

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen von Mäusen mit den unterschiedlichen genetischen Hintergründen NMRI und C57BL/6

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Wachstumsverhaltens glatter Gefäßmuskelzellen von Mäusen mit den unterschiedlichen genetischen Hintergründen NMRI und C57BL/6 gezeigt. Es wird postuliert, dass glatte Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen ein protektiveres Verhalten gegenüber schädigenden Einflüssen zeigen als glatte Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen. Eine schützende Wirkung spiegelt sich beispielsweise in der Fähigkeit der glatten Gefäßmuskelzellen wider, auf pathogene Noxen mit einer verstärkten Teilungsrate zu reagieren und dadurch schädigende Einflüsse auf die Gefäßwand zu kompensieren.

Nachfolgend werden zunächst Ergebnisse vorgestellt, die unter basalen Bedingungen generiert wurden. Dies bedeutet, dass die Zellen wachsender Kulturen untersucht wurden und somit Zellen aus jeder Phase des Zellzyklus zum Ergebnis beitrugen. Diese Untersuchungen bieten einen Überblick über das Wachstumsverhalten der Gesamtpopulation. Zur Spezifizierung der Ergebnisse wurden die Zellen durch Serumentzug in die G₀-Phase überführt und traten anschließend synchron durch mitogene Stimulation in den Zellzyklus ein.

4.1.1 Proliferationsverhalten

Zur Überprüfung des Wachstumsverhaltens der glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6- bzw. von NMRI-Mäusen wurde die Proliferationsrate analysiert. Die Zellen wurden unter basalen Bedingungen ausgesät und der ATP-Gehalt täglich vom 0.Tag bis zum 4.Tag analysiert. Der ATP-Gehalt nimmt proportional zur Zellvermehrung zu. Die Wachstumskurve von glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen zeigt einen steileren Anstieg und somit eine höhere Proliferationsrate (s. Abb. 4.1).

4.1.2 Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren unter basalen Bedingungen

Zur Überprüfung der Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren unter basalen Bedingungen wurden die Zelllysate von 70-90% konfluenten glatten Gefäßmuskelzellen auf die gesuchten Proteingehalte untersucht. Die Bestimmungen erfolgten in dreifachen Ansätzen. Die quantitative Auswertung stellt die relative Proteinexpression dar, die sich proportional zur Bandenintensität verhält. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

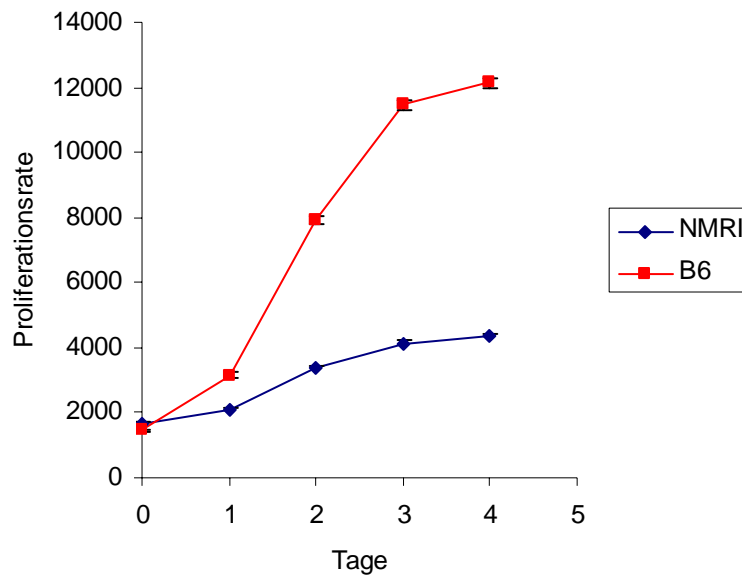


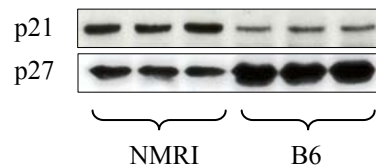
Abbildung 4.1: Wachstumskurve glatter Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen von Tag 0 bis Tag 4. Die gemessene Lumineszenzintensität verhält sich proportional zum Anstieg des ATP-Gehaltes und somit zur Zellmenge. Die Ergebnisse eines fünffachen Ansatzes stellen den Mittelwert \pm SEM dar.

4.1.2.1 Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}

Auf Grund der unterschiedlichen Proliferationsrate wurde die Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} unter basalen Bedingungen untersucht. p21^{Cip1} ist bekannt als Zellzyklusinhibitor, der in hohen Konzentrationen den Übergang der Zellen aus der G₁-Phase in die S-Phase hemmt. p27^{Kip1} hingegen liegt in der G₀-Phase in hoher Konzentration vor und hemmt die Zellen am Eintritt in die G₁-Phase (Sherr und Roberts, 1999).

Bei der Quantifizierung von p21^{Cip1} wurde die Bandenintensität der NMRI-Ergebnisse auf 100% festgelegt. p21^{Cip1} wird unter basalen Bedingungen in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen 2,0fach stärker exprimiert als in C57BL/6-Zellen. Der Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} verhält sich entgegengesetzt. Bei der Quantifizierung von p27^{Kip1} wurde die Bandenintensität der C57BL/6-Ergebnisse auf 100% festgelegt. In glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen liegt er mit einer relativen Proteinmenge von 43% vor und wird somit in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen 2,3fach schwächer exprimiert als in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen (s. Abb. 4.2).

A)



B)

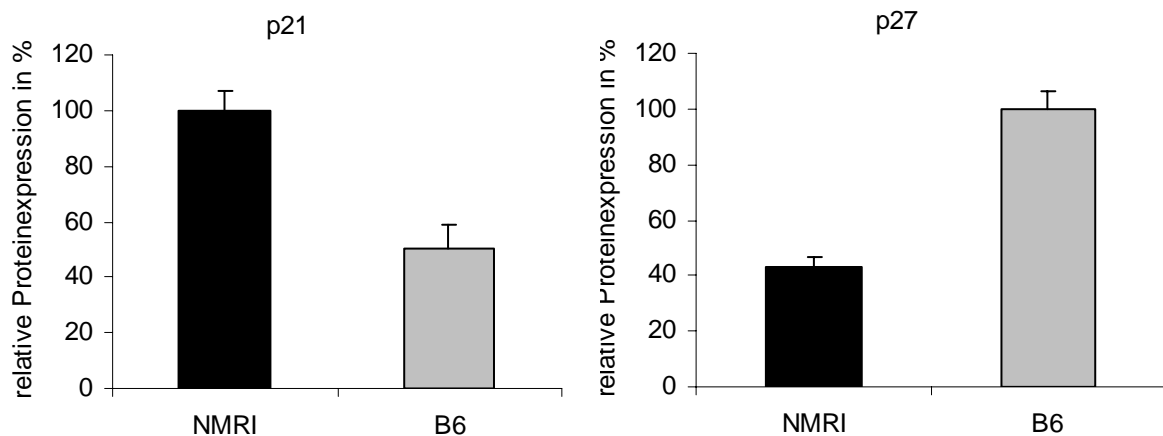


Abbildung 4.2: Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.1.2.2 Proteinexpression von Cyclin D1

Cyclin D ist ein positiver Zellzyklusregulator und das erste Cyclin, das nach mitogener Stimulation in der frühen G₁-Phase exprimiert wird. Cyclin D umfasst die Subtypen Cyclin D₁, Cyclin D₂ und Cyclin D₃. Der verwendete Cyclin D₁-Antikörper detektiert Cyclin D₁ und in einem etwas geringeren Ausmaß Cyclin D₂.

Cyclin D₁ wird in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen mit einer relativen Proteinexpression von 31% gebildet, bezogen auf die normalisierten Werte von C57BL/6-Zellen. Unter basalen Bedingungen wird Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen 3,2fach stärker exprimiert als in NMRI-Mäusen. Die Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (s. Abb. 4.3).

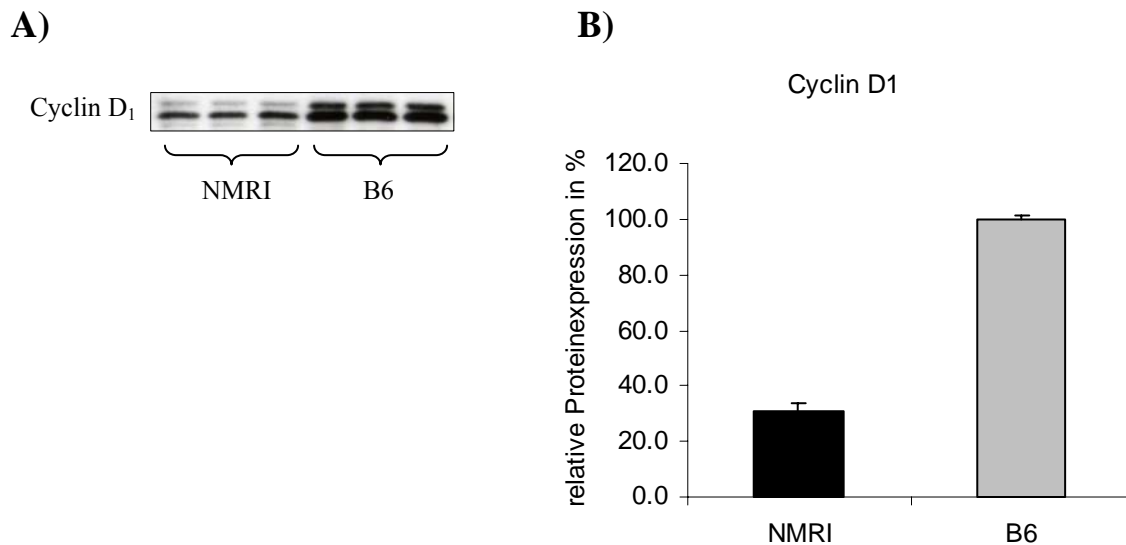


Abbildung 4.3: Proteinexpression von Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin D₁. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.1.2.3 Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2

Cyclin E wird in der Mitte der G₁-Phase des Zellzyklus verstärkt exprimiert. Dies erfolgt nach Phosphorylierung und Inaktivierung des Taschenproteins pRb. Über einen Rückkopplungsmechanismus fördert Cyclin E das Fortschreiten des Zellzyklus. Das Maximum der Cyclin A-Expression befindet sich am Anfang der S-Phase. Cyclin A wird daher auch als S-Phase-Marker betrachtet. Sowohl Cyclin E als auch Cyclin A wirken in aktivierter Form. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung an cdk2 (Sherr und Roberts, 1999).

Cyclin E, Cyclin A und cdk2 werden unter basalen Bedingungen in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen deutlich stärker exprimiert als in NMRI-Mäusen. Diese Ergebnisse bestätigen das Resultat der stärkeren Proliferationsrate in C57BL/6-Mäusen. Die relative Proteinexpression von Cyclin E in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen beträgt 14,6%. Der S-Phase-Marker Cyclin A liegt in NMRI-Zellen zu 5,4% exprimiert vor und cdk2 wird mit 51,6% gebildet. Die Expressionsunterschiede sind statistisch signifikant (s. Abb. 4.4).

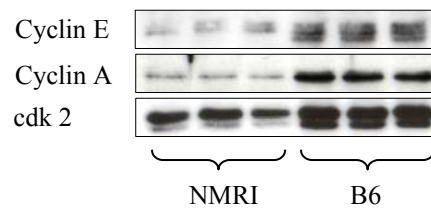
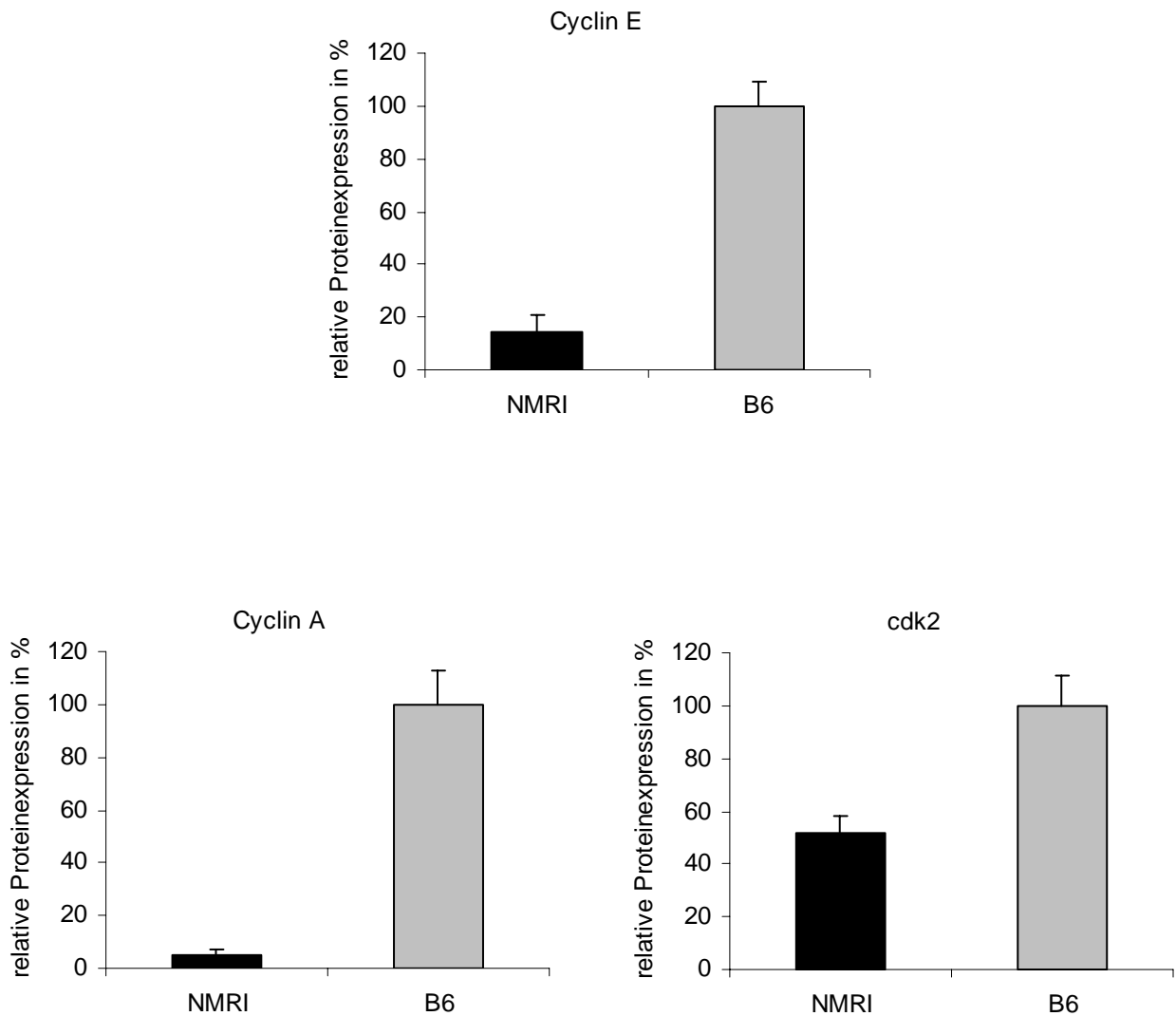
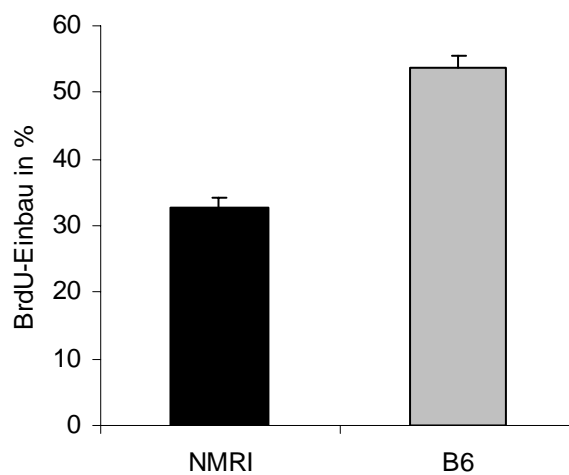
A)**B)**

Abbildung 4.4: Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2 in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.1.3 Eintritt in die S-Phase

Um zu überprüfen in welcher Phase des Zellzyklus der Proliferationsunterschied stattfindet, wurde der Fokus auf den G₁/S-Übergang gelegt. Dieser Übergang wird häufig blockiert durch die Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden durch 24-stündigen Mitogenentzug synchronisiert und 24 Stunden nach Zugabe von Serum, Wachstumsfaktoren und BrdU untersucht. Der S-Phase-Eintritt wurde durchflusszytometrisch über die Quantifizierung der BrdU-Inkorporation analysiert. BrdU, ein synthetisches Nukleotid, wird während der Synthese-Phase in die DNA eingebaut. 54% der glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen und 33% der NMRI-Zellen befinden sich in der S-Phase. Der Unterschied ist statistisch signifikant (s. Abb. 4.6).

A)



B)

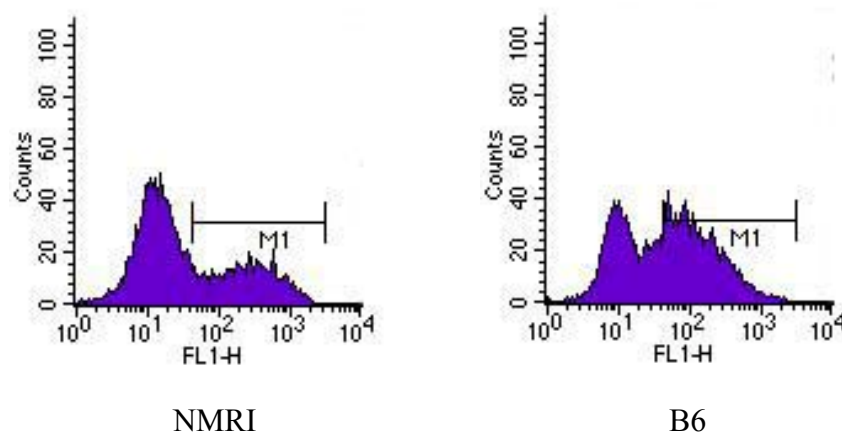


Abbildung 4.5: Durchflusszytometrische Untersuchung des BrdU-Einbaus in die DNA glatter Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. **A)** Quantifizierung des S-Phase-Eintritts. Das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$. **B)** Exemplarische Darstellung einer Messreihe der FACS-Ergebnisse.

4.1.4 Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren nach Synchronisation

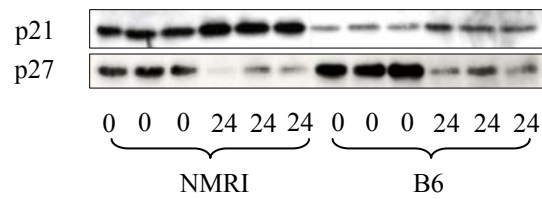
Zur Verifizierung des Ergebnisses der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren unter synchronisierten Bedingungen untersucht. Hierfür wurden die glatten Gefäßmuskelzellen 48 Stunden unter Mangelbedingungen mit 0,5% Serum synchronisiert und in der G₀-Phase arretiert. Nach dieser Zeit wurden die Null-Stunden-Werte generiert. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und 20% Serum traten die Zellen in den Zellzyklus ein. Nach 24-stündiger mitogener Stimulation wurden die 24-Stunden-Werte erstellt.

4.1.4.1 Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}

Es ist bekannt, dass der Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} während der G₀-Phase kaum exprimiert wird, durch mitogene Stimulation in der G₁-Phase leicht ansteigt und durch Bindung an Cyclin D den Zellzyklusprogress vorantreibt. Ab einer Grenzkonzentration wirkt p21^{Cip1} jedoch als Zellzyklusinhibitor und hemmt den Übergang in die S-Phase. p27^{Kip1} ist ein Zellzyklusinhibitor, der in hoher Konzentration in der G₀-Phase vorliegt und die Zellen am Eintritt in die G₁-Phase hemmt. Erst durch mitogene Stimulation nimmt die Konzentration in der G₁-Phase langsam ab (Sherr und Roberts, 1999).

Die Expression von p21^{Cip1} in glatten Gefäßmuskelzellen steigt sowohl in NMRI- als auch in C57BL/6-Zellen von 0 bis 24 Stunden an. An beiden Messpunkten ist die Expression in NMRI-Zellen stärker als in C57BL/6-Zellen, wodurch die Ergebnisse der Untersuchung unter Basalbedingungen bestätigt werden. Zur Bestimmung der relativen Expressionsunterschiede wurden die höchsten Bandenintensität auf 100% festgelegt. Die p21^{Cip1}-Expression in NMRI-Zellen beträgt in der G₀-Phase 60%. In C57BL/6-Zellen wird p21^{Cip1} zum Zeitpunkt 0 Stunden zu 6% und nach 24-stündiger Stimulation zu 26% exprimiert. p27^{Kip1} liegt in beiden Mäustämmen in der G₀-Phase in hoher Konzentration vor und nimmt mit Eintritt in den Zellzyklus ab. Die Werte wurden normalisiert auf die Bandenintensität der Null-Stunden-Werte der p27^{Kip1}-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von C57/BL6-Mäusen. Somit liegt p27^{Kip1} in NMRI-Zellen zum Zeitpunkt 0 Stunden 37% und nach 24 Stunden 7,5% exprimiert vor. Der 24-Stunden-Wert von C57BL/6-Zellen beträgt 39% (s. Abb. 4.6). An beiden Messpunkten ist p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen in höheren Konzentrationen zu finden und bestätigt damit das Western-Blot-Ergebnis, das unter Basalbedingungen generiert wurde.

A)



B)

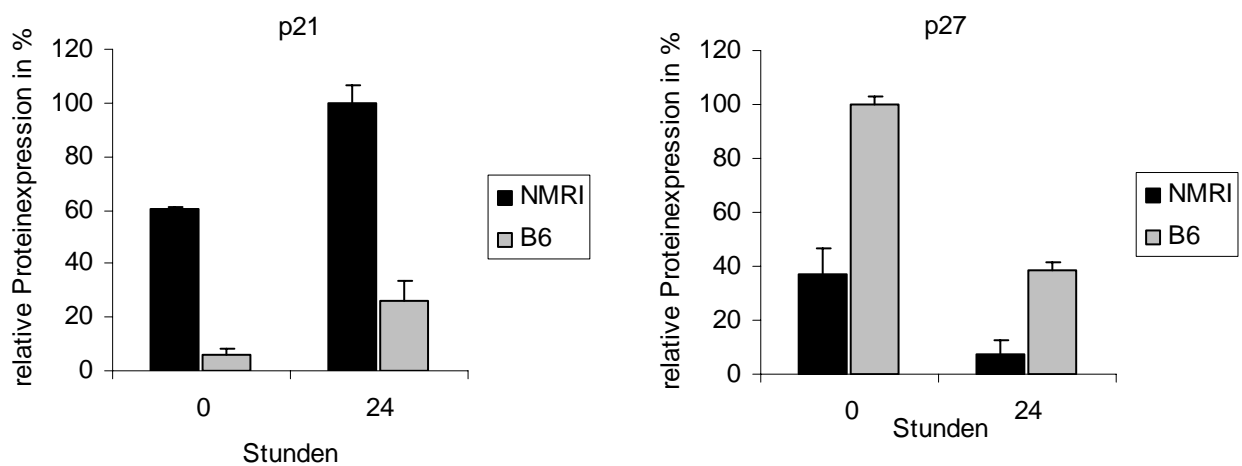


Abbildung 4.6: Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die Werte der 24-Stunden-Vergleiche der p21^{Cip1}-Expression sowie die Null-Stunden-Werte der p27^{Kip1}-Expression unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.1.4.2 Proteinexpression von Cyclin D1

Cyclin D₁ wird in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen deutlich stärker exprimiert als in NMRI-Zellen. Zur Bestimmung der relativen Expressionsunterschiede von Cyclin D₁ wurde die Bandenintensität der 24-Stunden-Werte der C57BL/6-Proben auf 100% festgelegt. Zum Zeitpunkt 24 Stunden liegt Cyclin D₁ in C57BL/6-Zellen 1,5fach stärker exprimiert vor als in NMRI-Zellen. Der Unterschied ist statistisch signifikant. Zum Zeitpunkt 0 Stunden sind niedrige Cyclin D₁-Mengen zu erkennen. In NMRI-Zellen beträgt dieser Anteil 4,5%, in C57BL/6-Zellen 22% (s. Abb. 4.7).

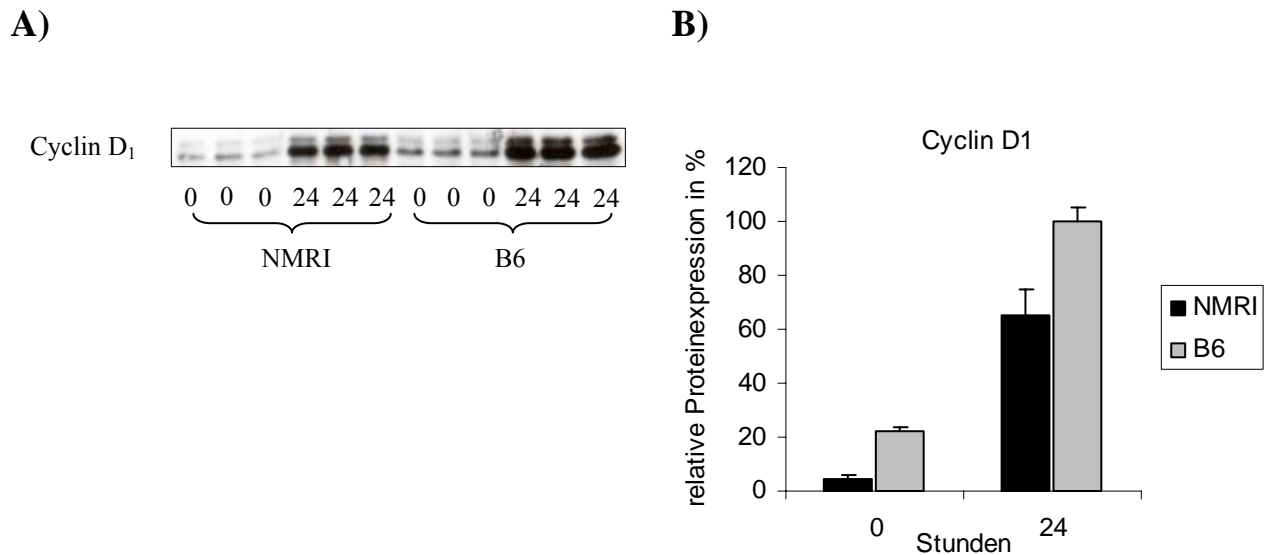
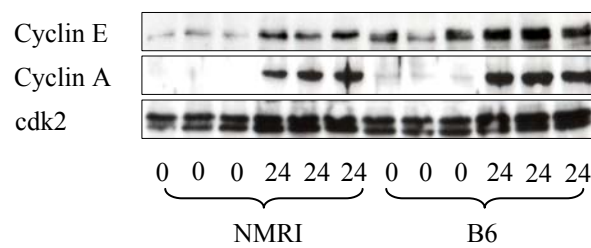


Abbildung 4.7: Proteinexpression von Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin D₁. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Die Werte der 24 Stunden-Vergleiche unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.1.4.3 Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2

Die positiven Zellzyklusregulatoren Cyclin E, Cyclin A und cdk2 werden sowohl in der G₀-Phase als auch 24 Stunden nach Eintritt in den Zellzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen stärker exprimiert als in NMRI-Zellen. Dies bestätigen die Western-Blot-Ergebnisse unter basalen Bedingungen und geben Einblick in das Zellzyklusverhalten der Zellen. Zur Bestimmung der relativen Expressionsunterschiede wurde jeweils die Bandenintensität der 24-Stunden-Werte der C57BL/6-Proben auf 100% festgelegt. Ein Grundspiegel von Cyclin E liegt bei 0 Stunden in C57BL/6-Zellen bereits zu 52% vor, ist hingegen zu diesem Zeitpunkt in NMRI-Zellen kaum nachweisbar. 24 Stunden nach Eintritt in den Zellzyklus besteht die Funktion von Cyclin E darin, den Zellzyklus voranzutreiben. Zu diesem Zeitpunkt wird Cyclin E in C57BL/6-Zellen doppelt so stark exprimiert wie in NMRI-Zellen. Der S-Phase-Marker Cyclin A ist in beiden Mäusestämmen in der G₀-Phase kaum detektierbar. 24 Stunden nach mitogener Stimulation wird Cyclin A in C57BL/6-Zellen 1,7fach stärker gebildet als in NMRI-Zellen. Cdk2, der Aktivator von Cyclin E und Cyclin A, wird zum Zeitpunkt 24 Stunden in C57BL/6-Zellen 15% stärker exprimiert als in NMRI-Zellen (s. Abb. 4.8).

A)



B)

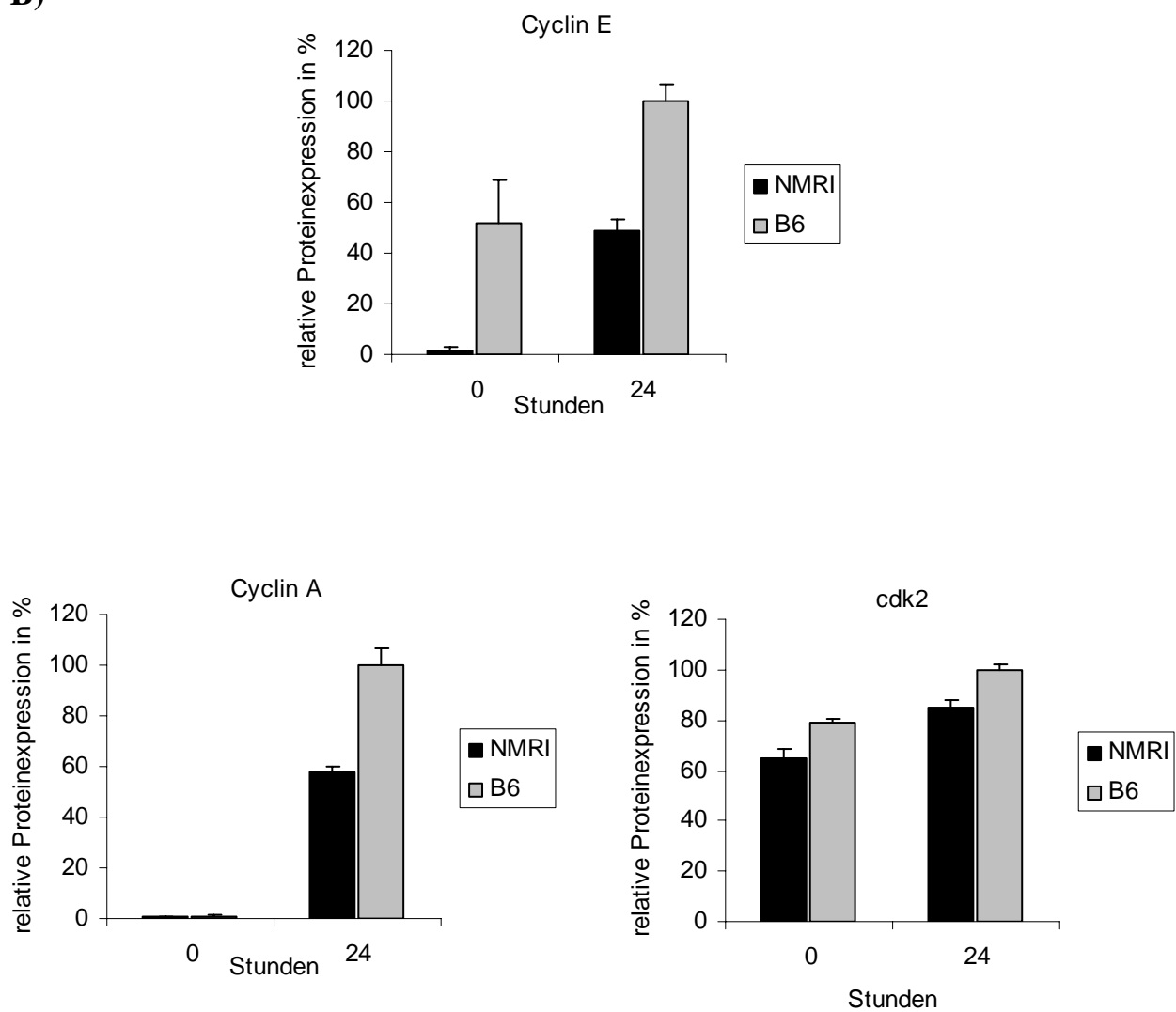


Abbildung 4.8: Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2 in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Alle Werte der 24 Stunden-Vergleiche unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.1.5 mRNA-Expression von p21^{Cip1}

4.1.5.1 Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

Zum besseren Verständnis der Unterschiede zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6- und NMRI-Mäusen wurden die Zelllysate mit Hilfe eines Mikroarrays untersucht. Von besonderem Interesse bei der Untersuchung waren die Unterschiede der mRNA-Expression der Zellzyklusregulatoren. Die mRNA von p21^{Cip1} liegt demnach in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen 2,0fach stärker exprimiert vor als in C57BL/6-Mäusen (s. Tab .4.1).

NMRI versus B6	Gentitel	Gensymbol
2,0	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Cdkn1a

Tabelle 4.1: Affymetrix-Chip-Analyse der mRNA-Expression von p21^{Cip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Der Faktor des Expressionsunterschieds ist angegeben.

4.1.5.2 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Zur Verifizierung der Affymetrix-Chip-Analyse wurde die mRNA-Expression von p21^{Cip1} der Zelllysate glatter Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Zellen mit Hilfe der Real-time PCR untersucht. Die Auswertung zeigt in NMRI-Zellen eine statistisch signifikante 2,4fach stärkere mRNA-Expression von p21^{Cip1} als in C57BL/6-Zellen (s. Abb. 4.9).

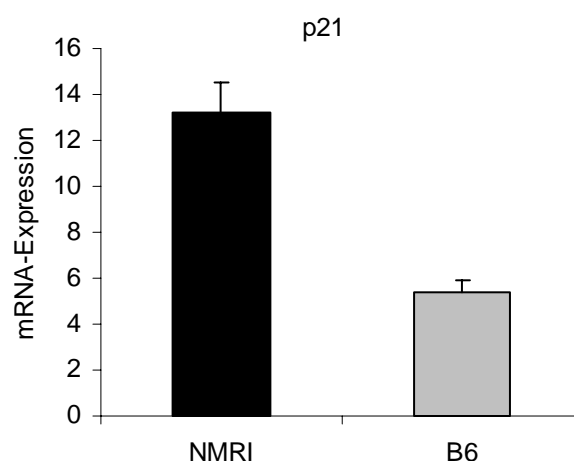


Abbildung 4.9: mRNA-Expression von p21^{Cip1}. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM, P<0,05.

4.1.6 mRNA-Expression von *Id2*

4.1.6.1 Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

Id2 wird auf dem Affymetrix-Chip mit zwei Oligo-Sequenzen repräsentiert. Der erste Probensatz zeigt eine 6,1fach stärkere *Id2* mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen als in C57BL/6-Zellen. Beim zweiten Probensatz wird eine 3,8fache *Id2* mRNA-Expression in NMRI-Zellen festgestellt. Diese starken Ergebnisschwankungen verdeutlichen die Notwendigkeit einer Ergebnisverifizierung (s. Tab. 4.2).

NMRI versus B6	Gentitel	Gensymbol
6,1	inhibitor of DNA binding 2	<i>Id2</i>
3,8	inhibitor of DNA binding 2	<i>Id2</i>

Tabelle 4.2: Affymetrix-Chip-Analyse der mRNA-Expression von *Id2* in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Der Faktor des Expressionsunterschieds ist angegeben.

4.1.6.2 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Die *Id2* mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen wurde mittels Real-time PCR und mit Hilfe einer Taqman-Sonde analysiert. Die Auswertung zeigt, dass *Id2* mRNA in NMRI-Zellen 3,1fach stärker exprimiert vorliegt als in C57BL/6-Zellen, der Unterschied ist statistisch signifikant (s. Abb. 4.10).

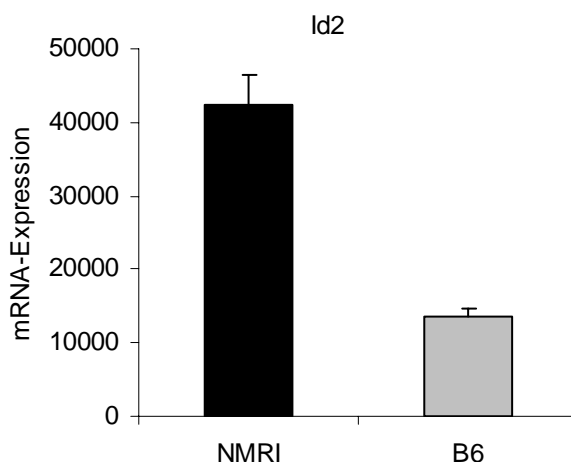


Abbildung 4.10: mRNA-Expression von *Id2*. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.2 Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen mit NMRI-Hintergrund

Auf Grund des Ergebnisses der unterschiedlichen mRNA-Expression von $Id2$ in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen stellte sich die Frage, ob zwischen dem Verhalten von glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen und $Id2^{-/-}$ -Mäusen mit einem NMRI-Hintergrund eine Analogie besteht. Ausgehend von dieser Fragestellung wurden glatte Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ - gegen $Id2^{-/-}$ -Mäusen verglichen. Diese Mäuse besitzen einen NMRI-Hintergrund.

In früheren Tierversuchsstudien wurde festgestellt, dass sich Wildtyp-NMRI- (auch als $Id2^{+/+}$ bezeichnet) und $Id2^{+/-}$ -Mäuse in ihrem Verhalten kaum unterscheiden, es bestehen jedoch ausgeprägte Unterschiede im Vergleich des Verhaltens von $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen. Auf Grund dieser Datenlage wurde für die folgenden Untersuchungen das Vergleichsmodell $Id2^{+/-}$ - versus $Id2^{-/-}$ -Zellen gewählt. Zur Abklärung des ähnlichen Verhaltens von Wildtyp- und $Id2^{+/-}$ -Zellen wurde bei den meisten Versuchen zusätzlich zum Vergleichspaar eine Probe glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -Mäusen mit NMRI-Hintergrund ausgewertet.

4.2.1 mRNA-Expression von $Id2$

Zur Bestätigung, dass es sich bei den verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen der Mäuse mit NMRI-Hintergrund tatsächlich um $Id2^{+/-}$ - bzw. um $Id2^{-/-}$ -Zellen handelt, wurde die $Id2$ mRNA-Expression von beiden Zellarten sowie von Wildtypzellen untersucht. Sowohl die Affymetrix-Chip-Analyse als auch der Nachweis mittels Real-time PCR bestätigte die jeweils entsprechende Ausknockung des Gens $Id2$.

4.2.1.1 Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

$Id2$, das auf dem Affymetrix-Chip mit zwei Probensätzen repräsentiert wird, zeigt eine 546fach bzw. 86fach stärkere Expression von $Id2$ mRNA in $Id2^{+/+}$ - als in $Id2^{-/-}$ -Zellen. Beim Vergleich der glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen ist der Expressionsunterschied etwas geringer. Hier wird $Id2$ mRNA in $Id2^{+/-}$ -Zellen 227fach bzw. 69fach stärker exprimiert als in $Id2^{-/-}$ -Zellen (s. Tab. 4.3).

Id2 ^{+/+} versus Id2 ^{-/-}	Id2 ^{+/-} versus Id2 ^{-/-}	Gentitel	Gensymbol
546	227	inhibitor of DNA binding 2	Id2
86	69	inhibitor of DNA binding 2	Id2

Tabelle 4.3: Affymetrix-Chip-Analyse der mRNA-Expression von Id2 von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Die Faktoren der Expressionsunterschiede sind angegeben.

4.2.1.2 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Zur Verifizierung der stark schwankenden Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Untersuchung wurde das Ergebnis mittels Real-time PCR analysiert. Das qualitative Ergebnis bestätigt den mittels Genchip nachgewiesenen Expressionsunterschied der Id2 mRNA in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{-/-}-Mäusen bzw. Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Die quantitative Auswertung zeigt jedoch deutlich stärkere Expressionsunterschiede. Id2 mRNA wird in Id2^{+/+}-Zellen 8,0*10³ fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. In Id2^{+/-}-Zellen wird Id2 mRNA 3,5*10³ fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Hingegen wird Id2 mRNA in Id2^{+/+}-Zellen nur 2,3fach stärker exprimiert als in Id2^{+/-}-Zellen (s. Abb. 4.11).

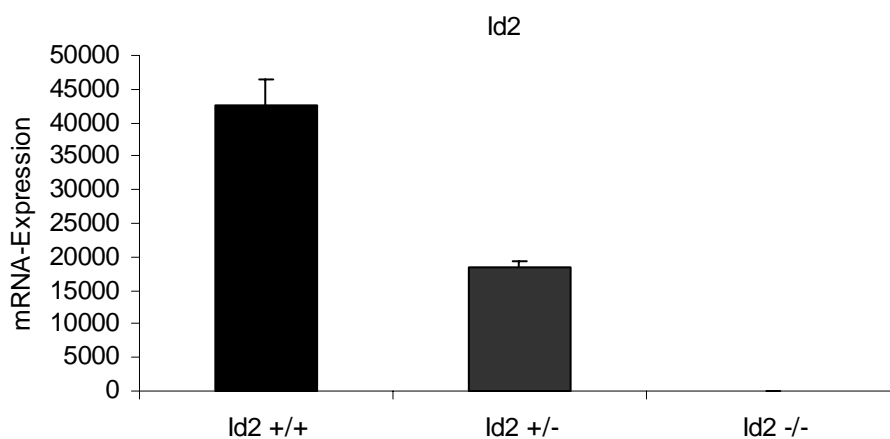


Abbildung 4.11: mRNA-Expression von Id2. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Die Unterschiede des Vergleichs Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen sind statistisch signifikant, P<0,05.

4.2.2 Proliferationsverhalten

Das Replikationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays untersucht. Die Wachstumskurve von $Id2^{+/+}$ -Zellen steigt am stärksten, die Kurve von $Id2^{-/-}$ - am geringsten an. $Id2^{+/-}$ - Zellen zeigen eine mittlere Proliferationsrate (s.Abb.4.12).

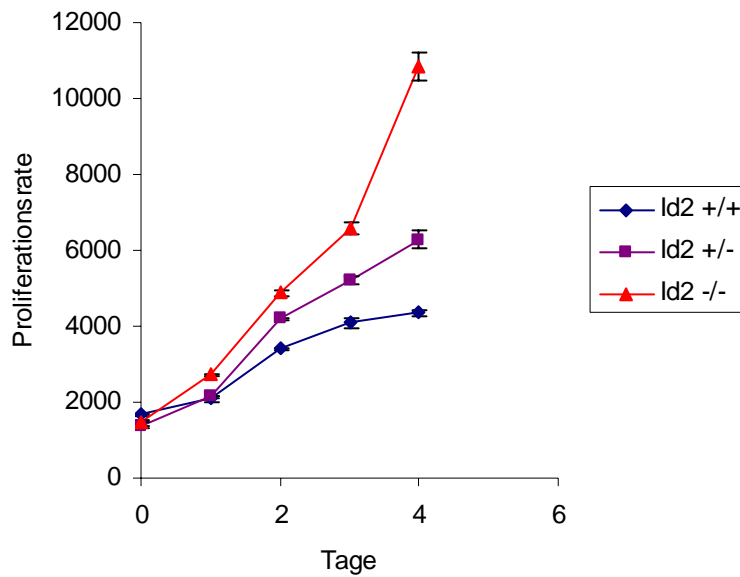


Abbildung 4.12: Wachstumskurve glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen von Tag 0 bis Tag 4. Die gemessene Lumineszenzintensität verhält sich proportional zum Anstieg des ATP-Gehaltes und somit zur Zellmenge. Die Ergebnisse eines fünffachen Ansatzes stellen den Mittelwert \pm SEM dar.

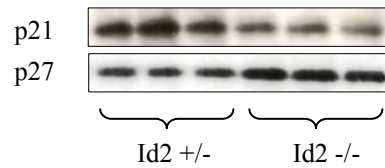
4.2.3 *Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren unter basalen Bedingungen*

Zwischen dem Proliferationsunterschied glatter Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen und dem Proliferationsunterschied zwischen NMRI- und C57BL/6-Mäusen besteht eine deutliche Analogie. Dies stellte die Frage in den Vordergrund, ob diese Analogie auch in der Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren wieder zu finden ist. Zur Überprüfung der Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren unter basalen Bedingungen wurden die Zelllysate von 70-90% konfluenten glatten Gefäßmuskelzellen auf die gesuchten Proteingehalte untersucht. Die Bestimmungen erfolgten in dreifachen Ansätzen. Die Versuche wurden mindestens zweimal wiederholt.

4.2.3.1 Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}

Das Ergebnis der Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zeigt eine qualitative Analogie zur Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in NMRI- und C57BL/6-Zellen. Sowohl in Id2^{-/-}- als auch in C57BL/6-Zellen wird p21^{Cip1} geringer und p27^{Kip1} stärker exprimiert als in Id2^{+/-}- bzw. NMRI-Zellen. Für die Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten der stärker exprimierten Proteine auf 100% festgelegt. Der Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} wird in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}-Zellen 1,9fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Der Unterschied ist statistisch signifikant, fällt jedoch geringer aus als im Vergleich NMRI- versus C57BL/6-Zellen. Der Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} wird in Id2^{+/-}-Zellen 2,9fach geringer exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Dieser statistisch signifikante Unterschied ist dem Expressionsunterschied in NMRI- und C57BL/6-Zellen ähnlich (s.Abb.4.13).

A)



B)

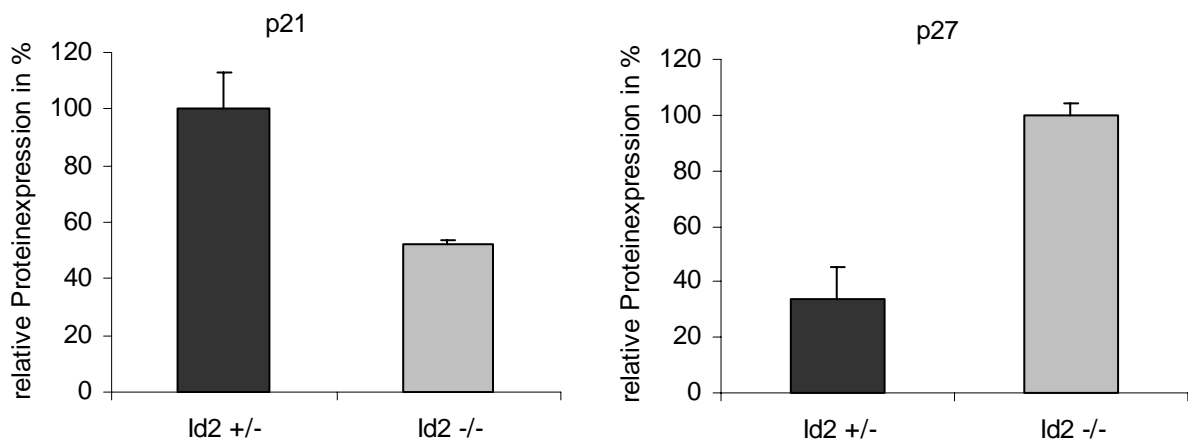
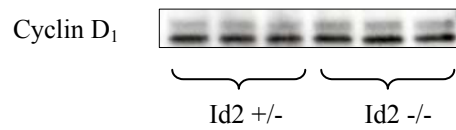


Abbildung 4.13: Unterschiedliche Expression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.2.3.2 Proteinexpression von Cyclin D1

Zur Überprüfung, ob die Analogie zwischen den Unterschieden in Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen und in NMRI- versus C57BL/6-Zellen auch für positive Zellzyklusregulatoren bestätigt werden kann, wurde die Proteinexpression von Cyclin D₁ bestimmt. Interessanterweise ist kein qualitativer Unterschied in der relativen Proteinexpression der Zellsate von Id2^{+/-} und Id2^{-/-}-Mäusen erkennbar. Bei der Quantifizierung des Proteingehalts wurden die Werte auf die Ergebnisse der Id2^{+/-}-Zellen normalisiert. Mit einer Cyclin D₁-Expression von 89% in Id2^{+/-}-Zellen ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen nachweisbar. Somit trifft die Analogie der Vergleiche Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen und NMRI- versus C57BL/6-Zellen nicht auf die Proteinexpression des positiven Zellzyklusregulators Cyclin D₁ zu (s.Abb.4.14).

A)



B)

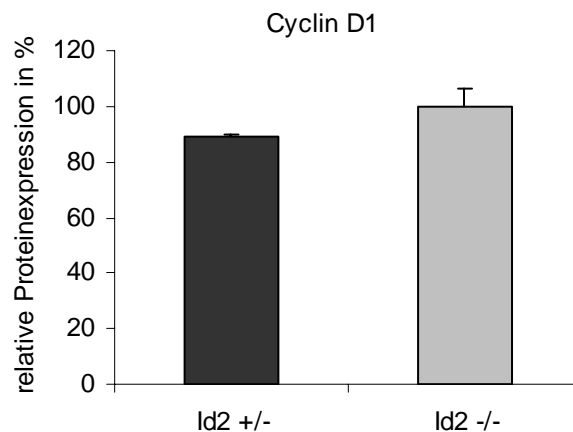
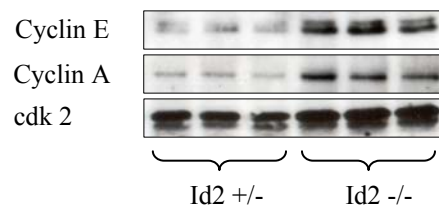


Abbildung 4.14: Proteinexpression von Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin D₁. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM, P>0,05.

4.2.3.3 Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2

Da kein Unterschied in der Cyclin D₁-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen zwischen Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden konnte, lag ein besonderes Interesse im Nachweis der Proteinexpression weiterer positiver Zellzyklusregulatoren. Qualitativ ist ein deutlicher Unterschied in der Expression von Cyclin E und Cyclin A erkennbar. Der qualitative Unterschied in der cdk2-Expression fällt etwas geringer aus. Die Quantifizierung bestätigte dieses Ergebnis. Alle Werte wurden auf die jeweiligen Proteinexpressionen der Bandenintensität von Id2^{-/-}-Zellen normalisiert. Die relative Proteinexpression von Cyclin E in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}-Zellen liegt mit 33% deutlich niedriger als in Id2^{-/-}-Zellen. Die relative Proteinexpression von Cyclin A in Id2^{+/-}-Zellen zeigt mit 31% ein ähnliches Ergebnis. Auch cdk2 ist mit einer relativen Expressionsrate von 67% in Id2^{+/-}-Zellen in geringerem Maße vorhanden. Alle Unterschiede sind statistisch signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte These der Analogie zwischen den Vergleichen in Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen und NMRI- versus C57BL/6-Zellen (s.Abb.4.15).

A)



B)

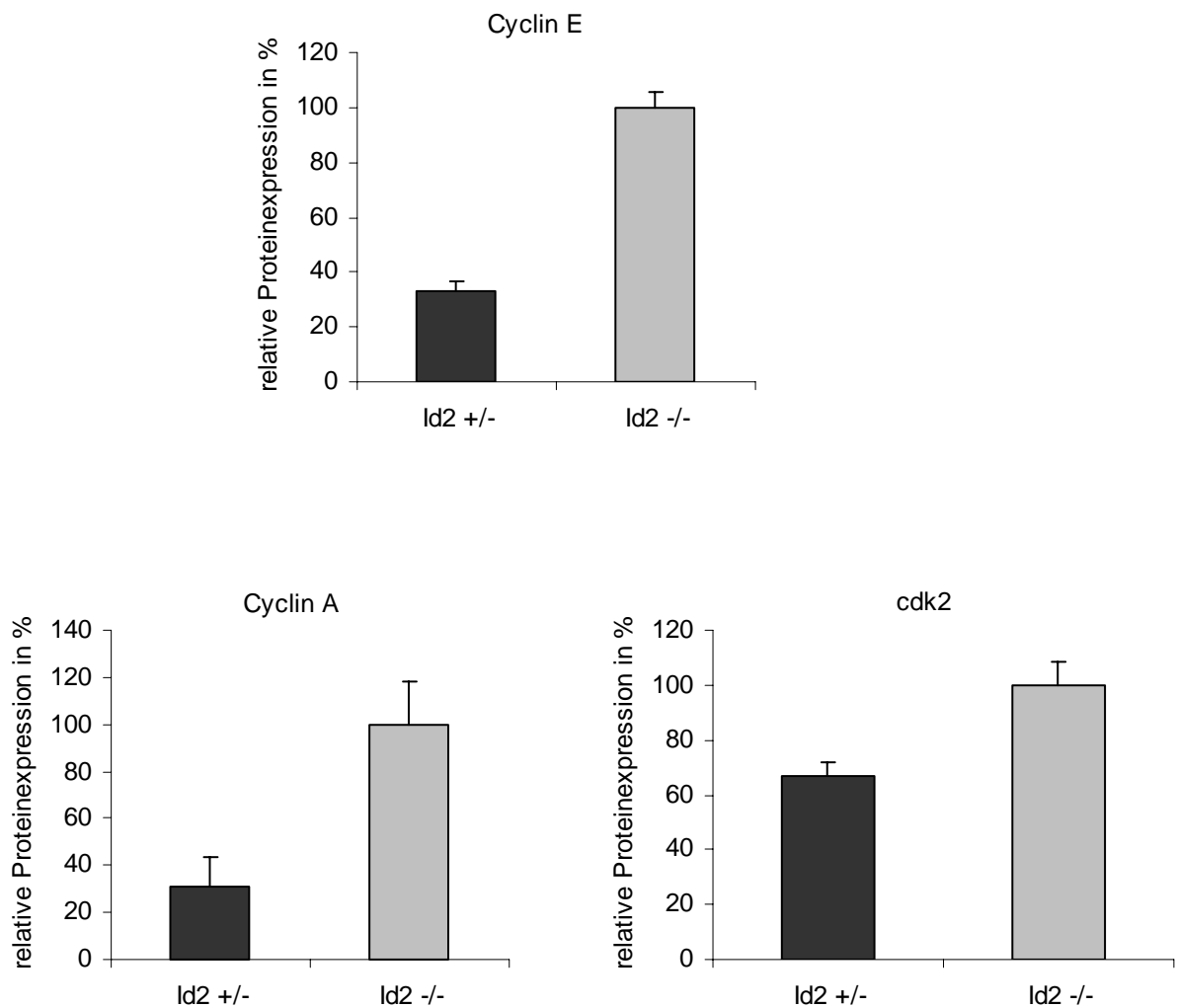


Abbildung 4.15: Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und ckd2 in glatten Gefäßmuskulzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen unter basalen Bedingungen. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und ckd2. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $P < 0,05$.

4.2.4 Eintritt in die S-Phase

Zur Überprüfung, ob die Ursache des Proliferationsunterschieds zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Zellen ebenfalls, wie bei dem Unterschied zwischen NMRI- und C57BL/6-Zellen, durch einen verstärkten S-Phase-Block hervorgerufen wird, wurde der Einbau von BrdU in die DNA durchflusszytometrisch gemessen. Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden durch 24stündigen Mitogenentzug synchronisiert und 24 Stunden nach Zugabe von Serum, Wachstumsfaktoren und BrdU untersucht. Der 33%ige BrdU-Einbau in $Id2^{+/+}$ -Zellen unterscheidet sich kaum vom 37%igen BrdU-Einbau in $Id2^{+/-}$ -Zellen. Jedoch erfolgt die Inkorporation von BrdU in die DNA von $Id2^{-/-}$ -Zellen zu 58% (s. Abb.4.16)

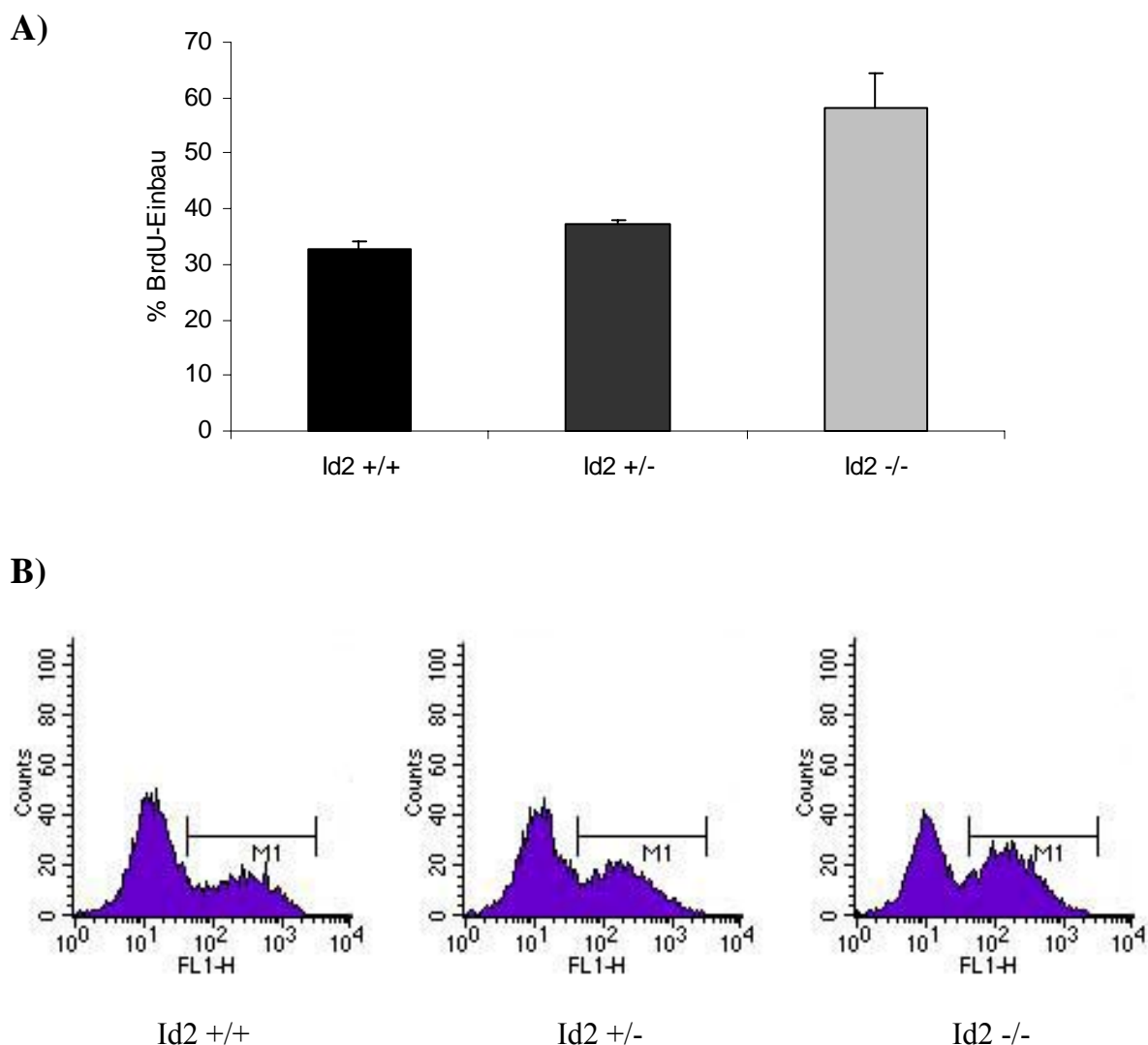


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Untersuchung des BrdU-Einbaus in die DNA glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen. **A)** Quantifizierung des S-Phase-Eintritts. Das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die Werte des Vergleichs $Id2^{+/-}$ - versus $Id2^{-/-}$ -Zellen sind statistisch signifikant unterschiedlich $P < 0,05$. **B)** Exemplarische Ergebnisdarstellung einer Messreihe der Untersuchung.

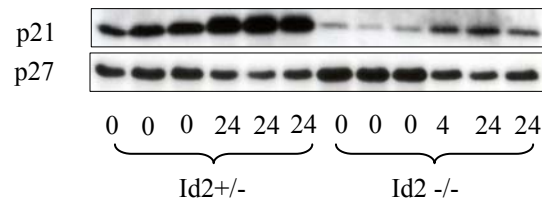
4.2.5 Proteinexpression der Zellzyklusfaktoren nach Synchronisation

Durch die durchflusszytometrische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsunterschied zwischen Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen, ebenso wie beim Unterschied zwischen NMRI- und C57BL/6-Zellen, auf Grund eines verstärkten S-Phase-Blocks in Id2^{+/-}- bzw. in NMRI- Zellen hervorgerufen wird. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses und zur Bestätigung der unter Basalbedingungen generierten Ergebnisse der Proteinexpression wurden glatte Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen synchronisiert und die Zellysate auf die Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren untersucht. Hierfür wurden die glatten Gefäßmuskelzellen 48 Stunden unter Mangelbedingungen mit 0,5% Serum synchronisiert und in der G₀-Phase arretiert. Nach dieser Zeit wurden die Null-Stunden-Werte generiert. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und 20% Serum traten die Zellen in den Zellzyklus ein und nach 24 Stunden wurden die 24-Stunden-Werte erstellt.

4.2.5.1 Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}

Qualitativ ist ein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zu erkennen. In beiden Zellarten steigt die Expression von 0 Stunden bis 24 Stunden an. Jedoch liegt die relative Proteinexpression zu beiden Zeitpunkten in Id2^{+/-}-Zellen in höheren Konzentrationen vor. Für die Quantifizierung von p21^{Cip1} wurde die Bandenintensität des 24-Stunden-Wertes der Id2^{+/-}-Proben auf 100% festgelegt. In Id2^{+/-}-Zellen beträgt die p21^{Cip1}-Proteinexpression zum Zeitpunkt 0 Stunden 58%, in Id2^{-/-}-Zellen zum Zeitpunkt 0 Stunden 1% und nach 24-stündiger Stimulation 39%. Somit wird p21^{Cip1} 24 Stunden nach Eintritt in den Zellzyklus in Id2^{+/-}-Mäusen 2,6fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Der Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} liegt in beiden Proben in der G₀-Phase in hoher Konzentration vor und nimmt mit Eintritt in den Zellzyklus ab, jedoch ist p27^{Kip1} in Id2^{-/-}-Zellen zu beiden Zeitpunkten in höherer Konzentration enthalten als in Id2^{+/-}-Zellen. Für die Quantifizierung wurden die Werte der Bandenintensität der p27^{Kip1}-Expression auf 100% festgesetzt. Die Auswertung zeigt, dass p27^{Kip1} zum Zeitpunkt 0 Stunden in Id2^{+/-}-Zellen 22% geringer exprimiert vorliegt als in Id2^{-/-}-Zellen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (s.Abb.4.17). Die relative Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} bestätigt die unter Basalbedingungen generierten Ergebnisse der Proteinexpression und verdeutlicht die Analogie zwischen den Vergleichen der glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-versus C57BL/6-Zellen und Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen.

A)



B)

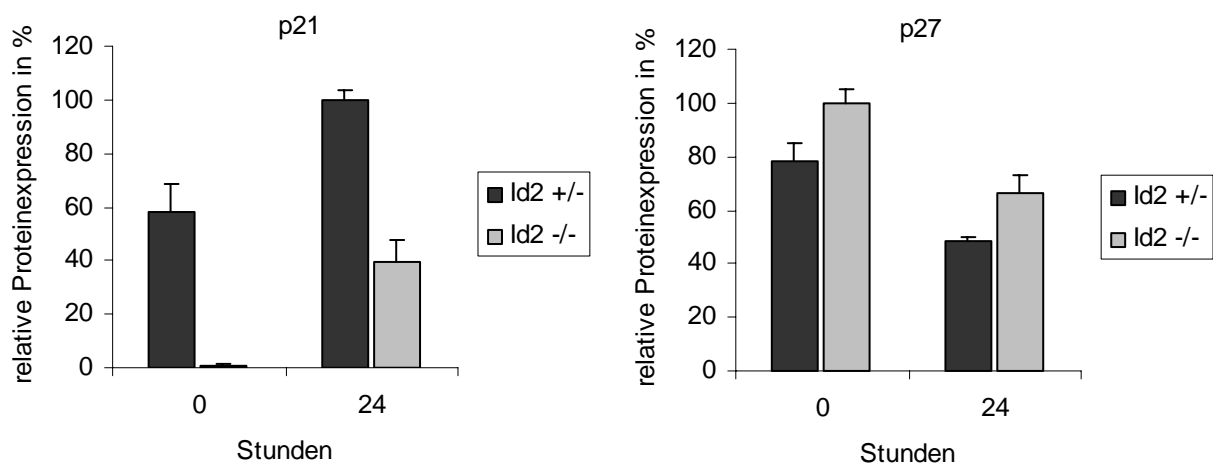


Abbildung 4.17: Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1} in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die Werte der 24 Stunden-Vergleiche der p21^{Cip1}-Expression sowie die Null-Stunden-Werte der p27^{Kip1}-Expression unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.2.5.2 Proteinexpression von Cyclin D1

Von besonderem Interesse war die Bestimmung der Proteinexpression von Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen in verschiedenen Zellzyklusphasen. Cyclin D₁ wird zu beiden Zeitpunkten in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}-Mäusen stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Für die Quantifizierung wurde die Bandenintensität der 24-Stunden-Werte der Id2^{+/-}-Proben auf 100% festgelegt. Cyclin D₁ wird 24 Stunden nach mitogener Stimulation in Id2^{+/-}-Zellen 4,2fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Dieser Unterschied ist signifikant (s.Abb.4.18). Bei der Proteinexpression von Cyclin D₁ besteht keine Analogie zwischen den Vergleichen Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen und NMRI- versus C57BL/6-Zellen.

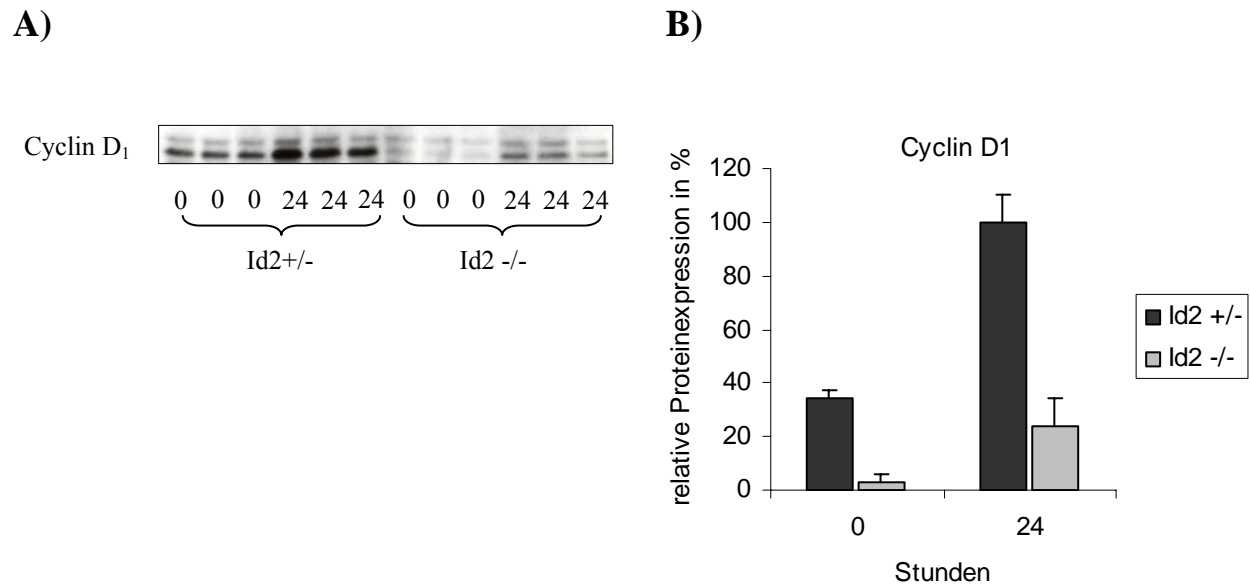
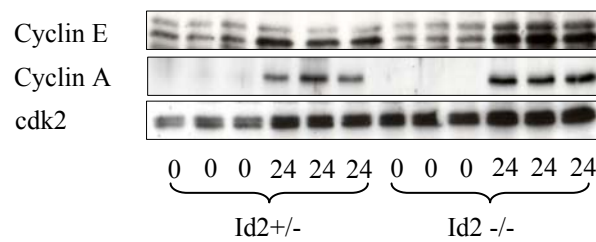


Abbildung 4.18: Proteinexpression von Cyclin D₁ in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin D₁. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Die Werte der 24 Stunden-Vergleiche unterscheiden sich statistisch signifikant, P<0,05.

4.2.5.3 Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2

Die qualitative Darstellung der Proteinexpression der positiven Zellzyklusregulatoren Cyclin E, Cyclin A und cdk2 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zeigt eine stärkere Expression des jeweiligen Proteins in Id2^{-/-}-Zellen als in Id2^{+/-}-Zellen zum Zeitpunkt 24 Stunden. Die These der Analogie zwischen den Vergleichen Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen und NMRI- versus C57BL/6-Zellen wird durch die Expression dieser drei Proteine während des Zellzyklusverlaufs bestätigt. Für die quantitative Auswertung wurden die Werte auf die jeweilige Bandenintensität der 24 Stunden-Werte der Id2^{-/-}-Proben normalisiert. Cyclin E liegt nach 24-stündiger mitogener Stimulation in Id2^{-/-}-Zellen 2,6fach stärker exprimiert vor als in Id2^{+/-}-Zellen. Der S-Phase-Marker Cyclin A wird zum Zeitpunkt 24 Stunden in Id2^{-/-}-Zellen 1,9fach stärker exprimiert als in Id2^{+/-}-Zellen. Dies bestätigt das Ergebnis des durchflusszytometrischen BrdU-Einbaus. Der Aktivator von Cyclin E und Cyclin A, cdk2, liegt zum Zeitpunkt 24 Stunden in Id2^{+/-}-Zellen 69% exprimiert vor. Auffallend ist die besonders geringe cdk2-Expression zum Zeitpunkt 0 Stunden in Id2^{+/-}-Zellen, die sich nach mitogener Stimulation bis zum Zeitpunkt 24 Stunden 2,3fach verstärkt, im Gegensatz zu einer 1,4fachen Verstärkung in Id2^{-/-}-Zellen (s. Abb. 4.19).

A)



B)

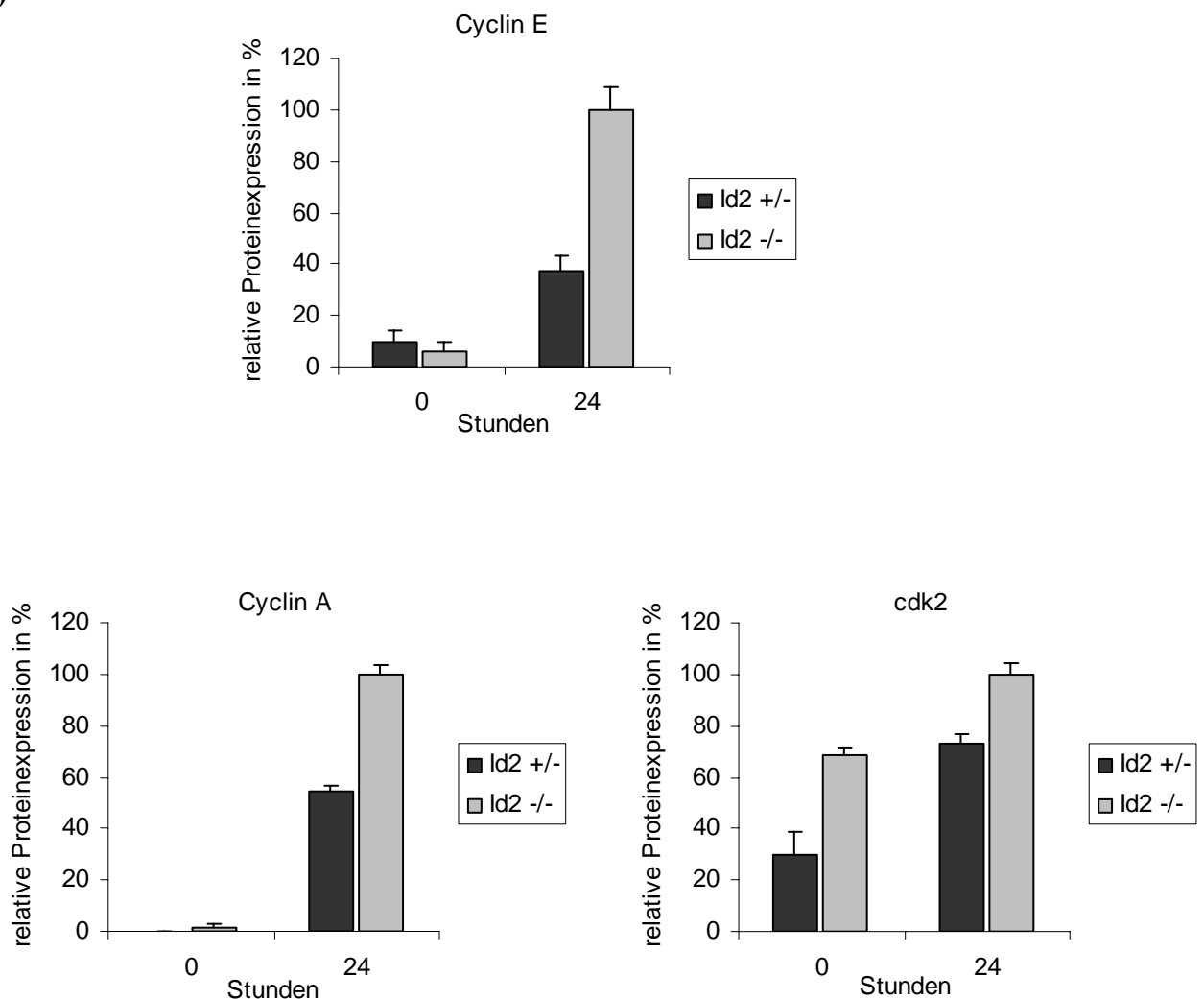


Abbildung 4.19: Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Synchronisation. **A)** Western-Blot-Analyse der Zellextrakte. **B)** Quantitative Darstellung der relativen Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Alle Werte der 24 Stunden-Vergleiche unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.2.6 mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}

Die Affymetrix-Vergleichsanalyse wurde im ersten Schritt auf unterschiedliche mRNA-Expressionen von Zellzyklusinhibitoren der Cip/Kip-Familie untersucht. Bei p27^{Kip1} konnte auf mRNA-Ebene kein Expressionsunterschied festgestellt werden. Dies bestätigt die in der Literatur bekannte Aussage, dass p27^{Kip1} posttranskriptionell reguliert wird (Sherr und Robert, 1999). Für p21^{Cip1} konnten mRNA-Unterschiede festgestellt werden.

4.2.6.1 Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

Die Auswertung der Genchip-Analyse zeigt einen Unterschied in der p21^{Cip1} mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{-/-}-Mäusen bzw. Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Die mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} liegt in Id2^{+/+}-Zellen 2,1fach stärker exprimiert vor als in Id2^{-/-}-Zellen. In Id2^{+/-}-Zellen ist p21^{Cip1} mRNA 2,6fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen (s.Tab.4.4).

Id2 ^{+/+} versus Id2 ^{-/-}	Id2 ^{+/-} versus Id2 ^{-/-}	Gentitel	Gensymbol
2,1	2,6	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Cdkn1a

Tabelle 4.4: Affymetrix-Chip-Analyse der mRNA-Expression von Id2 von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Die Faktoren der Expressionsunterschiede sind angegeben.

4.2.6.2 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Zur Verifizierung des Affymetrix-Chip-Ergebnisses wurde die p21^{Cip1} mRNA-Expression mit Hilfe der Real-time PCR-Methode analysiert. Die Auswertung zeigt einen 2,3fachen Unterschied in der p21^{Cip1} mRNA-Expression zwischen Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen. p21^{Cip1} mRNA wird in Id2^{+/+}-Zellen 1,3fach stärker als in Id2^{+/-}-Zellen und 3,0fach stärker als in Id2^{-/-}-Zellen exprimiert (s.Abb.4.20).

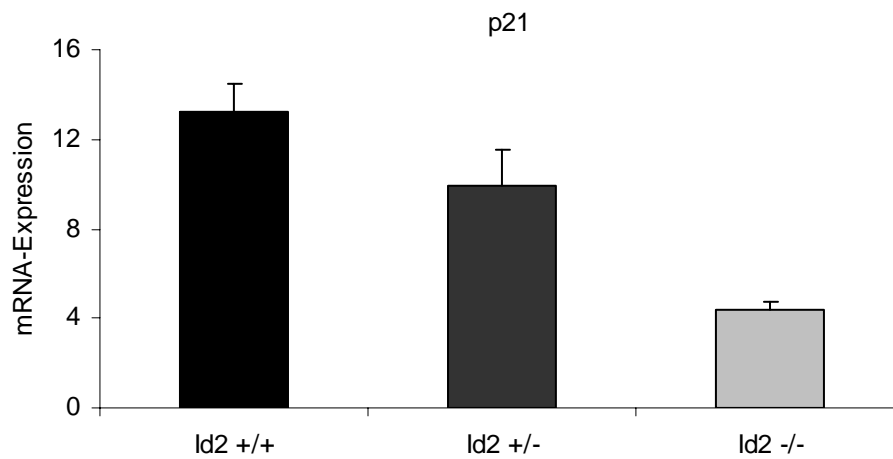


Abbildung 4.20: mRNA-Expression von p21^{Cip1}. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Der Unterschied in Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen ist statistisch signifikant, P<0,05.

4.3 Zelluläre Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen

Das Phänomen der zellulären Seneszenz ist charakterisiert durch die Beendigung der replikativen Lebenszeit, was sich in einem reduzierten Proliferationsverhalten äußert. Die verminderte Fähigkeit der Zellteilung geht einher mit einem veränderten Expressionsmuster der Zellzyklusfaktoren. Die Proteinexpression von Cyclin E, Cyclin A und p27 nimmt mit zunehmendem Alter ab. Als Seneszenz-Biomarker unter den Zellzyklusfaktoren gelten die beiden Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und im Besonderen p16^{Ink4}, die in seneszenten Zellen stark exprimiert vorliegen (Gorenne et al., 2006).

Da die bisherigen Ergebnisse des Vergleichs der glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen diese Kriterien vorwiesen, stellte sich die Frage, ob glatte Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen vor zellulärer Seneszenz geschützt sind.

4.3.1 mRNA-Expression des Seneszenz-Biomarkers p16Ink4

Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

Die Vergleichsanalysen von glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen bzw. $Id2^{+/+}$ - versus $Id2^{-/-}$ -Mäusen der Affymetrix-Chip-Auswertung zeigen einen sehr starken Expressionsunterschied des Seneszenz-Biomarkers und Zellzyklusinhibitors p16^{Ink4}. In $Id2^{+/-}$ -Zellen wird p16^{Ink4} mRNA 48fach und in $Id2^{+/+}$ - Zellen 53fach stärker exprimiert als in $Id2^{-/-}$ -Zellen (s.Tab.4.5).

$Id2^{+/+}$ versus $Id2^{-/-}$	$Id2^{+/-}$ versus $Id2^{-/-}$	Gentitel	Gensymbol
53	48	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	Cdkn2a

Tabelle 4.5: Genchip-Analyse der mRNA-Expression von p16^{Ink4} von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Die Faktoren der Expressionsunterschiede sind angegeben.

4.3.1.1 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Das Ergebnis der Real-time PCR verifiziert die Affymetrix-Chip-Auswertung der p16^{Ink4} mRNA-Expression. p16^{Ink4} mRNA wird in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}-Mäusen 32fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Beim Vergleich Id2^{+/+}- und Id2^{-/-}-Zellen ist ein 47facher Unterschied erkennbar (s.Abb.4.21).

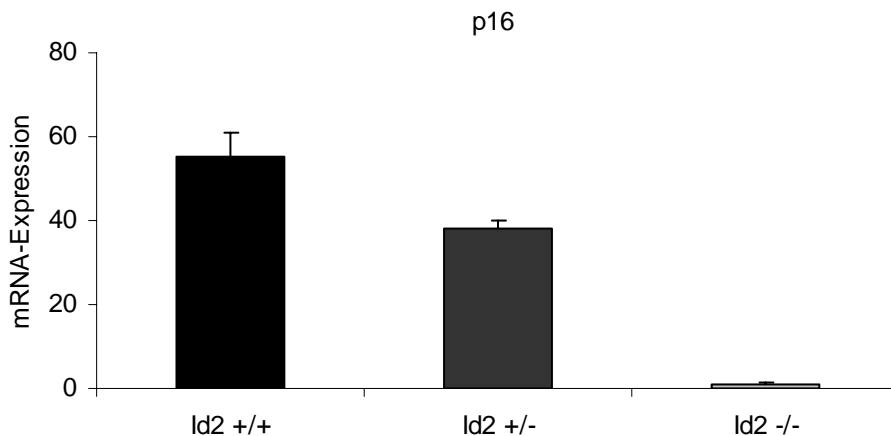


Abbildung 4.21: mRNA-Expression von p16^{Ink4}. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die Werte des Vergleichs Id2^{+/+}- versus Id2^{-/-}-Zellen unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.3.2 mRNA-Expression des Seneszenz-Biomarkers Colla1

Einen weiteren Seneszenz-Biomarker stellt Collagen 1a1 dar. Gonos und Mitarbeiter zeigten, dass die mRNA dieses Adhäsionsmoleküls in Zellen, in denen Seneszenz beobachtet wird, deutlich stärker exprimiert wird (Gonos et al., 1998). Für Collagen 1a1 codiert das Gen Colla1.

4.3.2.1 Ergebnis der Affymetrix-Chip-Analyse

Das Affymetrix-Chip-Ergebnis zeigt einen deutlichen Unterschied in der mRNA-Expression von Colla1 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Colla1 mRNA wird in Id2^{+/-}-Zellen 20fach stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen. Hingegen zeigt das Genchip-Ergebnis kaum einen Expressionsunterschied zwischen Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen (s.Tab.4.6)

Id2 ^{+/+} versus Id2 ^{-/-}	Id2 ^{+/-} versus Id2 ^{-/-}	Gentitel	Gensymbol
20,0	19,6	Collagen 1a1	Col1a1

Tabelle 4.6: Affymetrix-Chip-Analyse der mRNA-Expression von Col1a1 von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen eines einfachen Versuchsansatzes. Die Faktoren der Expressionsunterschiede sind angegeben.

4.3.2.2 Ergebnis der Real-time PCR-Analyse

Das Ergebnis der Real-time PCR-Analyse verifiziert qualitativ die Genchip-Auswertung. Quantitativ sind deutlich stärkere Unterschiede in der Col1a1 mRNA-Expression von glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen zu erkennen. Beim Vergleich Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen wird Col1a1 mRNA in Id2^{+/-}-Zellen 38fach stärker exprimiert. In Id2^{+/+}-Zellen besteht eine 1,9fache stärkere Col1a1 mRNA-Expression als in Id2^{+/-}-Zellen (s.Abb.4.22).

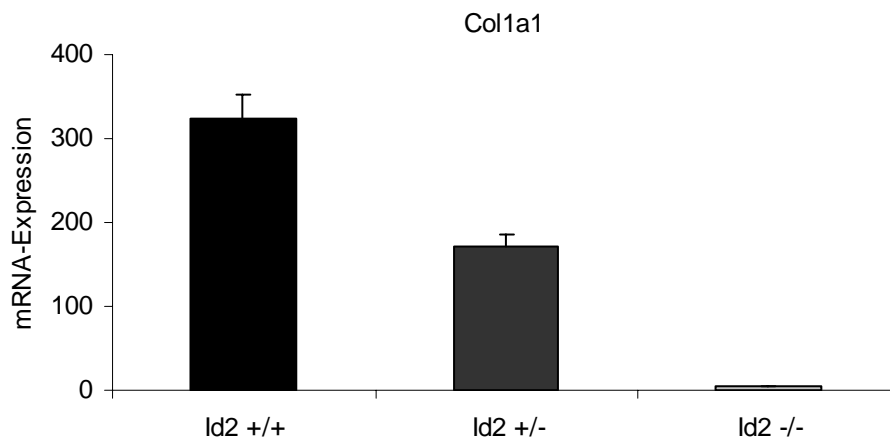


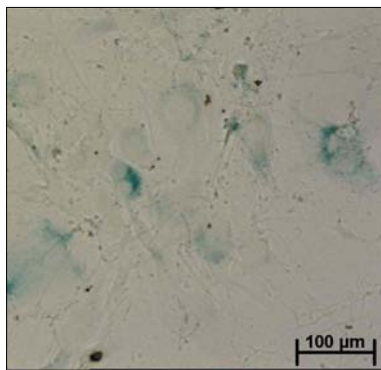
Abbildung 4.22: mRNA-Expression von Col1a1. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die Werte des Vergleichs Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen unterscheiden sich statistisch signifikant, $P < 0,05$.

4.3.3 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität

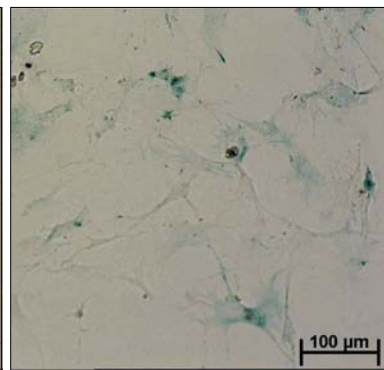
Dimri und Mitarbeiter etablierten den Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität als Methode zur Darstellung zelluläre Seneszenz (Dimri et al., 1995). Die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität ist in der Literatur allgemein als Seneszenz-Marker anerkannt. Bei der Reaktion wird 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid durch β -Galaktosidase gespalten in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, das durch Luftsauerstoff zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Die Intensität der Blaufärbung ist direkt proportional zur Enzym-Aktivität. Bei der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase handelt es sich um ein lysosomales Enzym, dessen Aktivitätsmaximum bei pH6 erreicht wird.

Das lichtmikroskopische Ergebnis bei 100facher Verstärkung zeigt eine deutliche Blaufärbung in einem Großteil der glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ - und $Id2^{+/-}$ -Mäusen. In glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen hingegen ist keine Färbung erkennbar (s.Abb.4.23)

A) $Id2^{+/+}$ -Zellen



B) $Id2^{+/-}$ -Zellen



C) $Id2^{-/-}$ -Zellen

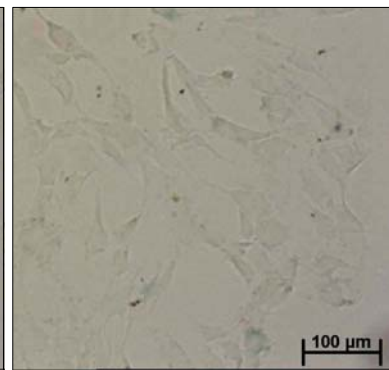


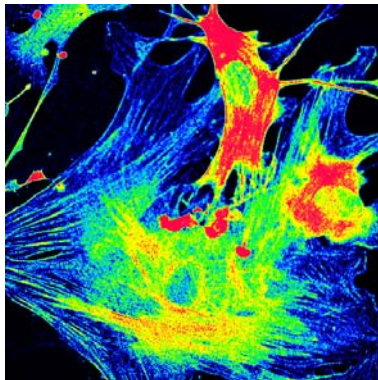
Abbildung 4.23: Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität bei pH6 in glatten Gefäßmuskelzellen von **A)** $Id2^{+/+}$, **B)** $Id2^{+/-}$ und **C)** $Id2^{-/-}$ -Mäusen bei 100facher Vergrößerung. Die Intensität der Blaufärbung ist direkt proportional zur Enzym-Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität.

4.3.4 Morphologische Veränderung

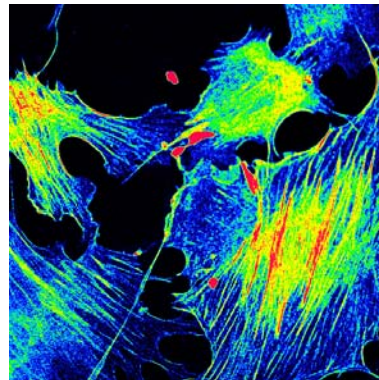
Zellen, die zellulärer Seneszenz unterliegen, zeigen eine veränderte morphologische Struktur. Sie werden größer und erlangen eine abgerundetere und abgeflachtere Form. Ebenso besitzen diese Zellen ein verändertes Verhalten gegenüber benachbarter Zellen, es kommt zu einem verstärkten Zell-Zell-Kontakt (Gorenne et al., 2006).

Die Morphologie glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Methode dargestellt. Beim Vergleich der Zellformen ist zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ - und $Id2^{+/-}$ -Mäusen kein Unterschied feststellbar. Beide Zellarten neigen zu Kontakt mit Nachbarzellen. Hingegen zeigen glatte Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen eine deutlich veränderte Form. Sie sind kleiner und das α -Glattmuskel-Actin-Cytoskelett erscheint undeutlich. $Id2^{-/-}$ -Zellen wachsen vereinzelter als $Id2^{+/+}$ - oder $Id2^{+/-}$ -Zellen und verbinden sich kaum mit benachbarten Zellen (s. Abb.4.24).

A) $Id2^{+/+}$ -Zellen



B) $Id2^{+/-}$ -Zellen



C) $Id2^{-/-}$ -Zellen

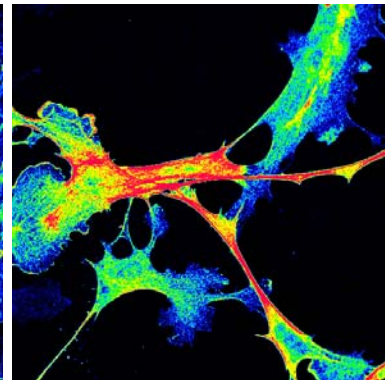


Abbildung 4.24: Immuncytochemische Färbung auf α -Glattmuskel-Actin in glatten Gefäßmuskelzellen von **A)** $Id2^{+/+}$ -, **B)** $Id2^{+/-}$ - und **C)** $Id2^{-/-}$ -Mäusen. Die morphologische Struktur der Cytoskelette ist bei 600facher Vergrößerung dargestellt. Die Farbskala von blau über grün, gelb bis rot zeigt aufsteigend die Intensität der Proteinexpression.

4.3.5 Expression von α -Glattmuskel-Actin

Id2 ist in vielen Zellarten als Differenzierungshemmer bekannt. Dadurch stellte sich die Frage, ob glatte Gefäßmuskelzellen von Id2^{-/-}-Mäusen einen differenzierteren Phänotyp vorweisen als Id2^{+/+}- oder Id2^{+/-}-Zellen. Differenzierte Zellen zeigen ebenso wie vor Seneszenz geschützte Zellen eine kleinere Form. Einen Biomarker für Differenzierung von glatten Muskelzellen stellt α -Glattmuskel-Actin dar (Owens et al., 2004). Zur Untersuchung, ob die unterschiedliche Morphologie in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen durch einen differenzierteren Phänotyp zu erklären ist, wurde die Expression von α -Glattmuskel-Actin in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen bestimmt.

4.3.5.1 Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin

Zur Untersuchung der Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin wurde das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität von jeweils 50 glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen wurde ausgewertet, auf Id2^{-/-}-Zellen normalisiert und graphisch dargestellt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin in Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen (s.Abb.4.25).

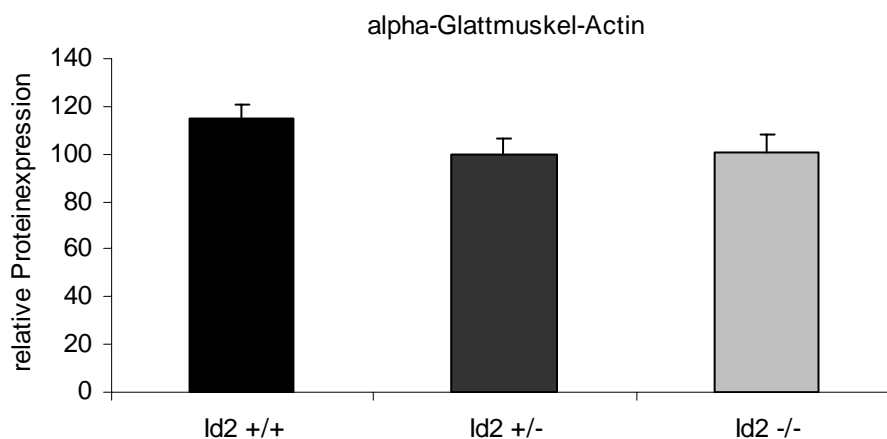


Abbildung 4.25: Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von jeweils 50 Zellen. Das Ergebnis ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Keine Werte unterscheiden sich statistisch signifikant, $P > 0,05$.

4.3.5.2 mRNA-Expression von α -Glattmuskel-Actin

Das Gensymbol für α -Glattmuskel-Actin in der Aorta wird mit Acta2 bezeichnet. Die Vergleichsanalysen mittels Affymetrix-Chip zeigen keine mRNA-Expressionsunterschiede von Acta2 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- gegen Id2^{-/-}- bzw. Id2^{+/+}- gegen Id2^{-/-}-Mäusen. Zur Verifizierung dieser Analysen wurde die mRNA-Expression von Acta2 mit Hilfe der Real-time PCR bestimmt. Das Ergebnis zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von Acta2 in Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen (s. Abb. 4.26).

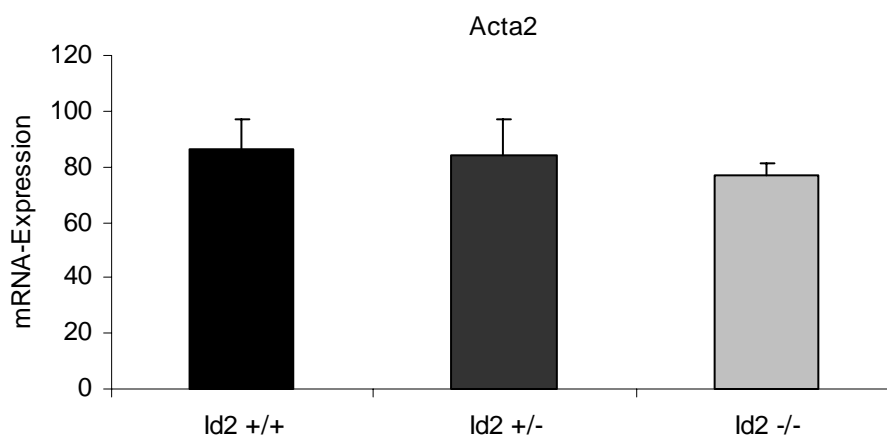


Abbildung 4.26: mRNA-Expression von Acta2 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen mittels Real-time PCR. Das Ergebnis ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Keine Werte unterscheiden sich statistisch signifikant, $P > 0,05$.

4.3.6 Telomerase-Aktivität

Zelluläre Seneszenz wird in einigen Fällen assoziiert mit Telomerkürzung. Die Kürzung der Nukleoprotein-Strukturen an den Enden eukaryotischer Chromosomen geht einher mit reduzierter Telomerase-Aktivität. Stressinduzierte Seneszenz hingegen wird in den meisten Studien als telomerunabhängiger Vorgang beschrieben. Zur Klärung, ob die zelluläre Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}-Mäusen telomerabhängig oder -unabhängig verläuft, wurde die Telomerase-Aktivität gemessen. Das Ergebnis zeigt, dass alle Proben Telomerase-positiv sind, jedoch besteht kein signifikanter Unterschied in der Telomerase-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen (s. Abb. 4.27).

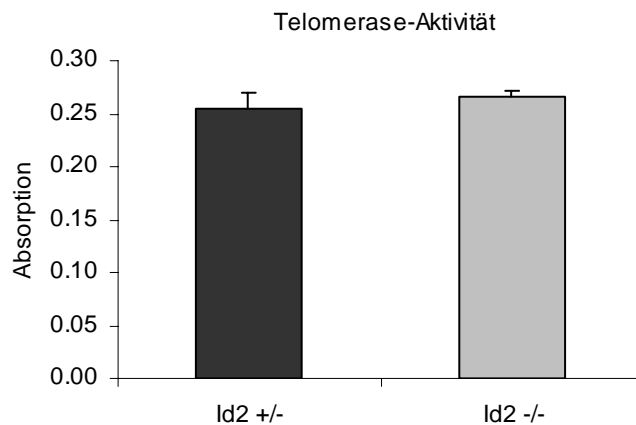


Abbildung 4.27: Darstellung der Telomerase-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Quantifizierung der Absorption von jeweils fünf unabhängigen Proben. Das Ergebnis ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Keine Werte unterscheiden sich statistisch signifikant, P>0,05.

4.3.7 mRNA-Expression von BMP4 (bone morphogenetic protein 4)

Literaturdaten zeigten, dass Zellen nach BMP4-Behandlung einen seneszenten Phänotyp ausbildeten (Buckley et al., 2003). Da die Induktion von Id2 mit BMP4 in Verbindung gebracht wurde (Hua et al., 2006; Samanta und Kessler, 2004), wurde die mRNA-Expression von BMP4 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen untersucht. BMP4 wird in Id2^{+/+}-Zellen 14fach und in Id2^{+/-}-Zellen in Id2^{-/-}-Zellen 6,4fach exprimiert (s.Abb. 4.28).

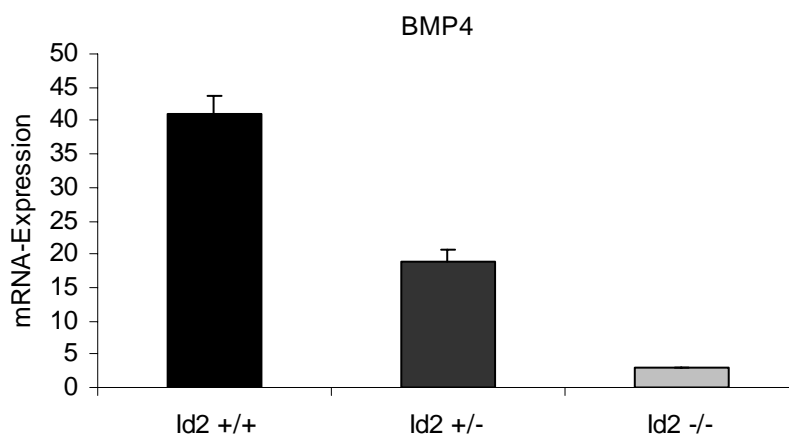


Abbildung 4.28: mRNA-Expression von A) BMP4 und B) Id2. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6- bzw. Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert ± SEM. Die Werte des Vergleichs Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen unterscheiden sich statistisch signifikant, P<0,05.

4.4 Keine replikative Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen

Auf Grund der Analogie bezüglich des Proliferationsverhaltens der Vergleiche zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- versus C57BL/6- und Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Mäusen stellte sich die Frage, ob C57BL/6-Zellen ebenfalls vor Seneszenz geschützt sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Seneszenzmarker p16^{Ink4}, Colla1 und Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität sowie die Morphologie von glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen bestimmt.

4.4.1 mRNA-Expression der Seneszenz-Biomarker p16Ink4 und Colla1

Die mRNA-Expressionen von p16^{Ink4} und Colla1 in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen wurden mit Hilfe der Real-time PCR bestimmt. Weder bei der Expression von p16^{Ink4} mRNA noch bei Colla1 mRNA ist ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar (s.Abb.4.29).

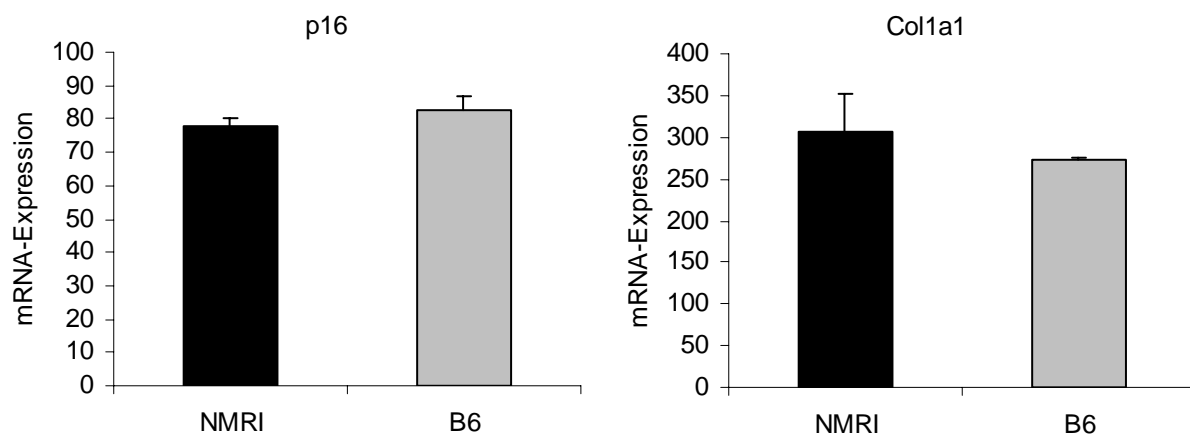
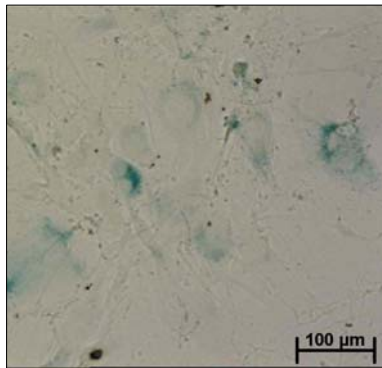


Abbildung 4.29: mRNA-Expression von p16^{Ink4} und Colla1. Real-time PCR-Analyse von Zelllysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. Das Ergebnis von drei Experimenten ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Beide Vergleiche unterscheiden sich nicht statistisch signifikant, $P > 0,05$.

4.4.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität

Die Untersuchung der Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen zeigt sowohl in NMRI- als auch in C57BL/6-Zellen eine deutliche Blaufärbung. Dies lässt auf eine ausgeprägte Enzymaktivität in beiden Zellarten schließen (s.Abb.4.30).

A) NMRI-Zellen



B) C57BL/6-Zellen

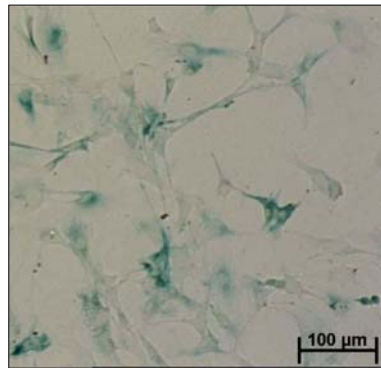
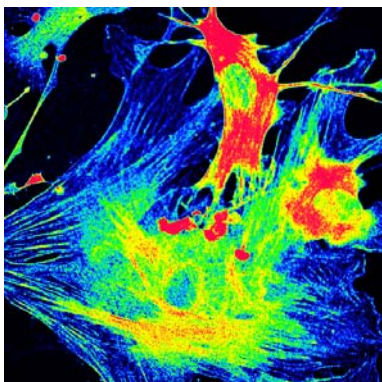


Abbildung 4.30: Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität bei pH6 in glatten Gefäßmuskelzellen von A) NMRI- und B) C57BL/6-Mäusen bei 100facher Vergrößerung. Die Intensität der Blaufärbung ist direkt proportional zur Enzym-Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität.

4.4.3 Morphologische Veränderung

Für die Bestimmung der Morphologie von glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen wurde zur Darstellung des Cytoskeletts das Protein α -Glattmuskel-Actin fluoreszenzmarkiert und mikroskopisch untersucht. Das Ergebnis zeigt keine ausgeprägten Unterschiede in der Morphologie. Beide Zellarten bilden große, abgeflachte und abgerundete Formen und neigen zur Kontaktaufnahme mit benachbarten Zellen (s.Abb. 4.31).

A) NMRI-Zellen



B) C57BL/6-Zellen

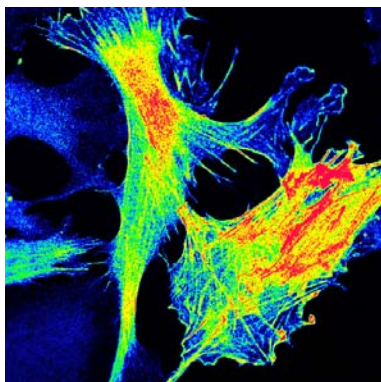


Abbildung 4.31: Immuncytochemische Färbung auf α -Glattmuskel-Actin in glatten Gefäßmuskelzellen von A) NMRI- und B) C57BL/6-Mäusen. Die morphologische Struktur der Cytoskelette ist bei 600facher Vergrößerung dargestellt. Die Farbskala von blau über grün, gelb bis rot zeigt aufsteigend die Intensität der Proteinexpression.

4.4.4 Expression von α -Glattmuskel-Actin

Zur Untersuchung, ob in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen ein unterschiedlicher Differenzierungsstatus vorliegt, wurde die Expression von α -Glattmuskel-Actin analysiert. Die Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin wurde über die Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse bestimmt. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität von jeweils 50 glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen ausgewertet und die Daten auf C57BL/6-Zellen normalisiert. Das Ergebnis zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin von NMRI- und C57BL/6-Zellen. Die Auswertung der Vergleichsanalyse der Affymetrix-Chip-Untersuchung zeigt keinen mRNA-Expressionsunterschied von Acta2 in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. Zur Verifizierung dieser Analyse wurde die mRNA-Expression von Acta2 mit Hilfe der Real-time PCR bestimmt. Das Ergebnis zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von Acta2 in NMRI- und C57BL/6-Zellen (s. Abb. 4.32).

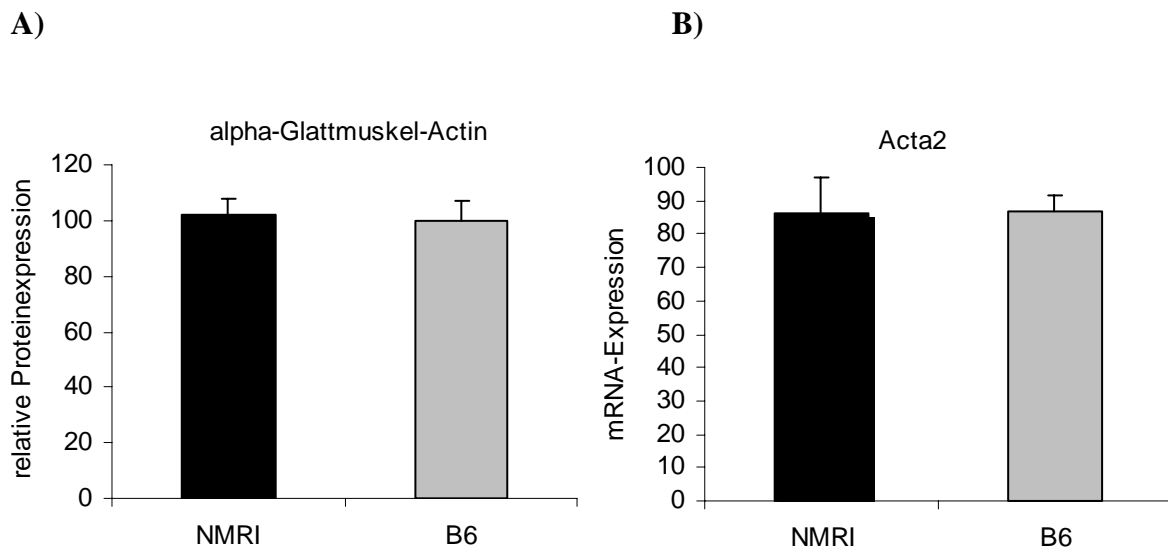


Abbildung 4.32: Expression von α -Glattmuskel-Actin in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen. **A)** Proteinexpression, Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von jeweils 50 Zellen. **B)** mRNA-Expression. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Keine statistisch signifikanten Unterschiede, $P > 0,05$.