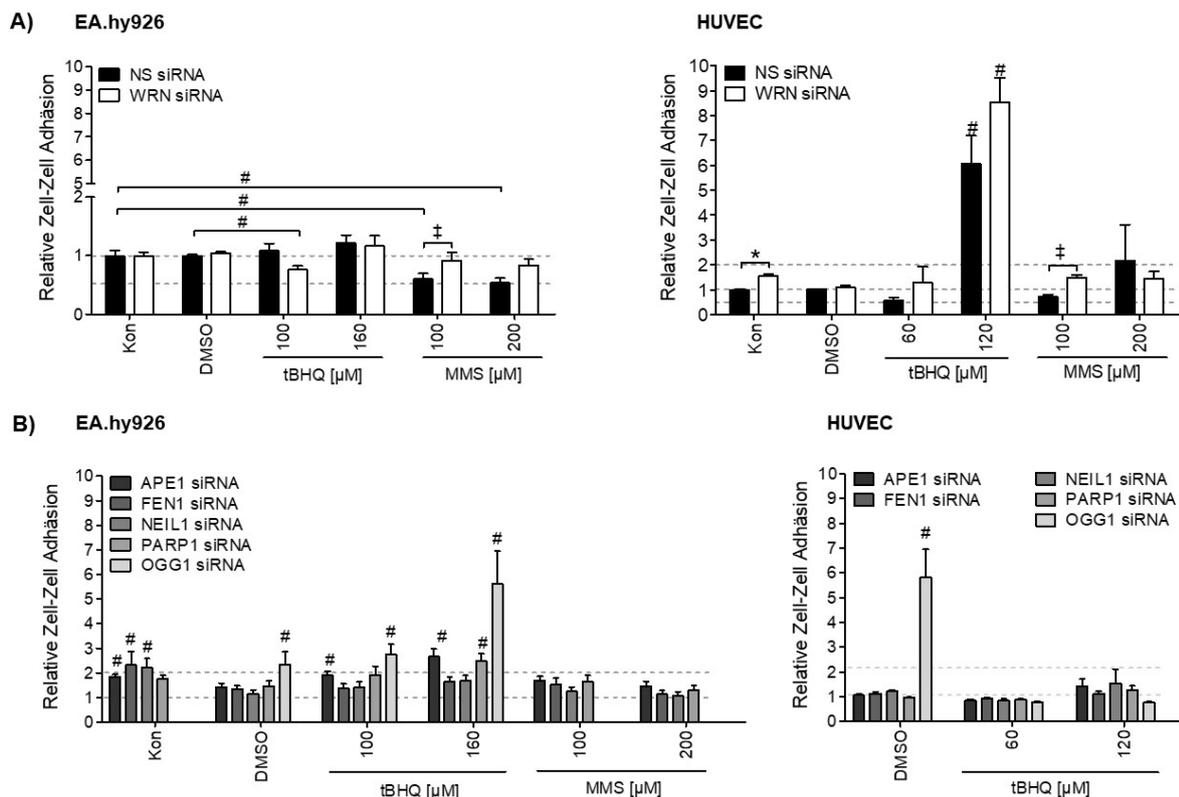


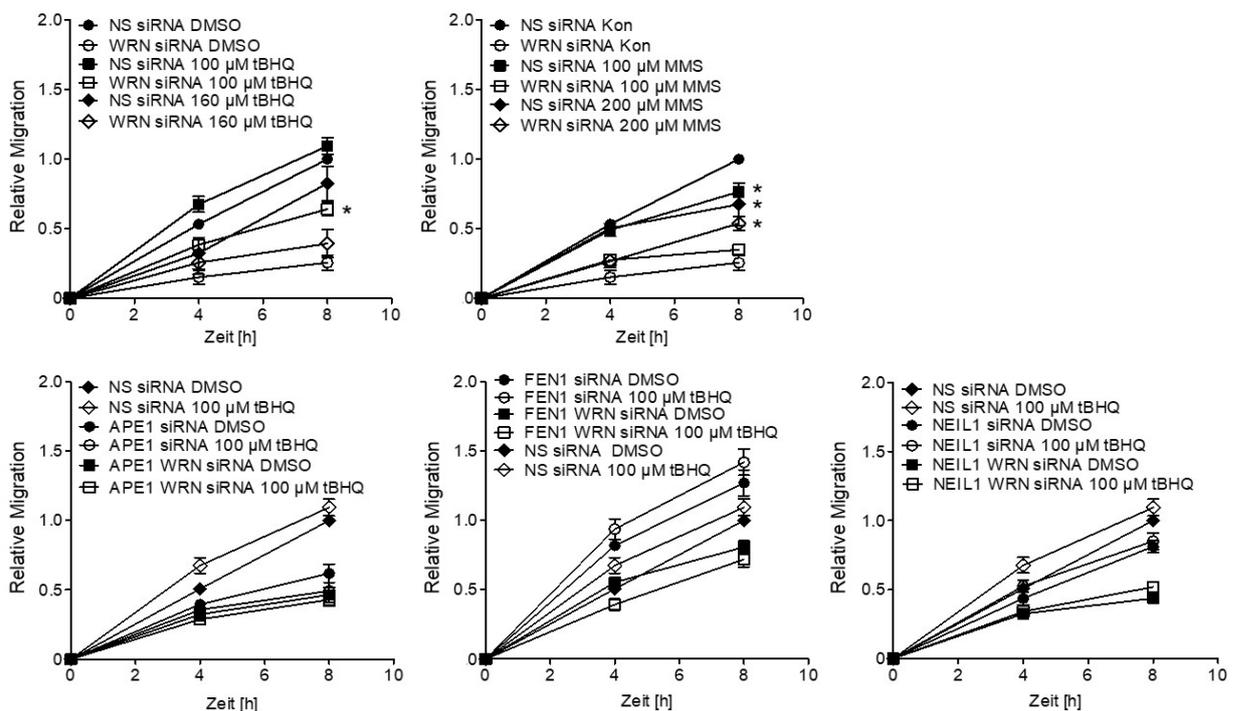
Abbildung 3-25: Analyse der Zell-Zell Adhäsion nach *kd* von WRN oder einzelnen BER-Faktoren und nach Inkubation mit tBHQ und MMS.

EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden für 24 h mit schwach toxischen oder moderat toxischen tBHQ- oder MMS-Konzentrationen behandelt und mit Calcein-AM gefärbten HT-29 Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der adhärenz HT-29 Zellen gemessen. Als Kontrolle für tBHQ behandelte Zellen dienen Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Kontrollen für die mit MMS behandelten Zellen waren unbehandelte Zellen (Kon: Kontrolle). A) Ergebnis der Zell-Zell Adhäsions-Analyse von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen oder HUVEC. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes aus drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Triplikaten ($n = 3$, $N = 3$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$; Two-way ANOVA ‡ $p \leq 0,05$. B) Resultat der Untersuchung von APE1-, FEN1-, NEIL1-, PARP1- oder OGG1-*kd* Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes ($n = 4$, $N = 4$). One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. APE1: *apurinic/aprimidinic endonuclease*; DMSO: Dimethylsulfoxid; FEN1: *flap endonuclease 1*; Kon: Kontrolle; MMS: Methylmethansulfonat; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Wie bereits in vorherigen Untersuchungen gezeigt, unterstützen WRN (Abbildung 3-7) sowie einige BER-Faktoren (APE1, NEIL1, PARP1) die endotheliale Migration, während andere (FEN1, OGG1) (Abbildung 3-15) dieser entgegenwirken. Der Einfluss von tBHQ und MMS auf die migratorische Eigenschaft von wildtypischen Endothelzellen und Endothelzellen mit

WRN/*BER-kd* wurde im Folgenden untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die tBHQ-Behandlung WRN-profizienter EA.hy926 Zellen keinen Effekt auf deren Migration hat, während WRN-defiziente EA.hy926 Zellen ihre Migration durch die Behandlung mit tBHQ verbessern (Abbildung 3-26A). Letzteres ist ebenfalls bei WRN-*kd* EA.hy926 Zellen der Fall, die mit MMS behandelt wurden (Abbildung 3-26A). Allerdings wirkt MMS hemmend auf die Migration der Wt EA.hy926 Zellen. In HUVEC ist die Migration durch die Behandlung mit schwach und moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen dosisabhängig und in WRN-profizienten und WRN-*kd* HUVEC gleichermaßen inhibiert (Abbildung 3-26B). Nach der tBHQ-Behandlung von APE1-, FEN1-, und NEIL1-*kd* EA.hy926 Zellen oder EA.hy926 Zellen mit einem WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* gibt es keinen signifikanten Unterschied zu den jeweiligen unbehandelten *kd*-Kontrollen. Die Migration ist in WRN-OGG1-Faktor-Doppel-*kd* Zellen vermindert (Abbildung 3-26A). In PARP1-*kd* Zellen verbessert die Inkubation mit tBHQ die Migration beider Endothelzelltypen (Abbildungen 3-26A und 3-26B). In APE1-*kd* HUVEC verbessert sich die Migration nach tBHQ-Behandlung signifikant, während die tBHQ-Behandlung der Zellen mit FEN1- und NEIL1-*kd* keinen Effekt auf die Migration hat (Abbildung 3-26B). Die Ergebnisse zeigen, dass tBHQ in Abhängigkeit der *kds* mancher BER-Faktoren die Migration von Endothelzellen modelliert.

A) EA.hy926



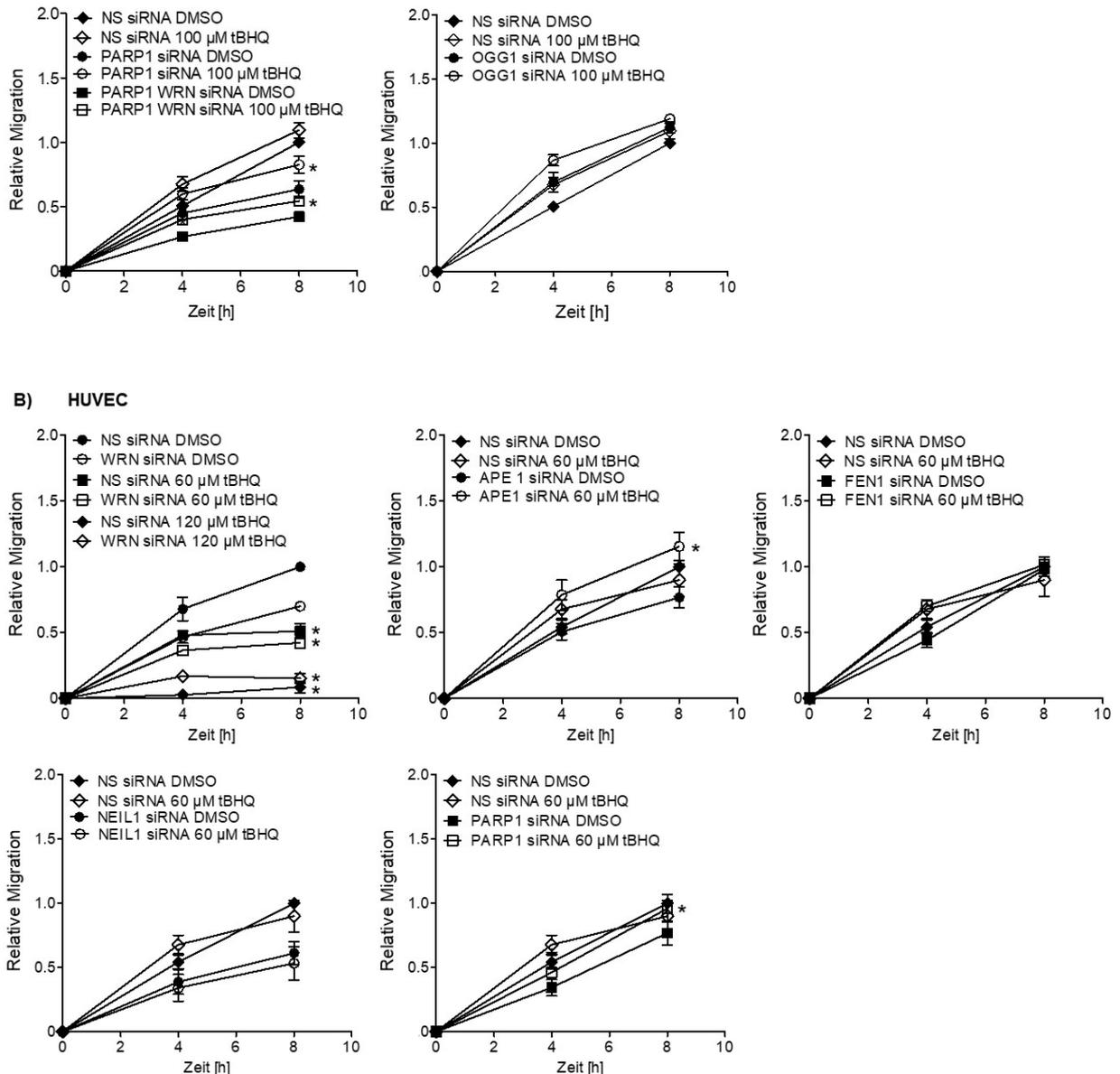


Abbildung 3-26: Endotheliale Zellmigration in Abhängigkeit von WRN und/oder einzelnen BER-Faktoren nach Behandlung mit tBHQ und MMS.

A) Nach *kd* des jeweiligen BER-Faktors und dem WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* in EA.hy926 Zellen und B) nach *kd* des jeweiligen BER-Faktors in HUVEC wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von tBHQ (oder ggf. MMS) behandelt. Die Migration wurde direkt nach Verletzung sowie 4 h und 8 h danach analysiert. Die Analysen zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen (= 1.0) oder zu mit NS siRNA, unbehandelten Zellen (= 1.0; Kon). Gezeigt sind ein bis drei unabhängige Versuche, durchgeführt in Triplikaten (n = 1-3, N = 3). Student's *t*-Test *p \leq 0,05. APE1: *apurinic/aprimidinic endonuclease*; BER: Basenexzisionsreparatur; DMSO: Dimethylsulfoxid; FEN1: *flap endonuclease 1*; Kon: Kontrolle; MMS: Methylmethansulfonat; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; tBHQ: tertiär-Butylhydro-chinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Die ATP-Menge von EA.hy926 Zellen wurde in Abhängigkeit von WRN und nach Behandlung mit tBHQ und MMS luminometrisch gemessen. Nach tBHQ-Behandlung ist das zelluläre ATP in WRN-profizienten EA.hy926 Zellen vermindert, was auf toxische Effekte von tBHQ zurückzuführen ist (Abbildung 3-27). Die ATP-Menge in WRN-*kd* Zellen ist durch eine tBHQ-Behandlung nicht signifikant verändert. MMS hat keinen Effekt auf die Menge des zellulären ATPs (Abbildung 3-27).

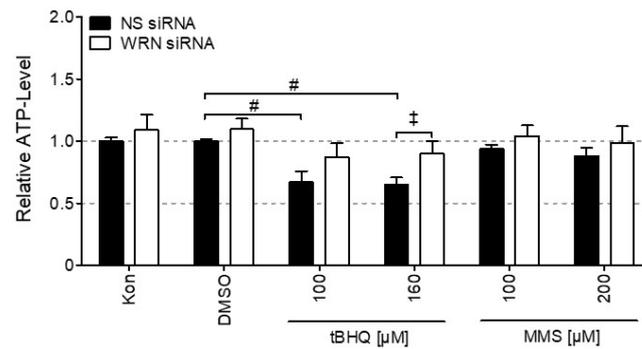
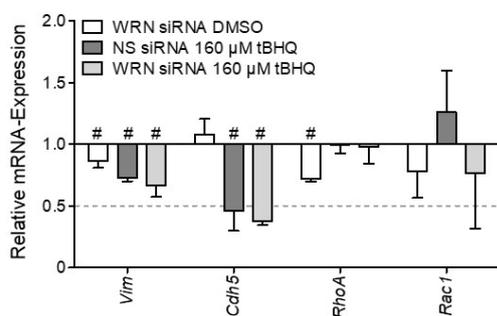


Abbildung 3-27: Zellulärer ATP-Gehalt nach Behandlung mit tBHQ und MMS.

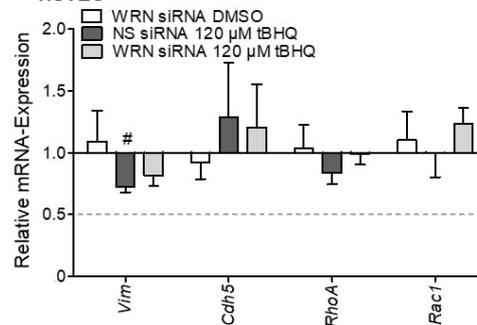
Der ATP-Gehalt von EA.hy926 Zellen wurde abhängig von WRN und nach Behandlung mit tBHQ und MMS mittels Lumineszenz ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen oder mit NS siRNA behandelten Zellen (= 1.0) aus drei bis vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten oder Quadruplikat ($n = 3-4$, $N = 2-4$). One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$, Two-way ANOVA $\ddagger p \leq 0,05$. ATP: Adenosintri-phosphat; DMSO: Dimethylsulfoxid; Kon: Kontrolle; MMS: Methylmethansulfonat; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

Mögliche Effekte des Oxidans tBHQ auf die Genexpression und Proteinmenge der migrationsassoziierten Faktoren Vimentin, CDH5, RAC1 und RHOA wurden untersucht (Abbildung 3-28). Die mRNA-Expression von *Vim* ist nach tBHQ-Behandlung in beiden Endothelzelltypen vermindert (Abbildung 3-28A). Auch die Ergebnisse der Analyse der *Cdh5* mRNA-Expression zeigen eine verringerte Menge nach tBHQ-Inkubation in EA.hy926 Zellen. TBHQ hat keinen Effekt auf die Genexpression von *RhoA* oder *Rac1* in beiden Zelltypen (Abbildung 3-28A). Die Proteinmenge der untersuchten Faktoren (Vimentin, CDH5, RHOA, RAC1, PTK2) ist nach tBHQ-Behandlung in WRN-*kd* Zellen im Vergleich zu WRN-Wt Zellen nicht verändert (Abbildung 3-28B). Unabhängig vom WRN-Status ist der RHOA-Proteingehalt nach tBHQ-Behandlung in EA.hy926 Zellen erhöht, während PTK2 in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen nach tBHQ-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten WRN-*kd* Zellen erhöht ist (Abbildung 3-28B). Die Ergebnisse zeigen, dass tBHQ die Gen- und Proteinexpression migrationsassoziierter Faktoren spezifisch beeinflusst.

A) EA.hy926



HUVEC



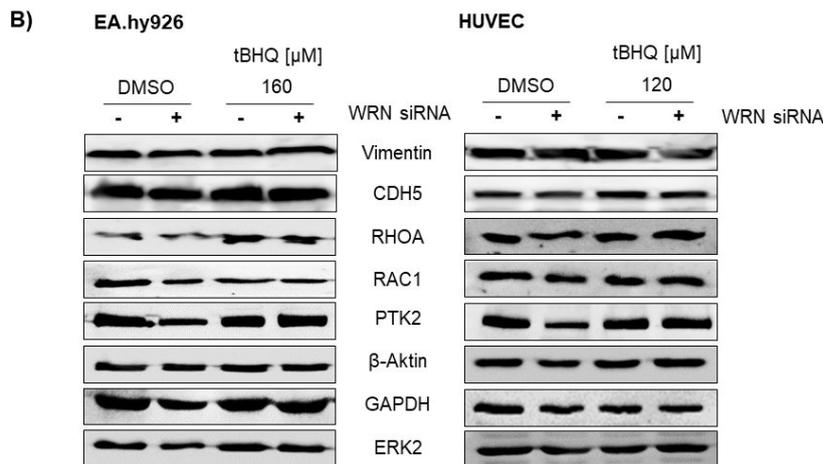


Abbildung 3-28: Analyse der mRNA- und Proteinexpression migrationsassoziierter Faktoren nach Genotoxin-Behandlung.

Nach WRN-*kd* wurden Zellen für 24 h mit moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen behandelt. A) Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time* PCR untersucht. Es wurde auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen normiert. Abgebildet sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes in Relation zu mit NS siRNA und DMSO behandelten Zellen (= 1.0) aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten ($n = 2-3$, $N = 2$). One-way ANOVA * $p \leq 0,05$. B) Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden Western Blot Analysen durchgeführt. β -Aktin, GAPDH und ERK2 dienten als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Blots aus zwei unabhängigen Experimenten. ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; *Ptk2*: fokale Adhäsionskinase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; *Rac1/Rac1*: Rac family small GTPase 1; *RhoA/RhoA*: *Ras homolog family member A*; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; VE-Cadherin/*Cdh5*: vaskulär-endotheliales Cadherin; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

3.3.4 Analyse der mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren nach Behandlung mit tBHQ und MMS in Abhängigkeit einzelner BER-Faktoren

Die Analyse der Genexpression und Proteinmenge endothelzellspezifischer Faktoren von WRN-*kd* Zellen wurde, ergänzend zur Analyse der basalen Expression, ebenfalls nach tBHQ und MMS-Behandlung untersucht. In HUVEC ist *Sele* nach Oxidansbehandlung herunterreguliert (Abbildung 3-29A). *Icam1* ist in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen nach Behandlung mit tBHQ vermehrt exprimiert, wohingegen *Icam1* durch die tBHQ-Behandlung in HUVEC nicht reguliert ist (Abbildung 3-29A). Die Proteinmenge von ICAM1 ist in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC erhöht, wobei die Proteinmenge in WRN-*kd* HUVEC nach tBHQ-Behandlung deutlich geringer ist als unter basalen Bedingungen (Abbildung 3-29B). Die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls *Vcam1* ist nach tBHQ-Behandlung in HUVEC herunterreguliert (Abbildung 3-29A). In beiden Endothelzelltypen ist die Expression von *Nos3* und *Nos2* Agens-unabhängig, was sich für NOS3 auf Proteinebene bestätigt (Abbildungen 3-29A und 3-29B). Während die *Ccl2* mRNA-Expression in HUVEC durch tBHQ verringert ist, ist *Ccl2* in EA.hy926 Zellen vermehrt exprimiert. MMS, nicht aber tBHQ, verringert die mRNA-Expressionslevel von *Plat* und *Kdr* in EA.hy926 Zellen. Die *Edn1* mRNA-Expression ist nach Behandlung mit tBHQ und MMS herunterreguliert, was für die Behandlung mit tBHQ ebenfalls auf Proteinebene erkennbar ist (Abbildungen 3-29A und 3-29B). Die Ergebnisse zeigen, dass tBHQ die Gen- und Proteinexpression und MMS die mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren beeinflusst.

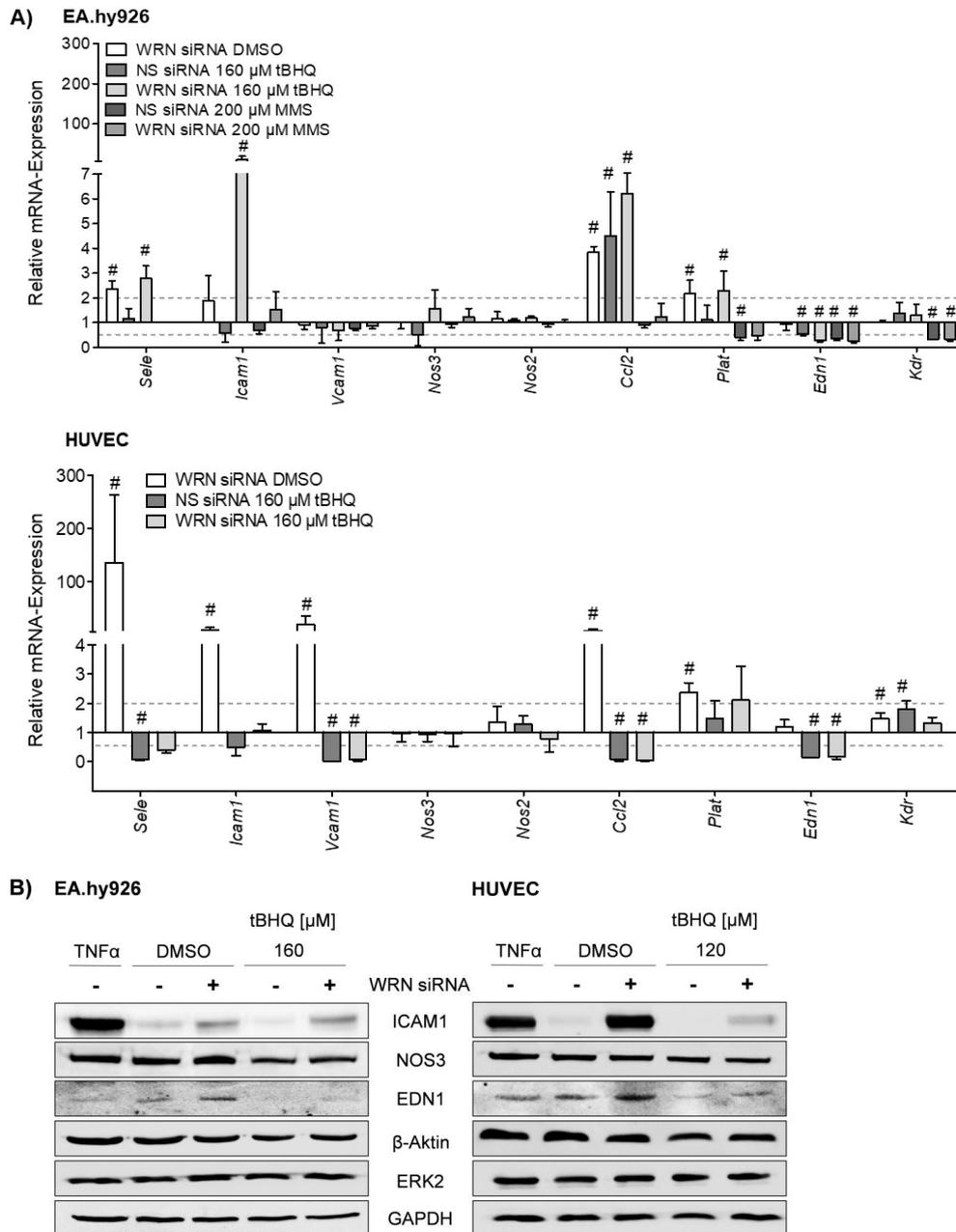


Abbildung 3-29: Analyse der mRNA- und Proteinexpression endothelzellspezifischer Faktoren nach Genotoxin-Behandlung.

WRN-*kd* und Kontrollzellen wurden für 24 h mit moderat toxischen tBHQ- und MMS-Konzentrationen behandelt. A) Die mRNA-Expression wurde quantifiziert und die Werte wurden auf die relative mRNA-Expression der mit NS siRNA behandelten Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes relativ zu mit NS siRNA und DMSO behandelten oder relativ zu mit NS siRNA behandelten Zellen (=1.0) aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten ($n = 2-4$, $N = 2$). One-way ANOVA $*p \leq 0,05$. B) Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Inkubation mit TNF α diente als Positivkontrolle für die Expression von Adhäsionsmolekülen. β -Aktin, GAPDH und ERK2 dienten als Ladekontrollen. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Experimenten. *Actb*: β -Aktin; *Ccl2*: *C-C motif chemokine ligand 2*; C-C Chemokinligand 2; DMSO: Dimethylsulfoxid; *Edn1/Edn1*: Endothelin 1; eNOS/*Nos3*: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; GAPDH/ *gapdh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; *ICAM1/Icam1*: *intercellular adhesion molecule 1*; *Nos2*: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; *Plaf*: *tissue-type plasminogen activator*, gewebespezifischer Plasminogenaktivator; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; TNF α : Tumornekrosefaktor alpha; *Vcam1*: *vascular cellular adhesion molecule 1*; *Kdr*: *vascular endothelial growth factor receptor 2*; WRN siRNA: Werner-Syndrom protein siRNA.

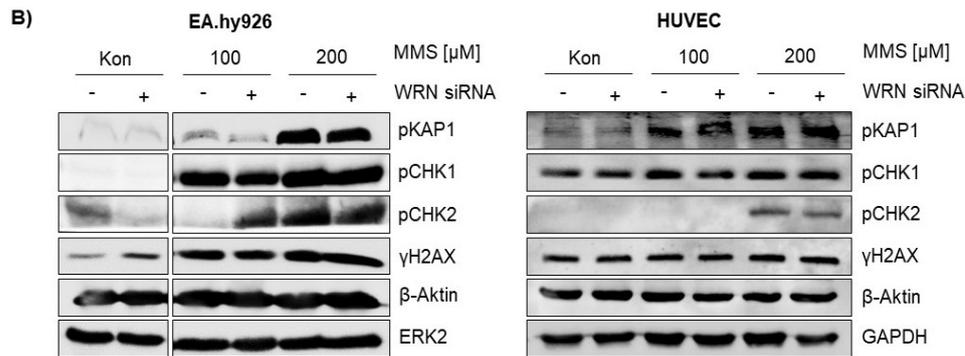


Abbildung 3-30: Aktivierung von an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine nach Behandlung mit tBHQ oder MMS.

WRN-*kd* und Kontroll EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden mit schwach oder moderat toxischen A) tBHQ- und B) MMS-Konzentrationen inkubiert. Nach einer Behandlung von 24 h wurde der Aktivierungsstatus der an der DNA-Schadensantwort beteiligten Faktoren, unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper mittels Western Blot Analysen untersucht. Als Kontrolle dienten mit NS siRNA und DMSO behandelte Zellen oder Zellen die nur mit NS siRNA behandelt wurden (Kon). Die Proteinmenge von β -Aktin, ERK2 und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) dienten als Ladekontrollen. Gezeigt sind repräsentative Blots aus 1-2 unabhängigen Versuchen. CHK: Checkpointkinase; DMSO: Dimethylsulfoxid; ERK2: extrazellulär regulierte Kinase 2; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert; KAP1: *KRAB-associated protein1*; Kon: Kontrolle; MMS: Methylmethansulfonat; NS siRNA: *Nonsilencing* siRNA; p: phospho; p53: Tumorsuppressorprotein; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; WRN siRNA: Werner-Syndrom Protein siRNA.

4 Diskussion

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische und altersassoziierte Erkrankung der Blutgefäße, die mit einer Dysfunktion des Endotheliums einhergeht. Das initiale Ereignis ist die Entkopplung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), was vermehrt zur Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Balligand *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2002). Folglich kommt es zur Schädigung von DNA, Proteinen und der Plasmamembran. Die Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache dar. Risikofaktoren wie Rauchen, eine glucosereiche Ernährung, Übergewicht und Bluthochdruck tragen maßgeblich zur Entstehung vaskulärer Erkrankungen bei (Barquera *et al.*, 2015; Herrington *et al.*, 2016). Neben Umwelt- und *Life-Style* bedingten Faktoren spielen genetische Faktoren ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose. Obwohl Atherosklerose eine komplexe Erkrankung ist, gibt es mehrere Kandidatengene, die die Artherosklerose begünstigenden Prozesse modellieren. Eines dieser Gene kodiert für das Werner-Syndrom Protein (WRN). Dabei handelt es sich um eine Helikase, die an der DNA-Reparatur, Replikation, Transkription sowie an der Erhaltung von Telomeren beteiligt ist (Larsen und Hickson, 2013). Während der Reparatur von Basenschäden entwindet WRN die DNA und interagiert mit weiteren Faktoren dieses Reparaturweges (Opresko *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2004). Mutationen des Werner-Syndrom Gens (*Wrn*) führen zu einem Funktionsverlust des Proteins. Ein Symptom von Werner-Syndrom Patienten ist die frühzeitige Manifestation der Atherosklerose (Tsianakas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2013). Wie es zur frühzeitigen Entstehung der Atherosklerose in Werner-Syndrom Patienten kommt und welche molekularen Mechanismen der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion zugrunde liegen, ist weitestgehend unbekannt. Unerforscht ist, inwieweit Defekte in *Wrn* die Endothelzellfunktionen beeinflussen, die zur Entstehung einer Atherosklerose führen.

4.1 Einfluss von WRN auf Viabilität und Endothelzellfunktionen

Zunächst wurde die Funktionalität von Endothelzellen in Abhängigkeit von WRN untersucht. Das Auftreten einer Atherosklerose und andere für das Werner-Syndrom typische altersassoziierte Erkrankungen sind auf das Fehlen oder einen Funktionsverlust von WRN zurückzuführen. Hierfür sind beispielsweise Mutationen im C-Terminus von *Wrn* verantwortlich, die einen Verlust der Kernlokalisationssequenz zur Folge haben. Aus diesem Grund ist das Protein nicht in der Lage, in den Kern zu translozieren. Andere Mutationen führen zur Instabilität von WRN, worauf ein schneller Proteinabbau folgt (Huang *et al.*, 2006). Die für das Werner-Syndrom typischen Erkrankungen treten mit einer unterschiedlichen Häufigkeit auf. Während sich bilaterale Katarakte bei 100 % der untersuchten Werner-Syndrom Patienten entwickeln, manifestiert sich bei 40 % der untersuchten Patienten eine Atherosklerose (Huang

et al., 2006). Warum diese Patienten von einer Atherosklerose betroffen sind, kann auf mehrere Gründe zurückzuführen sein. Die Entwicklung dieser Erkrankung ist ein multifaktorieller Prozess. Weitere genetische Faktoren könnten die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen. Des Weiteren könnten Umwelteinflüsse und die Lebensweise der Patienten die Genese der Atherosklerose fördern. Auch könnte es einen mutations-abhängigen Effekt innerhalb von *Wrn* geben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von RNA-Interferenz ein *WRN-knockdown (kd)* in EA.hy926 Zellen und HUVEC erzielt (Abbildung 3-2). Die Zellen hatten einen geringen WRN-Restgehalt. In welchem Ausmaß ein funktionsfähiges, aber in seiner Menge stark reduziertes WRN zur Aufrechterhaltung der Funktionen bzw. zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beiträgt, ist schwer zu beurteilen. Es stellt sich die Frage, ob es zu einer sukzessiven Abschwächung der jeweiligen Endothelfunktion mit sinkender WRN-Konzentration kommt und ob es einen Schwellenwert (*Threshold*) der WRN-Menge gibt, bei dem die Endothelfunktion erhalten bleibt bzw. eine Dysfunktion eintritt.

4.1.1 Einfluss von WRN auf die Viabilität von Endothelzellen

Zunächst wurde die Bedeutung von WRN für die Erhaltung von Vitalitätsparametern analysiert. Im Alamar Blue und im MTT Assay wurde die Umsetzung von Farbstoffen durch Reduktion in metabolisch aktiven Zellen untersucht. Der MTT Assay zeigt, dass WRN keinen Effekt auf die Reduktionskapazität von EA.hy926 Zellen hat (Abbildung 3-3B). Aus dem Alamar Blue Assay geht eine signifikant verminderte Reduktionsaktivität in *WRN-kd* EA.hy926 Zellen hervor, was auf eine Modellierung der Mitochondrienfunktionen zurückzuführen sein könnte (Abbildung 3-3A). Das Ergebnis des Alamar Blue Assays wird durch Untersuchungen von Li *et al.* unterstützt, die zeigen konnten, dass WRN-defiziente HeLa Zellen veränderte mitochondriale Funktionen aufweisen, deren Folge ein verändertes Redoxgleichgewicht und die Inhibition des Zellwachstums und der Zellproliferation ist (Li *et al.*, 2014). Die unterschiedlichen Ergebnisse des Alamar Blue und MTT Assays in der vorliegenden Arbeit, könnten auf die Beteiligung verschiedener Enzyme zurückzuführen sein. Während im MTT Assay die Reduktion von Tetrazolium durch mitochondriale Enzyme katalysiert wird, wird Alamar Blue (Resazurin) durch mitochondriale oder zytoplasmatische Reduktasen umgesetzt (De Fries *et al.*, 1995; Zalata *et al.*, 1998). Aus anderen Studien geht allerdings hervor, dass Resazurin und MTT durch zytosolische sowie mitochondriale Enzyme zu Resorufin bzw. Formazan umgesetzt werden (Gonzales und Tarloff, 2001; Hamid *et al.*, 2004). Dies würde bedeuten, dass durch den MTT und Alamar Blue Assay nur bedingt Rückschlüsse auf eine Schädigung der Mitochondrien gezogen werden können. Im Vergleich zum MTT Test ist der Alamar Blue Assay häufig sensitiver (Hamid *et al.*, 2004). In ersterem ist die Reduktionsaktivität von *WRN-kd* HUVEC im Vergleich zur *WRN-profizienten* HUVEC vermindert, wohingegen sie im Alamar Blue Assay

erhöht ist (Abbildungen 3-3A und 3-3B). Der WRN-abhängige Unterschied im Alamar Blue Assay ist nicht groß, aber statistisch signifikant ($0,07 \pm 0,02$).

Der Neutralrot Assay basiert auf der nichtionischen, passiven Diffusion des leicht kationischen Farbstoffs durch die Zellmembran und das Binden des Farbstoffs an den anionischen Gruppen der Lysosomen (Nemes *et al.*, 1979; Winckler, 1974; Repetto *et al.*, 2008). Während WRN-*kd* EA.hy926 Zellen eine verminderte Anlagerung von Neutralrot zeigen, was auf einen vermehrten Zelltod hindeuten kann, ist die Neutralrot-Aufnahme in HUVEC WRN-unabhängig (Abbildung 3-3C). Diese Abweichungen (ebenfalls im Alamar Blue Assay) zwischen beiden Endothelzelltypen sind möglicherweise durch zellspezifische Unterschiede und/oder durch eine unterschiedliche WRN-*kd* Effizienzen zu erklären.

Der LDH Assay beruht auf der enzymatischen Umsetzung eines Farbstoffs im Medium durch die Freisetzung der intrazellulären Lactatdehydrogenase (LDH) von Zellen mit beschädigter Plasmamembran (Fotakis und Timbrell, 2006). In beiden Endothelzelltypen ist kein Unterschied zwischen WRN-*kd* Zellen und deren Kontrollen zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass eine Reduktion des WRN-Gehalts in den untersuchten Zellen nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität führt (Abbildung 3-3D). Für die fortführenden Versuche bedeutet dies, dass ein verminderter WRN-Gehalt keine allgemeine Toxizität hervorruft und somit die möglichen Effekte auf Endothelzellfunktionen spezifisch sind.

4.1.2 Modulation endothelzellspezifischer Funktionen in Abhängigkeit von WRN

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von WRN auf die Ca^{2+} -Freisetzung, acLDL Aufnahme, Permeabilität, Zell-Zell Adhäsion und endotheliale Zellmigration erörtert. Dabei handelt es sich u. a. um Funktionen, deren Deregulierung zur Atherogenese beiträgt.

Zunächst wurde der Einfluss von WRN auf die Reaktionsfähigkeit des G-Protein-gekoppelten purinergen P2Y-Rezeptors (P2YR) untersucht, indem die Freisetzung intrazellulärer Calcium-Ionen nach ATP-Stimulation gemessen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass WRN-*kd* HUVEC mehr Ca^{2+} -Ionen freisetzen als WRN-profiziente HUVEC, was darauf hindeutet, dass WRN die Freisetzung von Calcium-Ionen reguliert und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen gering hält (Abbildung 3-4A). Welchen Mechanismen dies zugrunde liegen könnte, ist in der Literatur ansatzweise beschrieben. In WRN-defizienten Maushepatozyten war *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha* (HIF-1 α), welches die Genexpression von P2Y₂R stimuliert, aktiviert und stabilisiert (Kraus *et al.*, 2016; Labbé *et al.*, 2012). Dies könnte eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung erklären. Ca^{2+} ist ein *second messenger*, der die Permeabilität und die Zell-Zell Adhäsion erhöht (Tiruppathi *et al.*, 2002; Seye *et al.*, 2003). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors durch die Stimulation mit ATP und UTP die Expression des vaskulären Adhäsionsmolekül 1 (VCAM1) humaner koronarer, arterieller Endothelzellen

induziert (*human coronary artery endothelial cells*, HCAEC) und die Adhäsion von Monozyten an diesen Zellen stimuliert (Seye *et al.*, 2003; Seye *et al.*, 2004). Eine Studie mit Atherosklerose-sensitiven (*atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient*, ApoE^{-/-}) Mäusen zeigt, dass die Plaquebildung und die Makrophageninfiltration, bei vorliegender P2Y₂R-Defizienz, vermindert ist (Chen *et al.*, 2017). Die erhöhte Ca²⁺-Freisetzung in WRN-*kd* HUVEC könnte auch in der vorliegenden Arbeit zu einer erhöhten Zell-Zell Adhäsion (Abbildung 3-6A), einer vermehrten mRNA-Expression von *Vcam1* (Abbildung 3-10A) sowie einer erhöhten Permeabilität (Abbildung 3-5) geführt haben. In WRN-*kd* EA.hy926 Zellen ist die Freisetzung von Ca²⁺ im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abbildung 3-4A). Die abweichenden Ergebnisse von EA.hy926 Zellen und HUVEC sind womöglich auf zelltypabhängige Unterschiede zurückzuführen, da es sich bei HUVEC um Primärzellen und bei EA.hy926 Zellen um eine Hybridzelllinie (HUVEC und A549) handelt. Des Weiteren zeigen WRN-*kd* EA.hy926 Zellen, anders als WRN-*kd* HUVEC keine induzierte Zell-Zell Adhäsion (Abbildung 3-6A), keine erhöhte mRNA-Expression von *Vcam1* (Abbildung 3-10A) und keine Hyperpermeabilität (Abbildung 3-5).

Die Aktivierung der proinflammatorischen Signalkaskade, ausgelöst durch die Bindung von oxLDL an *Scavenger* Rezeptoren (SR), trägt wesentlich zur Pathogenese der Atherosklerose bei und ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Boullier *et al.*, 2001; Kzhyshkowska *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 1997b; Whitman *et al.*, 2002). Die Aufnahme von acLDL in WRN-*kd* Zellen ist in der vorliegenden Arbeit tendenziell, jedoch nicht signifikant, vermindert (Abbildung 3-4B). Aus einer Studie von Cogger *et al.* aus dem Jahr 2014 ergaben sich Hinweise auf die transkriptionelle Regulation von SR durch WRN. Mikroarray-Analysen zeigten, dass der makrophagenspezifische SR MSR1 (Klasse A) in Leber-sinusoidalen Endothelzellen WRN-Helikase mutierter Mäuse (WRN^{Δhel/Δhel}) hochreguliert war (Cogger *et al.*, 2014). Dies stellt aufgrund der durchgeführten *in vivo* Untersuchungen (Cogger *et al.*, 2014) keinen direkten Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen *in vitro* Daten dar. Ein weiterer Grund für die unveränderte Aufnahme von acLDL in WRN-*kd* Zellen im Vergleich zu WRN-Wildtyp (Wt)-Zellen könnte der Schwellenwert der WRN-Menge sein, der mit dem *kd* nicht erreicht wurde. In fortführenden Versuchen könnte eine Gen- und Proteinexpressionsanalyse ausgewählter endothelzellspezifischer SR klären, ob WRN einen Effekt auf die Gen- und Proteinexpression dieser Rezeptoren hat und infolgedessen inflammatorische und atherosklerotische Prozesse modelliert.

Ein weiteres Entzündungsmerkmal ist die Hyperpermeabilität des Endotheliums, die es immunkompetenten Zellen ermöglicht, aus dem Blutkreislauf ins Interstitium zu gelangen. Die Untersuchung von EA.hy926 Zellen hinsichtlich der Modellierung ihrer Permeabilität in Abhängigkeit von WRN oder nach TNFα-Behandlung ergibt keine Veränderung (Abbildung 3-5A). Da es sich bei EA.hy926 Zellen um eine Fusionszelllinie handelt und die Regulation der

Permeabilität endothelzellspezifisch ist, bleibt unklar, ob EA.hy926 Zellen für die Untersuchung dieses Endpunktes geeignet sind. Die Freisetzung von Ca^{2+} führt zum Abbau von Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) und resultiert somit in einer erhöhten Permeabilität (Tirupathi *et al.*, 2002). Demzufolge könnte eine fehlende Responsivität bzgl. der Ca^{2+} -Freisetzung nach Rezeptorstimulation in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen eine Hyperpermeabilität verhindern oder zumindest abschwächen. Aus dem Versuch mit HUVEC resultiert eine erhöhte Permeabilität, sowohl nach TNF α -Behandlung als auch in WRN-*kd* HUVEC. Daraus kann geschlossen werden, dass WRN für die Stabilität der endothelialen Barriere von Bedeutung ist. In Anwesenheit von WRN hat TNF α einen ähnlich starken Effekt auf die Permeabilität wie in WRN-*kd* HUVEC. Möglicherweise führen TNF α und WRN-*kd* durch den gleichen Aktivierungsweg zu einer erhöhten Permeabilität. Eine Studie von Hofmann *et al.* zeigt, dass TNF α die Genexpression von VE-Cadherin herunterreguliert (Hofmann *et al.*, 2002). VE-Cadherin (CDH5) stellt eine Schlüsselkomponente der Adhäsionsverbindungen dar und ist für den Aufbau von Zell-Zell Verbindung elementar (Crosby *et al.*, 2005). In dieser Arbeit ist die Genexpression von *Cdh5* (VE-Cadherin) in HUVEC mit vermindertem WRN-Gehalt im Vergleich zum Wt nicht beeinflusst (Abbildung 3-9B). Auch auf Proteinebene ist CDH5 in Zellen mit vermindertem WRN-Gehalt im Vergleich zu WRN-profizienten Kontrollzellen unverändert (Abbildung 3-9C). Daraus lässt sich zunächst schließen, dass die VE-Cadherin-Expression nicht der Grund für die erhöhte Permeabilität in Abwesenheit von WRN ist. In fortführenden Analysen könnte untersucht werden, ob eine Modellierung von Adhäsionsverbindungen der Grund für die erhöhte Permeabilität in HUVEC ist, indem eine Untersuchung die Phosphorylierung von VE-Cadherin an Serin S665 oder an einem Tyrosin-Rest (u. a. Y645, Y658, Y685, Y731) zeigt (Gavard und Gutkind, 2006; Wallez *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2005; Esser *et al.*, 1998; Eliceiri *et al.*, 1999). Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, wie sie bei WRN-*kd* HUVEC nach Stimulation mit ATP gemessen wurden (Abbildung 3-4A), vermitteln ebenfalls den Abbau von VE-Cadherin in Adhäsionsverbindungen (Sandoval *et al.*, 2001). In dieser Arbeit ist das Haupt-Intermediärfilament Vimentin weder auf Gen- noch auf Proteinebene in WRN-*kd* HUVEC im Vergleich zu Wt HUVEC verändert exprimiert (Abbildungen 3-9B und 3-9C). In der Literatur ist beschrieben, dass eine Phosphorylierung von Vimentin zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führt (Liu *et al.*, 2014). Demzufolge wäre es künftig interessant, auch hier zu untersuchen, ob Vimentin in WRN-*kd* Zellen vermehrt phosphoryliert ist.

Bei einer Entzündung kommt es zu einer erhöhten Adhäsion von Immunzellen an der Gefäßwand, die durch die Expression von Adhäsionsmolekülen vermittelt wird. Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Zell-Zell Adhäsion in WRN-*kd* HUVEC erhöht ist (Abbildung 3-6A), was darauf hindeutet, dass WRN für die Aufrechterhaltung der anti-adhäsiven Eigenschaften von HUVEC unter physiologischen Bedingungen von

Bedeutung ist. Nach Behandlung von HUVEC mit TNF α ist die Zell-Zell Adhäsion WRN-unabhängig erhöht (Abbildung 3-6A). Die Ergebnisse der Behandlung von HUVEC mit TNF α stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus der Literatur (Wang *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2015). TNF α stimuliert die transkriptionelle Expression von Adhäsionsmolekülen (*Icam1*, *Vcam1*) in Endothelzellen, was eine vermehrte Zell-Zell Adhäsion zur Folge hat (Wang *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2015). In Abwesenheit von WRN wurde vor allem in HUVEC eine Induktion der mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen, was die erhöhte Zell-Zell Adhäsion dieser Zellen erklären könnte (Abbildungen 3-6A und 3-10A). In WRN-*kd* HUVEC ist die Proteinexpression von ICAM1 ebenfalls deutlich stärker induziert als in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-10B). In der Literatur ist der Vergleich zwischen den primären HUVEC und der EA.hy926 Zelllinie hinsichtlich der Antwort auf Zytokine und der Expression von endothelzellspezifischen, immunrelevanten Molekülen mehrfach beschrieben (Thornhill *et al.*, 1993; Baranska *et al.*, 2005). Resultate proteomischer Analysen ergaben, dass EA.hy926 Zellen im Vergleich zu HUVEC einige, aber nicht alle, endothelzellspezifischen Proteine exprimieren und EA.hy926 Zellen darüber hinaus Proteine exprimieren, die A549-spezifisch sind (Lu *et al.*, 2009; Thornhill *et al.*, 1993; Baranska *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit ist die mRNA-Expression von *Vcam1* in WRN-*kd* HUVEC stark erhöht, während es in EA.hy926 Zellen zu keiner Induktion der Genexpression kommt (Abbildung 3-10A). Dieser Effekt wurde ebenfalls in der Literatur nach Behandlung mit TNF α beschrieben (Lidington *et al.*, 1999). Eine wenig bzw. nicht induzierte Expression von *Icam1* bzw. *Vcam1* in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen schwächt möglicherweise den Effekt auf die Zell-Zell Adhäsion ab (Abbildung 3-6A). Weiterhin wurde die Zell-Zell Adhäsion in Abhängigkeit von WRN untersucht, indem die Helikase-Aktivität in WRN-profizienten Zellen durch den Inhibitor NSC617145 spezifisch gehemmt wurde (Moles *et al.*, 2016; Aggarwal *et al.*, 2013). Die Auswertung der Analysen ergab, dass die Zell-Zell Adhäsion unabhängig von der katalytischen Aktivität der WRN-Helikase ist (Abbildung 3-6B). Wie bereits zuvor beschrieben (Abschnitt 1.1.1), besteht WRN aus verschiedenen funktionellen Domänen. Über seine HRDC Domäne interagiert WRN mit anderen Proteinen (Hu *et al.*, 2005; Kitano *et al.*, 2007; Samanta *et al.* 2012; Lan *et al.* 2005). Möglicherweise interagiert WRN über diese Domäne mit Faktoren, die die Zell-Zell Adhäsion modellieren.

Endotheliale Zellmigration ist ein wichtiger Prozess der Angiogenese während einer Inflammation oder der Reparatur von Gefäßen nach Verletzung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein sogenannter „Wundheilungsversuch“ durchgeführt, der eine Gefäßverletzung *in vitro* nachbilden soll. Im Versuch ist die endotheliale Migration von WRN-*kd* Zellen beider Endothelzelltypen gehemmt, wobei der Effekt in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen deutlicher ist (Abbildung 3-7A). Der inhibitorische Effekt, verursacht durch geringere WRN-Mengen, ist nach 24 h noch immer sichtbar, was die Stärke der Hemmung unterstreicht (Abbildung 3-7C), wobei

zu diesem späteren Zeitpunkt nicht mehr zwischen Migration und Proliferation unterschieden werden kann. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass WRN die Fähigkeit von Endothelzellen zu migrieren unterstützt. Gestützt werden diese Ergebnisse durch die Resultate einer Analyse mit Fibroblasten, die aus Patienten mit Werner-Syndrom isoliert wurden (Nyunoya *et al.*, 2009). Durch eine Überexpression von WRN verbesserte sich die zuvor verminderte Migrationsgeschwindigkeit WRN-defizienter Zellen (Nyunoya *et al.*, 2009). Die Mechanismen, die der Migrations-unterstützenden Funktion von WRN zugrunde liegen, sind nicht bekannt. Die Resultate der Analyse einer pharmakologischen Hemmung von WRN mit Hilfe des Inhibitors NSC617145 führen zu einem Helikase-unabhängigen Ergebnis (Abbildung 3-7B). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass WRN über eine andere Domäne, wie beispielsweise die HRDC Protein-Protein Interaktionsdomäne, Einfluss auf die Migration nimmt.

Endotheliale Zellmigration benötigt Energie. Anhand der Messung des intrazellulären ATP-Gehalts zeigt sich, dass der mitochondriale Energiemetabolismus von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant beeinflusst ist (Abbildung 3-7D). Demnach ist der Effekt eines WRN-*kd* auf die Migration nicht durch einen verminderten ATP-Gehalt zu begründen.

Um sicherzustellen, dass die Zellen im „Wundheilungsversuch“ nicht in den Spalt proliferieren, sondern migrieren, wurde der Mitose-Index dieser Zellen im Vergleich zu subkonfluenten Zellen untersucht. Aus der Bestimmung der mitotischen Indizes geht hervor, dass es sich bei den im Migrationsversuch verwendeten Zellen, im Vergleich zu subkonfluenten Kontrollzellen, um nicht proliferierende Zellen handelt (Abbildung 3-8). Des Weiteren wurde der Zeitraum (0-8 h Migrationszeit) zur Untersuchung der Spaltschließung so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Proliferation minimiert wurde. Daraus resultiert, dass die Spaltschließung im Migrationsversuch durch Migration und nicht durch Proliferation geschlossen wurde.

Adhäsionsverbindungen regulieren nicht nur die vaskuläre Permeabilität. Sie stellen durch Zell-Zell Kontakte ebenfalls sicher, dass Folgezellen mit den Pionierzellen mitmigrieren. Wie schon zuvor erörtert, ist in HUVEC weder VE-Cadherin noch Vimentin auf mRNA- oder Proteinebene WRN-abhängig reguliert (Abbildungen 3-9B und 3-9C). Auf den Daten basierend, scheint die Proteinexpression von VE-Cadherin und Vimentin nicht der Grund für die verlangsamte Migration zu sein.

Auffällig sind die Unterschiede in der Morphologie migrierender WRN-*kd* und WRN-nativer Zellen, die vorwiegend nach der Färbung des F-Aktins mit FITC-gekoppeltem Phalloidin erkennbar wurden. Während WRN-profiziente Zellen fächerförmige, kurze Lamellipodien ausbilden, sind die Lamellipodien von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen länglich und schmal (Abbildung 3-9A). Die Ergebnisse des Versuchs zeigen, dass in Abwesenheit von WRN eine Polarisierung und Protusionsbildung möglich ist, die Migration jedoch stark beeinträchtigt ist.

Dabei scheint WRN direkt oder indirekt auf die Form der Protrusionen Einfluss zu nehmen. Ein Grund hierfür könnten Modifikationen bei der Bildung von Aktin-Filamenten sein. An der Aktin-Nukleation sind verschiedene Faktoren beteiligt. Durch den Arp2/3 Komplex werden vermehrt verzweigte Aktin-Filamente gebildet, während durch Formin lange, unverzweigte Aktin-Filamente polymerisiert werden (Yang *et al.*, 2007; Dayel und Mullins, 2004; Rose *et al.*, 2005; Higashi *et al.*, 2008). Eine Aktivierung dieser Faktoren durch WRN und eine daraus resultierende Einflussnahme von WRN auf die Morphologie der Lamellipodien wäre möglich. Demnach wären in Abwesenheit von WRN vermehrt Formin oder VASP Proteine an der Aktin Nukleation beteiligt, während die Aktin-Filamente WRN-profizienter Zellen vermehrt durch Arp2/3 Komplexe gebildet werden würden. Dies könnte in fortführenden Studien untersucht werden.

Die endotheliale Zellmigration ist ein komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist, die u. a. Zell-Zell Kontakte sowie Zell-Substrat Kontakte und die Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts regulieren und kontrollieren. Um die gehemmte Migration von Zellen mit reduziertem WRN-Gehalt näher zu untersuchen, wurde die Expression einiger migrations-assoziierten Faktoren analysiert (Abbildungen 3-9B und 3-9C). Daraus ergibt sich, dass WRN selektiv auf die mRNA- und Proteinexpression verschiedener Faktoren Einfluss nimmt. So führt die Abwesenheit von WRN zu einem verminderten RAC1- und PTK2-Proteingehalt, während RHOA nicht beeinflusst ist (Abbildung 3-9C). Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass WRN die endotheliale Zellmigration durch seine Interaktion mit RAC1- und PTK2-assoziierten Mechanismen unterstützt. RHOA wird durch RAC1 aktiviert, was zu einer Myosin II-vermittelten Retraktion des hinteren Teils der Zelle führt (Pestonjamasp *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2004). Dies könnte in der vorliegenden Arbeit auf eine verminderte Aktivierung von RHOA durch reduzierte RAC1-Proteinmengen in WRN-*kd* Endothelzellen hindeuten. Durch eine geringere Aktivierung von RHOA käme es zu einer eingeschränkten Myosin II-vermittelten Retraktion der Zelle, wodurch die Migrationsfähigkeit der WRN-*kd* Endothelzelle vermindert wäre. Somit würde WRN die Migration durch Regulation der RAC1-Expression unterstützen. Da der Proteingehalt von RHOA weder in HUVEC noch in EA.hy926 Zellen beeinflusst ist, hat dieser vermutlich keinen entscheidenden Einfluss auf den Migrationseffekt. Eine wichtigere Rolle spielt möglicherweise die Aktivierung von RHOA. PTK2 ist eine weitere Schlüsselkomponente der endothelialen Zellmigration. Eine aktuelle Studie zeigt, dass die Hemmung von PTK2 durch den Inhibitor Y15 die Migration von EA.hy926 Zellen konzentrationsabhängig hemmt (Yu *et al.*, 2018). Dabei hemmt Y15 die Y397 Autophosphorylierung von PTK2 und verhindert somit dessen Aktivierung. Des Weiteren zeigte die Studie eine zeitabhängige Herunterregulierung von RAC1 und RHOA auf Proteinebene durch den PTK2 Inhibitor. Die Studie von Yu *et al.* zeigte ausserdem, dass die Proteinmengen von RHOA nach 120 min wieder anstiegen, während die RAC1

Proteinkonzentration nach 60 und 120 min vermindert war (Yu *et al.*, 2018). Übertragen auf die Ergebnisse dieser Arbeit könnte dies bedeuten, dass eine verminderte PTK2-Proteinmenge zu einer verminderten Expression von RAC1 führt, was zu einer Verlangsamung der Migration beiträgt. Unklar bleibt jedoch, wie es durch die verminderte Expression von WRN zu einem geringeren Proteingehalt von PTK2 kommt.

4.1.3 WRN-abhängige Induktion der Expression von endothelzellspezifischen Faktoren

Der Einfluss von WRN auf die Genexpression einiger wichtiger endothelzellspezifischer Faktoren wurde in EA.hy926 Zellen und HUVEC untersucht. Des Weiteren wurde selektiv für einige dieser Faktoren eine Proteinexpressionsanalyse durchgeführt. Die Expression der Zell-Zell Adhäsionsmoleküle *Icam1*, *Vcam1* und *Sele* wurde bereits zuvor im Rahmen der Zell-Zell Adhäsionsversuche diskutiert. An dieser Stelle soll die Expression von *Nos3*, *Nos2*, *Ccl2*, *Plat*, *Edn1* und *Kdr* in Abhängigkeit von WRN erörtert werden (Abbildung 3-10).

Die Synthese von Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) ist eine wichtige Eigenschaft des Endothels, deren Deregulierung zur Entstehung von endothelialen Dysfunktionen führt. In Endothelzellen existieren zwei Isoformen von NOS, die konstitutiv exprimierte endotheliale NOS (NOS3) und die induzierbare NOS (NOS2). Unabhängig vom betrachteten Zelltyp ist weder die mRNA-Expression von *Nos3* noch die von *Nos2* WRN-abhängig reguliert, was für NOS3 ebenfalls auf Proteinebene der Fall ist. Möglicherweise sind proatherosklerotische Mechanismen in Abwesenheit von WRN daher nicht auf die Deregulierung der Expression von *Nos2* oder *Nos3* zurückzuführen. Während die Produktion von NO durch NOS2, die vor allem nach bakteriellen Infektionen aktiviert wird, weitestgehend von der transkriptionellen Expression des *Nos2* Gens abhängt, wird NOS3 vorwiegend post-translational reguliert. Die Expression von *Nos3* ist konstitutiv und für die Modulation des Gefäßtonus verantwortlich. Die Bildung von *Nos3* kann allerdings durch Scherstress und erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen induziert werden (Ziegler *et al.*, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben keinen Hinweis auf eine Modifikation der Expression von NOS3 durch WRN. Die Phosphorylierung von NOS3 am Y495 führt zur Inaktivierung des Proteins und kommt vermehrt in gealterten Endothelzellen vor, wohingegen die Phosphorylierung am Y1177 eine Aktivierung von NOS3 zur Folge hat (Yoon *et al.*, 2010). Letztere wurde vermehrt in HUVEC niedriger Passage gefunden und nahm in älteren HUVEC ab. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass HUVEC einer höheren Passage im Vergleich zu einer geringeren Passage weniger NO produzieren (Yoon *et al.*, 2010). Da ein Verlust von WRN zu einem vorzeitig alternden Phänotyp führt, ist denkbar, dass in WRN-*kd* Endothelzellen NOS3 nicht auf transkriptioneller Ebene sondern post-translational (Phosphorylierung) reguliert wird. Dies ist spekulativ und muss durch entsprechende Analysen

(z. B. mit Hilfe eines Y495 phosphospezifischen NOS3 Antikörpers) bestätigt werden. Die Genexpression von *Ccl2* ist in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC hochreguliert (Abbildung 3-10A). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten einer Studie überein, in der die Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine von 35 Werner-Syndrom Patienten untersucht wurde (Goto *et al.*, 2015). CCL2 induziert die Permeabilität des Endotheliums (Stamatovic *et al.*, 2003). Ist die CCL2-Proteinexpression ebenfalls erhöht, könnte dies in WRN-*kd* HUVEC neben anderen Faktoren zur erhöhten Permeabilität der HUVEC Ein-Zell-Schicht beigetragen haben (Abbildung 3-5), was allerdings in entsprechenden Analysen untersucht werden müsste. Die mRNA-Expression von *Plat* ist in HUVEC und in EA.hy926 Zellen induziert (Abbildung 3-10A). Untersuchungsergebnisse von Blann und Lupu zeigten, dass die PLAT-Konzentration in atherosklerotischem Gewebe ebenfalls erhöht ist (Blann *et al.*, 1995; Lupu *et al.*, 1995). Es ist bisher nicht bekannt, welche WRN-abhängigen Mechanismen die mRNA-Expression von *Ccl2* und *Plat* regulieren. Die Expression von EDN1 ist auf Proteinebene leicht induziert. Eine vermehrte Expression von EDN1 kann zu erhöhten ROS-Mengen führen und ist ein Charakteristikum von atherosklerotischen Endothelzellen (Kapitel 1.5.1). Daher könnte die leichte Induktion von EDN1 in WRN-*kd* Endothelzellen ein Anzeichen für eine endotheliale Dysfunktion sein.

4.1.4 Einfluss von WRN auf die Seneszenz

Aufgrund der Akkumulation chromosomaler Aberrationen und dem Verlust von Telomeren weisen Werner-Syndrom Zellen eine erhöhte genomische Instabilität auf (Crabbe *et al.*, 2007). Werner-Syndrom Fibroblasten haben eine verminderte Lebensspanne, da sie die Proliferation früher stoppen als normale Fibroblasten. Des Weiteren proliferieren sie langsamer (Tahara *et al.*, 1997; Crabbe *et al.*, 2007; Faragher *et al.*, 1993) und reagieren sensitiver auf Noxen (de Magalhaes *et al.*, 2004). Daraus resultiert eine frühe replikative Seneszenz. Erhöhte intrazelluläre ROS-Mengen können ebenfalls Seneszenz hervorrufen. Seneszenz und Telomer-Verkürzung wurden in Endothelzellen arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen (Minamino *et al.*, 2002). Daran anlehnend wurden in dieser Arbeit native und im WRN-Gehalt modifizierte EA.hy926 Zellen und HUVEC hinsichtlich ihrer Seneszenz untersucht.

Aus den Untersuchungen resultieren keine signifikanten Unterschiede der lysosomalen seneszenzassoziierten β -Galactosidase (SA- β G) -Aktivität zwischen WRN-*kd* und WRN-profizienten Zellen (Abbildung 3-11A). Die Umsetzung des Substrats durch eine erhöhte SA- β G-Aktivität steigt 96 h bzw. 120 h nach Transfektion vor allem in EA.hy926 Zellen an. Primäre HUVEC sind Endothelzellen, die sich im konfluenten Zellverband „ruhend“ verhalten und vorwiegend nach Verletzung des Gewebes proliferieren. Dies könnte ein Grund für die schwache Induktion der SA- β G-Aktivität in HUVEC sein. Im Gegensatz dazu weist die EA.hy926 Hybridzelllinie Charakteristika der stark proliferierenden Krebszelllinie A549 auf.

Durch Veränderungen der Lysosomen kann es zu falsch positiven Ergebnissen bei der Analyse der SA- β G-Aktivität kommen (Yang und Hu, 2005). Ein direkter Einfluss von WRN auf Lysosomen ist zum bisherigen Zeitpunkt noch nicht in der Literatur beschrieben.

Morphologisch betrachtet erscheinen seneszente Zellen häufig groß und flächig oder spindelförmig. Außerdem können seneszente Zellen vielkernig sein (Coleman *et al.*, 2010). Übereinstimmend mit den Ergebnissen des SA- β G Versuchs weisen die untersuchten Endothelzellen basal keinen WRN-abhängigen Effekt bezüglich einer Seneszenzassoziierten Morphologie auf. Nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung in EA.hy926 Zellen zeigt sich ein Effekt auf die Morphologie, der in WRN-*kd* Zellen signifikant erhöht war, was bedeutet, dass WRN-*kd* EA.hy926 Zellen sensitiver auf Bestrahlung reagieren (Abbildungen 3-11B und 3-11C). Auch nach Bestrahlung zeigen EA.hy926 Zellen eine stärkere Responsivität als HUVEC, was womöglich ebenfalls darauf zurückzuführen ist, dass es sich bei EA.hy926 Zellen um eine Fusionszelllinie von HUVEC mit einer stark proliferierenden Krebszelllinie handelt.

An der Entwicklung der Seneszenz können verschiedene Signalwege beteiligt sein. Daher ist es nicht ausreichend, die Seneszenz mit nur einem Marker zu analysieren. Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Expression von Zellzyklus-Arrest-Proteinen, wie p16^{INK4A} und p21^{CIP1}, als Marker für Seneszenz (Stein *et al.*, 1999; Vogt *et al.*, 1998), induziert war. Die Analysen ergeben eine erhöhte Proteinexpression von p16 in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-12). Dies wurde ebenfalls in einer Studie aus dem Jahr 2018 in WRN-defizienten embryonalen Mausfibroblasten auf Proteinebene nachgewiesen (Si *et al.*, 2018). In dieser Arbeit ist p16 in WRN-*kd* HUVEC nicht induziert. Die Analyse von p21 ergibt eine Hochregulation des Proteins vor allem in EA.hy926 Zellen und geringfügig in HUVEC. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich unter basalen Bedingungen, vor allem in WRN-*kd* HUVEC, nicht um eine vermehrte replikative Seneszenz im Vergleich zum Wt handelt.

Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Endothelzellfunktionen sind in WRN-*kd* Endothelzellen dereguliert, was die Entstehung und Progression einer Atherosklerose begünstigen könnte (Abbildung 4-1). Dazu zählen eine erhöhte Ca²⁺-Freisetzung, Permeabilität und Zell-Zell Adhäsion. Zudem kommt es in WRN-*kd* Endothelzellen selektiv zur Induktion der Genexpression inflammationsassoziiierter Faktoren (*Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Ccl2*). Aus den Migrationsanalysen mit WRN-*kd* Zellen resultiert eine starke Inhibition der endothelialen Zellmigration, die vermutlich durch PTK2 und RAC1 vermittelt wird. Während Wt EA.hy926 Zellen eher kurze und breite Protrusionen ausbilden, ist die Form der Protrusionen WRN reduzierter EA.hy926 Zellen auffällig länglich. Die Aufnahme von modifiziertem LDL ist durch WRN nicht beeinflusst. Die Genexpression von *Nos2* und *Nos3* ist ebenfalls WRN-unabhängig. Aus den Untersuchungen geht ein inflammationsassoziiertes Gesamtbild hervor, welches zumindest teilweise auf eine NF- κ B-abhängige Aktivierung der Transkription

proinflammatorischer Gene zurückzuführen sein könnte, da beispielsweise Adhäsionsmoleküle durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B exprimiert werden (Collins *et al.*, 1995; Ledebur und Parks, 1995). Diese Vermutung wird durch eine Untersuchung an humanen embryonalen Nierenzellen und Epithelzellen unterstützt (Mizutani *et al.*, 2015). Die Studie zeigte, dass WRN sowohl mit der p65 Untereinheit als auch mit der p50 Untereinheit von NF- κ B interagiert (Mizutani *et al.*, 2015). Eine weitere Studie zeigte, dass ein WRN-*kd* in Fibroblasten zu einer Modifizierung der NF- κ B- und IL6-Signalwege führt (Turaga *et al.*, 2009).

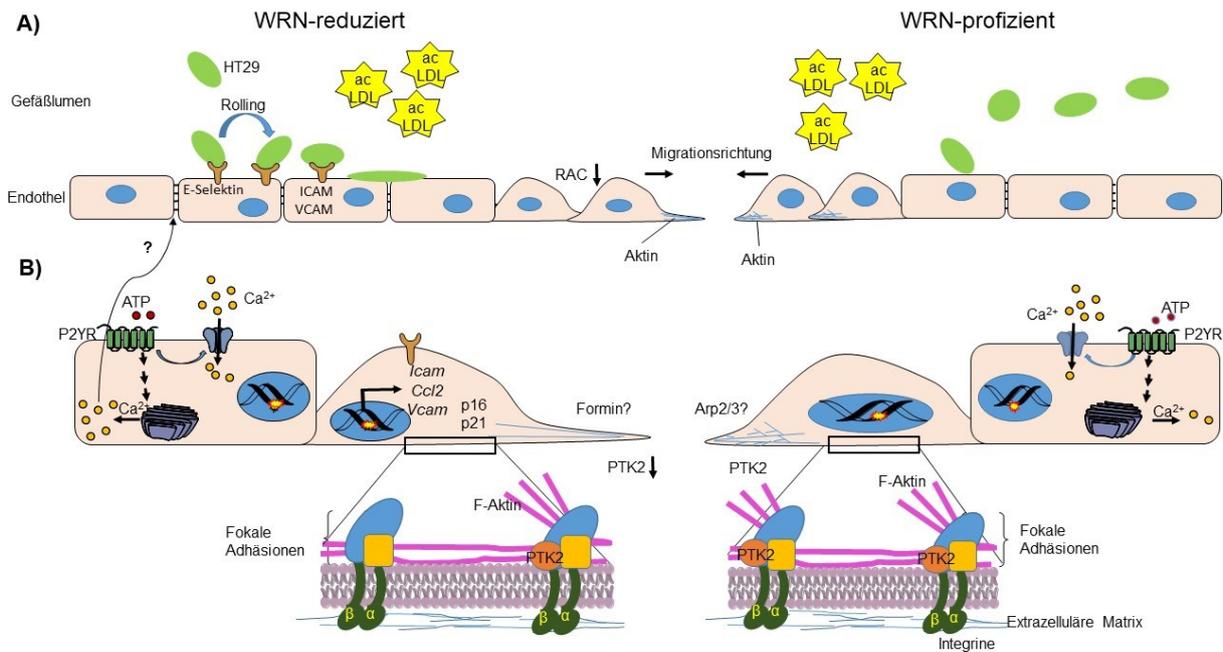


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des postulierten Einflusses von WRN auf Endothelfunktionen.

A) WRN-*kd* Endothelzellen zeigen im Vergleich zu profizienten Kontrollzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsfaktoren (*Sele*, *Icam1*, *Vcam1*) und eine erhöhte Zell-Zell Adhäsion. Der WRN-*kd* hat einen hemmenden Effekt auf die Migration sowie B) eine verminderte Expression von PTK2 zur Folge. Morphologisch weisen WRN-*kd* Zellen eine längliche Form der Lamellipodien auf, die möglicherweise einer veränderten Aktin Nukleation zugrunde liegt. In WRN-*kd* Zellen wurde durch die Stimulation mit ATP mehr Ca^{2+} freigesetzt und A) die Permeabilität ist im Vergleich zu WRN-profizienten Zellen erhöht. Arp2/3: *actin related proteins 2/3*; ATP: Adenosintriphosphat; Ca^{2+} : Calcium-Ionen; *Ccl2*: Cystein-Cystein Chemokinligand 2; *Icam*: interzelluläres Adhäsionsmolekül F-Aktin: filamentöses Aktin; PTK2: Protein Tyrosinkinase 2; P2YR: purinergere Rezeptor; RAC: Rac family small GTPase 1; *Vcam*: vaskuläres Adhäsionsmolekül; WRN: Werner-Syndrom Protein.

Die Expression inflammationsassoziiierter Proteine könnte auch aus einer Überaktivierung von PARP1 resultieren. Aus einer Studie geht hervor, dass es in WRN-defizienten U2OS zu einer Überaktivierung von PARP1 und erhöhten Bildung von PAR kommt (Gottipati *et al.*, 2010). PARP1 aktiviert NF- κ B, wodurch es zur Expression inflammatorischer Gene, wie Zytokinen und Adhäsionsmolekülen kommt (Ba und Garg, 2011; Infante *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit könnte eine Überaktivierung von PARP1 in Abwesenheit von WRN erklären, warum es in WRN-*kd* Zellen zu einer Aktivierung inflammationsassoziiierter Faktoren kommt. Die untersuchten WRN-*kd* Zellen zeigen Merkmale, bei denen es sich ebenfalls um postmitotische zelluläre Seneszenz (*post mitotic cellular senescence*, PoMiCs) handeln könnte (Sapieha und Mallette, 2018). Typische Merkmale von PoMiCs sind eine Stabilisierung von p53 (Abbildung

3-30) und die Induktion des p16 Signalweges (Abbildung 3-12), die bei WRN-*kd* Zellen in dieser Arbeit beobachtet wurden.

4.2 Einfluss einzelner Basenexzisionsreparaturfaktoren auf Endothelzellfunktionen

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) verursachen DNA-Läsionen, die durch die Basenexzisionsreparatur (BER) behoben werden. Dabei findet eine vielseitige Interaktion der beteiligten Faktoren statt, indem sie die Aktivität der anderen Faktoren stimulieren oder hemmen und dabei selbst stimuliert oder gehemmt werden. Kommt es zu einem Defekt der BER durch die Depletion eines beteiligten Faktors, kann die Reparatur nur unzureichend ausgeführt werden. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation von Basenschäden, die zur Apoptose oder Seneszenz der Zelle führen kann. Seneszenz ist ebenfalls ein Charakteristikum der Zellen atherosklerotischer Plaques (Minamino *et al.*, 2002). Die beobachteten Effekte eines WRN-*kd* auf die Endothelzellfunktionen könnten in Verbindung mit einer beeinträchtigten BER stehen. Inwieweit der *kd* eines BER-Faktors, die durch den WRN-*kd* hervorgerufene Modulation der Endothelzellfunktionen nachbildet oder, ob einzelne BER-Faktoren überhaupt Einfluss auf Endothelzellfunktionen nehmen, soll in diesem Abschnitt näher beleuchtet werden. Dazu wurden hauptsächlich Faktoren ausgewählt, die während der BER mit WRN interagieren (APE1, FEN1, NEIL1, PARP1). OGG1 stellt einen WRN-unabhängigen Faktor der BER dar. Der *kd* einzelner BER-Faktoren kann zur Akkumulation oxidativer Basenschäden führen, die teilweise zur Entstehung altersassoziierter Erkrankungen beitragen (Canugovi *et al.*, 2014a; Liu *et al.*, 2011). Ein Beispiel hierfür sind neurodegenerative Erkrankungen (Aliyev *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). Eine Reihe von Untersuchungen konnte die Beteiligung einzelner BER-Faktoren an der Entstehung dieser Erkrankungen nachweisen. So wurden in *post-mortem* Gehirnen von Patienten mit Alzheimer Erkrankung ein reduzierter NEIL1-Proteingehalt und eine geringere Aktivierung von NEIL1 nachgewiesen (Canugovi *et al.*, 2014a). Im Maus-Modell unterstützte NEIL1 die Erhaltung der Gedächtnisfunktionen nach Exposition mit oxidativem Stress (Canugovi *et al.*, 2014b). Eine Studie von Liu *et al.* zeigte, dass OGG1 murine Neuronen unter ischämischen Bedingungen vor oxidativen DNA-Schäden und Zelltod schützt. Die Akkumulation oxidativer DNA-Schäden in OGG-defizienten Mäusen war signifikant höher als in Wt-Mäusen (Liu *et al.*, 2011). BER-Faktoren haben ebenfalls Einfluss auf das vaskuläre System. So entwickelten Mäuse eine Hypertonie und eine reduzierte Vasodilatation, wenn die APE1-Proteinkonzentration vermindert war (Jeon *et al.*, 2004). Dies beruhte auf der Regulation des vaskulären Tonus durch die Aufrechterhaltung der eNOS-Aktivität durch APE1 im Maus-Modell (Jeon *et al.*, 2004). Eine Inhibition von PARP1 schützt vor altersassozierten endothelialen Dysfunktionen (Zhang *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2016).

4.2.1 *Knockdown*-Effizienz einzelner BER-Faktoren

Der *kd* der einzelnen BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 wurde mittels RNA-Interferenz erzielt. Dabei wurden unterschiedliche *kd* Effizienzen erreicht (Abbildung 3-13). Generell wurden für die EA.hy926 Zellen höhere *kd* Effizienzen erzielt als für die primären HUVEC.

4.2.2 Modulation der Zell-Zell Adhäsion, Migration und mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren durch *knockdown* einzelner BER-Faktoren

Ein *kd* von APE1 hat keinen Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion der hier verwendeten Endothelzellen (Abbildung 3-14). Dementsprechend sind die Adhäsionsmoleküle (*Icam1*, *Vcam1*, *Sele*) auf Genexpressionsebene nicht reguliert (Abbildung 3-16). Aus Ergebnissen von APE1-Überexpressionsanalysen in HUVEC aus dem Jahr 2006 resultierte eine anti-adhäsive Wirkung von APE1, da es die TNF α stimulierte Expression von VCAM1 auf Proteinebene abschwächte und die Adhäsion von Monozyten an HUVEC verminderte (Kim *et al.*, 2006). Im Umkehrschluss würde eine Reduktion des APE1-Proteingehalts zu einer verstärkten Zell-Zell Adhäsion und vermehrten VCAM1 Proteinexpression in HUVEC führen, was in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht der Fall war. Für HUVEC wurde ein APE1 hoher Restproteingehalt von 41 % detektiert, der dazu führen könnte, dass keine eindeutigeren Ergebnisse aus den Versuchen resultieren. In EA.hy926 Zellen und HUVEC hemmte der APE1-*kd* die Migration (Abbildung 3-15). Eine Studie von Jiang *et al.* bestätigt dieses Ergebnis. Die Inhibition der Migration von retinalen vaskulären Endothelzellen war hierbei von der Redoxfunktion von APE1 abhängig (Jiang *et al.*, 2011). Eine durch APE1-*kd* gehemmte Migration ist daher vermutlich nicht durch BER-abhängige Mechanismen reguliert, sondern auf die Redoxeigenschaften von APE1 und die damit verbundene Hemmung verschiedener Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. APE1 stimuliert die DNA-Bindungsaktivität von Redox-abhängigen Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP1 und HIF α (Bhattacharyya *et al.*, 2010; Ando *et al.*, 2008). Die mRNA-Expression von *Nos3*, *Ccl2* und *Kdr* ist durch einen APE1-*kd* nicht beeinflusst (Abbildung 3-16). Im Gegensatz zu einem WRN-*kd* werden durch reduzierte APE1-Mengen keine inflammationsassoziierten Mechanismen aktiviert, die für atherosklerotische Veränderungen charakteristisch sind. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen kann daher geschlossen werden, dass APE1, im Gegensatz zu WRN, keinen Einfluss auf die Entstehung einer Atherosklerose hat.

Mutationen des FEN1-Gens führen zur Hypersensitivität gegenüber genotoxischen Substanzen, zur Akkumulation von Mutationen und resultieren schließlich in einer genomischen Instabilität (Kucherlapati *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit hat der *kd* von FEN1 keinen Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion der untersuchten Endothelzellen (Abbildung 3-14). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Analyse der

transkriptionellen Expression von *Icam1*, *Vcam1* und *Sele*, da diese ebenfalls nicht induziert war (Abbildung 3-16). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden allerdings nicht durch die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse im Tiermodell unterstützt. Demnach wiesen FEN1 *knock-in* (E160D Fen1 Punktmutation, die die Nuklease-Aktivität hemmt) Mäuse inflammations-assoziierte Merkmale sowie eine vermehrte Akkumulation von Immunzellen auf (Zheng *et al.*, 2007). Die Differenzen sind womöglich in der Verwendung der verschiedenen Modelle (*in vivo* versus *in vitro*) zu begründen. FEN1-*kd* EA.hy926 Zellen migrieren schneller als Kontrollzellen, wohingegen FEN1-*kd* HUVEC bezüglich der Migration keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zeigen (Abbildung 3-15). Ein Grund hierfür könnte der hohe FEN1-Restgehalt in HUVEC von 59 % sein (Vergleich EA.hy926 Zellen: 25 % FEN1-Restproteingehalt). Der Schwellenwert, ab dem ein Effekt auf die Migration sichtbar wäre, wäre somit nicht erreicht. Die verbesserte Migration in FEN1-*kd* EA.hy926 Zellen zeigt, dass die beobachteten Effekte der WRN-assoziierten BER-Faktoren (APE1, NEIL1, PARP1) spezifisch sind. In der Literatur wird eine Deregulation von FEN1 vor allem mit der Entstehung und Progression von Tumoren in Verbindung gebracht (Zhang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2011; Kucherlapati *et al.*, 2002). Zellmigration ist ein Teil der Angiogenese, der unter pathophysiologischen Bedingungen den wachsenden Tumor mit Nährstoffen versorgt. Möglicherweise unterstützt die verstärkte endotheliale Zellmigration in FEN1 depletierten Endothelzellen die Tumorprogression.

Der *kd* von NEIL1 hat keinen Effekt auf die Zell-Zell Adhäsion und die mRNA-Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle (Abbildungen 3-14 und 3-16). Die mRNA-Expression der untersuchten endothelzellspezifischen Faktoren (*Nos3*, *Ccl2*, *Kdr*) ist ebenfalls nicht durch einen NEIL1-*kd* beeinflusst. Diese für die Entstehung einer Atherosklerose bedeutenden Prozesse sind unabhängig von NEIL1. Der NEIL1-*kd* hemmt die Migrationsgeschwindigkeit von EA.hy926 Zellen und HUVEC. Neben WRN interagiert auch NEIL1 *in vivo* und *in vitro* mit PARP1, indem NEIL1 die Parylierungsaktivität von PARP1 stimuliert (Noren Hooten *et al.*, 2012). Proteine von NEIL1-*kd* Zellen waren nach Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen weniger paryliert als die Proteine der NEIL1-profizienten Kontrollzellen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Parylierung durch NEIL1 in alten Mäusen vermindert war (Noren Hooten *et al.*, 2012). Die Parylierung von Proteinen durch PARP1 wird durch die Entstehung von DNA-Schäden aktiviert, wodurch DNA-Reparaturfaktoren zur Stelle des DNA-Schadens rekrutiert werden. Aus der verminderten Parylierung von Proteinen in NEIL1-*kd* Zellen könnte eine Akkumulation von DNA-Schäden resultieren. Neben der DNA-Glykosylase-Aktivität ist keine weitere Eigenschaft von NEIL1 bekannt. In dieser Arbeit könnte daher die Akkumulation von DNA-Schäden durch eine unzureichende DNA-Reparatur Grund für die inhibierte Migration sein oder aber die Beteiligung anderer unbekannter Proteine könnte zu dieser Funktionsstörung führen.

Ein PARP1-*kd* hat keinen Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion von EA.hy926 Zellen und HUVEC (Abbildung 3-14). Weder die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle noch die der endothelzellspezifischen Faktoren *Nos3*, *Ccl2* und *Kdr* sind durch einen PARP1-*kd* beeinflusst (Abbildung 3-16). Andere Ergebnisse resultierten aus einer Untersuchung von Atheroskleroseanfälligen Mäusen, deren PARP1 pharmakologisch inhibiert war oder die PARP1-defizient waren (von Lukowicz *et al.*, 2008). Hier war die Expression von VCAM1 und E-Selektin sowie NOS2 herunterreguliert (von Lukowicz *et al.*, 2008). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie und den Resultaten der vorliegenden Arbeit können durch die gewählten *in vivo* bzw. *in vitro* Modelle begründet sein. Die Anwesenheit von PARP1 unterstützt, ebenso wie WRN, die Migration sowohl in HUVEC als auch in EA.hy926 Zellen, was allerdings bei EA.hy926 Zellen nicht auf die enzymatische Aktivität von PARP1 zurückzuführen ist (Abbildung 3-16/Abbildung 3-15). Integrine vermitteln u. a. die Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix. Aufgrund einer verminderten mRNA- und Proteinexpression von Integrin α -L (CD34a), welches transkriptionell durch NF- κ B und PARP1 reguliert wird, waren PARP1-defiziente Mikroglia nicht in der Lage zu migrieren (Ullrich *et al.*, 2001). Demnach wäre eine verminderte Transkription von Integrinen auch in der vorliegenden Arbeit als ein möglicher Grund für die verlangsamte Migration von PARP1-*kd* Endothelzellen denkbar. In einer Studie von Zhang *et al.* wird eine Beteiligung von PARP1 an der Entstehung endothelialer Dysfunktion und der Manifestierung der Atherosklerose in der Maus beschrieben, die mit der Expression proinflammatorischer Faktoren einhergeht (Zhang *et al.*, 2015). Eine Depletion oder Inhibition von PARP1 verbesserte das Krankheitsbild, indem die Expression von Adhäsionsmolekülen und anderen inflammatorischen Faktoren vermindert war (Zhang *et al.*, 2015). Ein PARP1- sowie ein WRN-*kd* zeigen ähnliche inhibitorische Effekte auf die endotheliale Zellmigration, haben allerdings gegenteilige Effekte auf die Genexpression inflammationsassoziiierter Faktoren. Während eine PARP1-Inhibition als möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung von vaskulären Erkrankungen Gegenstand der heutigen Forschung ist, führt die Depletion von WRN zur Aktivierung inflammatorischer Gene (Turaga *et al.*, 2009).

Nach der Inkubation von Epithelzellen mit 8-oxo-dG, dem Substrat von OGG1 und Initiation der OGG1-induzierten BER wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, die zeigt, dass Cadherine, Zell-Zell Adhäsionsmoleküle und immunkompetente Moleküle *in vivo* hochreguliert werden (Aguilera-Aguirre *et al.*, 2015). In einer weiteren *in vivo* Studie führte eine Depletion von OGG1 zur verminderten transkriptionellen Aktivierung dieser Faktoren in Lungen-Epithelzellen (Ba *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu haben in der vorliegenden Arbeit verminderte OGG1-Proteinmengen in HUVEC eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle zur Folge (Abbildung 3-16). Ein möglicher Grund könnte hier wieder die *in vivo* Situation und die Untersuchung eines anderen Zelltyps (Epithelzellen) sein (Ba *et al.*, 2014).

Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen in OGG1-*kd* HUVEC steht im Einklang mit der im Zell-Zell Adhäsionsversuch beobachteten signifikant erhöhten Adhäsion von HT-29 Zellen an HUVEC (Abbildung 3-14). In HUVEC ist ebenfalls eine Induktion der Genexpression von *Ccl2* und *Kdr* zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass die Anwesenheit von OGG1 in den hier untersuchten Endothelzellen den inflammationsassoziierten Prozessen entgegen wirkt (Abbildung 3-16). In der vorliegenden Arbeit weisen OGG1-*kd* Zellen eine schnellere endotheliale Zellmigration auf als die profizienten Kontrollzellen (Abbildung 3-15). Eine Studie aus dem Jahr 2014 zeigt, dass die Bindung von OGG1 an sein Substrat 8-Oxo-dG in humanen Fibroblasten und Mauslungen zur Aktivierung der RHO-GTPasen führt und deren Expression erhöht (Luo *et al.*, 2014). Dies hat die Aktivierung der Polymerisation von Aktin und der Stressfaserbildung zur Folge, was für die Migration bedeutend ist (Luo *et al.*, 2014). RAC1 wird ebenfalls durch den 8-oxo-dG-OGG1 Komplex aktiviert (Hajas *et al.*, 2013). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass sich ein OGG-*kd* hemmend auf die Migration auswirken könnte.

Die Auswirkungen eines WRN-BER-Faktor-Doppel-*kd* auf die endotheliale Zellmigration von EA.hy926 Zellen wurde ebenfalls untersucht. Bei jedem untersuchten BER-Faktor resultierte eine Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit aus einem zusätzlichen *kd* von WRN. Vermutlich sind Mechanismen an der Modulation der Migration beteiligt, die unabhängig von der BER sind. Dabei kann es sich um eine für den jeweiligen BER-Faktor spezifische Aktivierung der Transkription von migrationsassoziierten Faktoren handeln (z. B. Redoxfunktion von APE1) oder um die Aktivierung von Proteinen durch BER-Faktoren, die an der Expression von migrationsmodellierenden Faktoren beteiligt sind. Auch Veränderungen der Aktivität oder post-translationale Regulation dieser Migrationsfaktoren sind denkbar.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen lässt sich Folgendes schließen: Die Anwesenheit von FEN1 und OGG1 hemmen die Migration, während APE1, NEIL1 und PARP1 (ebenso wie WRN) diese unterstützen (Abbildung 4-2). Dieser gegenteilige Effekt auf die Migration scheint nicht auf die klassische Rolle dieser Faktoren in der BER zurückgeführt werden zu können. Die DNA-Glykosylasen OGG1 und NEIL1 haben teilweise überlappende Substrataffinitäten innerhalb der BER, was die Hypothese des Einflusses nicht-kanonischer Funktionen auf die Migration unterstützt. Wie bereits erwähnt, reguliert APE1 die Aktivität redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren (Ando *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2010), während PARP1 mit NF- κ B interagiert (Ba und Garg, 2011; Infante *et al.*, 2012). FEN1 aktiviert RHOA und vermittelt den Umbau des Aktinzytoskeletts (Guerra *et al.*, 2011). OGG1 aktiviert nach Bindung sein Substrat 8-Oxo-dG Rho-GTPasen und stimuliert die Aktin-Nukleation (Luo *et al.*, 2014). Der *kd* des WRN-unabhängigen OGG1 führt (ebenso wie WRN-*kd*) als einziger der untersuchten BER-Faktoren (APE1, FEN1, NEIL1, PARP1) zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und einer Induktion der Zell-Zell Adhäsion. Die Induktion der Zell-Zell Adhäsion und die Expression inflammationsassoziiierter Faktoren ist charakteristisch für

atherosklerotische Endothelzellen. APE1, FEN1, NEIL1 und PARP1 haben keinen Einfluss auf die inflammationsassoziierten Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten Endothelzellen, was bedeuten könnte, dass diese BER-Faktoren keinen großen Effekt auf die Entstehung von Atherosklerose haben könnten. Welche Mechanismen hier zugrunde liegen, muss in fortführenden Studien geklärt werden. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass BER-Faktoren unabhängig von WRN Effekte auf Endothelzellfunktionen haben, die sich voneinander unterscheiden können.

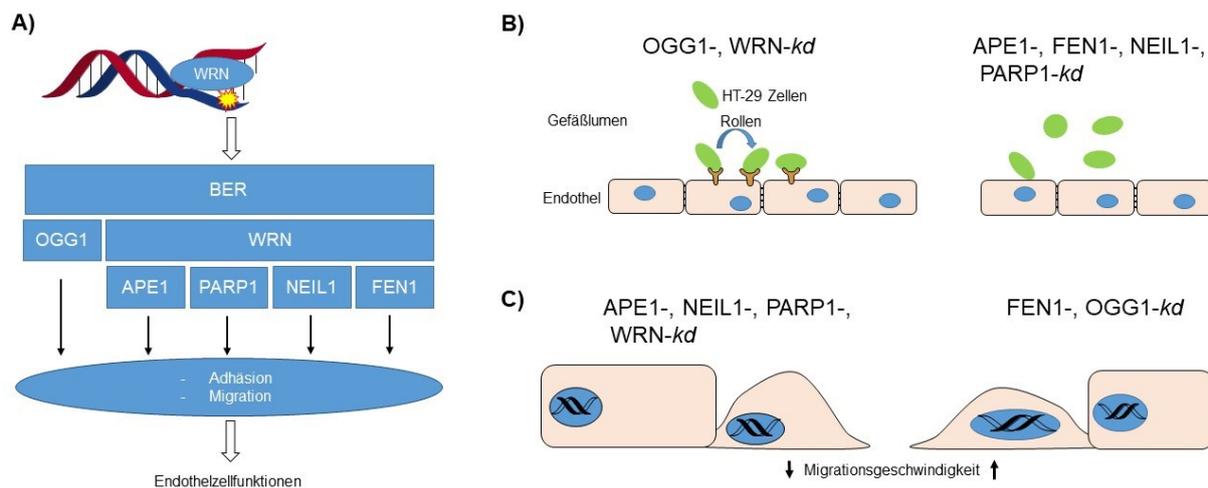


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Einflusses von APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 auf die Adhäsion und Migration.

A) APE1, FEN1, NEIL1 und PARP1 sind an der Reparatur kleiner Basenläsionen beteiligt und interagieren während der Basenexzisionsreparatur (BER) mit WRN. OGG1 ist ebenfalls ein BER-Faktor. Eine Interaktion von OGG1 mit WRN wurde bisher nicht beschrieben. Ebenso wie WRN wurden die aufgeführten BER-Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Adhäsion und Zellmigration untersucht. B) Die Zell-Zell Adhäsion OGG1-reduzierter HUVEC war stark erhöht. Keinen Einfluss auf die Adhäsion hatte ein *kd* von APE1, FEN1, NEIL1 oder PARP1. C) Reduzierte OGG1- oder FEN1-Proteinmengen wirkten stimulierend auf die Migration, wohingegen ein verminderter Gehalt von APE1-, NEIL1- oder PARP1 die Migration der untersuchten Endothelzellen hemmt. APE1: *apurinic/aprimidinic endonuclease*; BER: Basenexzisionsreparatur; FEN1: *flap endonuclease 1*; *kd*: *knockdown*; NEIL1: *Nei like DNA Glycosylase 1*; OGG1: 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1; PARP1: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; WRN: Werner-Syndrom Protein.

4.3 Einfluss von tBHQ und MMS auf die Viabilität und auf Endothelzellfunktionen

Neben der Entstehung intrazellulärer ROS durch die Atmungskette sind Endothelzellen extrazellulären ROS ausgesetzt. Endothelzellen stehen in direktem Kontakt mit dem Blutstrom und sind daher den im Blut enthaltenen Stoffen exponiert. Mit dem Blutstrom zirkulieren freie Radikale (ROS und *reaktive nitrogen species* (RNS)), die die Plasmamembran, Proteine und die DNA schädigen. Dabei kommt es durch die Schädigung von Makromolekülen zu Funktionsstörungen, aus denen sich eine Erkrankung manifestieren kann. Weiterhin kann es zur Akkumulation von DNA-Schäden kommen, die, sofern nicht repariert, zum Zelltod oder zur Seneszenz führen können. Daher ist neben zellulären ROS-Abwehrmechanismen (Katalase, Glutathion, Superoxid Dismutase) eine funktionierende DNA-Reparatur von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzellen mit dem Oxidans tBHQ und dem Alkylanz MMS

behandelt, um den Einfluss dieser Substanzen in Abhängigkeit der Expression von WRN und anderen BER-Faktoren auf Endothelzellfunktionen zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Analyse diskutiert werden.

4.3.1 Vergleich der Viabilität von Endothelzellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung sowie Induktion der ROS-Bildung und Expression von HO1 nach tBHQ-Behandlung

Zunächst wurde die Toxizität von tBHQ, als Vertreter von ROS und MMS, als Vertreter für Alkylanzien, untersucht (Abbildung 3-18). Eine langandauernde Inkubation (72 h) der Endothelzellen mit tBHQ oder MMS wirkt auf die untersuchten Endothelzellen stärker zytotoxisch als eine kurze Inkubation (24 h). Dies ist durch eine verlängerte Expositionszeit und die vermutlich damit verbundene Akkumulation von DNA-Schäden und Auslösung des Zelltods zu erklären. Dieses Ergebnis wird durch eine Studie bestätigt, bei der A549 Zellen und HUVEC für 24 h, 48 h und 72 h mit verschiedenen tBHQ-Konzentrationen behandelt wurden (Eskandani *et al.*, 2014).

Ein Vergleich der IC₅₀-Werte macht deutlich, dass die tBHQ-Behandlung auf HUVEC zytotoxischer wirkt als auf EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-18). HUVEC sind somit, im Vergleich zu EA.hy926 Zellen, sensitiver gegenüber tBHQ. In einer Studie wurde die Viabilität beider Endothelzelltypen unter hyperglykämischen Bedingungen miteinander verglichen. Aus den Ergebnissen der Untersuchung resultierte ebenfalls eine höhere Sensitivität von HUVEC gegenüber EA.hy926 Zellen (Karbach *et al.*, 2012).

Zudem reagierten beide der in dieser Arbeit untersuchten Endothelzelltypen sensitiver auf die kurze Behandlung mit tBHQ (24 h), wenn der WRN-Gehalt reduziert ist (Abbildung 3-19). Die erhöhte Sensitivität von WRN-defizienten Zellen gegenüber Noxen, die oxidative Schäden hervorrufen, ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Harrigan *et al.*, 2006; Ogburn *et al.*, 1997; Saintigny *et al.*, 2002) und wird durch die Akkumulation von DNA-Schäden hervorgerufen, die schließlich zur Apoptose führen (Harrigan *et al.*, 2006; Ogburn *et al.*, 1997; Saintigny *et al.*, 2002). DNA-Schäden können durch das Fehlen von WRN in den jeweiligen Reparaturwegen, wie BER und HR, nur unzureichend behoben werden.

Unter basalen Bedingungen wurde in keinem der untersuchten Endothelzelltypen eine erhöhte Bildung von intrazellulärem ROS nach *kd* von WRN gemessen (Abbildung 3-20). Auch die Gen- und Proteinexpression der HO1 war in WRN-*kd* EA.hy916 Zellen und HUVEC nicht induziert (Abbildung 3-21). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion des WRN-Gehalts alleine nicht zu einer erhöhten Konzentration von ROS führte. Dies entspricht nicht den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. In einer Studie ergaben Untersuchungen der ROS-Konzentration in WRN-defizienten Fibroblasten eine basale Erhöhung der ROS-Mengen um 34 % (Massip *et al.*, 2010). Eine weitere Studie zeigte, dass es in WRN-defizienten

Fibroblasten zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α kam, welche für die Generierung von mitochondrialen ROS verantwortlich ist (Labbé *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung könnte abermals die Verwendung verschiedener Zelltypen in der Literatur (Fibroblasten) und der vorliegenden Arbeit (Endothelzellen) sein. Die ROS-Bildung ist nach tBHQ-Behandlung tendenziell erhöht. HO1 unterliegt einer redoxregulierten Genexpression, die aktiviert wird, sobald ROS entsteht (Ryter und Choi, 2005). Die verstärkte Expression von *Ho1/HO1*, die in beiden Endothelzelltypen unabhängig vom WRN-Status nach tBHQ-Behandlung gemessen wurde (Abbildung 3-21), unterstützt das Ergebnis der Messung der ROS-Konzentration nach tBHQ-Behandlung in weiten Teilen (Abbildung 3-20). Die Aktivierung antioxidativer Mechanismen ist spezifisch, da die antioxidativ wirkende *Gpx1* in tBHQ behandelten *WRN-kd* EA.hy926 Zellen signifikant herunterreguliert ist. Dieses Ergebnis wird durch einer Studie aus dem Jahr 2014 unterstützt, bei der die *Gpx1* mRNA-Expression in WRN-defizienten Fibroblasten ebenfalls herunterreguliert war (Seco-Cervera *et al.*, 2014). Ein beeinträchtigter Abwehrmechanismus gegen ROS, in Form einer reduzierten *Gpx1* Expression, könnte zu einer erhöhten ROS Akkumulation in WRN-defizienten Zellen führen, was allerdings in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

4.3.2 Vergleich der Modulation von Endothelzellenfunktionen in Abhängigkeit von WRN und BER-Faktoren nach tBHQ- und MMS-Behandlung

TBHQ hat einen inhibitorischen Effekt auf die Aufnahme von acLDL in HUVEC, der durch einen WRN-*kd* verstärkt wird (Abbildung 3-22B). Dies ist womöglich auf toxische Effekte von tBHQ auf die beteiligten Strukturen zurückzuführen. Unterstützt wird dies durch die Viabilitätsuntersuchungen, die zeigen, dass WRN-*kd* HUVEC sensitiver gegenüber tBHQ waren als die WRN-Wt HUVEC (Abbildung 3-19B). Vor allem die mit MMS behandelten EA.hy926 Zellen nehmen, unabhängig vom WRN-Status, ebenfalls weniger acLDL auf (Abbildung 3-22A). Ein Grund für die verminderte Aufnahme von acLDL sind auch hier vermutlich zytotoxische Effekte von MMS. Unter physiologischen Bedingungen würde eine verminderte Aufnahme von oxLDL bedeuten, dass oxLDL vermehrt im Blutkreislauf verbleibt und zu oxidativen zellulären Schäden von Membranlipiden oder Proteinen führen könnte. Durch die verminderte Aufnahme von modifiziertem LDL könnte es möglicherweise unter physiologischen Bedingungen nicht zu einer Aktivierung der *Scavenger* Rezeptoren kommen, wodurch die Aktivierung der proinflammatorischen Signalkaskade ausbliebe. Eine Studie zeigt, dass ROS die Aktivität von *Scavenger* Rezeptoren und deren Genexpression in glatten Muskelzellen erhöht (Mietus-Snyder *et al.*, 1997). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nach der Inkubation mit schwach toxischen tBHQ-Konzentrationen nicht festgestellt werden.

In EA.hy926 Zellen ist die Freisetzung von Ca²⁺ in WRN-profizienten Zellen nach tBHQ-Behandlung vermindert, was auf einen toxischen Effekt von tBHQ auf die beteiligten

Makromoleküle hindeutet, während dieser Effekt in WRN-*kd* Zellen weniger ausgeprägt ist (Abbildung 3-23). Ein möglicher Grund dafür könnten antioxidative Effekte sein, die in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen verstärkt induziert sein könnten. Möglicherweise sind andere antioxidative Faktoren als Gpx1 involviert, wie z. B. *nuclear factor, erythroid 2 like 2* (Nrf2). Die Freisetzung von Ca²⁺ in HUVEC ist tBHQ-unabhängig. In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass die Aktivierung purinerge Rezeptoren durch ATP zur Akkumulation intrazellulärer ROS führt (Fujita *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2015; Sathanoori *et al.*, 2015). Ob ROS die Freisetzung von Ca²⁺ bzw. die Aktivierung purinereger Rezeptoren beeinflusst, ist nicht bekannt. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse von EA.hy926 Zellen im Vergleich zu HUVEC bleibt unklar. Spekulativ ist, ob die NF-κB-vermittelte transkriptionelle Expression purinerge Rezeptoren durch ROS vermindert wird. Einige Studien zeigten, dass ROS die HIF-1α-vermittelte Gentranskription seiner Zielgene supprimiert (Niecknig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2004). Dies könnte ein Grund für die verminderte Freisetzung von Ca²⁺ durch P2Y Rezeptoren der EA.hy926 Zellen nach tBHQ-Behandlung sein. Der leichte Anstieg nach tBHQ-Behandlung in WRN-*kd* Zellen könnte wiederum auf die stabilisierenden Effekte durch WRN-Depletion zurückzuführen sein.

Die Behandlung von HUVEC mit tBHQ führt zu einer tendenziell erhöhten Permeabilität der WRN-profizienten HUVEC Ein-Zell-Schicht (Abbildung 3-24). Obwohl dieser Effekt gering ist, wird dieses Ergebnis durch die Literatur unterstützt und mögliche Gründe werden beschrieben. ROS führt zur vaskulären Hyperpermeabilität, indem HIF1 hochreguliert wird (Lee *et al.*, 2006). Des Weiteren können ROS Phosphatasen durch die Oxidation wichtiger Cysteinreste im aktiven Zentrum inaktivieren, was dazu führt, dass Komponenten der Zell-Zell Verbindungen nicht mehr dephosphoryliert werden (Sallee *et al.*, 2006). Eine möglicher Abbau der Adhäsionsverbindungen, ausgelöst durch eine Tyrosin-Proteinkinase, bleibt bestehen und führt somit zu einer erhöhten Permeabilität (Sallee *et al.*, 2006). Eine weitere Möglichkeit ist die Regulierung der Genexpression oder die post-translationale Phosphorylierung von Adhäsionsverbindungen. Nach tBHQ-Behandlung ist Vimentin (*Vim*) auf Genexpressionsebene in beiden Endothelzelltypen und VE-Cadherin (*Cdh5*) in EA.hy926 Zellen herunterreguliert (Abbildung 3-28A). TBHQ hat jedoch keinen Einfluss auf die Proteinexpression von CDH5 und Vimentin (Abbildung 3-28B). Daraus kann geschlossen werden, dass eine veränderte Proteinexpression von CDH5 und Vimentin vermutlich nicht an der Veränderung der Permeabilität nach tBHQ-Behandlung beteiligt ist. Möglicherweise ist der Abbau von CDH5 und Vimentin durch deren Phosphorylierung auch hier ein Grund für eine leicht erhöhte Permeabilität. Die Permeabilität von WRN-*kd* HUVEC ist bereits basal erhöht und wird durch eine Inkubation mit tBHQ nicht verändert. Möglich wäre, dass die Permeabilität von WRN-*kd* HUVEC einen Schwellenwert erreicht, bei dem die Permeabilität nicht weiter erhöht werden kann und somit keine additiven Effekte erkennbar sind. Weiterhin könnten die

durch einen WRN-*kd* und durch tBHQ die gleichen Mechanismen aktiviert werden, die zu einer erhöhten Permeabilität führen. Fortführende Untersuchungen könnten diesen Annahmen auf den Grund gehen.

Da MMS die adhäsiven Eigenschaften nativer EA.hy926 Zellen vermindert, aber keinen Effekt auf die Genexpression der untersuchten Adhäsionsmolekülen hat (Abbildungen 3-25A und 3-29A), könnten allgemeine zytotoxische Effekte der Grund für eine verminderte Zell-Zell Adhäsion sein. MMS hat keinen Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen. Ähnliche WRN-abhängige Unterschiede waren bei der Aufnahme von acLDL (Abbildung 3-22) und der Freisetzung von Ca^{2+} (Abbildung 3-23) nach tBHQ-Behandlung von EA.hy926 Zellen zu verzeichnen. Ein Grund könnte, wie bereits zuvor erwähnt, die Aktivierung antioxidativer Mechanismen sein.

tBHQ hat keinen Einfluss auf die Proteinexpression von ICAM1 in Wt EA.hy926 Zellen (Abbildung 3-29B). Dieses Ergebnis wird durch eine Studie unterstützt, die zeigen konnte, dass ROS NF- κ B aktiviert, wodurch die Transkription von IL6, ICAM1 und VCAM1 in Endothelzellen initiiert wird (Volanti *et al.*, 2004). Es wurden allerdings keine erhöhten Proteinmengen von ICAM1 und VCAM1, aber von IL6 detektiert (Volanti *et al.*, 2004). Weiterhin fanden Volanti *et al.* heraus, dass ICAM1 und VCAM1 lysosomal aber nicht proteasomal abgebaut wurden. Es wurde keine Adhäsion von Granulozyten an der Endothelzellwand detektiert (Volanti *et al.*, 2004). Moderat toxische tBHQ-Konzentrationen stimulierten die Zell-Zell Adhäsion von HT-29 Zellen an HUVEC (Abbildung 3-25A). Eine Studie aus dem Jahr 2008 zeigt ebenfalls, dass ROS zu einer Induktion der Zell-Zell Adhäsion führt (Kim *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit war die Transkription von *E-Selektin*, *Icam1* und *Vcam1* nach tBHQ-Behandlung allerdings herunterreguliert (Abbildung 3-29A). Dieses Ergebnis konnte für ICAM1 auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 3-29B). Möglicherweise ist die verminderte Induktion der Genexpression auf den Zeitpunkt der Messung 24 h nach tBHQ-Behandlung zurückzuführen. Nach Behandlung der HUVEC mit MMS ist die Zell-Zell Adhäsion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant erhöht (Abbildung 3-25A). Wie sich bereits bei der Untersuchung von mit MMS behandelten WRN-*kd* EA.hy926 Zellen zeigt, auch bei der Analyse der mit MMS behandelten EA.hy926 Zellen mit *kd* einzelner BER-Faktoren keine signifikant veränderte Zell-Zell Adhäsion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 3-25B). Die Zell-Zell Adhäsion steigt in Abhängigkeit der tBHQ-Dosis und in Abwesenheit einzelner BER-Faktoren deutlich an. Daher scheinen vor allem ROS zu einer erhöhten Zell-Zell Adhäsion zu führen. Durch Stimulation der Zytokinproduktion führt oxidativer Stress zur Aktivierung des Endothels und zu einem proinflammatorischen Milieu (Bulua *et al.*, 2011). Die Zell-Zell Adhäsion ist vor allem nach tBHQ-Behandlung von APE1-*kd* EA.hy926 Zellen induziert (Abbildung 3-25B). Diese Ergebnisse werden durch eine Studie unterstützt, die zeigte, dass APE1 die TNF α induzierte

Expression von VCAM1 und die Adhäsion von Monozyten an HUVEC vermindert (Kim *et al.*, 2006). Wie bereits zuvor erwähnt, protektiert die Anwesenheit von APE1 Endothelzellen vor der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bei Auftreten erhöhter ROS-Mengen (Kim *et al.*, 2006; Pines *et al.*, 2005).

Eine Studie im Mausmodell mit Lungenentzündung zeigte, dass TNF α die Bildung von ROS induziert, wodurch 8-oxodG DNA-Schäden im Genom u. a. in Promotorregionen entstehen (Ba *et al.*, 2014). Dies führt zu einer vermehrten Bindung von OGG1 an 8-oxodG und zur Rekrutierung von NF- κ B/p65 sowie der damit verbundenen Genexpression proinflammatorischer Gene. In Abwesenheit von OGG1 war die Bindung von NF- κ B/p65 und die TNF α induzierte Transkription proinflammatorischer Gene nach ROS vermindert (Ba *et al.*, 2014). Dies ist nur schwer mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang zu bringen, da hier die Zell-Zell Adhäsion in Abwesenheit von OGG erhöht ist und die Zell-Zell Adhäsion nach tBHQ-Behandlung dieser Zellen nicht weiter erhöht ist (Abbildung 3-25B).

Die Zell-Zell Adhäsion von PARP1-*kd* EA.hy926 Zellen war erst nach Behandlung mit moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen signifikant induziert (Abbildung 3-25B). Wie bereits zuvor beschrieben, stimuliert PARP1 die Expression proinflammatorischer Gene durch ROS, was durch eine PARP1-Defizienz verhindert wird (Zhang *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2016). Möglicherweise ist der Restproteingehalt von PARP1 mit 34 % in EA.hy926 Zellen zu hoch und dafür verantwortlich, dass die Expression inflammationsassoziiierter Gene nach Exposition mit ROS induziert werden könnte. Die beobachteten Effekte sind ROS-spezifisch, da nach MMS-Behandlung die Zell-Zell Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle nicht induziert ist. *Kds* von FEN1 und NEIL1 haben weder nach tBHQ- noch nach MMS-Behandlung einen signifikanten Einfluss auf die Zell-Zell Adhäsion (Abbildung 3-25B). Dies könnte darauf hindeuten, dass beide BER-Faktoren einen weniger bedeutenden Einfluss auf inflammationsassoziierte Prozesse in Endothelzellen haben.

In Anwesenheit von WRN wirkt MMS hemmend auf die Migration. MMS stimuliert die Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen im Vergleich zu unbehandelten WRN-*kd* EA.hy926 Zellen. Ein, im Vergleich zu WRN-profizienten Zellen, stimulierender Effekt von MMS auf WRN-*kd* Zellen ist bereits zuvor bei anderen Analysen zu beobachten. Der Grund hierfür ist unklar und kann in fortführenden Studien untersucht werden.

Die Migration von normalen EA.hy926 Zellen ist tBHQ unabhängig. Im Vergleich zu unbehandelten WRN-*kd* EA.hy926 Zellen stimuliert die Behandlung dieser Zellen mit schwach toxischen tBHQ-Konzentrationen die Migration, während eine höhere tBHQ-Konzentration die Migration im Vergleich nur tendenziell erhöht (Abbildung 3-26A). Letzteres ist möglicherweise auf zytotoxische Effekte zurückzuführen. Im Vergleich zu unbehandelten WRN-*kd* EA.hy926 Zellen ist der Proteingehalt von RHOA und PTK2 in WRN-*kd* EA.hy926 nach tBHQ-Behandlung erhöht und somit für PTK2 ähnlich hoch wie in unbehandelten WRN-profizienten

Kontrollzellen (Abbildung 3-28B). Dies könnte darauf hinweisen, dass tBHQ die Expression von PTK2 unter WRN-*kd* Bedingungen stimuliert. Es ist bekannt, dass die Inhibition von PTK2 zu einer verminderten Migration von Endothelzellen führt (Yu *et al.*, 2018). Zellmigrationsanalysen („Wundheilungsversuch“) zeigen, dass eine erhöhte RHOA Expression in HUVEC zu einer erhöhten Migration dieser Zellen führt (Zhao *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit könnte daher die vermehrte RHOA-Proteinmenge nach tBHQ-Behandlung in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen die Migration stimulieren.

In HUVEC war ein dosisabhängiger toxischer Effekt von tBHQ auf die Migrationen zu beobachten (Abbildung 3-26B). Bis auf PTK2, welches nach tBHQ-Behandlung von WRN-*kd* HUVEC ähnliche Expressionsmuster aufweist wie EA.hy926 Zellen, sind keine weiteren migrationsassoziierten Faktoren durch eine Inkubation mit tBHQ verändert. Die gleichen Ergebnisse die ähnlichen Expressionsmuster von PTK2 in EA.hy926 und HUVEC untermauern die Bedeutung dieses Ergebnisses. Allerdings verbesserte dies nicht die Migrationsgeschwindigkeit dieser Zellen. Möglicherweise verhindern an dieser Stelle toxische Effekte eine verbesserte Migration von WRN-*kd* HUVEC durch tBHQ.

Geringe tBHQ-Konzentrationen stimulieren spezifisch die Migration von PARP1-*kd* und PARP1-WRN Doppel-*kd* EA.hy926 Zellen sowie von PARP1- und APE1-*kd* HUVEC (Abbildung 3-26). Diese Resultate sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit geringen tBHQ-Konzentrationen. Ob die Expression von PTK2 und RHOA in PARP1- und APE1-*kd* Zellen ebenfalls modifiziert ist, muss in fortführenden Untersuchungen geklärt werden.

MMS hat keinen Effekt auf die ATP-Mengen von EA.hy926 Zellen, während diese nach tBHQ-Behandlung in Anwesenheit, nicht aber in Abwesenheit, von WRN vermindert sind (Abbildung 3-27). Eine Schädigung der Mitochondrien durch oxidativen Stress und die damit einhergehende verminderte Produktion von ATP könnte ein Grund für das Ergebnis in WRN-Wt Zellen darstellen, vor dem WRN-*kd* EA.hy926 Zellen geschützt sein könnten. WRN-defiziente Zellen sind allerdings durch die Aktivierung von HIF1 und die damit verbundene Generierung von mitochondrialem ROS *per se* erhöhten ROS-Mengen ausgesetzt (Labbé *et al.*, 2012). Dies hätte eine Reduktion der ATP-Mengen von WRN-*kd* Zellen zur Folge, was allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde. Zudem ergab die Untersuchung der basalen intrazellulären ROS-Bildung keine erhöhten ROS-Konzentrationen in WRN-*kd* Zellen (Abbildung 3-20). Eine Studie von Sun *et al.* zeigte anhand von zerebrovaskulären Mausendothelzellen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion nach 24-stündiger tBHQ Inkubation; diese geht mit einer Reduktion von ATP einher (Sun *et al.*, 2016). Ähnliche Effekte wurden in Hepatozyten beobachtet (Nakagawa, 1996). Jiang *et al.* zeigten, dass die 24 h Inkubation von A549 Zellen mit in dieser Arbeit vergleichbaren tBHQ-Konzentrationen

keinen Effekt auf die ATP Level hat (Jiang *et al.*, 2016). Aus welchem Grund tBHQ bezüglich dieses Endpunktes keinen Effekt auf WRN-*kd* EA.hy926 Zellen hat, bleibt zu klären.

4.3.3 Wirkung von tBHQ und MMS auf die Expression endothelzellspezifischer Faktoren

In beiden Zelltypen ist weder die Expression von *Nos2* noch von *Nos3/NOS3* nach Behandlung mit tBHQ oder MMS reguliert (Abbildung 3-29). Nach Literaturangaben wird *Nos3* auf mRNA- und Proteinebene durch die Behandlung mit H₂O₂ induziert (Mohamed *et al.*, 1995; Drummond *et al.*, 2000). Ob NOS3 durch ROS post-translational modifiziert wird, hängt von dem ROS-Molekül ab (Veal and Day, 2011; Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Studien zeigten außerdem, dass Zytokine wie TNF α die mRNA-Expression von *Nos3* herunterregulieren (Lai *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008). Eine Studie von Wu *et al.* zeigte, dass die Transkription von *Nos2* vor allem während einer Infektion stimuliert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass die Transkription von *Nos2* spezifisch durch von NADPH-Oxidasen gebildeten ROS oder durch NF- κ B aktiviert wird (Wu *et al.*, 2008). Die fehlende Regulierung von *Nos2* und *Nos3/NOS3* in der vorliegenden Arbeit könnte auf die Reaktivität und die fehlende Spezifität des exogenen tBHQ zurückzuführen sein.

Die Transkription von *Kdr* ist in HUVEC nach tBHQ-Behandlung hochreguliert, wohingegen diese nach MMS-Behandlung in EA.hy926 Zellen signifikant herunterreguliert war (Abbildung 3-29). Durch NADPH-Oxidase produzierte ROS sind Signalmoleküle der Angiogenese. ROS initiieren die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor KDR (VEGFR2), woraufhin KDR phosphoryliert wird. Darauf folgt die Aktivierung eines Signalweges, der die Angiogenese aktiviert (Ushio-Fukai und Alexander, 2004). Bestätigt sich bei weiteren Analysen der auf mRNA-Ebene gezeigte Effekt auf Proteinebene, könnte die Behandlung mit MMS einen anti-angiogenen Effekt auf Endothelzellen haben. Die mRNA-Expression von *Ccl2* ist nach tBHQ-Behandlung WRN-unabhängig in EA.hy926 Zellen induziert, während der gegenteilige Effekt in HUVEC zu beobachten ist. Die Behandlung mit MMS hatte keinen Effekt auf die Genexpression von *Ccl2* in EA.hy926 Zellen. Die vermehrte Expression von *Ccl2* nach tBHQ-Behandlung könnte auf einen inflammationsassoziierten Effekt von tBHQ hindeuten. Ein gegenteiliger Effekt durch tBHQ wurde in HUVEC gezeigt. Unterschiede zwischen EA.hy926 Zellen und HUVEC sind möglicherweise auf deren unterschiedlichen Genotyp zurückzuführen. Um eine differenziertere Aussage treffen zu können, sollte der Proteingehalt von CCL2 in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Eine Studie zeigte, dass seneszente mesenchymale Zellen MCP1 (CCL2) sezernieren, welches durch die Bindung an seinen Rezeptor den Seneszenz-Signalweg verstärkt. MCP1 führt, durch ROS oder die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalwegs, zu einer erhöhten Proteinexpression von p53 sowie p21 (Jin *et al.*, 2016). Da die mRNA-Expression von CCL2

in WRN-*kd* EA.hy926 Zellen bereits basal hoch ist, könnte dies die erhöhten p21 Proteingehalte bei der Untersuchung der Seneszenz erklären (Abbildung 3-12). ROS führt zur Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase 14* (p38) MAPK Weges, der die Aktivierung von CCL2 induziert (Takaishi *et al.*, 2003). Dies könnte eine Erklärung für die in EA.hy926 Zellen beobachtete erhöhte *Ccl2* Expression sein. Der antiinflammatorische Faktor *Plat* war in EA.hy926 Zellen WRN-abhängig nach tBHQ-Behandlung hochreguliert. Nach Inkubation mit MMS war die Gentranskription von *Plat* allerdings vermindert, was zeigt, dass MMS keine inflammationsassoziierte Wirkung hat. Die *Edn1/EDN1* Expression war nach tBHQ-Behandlung signifikant in beiden Zelltypen herunterreguliert. Dies galt auch für mit MMS behandelte EA.hy926 Zellen. In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl die Exposition mit extrazellulären als auch intrazelluläre ROS die mRNA-Expression von EDN1 in Mesangialzellen induzieren. EDN1 führt wiederum zu einer vermehrten Bildung von ROS (Hughes *et al.*, 1996; Cerrato *et al.*, 2012). Dieses Ergebnis ist nicht charakteristisch für Endothelzellen in atherosklerotischen Gefäßen mit prooxidativem Milieu, da EDN1 in diesem Zusammenhang normalerweise hochreguliert ist.

4.3.4 Vergleich der Aktivierung der DNA-Schadensantwort nach tBHQ- oder MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN

DNA-Schäden aktivieren die DNA-Schadensantwort, die zu einer Apoptose, einem Zellzyklusarrest oder DNA-Reparatur führen kann. Ein initialer Schritt der DNA-Schadensantwortaktivierung ist die Aktivierung der DNA-Schadenssensoren ATM und ATR. DNA-Doppelstrangbrüche führen zur SUMOylierung (*small ubiquitin-related modifier*) des Proteins *NF-κB essential modulator* (NEMO), woraufhin die ATM Kinase NEMO phosphoryliert und NEMO im Anschluss ubiquitiniert wird. Der ATM-NEMO-Komplex transloziert aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo es daraufhin zum Abbau von *nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* (IκB) kommt. Dies hat die Aktivierung von NF-κB und der damit verbundenen Transkription inflammatorischer Gene zur Folge (Wu *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001; Gorgoulis *et al.*, 2003). Erhöhte ROS-Konzentrationen resultieren in DNA-Doppelstrangbrüchen und einer erhöhten genomischen Instabilität. Zellen, die aus Werner-Syndrom Patienten isoliert wurden, weisen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf (Sargolzaeiaval *et al.*, 2018). Es ist weiterhin bekannt, dass p53 die Expression von ICAM1 NF-κB-unabhängig stimuliert (Gorgoulis *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die gewählten tBHQ- und MMS-Konzentrationen eine DNA-Schadensantwort hervorrufen, die u. a. Rückschlüsse auf eine mögliche Aktivierung inflammationsassoziiierter Faktoren zulassen könnten (Abbildung 3-30). Dazu wurde der Aktivierungsstatus von einigen, an der DNA-Schadensantwort beteiligten, Faktoren untersucht (pKAP1, pCHK1, pCHK2, pp53, γH2AX). Aus den Analysen resultiert eine spezifische

Aktivierung der untersuchten Faktoren, wobei durch MMS eine etwas stärkere und umfassendere DNA-Schadensantwort ausgelöst wird als durch tBHQ. Erwartungsgemäß ergeben die Untersuchungen, entsprechend der geringen tBHQ- und MMS-Dosen, keine umfangreiche Aktivierung der DNA-Schadensantwort. Als Antwort auf DNA-Schäden, wird p53 durch ATM phosphoryliert und somit stabilisiert. Dies kann zu einem Zellzyklusarrest, zu Seneszenz oder zu Apoptose führen (Canman *et al.*, 1998). Die vermehrte Phosphorylierung von p53 in WRN-*kd* HUVEC, die nach Behandlung mit moderat toxischen tBHQ-Konzentrationen auftritt, könnte durch die höhere Suszeptibilität von WRN-*kd* Zellen gegenüber Noxen erklärt werden und mitverantwortlich für eine leicht erhöhte Expression von ICAM1 in WRN-*kd* Zellen sein (Abbildung 3-29B).

Es lässt sich folgendes zusammenfassen: Die gewählten niedrig dosierten tBHQ-Konzentrationen führen zu einem leichten intrazellulären ROS-Anstieg, aktivieren die Expression der redoxabhängigen HO1 und führen zu einer leichten Induktion der DNA-Schadensantwort. Obwohl WRN-*kd* Zellen sensitiver gegenüber tBHQ sind, waren diese Ergebnisse meist WRN-unabhängig (außer z. B. p53). Die Inkubation der Endothelzellen mit MMS führte zu einer stärkeren DNA-Schadensantwort. Die Behandlung mit tBHQ stimuliert die Zell-Zell Adhäsion und erhöht tendenziell die Permeabilität von HUVEC (Abbildung 4-3). Des Weiteren ist die mRNA-Expression von *Ccl2* nach tBHQ-Behandlung induziert. Die Behandlung der Endothelzellen mit MMS induziert weder die Expression von *Ccl2* noch aktiviert es die Zell-Zell Adhäsion.

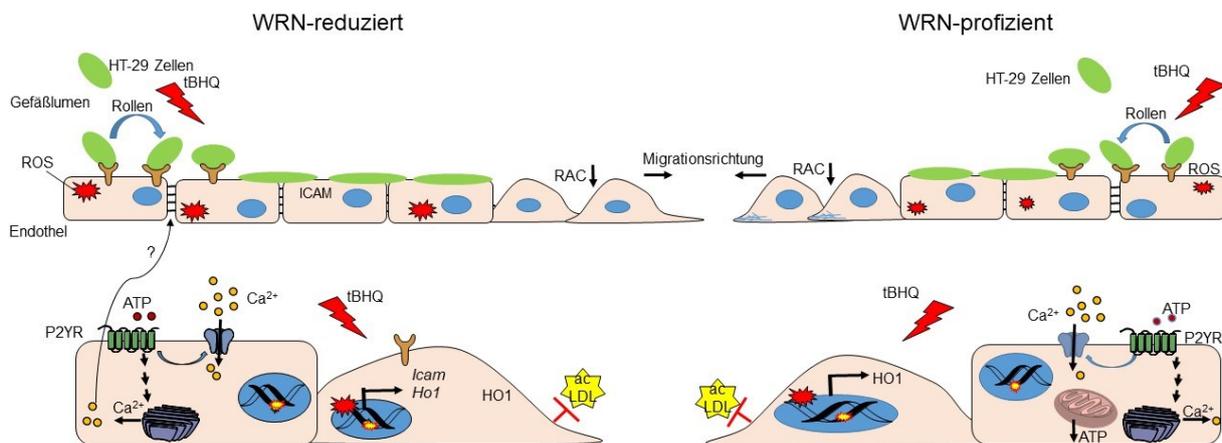


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Einflusses von tBHQ auf Endothelzellfunktionen in Abhängigkeit von WRN.

tBHQ stimulierte die Adhäsion von HT-29 Zellen (grüne Ovale) an Endothelzellen, wobei die Zell-Zell Adhäsion in WRN-*kd* Endothelzellen im Vergleich zu den wildtypischen Zellen nach tBHQ-Behandlung geringfügig höher war. Die Gen- und Proteinexpression von Ho1/HO1 war nach Inkubation mit tBHQ erhöht. Weiterhin führte die tBHQ-Behandlung zu einer teilweise reduzierten Freisetzung von Ca^{2+} vor allem in WRN-profizienten Zellen sowie zu einer Hemmung der Aufnahme von acLDL. acLDL: acetyliertes Lipoprotein geringer Dichte; ATP: Adenosintriphosphat; Ca^{2+} : Calcium-Ionen; HO1/*Ho1*: Hämoxigenase 1 *Icam*: interzelluläres Adhäsionsmolekül; PTK2: Protein Tyrosinkinase 2; P2YR: purinergem Rezeptor; RAC: Rac family small GTPase 1; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; *Sele*: Selektin; tBHQ: tertiär-Butylhydrochinon; *Vcam*: vaskuläres Adhäsionsmolekül; WRN: Werner-Syndrom Protein.

Daher scheint tBHQ, im Gegensatz zu MMS, vor allem inflammationsassoziierte, endothelzellspezifische Funktionen zu stimulieren. Die Inkubation der Zellen mit tBHQ oder MMS hemmt die Aufnahme von acLDL, die Freisetzung von Ca^{2+} und die endotheliale Zellmigration, möglicherweise durch toxische Effekte auf die beteiligten Moleküle. Dabei ergaben die Analysen, dass WRN-*kd* Zellen oftmals tendenziell weniger stark in ihrer Funktion gehemmt sind als WRN-profiziente Zellen (acLDL, Ca^{2+} -Freisetzung, ATP-Mengen). Dennoch waren die beobachteten genotoxischen Effekte größtenteils unabhängig vom WRN-Status. WRN scheint daher vor allem unter basalen Bedingungen wichtig für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von Endothelzellen zu sein.

5 Ausblick

Ein unerwartetes Ergebnis des ersten Teils dieser Arbeit war der stark inhibitorische Effekt eines WRN-*kd* auf die endotheliale Zellmigration von EA.hy926 Zellen und HUVEC. Weitere Analysen zeigten eine veränderte Morphologie der Lamellipodien und eine Reduktion der PTK2 Proteinmenge in diesen Zellen. Unklar ist, welche durch WRN regulierten Mechanismen diesem Ergebnis zugrunde liegen und auf welche Weise WRN mit den beteiligten Faktoren interagiert. Ein Ansatzpunkt zur Untersuchung des lamellipodialen Phänotyps von WRN-*kd* Zellen ist die Durchführung einer Vergleichsanalyse des Aktivierungsstatus von Proteinen, die an der Polymerisation verzweigter (z. B. Arp2/3) und länglicher (z. B. Formin) Aktin-Filamente beteiligt sind. Dabei können sowohl fluoreszenzmikroskopische zytochemische Verfahren als auch proteinmengenbasierte Verfahren verwendet werden. Mögliche Zielproteine wären Arp2/3 sowie Formin und deren jeweilige Aktivatorproteine Cortactin und Rho GTPasen (Urano *et al.*, 2001). Bezüglich der verminderten PTK2 Proteinmengen sollte zunächst untersucht werden, ob ein WRN-*kd* zu einem proteasomalen Abbau von PTK2 führt, was mit Hilfe eines Proteasom-Inhibitors untersucht werden könnte. Des Weiteren könnten post-transkriptionelle Modifikationen zu einem schnellen Abbau der synthetisierten *Ptk2* RNA führen. Ebenfalls ist weitestgehend ungeklärt, durch welche BER-Faktor-vermittelten Mechanismen die Migration beeinflusst wird. Zunächst könnte überprüft werden, ob der PTK2 Proteingehalt, ähnlich, wie in WRN-*kd* Zellen vermindert ist oder eine Veränderung der Expression von Adhäsionsverbindungen vorliegt. Darüber hinaus könnte die Phosphorylierung an einem Tyrosin-Rest (u. a. Y645, Y658, Y685, Y731) von VE-Cadherin mittels phosphospezifischer Antikörper und Western Blot Analysen untersucht werden (Gavard und Gutkind, 2006; Wallez *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2005; Esser *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wäre ebenfalls interessant zu klären, durch welche Mechanismen tBHQ und MMS die Migration von WRN-*kd* EA.hy926 Zellen modellieren. Weitere an der Migration beteiligte Faktoren wie Paxilin oder Integrine könnten an dieser Stelle näher untersucht werden.

Durch eine Vergleichsanalyse ließe sich klären, wodurch der durch WRN-*kd* herbeigeführte Effekt auf die Permeabilität begründet ist. Dies könnte erfolgen, indem die Phosphorylierung von VE-Cadherin oder β -Catenin und der damit verbundene Abbau von Adhäsionsverbindungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

Entgegen der Erwartungen waren die Ca^{2+} -Freisetzung, acLDL Aufnahme, Zell-Zell Adhäsion und die ATP-Menge WRN-profizienter Zellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung teilweise stärker beeinflusst als in WRN-*kd* Zellen. Aufgrund der erhöhten tBHQ Sensitivität von WRN-*kd* Zellen wäre ein gegenteiliger Effekt zu vermuten gewesen. Es bleibt zu klären, ob eine Veränderung der antioxidativen Schutzfunktionen zu diesen Ergebnissen geführt hat. Dabei könnte die mRNA- und Proteinexpression der antioxidativen Faktoren (Katalase, Superoxid-Dismutase) untersucht werden. Auch die Untersuchung von N-Acetylcystein oder Nrf2 könnten

in dieser Hinsicht Erkenntnisse liefern (Akerboom *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 2011 b). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 könnte mit Hilfe eines Kits bestimmt werden, bei dem Nrf2 an die doppelsträngige DNA bindet und diese Bindung durch die spezifische Bindung eines Antikörpers sichtbar gemacht wird (Taguchi *et al.*, 2011). Weiterhin ist eine Durchführung von Expressionsanalysen der Target Gene von Nrf2 denkbar.

Nicht alle Werner-Syndrom Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Atherosklerose (Huang *et al.*, 2006). In fortführenden Versuchen ließe sich mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems gezielt Mutationen in das *Wrn*-Gen integrieren, die bei Werner-Syndrom Patienten mit Atherosklerose identifiziert wurden. Dies würde vermutlich eine differenziertere und fokussiertere Betrachtung ermöglichen. Andererseits wird die Entwicklung einer Atherosklerose neben genetischen Faktoren durch Umwelteinflüsse begünstigt, weswegen die Wahl der atheroskleroseassoziierten Mutationen bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens genau überdacht werden muss. Außerdem muss die Fähigkeit der Zellen, *in vitro* zu proliferieren, sichergestellt sein.

Weitaus seltener als *kd*- oder Mutations-Analysen werden in der Literatur die Resultate von WRN-Überexpressionsanalysen beschrieben. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre die Analyse der Konsequenzen einer Überexpression von WRN vor allem für Versuche interessant, bei denen ein WRN-*kd* einen hemmenden Effekt hatte (z. B. Migration, mRNA- und Proteinexpression).

Da es sich bei EA.hy926 Zellen um eine Hybridzelllinie handelt, deren Genotyp aus HUVEC und A549 besteht, resultierten aus den vergleichenden Analysen mit primären HUVEC häufig unterschiedliche Effekte auf den untersuchten Endpunkt. Um die aus den Untersuchungen unter Verwendung von HUVEC resultierenden Ergebnisse zu verifizieren, könnten die Untersuchungen mit HUVEC, die aus anderen Spendern isoliert wurden, wiederholt werden, um klonale Effekte auszuschließen. Des Weiteren könnten die Versuche mit einem anderen *in vitro* System untersucht werden. Da es sich bei HUVEC um aus der Nabelschnurvene isolierte Endothelzellen handelt, könnte ein direkter Vergleich mit Endothelzellen aus der *Vena Saphena* (*human saphenous vein endothelial cells* (HSaVEC)) gezogen werden. Zum Vergleich von Endothelzellen, die aus Arterien isoliert wurden, dienen *human umbilical artery endothelial cells* (HUAEC) oder *human coronary artery endothelial cells* (HCAEC). Bei HUVEC handelt es sich um das prominenteste und zugleich um das etablierteste endotheliale *in vitro* System, was ein Grund für die Verwendung dieser Zellen in der vorliegenden Arbeit war. Das Verwenden anderer primärer Zellen wäre vor allem zur Untersuchung der Effekte von WRN auf verschiedene Endothelzellen von Interesse.

Die Atherogenese ist ein komplexer Prozess, der in der Tunica intima stattfindet. Neben Endothelzellen sind glatte Muskelzellen und immunkompetente Zellen (Monozyten) an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt. Daher wäre eine Untersuchung des

Einflusses von WRN auf die Funktionalität dieser Zellen in einem *in vitro* Modell oder unter physiologischen Bedingungen in einem *in vivo* Mausmodell interessant. Zu letzterem würde sich ein WRN-mutiertes Mausmodell eignen, welches im Vergleich zu Kontrollgruppen ein erhöhtes Serum PAI1-Level, erhöhte IL18 Expression und kardiovaskuläre Fibrose aufweist (Aumailley *et al.*, 2015). Diese Mäuse könnten beispielsweise hinsichtlich der Veränderung ihrer Gefäßstruktur und Modellierung atherogener Faktoren untersucht werden. Entnommene Gefäße älterer Mäuse könnten ebenfalls hinsichtlich Scherstress untersucht werden, der sich ebenfalls positiv auf die Entwicklung von Atherosklerose auswirkt.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Blutgefäßwand, die auf eine endotheliale Dysfunktion zurückgeht und durch eine Verdickung und Kalzifikation der Gefäßwand gekennzeichnet ist. Dabei sind reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) maßgeblich an der Aktivierung pathologischer Signalwege beteiligt. Komplikationen dieser Erkrankung führen zu einer unzureichenden Nähr- und Sauerstoffversorgung der betroffenen Gewebe und haben Gewebeschäden zur Folge. Die Gründe für die Entstehung einer Atherosklerose sind multifaktoriell. Neben Umwelteinflüssen sind genetische Prädispositionen für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen verantwortlich. Werner-Syndrom Patienten haben einen Defekt im Werner-Syndrom Gen (*Wrn*) und erkranken häufig bereits während der dritten Dekade ihres Lebens an Atherosklerose, die neben malignen Tumoren die häufigste Todesursache dieser Patienten darstellt. Das Werner-Syndrom Protein (WRN), eine DNA-Helikase, ist an der Reparatur von DNA-Basenschäden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt. DNA-Basenschäden entstehen u. a. durch ROS, wie sie vermehrt in atherosklerotischem Gewebe auftreten. Nach der Entstehung von DNA-Basenschäden entwindet WRN das zu reparierende Teilstück der DNA und interagiert mit Faktoren des BER-Weges.

Daher ist die Arbeitshypothese, dass durch das Fehlen von WRN (bzw. BER-Faktoren) pathologische, DNA-schadenassoziierte Mechanismen aktiviert werden, welche zu endothelialen Fehlfunktionen führen. WRN und eine funktionierende BER würden demnach einer Akkumulation von Basenläsionen entgegenwirken und wären für die Aufrechterhaltung endothelzellspezifischer Funktionen von Bedeutung.

Um dies zu untersuchen wurden WRN und/oder ausgewählte BER-Faktoren (APE1, FEN1, NEIL1, PARP1, OGG1) in EA.hy926 Hybridzellen sowie primären HUVEC mittels RNA-Interferenz herunterreguliert und der Einfluss auf ausgewählte Endothelzellfunktionen analysiert. Zusätzlich wurden die Endothelzellen mit schwach oder moderat zytotoxischen Konzentrationen des Oxidans tBHQ oder des Alkylanz MMS behandelt und im Anschluss ebenfalls hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht.

Ein reduzierter WRN-Gehalt hatte keine unspezifischen zytotoxischen Effekte auf die untersuchten Endothelzellen zur Folge. Die Analysen der endothelzellspezifischen Funktionen ergaben, dass WRN keinen Einfluss auf die Aufnahme von acLDL hat und die Stabilität der endothelialen Barriere aufrechterhält. WRN unterstützt die endotheliale Zellmigration. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Proteinexpression von PTK2 in WRN-*kd* Zellen vermindert ist, was u. a. ursächlich für die verminderte Migration dieser Endothelzellen sein könnte. WRN wirkt der mRNA-Expression inflammations-assoziierten Faktoren (Adhäsionsmoleküle, *Ccl2*, *Plat*) entgegen und verringert die adhäsiven Eigenschaften des Endothels, die die Adhäsion von im Blutkreislauf zirkulierenden Molekülen an das Endothelium

fördern. Aus den Untersuchungen ergab sich ein inflammations-assoziiertes Erscheinungsbild der Zellen mit vermindertem WRN-Gehalt. Als einziger der untersuchten BER-Faktoren beeinflusst OGG1 die Zell-Zell Adhäsion und die mRNA-Expression endothelzellspezifischer Faktoren in ähnlicher Weise wie WRN. Ebenso wie WRN unterstützen die WRN-assoziierten BER-Faktoren APE1, NEIL1 und PARP1 die Migration, während FEN1 und OGG1 hemmend auf diese wirken. Daraus kann geschlossen werden, dass die für APE1-, NEIL1- und PARP1-*kd* beobachteten Effekte spezifisch sind und diese nicht auf die klassische Rolle der untersuchten Faktoren in der BER zurückzuführen sind.

Die Inkubation der Endothelzellen mit tBHQ induziert die mRNA- und Proteinexpression der Hämoxygenase 1. Die hier verwendeten niedrigen tBHQ- und MMS-Konzentrationen führen nicht zu einem erhöhten Zelltod. Allerdings werden an der DNA-Schadensantwort beteiligte Faktoren durch die Inkubation der Zellen mit tBHQ und MMS aktiviert. TBHQ und MMS wirken hemmend auf die Aufnahme von acLDL, während ausschließlich tBHQ die Zell-Zell Adhäsion stimuliert. Die mRNA-Expression von *Ccl2* ist nach der Behandlung der Endothelzellen mit tBHQ ebenfalls erhöht. Daher scheint vor allem das Oxidans tBHQ inflammationsassoziierte Mechanismen zu stimulieren. Die Effekte der verwendeten Substanzen sind größtenteils unabhängig vom WRN-Proteingehalt der Zellen. Daher scheint WRN vor allem unter basalen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktionen beizutragen und alters-assoziierten Mechanismen entgegenzuwirken. Auch die untersuchten BER-Faktoren (APE1, NEIL1, PARP1, OGG1) tragen in unterschiedlichem Umfang zur Aufrechterhaltung der Endothelzellfunktionen bei.

Summary

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of blood vessels, which is initiated by endothelial dysfunction and leads to thickening and calcification of the vessel wall. Reactive oxygen species (ROS) are involved in activation of pathological, proatherogenic signalling pathways. Complications provoked by atherosclerosis are based on an insufficient nutrition and oxygen supply of the affected tissue, which leads to myocardial infarction and stroke. Atherosclerosis is a multifactorial disease, caused by environmental influences as well as genetic predisposition. The gene defect in Werner-Syndrome patients give rise to an early onset of atherosclerosis during the third decade of life. Besides cancer, atherosclerosis is the main cause of death of these patients. The Werner-Syndrome protein (WRN) DNA-helicase is involved in base excision repair (BER), which is activated by DNA base damage caused for instance by ROS. Abundant ROS formation occurs in atherosclerotic plaques activating inflammatory gene expression. During BER, WRN unwinds the DNA of the damaged area and interacts with various BER proteins to promote DNA repair.

Based on these data we hypothesized, that a loss of WRN (or other BER-factors) leads to the activation of pathological, DNA-damage associated mechanisms, which cause endothelial dysfunction. WRN and a functional BER prevent accumulation of DNA base lesions and are essential for the maintenance of endothelial-specific functions.

To this end, WRN and/or single BER factors (APE1, FEN1, NEIL1, PARP1, OGG1) of EA.hy926 cells and HUVEC were knocked down (*kd*) by RNA-interference technique. Subsequently, analysis of cell functionality was performed. Furthermore, endothelial cells were treated with slightly toxic and moderate toxic concentrations of the antioxidant tBHQ or the alkylating agent MMS, followed by the investigation of endothelial cell-specific functions.

The reduced WRN content has no unspecific cytotoxic effects on endothelial cells. Analyses of endothelial cell specific functions reveal that WRN has no influence on acLDL uptake and maintains the stability of the endothelial barrier. Moreover, WRN supports endothelial cell migration. More detailed investigations show reduced protein levels of PTK2 in WRN-*kd* endothelial cells, which might cause the impaired migration of these cells. WRN keeps the mRNA expression of inflammation-related factors (adhesion molecules, *Ccl2*, *Plat*) low and works against the adhesion of circulating molecules to the endothelium. WRN-*kd* cells show inflammation-associated features. Amongst the investigated BER-factors, OGG1 is the only one that influences cell-cell adhesion and mRNA expression of endothelial-specific factors similar to WRN. As observed for WRN, the WRN-associated BER factors APE1, NEIL1 and PARP1 support endothelial cell migration, whereas it is hampered by FEN1 and OGG1. Due to this result, the observed effects might be specific and are not based on the classical role of the BER-factors in BER.

The incubation of endothelial cells with tBHQ induce mRNA- and protein expression of heme oxygenase 1. Low-dose tBHQ and MMS concentrations show no increase in cells death. Both, tBHQ and MMS, activate factors of the DNA damage response. TBHQ and MMS have inhibitory effects on acLDL uptake, but only tBHQ stimulates cell-cell adhesion. The mRNA expression of *Ccl2* is increased after tBHQ treatment as well. It seems that especially the oxidative agent tBHQ stimulates inflammation-associated mechanisms. The effects of genotoxic agents are mostly independent of WRN content.

Therefore, the results indicate that WRN supports endothelial functionality especially under basal non genotoxic conditions and works against age-related mechanisms. The investigated BER-Factors (APE1, NEIL1, PARP1, OGG1) also maintain endothelial functionality with different efficiency.

7 Literaturverzeichnis

- Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., Arya, P. S., Sudhakaran, P. R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 10(4): 347-354.
- Adams, C. L., Nelson, W. J., Smith, S. J. (1996). Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganisation during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135(6 Pt 2): 1899-1911.
- Adelman, R., Saul, R. L., Ames, B. N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(8): 2706-2708.
- Aggarwal, M., Banerjee, T., Sommers, J. A., Iannascoli, C., Pichierri, P., Shoemaker, R. H., Brosh, R. M. Jr. (2013). Werner Syndrome helicase has a critical role in DNA damage responses in the absence of functional fanconi anemia pathway. *Cancer Res* 73(17): 5497-5507.
- Aguilera-Aguirre, L., Hosoki, K., Bcsi, A., Radák, Z., Sur., Hedge, M. L., Tian, B., Saavedra-Molina, A., Brasier, A. R., Ba, X., Boldogh, I. (2015). Whole transcriptome analysis reveals a role for OGG1-mediated DNA repair signalling in airway remodelling. *Free Radic Biol Med* 89: 20-33.
- Ahn, B., Harrigan, J. A., Indig, F. E., Wilson, D. M., Bohr, V. A. (2004). Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. *J Biol Chem* 279(51): 53465-53474.
- Akerboom, T. P. M., Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77: 373-382.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell - Blood vessels and endothelial cells*. Garland Science. 4th edition. New York.
- Alberts, G. F., Peifley, K. A., Johns, A., Kleha, J. F., Winkles, J. A. (1994). Constitutive endothelin 1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 269(1): 10112-10118.
- Aliyev, A., Chen, S. G., Sexidova, D., Smith, M. A., Perry, G., de la Torre, J., Aliev, G. (2005). Mitochondria DNA deletions in atherosclerotic hypoperfused brain microvessels as a primary target for the development of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 229-230: 285-292.
- Allingham, M. J., van Buul, J. D., Burridge, K. (2007): ICAM1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* 179(6): 4053-4063.
- Ando, K. H. S., Kabe, Y., Ogura, Y., Sato, I., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H. (2008). A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. *Nucleic Acids Res* 36(13): 4327-4336.
- Ashina, K., Tsubosaka, Y., Nakamura, T., Omori, K., Kobayashi, K., Hori, M., Ozaki, H., Murata, T. (2015). Histamine induces vascular hyperpermeability by increasing blood flow and endothelial barrier disruption in vivo. *PLoS One* 10(7): e0132367.
- Aumailley, L., Garand, C., Dubois, M. J., Johnson, F. B., Marette, A., Lebel, M. (2015). Metabolic and phenotypic differences between mice producing a Werner-Syndrome helicase mutant protein and Wrn null mice. *PLoS One* 10(10): e0140292.

- Aziz, M., Yadav, K. S. (2016). Pathogenesis of Atherosclerosis A Review. *Medical and clinical Reviews* 2(3): 1-6.
- Ba, X., Bacsi, A., Luo, J., Aguilera-Aguirre, L., Zeng, X., Radak, Z., Brasier, A. R., Boldogh, I. (2014). 8-Oxoguanine DNA glycosylase1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors. *J Immunol* 192(5): 2384-2384.
- Ba, X., Garg, N. J. (2011). Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in inflammatory disease. *Am J Pathol* 178(3): 946-955.
- Balajee, A. S., Machwe, A., May, A., Gray, M. D., Oshima, J., Martin, G. M., Nehlin, J. O., Brosh, R., Orren, D. K., Bohr, V. A. (1999). The Werner syndrome Protein is involved in RNA Polymerase II Transcription. *Mol Biol Cell* 10(8): 2655-2668.
- Balligand, J. L., Feron, O., Dessy, C. (2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 89(2): 481-534.
- Balligand, J. L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W. W., Pimental, D., Malinski, T. A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C. J., Davidoff, A. J., Kelly, R. A. (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 269(44): 27580-27588.
- Baranska, P., Jerczynska, H., Pawkowska, Z. (2005). Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA.hy926. *Postepy Biochem* 51(1): 12-21.
- Barbieri, S. S., Zacchi, E., Amadio, P., Gianellini, S., Mussoni, L., Weksler, B. B., Tremoli, E. (2011): Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 90(3): 475-483.
- Barquera, S., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., Hernández-Barrera, L., Bibbins-Domingo, K., Lozano, R., Moran, A. E. (2015). Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arch Med Res* 46(5): 328-338.
- Barton, M., Haudenschild, C. C., d'Uscio, L. V., Shaw, S., Münter, K., Lüscher, T. F. (1998). Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24):14367-14372.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Hall, E. H., Mebrahtu, S. T., Ernst, P. B., Crowe, S. E. (2010). Mechanism of hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated Mcl1 regulation in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(5): G1177-1186.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidative defense. *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19.
- Blann, A. D., Dobrotova, M., Kubisz, P., McCollum, C. N (1995). Von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 74(2): 626-630.

- Blau, C. W., Cowley, T. R., O'Sullivan, J., Grehan, B., Browne, T. C., Kelly, L., Birch, A., Murphy, N., Kelly, A. M., Kerskens, C. M., Lynch, M. A. (2012). The age-related deficit in LTP is associated with changes in perfusion and blood-brain barrier permeability. *Neurobiol Aging* 33(5): 1005 e23-35.
- Bohr, V. A., Metter, E. J., Harrigan, J. A., von Kobbe, C., Liu, J. L., Gray, M. G., Majumdar, A., Wilson, D. M., Seidman, M. M. (2004). Werner syndrome protein 1367 variants and disposition towards coronary artery disease in Caucasian patients. *Mech Ageing Dev* 125(7): 491-496.
- Boullier, A., Bird, D. A., Chang, M. K., Dennis, E. A., Friedman, P., Gillotre-Taylor, K., Palinski, W., Quehenberger, O., Shaw, P., Steinberg, D., Terpstra, V., Witztum, J. L. (2001). Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 974: 214-222.
- Bouma, M. G., van den Wildenberg, F. A., Buurman, W. A. (1996). Adenosine inhibits cytokine release and expression of adenosine molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol* 270(2 Pt1): C522-C529.
- Brosh, R. M. (2013). DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nat Rev Cancer* 13(8): 542-558.
- Brosh, R. M., Bohr, V. A. (2007). Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res* 35(22): 7527-7544.
- Brosh, R. M., Karmakar, P., Sommers, J. A., Yang, Q., Wang, X. W., Spillare, E. A., Harris, C. C., Bohr, V. A. (2001). p53 modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 276(37): 35093-35102. a
- Brosh, R. M., Orren, D. K., Nehlin, J. O., Ravn, P. H., Kenny, M. K., Machwe, A., Bohr, V. A. (1999). Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J Biol Chem* 274(26): 18341-18350.
- Brosh, R. M., von Kobbe, C., Sommers, J. A., Karmakar, P., Opresko, P. L., Piotrowski, J., Dianova, I., Dianov, G. L., Bohr, V. A. (2001). Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J* 20(20): 5791-5801. b
- Brosh, R. M., Waheed, J., Sommers, J. A. (2002). Biochemical characterization of the DNA substrate specificity of Werner-Syndrome helicase. *J Biol Chem* 277(26): 23236-23245.
- Budiawan, B., Widiastuti, D. R. (2015). In vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in calf thymus DNA upon treatment of 2'-deoxyguanosine with propyl gallate and 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone. *Makara J of Sci* 19(4): 167-176.
- Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., Sack, M. N., Kastner, D. L., Siegel, R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 208(3): 519-533.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B., Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation. *Science* 281(5383): 1677-1679.

- Canugovi, C., Misiak, M., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., Mattson, M. P., Bohr, V. A. (2014). Loss of endonuclease eight-like 1 causes defects in olfactory function in mice. *Neurobiol Aging* 36(2): 1007-1012. b
- Canugovi, C., Shamanna, R. A., Bohr, V. A. (2014). Base excision repair levels mitochondrial lysates of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35(6). 1293-1300. a
- Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernández-García, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., Vázquez-Prado, J. (2010). Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenesis responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-2 (SDF-1/CXC-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol* 77(3): 435-442.
- Cary, L. A., Han, D. C., Polte, T. R., Hanks, S. K., Guan, J. L. (1998). Identification of p130Cas as a mediation for focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* 140(1): 211-221.
- Castro, E., Ogburn, C. E., Hunt, K. E., Tilvis, R., Louhija, J., Penttinen, R., Erkkola, R., Panduro, A., Riestra, R., Piussan, C., Deeb, S. S., Wang, L., Edland, S. D., Martin, G. M., Oshima, J. (1999). Polymorphisms at the Werner locus: I. Newly identified polymorphisms ethnic variability of 1367Cys/Arg, and its stability in a population of Finnish centenarians. *Am J Med Genet* 82(5): 399-403.
- Cerrato, R., Cunnington, C., Crabtree, M. J., Antoniadis, C., Pernow, J., Channon, K. M., Böhm, F. (2012). Endothelin-1 increases superoxide production in human coronary artery bypass grafts. *Life Sci* 91(13-14):723-728.
- Chen, J. (1999). Evaluation of national assessments of intake of tert-butylhydroquinone (TBHQ). The International Programme on Chemical Safety World Health Organization. IPCS Inchem.
- Chen, Q., Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4130-4134.
- Chen, M., Nagase, M., Fujita, T., Narumiya, S., Masaki, T., Sawamura, T. (2001). Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (Lox-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE. *Biochem Biophys Res Commun* 287(4): 962-968. a
- Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., Linskens, M. H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265(2): 294-303. b
- Chen, X., Qian, S., Hoggatt, A., Tang, H., Hacker, T. A., Obukhov, A. G., Herring, P. B., Sexe, C. I. (2017). Endothelial cell-specific deletion of P2Y2 receptor promotes plaque stability in atherosclerosis-susceptible ApoE-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37(1): 72-83.
- Christoffersen, M., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A. (2017). Genetic variation in WRN and ischemic stroke: General population studies and meta-analyses. *Exp Gerontol* 89: 69-77.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133(6): 1403-1415.

- Clark, P. R., Manes, T. D., Pober, J. S., Kluger, M. S. (2007). Increased ICAM1 expression causes endothelial cell leakiness, cytoskeletal reorganization and junctional alterations. *J Invest Dermatol* 127(4): 762-774.
- Cogger, V. C., Svistounov, D., Warren, A., Zykova, S., Melcin, R. G., Solon-Biet, S. M., O'Reilly, J. N., McMahon, A. C., Ballard, J. W., Le Couteur, D. G., Lebelm M. (2014). Liver aging and pseudocapillarization in a Werner syndrome mouse model. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69(9): 1076-1086.
- Coleman, P. R., Hahn, C. N., Grimshaw, M., Lu, Y., Li, X., Brautigan, P. J., Beck, K., Stocker, R., Vadas, M. A., Gamble, J. R. (2010). Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood* 116(19): 4016-4024.
- Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9(10): 899-909.
- Cominacini, L., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., Pastorino, A., Rigoni, A., Lo Cascio, V., Sawamura, T. (2000). Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275(17): 12633-12638.
- Cominacini, L., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Pastorino, A., Rigoni, A., Nava, C., Davoli, A., Lo Cascio, V., Sawamura, T. (2003). The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells. *J Am Coll Cardiol* 41(3): 499-507.
- Cooper, M. P., Machwe, A., Orren, D. K., Brosh, R. M., Ramsden, D., Bohr, V. A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* 14(8): 907-912.
- Cooper, D., Stokes, K. Y., Tailor, A., Granger, D. N. (2002): Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2(3): 165-180.
- Crabbe, L., Jauch, A., Naeger, C. M., Holtgreve-Grez, H., Karlseder, J. (2007). Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad U S A* 104(7): 2205-2210.
- Crosby, C. V., Fleming, P. A., Argravesm W. S., Corada, M., Zanetta, L., Dejana, E., Drake, J. (2005). VE-Cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood* 105(7): 2771-2776.
- Cross, A. R., Parkinson, J. F., Jones, O. T. (1984). The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of Flavin and cytochrome b in solubilized preparations. *Biochem J* 223(2): 337-244.
- Dancker, P., Löw, I., Hasselbach, W., Wieland, T. (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta* 400(2): 407-414.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Ménissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39(25): 7559-7569.

- Darville, M. I., Eizirik, D. L. (1998). Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 41(9): 1101-1108.
- Das, A., Boldogh, I., Lee, J. W., Harrigan, J. A., Hegde, M. L., Piotrowski, J., de Souza Pinto, N., Ramos, W., Greenberg, M. M., Hazra, T. K., Mitra, S., Bohr, V. A. (2007). The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *J Biol Chem* 282(36): 26591-26602.
- Dayel, M. J., Mullins, R. D. (2004). Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol* 2(4): E91.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 155(1): 61-69.
- De Fries, R., Mistuhashi, M. (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocytes proliferation: comparison of Alamar Blue assay to 3 H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 9(2): 89-85.
- De Magalhaes, J. P., Migeot, V., Mainfroid, V., de Longueville, F., Remacle, J., Toussaint, O. (2004). No increase in senescence-associated beta-galactosidase activity in Werner-Syndrome fibroblasts after exposure to H₂O₂. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 375-378.
- Di, A., Mehta, D., Malik, A. B. (2016). ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium* 60(3): 163-173.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.
- Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res* 72(21):5441-5447.
- Dreesen, O., Stewart, C. L. (2011). Accelerated aging syndromes, are they relevant to normal human aging? *Aging* 3(9): 889-895.
- Drummond, G.R., Cai, H., Davis, M. E., Ramasamy, S., Harrison, D. G. (2000). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86(3): 347-354.
- Dumas de la Roque, E., Smeralda, G., Quignard, J. F., Freund-Michel, V., Courtois, A., Marthan, R., Muller, B., Guibert, C., Dubois, M. (2017). Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signalling. *PLoS One* 12(2): e0173044.
- Edderkaoui, M., Hong, P., Vaquero, E. C., Lee, J. K., Fischer, L., Friess, H., Buchler, M. W., Lerch, M. M., Pandol, S. J. and Gukovskaya, A. S. (2005). Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(6): G1137-G1147.

- Edgell, C. J., McDonald, C. C., Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(12): 3734-3737.
- EFSA (2006). Statement on the refined exposure assessment of tertiary-butyl hydroquinone (E319). *The EFSA Journal*.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng J., Cheresch, D. A. (1999). Selective requirement for Scr kinase during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4(6): 915-924.
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M., German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83(4): 655-666.
- Erl, W., Weber, P. C., Weber, C. (1998). Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis* 136(2): 297-303.
- Eskandani, M., Hamishehkar, H., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2014). Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem* 153: 315-320.
- Esser, S., Lampugnani, M., Corada, E., Dejana, E., Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111(Pt13): 1853-1865.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106(4): 489-498.
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am coll of cardiol* 47(8): C7-C12.
- Faller, A., Schünke, G. (2008). Der Körper des Menschen – Einführung in Bau und Funktionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart ISBN:978-3-13-329715-8.
- Fantel, A. G., Person, R. E., Tumbic, R. W., Nguyen, T. D., Mackler, B. (1995). Studies of mitochondria in oxidative embryotoxicity. *Teratology* 52(4): 190-194.
- Faragher, R. G., Kill, I. R., Hunter, J. A., Pope, F. M., Tannock, C., Shall, S. (1993). The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 12030-12034.
- Feig, D. I., Reid, T. M., Loeb, L. A. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54(7): 1890 – 1894.
- Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160(2): 171-177.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A., Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271(17): 9573-9578.

- Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H., Inoue, K. (2009). P2Y1 receptor signalling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57(3): 244-257.
- Gagné, J. P., Lachapelle, S., Garand, C., Tsofack, S. P., Coulombe, Y., Caron, M. C., Poirier, G. G., Masson, J. Y., Lebel, M. (2016). Different non-synonymous polymorphism modulate the interaction of the WRN-Protein to its protein partners and its enzymatic activities. *Oncotarget* 7(52): 85680-85696.
- Galley, H. F., Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93(1): 105-113.
- Gavard, J., Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8(11): 1223-34.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161(6): 1163-1177.
- Gharavi, N., Haggarty, S., El-Kadu, A. O. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr Drug Metab* 8: 1-7.
- Goldstein, J. L., Browns, M. S. (1976). The LDL pathway in human fibroblasts: a receptor-mediated mechanism for the regulation of cholesterol metabolism. *Curr Top Cell Regul* 11: 147-181.
- Gonzales, R. J., Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 15(3): 257-259.
- Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., Ryan, K. M., Kittas, C., Papavassiliou, A. G. (2003). p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J* 22(7): 1567-1578.
- Goto, M., Hayata, K., Chiba, J., Matsuura, M., Iwaki-Egawa, Watanabe, Y. (2015). Multiplex cytokine analysis of Werner syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 4(4): 190-197.
- Goto, M., Ishikawa, Y., Sugimoto, M., Furuichi, Y. (2013). Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917~2008). *Biosci Trends* 7(1): 13–22.
- Goto, M., Matsuura, M. (2008). Secular trends towards delayed onsets of pathologies and prolonged longevities in Japanese patients with Werner syndrome. *Biosci Trends* 2(2): 81- 87.
- Gottipati, P., Vischioni, B., Schultz, N., Solomons, J., Bryant, H. E., Djureinovic, T., Issaevam N., Sleeth, K., Sharma, R. A., Helleday, T. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res* 70(13): 5389-5398.
- Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J., Loeb, L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17(1): 100-102.
- Grulich-Henn, J., Müller-Berghaus, G. (1990). The role of vascular endothelial cells in the regulation of fibrinolysis. *Z Kardiol* 78(6): 25-29.

- Guerra, L., Guidi, R., Slot, I., Callegari, S., Sompallae, R., Pickett, C. L., Astrom, S., Eisele, F., Wolf, D., Sjogren, C., Masucci, M. G., Frisan, T. (2001). Bacterial genotoxin triggers FEN1-dependent RhoA activation, cytoskeleton remodeling and cell survival. *J Cell Sci* 124(Pt 16): 2735-2742.
- Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16(6): 259-264.
- Hajas, G., Bacsi, A., Aguilera-Aguirre, L., Hedge, M. L., Tapas, K. H., Sur, S., Radak, Z., Ba, X., Boldogh, I. (2013). 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 links DNA repair to cellular signalling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radiac Biol Med* 61: 384-394.
- Hallbach, J. (2011). Klinische Chemie und Hämatologie - Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium. In: Georg Thieme Verlag. 3. überarbeitete Auflage. Stuttgart.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 18(5): 703-710.
- Harrigan, J. A., Fan, J., Momand, J., Perrino, F. W., Bohr, V. A., Wilson, D. M. (2007). WRN exonuclease activity is blocked by DNA termini harbouring 3' obstructive groups. *Mech Ageing Dev* 128(3): 259-266.
- Harrigan, J. A., Opresko, P. L., von Kobbe, C., Kedar, P. S., Prasad, R., Wilson, S. H., Bohr, V. A. (2003). The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J Biol Chem* 278(25): 22686-22695.
- Harrigan, J. A., Wilson, D. M., Prasad, R., Opresko, P. L., Beck, G., May, A., Wilson, S. H., Bohr, V. A. (2006). The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase β . *Nucleic acids Res* 34(2): 745-754.
- Hellström, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 455(7129): 776-780.
- Helt, C. E., Cliby, W. A., Keng, P. C., Bambara, R. A., O'Reilly, M. A. (2005). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* 280 (2): 1186-1192.
- Henseleit, U., Steinbrink, K., Sunderkotter, C., Goebeler, M., Roth, J., Sorg, C. (1994). Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp Dermatol* 4(5): 249-256.
- Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., Lewington, S. (2016). Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ Res* 118(4): 535-546
- Higashi, T., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kondo, H., Kawato, M., Horiguchi, M., Okuda, T., Okawa, K., Fukai, S., Nureki, O., Kita, T., Horiuchi, H. (2008). Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *J Biol Chem* 283(13): 8746-8755.
- Higgs, H. N., Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and Pip2 of Wiskott-Aldrich syndrome Protein (WASP) stimulates Actin Nucleation by Arp2/3 Complex. *J Cell Biol* 150(6): 1311-1320.

- Hillyer, P., Mordet, E., Flynn, G., Male, D. (2003). Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect migration. *Clin Exp Immunol* 134(3): 431-441.
- Hippenstiel, S., Krüll, M., Ikemann, A., Risau, W., Clauss, M., Suttorp, N. (1998). VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol* 274(5Pt1): L678-684.
- Hobson, B., Denekamp, J. (1984). Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49(4): 405-413.
- Hofmann, S., Grasverger, H., Jung, P., Bidlingmaier, M., Vlotides, J., Janssen, O. E., Landgraf, R. (2002). The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with reduction of VE-cadherin expression. *Eur J Med Res* 7(4): 171-176.
- Hu, J.-S., Fen, H., Zeng, W., Lin, G.-X., Xi, X. G. (2005). Solution structure of a multifunctional DNA- and protein-binding motif of human Werner-Syndrome protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18379-18384.
- Huang, S., Lee, L., Hanson, N. B., Lenaerts, C., Hoehn, H., Poot, M., Rubin, C. D., Chen, D. F., Yang, C. C., Juch, H., Dorn, T., Spiegel, R., Oral, E. A., Abid, M., Abid, M. *et al.* (2006). The spectrum of WRN mutations in Werner-Syndrome patients. *Hum Mutat* 27(6): 558-567.
- Huang, T. T., Wuerzberger-Davism S. M., Wu, Z. H., Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115(5): 565-576.
- Hughes, A. K., Stricklett, P. K., Padilla, E., Kohan, D. E. (1996). Effects of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. *Kidney Int* 49(1): 181-189.
- Infante, J., Llorca, J., Mateo, I., Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Quintana, C., Sánchez-Juan, P. (2012). Interaction between poly (ADP-ribose) polymerase 1 and interleukin 1A genes is associated with Alzheimer's disease risk. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23(4): 215-218.
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J., Eriksson, J. E. (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signalling. *Exp Cell Res* 313(10): 2050-2062.
- Janssen-Heininger, Y. M., Mossmann, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J. S., Rhee, S. G., van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45(1): 1-17.
- Jeon, B. H., Gupta, G., Park, Y. C., Qi, B., Haile, A., Khanday, F. A., Liu, Y. X., Kim, J. M., Ozaki, M., White, A. R., Berkowitz, D. E., Irani, K. (2004). Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. *Circ Res* 95(9): 902-910.
- Jiang, A., Gao, H., Kelley, M. R., Qiao, X. (2011). Inhibition of APE1/Ref-1 redox activity with APX3330 blocks retinal angiogenesis in vitro and in vivo. *Vision Res* 51(1): 93-100.
- Jiang, Y., Shan, S., Chi, L., Zhang, G., Gao, X., Li, H., Zhu, X., Yang, J. (2016). Methyl methanesulfonate induces necroptosis in human lung adenoma A549 cells through the PIG-3-reactive oxygen species pathways. *Tumour Biol* 37(3): 3785-3795.

- Jin, H. J., Lee, H. J., Heo, J., Lim, J., Kim, M., Kim, M. K., Nam, H. Y., Hong, G. H., Cho, Y. S., Choi, S. J., Kim, I.-G., Shin, D.-M., Kim, S. W. (2016). Senescence-associated MCP1 secretion is dependent on a decline in BMI1 in human mesenchymal stromal cells. *Antioxid Redox Signal* 24(9): 471-485.
- Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., Blusztajn, J. K., Trinkaus-Randall, V., Weisman, G. A., Robson, S. C. (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 93(4): 735-742.
- Kamada, N., Kodama, T., Suzuki, H. (2001). Macrophage scavenger receptor (SR-A I/II) reduced diet-induced atherosclerosis in C57BL/6J mice. *J Atheroscler Thromb* 8(1). 1-6.
- Kalam, A. M., Haraguchi, K., Chandani, S., Loechler, E. L., Moriya, M., Greenberg, M. M., Basu, A. K. (2006). Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucleic acids Res* 34(6): 2305-2315.
- Kanazawa, S., Fujiwara, T., Matsuzaki, S., Shingaki, K., Tanuguchi, M., Miyata, S., Tohyama, M., Sakai, Y., Yano, K., Hosokawa, K., Kubo, T. (2010). bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS One* 5(8): e12228.
- Karahalil, B., Girard, P. M., Boiteuxm S., Dizdaroglu, M. (1998). Substrate specificity of the ogg2 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucleic acids Res* 26(5): 1228-1233.
- Karbach, S., Jansen, T., Horke, S., Heeren, T., Scholz, A., Coldewey, M., Karpi, A., Hasuding, M., Kröller-Schön., Oelze, M., Münzel, T., Daiber, A. (2012). Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells- a comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. *J Diabetes Complications* 26(3): 155-162.
- Karmakar, P., Snowden, C. M., Ramsden, D. A. and Bohr, V. A. (2002). Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus. *Nucleic Acids Res* 30(16): 3583-3591.
- Kassack, M. U., Höfgen, B., Lehmann, J., Eckstein, N., Quillan, J. M., Sadée, W. (2002). Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen* 7(3): 233-246.
- Kawano, A., Hayakawa, A., Kojima, S., Tsukimoto, M., Sakamoto, H. (2015). Purinergic signalling mediates oxidative stress in UVA-exposed THP1 cells. *Toxicol Rep* 2: 391-400.
- Khadka, P., Hsu, J. K., Veith, S., Tadokoro, T., Shamanna, R. A., Mangerich, A., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2015). Differential and concordant roles for Poly(ADP-ribose) polymerase 1 and Poly (ADP-Ribose) in regulating WRN and RECQL5 activities. *Mol Cell Biol* 35(23): 3974-3989.
- Khaidakov, M., Wang, X., Mehta, J. L. (2011). Potential involvement of LOX-1 in functional consequences of endothelial senescence. *PLoS ONE* 6(6): e20964.

- Kim, S. R., Bae, Y. H., Bae, S. K., Choi, K. S., Yoon, K. H., Koo, T. H., Jang, H. O., Yun, I., Kim, K. W., Kwon, Y. G., Yoo, M. A., Bae, M. K. (2008). Visfatin enhances ICAM1 and VCAM1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1783(5): 886-895.
- Kim, K., Biade, S., Matsumoto, Y. (1998). Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* 273(15): 8842-8848.
- Kim, C. S., Son, S. J., Kim, E. K., Kim, S. N., Yoo, D. G., Ryoo, S. W., Lee, S. D., Irani, K., Jeon, B. H. (2006). Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor 1 inhibits monocyte adhesion in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 69(2): 520- 526.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. *J Biol Chem* 274(20): 13908-13914.
- Kitano, K. (2014). Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Front Genet* 29(5): 366.
- Kitano, K., Kim, S. Y., Hakoshima, T. (2010). Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure* 18(2): 177-187.
- Kitano, K., Yoshihara, N., Hakoshima, T. (2007). Crystal structure of the HRDC domain of human Werner-Syndrome protein, WRN. *J Biol Chem* 282(4): 2717-2728.
- Klungland, A., Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision repair: reconstruction with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 16(11): 3341-3348.
- Kohn, E. C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R. P., Liotta, L. A. (1995). Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1307-1311.
- Kou, B., Ni, J., Vatish, M., Singer, D. R. (2008). Xanthine oxidase interaction with vascular endothelial growth factor in human endothelial cell angiogenesis. *Microcirculation* 15(3):251-267.
- Kramer, R. H., Cheng, Y. F., Clyman, R. (1990). Human microvascular endothelial cells use beta 1 and beta 3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *J Cell Biol* 111(3): 1233-1243.
- Kraus, A., Grampp, S., Goppelt-Struebe, Schreiber, R., Kunzelmann, K., Peters, D. H. M., Leipziger, J., Schley, G., Schödel, J., Eckardt, K.-U., Buchholz, B. (2016). P2Y2R is a direct target of HIF1a and mediates secretion-dependent cyst growth of renal cyst-forming epithelial cells. *Purifying Signal* 12(4): 687-695.
- Krouwer, V. J., Hekking, L. H., Langelaar-Makkinje, M., Regan-Klapisz, E., Post, J. A. (2012). Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vasc Cell* 4(1): 12.
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4651-4655.

- Kucherlapati, M., Yangm K., Kuraguchi, M., Zhao, J., Lia, M., Heyer, J., Kane, M. F., Fan, K., Russell, R., Brown, A. M., Kneitz, B., Edelman, W., Kolodner, R. D., Lipkin, M., Kucherlapati, R. (2002). Haploinsufficiency of flap endonuclease (Fen1) leads to rapid tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 9924-9949.
- Kudlow, B. A., Kennedy, B. K., Monnat, R. J. (2007). Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 394-404.
- Kyng, K. J., May, A., K vraa, S., Bohr, V. A. (2003). Gene expression profiling in Werner-Syndrome closely resembles that of normal ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (21): 12259-12264.
- Kyng, K. J., May, A., Stevnsner, T., Becker, K. G., K lvra, A., Bohr, V. A. (2005). Gene expression responses to DNA damage are altered in human aging and in Werner syndrome. *Oncogene* 24(32): 5026-5042.
- Kzhyshkowska, J., Neyen, C., Gordon, S. (2012). Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunology* 217(5): 492-502.
- Labb , A., Lafleur, V. N., Patten, D. A., Robitaille, G. A., Garand, C., Lamalice, L., Lebel, M., Richard, D. E. (2012). The Werner syndrome gene product (WRN): a repressor of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp Cell Res* 318(14): 1620-1632.
- Lai, P. F., Mohamed, F., Monge, J. C., Steward, D. J. (2003). Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc Res* 59(1): 160-168.
- Lakin, N. D., Hann, B. C., Jackson, S. P. (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18(27): 3889-3995.
- Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J., Yasui, A. (2005). Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *J Cell Sci* 118(18): 4153-4162.
- Larsen, E., Gran, C., Saether, B. E., Seeberg, E., Klungland, A. (2003). Proliferation failure and gamma radiation sensitivity of Fen1 null mutant mice at the blastocyst stage. *Mol Cell Biol* 23(15): 5346-5353.
- Larsen, N. B., Hickson, I. D. (2013). RecQ helicases: Conserved guardians of genomic integrity. *Adv Exp Med Biol* 767: 161-184
- Lawley, P. D., Shah, S. A. (1972). Reaction of alkylating mutagens and carcinogens with nucleic acids: detection and estimation of a small extent of methylation at O-6 of guanine in DNA by methyl methanesulfonate in vitro. *Chem Biol Interact* 5(4): 286-288.
- Leavesley, D. I., Schwartz, M. A., Rosenfeld, M., Cheresh, D. A. (1993). Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol* 121(1): 163-170.
- Ledebur, H. C., Parks, T. P. (1995). Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 270(2): 933-943.

- Lee, M. E., Dhadly, M. S., Temizer, D. H., Clifford, J. A., Yoshizumi, M., Quertermous, T. (1991). Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem* 266(28): 19034-19039.
- Lee, K. S., Kim, S. R., Park, S. R., Park, H. S., Min, K. H., Lee, M. H., Jin, S. M., Jin, G. Y., Yoo, W. H., Lee, Y. C. (2006). Hydrogen peroxide induces vascular permeability via regulation of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(2): 190-197.
- Lee, C. W., Lin, C. C., Lee, I. T., Lee, H. C., Yang, C. M. (2011). Activation and induction of cytosolic phospholipase A₂ by TNF α mediated through Nox2, MARKs, NF-kB, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 226(8): 2103-2114. a
- Lee, E., Seo, E. Y., Kwon, Y., Ha, H. (2011). Rapid and reliable measurement for evaluating directly the reactivity of N-acetylcysteine with glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids. *Anal Chem* 83(5). 1518-1522. b
- Lefer, A. M., Lefer, D. J. (1996). The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 32(4): 743-751.
- Ley, K. (2013). Leukocytes talking to VE-Cadherin. *Blood* 122(14): 2300-2301.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-689.
- Li, N., Banin, S., Ouyang, H., Li, G. C., Courtois, G., Shiloh, Y., Karin, M., Rotman, G. (2001). ATM is required for I κ B kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 276(12): 8898-8903.
- Li, B., Iglesias-Pedraz, J. M., Chen, L. Y., Yin, F., Cadenas, E., Reddy, S., Comai, L. (2014). Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging cell* 13(2): 367-378.
- Li, H., Luo, Y.-F., Wang, Y.-S., Yang, Q., Xiao, Y.-L., Cai, H.R., Xie, C.-M. (2018). Using ROS as a second messenger, NADPH Oxidase 2 mediates macrophage senescence via interaction with NF kB during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Oxid Med Cell Longev*
- Li, B., Navarro, S., Kasahara, N., Comai, L. (2004). Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* 279(14): 13659–13667.
- Liang, W., McDonald, P., McManus, B., van Breemen, C., Wang, X. (2008). P2Y2 receptor-mediated Ca²⁺ signaling and spontaneous Ca²⁺ releases in human valvular myofibroblasts. *Int Heart J* 49(2): 221-236.
- Lidington, E. A., Moyes, D. L., Cormack, A. M., Rose, M. L. (1999). A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol* 7(4): 239-246.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human non-homologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283(1): 1-5.

- Liu, Q., Berchner-Pfannschmidt, U., Moller, U., Brecht, M., Wotzlaw, C., Acker, H. A. (2004). A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12): 4302–4307.
- Liu, D., Croteau, D. L., Souza-Pinto, N., Pitta, M., Tian, J., Wu, C., Jiang, H., Mustafa, K., Keijzers, G., Bohr, V. A., Mattson, M. P. (2011). Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(2): 680-692.
- Lu, Z. J., Ren, Y. Q., Wang, G. P., Song, Q., Li, M., Jiang, S. S., Ning, T., Guan, Y. L., Luo, F. (2009). Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EA.hy926 and its parent cell line A 549. *J Exp Clin Cancer Res* 28: 16.
- Luissint, A. C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., Couraud, P. O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9(1): 23.
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2009). Taschenlehrbuch Histologie. In: Georg Thieme Verlag. 3. Auflage. Stuttgart.
- Luo, J., Hosoki, K., Bacsim A., Radak, Z., Hedge, M. L., Sur, S., Hazra, T. K., Brasier, A. R., Ba, X., Boldogh, I. (2014). 8-oxoguanine DNA glycosylase 1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α -smooth muscle actin polymerization. *Free Radic Biol Med* 73: 430-438.
- Luo, P., Yan, M., Frohlich, E. D., Mehta, J. L., Hu, C. (2011). Novel concepts in the genesis of hypertension: role of LOX-1. *Cardiovasc Drugs Ther* 25(5): 441-449.
- Lupu, F., Heim, D. A., Bachmann, F., Hurni, M., Kakkar, V. V., Kruithof, E. K. (1995). Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(9): 1444-14455.
- Ma, H., Matsunaga, H., Li, B., Schieffer, B., Marrero, M. B., Ling, B. N. (1996). Ca^{2+} channel activation by platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation and Ras guanine triphosphate-binding proteins in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 97(10): 2332-2341.
- Ma, L., Raycroft, L., Asa, D., Anderson, D. C., Geng, J. G. (1994): A sialoglycoprotein from human leukocytes functions as a ligand for P-selectin. *J Biol Chem* 269(4): 27739–27746.
- MacMicking, J. D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D. S., Trumbauer, M., Stevens, L., Xie, Q. W., Sokol, K., Hutchinson, N. (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81(4): 641-650.
- Marino, F., Vindigni, A., Onesti, S. (2013). Bioinformatic analysis of RecQ4 helicases reveals the presence of a RQC domain and a Zn knuckle. *Biophys Chem* 177-178: 34–39.
- Martikainen, P., Isaacs, J. (1990). Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells. *Prostate* 17(3): 175-187.
- Martin, G.M., Oshima, J., Gray, M. D., Poot, M. (1999). What geriatricians should know about the Werner syndrome. *J Am Geriatr Soc* 47(9): 1136–1144.

- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110(5): 563-574.
- Massip, L., Garand, C., Labbé, A., Perreault, E., Turaga, R. V. N., Bohr, V. A., Lebel, M. (2010). Depletion of WRN protein causes RACK1 to activate several protein kinase C isoforms. *Oncogene* 29(10): 1486-1497.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol* 14(9): 6187-6197.
- Matsumoto, T., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. (1997). Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nat Genet* 16(4): 335-336.
- Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y., Takisawa, H. (2006). The N-terminal noncatalytic region of *Xenopus* RecQ4 is required for chromatin binding of DNA polymerase alpha in the initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* 26(13): 4843-4852.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
- Michaelis, U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 71(21): 4131-4148.
- Mietus-Snyder, M., Frieria, A., Lass, C. K., Pitas, R. E. (1997). Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(5): 969-978.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Oshida, Y., Yoshida, H., Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105(13): 1541-1544.
- Mizutani, T., Ishizaka, A., Furuichi, Y. (2015). The Werner protein acts as a coactivator of nuclear factor kB (Nf-kB) on HIV 1 and Interleukin 8 (IL 8) promoters. *J Biol Chem* 290(30): 18391-18399.
- Mohamed, F., Monge, J. C., Gordon, A., Cernacek, P., Blais, D., Stewart, D. J. (1995). Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(1): 52-57.
- Moles, R., Bai, X. T., Chaib-Mezreg, H., Nicot, C. (2016). WRN-targeted therapy using inhibitors NSC 19630 and NSC 617145 induce apoptosis in HTLV-transformed adult T-cell leukemia cells. *J Hematol Oncol* 9: 121.
- Monti, D., Cossarizza, A., Chiricolo, M., Vannini, P., Ciavarella, A., Franceschi, C. (1992). Sensitivity to genotoxic agents and immunological status in a case of Werner's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 663: 429-431.
- Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2001). Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin.1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(4): 961-965.

- Morel, D. W., Hessler, J. R., Chisolm, G. M. (1983). Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 24(8): 1070-1076.
- Morita, H., Kurihara, H., Sugiyama, T., Hamada, C., Yazaki, Y. (1999). A polymorphic variant C1367R of the Werner helicase gene and atherosclerotic diseases in the Japanese population. *Thromb Haemost* 82(1): 160-161.
- Moriwaki, H., Kume, N., Sawamura, T., Aoyama, T., Hoshikawa, H., Ochi, H., Nishi, E., Masaki, T., Kita, T. (1998). Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(10): 1541-1547.
- Moser, M. J., Holley, W. R., Chatterjee, A., Mian, I. S. (1997). The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res* 25(24): 5110-5118.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping and formation of branching networks filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6181-6186.
- Mushegian, A. R., Bassett, D. E. Jr., Boguski, M. S., Bork, P., Koonin, E. V. (1997). Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5831-5836.
- Myers, C. L., Wertheimer, S. J., Schembri, K. J., Parks, T., Wallace, R. W. (1992). Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 263(4 Pt 1): C767-C772.
- Nakagawa, Y. (1996). Effects of dicoumarol on cytotoxicity caused by tert-butylhydroquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 84(2): 63-8.
- Navarro, P., Ruco, L., Dejana, E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* 140(6): 1475-1484.
- Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D., Wilcox, J. N. (1991). Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88(4): 1121-1127.
- Nemes, Z., Dietz, R., Luth, J. B. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 35(11): 1475-1476.
- Niecknig, H., Tug, S., Rexes, B. D., Kirsch, M., Fandrey, J., Berchner-Pfannschmidt, U. (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase under mild hypoxia. *Free Radic Res* 46(6): 705-717.
- Noren Hooten, N., Fitzpatrick, M., Kompaniez, K., Jacob, K. D., Moore, B. R., Nagle, J., Barnes, J., Lohani, A., Evans, M. K. (2012). Coordination of DNA repair by NEIL1 and PARP1: a possible link to aging. *Aging* 4(10): 674-685.

- Nübel, T., Dippold, W, Kaina, B., Fritz, G. (2004). Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* 25(8): 1335-1344.
- Nyunoya, T., Monick, M. M., Klingelutz, A. L., Glaser, H., Cagley, J. R., Brown, C. O., Matsumoto, E., Aykin-Burns, N., Spitz, D. R., Oshima, J., Hunninghake, G. W. (2009). Cigarette smoke induces cellular senescence via Werner's syndrome protein down-regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 179(4): 279-287.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17): 5421-5426.
- Ogburn, C. E., Oshima, J., Poot, M., Chen, R., Hunt, K. E., Gollahon, K. A., Rabinovitch, P. S., Martin, G. M. (1997). An apoptosis-induced genotoxin differentiates heterozygic carries for Werner helicase mutations from wild-type and homozygous mutants. *Hum Genet* 101(2): 121-125.
- Opresko, P. L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kølvrå, S., May, A., Seidman, M. M., Bohr, V. A. (2004). The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 14(6): 763-774.
- Oshima, J., Kato, H., Maezawa, Y., Yokote, K. (2018). RECQ helicase disease and related progeroid syndromes: RECQ 2018 meeting. *Mech Ageing Dev* 173: 80-83
- Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., Vallee, R. B., Gundersen, G. G. (2001). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* 11(9): 1536-1541.
- Palmer, C. M., Serafini, D. M., Schellhorn, H. E. (1997). Near ultraviolet radiation (UVA and UVB) causes a formamidopyrimidine glycosylase-dependent increase in G to T transversions. *Photochem Photobiol* 65(3): 543-549.
- Park, Y. M., Drazba, J. A., Vasanji, A., Egelgoff, T., Febbraio, M., Silverstein, R. L. (2012). Oxidized LDL/CD36 interaction induced loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion. *Mol Biol Cell* 23(16): 3057-3068.
- Park, S.-H., Shin, M. J., Kim, D. W., Park, J., Choi, S. Y., Kang, Y. H. (2015). Blockade of monocyte-endothelial trafficking by transduced Tat-superoxide dismutase protein. *Int J Mol Med* 27(2): 387-397.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5(8): 741-747.
- Pascucci, B., Russo, M. T., Crescenzi, M., Bignami, M., Dogliotti, E. (2005). The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 33(1): 280-288.
- Patibandla, P. K., Tyagi, N., Dean, W. L., Tyagi, S. C., Roberts, A. M., Lominadze, D. (2009). Fibrinogen induces alterations of endothelial cell tight junction proteins. *J Cell Physiol* 221(1): 195-203.

- Pelegrí, C., Canudas, A. M., del Valle, J., Casadesus, G., Smith, M. A., Camins, A., Pallàs, M., Vilaplana (2007). Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *J Mech Ageing Dev* 128(9): 522-528.
- Pestonjamas, K. N., Forster, C., Sun, C., Gardiner, E. M., Bohl, B., Weiner, O., Bokoch, G. M., Glogauer, M. (2006). Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood* 108(8): 2814-2820.
- Pham, A. N., Xing, G., Miller, C. J., Waite, T. D. (2013). Fenton-like copper redox chemistry revisited: hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of catalysis* 301: 54-64.
- Pines, A., Perrone, L., Bivi, N., Romanello, M., Damante, G., Gulisano, M., Kelley, M. R., Quadrioglio, Tell, G. (2005). Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP. *Nucleic Acids Res* 33(14): 4379-4394.
- Pommier, Y., Diasio, R. B. (2006). DNA Replication and human disease – Pharmacological Agents that target DNA replication. Cold spring harbour laboratory press. Chapter 26.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S. L., Waterman-Storer, C. G., Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 205(5691): 1782-1786.
- Popuri, V., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2010). Substrate specific stimulation of NEIL1 by WRN but not the other human RecQ helicases. *DNA repair (Amst)* 9(6): 636-642.
- Poston, R. N., Haskard, D. O., Coucher, J. R., Gall, N. P., Johnson-Tidey, R. R. (1992). Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140(3): 665-673.
- Potter, M D., Barbero, S., Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-Cadherin prevents binding of p120-and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 280(36): 3106-3112.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J., Wilson, S. H. (2001). DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem* 276(35): 32411-32412.
- Quehenberger, P., Bierhaus, A., Fasching, P., Müller, C., Klevesath, M., Hong, M., Stier, G., Sattler, M., Schleicher, E., Speiser, W., Nawroth, P. P. (2000). Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 49(9): 1561-1570.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013). An improvement of the 2^{-delta delta CT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 3(3): 71-85.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J., L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7): 1125-1131.
- Reynolds, P., Cooper, S., Lomax, M., O'Neill, P. (2015). Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. *Nucleic Acids Res* 43(8): 4028-4038.

- Rodríguez-López, A. M., Jackson, D. A., Iborra, F., Cox, L. S. (2002). Asymmetry of DNA replication fork progression in Werner's syndrome. *Ageing Cell* 1(1): 30-39.
- Rose, R., Wayand, M., Lammers, M., Oshizaki, T., Ahmadian, M. R., Wittinghofer, A. (2005). Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* 435(7041): 513-518.
- Ryter, S. W., Choi, A. M. (2005). Heme oxygenase 1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal* 7(1-2): 80-91.
- Saha, B., Lessel, D., Nampoothiri, S., Rao, A. S., Hisama, F. M., Peter, D., Bennet, C., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Martin, G. M., Kubisch, C., Oshima, J. (2013). Ethnic-specific WRN mutations in South Asian Werner syndrome patients: potential founder effect in patients with Indian or Pakistani ancestry. *Mol Genet Genomic Med* 1(1): 7-14.
- Saintigny, Y., Makiendo, K., Swanson, C., Emond, M. J., Monnat, R., J. (2002). Homologous recombination resolution defect in Werner syndrome. *Mol Cell Biol* 22(20): 6971-6978.
- Sakamoto, S., Nishikawa, K., Heo, S. J., Goto, M., Furuichi, Y. and Shimamoto, A. (2001). Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells* 6(5): 421-430.
- Sakurai, K., Cominacini, L., Garbin, U., Fratte Pasini, A., Sasaki, N., Takuwa, Y., Masaki, T., Sawamura, T. (2004). Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via cooperative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 173-180.
- Sallee, J. L., Wittchen, E. S., Burridge, K. (2006). Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281(24): 16189-16192.
- Samanta, S., Karmakar, P. (2012). Recruitment of HRDC domain of WRN and BLM to the sites of DNA damage induced by mitomycin C and methyl methanesulfonate. *Cell Biol Int* 36(10): 873-881.
- Sandoo, A., Veldhuijzen van Zanten, J.C.S., Metsios, G. S., Carroll, D., Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J* 4:302-312.
- Sandoval, R., Malik, A. B., Minshall, R. D., Kouklis, P., Ellis, C. A., Tiruppathi, C. (2001). Ca²⁺ signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* 533(2): 433-445.
- Sans, M., Panés, J., Ardite, E., Elizalde, J. I., Acre, Y., Elena, M., Palacín, A., Fernández-Checa, J. C., Anderson, D. C., Lobb, R., Pirué, J. M. (1999). VCAM1 and ICAM1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 116(4): 874-883.
- Sanz, M. J., Hartnell, A., Chisholm, P., Williams, C., Davies, D., Weg, V. B., Feldmann, M., Bolanowski, M. A., Lobb, R. R., Nourshargh, S. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on alpha4 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 adhesion pathways. *Blood* 90(10): 4144-4152.
- Sapieha, P., Mallette, F. A. (2018). Cellular Senescence in postmitotic cells: beyond growth arrest. *Trends Cell Biol* 28(8): 595-607.

- Sargolzaeiaval, F., Zhang, J., Schleit, J., Lessel, D., Kubisch, C., Precioso, D. R., Sillence, D., Hisama, F. M., Dorschner, M., Martin, G. M., Oshima, J. (2018). CTC1 mutations in a brazilian family with progeroid features and recurrent bone fractures. *Mol Genet Genomisch Med* 6(6): 1148-1156.
- Sarkar, R., Gordon, D., Stanley, J. C., Webb, R. C. (1997). Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): H1810-1818.
- Sathanoori, R., Bryl-Gorecka, P., Müller, C. E., Erb, L., Weismann, G. A., Olde, B., Erlinge, D. (2017). P2Y2 receptor modulates shear stress-induced cell alignment and actin stress fibers in human umbilical vein endothelial cells. *74(4)*: 731-746.
- Sathanoori, R., Swärd, K., Olde, B., Erlinge, D. (2015). The ATP receptors P2X7 and P2X4 modulate high glucose and palmitate-induced inflammatory response in endothelial cells. *PLoS One* 10(5): e0125111.
- Satoh, M., Imai, M., Sugimoto, M., (1999). Prevalence of Werner's syndrome heterozygotes in Japan. *Lancet* 353(9166): 1766.
- Sawant, D. A., Tharakan, B., Adekanbi, A., Hunter, F. A., Smythe, W. R., Childs, E. W. (2011). Inhibition of VE-cadherin proteasomal degradation attenuates microvascular hyperpermeability. *Microcirculation* 18(1): 46-55.
- Sawant, D. A., Tharakan, B., Wilson, R. L., Hayden, M. D., Stagg, W., Hunter, F., A., Childs, E. W. (2013). Regulation of TNF α -induced microvascular endothelial hyperpermeability by recombinant Bcl-xL. *J Surg Res* 184(1): 628-637.
- Schwartz, S. M., Benditt, E. P. (1977). Aortic endothelial cell replication. I. Effects of age and hypertension in the rat. *Circ Res* 41(2): 248-255.
- Schwartz, S. M., Gajdusek, C. M., Selden, S. C. (1981). Vascular wall growth control: the role of the endothelium. *Atherosclerosis* 1(2): 107-126.
- Scott-Burden, T., Vanhoutte, P. M. (1994). Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 21(1): 91-97.
- Seco-Cervera, M., Spis, M., García-Giménez, J. L., Ibanez-Cabellos, J. S., Velázquez-Ledesma, A., Esmorís, I., Banuls, S., Pérez-Machado, G., Pallardó, F. V. (2014). Oxidative stress and antioxidant response in fibroblasts from Werner and atypical Werner syndrome. *Aging* 6(3): 231-245.
- Senra, J. M., Telfer, B. A., Cherry, K. E., McCrudden, C. M., Hirst, D. G., O'Connor, M., J., Wedge, S. R., Stratford, I. J. (2011). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase 1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft. *Mol Cancer Ther* 10(10): 1949-1658.
- Seye, C. I., Yu, N., González, F. A., Erb, L., Weisman, G. A. (2004). The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem* 279(34): 35679-35686.

- Seye, C. I., Yu, N., Jain, R., Kong, Q., Minor, T., Newton, J., González, F. A., Erb, L., Weisman, G. A. (2003). The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecular-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 278(27): 24960-24965.
- Shamanna, R. A., Lu, H., de Freitas, J. K., Tian J., Croteau D. L., Bohr, V. A. (2016). WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Commun* 7: 13785.
- Shang, F., Zhang, J., Li, Z. (2016). Cardiovascular protective effect of metformin and telmisartan: reduction of PARP1 activity via the AMPK-PARP1 cascade. *PLoS One* 11(3): e0151845.
- Shen, J., Loeb, L. A. (2001). Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mech Ageing Dev* 122(9): 921-944.
- Si, X., Shao, C., Li, J., Jia, S., Tang, W., Zhang, J., Yang, J., Wu, X., Luo, Y. (2018). Loss of p21 promoted tumorigenesis in the background of telomere dysfunctions induced by TRF2 and Wrn deficiency. *Int J Biol Sci* 14(2): 165-177.
- Sidorova, J. M., Nianzhen, L., Folch, A., Monnat, R., J. Jr. (2008). The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest. *Cell Cycle* 7(6): 796-807.
- Singh, R. B., Mengi, S. A., Xu, Y. J., Arneja, A. S., Dhalla, N. S. (2002). Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol* 7(1): 40-53.
- Sirois, M. G., Edelman, E. R. (1997). VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 272(6Pt2): H2746-56.
- Skaria, T., Burgener, J., Bachli, E., Schoedon, G. (2016). IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A Signaling. *PLoS One* 11(5): e0156002.
- Spiering, D., Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes Migr* 5(2): 170-180.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., Borune, H. R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160(3): 375-385.
- Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Kunkel, S. L., Andjelkovic, A. V. (2003). Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction opening: signalling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* 116(Pt 22): 4615-4628.
- Stasek, J. E., Jr, Patterson, C. E., Garcia, J.G. (1992). Protein kinase C phosphorylates caldesmon77 and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Cell Physiol* 153(1): 62-75.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19(3): 2109-2117.

- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3225-3230.
- Sun, C. X., Downey, G. P., Zhu, F., Koh, A. L. Y., Thang, H., Glogauer, M. (2004). Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood* 104(12): 3758-65.
- Sun, J. Hu, H., Ren, X., Simpkins, J. W. (2016). Tert-butylhydroquinone compromises survival in murine experimental stroke. *Neurotoxicol Teratol* 54: 15-21.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M. *et al.* (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386(6622): 292–296. a
- Suzuki, N., Shimamoto, A., Imamura, O., Kuromitsu, J., Kitao, S., Goto, M., Furuichi, Y (1997). DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res* 25(15): 2973–2978. b
- Tadokoro, T., Rybanska-Spaeder, I., Kulikowicz, T., Dawut, L., Oshima, J., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2013). Functional deficit associated with a missense Werner-Syndrome mutation. *DNA Repair (Amst)* 12(6): 414–421.
- Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y., Sugimoto, M. (1997). Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 15(16): 1911-1920.
- Takaishi, H., Tanuguchi, T., Takahashi, A., Ishikawa, Y., Yokoyama, M. (2003). High glucose accelerates MCP1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 122-128.
- Takei, A., Huang, Y., Lopes-Virella, M. F. (2001). Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* 154(1): 79-86.
- Takemoto, M., Mori, S., Kuzuya, M., Yoshimoto, S., Shimamoto, A., Igarashi, M., Tanaka, Y., Miki, T., Yokote, K. (2013). Diagnostic criteria for Werner-Syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int* 13(2): 475-481.
- Taguchi, K., Motohata, H., Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16(2): 123-140.
- Taylor, D. E., Ghio, A. J., Piantadosi, C. A. (1995). Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 316(1): 70-76.
- Téoule, R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51(4): 573-589.
- Tharakan, B., Hellman, J., Sawant, D. A., Tinsley, J. H., Parrish, A. R., Hunter, F. A., Smythe, W. R., Childs, E. W. (2012). β -Catenin dynamics in the regulation of microvascular endothelial cell hyperpermeability. *Shock* 37(3): 306-311.

- Thompson, L. H., Schild, D. (2001). Homologous recombination repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 477(1-2): 131-153.
- Thornhill, M. H., Li, J., Haskard, D. O. (1993). Leukocyte endothelial cell adhesion: a study comparing Human Umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA.hy926. *Scand J Immunol* 38(3): 279-286.
- Tiruppathi, C., Minshall, R. D., Paria, B. C., Vogel, S. M., Malik, A. B. (2002). Role of Ca²⁺ signalling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 39(4-5): 173-185.
- Trenam, C. W., Dabbagh, A. J., Morris, C. J., Blake, D. R. (1990). Skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS): an in-vivo model. *Br J Dermatol* 125(4): 325-329.
- Tsianakas, A., Müller, F.B., Hunzelmann, N., Kuwert, C. (2007). Werner Syndrom - Case report. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 91-94.
- Turaga, R. V., Paquet, E. R., Sild, M., Vignard, J., Garand, C., Johnson, F. B., Masson, J. Y., Lebel, M. (2009). The Werner syndrome protein affects the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation in addition to cell cycle and DNA damage response. *Cell Cycle* 8(13): 2080-2092.
- Turner, J. T., Landon, L. A., Gibbons, S. J., Talamo, B. R. (1999). Salivary gland nucleotid receptors. *Crit Rev Oral Bio Med* 10(2): 210-224.
- Uhrhammer, N. A., Lafarge, L., Dos Santos, L., Domaszewska, A., Lange, M., Yang, Y., Aractingi, S., Bessis, D., Bignon, Y. J. (2006). Werner syndrome and mutations of the WRN and LMNA genes in France. *Hum Mutat* 27(7): 718-719.
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyupoglu, I. Y., Nitsch, R. (2001). Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase1. *Nat Cell Biol* 3(12): 1035-1042.
- Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y.-X., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature Cell Biol* 3(3): 259-266.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W. (2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signalling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264(1-2): 85-97.
- van der Meer, A. D., Vermeil, K., Poot, A. A., Feijen, J., Vermes, I. (2010). A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(2): H719-725.
- Veal, E., Day, A. (2011). Hydrogen peroxide as a signalling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15(1): 147-151.
- Vitorino, P., Meyer, T. (2008). Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev* 22(23): 3268-3281.
- Vogt, M., Haggblom, C., Yeargin, J., Christiansen-Weber, T., Haas, M. (1998). Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 9(2): 139-146.

- Volanti, C., Gloire, G., Vanderplasschen, A., Jacobs, N.m Habraken, Y., Piette, J. (2004). Downregulation of ICAM1 and VCAM1 expression in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Oncogene* 23(53): 8649-8658.
- von Kobbe, C., Harrigan, J. A., May, A., Opresko, P. L., Dawut, L., Cheng, W. H., Bohr, V. A. (2003). Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol Cell Biol* 23(23): 8601-8613. B
- von Kobbe, C., Harrigan, J. A., Schreiber, V., Stiegler, P., Piotrowski, J., Dawut, L., Bohr, V. A. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acid Res* 32(13): 4003-4014.
- von Kobbe, C., Thoma, N. H., Czyzewski, B. K., Pavletich, N. P., Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J Biol Chem* 278(52): 52997-3006. a
- von Lukowicz, T., Hassa, P. O., Lohmann, C., Borén, J., Braunersreuther, V., Mach, F., Odermatt, B., Gersbach, M., Camici, G. G., Stähli, B. E., Tanner, F. C., Hottiger, M. O., Lüscher, T. F., Matter, C. M. (2008). PARP1 is required for adhesion molecule expression in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 78(1): 158-166.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernsted, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., Huber, P. (2007). Scr kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26(7): 1067-1077.
- Wang, X., Roper, M. G. (2014). Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal Methods* 6(9): 3019-3024.
- Wang, Y., Cao, J., Xie, Y., Xu., Z., Yin, Z., Gao, L., Wang, C. (2016). Artemisinin inhibits monocyte adhesion to HUVECs through NFkB and MAPK pathway in vitro. *Int J Mol Med* 37(6): 1567-1575.
- Whitman, S. C., Rateri, D. L., Szilvassy, S. J., Cornicello, J. A., Daugherty, A. (2002). Macrophage-specific expression of class A scavenger receptors in LDL receptor (-/-) mice decreases atherosclerosis and changes in spleen morphology. *J Lipid Res* 43(8): 1201-1208.
- Winckler, J. (1974). Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red. *Prog Histochem Cytochem* 6(3): 1-91.
- Wu, K. K., Frasier-Scott, K., Hatzakis, H. (1988). Endothelial cell function in hemostasis and thrombosis. *Adv Exp Med Biol* 242: 127-133.
- Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311(5764): 1141-1146.
- Wu, F., Tyml, K., Wilson, J. X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 217(1): 207-214.
- Xu, S., Ogura, S., Chen, J., Little, P. J., Moss, J., Liu, P. (2013). LOX-1 in atherosclerosis: biological function and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci* 70(16): 2859-2872.

- Yamabe, Y., Sugimoto, M., Satoh, M., Suzuki, N., Sugawara, M., Goto, M., Furuichi, Y. (1997) Down-regulation of the defective transcripts of the Werner's syndrome gene in the cells of patients. *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 151–154.
- Yamazaki, D., Oikawa, T., Takenawa, T. (2007). Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 120(Pt1): 86-100.
- Yan, G., You, B., Chen, S. P., Liao, J. K., Sun, J. (2008). Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circ Res* 103(6): 591-597.
- Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007). Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol* 5, e317.
- Yang, N. C., Hu, M. L. (2005). The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol* 40(10): 813-819.
- Ye, L., Miki, T., Nakura, J., Oshima, J., Kamino, K., Rakugi, H., Ikegami, H., Higaki, J., Edland, S. D., Martin, G. M., Ogiwara, T. (1997). Association of a polymorphic variant of the Werner helicase gene with myocardial infarction in a Japanese population. *Am J Med Genet* 68(4): 494-498.
- Yoon, H. J., Cho, S. W., Ahn, B. W., Yang, S. Y. (2010). Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 131(2): 119-123.
- Yoshida, A., Anand-Apte, B., Zetter, B. R. (1996). Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth factors* 13(1-2): 57-64.
- Yu, H., Gao, M., Ma, Y., Wang, L., Shen, Y., Liu, X. (2018). Inhibition of cell migration by focal adhesion kinase: Time-dependent difference in integrin-induced signaling between endothelial and hepatoblastoma cells. *Int J Mol Med* 41(5): 2573-2588.
- Zalata, A. A., Lammertijn, N., Christophe, A., Comhaire, F. H. (1998). The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* 21(5): 289-294.
- Zhang, G.-H., Chao, M., Hui, L.-H., Xu, D. I., Cai, W.-I., Zheng, J., Gao, M., Zhang, M.-X., Wang, J., Lu, Q.-H. (2015). Poly(ADP-ribose)polymerase 1 inhibition protects against age-dependent endothelial dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42(12): 1266-1274.
- Zhang, K., Keymeulen, S., Nelson, R., Ting, T. R., Yuan, Y. C., Yun, X., Liu, Z., Lopez, J., Raz, D. J., Kim, J. Y. (2018). Overexpression of flap endonuclease 1 correlates with enhanced proliferation and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Am J Pathol* 188(1): 242-251.
- Zhang, Y., Zhao, S., Gu, Y., Lewis, D. F., Alexander, J.S., Wang, Y. (2005). Effects of peroxynitrite and superoxide radicals on endothelial monolayer permeability: potential role of peroxynitrite in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 12(8): 586-592.
- Zhao, L., Xu, G., Zhou, J., Wang, S., Wu, M., Lu, Y. P., Ma, D. (2006). The effect of RhoA on human umbilical vein endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Oncol Rep* 15(5): 1147-1152.

Zheng, L., Dai, H., Hedge, M. L., Zhou, M., Guo, Z., Wu, X., Wu, J., Su, L., Zhong, X., Mitra, S., Huang, Q., Kernstine, K. H., Pfeifer, G. P., Shen, B. (2011). Fen1 mutations that specifically disrupt its interaction with PCNA cause aneuploidy-associated cancer. *Cell Res* 21(7): 1052-1067.

Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, K., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., Lin, D., Shein, B. (2007). Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nature Med* 13(7): 812-819.

Zhu, X. D., Zhuang, Y., Ben, J. J., Qian, L. L., Huang, H. P., Bai, H., Sha, J. H., He, Z. G., Chen, Q. (2011). Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem* 286(10): 8231-8239.

Ziegler, T., Silacci, P., Harrison, V. J., Hayoz, D. (1998). Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32(2): 351-355.

Zou, M. H., Shi, C., Cohen, R., A. (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 109(6): 817-826.

Statistisches Bundesamt:

Ohne Verfasser (2015): Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html> Statistisches Bundesamt [Stand: 18.08.2018]

Ohne Verfasser (2015): Todesursachen: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> Statistisches Bundesamt

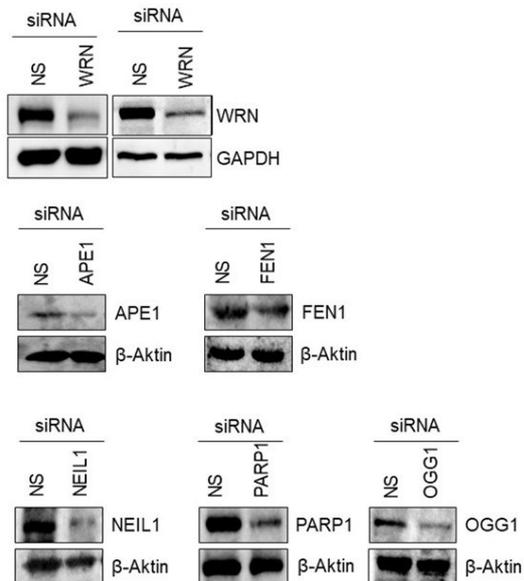
Ohne Verfasser: <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/histologie/aufbau+der+mikrogefäÙe> [Stand: 31.01.2019]

Ohne Verfasser: <https://www.abcam.com/luminescent-atp-detection-assay-kit-ab113849.html> [Stand: 30.01.2019]

8 Anhang

8.1 Weitere Abbildungen

A) EA.hy926



B) HUVEC

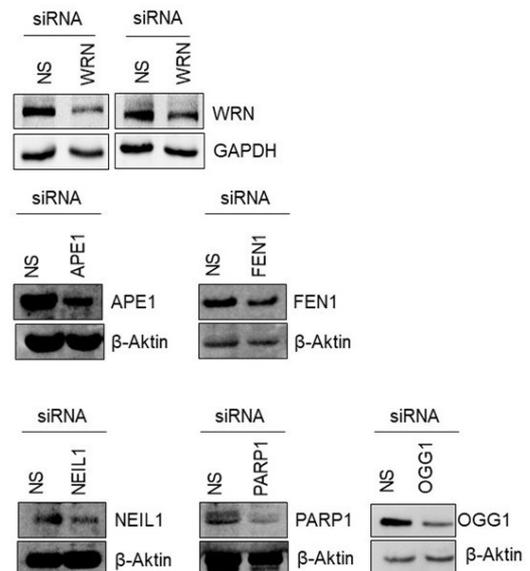
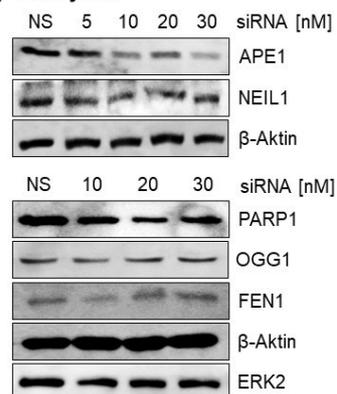


Abbildung 8-1: Western Blot Analysen nach *knockdown* von WRN und einzelnen BER-Faktoren.

Die Effizienz des RNA-Interferenz-vermittelten *kds* von WRN, APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 in A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurde auf Proteinebene mittels Western Blot Analysen untersucht. Ergänzend zu den Blots in Abbildungen 3-2 und 3-13 sind an dieser Stelle weitere Blots aufgeführt. Diese wurden zur Quantifizierung des Proteingehalts herangezogen.

Dosisfindung

A) EA.hy926



B) HUVEC

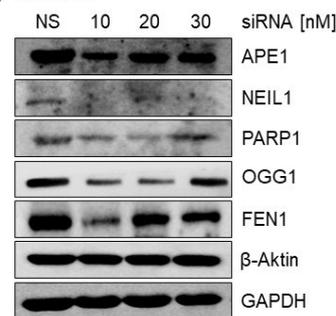


Abbildung 8-2: Western Blot Analysen zur Bestimmung der höchsten *knockdown* Effizienz.

A) EA.hy926 Zellen und B) HUVEC wurden 48 h nach Aussaat mit verschiedenen Konzentrationen der APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 oder OGG1 siRNA inkubiert. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht. Die Konzentration mit der jeweils höchsten *kd* Effizienz wurde für weitere Versuche verwendet.

8.2 Auflistung der den Abbildungen zugrunde liegenden Daten

Im Folgenden sind die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Daten aufgeführt. Die Anzahl der technischen und biologischen Replikate sind jeweils der Legende der entsprechenden Abbildungen zu entnehmen.

Tabelle 8-1: Restproteingehalte von WRN und einzelnen BER-Faktoren nach Transfektion.

In EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden WRN oder einzelne BER-Faktoren 48 h nach Aussaat mittels RNA-Interferenz herunterreguliert und der Restproteingehalt mittels Western Blot Analysen bestimmt. Aufgeführt sind die den Abbildungen 3-2 und 3-13 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM.

EA.hy926		HUVEC	
WRN siRNA	0,23 + 0,07	WRN siRNA	0,36 + 0,06
APE1 siRNA	0,08 + 0,25	APE1 siRNA	0,41 + 0,01
FEN1 siRNA	0,25 + 0,053	FEN1 siRNA	0,59 + 0,07
NEIL1 siRNA	0,14 + 0,013	NEIL1 siRNA	0,25 + 0,22
PARP1 siRNA	0,34 + 0,023	PARP1 siRNA	0,13 + 0,04
OGG1 siRNA	0,23 + 0,014	OGG1 siRNA	0,22 + 0,03

Tabelle 8-2: WRN-abhängige Ca²⁺-Freisetzung nach tBHQ-Behandlung.

Nach Stimulation mit 10 µM ATP wurde die Freisetzung von Ca²⁺ gemessen. Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte + SEM aus den Abbildungen 3-4 und 3-23.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA DMSO	1,0 + 0,05	NS siRNA DMSO	1,0 + 0,04
NS siRNA 100 µM tBHQ	0,72 + 0,56	NS siRNA 60 µM tBHQ	0,93 + 0,05
NS siRNA 160 µM tBHQ	0,64 + 0,56	NS siRNA 120 µM tBHQ	1,07 + 0,08
WRN siRNA DMSO	1,04 + 0,06	WRN siRNA DMSO	1,35 + 0,17
WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,88 + 0,07	WRN siRNA 60 µM tBHQ	1,41 + 0,17
WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,79 + 0,056	WRN siRNA 120 µM tBHQ	1,32 + 0,16

Tabelle 8-3: Daten zur Untersuchung des Einflusses von WRN und/oder tBHQ auf die Permeabilität.

Die Permeabilität von WRN-*kd* und WRN-Wt EA.hy926 Zellen und HUVEC wurde gemessen. Zusätzlich wurden WRN-*kd* und WRN-Wt HUVEC mit tBHQ behandelt und hinsichtlich der Permeabilität untersucht. Die aufgelisteten Daten sind Mittelwerte + SEM von Abbildung 3-5 und 3-24.

	EA.hy926	HUVEC
NS siRNA	1,0 + 0,22	1,0 + 1,11
NS siRNA TNFα	0,64 + 0,02	2,26 + 0,41
WRN siRNA	0,61 + 0,005	2,63 + 0,54
WRN siRNA TNFα	0,57 + 0,001	2,59 + 0,59
NS siRNA 60 µM tBHQ	-	2,87 + 1,28
NS siRNA 120 µM tBHQ	-	1,51 + 0,34
WRN siRNA 60 µM tBHQ	-	2,62 + 0,45
WRN siRNA 120 µM tBHQ	-	3,10 + 1,0

Tabelle 8-4: Daten zur Aufnahme von acLDL in Abhängigkeit der WRN-Expression.

EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden nach einer WRN siRNA Transfektion mit schwach oder moderat toxischen tBHQ- oder MMS-Konzentrationen behandelt und für 4 h mit gelabeltem acLDL inkubiert. Bei den der Tabelle zu entnehmenden Daten handelt es sich um Mittelwerte + SEM, die den Abbildungen 3-4 und 3-22 zugrunde liegen.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA DMSO	1,0 + 0,01	NS siRNA DMSO	1,0 + 0,04
NS siRNA 100 µM tBHQ	0,87 + 0,04	NS siRNA 60 µM tBHQ	0,93 + 0,03
NS siRNA 160 µM tBHQ	0,58 + 0,09	NS siRNA 120 µM tBHQ	0,69 + 0,02
WRN siRNA DMSO	0,89 + 0,05	WRN siRNA DMSO	0,98 + 0,04
WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,87 + 0,03	WRN siRNA 60 µM tBHQ	0,81 + 0,07
WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,82 + 0,06	WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,46 + 0,06
NS siRNA Kon	1,0 + 0,04		
NS siRNA 100 µM MMS	0,73 + 0,09		
NS siRNA 200 µM MMS	0,62 + 0,09		
WRN siRNA Kon	0,99 + 0,09		
WRN siRNA 100 µM MMS	0,63 + 0,10		
WRN siRNA 200 µM MMS	0,57 + 0,11		

Tabelle 8-5: Daten zur Zell-Zell Adhäsion in Abhängigkeit der Expression von WRN oder einzelnen BER-Faktoren.

Die Zell-Zell Adhäsion wurde in Abhängigkeit von WRN und den einzelnen BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL1, PARP1 und OGG1 sowie in Abhängigkeit des WRN Inhibitors (WRNi) und nach tBHQ- oder MMS-Behandlung untersucht. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte HT-29 Zellen mit der Endothel-Ein-Zell-Schicht inkubiert. Nach einer Adhärenzzeit von 1 h wurde die Fluoreszenzintensität der adhärennten HT-29 Zellen gemessen. Die aufgeführten Daten liegen Abbildung 3-6, 3-14 und 3-25 zugrunde. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA DMSO	1,0 + 0,02	NS siRNA DMSO	1,0 + 0,02
NS siRNA 100 µM tBHQ	1,08 + 0,13	NS siRNA 60 µM tBHQ	0,58 + 0,09
NS siRNA 160 µM tBHQ	1,22 + 0,13	NS siRNA 120 µM tBHQ	6,05 + 1,14
WRN siRNA DMSO	1,04 + 0,02	WRN siRNA DMSO	1,11 + 0,07
WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,76 + 0,07	WRN siRNA 60 µM tBHQ	1,28 + 0,65
WRN siRNA 160 µM tBHQ	1,17 + 0,17	WRN siRNA 120 µM tBHQ	8,55 + 0,96
NS siRNA Kon	1,0 + 0,09	NS siRNA Kon	1,0 + 0,02
NS siRNA 100 µM MMS	0,6 + 0,09	NS siRNA 100 µM MMS	0,73 + 0,09
NS siRNA 200 µM MMS	0,54 + 0,08	NS siRNA 200 µM MMS	2,18 + 1,43
WRN siRNA Kon	1,0 + 0,06	WRN siRNA Kon	1,55 + 0,78
WRN siRNA 100 µM MMS	0,92 + 0,14	WRN siRNA 100 µM MMS	1,48 + 0,12
WRN siRNA 200 µM MMS	0,84 + 0,11	WRN siRNA 200 µM MMS	1,44 + 0,29
APE1 siRNA Kon	1,85 + 0,084		
APE1 siRNA DMSO	1,42 + 0,16	APE1 siRNA DMSO	1,06 + 0,04
APE1 siRNA 100 µM tBHQ	1,91 + 0,16	APE1 siRNA 60 µM tBHQ	0,83 + 0,07
APE1 siRNA 160 µM tBHQ	2,66 + 0,30	APE1 siRNA 120 µM tBHQ	1,43 + 0,28
APE1 siRNA 100 µM MMS	1,69 + 0,16		
APE1 siRNA 200 µM MMS	1,47 + 0,18		
FEN1 siRNA Kon	2,32 + 0,55		
FEN1 siRNA DMSO	1,34 + 0,14	FEN1 siRNA DMSO	1,12 + 0,06
FEN1 siRNA 100 µM tBHQ	1,38 + 0,18	FEN1 siRNA 60 µM tBHQ	0,92 + 0,044
FEN1 siRNA 160 µM tBHQ	1,66 + 0,18	FEN1 siRNA 120 µM tBHQ	1,11 + 0,09
FEN1 siRNA 100 µM MMS	1,53 + 0,26		
FEN1 siRNA 200 µM MMS	1,13 + 0,15		
NEIL1 siRNA Kon	2,22 + 0,36		
NEIL1 siRNA DMSO	1,16 + 0,15	NEIL1 siRNA DMSO	1,21 + 0,06
NEIL1 siRNA 100 µM tBHQ	1,42 + 0,21	NEIL1 siRNA 60 µM tBHQ	0,84 + 0,07
NEIL1 siRNA 160 µM tBHQ	1,68 + 0,21	NEIL1 siRNA 120 µM tBHQ	1,54 + 0,56
NEIL1 siRNA 100 µM MMS	1,24 + 0,17		
NEIL1 siRNA 200 µM MMS	1,07 + 0,17		
PARP1 siRNA Kon	1,74 + 0,15		
PARP1 siRNA DMSO	1,46 + 0,21	PARP1 siRNA DMSO	1,43 + 0,28
PARP1 siRNA 100 µM tBHQ	1,92 + 0,35	PARP1 siRNA 60 µM tBHQ	0,88 + 0,03
PARP1 siRNA 160 µM tBHQ	2,48 + 0,30	PARP1 siRNA 120 µM tBHQ	1,27 + 0,17
PARP1 siRNA 100 µM MMS	1,65 + 0,26		
PARP1 siRNA 200 µM MMS	1,29 + 0,19		
OGG1 siRNA DMSO	5,74 + 0,92	OGG1 siRNA DMSO	0,96 + 0,02
OGG1 siRNA 100 µM tBHQ	2,76 + 0,40	OGG1 siRNA 60 µM tBHQ	0,78 + 0,03
OGG1 siRNA 160 µM tBHQ	5,63 + 1,31	OGG1 siRNA 120 µM tBHQ	0,77 + 0,04
0,5 µM WRNi	0,99 + 0,08	0,5 µM WRNi	1,09 + 0,12
1 µM WRNi	1,08 + 0,13	1 µM WRNi	1,28 + 0,19
5 µM WRNi	1,02 + 0,06	5 µM WRNi	1,44 + 0,35

Tabelle 8-6: Daten zur Zellmigration von WRN- bzw. BER-Faktor-*kd* Zellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung.

Entsprechende *kd* EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden für 24 h mit tBHQ oder MMS behandelt. Im Anschluss daran wurde die Ein-Zell-Schicht verletzt und die Migrationsgeschwindigkeit nach 8 h Migrationszeit bestimmt. Die aufgelisteten Daten sind Grundlage für die Abbildungen 3-7, 3-15 und 3-26. Es handelt sich um Mittelwerte ± SEM.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA	1,00 ± 0,02	NS siRNA	1,00 ± 0,03
WRN siRNA	0,25 ± 0,05	WRN siRNA	0,70 ± 0,03
NS siRNA 100 µM tBHQ	1,09 ± 0,06	NS siRNA 60 µM tBHQ	0,51 ± 0,05
WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,64 ± 0,05	WRN siRNA 60 µM tBHQ	0,42 ± 0,03
NS siRNA 160 µM tBHQ	0,82 ± 0,12	NS siRNA 120 µM tBHQ	0,11 ± 0,05

WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,39 ± 0,09	WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,01 ± 0,01
NS siRNA 100 µM MMS	0,76 ± 0,03		
WRN siRNA 100 µM MMS	0,35 ± 0,04		
NS siRNA 200 µM MMS	0,67 ± 0,15		
WRN siRNA 200 µM MMS	0,53 ± 0,05		
1 µM WRNi	1,06 ± 0,03		
10 µM WRNi	1,14 ± 0,01		
APE1 siRNA	0,61 ± 0,06	APE1 siRNA	0,76 ± 0,07
APE1 siRNA 100 µM tBHQ	0,49 ± 0,06	APE1 siRNA 60 µM tBHQ	1,15 ± 0,10
APE1 WRN siRNA	0,46 ± 0,05		
APE1 WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,42 ± 0,04		
FEN1 siRNA	1,27 ± 0,09	FEN1 siRNA	0,97 ± 0,05
FEN1 siRNA 100 µM tBHQ	1,42 ± 0,09	FEN1 siRNA 60 µM tBHQ	1,01 ± 0,05
FEN1 WRN siRNA	0,80 ± 0,04		
FEN1 WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,71 ± 0,05		
NEIL1 siRNA	0,81 ± 0,04	NEIL1 siRNA	0,61 ± 0,09
NEIL1 siRNA 100 µM tBHQ	0,85 ± 0,05	NEIL1 siRNA 60 µM tBHQ	0,53 ± 0,13
NEIL1 WRN siRNA	0,43 ± 0,01		
NEIL1 WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,51 ± 0,01		
PARP1 siRNA	0,63 ± 0,06	PARP1 siRNA	0,76 ± 0,09
PARP1 siRNA 100 µM tBHQ	0,82 ± 0,06	PARP1 siRNA 60 µM tBHQ	0,95 ± 0,10
PARP1 WRN siRNA	0,42 ± 0,03		
PARP1 WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,54 ± 0,02		
OGG1 siRNA	1,12 ± 0,04	OGG1 siRNA	0,69 ± 0,07
OGG1 WRN siRNA	0,66 ± 0,12	OGG1 siRNA 100 µM tBHQ	0,75 ± 0,04
OGG1 WRN siRNA 100 µM tBHQ	1,19 ± 0,03		

Tabelle 8-7: ATP-Gehalt von WRN-kd Zellen basal und nach tBHQ-oder MMS-Behandlung.

Nach der Behandlung von WRN-kd EA.hy926 Zellen und mit NS siRNA behandelten EA.hy926 Zellen mit tBHQ oder MMS wurde der ATP-Gehalt gemessen. Die gezeigten Daten sind Grundlage für Abbildungen 3-7 und 3-27. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM.

EA.hy926	
NS siRNA DMSO	1,0 + 0,02
NS siRNA 100 µM tBHQ	0,67 + 0,9
NS siRNA 160 µM tBHQ	0,66 + 0,06
WRN siRNA DMSO	1,09 + 0,09
WRN siRNA 100 µM tBHQ	0,87 + 0,12
WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,9 + 0,1
NS siRNA Kon	1,0 + 0,03
NS siRNA 100 µM MMS	0,94 + 0,04
NS siRNA 200 µM MMS	0,88 + 0,06
WRN siRNA Kon	1,09 + 0,12
WRN siRNA 100 µM MMS	1,04 + 0,08
WRN siRNA 200 µM MMS	0,99 + 0,13

Tabelle 8-8: Daten zur Bestimmung des mitotischen Index in Abhängigkeit von WRN.

WRN-reduzierte und WRN native EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden hinsichtlich ihres mitotischen Indexes untersucht, indem pH3-positive Zellen angefärbt wurden. Proliferierende Zellen dienten als Kontrolle. Erfasst sind Mittelwerte + SEM. Die zugehörige graphische Darstellung ist Abbildung 3-8.

EA.hy926		HUVEC	
Prolif. Zellen	4,47 + 0,93	Prolif. Zellen	7,52 + 1,10
NS siRNA	1,27 + 0,090	NS siRNA	1,55 + 0,92
WRN siRNA	1,10 + 0,31	WRN siRNA	1,93 + 0,67

Tabelle 8-9: Daten zur mRNA-Expression von WRN bzw. BER-Faktor-*kd* Zellen nach tBHQ- oder MMS-Behandlung.

Endothelzellspezifische, migrationsassoziierte und antioxidative Faktoren wurden hinsichtlich der Veränderungen durch reduzierte Proteinmengen von WRN oder den BER-Faktoren APE1, FEN1, NEIL, PARP1 und OGG1 sowie durch die Behandlung mit tBHQ oder MMS mit Hilfe einer quantitativen *Real-time* PCR untersucht. Bei den gelisteten Daten handelt es sich um Mittelwerte + SEM. Die dazugehörigen grafischen Darstellungen sind Abbildungen 3-9, 3-10, 3-16, 3-28 und 3-29.

EA.hy926		HUVEC	
<i>Vim</i> ; WRN siRNA	0,86 + 0,05	<i>Vim</i> ; WRN siRNA	1,08 + 0,25
<i>Vim</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,73 + 0,03	<i>Vim</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,72 + 0,04
<i>Vim</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,66 + 0,09	<i>Vim</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,81 + 0,08
<i>Cdh5</i> ; WRN siRNA	1,08 + 0,13	<i>Cdh5</i> ; WRN siRNA	0,92 + 0,14
<i>Cdh5</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,46 + 0,16	<i>Cdh5</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	1,29 + 0,44
<i>Cdh5</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,38 + 0,04	<i>Cdh5</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	1,20 + 0,34
<i>RhoA</i> ; WRN siRNA	0,72 + 0,02	<i>RhoA</i> ; WRN siRNA	1,04 + 0,18
<i>RhoA</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,99 + 0,07	<i>RhoA</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,84 + 0,09
<i>RhoA</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,98 + 0,14	<i>RhoA</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,99 + 0,08
<i>Rac1</i> ; WRN siRNA	0,78 + 0,21	<i>Rac1</i> ; WRN siRNA	1,09 + 0,23
<i>Rac1</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	1,26 + 0,34	<i>Rac1</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,99 + 0,19
<i>Rac1</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,76 + 0,45	<i>Rac1</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	1,23 + 0,14
<i>Ptk2</i> ; WRN siRNA	1,18 + 0,04	<i>Ptk2</i> ; WRN siRNA	1,14 + 0,07
<i>Sele</i> ; WRN siRNA	2,36 + 0,33	<i>Sele</i> ; WRN siRNA	135,21 + 128,81
<i>Sele</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	1,16 + 0,40	<i>Sele</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,07 + 0,03
EA.hy926		HUVEC	
<i>Sele</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	2,79 + 0,49	<i>Sele</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,41 + 0,13
<i>Icam1</i> ; WRN siRNA	1,89 + 1,01	<i>Icam1</i> ; WRN siRNA	7,95 + 4,75
<i>Icam1</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,56 + 0,34	<i>Icam1</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,49 + 0,28
<i>Icam1</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	12,27 + 6,84	<i>Icam1</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	1,07 + 0,23
<i>Icam1</i> ; NS siRNA 200 µM MMS	0,68 + 0,15		
<i>Icam1</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	1,52 + 0,73		
<i>Vcam1</i> ; WRN siRNA	0,89 + 0,17	<i>Vcam1</i> ; WRN siRNA	17,83 + 15,89
<i>Vcam1</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,80 + 0,64	<i>Vcam1</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,01 + 0,01
<i>Vcam1</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,69 + 0,41	<i>Vcam1</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,08 + 0,06
<i>Vcam1</i> ; NS siRNA 200 µM MMS	0,75 + 0,08		
<i>Vcam1</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	0,86 + 0,10		
<i>Nos3</i> ; WRN siRNA	0,99 + 0,24	<i>Nos3</i> ; WRN siRNA	0,97 + 0,28
<i>Nos3</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,52 + 0,46	<i>Nos3</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,94 + 0,25
<i>Nos3</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	1,56 + 0,78	<i>Nos3</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,97 + 0,45
<i>Nos3</i> ; NS siRNA 100 µM MMS	0,94 + 0,13		
<i>Nos3</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	1,23 + 0,33		
<i>Nos2</i> ; WRN siRNA	1,15 + 0,28	<i>Nos2</i> ; WRN siRNA	1,36 + 0,53
<i>Nos2</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	1,10 + 0,06	<i>Nos2</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	1,29 + 0,29
<i>Nos2</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	1,21 + 0,05	<i>Nos2</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,77 + 0,45
<i>Nos2</i> ; NS siRNA 200 µM MMS	0,94 + 0,12		
<i>Nos2</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	1,01 + 0,10		
<i>Ccl2</i> ; WRN siRNA	3,52 + 1,86	<i>Ccl2</i> ; WRN siRNA	6,69 + 3,45
<i>Ccl2</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	4,52 + 3,54	<i>Ccl2</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,07 + 0,05
<i>Ccl2</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	6,22 + 2,51	<i>Ccl2</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,04 + 0,02
<i>Ccl2</i> ; NS <i>kd</i> 200 µM MMS	0,92 + 0,14		
<i>Ccl2</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	1,24 + 0,55		
<i>Plat</i> ; WRN siRNA	2,16 + 0,54	<i>Plat</i> ; WRN siRNA	2,37 + 0,33
<i>Plat</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	1,11 + 0,59	<i>Plat</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	1,47 + 0,61
<i>Plat</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	2,29 + 0,78	<i>Plat</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	2,10 + 1,15
<i>Plat</i> ; NS siRNA 200 µM MMS	0,39 + 0,10		
<i>Plat</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	0,47 + 0,17		
<i>Edn1</i> ; WRN siRNA	0,93 + 0,26	<i>Edn1</i> ; WRN siRNA	1,18 + 0,25
<i>Edn1</i> ; NS siRNA 160 µM tBHQ	0,52 + 0,05	<i>Edn1</i> ; NS siRNA 120 µM tBHQ	0,15 + 0,01
<i>Edn1</i> ; WRN siRNA 160 µM tBHQ	0,27 + 0,04	<i>Edn1</i> ; WRN siRNA 120 µM tBHQ	0,17 + 0,07
<i>Edn1</i> ; NS siRNA 200 µM MMS	0,37 + 0,08		
<i>Edn1</i> ; WRN siRNA 200 µM MMS	0,25 + 0,06		
<i>Kdr</i> ; WRN siRNA	1,01 + 0,09	<i>Kdr</i> ; WRN siRNA	1,47 + 0,19

<i>Kdr</i> ; NS siRNA 160 μ M tBHQ	1,38 + 0,42	<i>Kdr</i> ; NS siRNA 120 μ M tBHQ	1,79 + 0,28
<i>Kdr</i> ; WRN siRNA 160 μ M tBHQ	1,29 + 0,44	<i>Kdr</i> ; WRN siRNA 120 μ M tBHQ	1,33 + 0,20
<i>Kdr</i> ; NS siRNA 200 μ M MMS	0,34 + 0,02		
<i>Kdr</i> ; WRN siRNA 200 μ M MMS	0,33 + 0,07		
<i>Gpx1</i> WRN siRNA	1,01 + 0,17	<i>Gpx1</i> ; WRN siRNA	0,87 + 0,13
<i>Gpx1</i> NS siRNA 160 μ M tBHQ	0,71 + 0,17	<i>Gpx1</i> ; NS siRNA 120 μ M tBHQ	0,93 + 0,035
<i>Gpx1</i> WRN siRNA 160 μ M tBHQ	0,50 + 0,11	<i>Gpx1</i> ; WRN siRNA 120 μ M tBHQ	0,97 + 0,26
<i>Ho1</i> WRN siRNA	1,01 + 0,09	<i>Ho1</i> ; WRN siRNA	0,83 + 0,29
<i>Ho1</i> NS siRNA 160 μ M tBHQ	19,72 + 3,46	<i>Ho1</i> ; NS siRNA 120 μ M tBHQ	206,91 + 63,95
<i>Ho1</i> WRN siRNA 160 μ M tBHQ	30,55 + 2,61	<i>Ho1</i> ; WRN siRNA 120 μ M tBHQ	264,44 + 156,86
<i>Sele</i> APE1 siRNA	1,34 + 0,44	<i>Sele</i> ; APE1 siRNA	4,76 + 3,20
<i>Sele</i> FEN1 siRNA	3,60 + 2,19	<i>Sele</i> ; FEN1 siRNA	4,76 + 3,44
<i>Sele</i> NEIL1 siRNA	2,17 + 0,80	<i>Sele</i> ; NEIL1 siRNA	3,60 + 2,44
<i>Sele</i> PARP1 siRNA	1,04 + 0,55	<i>Sele</i> ; PARP1 siRNA	3,31 + 2,37
<i>Sele</i> OGG1 siRNA	0,56 + 0,20	<i>Sele</i> ; OGG1 siRNA	385,52 + 293,78
<i>Icam1</i> ; APE1 siRNA	1,12 + 0,41	<i>Icam1</i> ; APE1 siRNA	3,75 + 1,95
<i>Icam1</i> ; FEN1 siRNA	0,57 + 0,11	<i>Icam1</i> ; FEN1 siRNA	4,73 + 2,23
<i>Icam1</i> ; NEIL1 siRNA	0,81 + 0,15	<i>Icam1</i> ; NEIL1 siRNA	3,94 + 1,48
<i>Icam1</i> ; PARP1 siRNA	0,37 + 0,21	<i>Icam1</i> ; PARP1 siRNA	3,26 + 1,62
EA.hy926		HUVEC	
<i>Icam1</i> ; OGG1 siRNA	0,96 + 0,26	<i>Icam1</i> ; OGG1 siRNA	49,40 + 14,37
<i>Vcam1</i> ; APE1 siRNA	0,82 + 0,15	<i>Vcam1</i> ; APE1 siRNA	1,29 + 0,53
<i>Vcam1</i> ; FEN1 siRNA	1,55 + 0,21	<i>Vcam1</i> ; FEN1 siRNA	1,83 + 0,75
<i>Vcam1</i> ; NEIL1 siRNA	1,11 + 0,10	<i>Vcam1</i> ; NEIL1 siRNA	1,57 + 0,15
<i>Vcam1</i> ; PARP1 siRNA	1,09 + 0,06	<i>Vcam1</i> ; PARP1 siRNA	1,57 + 0,86
<i>Vcam1</i> ; OGG1 siRNA	0,82 + 0,19	<i>Vcam1</i> ; OGG1 siRNA	12,04 + 11,0
<i>Nos3</i> ; APE1 siRNA	1,23 + 0,05	<i>Nos3</i> ; APE1 siRNA	0,53 + 0,29
<i>Nos3</i> ; FEN1 siRNA	0,96 + 0,02	<i>Nos3</i> ; FEN1 siRNA	0,45 + 0,23
<i>Nos3</i> ; NEIL1 siRNA	1,07 + 0,04	<i>Nos3</i> ; NEIL1 siRNA	0,59 + 0,14
<i>Nos3</i> ; PARP1 siRNA	0,76 + 0,14	<i>Nos3</i> ; PARP1 siRNA	0,46 + 0,15
<i>Nos3</i> ; OGG1 siRNA	0,96 + 0,05	<i>Nos3</i> ; OGG1 siRNA	0,57 + 0,14
<i>Ccl2</i> ; APE1 siRNA	1,36 + 0,05	<i>Ccl2</i> ; APE1 siRNA	1,56 + 0,45
<i>Ccl2</i> ; FEN1 siRNA	0,92 + 0,12	<i>Ccl2</i> ; FEN1 siRNA	2,10 + 0,57
<i>Ccl2</i> ; NEIL1 siRNA	1,29 + 0,10	<i>Ccl2</i> ; NEIL1 siRNA	1,30 + 0,36
<i>Ccl2</i> ; PARP1 siRNA	0,69 + 0,16	<i>Ccl2</i> ; PARP1 siRNA	1,62 + 0,70
<i>Ccl2</i> ; OGG1 siRNA	0,87 + 0,11	<i>Ccl2</i> ; OGG1 siRNA	4,30 + 0,92
<i>Kdr</i> ; APE1 siRNA	1,43 + 0,18	<i>Kdr</i> ; APE1 siRNA	0,71 + 0,22
<i>Kdr</i> ; FEN1 siRNA	0,73 + 0,12	<i>Kdr</i> ; FEN1 siRNA	0,79 + 0,16
<i>Kdr</i> ; NEIL1 siRNA	0,92 + 0,05	<i>Kdr</i> ; NEIL1 siRNA	0,75 + 0,24
<i>Kdr</i> ; PARP1 siRNA	0,40 + 0,28	<i>Kdr</i> ; PARP1 siRNA	0,98 + 0,09
<i>Kdr</i> ; OGG1 siRNA	1,15 + 0,13	<i>Kdr</i> ; OGG1 siRNA	33,08 + 22,50

Tabelle 8-10: Daten zur WRN-assoziierten Seneszenz.

Die Seneszenz WRN reduzierter Zellen und die der jeweiligen Kontrollzellen wurde mittels SA- β G Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 10 Gy bestrahlt wurden. Des Weiteren wurden morphologisch vergrößerte Zellen gezählt. Bei den aufgeführten Zahlenangaben handelt es sich um den Mittelwert + SEM. Die dazugehörigen Darstellungen befinden sich in Abbildung 3-11.

EA.hy926		HUVEC	
X-Gal positive Zellen		X-Gal positive Zellen	
NS siRNA 48 h	2,13 + 0,21	NS siRNA 48 h	1,71 + 0,83
WRN siRNA 48 h	6,74 + 1,35	WRN siRNA 48 h	3,04 + 0,82
NS siRNA 72 h	6,87 + 3,62	NS siRNA 72 h	4,18 + 2,24
WRN siRNA 72 h	6,56 + 2,59	WRN siRNA 72 h	4,18 + 2,52
NS siRNA 96 h	13,87 + 3,23	NS siRNA 96 h	10,82 + 1,11
WRN siRNA 96 h	13,40 + 1,10	WRN siRNA 96 h	9,56 + 2,91
NS siRNA 120 h	22,39 + 6,90	NS siRNA 120 h	9,54 + 0,70
WRN siRNA 120 h	29,74 + 10,03	WRN siRNA 120 h	7,87 + 1,13
NS siRNA 10 Gy, 72 h	28,96 + 5,12	10 Gy, 72 h	13,59 + 0,46
WRN siRNA 10 Gy, 72 h	38,08 + 6,33	WRN siRNA 10 Gy, 72 h	11,26 + 2,98
Anzahl großer Zellen		Anzahl großer Zellen	
NS siRNA 48 h	0,66 + 0,42	NS siRNA 48 h	0,47 + 0,21

WRN siRNA 48 h	0,43 + 0,33	WRN siRNA 48 h	0,68 + 0,38
NS siRNA 72 h	0,68 + 0,06	NS siRNA 72 h	1,17 + 0,84
WRN siRNA 72 h	0,77 + 0,07	WRN siRNA 72 h	0,94 + 0,67
NS siRNA 96 h	1,08 + 0,22	NS siRNA 96 h	0,98 + 0,26
WRN siRNA 96 h	0,86 + 0,27	WRN siRNA 96 h	0,87 + 0,30
NS siRNA 120 h	0,51 + 0,28	NS siRNA 120 h	0,49 + 0,29
WRN siRNA 120 h	0,70 + 0,29	WRN siRNA 120 h	0,48 + 0,12
NS siRNA 10 Gy, 72 h	2,30 + 0,34	NS siRNA 10 Gy, 72 h	1,44 + 0,01
WRN siRNA 10 Gy, 72 h	3,91 + 0,46	WRN siRNA 10 Gy, 72 h	1,54 + 0,49

Tabelle 8-11: Viabilität von WRN-knockdown Zellen.

Die Viabilität von WRN-kd Zellen wurde mit Hilfe des Alamar Blue- (AB), MTT-, Neutralrot- (NR) und LDH-Assays untersucht. Die aufgelisteten Daten sind Mittelwerte + SEM. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 3-3 zu finden.

EA.hy926		HUVEC	
AB NS siRNA	1,00 + 0,01	AB NS siRNA	1,00 + 0,02
AB WRN siRNA	0,76 + 0,02	AB WRN siRNA	1,07 + 0,01
MTT NS siRNA	1,00 + 0,02	MTT NS siRNA	1,00 + 0,01
MTT WRN siRNA	0,96 + 0,04	MTT WRN siRNA	0,91 + 0,02
NR NS siRNA	1,00 + 0,01	NR NS siRNA	1,00 + 0,09
NR WRN siRNA	0,89 + 0,03	NR WRN siRNA	1,07 + 0,13
LDH NS siRNA	1,00 + 0,09	LDH NS siRNA	1,00 + 0,06
LDH WRN siRNA	1,05 + 0,07	LDH WRN siRNA	1,05 + 0,01

Tabelle 8-12: Daten zur Viabilität von Endothelzellen nach MMS-Behandlung.

EA.hy926 Zellen und HUVEC wurden für 24 h und 72 h mit verschiedenen MMS-Konzentrationen behandelt. Die Viabilität wurde mittels Alamar Blue Assay gemessen. Bei den gelisteten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± SEM. Die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven sind in Abbildung 3-18 dargestellt.

EA.hy926		HUVEC	
tBHQ [µM] nach 24 h		tBHQ [µM] nach 24 h	
0	1,00 ± 0,01	0	1,00 ± 0,0
100	1,00 ± 0,03	25	0,95 ± 0,01
200	0,53 ± 0,06	50	0,91 ± 0,04
300	0,34 ± 0,1	100	0,76 ± 0,05
400	0,14 ± 0,08	200	0,62 ± 0,01
		300	0,10 ± 0,03
tBHQ [µM] nach 72 h		tBHQ [µM] nach 72 h	
0	1,00 ± 0,01	0	1,00 ± 0,01
100	0,84 ± 0,01	25	1,02 ± 0,02
200	0,43 ± 0,07	50	0,89 ± 1,04
300	0,11 ± 0,01	100	0,63 ± 0,01
400	0,0 ± 0,01	200	0,08 ± 0,01
		300	0,04 ± 0,01
MMS [µM] nach 24 h		MMS [µM] nach 24 h	
0	1,04 ± 0,02	0	1,00 ± 0,03
50	1,09 ± 0,07	50	1,06 ± 0,03
100	0,97 ± 0,07	100	0,88 ± 0,04
200	0,93 ± 0,06	200	0,64 ± 0,09
300	0,46 ± 0,14		
MMS [µM] nach 72 h		MMS [µM] nach 72 h	
0	1,04 ± 0,03	0	1,00 ± 0,03
50	0,91 ± 0,06	50	0,78 ± 0,04
100	0,82 ± 1,06	100	0,75 ± 0,02
200	0,41 ± 0,06	200	0,35 ± 0,04
300	0,17 ± 0,03		

Tabelle 8-13: Daten zur Viabilität nach tBHQ- und MMS-Behandlung in Abhängigkeit von WRN.

Sowohl WRN-*kd* als auch WRN-profiziente Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen tBHQ-Konzentrationen behandelt. Im Anschluss wurde deren Viabilität mittels Alamar Blue Assay gemessen. Es handelt sich bei den dargestellten Daten um Mittelwerte \pm SEM der in Abbildung 3-19 gezeigten Dosis-Wirkungskurven.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA		NS siRNA	
tBHQ [μ M]		tBHQ [μ M]	
0	1,00 \pm 0,01	0	1,00 \pm 0,02
50	1,08 \pm 0,02	50	0,96 \pm 0,01
100	0,86 \pm 0,04	100	0,89 \pm 0,02
200	0,46 \pm 0,05	200	0,32 \pm 0,07
300	0,23 \pm 0,05	300	-0,01 \pm 0,01
400	0,03 \pm 0,00	400	-0,01 \pm 0,01
WRN siRNA		WRN siRNA	
tBHQ [μ M]		tBHQ [μ M]	
0	0,78 \pm 0,02	0	1,07 \pm 0,01
50	0,82 \pm 0,03	50	0,91 \pm 0,03
100	0,63 \pm 0,09	100	0,59 \pm 0,09
200	0,20 \pm 0,04	200	-0,01 \pm 0,01
300	0,03 \pm 0,00	300	-0,01 \pm 0,01
400	0,04 \pm 0,01	400	-0,01 \pm 0,01

Tabelle 8-14: Daten zur Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit tBHQ.

Die Bildung intrazellulärer ROS in EA.hy926 Zellen und HUVEC wurde mit Hilfe des H₂DCFDA Assays fluorimetrisch gemessen. Tabellarisch aufgeführt sind Mittelwerte + SEM. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 3-20 zu finden.

EA.hy926		HUVEC	
NS siRNA DMSO	1,00 + 0,00	NS siRNA DMSO	1,00 + 0,00
NS siRNA 100 μ M tBHQ	1,34 + 0,19	NS siRNA 60 μ M tBHQ	1,61 + 0,21
NS siRNA 160 μ M tBHQ	1,37 + 0,22	NS siRNA 120 μ M tBHQ	1,47 + 0,27
WRN siRNA DMSO	0,87 + 0,12	WRN siRNA DMSO	0,63 + 0,19
WRN 100 μ M tBHQ	1,15 + 0,173	WRN 60 μ M tBHQ	1,02 + 0,22
WRN 160 μ M tBHQ	1,30 + 0,24	WRN 120 μ M tBHQ	1,61 + 0,35

8.3 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert.

Laarmann, K., Kress, J. M., Kaina, B., Fritz, G. (2019). Werner-Syndrome (WRN) DNA helicase and base excision repair (BER) factors maintain endothelial homeostasis. *DNA Repair* 73: 17-27.

Auflistung des Eigenanteils an der Publikation mit dem Titel:

Laarmann, K., Kress, J. M., Kaina, B., Fritz, G. (2019). Werner-Syndrome (WRN) DNA helicase and base excision repair (BER) factors maintain endothelial homeostasis. *DNA Repair* 73: 17-27.

Verfassen der Einleitung, des Material- und Methodenteils, sowie Mitarbeit bei der Abfassung des Ergebnis- und Diskussionsteils. Durchführung sämtlicher Versuche, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Abbildungen.

Zusatzdaten (Supplementary Data): Durchführung der zu den Abbildungen 1-4 und 6 zugehörigen Versuche, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Abbildungen.

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Gerhard Fritz für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung während der gesamten Arbeit.

Prof. Dr. Johannes Hegemann für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen sowie für die konstruktiven Vorschläge.

Prof. Dr. Matthias Kassack für die Möglichkeit den Ca^{2+} -Release Versuch im Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie durchführen zu dürfen sowie den **Mitarbeitern** für die Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung.

Prof. Dr. Kaina und **Joana Kreß** aus dem Institut für Toxikologie in Mainz für die gute Zusammenarbeit.

Dem gesamten **Hitzebunker** für die schöne Zeit und die fachbezogenen und nicht-fachbezogenen Gespräche.

Andi, Birgit, Christian, Christina, Jana, Katharina, Kerstin, Lara, Lena, Martina, Nicole, Reni, Sarah J., und **Sebastian** für ihre Hilfsbereitschaft.

Allen **Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie** für das angenehme und persönliche Arbeitsklima.

Meinen Freunden für die Motivation und die Geduld.

Mein ganz besonderer Dank gilt **meiner Familie**, der ich so viel zu verdanken habe.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, 30.07.2019

Kathrin Laarmann