

Die Rolle des Inhibitors der DNA-Bindung Id2 aus der Familie der Helix-Loop-Helix-Faktoren bei zellulärer Seneszenz

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carolin Christiane Stocker

aus Regensburg

Februar 2008

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dominik N. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

Disputation am 18.02.2008

Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. Ralf Dechend und im Besonderen Herrn Priv. Doz. Dr. Dominik Müller danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die gute Betreuung und die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis, vor allem nach dem Weggang meines ersten Betreuers.

Bei Herrn Prof. Dr. Luft bedanke ich mich für die Arbeitsmöglichkeiten in den Laboren der Franz-Volhard-Klinik, Universitätsklinikum Charite und am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für seine Bereitschaft, diese Dissertation zu begutachten und seine stete Unterstützung während der gesamten Zeit der Entstehung dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Dominik Müller und Priv. Doz. Dr. Ralf Dechend sowie unseren Nachbararbeitsgruppen danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Dr. Maren Wellner, Jana Czychi und Ute Gerhardt danke ich für die Unterstützung und Unterweisung in die verschiedenen molekularbiologischen Methoden. Priv. Doz. Dr. Anette Fiebeler, Petra Quass und Carsten Lindschau bin ich dankbar für die Unterstützung bei der Durchführung der immunzytochemischen Versuche. Des Weiteren geht mein Dank an Dr. Angelika Kusch für die Bereitstellung von Protokollen und Material sowie die Einarbeitung in die durchflusszytometrische Analyse. Ferner möchte ich Dr. Fatimunnisa Quadi danken für ihre Geduld bei den stundenlangen mikroskopischen Auswertungen. Und im Besonderen danke ich Gabi N'diaye und Mathilde Schmidt für die tatkräftige Hilfe im Labor.

Bei der Charite bedanke ich mich recht herzlich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für die Anteilnahme und Unterstützung während der Doktorarbeit bedanken.

Verena danke ich für die seelische und emotionale Unterstützung und die Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.2	Zelluläre Seneszenz	1
1.2.1	Formen zellulärer Seneszenz	1
1.2.2	Kriterien zellulärer Seneszenz	2
1.2.3	Mechanismen zellulärer Seneszenz	3
1.3	Zellzyklusregulation	5
1.3.1	Zellzyklusregulation in somatischen Zellen von der G ₀ - bis zur S-Phase	5
1.3.2	Wirkungsweisen der Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und p27	7
1.4	Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen	9
1.5	Rolle des Inhibitors der DNA-Bindung Id2	12
1.5.1	HLH (Helix-Loop-Helix)-Transkriptionsfaktoren	12
1.5.2	Die Rolle von Id-Proteinen	12
1.5.3	Id-Proteine und Zellzyklusregulatoren	13
1.6	Der Einfluss von Id2 auf die Blutdruckregulierung	15
1.7	Problemstellung	17
2.	Material	18
2.1	Geräte, Software, Verbrauchsmaterial	18
2.2	Chemikalien	20
2.3	Biologisches Material	21
2.4	Lösungen, Puffer, Medien	22
2.5	Synthetische Oligonukleotide	27
2.6	Kits	28
3.	Methoden	30
3.1	Isolierung von Primärzellen aus Mausearten	30
3.2	Zellkultur	30
3.2.1	Kultivierung	30
3.2.2	Passagieren von Zellkulturen	30
3.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	31
3.2.4	Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellkulturen	31

3.2.5	Ernten von Zellpellets	31
3.3	Proliferationsassay	32
3.4	Durchflusszytometrische Analyse	32
3.5	RNA-Analyse mittels Real-time PCR	33
3.5.1	RNA-Isolierung	33
3.5.2	Bestimmung des RNA-Gehaltes	34
3.5.3	cDNA-Synthese	34
3.5.4	Primerdesign	34
3.5.5	Real-time PCR	35
3.5.6	Taqman-Analyse	35
3.6	RNA-Analyse mittels Affymetrix-Chip	36
3.6.1	RNA-Isolierung	38
3.6.2	Erststrangsynthese	38
3.6.3	Test-Taqman	38
3.6.4	Zweitstrangsynthese	39
3.6.5	DNA-Aufreinigung	39
3.6.6	T7-Reaktion, Amplifikation	39
3.6.7	Aufreinigung mit RNeasy-Säulen	39
3.6.8	Affymetrix-Chip-Analyse	40
3.7	Proteinanalyse	41
3.7.1	Präparation von Zellextrakten	41
3.7.2	Bestimmung des Proteingehaltes	41
3.7.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.7.4	Western-Blot-Analyse	42
3.7.5	Chemilumineszenz-Verfahren	42
3.7.6	Strippen von Membranen	43
3.7.7	Quantitative Auswertung der Proteinexpression	43
3.8	Immunfluoreszenz	43
3.8.1	Fixierung und Permeabilisierung	43
3.8.2	Färbung und mikroskopische Analyse	44
3.8.3	Quantitative Auswertung	44
3.9	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität	44
3.10	Telomerase-Aktivitätsmessung	45
3.11	Statistische Analyse	46

4.	Ergebnisse	47
4.1	Wachstumsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen von Mäusen mit den unterschiedlichen genetischen Hintergründen NMRI und C57BL/6	47
4.1.1	Proliferationsverhalten	47
4.1.2	Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren unter basalen Bedingungen	47
4.1.2.1	Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21 ^{Cip1} und p27 ^{Kip1}	48
4.1.2.2	Proteinexpression von Cyclin D ₁	49
4.1.2.3	Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2	50
4.1.3	Eintritt in die S-Phase	52
4.1.4	Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren nach Synchronisation	53
4.1.4.1	Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21 ^{Cip1} und p27 ^{Kip1}	53
4.1.4.2	Proteinexpression von Cyclin D ₁	54
4.1.4.3	Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2	55
4.1.5	mRNA-Expression von p21 ^{Cip1}	57
4.1.5.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	57
4.1.5.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	57
4.1.6	mRNA-Expression von Id2	58
4.1.6.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	58
4.1.6.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	58
4.2	Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen von Id2 ^{-/-} -Mäusen mit NMRI-Hintergrund	59
4.2.1	mRNA-Expression von Id2	59
4.2.1.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	59
4.2.1.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	60
4.2.2	Proliferationsverhalten	61
4.2.3	Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren unter basalen Bedingungen	62
4.2.3.1	Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21 ^{Cip1} und p27 ^{Kip1}	62
4.2.3.2	Proteinexpression von Cyclin D ₁	63
4.2.3.3	Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2	64
4.2.4	Eintritt in die S-Phase	66
4.2.5	Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren nach Synchronisation	67
4.2.5.1	Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21 ^{Cip1} und p27 ^{Kip1}	67
4.2.5.2	Proteinexpression von Cyclin D ₁	68
4.2.5.3	Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2	69
4.2.6	mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors p21 ^{Cip1}	71

4.2.6.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	71
4.2.6.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	71
4.3	Zelluläre Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2 ^{-/-} -Mäusen	73
4.3.1	mRNA-Expression des Seneszenz-Biomarkers p16 ^{Ink4}	73
4.3.1.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	73
4.3.1.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	74
4.3.2	mRNA-Expression des Seneszenz-Biomarkers Colla1	74
4.3.2.1	Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse	74
4.3.2.2	Ergebnis der Real-time PCR-Analyse	75
4.3.3	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität	76
4.3.4	Morphologische Veränderung	77
4.3.5	Expression von α -Glattmuskel-Actin	78
4.3.5.1	Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin	78
4.3.5.2	mRNA-Expression von α -Glattmuskel-Actin	79
4.3.6	Telomerase-Aktivität	79
4.3.7	mRNA-Expression von BMP4 (bone morphogenetic protein 4)	80
4.4	Keine replikative Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen	81
4.4.1	mRNA-Expression der Seneszenz-Biomarker p16 ^{Ink4} und Colla1	81
4.4.2	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität	81
4.4.3	Morphologische Veränderung	82
4.4.4	Expression von α -Glattmuskel-Actin	83
5.	Diskussion und Ausblick	84
5.1	Id2-Deletion verhindert die Ausbildung zellulärer Seneszenz	84
5.2	Id2 greift regulierend in den Zellzyklus glatter Gefäßmuskelzellen ein	88
5.3	Id2 übt keinen Einfluss aus auf die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57/BL6-Mäusen	94
5.4	Ausblick	95
6.	Zusammenfassung	96
7.	Summary	98
8.	Literaturverzeichnis	100
9.	Anhang	109

Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata
A ₂₆₀	Absorption bei 260nm
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH	“basic helix-loop-helix” (basisches Helix-Loop-Helix)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP4	bone morphogenetic proteins
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	“bovine serum albumin” (Rinderserumalbumin)
CAK	“cdk activating kinase” (cdk-aktivierenden Kinase)
cdk	“cyclin dependent kinase” (cyclinabhängige Kinase)
CO ₂	Kohlendioxid
Colla1	Collagen 1a1
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	“epidermal growth factor” (epidermaler Wachstumsfaktor)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	“fetal bovine serum” (fetales Rinderserum)
FGF	“fibroblast growth factor” (Fibroblast Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gravidität
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-ethansulfonsäure
HLH	“helix-loop-helix” (Helix-Loop-Helix)
HPR	“horseradish peroxidase” (Meerrettich-Peroxidase)
hTERT	“human telomerase reverse transcriptase” (humane Telomerase Reverse Transkriptase)
Id2	“inhibitor of differentiation” (Inhibitor der Differenzierung)
Id2	“inhibitor of DNA binding” (Inhibitor der DNA-Bindung)
IgG	Immunglobulin G

LDL	“low density lipoprotein” (Lipoprotein niedriger Dichte)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mk	monoclonal
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NIH	National Institutes of Health
NP40	Nonidet P40
PBS	“phosphate-buffered saline” (Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung)
PCNA	“proliferating cell nuclear antigen” (Kernantigen proliferierender Zellen)
PCR	“polymerase chain reaction” (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pk	polyclonal
pRB	Retinoblastom-Protein
RIPA	“radioimmunoprecipitation assay” (Radioaktivitäts-Immunpräzipitations-Testverfahren)
rpm	“rotation per minute” (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Aktivität
SDS	“sodium dodecyl sulphate” (Natriumdodecylsulfat)
Skp2	“S-phase kinase-associated protein 2” (S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 2)
SmBM	“smooth muscle cell basal medium” (Basalmedium für glatte Gefäßmuskelzellen)
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween® 20
TEMED	(N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin)
TGFβ	„transforming growth factor β” (transformierender Wachstumsfaktor beta)
v/v	“volume per volume” (Volumen pro Volumen)
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid