

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Klinischer Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Nummer Eins aller Todesursachen dar. Im Jahr 2005 starben nach Schätzungen der WHO 30% der Weltbevölkerung an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Die europäische Statistik berechnete 42% der Todesfälle auf Grund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der EU (Petersen et al., 2005). Hochrechnungen der WHO sagen voraus, dass sich diese Situation in den kommenden Jahren kaum ändern wird (WHO, 2007). Kardiovaskuläre Erkrankungen zeichnen sich in der Regel durch arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwand aus. Risikofaktoren, die Ausbildung und Fortschreiten einer Arteriosklerose begünstigen, sind Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Adipositas, Zigarettenrauch, Alkoholkonsum sowie physische Inaktivität (Petersen et al., 2005). Akute kardiovaskuläre Ereignisse resultieren in der Regel aus fortgeschrittenen arteriosklerotischen Lesionen der Gefäßwand. In diesem Stadium zeigen glatte Gefäßmuskelzellen häufig einen seneszenten Phänotyp, der einher geht mit funktionellen Änderungen der Zellen. Beispielsweise wird die Proliferationsrate reduziert. Die Abnahme der Replikationsrate ist mitverantwortlich für den Verlust der Fähigkeit von glatten Gefäßmuskelzellen zur Regenerierung von Plaque-Rupturen beizutragen (Virmani et al., 2000). An den gerissenen Arealen können Thromben entstehen. Als klinische Konsequenzen der thromboembolischen Gefäßverschlüsse ergeben sich häufig Myokardinfarkte, Hirninfarkte und periphere Gefäßerkrankungen.

1.2 Zelluläre Seneszenz

1.2.1 Formen zellulärer Seneszenz

Zelluläre Seneszenz stellt einen Zustand des dauerhaften Zellzyklusarrests dar. Bereits zu Beginn der 60er Jahre wurde dieses Phänomen von Hayflick und Mitarbeitern in humanen embryonalen Fibroblasten erkannt, daher wird die Beendigung der Zellteilungskapazität auch als „Hayflick-Limit“ bezeichnet (Hayflick und Moorhead, 1961). Zelluläre Seneszenz geht einher mit funktionellen und morphologischen Änderungen, über die mechanistischen Abläufe ist jedoch wenig bekannt (Ben-Porath und Weinberg, 2005). Mit zunehmender Sicherheit

wird davon ausgegangen, dass DNA-Schädigungen die auslösenden Faktoren darstellen (Chen et al., 2007). Es wird zwischen zwei Formen zellulärer Seneszenz unterschieden. Die erste Form wird als replikative Seneszenz bezeichnet. Hierbei wird als auslösender Faktor eine Telomerverkürzung diskutiert. Telomere sind Nukleoprotein-Strukturen mit der Funktion Chromosomenenden zu schützen. Mit jedem Zellzyklurdurchlauf werden Telomere ein Stückchen gekürzt. Es wird angenommen, dass das Erreichen einer kritischen Länge das auslösende Moment darstellt für die Induktion des Seneszenz-Programms (Martens et al., 2000). Telomerverkürzung geht einher mit reduzierter Telomerase-Aktivität. Dieses Enzym katalysiert die Neusynthese der telomerischen Wiederholungen. Eine Inhibierung der Telomerase reduziert die Proliferationsrate (Hahn et al., 1999). Die andere Form der zellulären Seneszenz wird als prämatüre Seneszenz beschrieben. Diese Variante unterscheidet sich durch akute Induzierbarkeit. Sie verläuft telomerunabhängig und wird induziert durch unterschiedliche Stressfaktoren, wie bestimmte Onkogenen, reaktive Sauerstoff-Spezies oder andere Stimuli, die DNA-Schädigungen auslösen (Zhang, 2007).

1.2.2 Kriterien zellulärer Seneszenz

Das charakteristische Kriterium zellulärer Seneszenz ist der Verlust der Fähigkeit zu proliferieren. Nach vielfacher Passagierung von Zellkulturen wird ein Stadium des permanenten Zellzyklusarrests erreicht, das ausschlaggebend ist für die limitierte Lebensspanne der Zellen (Hayflick, 1965). Seneszenten Zellen sind in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus arretiert und nicht in der Lage nach mitogener Stimulation in die S-Phase einzutreten (Sherwood et al., 1988). Sie bleiben über einen langen Zeitraum lebensfähig und metabolisch aktiv, selbst bei Kultivierung unter verminderter Gabe von Mitogenen (Matsumara et al., 1997). Ein weiteres Merkmal der Seneszenz stellt eine Veränderung in der Morphologie dar. Das Volumen steigt an, die Zellen werden größer, verlieren ihre ursprüngliche Form und bilden einen abgeflachten Phänotyp aus. Außerdem ist ein hoher Anteil an granulösen Strukturen erkennbar (Goldstein, 1990). Eine besondere Herausforderung liegt in der Suche nach Biomarkern für Seneszenz. Der gebräuchlichste Biomarker stellt den Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) dar. Der Nachweis erfolgt über eine Umsetzung von X-Gal durch Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase bei pH6 und anschließender Oxidation des Produkts durch Luftsauerstoff, wodurch tiefblauer Indigo-Farbstoff entsteht (Dimri et al., 1995). Die Ursache der SA- β -Gal-Aktivität war lange Zeit unklar. Untersuchungen von Kurz und Mitarbeitern an humanen Endothelzellen ergaben, dass bei zunehmender Zellalterung der lysosomale Anteil und gleichzeitig der Gehalt an lysosomaler β -Galaktosidase ansteigen. Dadurch

wird die gesteigerte Enzymaktivität bei einem suboptimalen pH-Wert detektierbar (Kurz et al., 2000). Senescente Zellen besitzen ein verändertes Genexpressionsprofil. Übereinstimmende Untersuchungen an Fibroblasten konnten zeigen, dass durch stressinduzierter Seneszenz eine Reihe spezifischer Gene transkribiert wird, unter anderem Collagen 1a1 (Col1a1) (Gonos et al., 1998; Dumont et al., 2000). Auf Grund des reduzierten replikativen Potentials alternder Zellen ist es nicht verwunderlich, dass auch Zellzyklusinhibitoren Seneszenz-Biomarker darstellen. Der hierbei anerkannteste Marker ist p16. Eine Überexpression dieses Proteins ist direkt mit Zellalterung in den meisten Zellarten assoziiert (Krishnamurthy et al., 2004). Gleichzeitig erfolgt in den meisten alternden Zellen eine verstärkte Expression von p21 (Chen, 2000). Dies ist jedoch nicht zwingend notwendig. So konnte gezeigt werden, dass p21-defiziente Zellen in der Lage sind, einen seneszenten Phänotyp auszubilden (Pantoja und Serrano 1999).

1.2.3 Mechanismen zellulärer Seneszenz

In den letzten Jahren wurden beachtliche Erfolge verbucht in der Aufklärung molekularer Mechanismen zellulärer Seneszenz. Jedoch ist noch nicht endgültig geklärt, ob diese Signaltransduktionswege ursächlich oder seneszenzverursacht ablaufen. Die Aufklärung molekularer Seneszenz-Mechanismen ist kompliziert, da Seneszenz keinen einheitlichen zellulären Prozess darstellt (Zhang et al., 2003). Die Signaltransduktionswege variieren sowohl zwischen Zell- als auch Speziesarten. Nach bisherigen Erkenntnissen kann zwischen zwei unterschiedlichen molekularen Wegen unterschieden werden. Bei dem ersten Mechanismus handelt es sich um die p53-p21-vermittelte Signaltransduktion. In vielen seneszenten Zellen ist zwar kein Unterschied im mRNA- oder Protein-Gehalt von p53 feststellbar, jedoch steigt die Phosphorylierung und somit die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor während der Seneszenz (Webley et al., 2000). Eine p53-Aktivierung wird häufig diskutiert im Zusammenhang mit Telomerverkürzung und somit als vermittelnder Faktor bei der replikativen Seneszenz. Der detaillierte molekulare Zusammenhang ist jedoch unklar (Takai et al., 2003). Andere Untersuchungen zeigen, dass p53 ebenfalls eine Rolle spielt in der telomerunabhängigen prämaturnen Seneszenz (Chen et al., 1998). Eine Zielstruktur von aktiviertem p53 stellt p21 dar, das nach verstärkter Expression durch cdk2-Inhibierung den Zellzyklus arretiert (Sherr und Roberts, 1999). Erhöhte p21-Spiegel sind einerseits assoziiert mit Telomerverkürzung und erhöhter p53-Aktivität (Herbig et al., 2003). Andererseits konnten auch p53-unabhängige p21-Hochregulationen nachgewiesen werden (Bond et al., 1995).

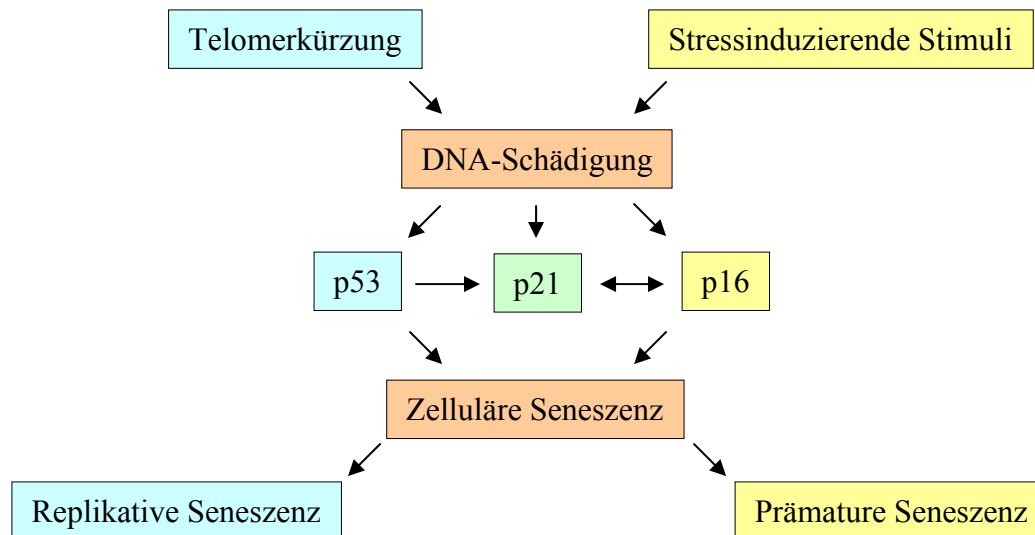


Abbildung 1.1: Entstehung zellulärer Seneszenz. Auslösende Faktoren stellen sowohl Telomerverkürzung, als auch eine Vielzahl stressinduzierender Stimuli, wie oxidativer Stress oder Überexpression von spezifischen Onkogenen dar, die in DNA-Schädigung konvergieren. Die Signaltransduktion kann p53-, p21- oder p16-vermittelt oder in kombinierten Wegen ablaufen. Replikative Seneszenz wird in der Regel telomerabhängig und p53-vermittelt dargestellt. Die stressinduzierte, prämatüre Seneszenz verläuft meist p16-reguliert.

Der zweite diskutierte Mechanismus stellt den pRb-p16-Signaltransduktionsweg dar. In vielen seneszenten Zellen kann eine starke p16-Expression nachgewiesen werden. Der zellzyklusinhibierende Effekt erfolgt über die Bindung an Cyclin D-abhängige Kinasen, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) gehemmt wird. Hypophosphoryliertes pRb bindet und inaktiviert E2F-Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression von S-Phase-Induktoren gehemmt wird (Sherr und Roberts, 1999). Es scheint deutlich zu sein, dass eine Seneszenz-induzierte p16-Expression unabhängig von einer Telomerverkürzung erfolgt und die stressinduzierte, prämatüre Seneszenz pRb-p16-vermittelt verläuft. So wird beispielsweise einerseits bei ektopischer Expression von hTERT (human telomerase reverse transcriptase), der katalytischen Untereinheit der Telomerase, die p16-Induktion nicht verhindert (Forsyth et al., 2003). Andererseits steigt die p16-Expression bei stressinduzierter Seneszenz stark an (Lin et al., 1998).

Welche Art der Seneszenz in den zu untersuchenden Zellen vorliegt ist häufig nicht eindeutig bestimmbar. Neuere Studien an Zellkulturen konnten zeigen, dass seneszente Populationen ein Mosaik aus unterschiedlichen Subpopulationen darstellen, bei denen einige p21, andere p16 exprimieren (Itahana et al., 2003). Interessanterweise steigt die p21-Expression rapide in

der frühen Seneszenz-Phase (Herbig et al., 2003), die p16-Akkumulation hingegen erfolgt verzögert und gleichzeitig mit sowohl steigender SA- β -Aktivität als auch morphologischer Veränderung (Stein et al., 1999). Brown und Mitarbeiter zeigten, dass nach DNA-Schädigung keine Zellzyklusarretierung erfolgt, wenn p21 zuvor inaktiviert wurde (Brown et al., 1997). So kann vermutet werden, dass p21 eine wesentliche Rolle einnimmt bei der Zellzyklusinhibierung und p16 an der seneszenzassoziierten Phänotyp-Modulation beteiligt ist (Abb.1.1).

1.3 Zellzyklusregulation

1.3.1 Zellzyklusregulation in somatischen Zellen von der G₀- bis zur S-Phase

Der mitogenabhängige Eintritt von somatischen Zellen in die G₁-Phase und der anschließende Verlauf durch den Zellzyklus sind Vorgänge, die kooperativ durch mehrere Klassen an Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen (cdk) reguliert werden. Die Aktivität der cdk's unterliegt der Kontrolle der cdk-Inhibitoren, die sich in zwei Familien unterteilen lassen. Die erste Klasse stellt die Ink4-Proteine dar. Diese binden und inhibieren cdk4 und cdk6. Vertreter der Ink4-Familie sind p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d}. Die andere Klasse umfasst die Cip/Kip-Familie und setzt sich zusammen aus p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Cip/Kip-Proteine besitzen ein weiteres Wirkspektrum und beeinflussen Cyclin D-, Cyclin E- und Cyclin A-abhängige Kinasen. Hierbei stellen sie sich als potente Inhibitoren von cdk2, der cyclinabhängigen Kinase von Cyclin E und Cyclin A, dar (s.Abb.1.2). Die cyclinabhängigen Kinasen von Cyclin D, cdk4 und cdk6, werden durch Cip/Kip-Proteine sowohl negativ als auch positiv beeinflusst (Sherr und Roberts, 1999).

Der initiale Schritt des Zellzykluseintritts auf Grund mitogener Stimulation besteht in der Expression von Typ D-Cyclinen, die sich zusammensetzen aus Cyclin D₁, D₂ und D₃. Des Weiteren stimulieren Mitogene die Expression geringer Mengen p21 (Dong et al., 2003). Ein geringer Gehalt an Cip/Kip-Proteinen stellt eine Voraussetzung dar für das Fortschreiten des Zellzyklus, indem diese Proteine den Zusammenschluss, die Stabilisierung und den Kernimport des Komplexes aus Cyclin D, einer Cyclin D-abhängigen Kinase und einem Cip/Kip-Protein regulieren (Cheng et al., 1999). Im Zellkern werden die Cyclin D-abhängigen Kinasen des Komplexes durch Beteiligung der cdk-aktivierenden Kinase (CAK) phosphoryliert. Aktive Cyclin D-Komplexe besitzen mehrere Funktionen. Zum einen phosphorylieren sie in der Mitte der G₁-Phase das Retinoblastom-Protein (pRb), das als zellzyklusinhibierendes Protein in hypophosphorylierter Form vorliegt und so die Familie der Transkriptionsfaktoren E₂F

durch Bindung inhibiert. Zum anderen titrieren aktive Cyclin D-Komplexe Cip/Kip-Proteine aus inaktivierten Cyclin E/cdk2/Cip/Kip-Komplexen (Coqueret, 2003). Dadurch wird der Cyclin E/cdk2-Komplex reaktiviert und das Retinoblastom-Protein an einer weiteren Stelle phosphoryliert (Lundberg und Weinberg, 1998). Durch diesen Schritt wird E2F aus der Bindung mit E2F freigesetzt und es wird eine Reihe von Genen transkribiert, die für den weiteren Zellzyklusverlauf notwendig sind (Dyson, 1998). Eine wesentliche Regulation ist hierbei die Expression von Cyclin E. Dies bildet mit konstitutiv vorhandenem cdk2 zusätzlich aktive Komplexe und trägt somit über einen positiven Rückkopplungsmechanismus entscheidend zum irreversiblen G₁/S-Übergang bei. Für das weitere Zellzyklusfortschreiten in der Synthese-Phase ist die, durch E2F initiierte, Expression von Cyclin A ausschlaggebend. Hierfür bildet Cyclin A einen aktiven Komplex mit cdk2 (Sherr und Roberts, 2004) (Abb.1.3).

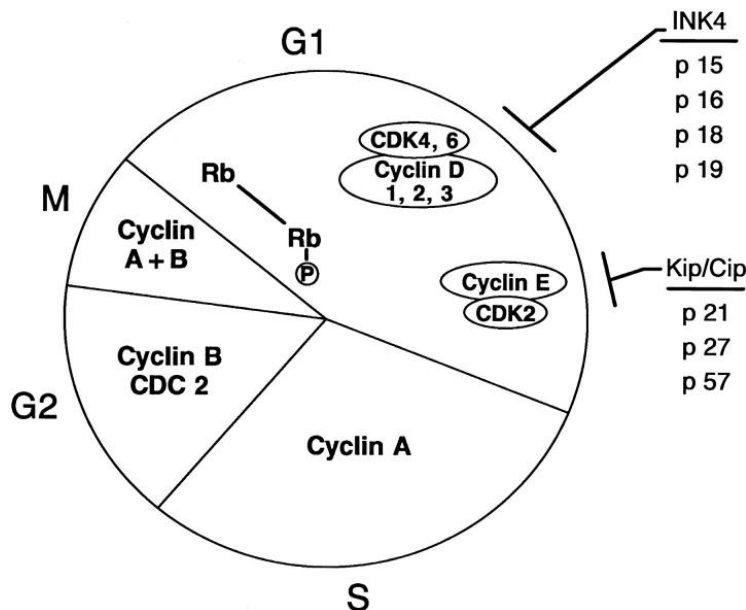


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über den eukaryotischen Zellzyklus, modifiziert nach Lloyd et al. (1999). Zellzyklusinhibitoren der Ink4- und der CIP/KIP-Familie besitzen hemmende Wirkung in der G₁-Phase.

1.3.2 Wirkungsweisen der Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und p27

Zellzyklusinhibitoren hemmen den Zellzyklus durch Blockade des aktiven Zentrums der cyclinabhängigen Kinasen. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt die Hemmung von cdk2, die durch eine geringe Konzentration an ungebundenen Cip/Kip-Proteinen hervorgerufen werden kann (Sherr und Roberts, 2004). So wird beispielsweise der Komplex Cyclin E/cdk2 in der G₀-Phase vom Zellzyklusinhibitor p27 gehemmt. p27 wird in der Regel posttranskriptionell exprimiert, liegt in der G₀-Phase zu einem hohen Anteil vor und ist für die Arretierung des Zellzyklus verantwortlich (Agrawal et al., 1996). Die p27-Expression wird u.a. induziert durch Zell-Zell-Kontakte oder über TGFβ-Signaltransduktionswege (Lloyd et al., 1999). Beim Eintritt in die G₁-Phase sinkt der p27-Spiegel rasch ab. Nach mitogener Stimulation wird die Expression von Cyclin D2 induziert, das an cdk4 oder -6 bindet. Dieser Komplex entzieht dem cdk2/Cyclin E/p27-Komplex den cdk-Inhibitor p27, wodurch cdk2 reaktiviert wird. Cyclin D2 vermittelt den nuklearen Export des Cyclin D2/cdk4,6/p27-Komplexes. Im Zytoplasma erfolgt die Degradierung von p27 (Susaki et al., 2007). Ab der späten G₁-Phase wird p27 durch aktiviertes cdk2 an Threonin 187 phosphoryliert. Thr187-Phospho-p27 bindet an Skp2, einem F-Box-Protein, das den p27-Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt. Dieser proteolytische Mechanismus hält den p27-Spiegel bis zum Zellzyklusende auf einem niedrigen Niveau (Sutterlüty et al., 1999). Die Reaktionen zwischen aktiviertem cdk2 und p27 ist abhängig von den Konzentrationen der einzelnen Verbindungen. Dominiert p27, so bindet es an den Komplex und inhibiert damit dessen Aktivität. Nimmt jedoch die Menge an aktiviertem cdk2 zu, so phosphoryliert dieses seine Substrate.

p21 ist ein gut charakterisiertes Protein, das verschiedene Rollen bei unterschiedlichen zellphysiologischen Abläufen einnimmt (Child und Mann, 2006). p21 stellt einen wesentlichen Zellzyklusregulator dar, der modulierend in Prozesse wie Differenzierung, Apoptose und Seneszenz eingreift. p21 erreicht seine antiproliferative Wirkung zum einen über die Bindung und Inaktivierung von PCNA (proliferating cell nuclear antigen), einem Co-Faktor, der zur DNA-Synthese benötigt wird (Waga et al., 1994). Zum anderen inhibiert p21 die Aktivität von Cyclin/cdk2-Komplexen und somit das weitere Fortschreiten des Zellzyklus (Sherr und Roberts, 1999). Verschiedene Mechanismen regulieren den zellulären p21-Spiegel, einschließlich Transkription, mRNA-Stabilisierung und sowohl Ubiquitin-abhängige als auch -unabhängige Proteindegradierung (Gartel und Radhakrishnan, 2005). So stellt p21 beispielsweise das transkriptionelle Ziel von p53 dar und spielt dabei eine wesentliche Rolle in der Vermittlung des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung (El-Deiry et al., 1993). Neben p53 sind jedoch noch eine Reihe weiterer Faktoren bekannt, die eine p21-Transkription induzie-

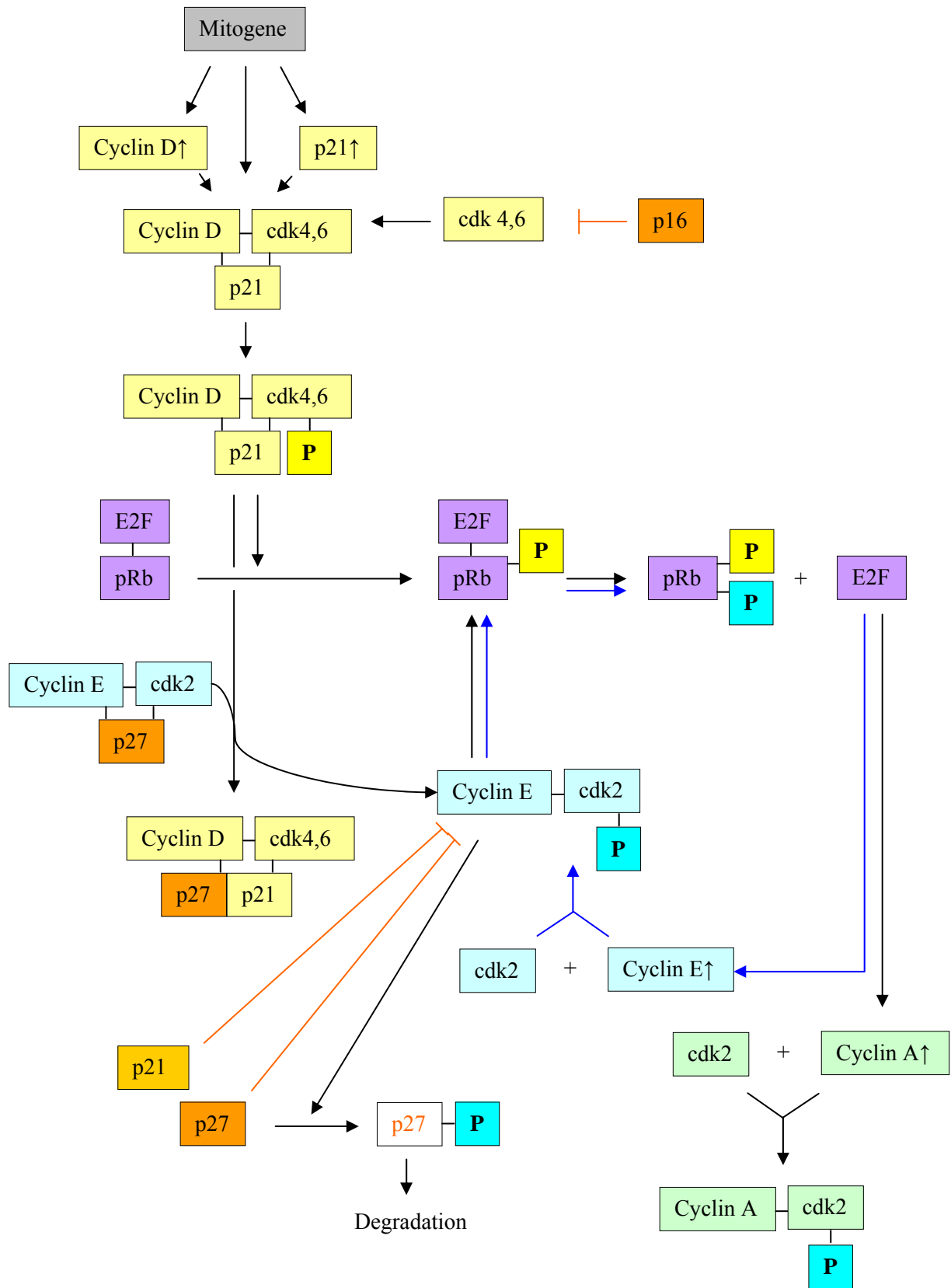


Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über die Regulation des Zellzyklus somatischer Zellen von G₀-, über G₁- bis zur S-Phase.

ren, wie Sp- und E2F-Proteine, Smads und andere (Gartel und Tyner, 1999). Zu Beginn der G₁-Phase vermittelt mitogene Stimulation die Expression einer geringen Menge von p21. Dieser p21-Gehalt ist für das weitere Fortschreiten des Zellzyklus notwendig. p21 erreicht seine proliferative Wirkung durch Vermittlung des Zusammenschlusses von Cyclin D mit cdk4 oder -6 mit folgender Translokalisierung des Komplexes in den Nukleus. p21 wirkt erst in höheren Konzentrationen durch Bindung mehrerer Cip/Kip-Proteine an den Cyclin D/cdk-Komplex zellzyklusinhibierend. In diesem Fall wird der Komplex nicht mehr stabilisiert, sondern inaktiviert (Sherr und Roberts, 2004).

p16, ein Protein der Ink-Familie, ist ein spezifischer Inhibitor der Cyclin D-abhängigen Kinasen cdk4 und cdk6. p16 ist bekannt als Tumorsuppressor-Protein, das in vielen Tumorarten aus unterschiedlichen Gründen, wie homozygoter Deletion oder Punktmutation, nicht exprimiert wird (Ruas und Peters, 1998). Der p16-pRb-Signaltransduktionsweg stellt eine molekulare Verbindung dar zwischen zellulärer Seneszenz und Tumorsuppression (Ohtani et al., 2004). Die Expression von p16 steigt in vielen Fällen bei Zellalterung an, wobei der molekulare Mechanismus nicht geklärt ist (Chen et al., 2007). p16 wird häufig als Biomarker für zelluläre Seneszenz betrachtet (Krishnamurthy et al., 2004). Zellkulturstudien zeigen, dass eine ektopische Expression von p16 entweder Zellzyklusarrest oder Apoptose verursacht (Calbo et al., 2004). Die zellzyklusinhibierende Wirkung von p16 erfolgt indirekt über eine induzierte Zellzyklusarretierung durch p21. Durch Bindung von p16 an cdk4 oder -6 wird der Aufbau des Komplexes Cyclin D/cdk/p21 verhindert. Der Anteil an ungebundenem p21 steigt an und inaktiviert Cyclin E/cdk2-Komplexe. Ein weiteres Fortschreiten des Zellzyklus wird dadurch verhindert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin A oder Cyclin E diesen Arrest invertieren kann (Mitra et al., 1999). Es kann daher auch an dieser Stelle vermutet werden, dass das Schicksal des Zellzyklus abhängig ist von der Konzentration der einzelnen Regulatoren (s.Abb.1.3).

1.4 Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen

Die prinzipielle Funktion von glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica media arterieller Gefäße besteht in der Fähigkeit zu kontrahieren und somit zur Blutdruckregulierung beizutragen. Glatte Gefäßmuskelzellen in gesunden Gefäßen proliferieren kaum und zeigen einen Phänotyp, der sich durch die Expression kontraktile Proteine auszeichnet (Owens et al., 2004) (s.Abb.1.4).

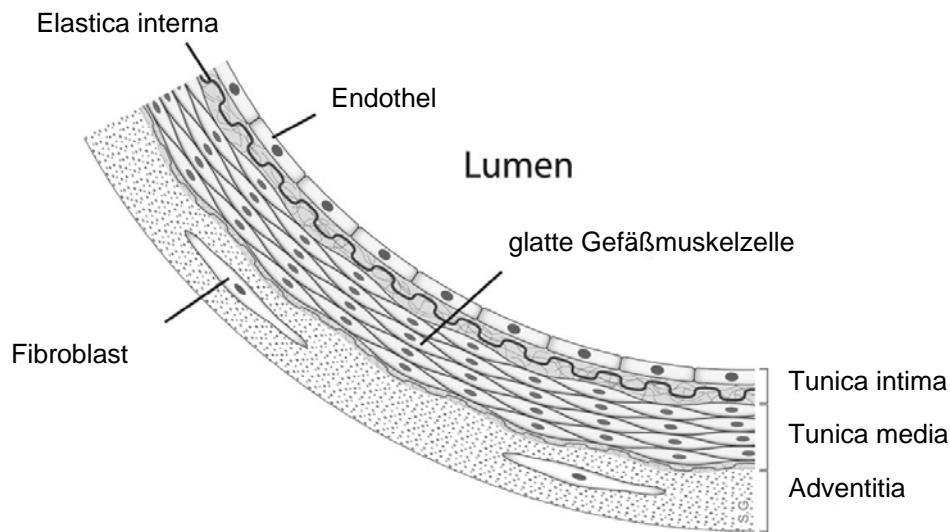


Abbildung 1.4: Dreischichtiger Aufbau der gesunden arteriellen Gefäßwand, modifiziert nach Ghesquiere (2005). Tunica intima, aus Endothel und Elastica interna, Tunica media, in erster Linie bestehend aus kontraktiven glatten Gefäßmuskelzellen und Adventitia.

Glatte Gefäßmuskelzellen reagieren sehr sensibel und sehr unterschiedlich auf exo- und endogene Einflüsse. So kann beispielsweise ihr Proliferationsstatus verändert werden, aber auch Migration, Differenzierung, Apoptose oder die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps sind möglich. Während der Pathogenese der Arteriosklerose unterliegen glatte Gefäßmuskelzellen mehreren Phänotypmodulationen. So ist der anfängliche Verlauf der Arteriosklerose mit einer kontinuierlichen Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen assoziiert (O'Brien et al., 1993). Diese erhöhte Proliferationsrate, die zur intimalen Verdickung beiträgt, gestaltet sich allerdings ebenso problematisch wie der Verlust der Replikationsfähigkeit in glatten Gefäßmuskelzellen in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen. In diesen Stadien haben glatte Gefäßmuskelzellen ihre Eigenschaft zur Reparatur ruptierter Plaques beizutragen verloren (Gorenne et al., 2006).

Arteriosklerose ist eine Gefäßerkrankung, die einen jahrzehntelangen, progressiv fortschreitenden Prozess darstellt (Steinberg et al., 1989). Ross und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass Arteriosklerose als Antwort auf eine endotheliale Veränderung zu verstehen ist. Diese kann durch eine mechanische Abnutzung der Endothelschicht ausgelöst werden, aber auch durch pathogene Einflüsse, die eine endotheliale Dysfunktion hervorrufen. Mögliche Gründe stellen Bluthochdruck, erhöhter LDL-Spiegel, glykosylierte Proteine bei Diabetes mellitus, erhöhter Homocystein-Spiegel, infektiöse Mikroorganismen, wie Herpesviren oder Chlamydia pneumoniae oder freie Radikale durch Zigarettenrauch dar. Die Prävalenz der Arteriosklerose

rose steigt mit Anzahl der Risikofaktoren. Vaskuläre Schädigungen führen über eine endotheliale Dysfunktion zu einer Veränderung der Eigenschaften von glatten Gefäßmuskelzellen. Das zentrale Ereignis der frühen arteriosklerotischen Lesion besteht in der Akkumulation von oxidierten Lipoproteinen, Makrophagen und Lymphozyten in der Tunica intima (Raines und Ross, 1993). Die immunologische Antwort stimuliert die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima sowie deren Proliferation. Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen phagozytieren oxidiertes LDL und konvertieren zu Schaumzellen. Die glatten Gefäßmuskelzellen exprimieren Extrazellulärmatrixmoleküle, wie Elastin, Collagen und Proteoglykane. Mit fortschreitender Zellteilung und steigendem Gehalt an Bindegewebe wird die Intima verdickt (Ross, 1999). Die Gefäßwand reagiert mit „Remodeling“, einem Kompensationsmechanismus. Hierbei wird mit zunehmender intimaler Verdickung das Gefäß in der Weise vergrößert, dass das Lumen bis zu einem gewissen Grad konstant bleibt. Wird dieser Punkt überschritten, reduziert sich das Lumen markant (Glagov et al., 1987). Fibröse Plaques entwickeln sich fokal in der Intima, indem lipidbeladene Zellen auf Grund apoptotischer Vorgänge zu Grunde gehen und sich ein Kern aus extrazellulärem Lipid und nekrotischen Zellresten ausbildet. Dieses Zentrum wird abgedeckt durch eine dichte fibröse Kappe aus glatten Gefäßmuskelzellen und Bindegewebe (Raines und Ross, 1995). Die verdickte Intima kann einerseits zum Gefäßverschluss führen andererseits stellt sie eine schützende Kappe über dem expandierenden Atherom dar. Eine zunehmende Apoptoserate von glatten Gefäßmuskelzellen in fortgeschrittenen Plaques führt zur Abnahme des zellulären Gehalts und des Anteils an Extrazellulärmatrix der Intima. Dadurch wird die fibröse Kappe dünner und die Lesion anfälliger gegenüber Verletzungen (Clarke und Bennett, 2006). Der nekrotische Kern der instabilen Plaque vergrößert sich und Hämorrhagien sowie Kalzifizierungen sind häufig präsent (Virmani et al., 2000). Die Menge an Arteriosklerose bestimmt das Ausmaß der Gewebeischämie. Jedoch ist die Qualität und nicht die Quantität der Lesion ausschlaggebend für das Schicksal der Plaque. Ruptur und Erosion von instabilen Plaques sind Hauptgründe der akuten klinischen Folgen der Arteriosklerose. Reißt die Plaque, sind Einblutungen und Thrombusbildungen möglich. Folgende Gefäßokklusionen sind die Hauptursache für den plötzlichen Herztod (Lutgens et al., 2003). Pathologische Studien bescheinigen allerdings, dass sich einige Plaque-Rupturen ruhig verhalten (Mann und Davies, 1999). Dies ist der Fall, wenn nach Verletzung der Lesion glatte Gefäßmuskelzellen noch in der Lage sind die Proliferationsrate erneut zu steigern. Die erhöhte Zellzahl ist ausschlaggebend für die Wundheilung der ruptierten Lesion und stellt somit einen Schutz vor akuten Folgen dar (Burke et al, 2001). Mit zunehmendem Alter verlieren die glatten Gefäßmuskelzellen viele ihrer Eigenschaften.

Untersuchungen von Ruiz-Torres und Mitarbeitern zeigen, dass sowohl die Proliferationsaktivität (Ruiz-Torres et al., 1999) als auch die Fähigkeit zur Migration (Ruiz-Torres et al., 2003) von glatten Gefäßmuskelzellen mit steigendem Alter abnehmen. Proliferationsabnahme ist ein wesentliches Kriterium der zellulären Seneszenz. Glatte Gefäßmuskelzellen, die den Seneszenz-Phänotyp vorweisen, konnten in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Fenton et al., 2000). Ein fataler Befund, da diese Zellen nicht mehr in der Lage sind, zur Reparatur gerissener Läsionen beizutragen und somit die Wahrscheinlichkeit von Plaquerupturen mit akuten Folgen steigt (Gorenne et al., 2006).

1.5 Rolle des Inhibitors der DNA-Bindung Id2

1.5.1 HLH (Helix-Loop-Helix)-Transkriptionsfaktoren

Die HLH-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren unterteilt sich in mehrere Klassen und es konnten bisher mehr als 240 zugehörige Proteine identifiziert werden. Alle HLH-Faktoren enthalten eine hochkonservierte „Helix-Loop-Helix“-Domäne, die eine Homo- oder Heterodimerisierung vermittelt. Eine Dimerisierung ist die Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität von bHLH-Faktoren. bHLH-Proteine besitzen benachbart zur HLH-Domäne eine Region mit basischen Resten. Diese ist notwendig für die Bindung an eine spezifische Region der DNA, z.B. an eine E-Box oder CANNTG-Sequenz in der Promotorregion des zu transkribierenden Gens (Massari und Murre, 2000). Klasse I bHLH-Faktoren, sogenannte E-Proteine, wie E12, E47, HEB und E2-2, sind in vielen Geweben exprimiert. Sie dimerisieren mit Klasse II bHLH-Faktoren, wie MyoD, NeuroD, eHAND oder dHAND, die gewebespezifisch exprimiert werden (Forrest und McNamara, 2004). Eine andere Unterklasse der HLH-Familie stellen die Id-Proteine dar. Diesen fehlt die basische Region neben der HLH-Domäne, wodurch eine DNA-Bindung nicht möglich ist. Id-Proteine dimerisieren mit bHLH-Faktoren der Klassen I und II und hemmen dadurch deren transkriptionelle Aktivität (Benezra et al., 1990).

1.5.2 Die Rolle von Id-Proteinen

Id-Proteine, auch genannt Inhibitoren der DNA-Bindung oder Inhibitoren der Differenzierung, greifen modulierend in die Zellzyklusregulation ein und spielen eine Rolle bei Differenzierung und Apoptose verschiedener Zellarten (Norton, 2000). Es sind vier Id-Proteine (Id1-Id4) bekannt, jedoch sind Regulation und detaillierte Funktion der einzelnen Id-Proteine bisher weitgehend ungeklärt (Massari und Murre, 2000). Es konnte beispielsweise nachgewiesen

werden, dass Id2, Id3 und Id4, jedoch nicht Id1, am N-terminalen Ende durch cdk2 phosphoryliert werden (Hara et al., 1997). Des Weiteren differieren die C-terminalen Enden der Id-Proteine sehr stark, wodurch u.a. die Proteinstabilität reguliert wird (Forrest und McNamara, 2004). Bei Id1 und Id3 konnten verschiedene Splice-Formen gezeigt werden (Springhorn et al., 1994; Matsumara et al., 2001). Untersuchungen an Id2^{-/-}-Mäusen belegten den Einfluss von Id2 auf eine normale Entwicklung und Regulation des Immunsystems. Id2-defizienten Mäusen fehlen Lymphknoten und Langerhanszellen. Die Population an natürlichen Killerzellen ist deutlich reduziert und es treten Veränderungen im CD8 T-Zell-Gedächtnis auf (Yokota et al., 1999; Cannarile et al., 2006; Hacker et al. 2003).

1.5.3 *Id-Proteine und Zellzyklusregulatoren*

Id-Gene werden in der Regel in proliferierenden Zellen exprimiert und greifen positiv regulierend in den Zellzyklus ein (Barone et al., 1994). Ein besonderes Expressionsmuster zeigen Id1 und Id2, die nach mitogener Stimulation biphasisch einmal in der frühen und das zweite Mal in der späten G₁-Phase exprimiert werden (Zebedee und Hara, 2001). In der frühen G₁-Phase liegt pRb in der hypophosphorylierten und zellzyklusinhibierenden Form vor. An U2OS-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Id2-Überexpression die Proliferationsrate bei gleichzeitig reduziertem Serumverbrauch erhöht. Id2 bindet an pRb, wodurch E2F freigesetzt wird und S-Phase-Gene transkribiert. Dies lässt vermuten, dass Id2 einen positiven Zellzyklusregulator darstellt, der in der frühen G₁-Phase alternativ zu cdk4 zum Zellzyklusprogress beiträgt (Ivarone et al., 1994). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Id2, jedoch nicht Id1 oder Id3, die zellzyklussupprimierende Wirkung von pRb abschwächt (Lasorella et al., 1996). Das zweite Expressionsmaximum von Id2 erfolgt in der späten G₁-Phase, parallel zur Expression von Cyclin E, das mit cdk2 einen aktiven Komplex bildet. Dieser Komplex phosphoryliert unterschiedliche Substrate, unter anderem Id2, Id3 und Id4 an Ser5 innerhalb der SPVR-Region. Id1 besitzt in dieser Region eine andere Aminosäuresequenz (Hara et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Id2 an Ser5 notwendig ist für den nuklearen Import von Id2 und damit für ein weiteres Fortschreiten des Zellzyklus durch folgende Inhibierung der p21-Transkription (Matsumara et al., 2002). Der Mechanismus der p21-Hemmung durch Id2 ist nicht eindeutig geklärt. Jedoch befinden sich in der Promotorregion des p21-Gens mehrere E-Boxen und es konnte gezeigt werden, dass Id1 durch Inhibierung des bHLH-Transkriptionsfaktors E2A die p21-Expression hemmt (Prabhu et al., 1997).

Das Zusammenspiel der Id-Proteine und der Zellzyklusregulatoren scheint ein diffiziler Vorgang zu sein, der im Endeffekt Konkurrenzreaktionen zwischen einzelnen Proteinen darstellt.

So zeigt beispielsweise p21 eine konzentrationsabhängige Wirkung. In höherer Konzentration liegt p21 ungebunden vor, wodurch es Cyclin E/cdk2-Komplexe inhibiert. Als Folge können Substrate von cdk2-Komplexen, wie z.B. Id2, nicht phosphoryliert werden. Der nukleare Ausschluss von unphosphoryliertem Id2 verhindert die p21-Suppression durch Id2. In geringer Menge jedoch wird p21 von Cyclin D-abhängigen Komplexen gebunden. Aktivierte Cyclin E-cdk2-Komplexe phosphorylieren in diesem Fall Id2, wodurch die Transkription des p21-Gens inhibiert wird (Abb.1.5).

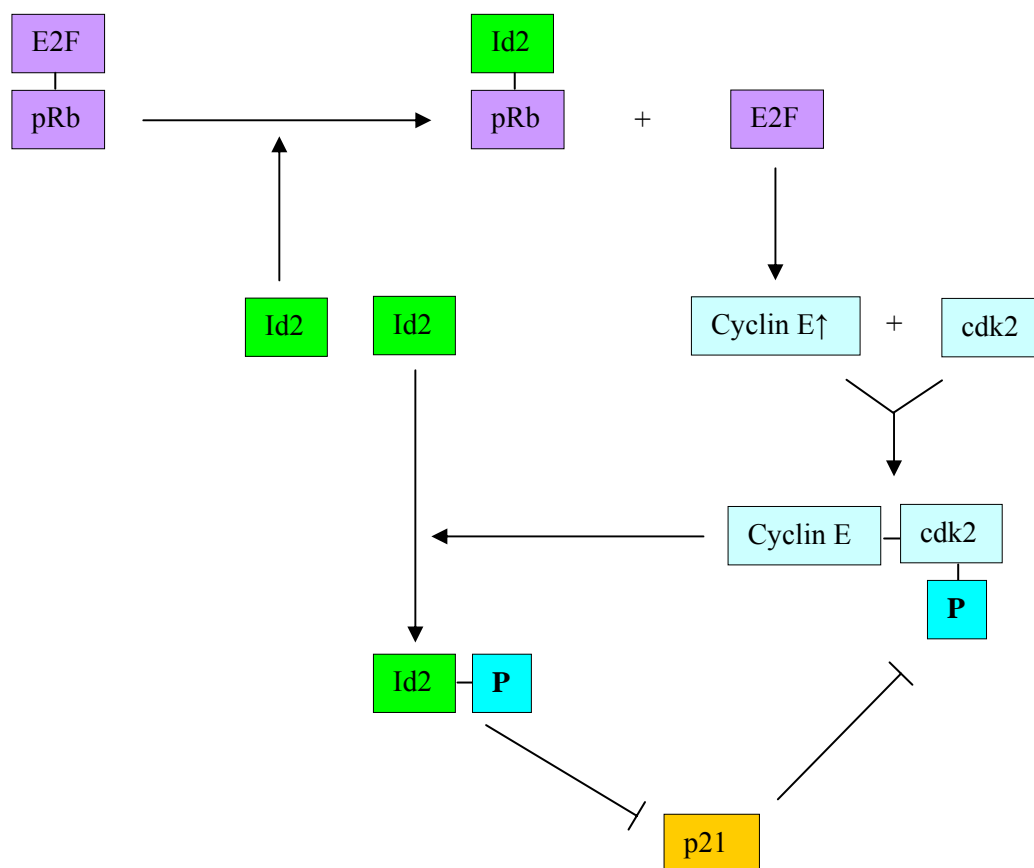


Abbildung 1.5: Einfluss von Id2 auf den Zellzyklus. Inhibierung der zellzyklussupprimierenden Wirkung von pRb in der frühen G₁-Phase. Freies E2F reguliert die Transkription von Cyclin E in der späten G₁-Phase. Konzentrationsabhängig wird entweder cdk2 durch p21 inhibiert oder aktiviertes cdk2 phosphoryliert Id2, wodurch eine weitere p21-Transkription gehemmt wird.

1.6 Der Einfluss von Id2 auf die Blutdruckregulierung

Hypertonie erhöht das Risiko der Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen und daraus resultierenden Folgeerkrankungen, wie Nierenschädigung, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Ong et al., 2007). Die Blutdruckregulierung in Säugetieren unterliegt vielfachen Mechanismen. So greift auf nervaler Ebene das vegetative Nervensystem regulierend ein. Das kardiovaskuläre System nimmt Einfluss über das Herz-Zeit-Volumen und über zelluläre Mechanismen der Endothel- und glatten Gefäßmuskulaturzellen. Eine hormonelle Steuerung durch Aldosteron wird renal über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vermittelt (Duprez, 2007). Aber auch Angiotensin II trägt entscheidend zur Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei (Mehta und Griendling, 2007).

Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass der HLH-Faktor Id2 eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Angiotensin II-vermittelten Hypertonie spielt. Zur Untersuchung des Einflusses von Id2 auf die Entwicklung von Bluthochdruck, wurden Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäuse zwei Wochen lang mit Angiotensin II behandelt. Während der ersten Tage entwickelten beide Gruppen auf Grund des postoperativen Stresses zwar einen transienten Blutdruckanstieg, interessant war jedoch der anschließend sinkende Blutdruck in Id2^{-/-}-Mäusen auf Normwerte trotz anhaltender Angiotensin II-Infusion. Im Gegensatz dazu stieg der Blutdruck von Id2^{+/-}-Mäusen signifikant an und blieb während des gesamten Prozesses auf hohem Niveau (s. Abb. 1.6 A). Da Id2 Einfluss nimmt auf die Entwicklung und Regulation des Immunsystems (s. 1.5.2), wurde als nächstes untersucht, ob die Wirkung von Id2 in Immunzellen eine Rolle spielt bei der Hypertonie-Entwicklung. Hierfür wurde Knochenmark von Id2^{+/-}- und Id2^{-/-}-Mäusen in Id2^{+/-}-Mäuse transplantiert. Nach zweiwöchiger Angiotensin II-Infusion stieg der Blutdruck in beiden Gruppen stark an. Im Gegensatz dazu zeigte der Blutdruck in Id2^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Knochenmark von Id2^{+/-}-Mäusen nach Angiotensin II-Infusion keine signifikanten Änderungen (s. Abb. 1.6 B). Ein Id2-vermittelter Einfluss über das Immunsystems auf die Blutdruckregulierung konnte somit ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurde der renale Einfluss auf die Blutdruckregulierung in Id2^{-/-}-Mäusen getestet. Hierfür wurden Nieren von Id2^{-/-}-Mäusen in Id2^{+/-}-Mäuse transplantiert. Auch in diesem Fall war der Blutdruck transplantiertter Mäuse vergleichbar mit dem Blutdruck von Id2^{+/-}-Mäusen und signifikant erhöht im Gegensatz zu Id2^{-/-}-Mäusen (s. Abb. 1.6 C). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Blutdruckregulierung nach Angiotensin II-Infusion nicht über renales Id2 vermittelt wird. Es stellte sich die Frage, welches System oder Gewebe Einfluss nimmt auf die Blutdruckregulierung in Id2^{-/-}-Mäusen.

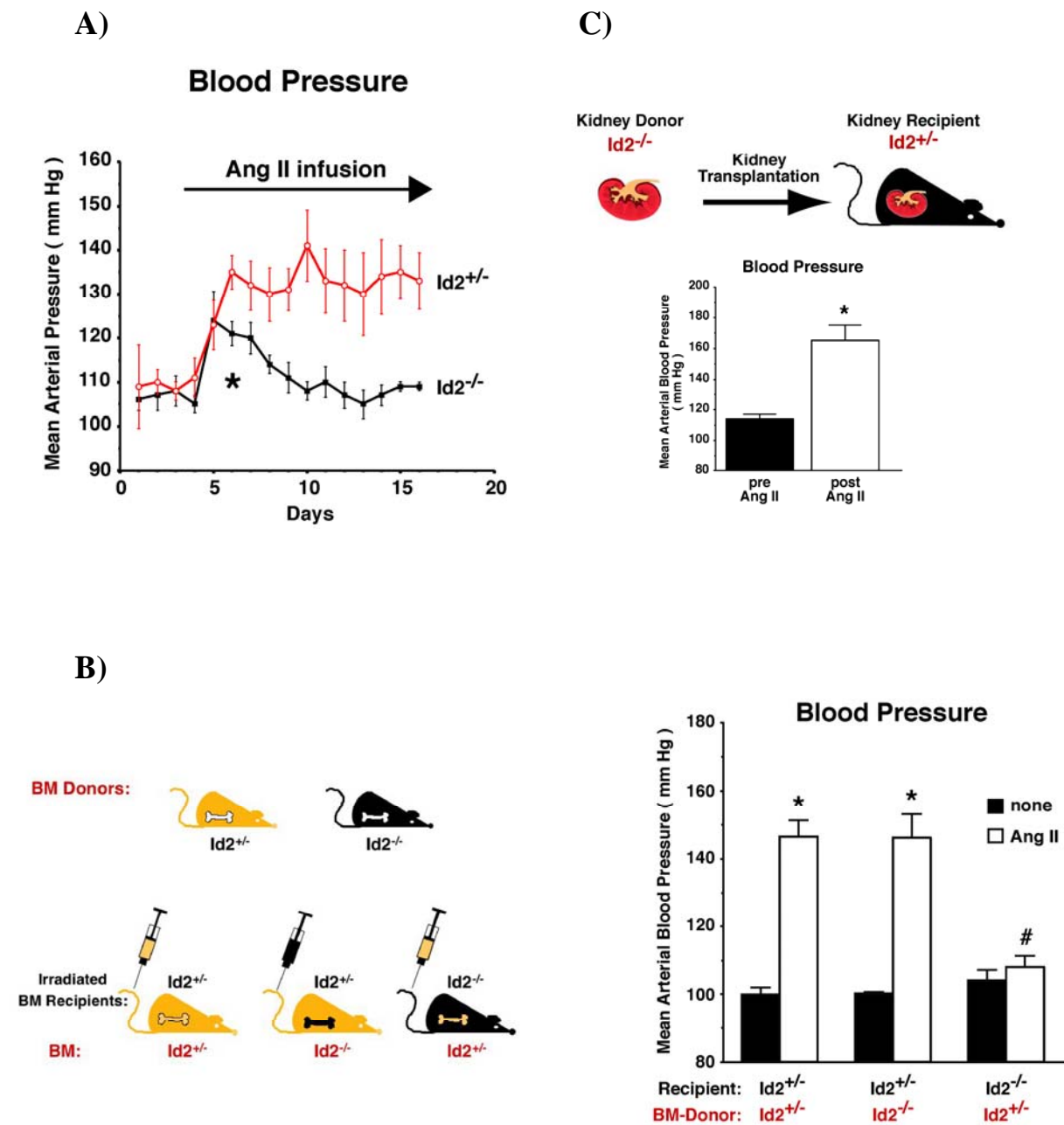


Abbildung 1.6: Blutdruckregulierung in $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen bei Angiotensin II-Infusion. **A)** 14-tägiger Verlauf der Blutdruckregulierung. Eine transiente Blutdruckerhöhung konnte in $Id2^{-/-}$ -Mäusen nicht Aufrecht erhalten werden. **B)** Blutdruckwerte nach 14-tägiger Angiotensin II-Infusion in knochenmarktransplantierten Mäusen. Studiendesign: Knochenmark von $Id2^{+/-}$ -Mäusen wurde in $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ -Mäusen transplantiert und Knochenmark von $Id2^{-/-}$ -Mäusen in $Id2^{+/-}$ -Mäuse. **C)** Blutdruckwerte nach 14-tägiger Angiotensin II-Infusion in nierentransplantierten Mäusen. Nieren von $Id2^{-/-}$ -Mäusen wurden in $Id2^{+/-}$ -Mäuse verpflanzt.

1.7 Problemstellung

Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Müller und Priv. Doz. Dr. Dechend zeigen, dass eine Angiotensin II-Behandlung in $Id2^{-/-}$ -Mäusen, im Gegensatz zu $Id2^{+/-}$ -Mäusen, keine anhaltende Hypertonie induziert. Es stellte sich die Frage, welches Blutdruck regulierende System diese protektive Wirkung in $Id2^{+/-}$ -Mäusen vermittelt. Knochenmark- und Nierentransplantationsexperimente ergaben, dass weder zirkulierende Immunzellen noch die Niere für die Angiotensin II-Resistenz verantwortlich sind. Glatte Gefäßmuskelzellen greifen auf Grund ihrer kontraktiven Eigenschaften direkt in die Blutdruckregulierung ein. Hieraus resultierte die Fragestellung, ob $Id2$ Einfluss nimmt auf das Verhalten glatter Gefäßmuskelzellen. In diesem Zusammenhang sollten das Genexpressionsprofil sowie das Proliferationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen von $Id2^{+/+}$ -, $Id2^{+/-}$ - und $Id2^{-/-}$ - Mäusen untersucht werden.

Weitere Studien des eigenen Arbeitskreises deuten darauf hin, dass kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Hypertonie und Nierenschäden, in C57BL/6-Mäusen experimentell schwieriger zu induzieren sind als in NMRI-Mäusen. Glatte Gefäßmuskelzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von Gefäßerkrankungen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie sensibel auf äußere Einflüsse reagieren. Es erfolgen Phänotypumwandlungen, die eine Änderung des Zellzyklusverhaltens verursachen. Es stellte sich daher die Frage, ob der genetische Hintergrund der beiden Mäusestämme NMRI- und C57BL/6 im Zusammenhang steht mit dem Proliferationsverhalten von glatten Gefäßmuskelzellen. Mit Hilfe von Proliferationsassays, durchflusszytometrischen Methoden und Western-Blot-Analysen sollten Änderungen des Zellzyklusverhaltens verifiziert werden.

Da sowohl in $Id2^{-/-}$ -Mäusen mit NMRI-Hintergrund als auch in C57BL/6-Mäusen kardiovaskuläre Erkrankungen schwerer zu induzieren sind als in $Id2^{+/-}$ - bzw. Wildtyp-Mäusen mit NMRI-Hintergrund, wurde vermutet, dass weitere Analogien zwischen $Id2^{-/-}$ - und C57BL/6-Mäusen bestehen. Zur Aufklärung möglicher mechanistischer Analogien von glatten Gefäßmuskelzellen der Vergleichsgruppen NMRI versus C57BL/6 und $Id2^{+/-}$ versus $Id2^{-/-}$ wurden Affymetrix-Chip-Versuche durchgeführt und analysiert. Gefundene Cluster an unterschiedlich exprimierten Genen wurden interpretiert und durch Real-time PCR-Untersuchungen bestätigt. Zur Validierung der angezeigten phänotypischen Unterschiede sollten entsprechende Methoden etabliert werden. Zur Darstellung des antiseneszenten Phänotyps in glatten Gefäßmuskelzellen von $Id2^{-/-}$ -Mäusen wurde die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und morphologische Unterschiede wurden immunocytochemisch nachgewiesen.