

5. Diskussion und Ausblick

Weltweit ist die Mortalitätsrate auf Grund kardiovaskulärer Erkrankungen am höchsten (WHO, 2005). Todesursachen sind in erster Linie akute Ereignisse, wie Thrombenbildungen, die zu Gefäßverschlüssen führen und Infarkte auslösen. Diese Ereignisse werden in den meisten Fällen in fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose durch Plaque-Rupturen verursacht, die durch kompensatorische Mechanismen nicht mehr heilbar sind (Virmani et al., 2000). Einen wesentlichen Beitrag zur Reparatur von verletzten Läsionen stellt die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen dar. Hierbei induzieren Wachstumsfaktoren eine Steigerung der Replikationsrate. Durch die gesteigerte Zellmasse und die, durch glatte Gefäßmuskelzellen produzierte, Extrazellulärmatrix wird die dünne, verletzte Intima gestärkt und kann das Atherom vor weiterer Schädigung und Thrombusanlagerung schützen. Seneszente glatte Gefäßmuskelzellen haben die Fähigkeit zur Proliferation verloren und sind somit nicht mehr in der Lage zur Wundheilung ruptierter Plaques beizutragen (Gorenne et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, grundlegende Unterschiede im Verhalten von glatten Gefäßmuskelzellen aufzuklären und dabei den Einfluss von Id2 zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden einerseits glatte Gefäßmuskelzellen von Wildtyp-, Id^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund und andererseits glatte Gefäßmuskelzellen von den beiden Mäusestämmen NMRI und C57BL/6 untersucht. Der Fokus lag auf Untersuchungen des Proliferationsverhaltens und phänotypischen Modulationen in glatten Gefäßmuskelzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen neue Strategien zu entwickeln, welche die Ausbildung eines antiseneszenten Phänotyps in glatten Gefäßmuskelzellen bei fortgeschrittener Arteriosklerose ermöglichen.

5.1 Id2-Deletion verhindert die Ausbildung zellulärer Seneszenz

Alterung und zelluläre Seneszenz sind zwei Begriffe, die eng miteinander in Verbindung stehen. Beispielsweise akkumulieren seneszente Zellen während des Alterungsprozesses in vaskulärem, arteriosklerotischen Gewebe. Die Frage, ob Alterung einen unabhängigen Risikofaktor für die Ausbildung einer Arteriosklerose darstellt oder ob arteriosklerotische Läsionen ein Merkmal von Alterung sind, bleibt offen (Orlandi et al., 2006). Es gibt allerdings zunehmend Beweise dafür, dass zelluläre Seneszenz zur Pathogenese der Arteriosklerose beiträgt

(Minamino und Komuro, 2007). Mit steigendem Alter akkumulieren Mutationen und Unterbrechungen der Gen-Expression. Es wird angenommen, dass diese DNA-Schädigungen ausschlaggebend sind für die Ausbildung zellulärer Seneszenz.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue, bisher nicht beschriebene Rolle für Id2 nachgewiesen: durch Deletion von Id2 wird die Entwicklung eines seneszenten Phänotyps in glatten Gefäßmuskelzellen verhindert. Glatte Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Mäusen bilden, im Gegensatz zu glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{-/-}-Mäusen, charakteristische seneszenzmerkmale aus. Zelluläre Seneszenz ist charakterisiert durch den Status des permanenten Zellzyklusarrests und durch morphologische Veränderungen. So werden seneszenzmerkmale Zellen größer, flacher und der granulöse Anteil steigt. Sie bleiben über einen langen Zeitraum lebensfähig und metabolisch aktiv. Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen zeigen eine reduzierte Proliferationsrate (s. 4.2.2, Abb. 4.12) und die Morphologie eines seneszenten Phänotyps. Die Zellen sind groß und flach (s. 4.3.4, Abb. 4.24). Nachweisbar ist zelluläre Seneszenz über den Biomarker der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität bei pH6 (Chen et al., 2007). Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase ist in Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen, im Gegensatz zu Id2^{-/-}-Zellen, deutlich aktiviert (s. 4.3.3, Abb. 4.23). Es gibt allerdings unterschiedliche Formen zellulärer Seneszenz. So wird unterschieden zwischen replikativer und prämaturer Seneszenz. Die replikative Seneszenz zeichnet sich aus durch Telomerverkürzung. Dies geht einher mit dem Verlust der Telomerase-Aktivität, da eine inaktive Telomerase nicht mehr in der Lage ist Telomerverkürzungen zu reparieren. Die prämaturre Seneszenz verläuft telomerunabhängig. Sie wird induziert durch unterschiedliche Arten stressender Stimuli, wie Überexpression bestimmte Onkogene, oxidativer Stress oder spezielle DNA-Schädigungen. Wie es für die prämaturre Seneszenz beschrieben wird, erfolgt die Ausbildung der Seneszenz in Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen telomerunabhängig. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Telomerase-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen (s. 4.3.6, Abb. 4.27). Trotz überschneidender Merkmale von replikativer und prämaturer Seneszenz treten Unterschiede in der genomweiten Genexpression von telomerabhängiger und stressinduzierter Seneszenz auf (Zhang, 2007). So konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Collagen 1a1 (Col1a1) bei stressinduzierter Seneszenz anstieg (Gonos et al., 1998). Auch die Induktion des Zellzyklusarrests wird über verschiedene Mechanismen vermittelt. So wird zwischen dem telomerabhängigen, p53-p21-assoziierten und dem stressinduzierten, pRb-p16-vermittelten Signaltransduktionsweg differenziert, wobei Überschneidungen möglich sind (Zhang, 2007). Glatte Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Mäusen zeigen auch in diesem Punkt die Merkmale der klassischen prämaturen, stressinduzierten Seneszenz. So expri-

mieren sie zum einen verstärkt Collagen 1a1 (s. 4.3.2, Tab. 4.6 und Abb. 4.22) und zum anderen die Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 (s. 4.3.1, Tab. 4.5 und Abb. 4.21; 4.2.6, Tab. 4.4 und Abb. 4.20). Welche Art der Seneszenz in glatten Gefäßmuskelzellen arteriosklerotischer Plaques auftritt, wird kontrovers diskutiert. So zeigte eine Studie an glatten Gefäßmuskelzellen, dass eine Ras-Überexpression die Zellen in einen seneszenten Zustand überführte. Die Zellen nahmen die charakteristische Morphologie an, proliferierten weniger und entwickelten gesteigerte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität. Die Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 waren stark exprimiert und die Signaltransduktion verlief ERK-vermittelt (Minamino et al., 2003). Eine andere Untersuchung belegte, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus arteriosklerotischen Plaques einen Seneszenz-Phänotyp zeigten, der gekennzeichnet war durch die charakteristische Morphologie, reduzierte Proliferationsrate und gesteigerte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität. Auch hier waren die p16- und die p21-Expression deutlich erhöht, jedoch wurden in diesen seneszenten Zellen eine Telomerverkürzung und eine reduzierte Telomerase-Aktivität nachgewiesen (Matthews et al., 2006). Die Rollen von p16 und p21 während der Entwicklung der Seneszenz sind nicht endgültig geklärt. So wird vermutet, dass p21 verantwortlich ist für die Zellzyklusinhibierung und p16 entscheidend zur Phänotyp-Modulation beiträgt, wodurch seneszente Charakteristika ausgebildet werden (Stein et al., 1999). Bemerkenswerterweise werden C57BL/6-Zellen nicht vor der Ausbildung einer Seneszenz geschützt. So zeigen C57BL/6-Zellen die gleichen Charakteristika prämururer Seneszenz wie NMRI-Zellen. Zwischen glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen bestehen zwar deutliche Unterschiede im Proliferationsverhalten (s. 4.1.1, Abb. 4.1), jedoch liegen in der Morphologie (s. 4.4.3, Abb. 4.31), der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität (s. 4.4.2, Abb. 4.30) und in der Expression der Seneszenz-Marker p16 und Collagen 1a1 (s. 4.4.1, Abb. 4.29) keine signifikanten Unterschiede vor. Es ist zu vermuten, dass für den Schutz vor der Ausbildung des seneszenten Phänotyps die Konzentration von Id2 eine entscheidende Rolle spielt. So wird Id2 zwar in C57BL/6-Zellen in geringerem Maße als in Wildtyp- und Id2^{+/-}-Zellen exprimiert, jedoch ist der Id2-Gehalt in C57BL/6-Zellen deutlich nachweisbar (s. 4.1.6, Tab. 4.2 und Abb. Abb. 4.10) und wahrscheinlich zu hoch für eine anti-seneszente Wirkung.

Die genauen Wirkungsweisen von Id-Proteinen sind weitgehend unbekannt. Eine Funktion der Id-Proteine ist die Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von bHLH-Faktoren. Diese entfalten ihre Wirkung durch Bindung an E-Box-Elemente in Promotorregionen verschiedener Zielgene. So besitzen p16 und p21 multiple E-Boxen in ihren Promotorregionen. Als dominant negative Transkriptionsregulatoren dieser beiden Zellzyklusfaktoren können Id-

Proteine den Eintritt in den Zellzyklus bewirken und zelluläres Wachstum stimulieren. Es konnte gezeigt werden, dass das E2A-Protein der bHLH-Faktoren E47 die p21-Expression aktivieren kann. Eine Überexpression von Id1 inhibierte durch E47-Inaktivierung die Expression von p21 und beschleunigte das Zellwachstum (Prabhu et al., 1997). Eine andere Studie belegte, dass embryonale Fibroblasten aus Id1^{-/-}-Mäusen der Entwicklung prämaturer Seneszenz unterliegen. Die Zellen exprimierten einen hohen p16-Spiegel und besaßen kaum cdk2-Aktivität (Alani et al., 2001). Unterschiedliche Literaturdaten zeigten, dass Id1 an der Inhibition der Seneszenz-Ausbildung beteiligt ist. So wurde berichtet, dass eine abnehmende Expression von Id1 mit einer zunehmenden Bildung von p16 während des Alterungsprozesses korrelierte. Die abnehmende inhibierende Wirkung von Id1 erklärte hierbei die zunehmende transkriptionelle Aktivität von E47 und die daraus resultierende steigende p16-Expression (Zheng et al., 2004). Diese Daten stehen im Widerspruch zum antiseneszenten Phänotyp in glatten Gefäßmuskelzellen in Id2^{-/-}-Mäusen. Es kristallisiert sich jedoch immer deutlicher heraus, dass sich Id1 in seiner Wirkungsweise von den anderen Id-Proteinen unterscheidet. Id1 wird im Gegensatz zu Id2, Id3 und Id4 nicht durch cdk2 phosphoryliert, wodurch Id1 seine positive Zellzyklusregulation über andere Mechanismen vermittelt (Hara et al., 1997). Id2 und Id3 erhalten ihre Rolle als positive Zellzyklusregulatoren erst nach Phosphorylierung durch cdk2 (Forrest et al., 2004 und Matsumura et al., 2002) und nur phosphoryliertes Id2 inhibiert die transkriptionelle Aktivität der bHLH-Faktoren E2A (Hara et al., 1997). Der Einfluss von Id2 auf die Expression von p16 ist weitgehend unbekannt. Eine Studie konnte belegen, dass in mehreren Melanom-Zelllinien mit homozygoter p16-Gendeletion die Expression von Id2 herunterreguliert wurde (Bloethner et al., 2006). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen der Expression von Id2 und p16. Die Induktion von p16 steigt mit zunehmendem Id2-Spiegel. Der seneszente Phänotyp ist aber nur in Zellen mit vollständiger Id2-Deletion zu erkennen. Daher ist anzunehmen, dass unterschiedliche Kompensationsmechanismen die p16-Expression aufrechterhalten und erst ab einer sehr geringen Grenzkonzentration von Id2 die p16-Expression nicht mehr induziert werden kann.

Die mechanistische Regulation der Ausbildung des seneszenten Phänotyps in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen mit Id2-Deletion kann über die Inhibition des BMP4/Id2-Signaltransduktionswegs erklärt werden. BMPs (bone morphogenetic proteins) sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die der TGFβ (transforming growth factor beta) – Superfamilie angehören. Bisher wurden etwa 20 BMP-Familienmitglieder charakterisiert. Mechanistisch induzieren BMPs über eine Phosphorylierung von R-Smads (receptor-regulated Smads) die Expression von Id-Proteinen (Miyazono und Miyazawa, 2002). Es ist

bekannt, dass BMP4 zelluläre Seneszenz induzieren kann. So konnte gezeigt werden, dass eine BMP4-Behandlung der Lungenkrebszelllinie A549 nach zwei Wochen über einen Smad1-vermittelten Weg einen seneszenten Phänotyp ausbildet (Buckley et al., 2003). Zudem konnte in Zellkulturstudien an pankreatischen und neuralen Vorläuferzellen belegt werden, dass nach Gabe von BMP4 die Expression von Id2 induziert wird (Hua et al., 2006; Samanta und Kessler, 2004). Die abnehmende BMP4-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen korreliert direkt mit einer abnehmenden Id2-Expression (s. 4.3.7, Abb. 4.34 und 4.2.1 Tab. 4.3 und Abb. 4.11). Aus diesem Grund kann eine direkte Verknüpfung dieser beiden Moleküle angenommen werden und es ist zu vermuten, dass der senescente Phänotyp in glatten Gefäßmuskelzellen über einen BMP4/Id2-vermittelten Signaltransduktionsweg induziert wird. Eine Seneszenz-Entwicklung konnte in Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und C57BL/6-Zellen nachgewiesen werden, die jeweils in unterschiedlichen Mengen Id2 exprimieren. Es ist daher zu vermuten, dass nur eine vollständige Id2-Deletion glatte Gefäßmuskelzellen vor der Ausbildung eines seneszenten Phänotyps schützen kann.

5.2 Id2 greift regulierend in den Zellzyklus glatter Gefäßmuskelzellen ein

Glatte Gefäßmuskelzellen in arteriellen Gefäßwänden reagieren auf exo- und endogene Einflüsse sehr sensibel. Normalerweise sind glatte Gefäßmuskelzellen in der medialen Schicht von elastischen Arterien zu finden. In dieser Form zeigen sie einen kontraktilen Phänotyp und sind im Ruhezustand arretiert. Durch Stimulation mit unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Faktoren können glatte Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus eintreten, während sie eine phänotypische Modulation durchlaufen. Eine übermäßige Proliferation ist assoziiert mit der Pathogenese vaskulärer Lumenverengung bei Arteriosklerose und Restenose (Sanz-Gonzalez et al., 2000) und ebenso nachteilig wie eine stagnierende Proliferation. Letzteres Verhalten ist in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques zu finden und wird in direkten Zusammenhang gebracht mit einer Verhinderung der Reparatur rupturierter Lesionen (Virmani et al., 2000).

Die Funktion von Id2 in glatten Gefäßmuskelzellen ist weitgehend unbekannt. Mehrere Studien an unterschiedlichen Zellarten belegten, dass Id2 regulierend in den Zellzyklus eingreift. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Id2 in U2OS-Zellen die Proliferationsrate steigert. Der mechanistische Ablauf erfolgte über die Bindung von Id2 an pRb, wo-

durch pRb aus dem Komplex mit einem Teilnehmer der E2F-Familie verdrängt wurde und somit seine zellzyklusinhibierende Eigenschaft verlor (Ivarone et al., 1994).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen anderen Effekt. Glatte Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ - und $Id2^{+/-}$ -Mäusen proliferieren stärker als glatte Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen (s. 4.2.2, Abb. 4.12). Die durchflusszytometrische Untersuchung verdeutlicht, dass die Proliferationsunterschiede auf einen reduzierten S-Phase-Eintritt in $Id2^{+/+}$ - und $Id2^{+/-}$ -Zellen zurückzuführen sind (s. 4.2.4, Abb. 4.16). Durch Mutationsversuche konnten Hara und Mitarbeiter eine weitere zellzyklusregulierende Wirkung von Id2 nachweisen. So verliert Id2 seine positiv zellzyklusregulierende Eigenschaft, wenn die Aminosäure Serin 5 gegen Alanin (Id2-S5A) ausgetauscht wird. Untersuchungen an synchronisierten humanen Fibroblasten zeigten eine biphasische Induktion von Id2 nach Serumstimulation. Die erste Induktion erfolgte in der frühen G_1 -Phase. Zu diesem Zeitpunkt lag Id2 unphosphoryliert vor. Für diese Form konnte keine Funktion definiert werden. Die zweite Induktion erfolgte in der späten G_1 -Phase. An dieser Stelle wurde Id2 durch aktiviertes Cyclin E/cdk2 an Serin 5 phosphoryliert, wodurch Id2 seine positiv zellzyklusregulierende Eigenschaft erlangte. Aktiviertes cdk2 war in der Lage Id2, Id3 und Id4, jedoch nicht Id1 zu phosphorylieren. Bei gleichzeitiger Zugabe von p21 wurde durch die Inhibierung der cdk2-Aktivität die Phosphorylierung der Id-Proteine verhindert (Hara et al., 1997). In glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ -Mäusen sind unter basalen Bedingungen die Protein-Expressionen von Cyclin E, Cyclin A und cdk2 niedriger und von p21 höher als in $Id2^{-/-}$ -Zellen (s. 4.2.3.1, Abb. 4.13 und 4.2.3.3, Abb. 4.15). In einer Zellkulturstudie konnten Matsumura und Mitarbeiter die Funktion von Id2 in glatten Gefäßmuskelzellen ermitteln. Es wurde gezeigt, dass nur Id2, das durch aktiviertes cdk2 an Serin 5 phosphoryliert worden war, den Zellzyklus positiv beeinflussen konnte. Durch phosphoryliertes Id2 wurde die Proliferationsrate der glatten Gefäßmuskelzellen über einen verstärkten S-Phase-Eintritt erhöht. Mechanistisch wurde diese Reaktion über die Inhibierung der p21-Promotoraktivität und einer daraus resultierenden reduzierten p21-Proteinexpression vermittelt (Matsumura et al., 2002). In synchronisierten glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/-}$ -Mäusen sind nach 24-stündiger mitogener Stimulation die positiven Zellzyklusregulatoren Cyclin E, Cyclin A und cdk2 geringer exprimiert als in $Id2^{-/-}$ -Zellen (s. 4.2.5.3, Abb. 4.19). Hingegen liegt p21 in $Id2^{+/-}$ -Zellen sowohl im Ruhezustand als auch nach 24-stündiger Mitogenstimulation deutlich stärker exprimiert vor als in $Id2^{-/-}$ -Zellen (s. 4.2.5.1, Abb. 4.17). Dies lässt vermuten, dass in glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ - und $Id2^{+/-}$ -Mäusen zum einen durch die geringe Expression von Cyclin E, Cyclin A und cdk2 und zum anderen durch die starke inhibitorische Wirkung von p21 die Aktivität der cdk2-Komplexe sehr gering ist. Inak-

tives cdk2 ist nicht in der Lage Id2 zu phosphorylieren. Es ist daher anzunehmen, dass in Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen Id2 unphosphoryliert vorliegt und somit den Zellzyklus nicht positiv beeinflussen kann. Untersuchungen von Forrest und Mitarbeitern in glatten Gefäßmuskelzellen zeigten, dass Id3 einen ähnlichen Effekt ausübt, wie Id2. Nur phosphoryliertes Id3 verstärkte über eine reduzierte p21-Expression den S-Phase-Eintritt der Zellen. Durch eine Überexpression von Wildtyp-Id3 wurde die p21-Promotor-Aktivität reduziert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von mutiertem Id3-S5A nicht nur den Effekt von phosphoryliertem Id3 aufhob, sondern die p21-Promotor-Aktivität sogar verstärkte. Bestätigt wurde dieses Ergebnis an synchronisierten glatten Gefäßmuskelzellen. So wurde Id3, wie Id2, nach Serumstimulation biphasisch induziert. Ein Anstieg der p21-Expression in der frühen G₁-Phase ging einher mit der ersten Id3-Induktion. Eine zunehmende Phosphorylierung von Id3 in der späten G₁-Phase korrelierte mit einem abnehmenden p21-Spiegel (Forrest et al., 2004).

Man kann daher davon ausgehen, dass in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Mäusen der unphosphorylierte Zustand von Id2 nicht nur die positiv zellzyklusregulierenden Eigenschaften von Id2 inaktiviert, sondern dass unphosphoryliertes Id2 eine bisher nicht charakterisierte zellzyklusinhibierende Wirkung besitzt. Diese hemmende Funktion von Id2 wird vermutlich, wie bei Id3, über eine verstärkte p21-Expression vermittelt, wodurch der hohe p21-Spiegel in Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Zellen erklärt werden kann. Diese These wird gestützt durch Literaturdaten eines in vivo-Versuchs. Es wurde beschrieben, dass die initiale Expression von Id2 in glatten Gefäßmuskelzellen nach arterieller Verletzung einherging mit einer gesteigerten Cyclin E- und cdk2-Expression sowie einer erhöhten Proliferationsrate bei reduziertem p21-Spiegel. Die Inhibierung der p21-Expression erfolgte dabei durch Id2, das durch aktiviertes cdk2 phosphoryliert worden war. Im weiteren Verlauf der Neointima-Bildung sank die Proliferationsrate bei steigender p21-Expression und interessanterweise gleichzeitig hohem Id2-Spiegel. Die gleichzeitig hohe Id2- und p21-Expression erschien paradox (Matsumura et al., 2002). Die Wechselwirkung zwischen Id2 und p21 stellt eine sensible Verknüpfung dar, die über einen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird (s. 1.5.3, Abb.1.5). Einerseits hemmt phosphoryliertes Id2 die p21-Expression andererseits inhibiert p21 über eine cdk2-Inaktivierung die Id2-Phosphorylierung. Zusätzlich wird in dieser Arbeit erstmalig die These aufgestellt, dass unphosphoryliertes Id2 die p21-Expression induziert. Es ist anzunehmen, dass das Gleichgewicht zwischen Id2 und p21 in glatten Gefäßmuskelzellen von Id2^{+/+}- und Id2^{+/-}-Mäusen verschoben vorliegt und diese Zellen durch die starke Induktion von p21 ihre proliferierenden Eigenschaften weitgehend verloren haben.

Mit Hilfe von Tiermodellen kann das Verhalten von glatten Gefäßmuskelzellen nach Verletzung nachgestellt werden. Bei experimentellen Untersuchungen wird die Endothelschicht der Arterien mittels experimenteller Ballon-Angioplastie beschädigt. Die Studien zeigen, dass die Gefäßwand kompensatorisch mit einer gesteigerten Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen reagiert (Braun-Dullaes et al., 1998). Die Teilungsrate nimmt jedoch im weiteren Verlauf ab und die Zellen werden wieder in den Ruhezustand überführt (Sanz-Gonzalez et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proliferationsraten der glatten Gefäßmuskelzellen der unterschiedlichen Mäusestämme NMRI und C57BL/6 verglichen. C57BL/6-Zellen proliferieren stärker als NMRI -Zellen (s. 4.1.1, Abb. 4.1). Die durchflusszytometrische Untersuchung zeigt einen höheren BrdU-Einbau in C57BL/6- als in NMRI-Zellen (s. 4.1.3, Abb. 4.5). Dadurch wird belegt, dass die erhöhte Proliferationsrate in C57BL/6-Zellen über einen verstärkten S-Phase-Eintritt vermittelt wird. Diese Daten zeigen eine Analogie im Proliferationsverhalten der Vergleichsgruppen NMRI- versus C57BL/6-Zellen und Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen. Die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen nach experimenteller vaskulärer Verletzung zeigt ein spezielles Muster. So ist die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Rattenkarotis nach angioplastischer Verletzung assoziiert mit einer zeitlich koordinierten Expression von cdk2 und seinen regulatorischen Untereinheiten Cyclin E und Cyclin A. Die Induktion dieser Cycline korreliert mit gesteigerter Kinaseaktivität von cdk2 (Wei et al., 1997). Die Expression der positiven Zellzyklusregulatoren Cyclin E, Cyclin A und cdk2 ist sowohl unter Basalbedingungen als auch nach 24-stündiger mitogener Stimulation von synchronisierten Zellen in C57BL/6-Zellen erhöht (s. 4.1.2.3, Abb. 4.4 und 4.1.4.3, Abb. 4.8). Die sehr geringe bis kaum detektierbare Proteinexpression dieser positiven Zellzyklusregulatoren zum Zeitpunkt Null Stunden bestätigt den Status des Ruhezustands der Zellen. Das Expressionsmuster dieser Zellzyklusregulatoren verdeutlicht eine Analogie zwischen den Vergleichen NMRI- versus C57BL/6- und Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen. Ein Unterschied ist in der Cyclin D₁ -Expression feststellbar. In C57BL/6-Zellen ist Cyclin D₁ sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach mitogener Stimulation synchronisierter Zellen stärker exprimiert als in NMRI-Zellen (s. 4.1.2.2, Abb. 4.3 und 4.1.4.2, Abb. 4.7). In Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen ist unter basalen Bedingungen kein Unterschied in der Proteinexpression von Cyclin D₁ erkennbar (s. 4.2.3.2, Abb., 4.14). Serumstimulierte synchronisierte Id2^{-/-}-Zellen zeigen jedoch eine signifikant geringere Cyclin D₁-Expression als Id2^{+/-}-Zellen (s. 4.2.5.2, Abb. 4.18). Id2 scheint somit über einen unbekanntem Mechanismus zur Cyclin D₁-Expression beizutragen. Zudem ist zu vermuten, dass die hohe Cyclin D₁-Expression in C57/BL6-Zellen auf weitere, nicht definierte Unterschiede zwischen C57BL/6 und NMRI-Zellen zurückzuführen ist.

Die starke Ansprechbarkeit von C57BL/6-Zellen auf mitogene Signale steht auf den ersten Blick im Widerspruch mit der Feststellung, dass C57BL/6-Mäuse vor kardiovaskulären Erkrankungen besser geschützt seien als NMRI-Mäuse. Es ist jedoch festzustellen, dass die proliferative Reaktion von C57BL/6-Zellen auf experimentelle Verletzung in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen einen Schutzmechanismus darstellen, der bei ruptierten Plaques zur Regenerierung der Verletzung beiträgt und somit vor akuten thrombotischen Ereignissen schützt. Im Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass die Proliferationsrate zwei Wochen nach Verletzung wieder auf ein normales Level absinkt. In einer Studie wurde das Expressionsverhalten der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 nach arterieller Verletzung untersucht. Hierbei war p27 in normalen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen, die im Ruhezustand arretiert waren, stark exprimiert. Nach interventionellem Eingriff nahm der p27-Spiegel rasch ab. Nach vierzehn Tagen wurde p27 jedoch erneut hochreguliert und hielt diesen Spiegel bis zum sechzigsten Tag. p21 war in normalen Arterien nicht erkennbar. Nach arterieller Verletzung blieb die p21-Expression auf einem niedrigen Niveau, bis sie nach 14 Tagen stark anstieg und nach drei Wochen ein Maximum erreichte. Nach sechzig Tagen war p21 nicht mehr nachweisbar. Der Anstieg von p21 und p27 korrelierte mit der Proliferationsabnahme. Da allerdings nur p27 und nicht p21 anhaltend exprimiert wurde, wurde abgeleitet, dass der dauerhafte Proliferationsarrest durch p27 vermittelt wird (Tanner et al., 1998). Die Expressionen der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 zeigen in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57BL/6-Mäusen deutlich unterschiedliche Muster. So ist bereits unter Basalbedingungen zu erkennen, dass in C57BL/6-Zellen die Expression von p27 höher und die Expression von p21 niedriger ausgeprägt ist als in NMRI-Zellen (s. 4.1.2.1, Abb. 4.2). Sehr aussagekräftig ist die Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 in synchronisierten Zellen. Im Ruhezustand ist in glatten Gefäßmuskelzellen von C57BL/6-Mäusen die p27-Expression deutlich höher und die p21-Expression wesentlich niedriger als in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen (s. 4.1.4.1, Abb. 4.6). Auch bei der Expression von p21 und p27 ist eine Analogie der Vergleichsgruppen NMRI- versus C57BL/6-Zellen und Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen feststellbar. So zeigen C57BL/6- und Id2^{-/-}-Zellen ein Expressionsmuster der Zellzyklusinhibitoren wie es in normalen glatten Gefäßmuskelzellen arterieller Gefäße zu finden ist. Es ist zu vermuten, dass p27 die protektive Wirkung in C57BL/6- und Id2^{-/-}-Zellen durch eine schnelle Arretierbarkeit der Zellen im Ruhezustand vermittelt.

Eine Besonderheit stellt der p21 Spiegel dar. p21 ist unter Basalbedingungen und nach Serumstimulation in NMRI-Zellen deutlich stärker exprimiert als in C57BL/6-Zellen (s. 4.1.4.1, Abb. 4.6). Hier ist ebenfalls eine Analogie zum Vergleich Id2^{+/-}- versus Id2^{-/-}-Zellen erkenn-

bar. Es ist festzustellen, dass glatte Gefäßmuskelzellen von NMRI- und Id2^{+/-}-Mäusen einen Phänotyp einnehmen, der nicht mit dem Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen im normalen Gewebe von arteriellen Gefäßwänden übereinstimmt. Es ist daher zu vermuten, dass der p21-Spiegel in der G₁-Phase von NMRI- und Id2^{+/-}-Zellen so hoch ist, dass p21 nicht mehr als positiver sondern als negativer Zellzyklusregulator fungiert. Dies ist der Fall, wenn p21 in einem stöchiometrisch höheren Anteil vorliegt als die Cyclin E/cdk2-Komplexe und in diesem Verhältnis die cdk2-Aktivität und somit das Voranschreiten des Zellzyklus inhibiert (Sherr und Roberts, 1999).

Die mRNA-Expressionen von Id2 und p21 in C57BL/6-, NMRI-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Zellen wurde mit Hilfe der Real-time PCR-Analyse dargestellt. So wurde Id2 in C57BL/6-Zellen zwar stärker exprimiert als in Id2^{-/-}-Zellen, allerdings geringer als in NMRI- oder Id2^{+/-}-Zellen (s. 4.1.6, Tab. 4.2, Abb. 4.10 und 4.2.1, Tab. 4.3, Abb. 4.11). Dieses Expressionsmuster steht in direkter Analogie zur p21-mRNA-Expression (s. 4.1.5, Tab. 4.1, Abb. 4.9 und 4.2.6, Tab. 4.4 und Abb. 4.20). Die zellzyklusregulierende Wirkung von p21 ist abhängig von der p21-Konzentration in der Zelle. Ein niedriger Gehalt an p21 reguliert den Zellzyklus positiv, ein hoher p21-Anteil resultiert im Zellzyklusarrest. Auf Grund des ähnlichen Expressionsprofils von Id2 und p21 ist zu vermuten, dass die Id2-vermittelte p21-Induktion abhängig ist vom Id2-Gehalt. Aus dieser Tatsache kann man folgern, dass die zellzyklusregulierende Wirkung von Id2, genauso wie p21, von der Konzentration abhängig ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Id2-Konzentration in C57BL/6-Zellen so niedrig ist, dass die geringe p21-Konzentration in diesen Zellen den Zellzyklus positiv reguliert. Es ist weiterhin naheliegend, dass Id2 in C57BL/6-Zellen in der späten G₁-Phase durch aktiviertes cdk2 phosphoryliert wird und somit zum Zellzyklusprogress beiträgt. Wie das Zellzyklusverhalten von Id2^{-/-}-Zellen zeigt, ist Id2 jedoch nicht notwendig für eine positive Zellzyklusregulierung in glatten Gefäßmuskelzellen.

5.3 Id2 übt keinen Einfluss aus auf die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen von NMRI- und C57/BL6-Mäusen

Id-Proteine werden sowohl als Inhibitoren der DNA-Bindung als auch als Inhibitoren der Differenzierung bezeichnet. Die Namensgebung erfolgte auf Grund ihrer Funktion. So können Id-Proteine zum einen die Bindung von bHLH-Faktoren an Promotorregionen der Zielgene hemmen und vermindert somit die transkriptionelle Aktivität der bHLH-Proteine. Zum anderen sind Id-Proteine in der Lage die Differenzierung einiger Zellarten zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass die ektope Expression von Id-Proteinen die zelluläre Differenzierung in unterschiedlichen Zellarten inhibiert. Änderungen im Differenzierungs-Status von glatten Gefäßmuskelzellen spielen eine wichtige Rolle bei vaskulären Erkrankungen. Allerdings ist der Mechanismus, der die Differenzierung kontrolliert, noch nicht endgültig definiert. Die Hauptfunktion differenzierter glatter Gefäßmuskelzellen besteht darin zu kontrahieren. Kontraktile Proteine sind daher Indikatoren für den differenzierten, kontraktilen Phänotyp (Forrest und McNamara, 2004). Den wichtigsten Marker für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen stellt α -Glattmuskel-Actin dar. Dieses Protein wird zwar in einigen Geweben während der Entwicklung transient gebildet, jedoch ist seine Expression in adulten Organismen auf glatte Gefäßmuskelzellen beschränkt. In einer Zellkulturstudie konnte gezeigt werden, dass die Promotor-Region von α -Glattmuskel-Actin zwei E-Box-Elemente enthält und die Gentranskription durch den bHLH-Faktor E12 induziert wird. Eine Co-Expression von E12 und Id2 oder Id3 reduzierte die Transkription von α -Glattmuskel-Actin, so dass eine Beteiligung der Id-Proteine an der Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen diskutiert wird (Kumar et al., 2003). Glatte Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen zeigen auch nach hetero- und homozygoter Id2-Deletion keine Veränderungen im Expressionsmuster von α -Glattmuskel-Actin. So ist sowohl auf mRNA-Ebene nach Transkription des Acta2-Gens als auch auf Protein-Ebene (s. 4.3.5, Abb. 4.25-26) kein signifikanter Expressionsunterschied in Id2^{+/+}-, Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen feststellbar. Auch beim Vergleich glatter Gefäßmuskelzellen zwischen NMRI- und C57BL/6-Mäusen ist sowohl die Acta2-Transkription als auch die Proteinexpression von α -Glattmuskel-Actin (s. 4.4.4, Abb. 4.32) vergleichbar. Es scheint daher, dass Id2 auch beim Differenzierungsprozess unterschiedliche Rollen einnimmt und es ist zu vermuten, dass auch in diesem Fall die Phosphorylierung von Id2 an Serin 5 ausschlaggebend ist. Es konnte belegt werden, dass nur die phosphorylierte Form von Id2 in der Lage ist bHLH-Faktoren negativ zu regulieren (Hara et al., 1997). Dies verstärkt die These, dass Id2 in glatten Gefäßmuskelzellen von NMRI-Mäusen in unphosphorylierter Form vorliegt.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt in der Id2-vermittelten Ausbildung des seneszenten Phänotyps ein bisher noch nicht bekanntes biologisches Phänomen. Ein Schlüsselkriterium zellulärer Seneszenz stellt die Abnahme der Proliferationsrate dar. Es konnte gezeigt werden, dass p21-vermittelt eine zunehmende Id2-Konzentration die Replikationsrate reduziert. Jedoch ist der genaue Mechanismus der Regulation nicht endgültig geklärt. Die Charakterisierung des Phosphorylierungsstatus von Id2 in seneszenten und nicht-proliferierenden Zellen stellt eine interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen dar. Vaskuläre Seneszenz spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hypertonie. Die Aufklärung dieser Hypothese könnte zum besseren Verständnis der Pathogenese von Hypertonie beitragen. Darüber hinaus könnten diese Daten dabei helfen, therapeutische Ansätze zu entwickeln, die zur Verhinderung der Ausbildung des seneszenten Phänotyps in kardiovaskulären Erkrankungen von Nutzen wären. Versuche zur Bestätigung der Id2-Wirkung in humanen glatten Gefäßmuskeln wären dabei der nächste Schritt.