

**Analyse der *in vivo*-Funktion des
Transkriptionsfaktors SRF
in adulten Glattmuskelzellen
der Maus**

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Meike Angstenberger

aus Müllheim

vorgelegte

DISSERTATION

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Oktober 2007

Dekan:.....Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter:.....Prof. Dr. A. Nordheim

2. Berichterstatter:.....Prof. Dr. R. Reuter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der “Serum Response Factor” (SRF)	1
1.1.1	Das <i>Srf</i> -Gen	1
1.1.2	Strukturelle Eigenschaften von SRF	1
1.1.3	SRF- <i>Splice</i> -Varianten	3
1.1.4	Bindung von SRF an DNA	4
1.1.5	SRF-Partner-Proteine	5
1.1.6	Regulation der SRF-Aktivität	8
1.1.6.1	Signalwege zur SRF-Aktivierung	8
1.1.6.1.1	Der TCF-abhängige Signalweg	9
1.1.6.1.2	Der TCF-unabhängige Signalweg	10
1.1.6.1.3	Ausschließlichkeit der Bindung von TCFs und MAL an SRF-DNA-Komplexe	12
1.1.6.2	Posttranslationale Modifikationen von SRF	13
1.1.7	Zelluläre und biologische Funktionen von SRF	14
1.1.7.1	Regulation der Transkription	15
1.1.7.2	Zellproliferation	15
1.1.7.3	Differenzierung und Entwicklung	16
1.1.7.4	Neuronale Organisation	16
1.1.7.5	Organisation des Aktin-Zytoskeletts und Zellmigration	17
1.1.7.6	Muskeldifferenzierung und Muskelfunktion	18
1.2	Das Glattmuskelgewebe	20
1.2.1	Allgemeines	20
1.2.2	Ultrastruktur der Glattmuskelzelle	21
1.2.3	Heterogenität und phänotypische Plastizität von Glattmuskelzellen	22
1.2.4	Kontraktion der Glattmuskelzellen	25
1.2.4.1	Grundlagen der Glattmuskelkontraktion	25
1.2.4.2	Kontraktion der Glattmuskulatur des Gastrointestinaltraktes	27
1.2.4.2.1	Das enterische Nervensystem	27
1.2.4.2.2	Interstitielle Zellen von Cajal (ICCs)	28
1.2.4.2.3	Signalwege zur Kontraktion der Glattmuskulatur des Intestinaltraktes	28
1.2.4.2.4	Kalzium-abhängige, initiale Kontraktion	29
1.2.4.2.5	Kalzium-unabhängige, anhaltende Kontraktion	30
1.3	Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/<i>loxP</i>-Systems	31
1.3.1	Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinasen	34
1.4	Der Mausstamm mit “geflochten” <i>Srf</i>-Allelen: <i>Srf</i>^{flex1}	35
1.5	Zielsetzung der Arbeit	36
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Versuchstiere	37
2.1.1	Die <i>Srf</i> ^{flex1} -Mauslinie	37
2.1.2	Die Glattmuskel-spezifische Cre-Mauslinie [<i>SM22-CreER</i> ^{T2} (<i>ki</i>)]	38
2.1.3	Genotyp-basiertes Zuchtschema zur Generierung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer, Tamoxifen-induzierbarer <i>Srf</i> -Deletion	39
2.1.4	Haltung und Zucht der Mäuse	39

2.2 Generierung Glattmuskel-spezifischer Srf-knockout-Mäuse	40
2.2.1 Präparation und Verabreichung von Tamoxifen.....	40
2.3 Analyse genetisch veränderter Mäuse	41
2.3.1 Genotypisierung genetisch veränderter Mäuse mittels PCR.....	41
2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Gewebe.....	41
2.3.1.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Gewebelysaten	42
2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	42
2.3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung transgener Mauslinien.....	43
2.3.1.4.1 Genotypisierung des Srf-Lokus.....	44
2.3.1.4.2 Genotypisierung des SM22 α -Lokus	45
2.3.1.5 Rekombinationsanalyse des Srf ^{flex1} -Lokus mittels PCR	46
2.3.1.5.1 PCR-Analyse mit Primerpaar Lw-lox und Bw-3pri	46
2.3.1.5.2 PCR-Analyse mit Primern Srf-KO8-fw, Srf-KO8-bw und Lox2	47
2.3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	49
2.3.2 Analyse von RNA aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen.....	51
2.3.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen	51
2.3.2.1.1 Stabilisierung von RNA aus Gewebe mittels RNAlater.....	51
2.3.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus RNAlater-stabilisierten Geweben mittels des RNeasy [®] -Kits (QIAGEN)	51
2.3.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herz, Muskel und Haut mittels des RNeasy [®] -Kits (QIAGEN)	52
2.3.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus primären Glattmuskelzellen mittels des RNAeasy [®] -Kits (QIAGEN).....	53
2.3.2.2 DNase I-Verdau von RNA-Lösungen.....	53
2.3.2.3 cDNA-Synthese	54
2.3.2.4 Semi-quantitative RT-PCR	55
2.3.3 Analyse von Proteinen aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen.....	58
2.3.3.1 Proteinisolierung aus Gewebe	58
2.3.3.2 Proteinisolierung aus primären Glattmuskelzellen	59
2.3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford	59
2.3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.3.3.5 Western Blot-Analyse	63
2.3.3.5.1 Quantifizierung transferierter Proteine.....	65
2.3.4 Analyse primärer Glattmuskelzellen.....	65
2.3.4.1 Isolierung und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen.....	65
2.3.4.2 <i>In vitro</i> -Tamoxifen-Behandlung primärer Glattmuskelzellen.....	68
2.3.4.3 Untersuchung der Viabilität von Glattmuskelzellen.....	68
2.3.4.4 MTT-Proliferationsanalyse.....	69
2.3.4.5 Immunfluoreszenz an primären Glattmuskelzellen	70
2.3.4.6 Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Test.....	72
2.3.5 Röntgenkontrast-Computertomographie zur Analyse der Intestinalmotilität ..	73
2.3.6 Isometrische Kraftmessungen an intakten Organen	74
2.3.7 Histologische Färbungen	75
2.3.7.1 Anfertigung von Gewebe-Paraffinschnitten.....	75
2.3.7.1.1 Rehydratisierung von Paraffin-Gewebeschnitten	76
2.3.7.2 Färbung nach Hämatoxylin und Eosin.....	76
2.3.7.3 Immunhistologische Färbungen.....	77
2.4 Synthetische Oligonukleotide	80
2.4.1 Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktion.....	80
2.4.2 Oligonukleotide für semi-quantitative-RT-PCR	81
2.5 Antikörper	82
2.5.1 Primäre Antikörper	82
2.5.2 Sekundäre Antikörper	83

3	ERGEBNISSE	85
3.1	Zucht der <i>Srf^{flex1}</i> -Mauslinie	85
3.2	Zucht der Glattmuskel-spezifischen Cre-Mauslinie: <i>SM-CreER^{T2}</i>	86
3.3	Generierung der Tamoxifen-induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mauslinie.....	87
3.3.1	Genotypen der verwendeten Versuchs- und Kontrolltiere	88
3.4	Analyse der Glattmuskel-spezifischen SRF- <i>knockout</i> -Mäuse.....	88
3.4.1	Rekombinationsanalysen in verschiedenen Organen mittels PCR.....	88
3.4.2	Expressionsanalyse des <i>Srf</i> -Lokus in verschiedenen Organen.....	90
3.4.2.1	SRF-Expressionsanalyse anhand immunhistologischer Färbungen an Dün- und Dickdarmgewebe.....	92
3.4.3	Phänotypische und funktionelle Analysen der Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Tiere	94
3.4.3.1	Phänotypische Veränderungen der Glattmuskel-spezifischen <i>Srf-knockout</i> -Mäuse	94
3.4.3.1.1	<i>Einfluss des Genotyps, der "leakiness" und des genetischen Hintergrundes der Mauslinie innerhalb des SM-CreER^{T2}-Rekombinationssystems</i>	96
3.4.3.2	Funktionelle Analysen anhand Glattmuskel-spezifischer SRF-defizienter Tiere.....	98
3.4.3.2.1	<i>Darstellung der intestinalen Motilität mittels Röntgenkontrast-Computertomographie (CT)</i>	99
3.4.3.2.2	<i>Isometrische Kraftmessungen an intakten Intestinalgeweben</i>	102
3.4.3.2.2.1	Spontanaktivität der Längsmuskulatur von Dün- und Dickdarm	102
3.4.3.2.2.2	Carbachol-induzierte Kontraktionen der Muskulatur des Dün- und Dickdarms und von der Blase	105
3.5	Analyse von SRF-defizienten, adulten, primären Glattmuskelzellen	108
3.5.1	Isolierung und Kultivierung von primären Glattmuskelzellen aus der Aorta und aus dem Dickdarm.....	108
3.5.2	<i>In vitro</i> -Induktion der Cre-vermittelten Rekombination des <i>Srf^{flex1}</i> -Lokus in primären Glattmuskelzellen durch Tamoxifen.....	109
3.5.3	Zellbiologische und molekularbiologische Analysen anhand SRF-defizienter Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm.....	112
3.5.3.1	Zellmorphologische Veränderungen der SRF-defizienten Glattmuskelzellen	114
3.5.3.2	Analyse der Viabilität SRF-defizienter, adulter Glattmuskelzellen	115
3.5.3.3	Analyse der Proliferation der SRF-depletierten adulten Glattmuskelzellen.....	116
3.5.3.4	Erhöhte Seneszenz in SRF-defizienten adulten Glattmuskelzellen.....	117
3.5.3.5	Auswirkungen der SRF-Defizienz auf das Aktin-Zytoskelett adulter Glattmuskelzellen aus dem Darm	120
3.5.4	Expressionsanalysen von Glattmuskel-spezifischen und <i>IEG</i> -SRF-Zielgenen in SRF-defizienten Glattmuskelzellen und in verschiedenen Organen Glattmuskel-spezifischer <i>Srf-knockout</i> -Mäuse.....	123

4	DISKUSSION.....	127
4.1	Konditional SRF-defiziente Mäuse – Möglichkeiten und Grenzen	127
4.2	Die Funktion von SRF in Muskelgeweben	128
4.3	Analyse der <i>in vivo</i>-Funktion von SRF im Glattmuskel-gewebe adulter Mäuse.....	129
4.3.1	Generierung Glattmuskel-spezifischer, SRF-defizienter Mäuse.....	129
4.3.2	Das Problem der “ <i>leakiness</i> ” des CreER ^{T2} -Rekombinationssystems.....	131
4.3.3	Das p36-Protein	132
4.3.4	Funktionelle Analyse der Glattmuskel-spezifischen <i>Srf-knockout</i> Mäuse	133
4.3.4.1	Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz verursacht einen letalen “ <i>Ileus paralyticus</i> ”.....	133
4.3.5	Die Rolle von SRF in adulten Glattmuskelzellen.....	135
4.3.5.1	Die entscheidene Funktion von SRF bei der Aufrechterhaltung des Glattmuskel-Phänotyps	136
4.3.5.2	SRF – ein wichtiger Regulator zur Aufrechterhaltung des Aktin-Zytoskeletts adulter Glattmuskelzellen.....	138
4.3.5.3	SRF – ein entscheidender Faktor zur Inhibierung zellulärer Seneszenz?	140
4.4	Glattmuskel-spezifische <i>Srf-knockout</i>-Mäuse: Mausmodell für intestinale Erkrankungen?	142
5	ZUSAMMENFASSUNG	145
6	SUMMARY	147
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149
8	LITERATURVERZEICHNIS	155
8.1	Zitierte Publikationen	155
8.2	Eigene Publikationen	168
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	169
10	ACKNOWLEDGEMENTS	171
11	CURRICULUM VITAE.....	173

1 Einleitung

1.1 Der “Serum Response Factor” (SRF)

1.1.1 Das *Srf*-Gen

Der “*Serum Response Factor*” (SRF) ist im humanen Genom auf Chromosom *6p21.1*, im murinen Genom auf Chromosom *17 C* kodiert, hat eine Länge von 10324 Basenpaaren (human) bzw. 9323 Basenpaaren (murin) und enthält 7 Exons (**Abb. 1.1**) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

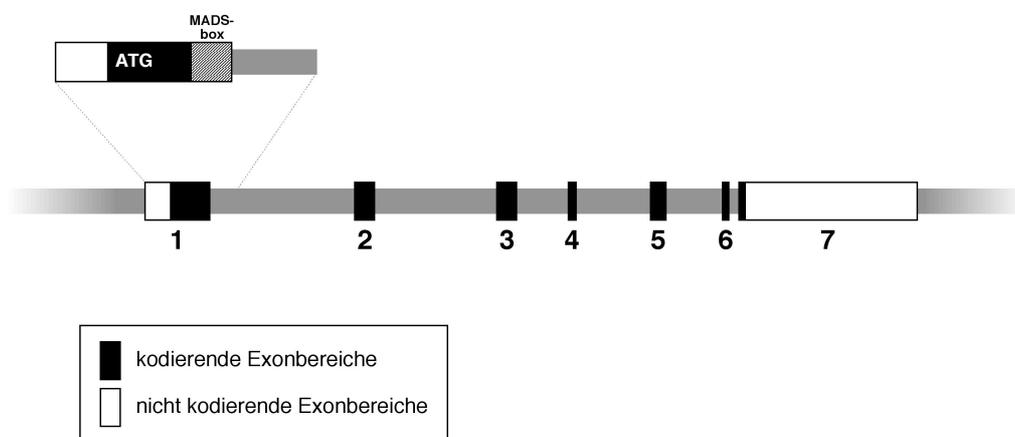


Abb. 1.1: Graphische Darstellung des *Srf*-Gens

Gezeigt ist der komplette *Srf*-Genlocus, bestehend aus sieben Exons. Schwarze Balken stellen kodierende, weiße Balken nicht-kodierende Exonbereiche dar. (ATG) Translationsstart.

Die transkribierte murine mRNA weist eine Länge von 4093 bp auf: Exon 1 (1-835), Exon 2 (836-1102), Exon 3 (1103-1364), Exon 4 (1365-1484), Exon 5 (1485-1676), Exon 6 (1677-1753) und Exon 7 (1754-4093) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.1.2 Strukturelle Eigenschaften von SRF

Der “*Serum Response Factor*” stellt einen phylogenetisch konservierten, kernständigen Transkriptionsfaktor dar, der zur Familie der MADS-Box-Proteine gehört (Norman and Treisman 1988). Die Bezeichnung MADS-Box leitet sich aus den Initialen der ersten identifizierten Proteine der Familie ab: MCM1 und Arg80 (in *S.cerevisiae*), Agamous

und Deficiens (in Pflanzen) und SRF (in höheren Organismen). Die MADS-Box stellt ein konserviertes Motiv innerhalb der DNA-Bindungs-Domäne dieser Proteinfamilie dar und umfasst 56 Aminosäuren. Der hohe Konservierungsgrad der MADS-Box zeigt sich in neun Aminosäuren, welche in allen bisher bekannten Mitgliedern der MADS-Box-Proteinfamilie identisch sind, wobei neun weitere Aminosäuren höchst konserviert scheinen (Shore and Sharrocks 1995).

Das humane SRF-Protein besteht aus 508, das murine SRF-Protein aus 504 Aminosäuren, welche sich in multiple funktionelle Domänen gliedern lassen (**Abb. 1.2**): Im aminoterminalen Bereich zwischen Aminosäure 133 und 168 befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, welche den aminoterminalen Bereich der konservierten MADS-Box (AS 142 bis 198) beinhaltet. Die für die Dimerisierung von SRF verantwortliche Domäne umfasst AS 168 bis 222 und schließt den carboxyterminalen Bereich der MADS-Box ein (Norman et al. 1988; Sharrocks et al. 1993). Eine Sequenz von vier basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von SRF (AS 95 bis 100; **-RRGLKR-**) fungiert als nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die für den Import von SRF in den Nukleus essentiell ist (Gauthier-Rouviere et al. 1995). Die Transaktivierungsdomäne (TAD) ist in der C-terminalen Region des SRF-Proteins lokalisiert und umfasst den Bereich zwischen AS 339 und 508, welcher eine bedeutende Rolle bei einer transkriptionellen Aktivierung spielt (Johansen and Prywes 1993).

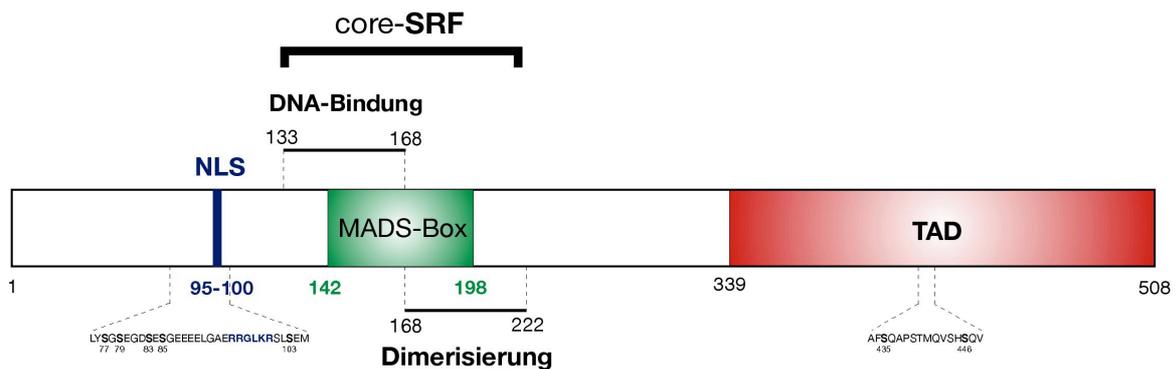


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen “Serum Response Factors” mit seinen funktionellen Proteindomänen

(NLS, *Nuclear Localisation Sequence*) Kernlokalisierungssignal; (TAD) Transaktivierungsdomäne. Das sogenannte “core-SRF” vermittelt Dimerisierung, DNA-Bindung und TCF-Interaktion. Phosphorylierungsstellen sind hervorgehoben (**S**) und mit der Angabe der Aminosäureposition markiert.

1.1.3 SRF-*Splice*-Varianten

In Mensch und Maus sind bis zum heutigen Zeitpunkt sieben alternative Isoformen des SRF-Proteins identifiziert, die Gewebe-spezifisch exprimiert werden und deren Herkunft durch alternatives *Splicen* der *Srf*-mRNA zu erklären ist (**Abb. 1.3**) (Kemp and Metcalfe 2000; Zhang et al. 2007).

In der Maus betrifft differentielles *Splicing* die Exons 3, 4 und 5 in verschiedenen Kombinationen, wobei die SRF-M-Isoform, welcher auf RNA-Ebene das Exon 5 fehlt, als dominant-negative Mutante fungiert, was auf eine Deletion der C-terminalen Transaktivierungsdomäne und folglich auf eine unterdrückte SRF-abhängige Transkription zurückzuführen ist (Belaguli et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die SRF-M-Isoform in allen drei Muskelgewebetypen (Herz-, Skelett- und Glattmuskel) adulter Mäuse mit vergleichbarem Niveau wie die SRF-L-Isoform (*“full-length”*-SRF) exprimiert ist. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass muskelspezifische Genexpression durch das relative Verhältnis zwischen SRF-L- und SRF-M-Isoform reguliert werden könnte (Kemp and Metcalfe 2000). Die SRF-S-Isoform zeichnet sich durch das Fehlen der Exons 4 und 5 aus und wurde bisher nur in der Aorta und in embryonalen Lysaten nachgewiesen. Die kürzeste SRF-Isoform stellt SRF-I dar, welche aus Exon 1, 2, 6 und 7 besteht und nur in Embryonen zu finden ist. Das resultierende Protein besitzt eine unveränderte DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, zeichnet sich aber durch das Fehlen der Transaktivierungsdomäne als mögliche dominant-negative SRF-Isoform aus (Kemp and Metcalfe 2000).

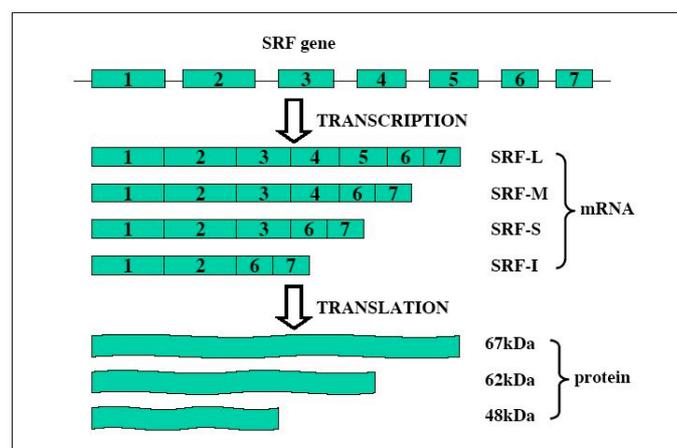


Abb. 1.3: Alternative *Splice*-Varianten von SRF

Graphische Darstellung der SRF-Genstruktur mit resultierenden *Splice*-Varianten. Vier mRNA- und drei Protein-Isoformen sind bis zum heutigen Zeitpunkt identifiziert (aus Chai and Tarnawski 2002).

In humanem Gewebe konnten drei zusätzliche SRF-Isoformen, SRF- $\Delta 3$, SRF- $\Delta 3,4$ und SRF- $\Delta 3,4,5,6$ identifiziert werden, wobei die in der Maus beschriebene SRF-M- und SRF-I-Isoform ebenfalls nachgewiesen wurden (Zhang et al. 2007). Transkripte der SRF- $\Delta 3$ - und der SRF- $\Delta 3,4$ -Isoform konnten im humanen Herz- und Skelettmuskel bzw. im humanen Dickdarmgewebe gefunden werden. Aufgrund eines vorgezogenen Terminationssignals (*premature termination codon*, PTC) werden diese beiden verkürzten mRNAs jedoch abgebaut (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD), weshalb eine Expression dieser beiden SRF-Isoformen auf Proteinebene nicht nachzuweisen ist. Die SRF- $\Delta 3,4,5,6$ -Isoform, deren Transkript ebenfalls im Dickdarmgewebe gefunden wurde, scheint dagegen translatiert zu werden. Die Funktionen dieser drei neu identifizierten SRF-Isoformen ist bisher nicht geklärt. Das alternative *Splicing* und der regulierte Abbau der verkürzten *Srf*-mRNAs scheinen jedoch eine bedeutende Funktion bei der Regulation der SRF-Genexpression, und damit bei der Regulation SRF-abhängiger Zielgene zu spielen (Zhang et al. 2007).

1.1.4 Bindung von SRF an DNA

SRF bindet mittels der "core"-SRF-Region als Homodimer über ein konserviertes Sequenzmotiv an DNA (**Abb. 1.1**) (Pellegrini et al. 1995; Mo et al. 2001; Huet et al. 2005).

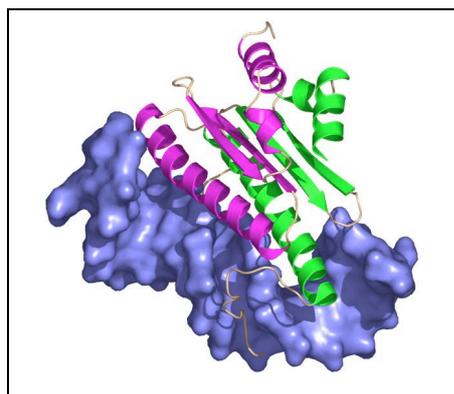


Abb. 1.4: Der SRF-“core“-DNA-Komplex

Gezeigt ist das an die DNA-Doppelhelix (blau) gebundene SRF-Homodimer (SRF-“core“-Region, in pink und grün dargestellt) (Quelle: www.bio.cam.ac.uk/~lp212/).

Die Konsensussequenz [CC(A/T)₆GG], auch als CArG-Box bezeichnet, wurde ursprünglich in dem *cardiac* α -Aktin-Promotor charakterisiert und ist eine zentrale Struktur des strukturell und funktionell äquivalenten "serum response element" (SRE) in dem humanen *c-fos* Promotor (Gilman et al. 1986; Minty and Kedes 1986; Prywes and Roeder 1986; Treisman 1986). Zum heutigen Zeitpunkt sind bereits mehr als 200 Gene identifiziert, die eine CArG-Box in ihren Promotorregionen aufweisen, darunter "immediate early"-Gene, wie z. B. *c-fos*, *egr-1*, *egr-2*, Muskel-spezifische Gene, wie z.B. *cardiac* und *SM* α -*Actin*, β -*Actin*, *SM22 α* etc. und neuronale Gene, wie z. B. *nur77* oder *nurr1* (Chai and Tarnawski 2002). Während einige SRF-regulierte Gene nur eine CArG-Box in deren Promoterregion aufweisen (z. B. *c-fos*, *telokin*), enthalten viele andere Zielgene zwei oder mehrere CArG-Boxen (z. B. *SM* α -*actin*, *SM22 α*).

Die Bindungsaffinität von SRF ist primär von den flankierenden G- und C- Nukleotidpaaren der CArG-Box abhängig, wohingegen das zentrale A/T-reiche Segment die Bindung von SRF unwesentlich beeinflusst (Huet et al. 2005). Es lassen sich somit zwei Klassen von CArG-Box-Elementen unterscheiden: Elemente mit vollständigem (A/T)₆-Konsensussegment werden als "invariante", solche mit AT→GC-Transitionen als "variante" CArG-Boxen bezeichnet (Sobue et al. 1999). Austausch von Nukleotiden innerhalb der CArG-Box-Sequenz kann somit die Effizienz und die Spezifität SRF-abhängiger Transkription beeinflussen (Hautmann et al. 1998). CArG-Boxen, welche eine hohe Affinität aufweisen, scheinen permanent von einem SRF-Dimer gebunden zu sein, wodurch die Genexpression hauptsächlich durch Mechanismen, die nach der Bindung von SRF an die DNA stattfinden, wie z. B. Interaktion mit akzessorischen Proteinen, reguliert zu sein scheint (Treisman 1994).

1.1.5 SRF-Partner-Proteine

Über Interaktionen mit unterschiedlichen Partnerproteinen an verschiedenen Promotoren erfüllt SRF Zelltyp-spezifische Regulationen unterschiedlicher Gene. Dabei spielt die Zusammensetzung der flankierenden Sequenzen der CArG-Box eine entscheidende Rolle und legt fest, mit welchen spezifischen Interaktionspartner(n) SRF interagiert.

Als erste SRF-Interaktionspartner wurden die "ternary complex factors" (TCFs) entdeckt (**Abb. 1.5**) (Shaw et al. 1989). Die TCFs gehören zu der Familie der Ets-Proteine, die

eine ETS-DNA-Bindungsdomäne am N-Terminus aufweisen. In Säugetierzellen sind drei dieser TCFs beschrieben: **Elk-1** (Hipskind et al. 1991; Dalton et al. 1993), **SAP-1** (Elk-4) (Dalton and Treisman 1992; Dalton et al. 1993) und **Net** (Elk-3/SAP-2) (Dalton et al. 1993; Giovane et al. 1994).

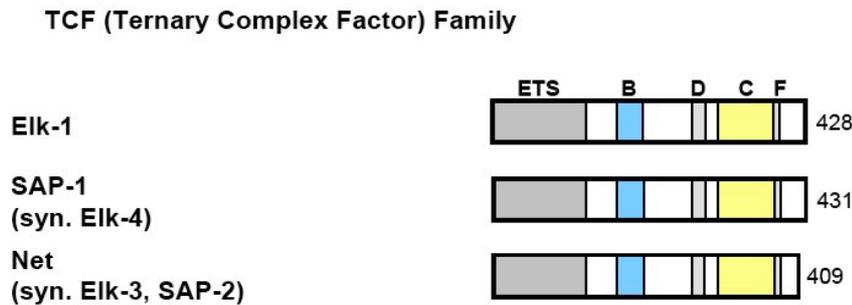


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Ternary Complex Factor (TCF)-Familie

(ETS) DNA-Bindungsdomäne, (B) SRF-Interaktionsdomäne, (C) Transkriptions-Aktivierungsdomäne, (D) und (F) Bindungsstellen für die MAP-Kinase. Die Nummern geben die Aminosäurelänge an (aus Posern and Treisman 2006).

Die Interaktion der TCFs mit SRF erfolgt über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem SRF-Dimer und der für die TCF charakteristischen Bindungsdomäne (B-Box) (**Abb. 1.6**) (Buchwalter et al. 2004).

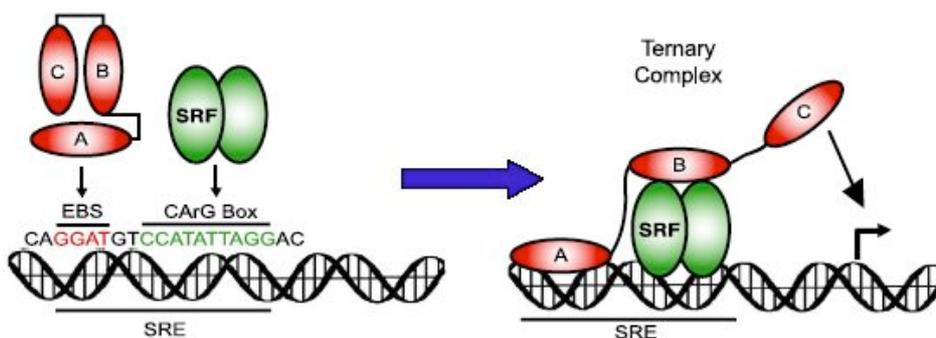


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Ternär-Komplex Bildung am c-fos Promotor.

Das SRF-Homodimer (grün) bindet an die CArG-Box während die A-Box (Ets-Domäne; rot) die Ets-Bindestelle (EBS) der DNA bindet. Über die B-Domäne des TCF erfolgt die Protein-Protein-Wechselwirkung mit der MADS-Box von SRF (aus Buchwalter, Gross et al. 2004).

Die drei unterschiedlichen TCFs stellen unterschiedlich bevorzugte Substrate für die verschiedenen MAP-Kinasen dar. So wird z. B. Elk-1 von den ERKs, den JNKs und auch von p38 bevorzugt phosphoryliert, wohingegen SAP-1 ein weniger bevorzugtes Substrat für die JNKs darstellt. Somit kann je nach Zelltyp, Stimulus und Signalkaskade die Regulation der unterschiedlichen TCFs variieren (Treisman 1994; Whitmarsh et al. 1997).

Eine zweite wichtige Gruppe von SRF-Interaktionspartnern umfasst die Mitglieder der "Myocardin-Related Transcription Factors" (MRTFs): **Myocardin**, **MRTF-A** (MAL; MKL1, *megakaryoblastic leukemia 1*) und **MRTF-B** (MKL2; MAL16) (**Abb. 1.7**), die zusammen mit SRF die Transkription von Genen aktivieren, die für zytoskelettale Organisation der Zelle und Muskelzellendifferenzierung verantwortlich sind. Die Expression von Myocardin, dem Namensgeber dieser SRF-Koaktivatoren, ist auf Herz- und Glattmuskelgewebe beschränkt, während MAL/MRTF-A und MRTF-B ubiquitär exprimiert sind (Ma et al. 2001; Mercher et al. 2001; Wang et al. 2001; Wang et al. 2002; Wang et al. 2003). Die Aktivität von MAL und MRTF-B wird durch einen neuen, durch Rho-GTPasen und globuläres Aktin kontrollierten Signalweg reguliert (siehe Abschnitt 1.1.6.1.2), während Myocardin SRF konstitutiv zu aktivieren scheint (Wang et al. 2001; Cen et al. 2003; Miralles et al. 2003; Wang et al. 2003; Pipes et al. 2006).

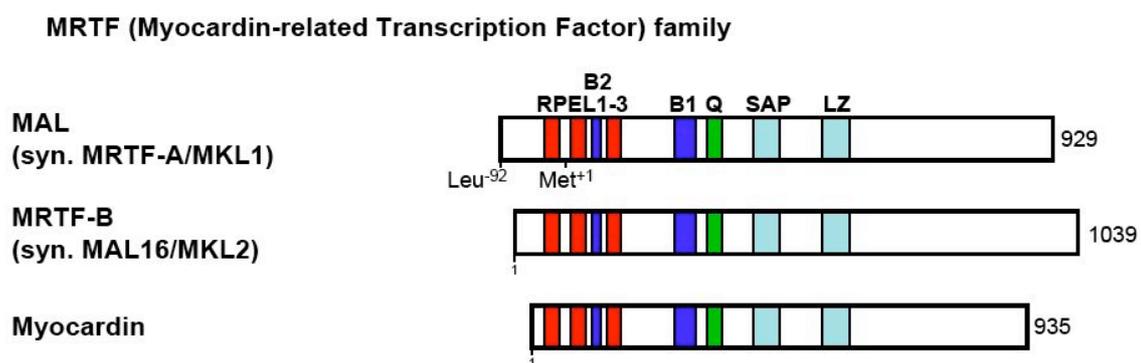


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der "Myocardin-Related Transcription Factor" (MRTF)-Familie.

(RPEL 1-3) Aktin-Bindemotive mit der Konsensussequenz RPxxxEL, (B1) und (B2) basische Regionen, (Q) Glutamin-reiche Domäne, (SAP) SAP-Domäne, (LZ) Leucin-Zipper. Die Nummern geben die Aminosäurelänge an (aus Posern and Treisman 2006).

Neben den TCFs und den MRTFs existiert eine Vielzahl weiterer SRF-Interaktionspartner, die für eine Regulation von SRF verantwortlich sind. Zu der Gruppe der aktivierende Kofaktoren zählen die Mitglieder der GATA-Proteinfamilie der "Zink-Finger"-Transkriptionsfaktoren und die Nkx2.5-Familie der Homeodomäne-Proteine (Chen and Schwartz 1996; Belaguli et al. 2000; Sepulveda et al. 2002). Eine weitere SRF-Kofaktor-Familie stellt die CRP-Familie der "*cysteine-rich LIM-only-proteins*" dar, welche die Bildung von GATA-SRF-Komplexen erleichtert und dadurch Muskelzellendifferenzierung bewirkt (Chang et al. 2003). Die Gruppe der inhibitorischen Kofaktoren umfasst das SRF-Zielgen *Fhl2*, das der Rho/MAL-abhängigen Aktivierung von SRF entgegenwirkt (Philippart et al. 2004), sowie das Homeodomäne-Protein HOP, welches die Bindung von SRF an DNA verhindert (Chen et al. 2002; Shin et al. 2002). Es existiert eine Vielzahl weiterer SRF-Interaktionspartner, deren Funktionen in Bezug auf SRF noch nicht vollständig geklärt sind. Zusätzlich bedarf das Zusammenspiel verschiedener Signale und Kofaktoren für die differentielle Aktivität SRF-abhängiger Transkription in verschiedenen Zelltypen der Aufklärung.

1.1.6 Regulation der SRF-Aktivität

1.1.6.1 Signalwege zur SRF-Aktivierung

Die Aktivierung SRF-vermittelter Transkription kann grundsätzlich über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Man unterscheidet den "*Ternary-Complex-Factor*" (TCF)-abhängigen Signalweg, welcher über die Ras-Raf-MAPK-Erk-Signalkaskade stattfindet, und einen TCF-unabhängigen Signalweg, in dem die Rho-Familie der GTPasen involviert sind (Johansen and Prywes 1994; Hill et al. 1995).

1.1.6.1.1 Der TCF-abhängige Signalweg

Der TCF-abhängige Signalweg, der zur Phosphorylierung der TCFs und SRF führt, wird von der Plasmamembran zum Zellkern durch unterschiedliche Proteinkaskaden vermittelt (Hill et al. 1993; Janknecht et al. 1993; Marais et al. 1993; Zinck et al. 1995). Eine bedeutende Stellung nehmen die MAP-Kinase-Kaskaden ein. Die MAP-Kinasen, die zu der Gruppe der Serin/Threonin-Proteinkinasen zählen, teilen sich funktionell in eine hierarchische Abfolge von Proteinkinasen ein (**Abb. 1.8**).

Man unterscheidet drei MAPK-Signalkaskaden: den ERK- (*extracellular-signal regulated kinase*), den JNK- (*Jun N-terminal kinase*) und den p38- (*stress-activated protein kinase*) Signalweg (Cahill et al. 1996). Die Aktivierung der TCFs durch die unterschiedlichen MAPK-Signalwege ist nicht isoliert voneinander zu betrachten, vielmehr findet eine Kommunikation und Kooperation der Proteinkomponenten der drei Signalwege statt (Frost et al. 1997).

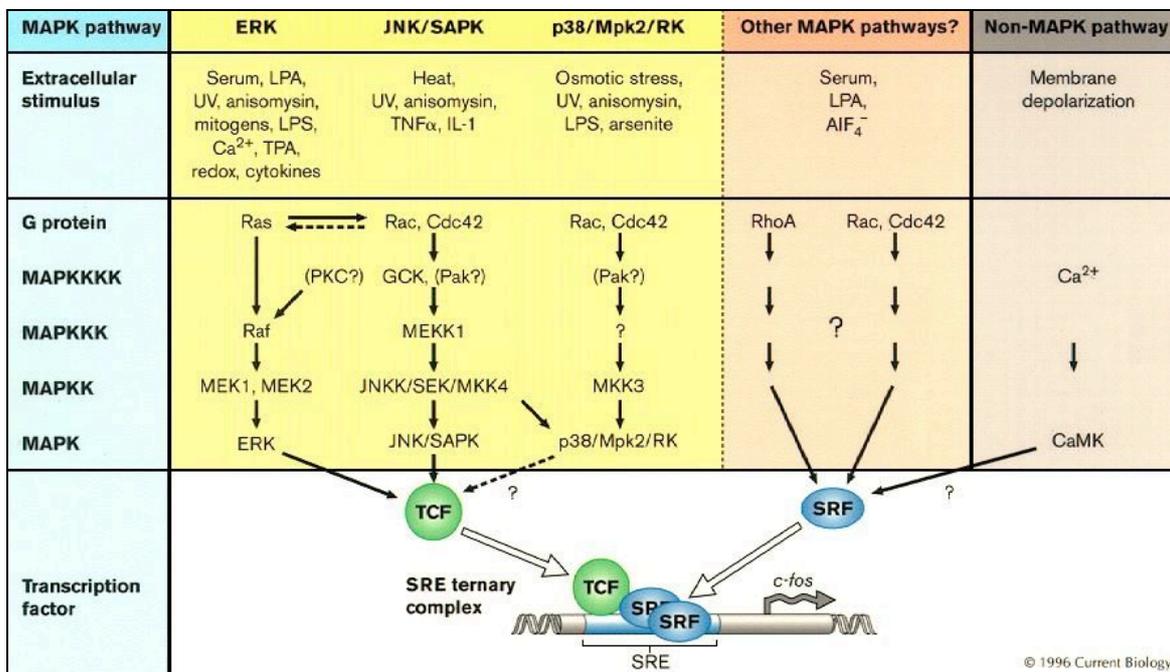


Abb. 1.8: Signaltransduktionswege zur Aktivierung von SRF

Gezeigt sind unterschiedliche Signalkaskaden zur SRF-Aktivierung über TCF-abhängige und TCF-unabhängige Mechanismen. Fragezeichen und unterbrochene Pfeile heben zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Schemas bestehende Unklarheiten hervor. (aus Cahill, Janknecht et al. 1996).

1.1.6.1.2 Der TCF-unabhängige Signalweg

Eine TCF-unabhängige Aktivierung von SRF wird durch die Rho-Familie von GTPasen (Rho, Rac und Cdc42) reguliert, die mit Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts einhergeht. RhoA ist an der Kontrolle diverser zytoskelettaler Prozesse beteiligt, wie z.B. an der Bildung fokaler Adhäsionskontakte, der Zytokinese und an der Aktin-Polymerisation. Ergebnisse haben einen engen Zusammenhang zwischen SRF-Aktivierung von Zielgenen und Aktin-Polymerisation belegt. So wurde die Aktin-regulierende LIM-Kinase als effektiver Aktivator von SRF beschrieben, deren bisher einzige Funktion darin besteht, Cofilin, kleine, Aktin-bindende Proteine, welche eine Dissoziation des filamentösen Aktins (F-Aktin) in globuläres Aktin (G-Aktin) begünstigen, zu phosphorylieren und somit zu inaktivieren (Arber et al. 1998; Sotiropoulos et al. 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von SRF durch die LIM-Kinase über ROCK (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*) indirekt über eine Veränderung des Aktin-Gleichgewichts zwischen F-Aktin und G-Aktin erfolgt. So konnte die Vermutung bestätigt werden, dass eine Verringerung des G-Aktin-"Pools" eine SRF-Aktivierung induziert (Posem et al. 2002).

Eine weitere Effektor-Familie von RhoA, die "*Diaphanous Related Formins*" (DRFs), stellt einen zusätzlichen Effektor in diesem Signalweg dar. SRF-Aktivierung durch mDia1 DRF steht in einem direkten Zusammenhang mit dessen Fähigkeit, die Polymerisation zu F-Aktin zu steigern (Copeland and Treisman 2002; Geneste et al. 2002).

Um den durch die Rho-Kinase veränderten Status des Aktin-Zytoskeletts mit der Aktivierung SRF-abhängiger Genexpression zu verknüpfen, bedarf es einer Art "Sensormoleküls", welches SRF mit dem Aktin-Polymerisierungsgrades kooperieren lässt. MAL, ein Mitglied der MRTF-Familie der SRF-Partner-Proteine (auch MRTF-A oder MKL1 genannt), assoziiert über die RPEL-Motive mit globulärem Aktin (G-Aktin) und ist damit im Zytoplasma lokalisiert. Nach Rho-induzierter Aktin-Polymerisation und resultierender Freisetzung transloziert MAL vom Zytoplasma in den Nukleus und interagiert mit SRF, wobei MAL als Dimer an die DNA-Bindungsdomäne von SRF bindet und somit eine Expression von Zielgenen induziert (Miralles et al. 2003). Dieser komplexe Regulationsmechanismus von SRF über Aktin-Dynamik ist in **Abb. 1.9** schematisch dargestellt.

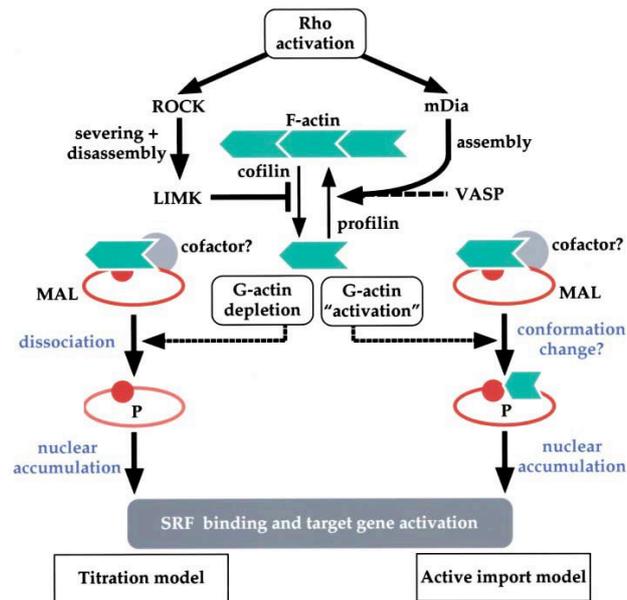


Abb. 1.9: Schematische Darstellung des Rho-Aktin-Signalwegs mit den zwei Modellen zur SRF-Aktivierung durch MAL

Erläuterungen sind im Text zu finden (aus Miralles, Posern et al. 2003).

Die zelluläre Lokalisation von MAL ist vom G-Aktin-*"Pool"* abhängig, wobei entweder die Menge von G-Aktin an sich, oder einer Subpopulation von G-Aktin, die sich einerseits durch Bindung an Aktin-bindende Proteine oder andererseits durch den Status des gebundenen Nukleotids auszeichnen könnte, ausschlaggebend ist. Somit können zwei Modelle zur SRF-Aktivierung durch MAL über den G-Aktin-*"Pool"* unterschieden werden:

Im ersten Modell würde G-Aktin, vermutlich in Verbindung eines weiteren Kofaktors, durch Bindung an MAL dessen Verfügbarkeit herabsetzen und damit die Translokation von MAL in den Nukleus verhindern. Somit würde eine Verringerung des G-Aktin-*"Pools"* durch Rho-induzierte Aktin-Polymerisation, die Akkumulation von MAL im Nukleus bewirken (*"Titration model"*, **Abb. 1.9**).

Das zweite Modell impliziert die Existenz einer zusätzlichen G-Aktin-Population, wobei G-Aktin MAL bindet und dadurch einen direkten, aktiven Transport von MAL in den Nukleus, und folglich SRF-abhängige Genexpression induziert (*"Active import model"*, **Abb. 1.9**) (Miralles et al. 2003).

Eine weitere TCF-unabhängige Aktivierung von SRF ist auch durch die Kalzium-aktivierte Proteinkinase CaMKII möglich. Somit führt eine Stimulation mit Serum oder Kalzium zu einer spezifischen Phosphorylierung von SRF durch die CaMKII (Miranti et al. 1995).

Ein weiterer Mechanismus einer TCF-unabhängigen Signalkaskade wird nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren über die PI3-Kinase vermittelt, was zur Induktion SRF-abhängiger Genexpression der *IEGs* führt (Poser et al. 2000).

1.1.6.1.3 Ausschließlichkeit der Bindung von TCFs und MAL an SRF-DNA-Komplexe

Neuere Ergebnisse haben belegt, dass sich die Bindung der TCFs und Mitgliedern der MRTF-Familie gegenseitig ausschließt, da beide SRF-Interaktionspartner zur Bindung dieselbe Region der SRF-DNA-Bindungsdomäne nutzen (**Abb. 1.10**) (Hill et al. 1994; Wang et al. 2004).

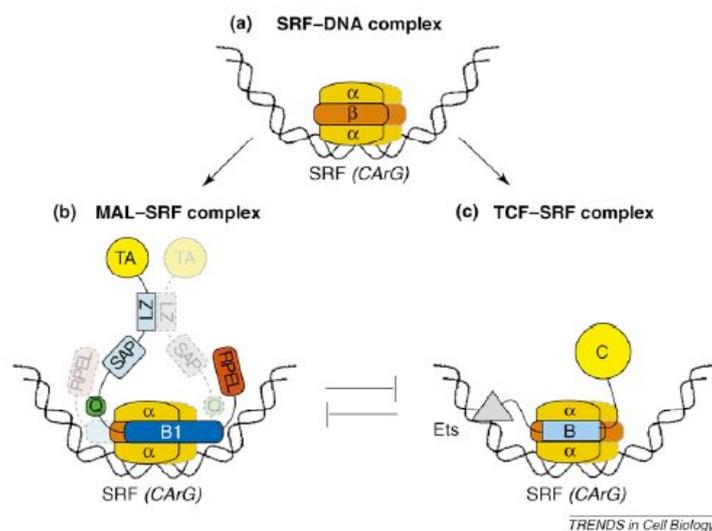


Abb. 1.10: Modell der sich gegenseitig ausschließenden Bindung von MAL und TCFs an SRF-DNA-Komplexe

(a) SRF bindet als Dimer an die CARG-Box, wobei MAL und die TCFs die gleiche Bindungsstelle an SRF (β -sheet) nutzen (b) zwei MAL-Moleküle binden an SRF (das zweite ist schattiert dargestellt) (c) Die Ets-Domäne des TCFs bindet eine spezifische DNA-Sequenz während die B-Box des TCF-Proteins mit SRF interagiert (aus Posern and Treisman 2006).

Diese Tatsache ermöglicht der Zelle auf verschiedene Stimuli mit differentieller, SRF-abhängiger Genexpression zu reagieren. Wachstumsfaktoren aktivieren den MAP-Kinase-Signalweg, der zu einer Aktivierung der TCFs und damit zur Transkription von Genen führt, die Zellwachstum und –proliferation induzieren. Differenzierungssignale hingegen werden über den Myocardin/MRTF-Signalweg weitergeleitet und aktivieren damit SRF-abhängige Gene, die für Zelldifferenzierung verantwortlich sind. Dieser Prozess wurde speziell in Glattmuskelzellen bewiesen und gilt als entscheidender Mechanismus der phänotypischen Plastizität (*phenotypic “switch”*, siehe Abschnitt 1.2.3) von Glattmuskelzellen (**Abb. 1.11**) (Wang et al. 2004; Zhou et al. 2005).

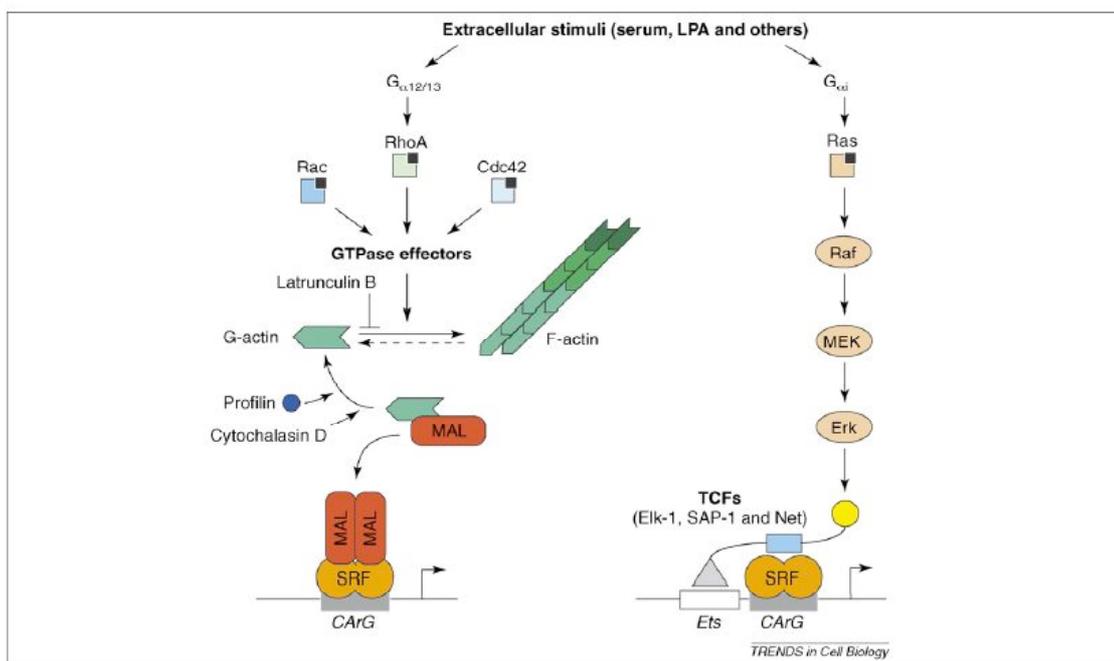


Abb. 1.11: Modell der zwei prinzipiellen Signalwege zur Regulation der SRF-Aktivität

Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs über Ras-Raf-MEK und Erk. Erk phosphoryliert die TCFs, welche über die Ets-Domäne mit der DNA und über die B-Box mit SRF interagieren. Signalwege über die Rho-Familie der GTPasen und über Veränderungen des Aktin-Polymerisierungsgrades führen zur Dissoziation von G-Aktin und MAL, welches anschließend in den Nukleus transloziert, SRF bindet und aktiviert (aus Posern and Treisman 2006).

1.1.6.2 Posttranslationale Modifikationen von SRF

Die Eigenschaften von SRF können durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, v. a. durch Phosphorylierungen bestimmter Serin-Seitenketten innerhalb der Peptidsequenz und Glykosilierungen verändert werden.

Zu den wichtigsten Veränderungen zählt die Phosphorylierung des Serin 83 durch die Casein-Kinase II (CKII), was zu einer veränderten Bindungskinetik des SRF an seine DNA-Zielsequenz (CArG-Box) führt. Eine weitere an der Phosphorylierung beteiligte Kinase ist die ribosomale S6 Kinase (pp90^{RSK}), welche als nachgeschaltetes Element des Raf-MAP-Kinase-Signalwegs nach Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren aktiviert wird. pp90^{RSK} phosphoryliert Serin 103 und erhöht dadurch die Bindung von SRF an die DNA (Janknecht et al. 1992; Rivera et al. 1993). Die Phosphorylierung der beiden C-terminalen Serine 435 und 446 erfolgt durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), was zu einer Potenzierung der Transkriptionsaktivität führt (Liu et al. 1993). Zwischen der DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne von SRF stellt das Serin 253 eine weitere Phosphorylierungsstelle dar (Janknecht et al. 1993). Die von den verschiedenen Kinasen katalysierten Phosphorylierungen erhöhen zwar die DNA-Bindung bzw. die Transkriptionsaktivität von SRF, sind aber für eine Seruminduktion mit resultierender SRF-abhängiger Genexpression nicht essentiell (Johansen and Prywes 1993). Neueste Ergebnissen haben gezeigt, dass SRF innerhalb der MADS-Box an Threonin 159 und Serin 162 durch die "Myotonic Dystrophy Protein Kinase" (DMPK) und die Proteinkinase C α (PKC α) phosphoryliert wird (Iyer et al. 2003; Iyer et al. 2006). Eine Phosphorylierung an Serin 162 inhibiert einerseits die Bindung von SRF an DNA, wobei zusätzlich eine Inhibierung der Komplexbildung von SRF mit den MRTFs zu beobachten ist, weshalb diese Phosphorylierung als Regulator des Wechsels zwischen Differenzierung und Proliferation in Muskelzellen gedeutet wird (Iyer et al. 2006). Neben den Phosphorylierungen kann SRF an verschiedenen Serinen zwischen der DNA-Bindungsdomäne und des C-Terminus durch kovalente Bindung von N-Acetylglucosamin glykosyliert werden, wobei die physiologischen Effekte dieser Modifikation unklar sind (Reason et al. 1992).

1.1.7 Zelluläre und biologische Funktionen von SRF

Obwohl über die Funktionen von SRF in *in vitro*-Systemen bisher sehr viel bekannt ist, ist die Rolle von SRF auf organismischer Ebene noch weitgehend unklar. Jedoch lassen sich die Funktionen von SRF, welche durch molekulargenetische *Srf-knockout*-Studien u.a. in murinen embryonalen Stammzellen aufgeklärt wurden, folgendermaßen einteilen.

1.1.7.1 Regulation der Transkription

Eine der ersten zellulären Funktionen, die SRF zugeordnet werden konnte, ist die der transkriptionellen Regulation im Verlauf der induzierten Zellproliferation. SRF ist wesentlich an der Induktion der "*immediate-early*"-Gene (*IEGs*) nach Stimulation mit mitotischen Signalen beteiligt. In SRF-defizienten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist diese *IEG*-Antwort nach Stimulation mit Serum oder LPA drastisch vermindert, was als genetischer Beweis der transkriptionellen Kontrolle durch SRF gilt (Schratt et al. 2001).

Zum heutigen Zeitpunkt sind >200 Gene identifiziert, die eine oder mehrere SRF-Bindungsstellen (CArG-Box) in deren Promoterregion aufweisen. Darunter sind, neben den *IEGs*, neuronale, Aktin-zytoskelettale und muskelspezifische Gene zu finden, deren Expression direkt von SRF in Interaktion mit seinen Partnerproteinen reguliert wird (Chai and Tarnawski 2002; Sun et al. 2006; Miano et al. 2007).

1.1.7.2 Zellproliferation

Die Tatsache, dass SRF wesentlich an der Induktion der "*immediate-early*"-Gene (*IEGs*) nach Stimulation mit Serum beteiligt und somit für den Übergang von der G₀- zur G₁- Phase des Zellzyklus verantwortlich ist (Poser et al. 2000), legt nahe, dass SRF direkt an der Zellproliferation beteiligt ist. In einigen somatischen Zellen konnte ein durch SRF-Defizienz verursachter Proliferationsdefekt nachgewiesen werden (Gauthier-Rouviere et al. 1991; Soulez et al. 1996). Widersprüchlicherweise weisen SRF-defiziente, murine embryonale Stammzellen (Schratt et al. 2001), sowie Herzmuskelzellen (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004), eine normale Proliferationsrate auf und zeigen ein weitgehend normales Zellzyklusprofil. In SRF-depletierten, vaskulären Glattmuskelzellen ist hingegen eine erhöhte Proliferation nachgewiesen (Kaplan-Albuquerque et al. 2005). Die unterschiedlichen Beobachtungen der Auswirkungen der SRF-Defizienz auf das Proliferationsverhalten verschiedener Zelltypen erschweren eine genaue Aussage über die Funktion von SRF während der Proliferation. Zelltyp-spezifische Regulationsmechanismen im Rahmen der Zellproliferation sind daher nicht auszuschließen.

1.1.7.3 Differenzierung und Entwicklung

SRF nimmt weiterhin funktionell an Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen teil. In *Drosophila melanogaster* findet man zwei Mutanten, *pruned* und *blistered*, zwei Allele des Drosophila SRF-Homologs (DSRF) (Guillemin et al. 1996). Die *blistered*-Mutation, die einen Funktionsverlust von SRF zur Folge hat, zeigt einen Defekt in der frühen Flügelentwicklung und -positionierung, sowie einen Defekt in der Zelladhäsion zwischen epidermalen Zellen. Bei der *pruned*-Mutante ist die Tracheenentwicklung gestört.

In Säugern hat SRF eine essentielle Funktion während der frühen Embryonalentwicklung. Sind in murinen Embryonen beide *Srf*-Allele deletiert, entwickeln sich keine mesodermalen Zellen und es kann keine Expression mesodermaler Markergene wie z. B. *Bra(T)*, *Shh* und *Bmp2/4* nachgewiesen werden. Zusätzlich ist eine erhebliche Reduktion in der *IEG*-Induktion nachgewiesen. Murine SRF-defiziente Embryonen sterben zu Beginn der Gastrulation an Tag E6.5 und sind nach Tag E12.5 der Fertilisation nicht mehr nachweisbar (Arsenian et al. 1998).

1.1.7.4 Neuronale Organisation

Neuere Studien haben SRF essentielle Funktionen in der neuronalen Organisation zugeschrieben, wobei einige der Prozesse auf die durch SRF-Defizienz verursachten zytoskelettalen und migratorischen Defekte zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 1.1.7.5). So konnte gezeigt werden, dass SRF für die neuronale Migration im Vorderhirn absolut notwendig ist und SRF eine durch neuronale Aktivität induzierte Genexpression, sowie die synaptische Plastizität gewährleistet (Alberti et al. 2005; Ramanan et al. 2005). Zusätzlich wurde bewiesen, dass SRF eine essentielle Rolle in der axonalen Wachstumslenkung und bei der korrekten Verschaltung von Neuronen im Hippocampus einnimmt (Knoll et al. 2006).

1.1.7.5 Organisation des Aktin-Zytoskeletts und Zellmigration

Genomische Studien haben belegt, dass mehr als die Hälfte der bisher bekannten >200 SRF-Zielgene Proteine kodieren, deren Funktionen mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung gebracht werden können. Diese Tatsache, unterlegt von vielen experimentellen Daten, welche die essentielle Funktion von SRF bezüglich des Aktin-Zytoskeletts und der Migration unterstreichen, hat SRF zu dem zentralen transkriptionellen Regulator des Aktin-Zytoskeletts hervorgehoben (Miano et al. 2007).

SRF-defiziente ES-Zellen *in vitro* zeigen schwerwiegende Defekte in der Ausbildung zytoskelettaler Strukturen, wie Aktin-Stressfasern, Zellfortsätze und fokale Adhäsionskontakte, welche für Migrationsprozesse essentiell sind. Damit einhergehend ist in SRF-defizienten ES-Zellen die Expression fokaler Adhäsions-Proteine, wie FAK ("*focal adhesion kinase*"), β 1-Integrin, Talin, Zyxin und Vinculin reduziert und/oder deren Lokalisation gestört, was zu einer ineffizienten Aktivierung der FAK führt (Schratt et al. 2002). Studien mit primären, murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) haben unterstreichend einen deutlichen Migrationsdefekt aufgrund SRF-Defizienz belegt, der mit schweren Defekten des Aktin-Netzwerks der Zellen einhergeht (M. Angstenberger, D. Nittner, unpubliziert). Umgekehrt führt eine Überexpression von SRF zu einer verstärkten Migration von kultivierten Glattmuskelzellen (Chai et al. 2004).

In den letzten Jahren wurden die *in vivo*-Effekte Zelltyp-spezifischer SRF-Inaktivierung, wie z. B. im Gehirn oder Herzmuskel, intensiv untersucht. Ein gemeinsames Ergebnis all dieser molekulargenetischen Studien ist der schwerwiegende Defekt in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und/oder des kontraktiven Apparates, was *in vivo* zu verminderter Zellmigration und/oder gestörter Kontraktion führt (Miano et al. 2007). Dabei ist die Funktion von SRF in Bezug auf Muskeldifferenzierung und –funktion besonders hervorzuheben und soll im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

1.1.7.6 Muskeldifferenzierung und Muskelfunktion

Muskelzellendifferenzierung geht mit transkriptioneller Aktivierung einer Reihe Muskel-spezifischer Gene einher, die den Muskelzellen die einzigartigen kontraktile und physiologischen Eigenschaften verleihen. Da SRF die Mehrheit dieser Muskel-spezifischen Gene in Herz-, Skelett- und Glattmuskelzellen reguliert (Beispiele siehe **Tabelle 1.1**), wird SRF eine bedeutende Rolle in der Differenzierung und Funktion von Muskelzellen zugeordnet.

Für den Prozess der Skelettmuskeldifferenzierung ist eine Familie Muskel-regulierender Faktoren (MRFs) essentiell, die zu der basischen *Helix-Loop-Helix*-Proteinfamilie gehören und MyoD, Myf5 und MRF4 einschließen (Rudnicki et al. 1993; Rudnicki and Jaenisch 1995). Es wurde gezeigt, dass die Expression von MyoD von dem RhoA-SRF-Signalweg abhängig ist und dass der distale Promotorbereich eine CArG-Box aufweist, was auf eine Notwendigkeit von SRF bei der Skelettmuskeldifferenzierung hindeutet (Gauthier-Rouviere et al. 1996; Carnac et al. 1998; L'Honore et al. 2003; L'Honore et al. 2007).

Die Differenzierung von Herz- und Glattmuskelzellen ist von der MRTF-Familie der SRF-Partner-Proteine abhängig, die in Interaktion mit SRF Muskel-spezifische Gene aktivieren. Eine Vielzahl von *knockout*-Studien *in vivo* haben die essentielle Rolle der MRTF-Familie in der Glatt- und Herzmuskelzellentwicklung belegt (Parmacek 2007).

Die essentielle Funktion von SRF in der Muskeldifferenzierung und –funktion ist in den letzten Jahren durch eine große Anzahl genetischer, Muskel-spezifischer *Srf-knockout*-Studien während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier bestätigt worden. Eine Herzmuskel-spezifische Inaktivierung von SRF während der Entwicklung führt zu embryonaler Letalität zwischen Tag E10.5 und E13.5 aufgrund schwerwiegender kardialer Defekte (Parlakian et al. 2004). Auch eine zeitlich-induzierte SRF-Defizienz in Herzmuskelzellen adulter Tiere resultiert in Letalität aufgrund von Störungen der Herzmuskelfunktion in Form einer Kardiomyopathie mit desorganisierter Sarkomerstruktur der Herzmuskulatur (Parlakian et al. 2005).

Eine weitere wichtige Studie belegt die Notwendigkeit von SRF während der Entwicklung des Kardiovaskulärsystems. SRF-defiziente Embryonen weisen eine gestörte Entwicklung der Myofibrillen im Herzen, sowie zytoskelettale Defekte in Zellen der Aorta auf. Zusätzlich konnte eine verminderte Migration von Glattmuskelzellen zur Aorta festgestellt werden. Zudem ist eine reduzierte Expression von Genen, die im

Zusammenhang mit dem Zytoskelett und dem kontraktilem Apparat stehen, deutlich nachgewiesen (Miano et al. 2004).

Während der Embryonalentwicklung resultiert SRF-Defizienz in Skelettmuskelzellen in perinataler Letalität, verursacht durch eine schwerwiegende Myopathie der Skelettmuskulatur, welche durch einen starken Muskelwachstumsdefekt charakterisiert ist (Li et al. 2005). Im adulten Tier hingegen weisen die SRF-defizienten Tiere ebenfalls eine durch einen postnatalen Muskelwachstumsdefekt hervorgerufene Reduktion der Skelettmuskelmasse auf. Zusätzlich ist die Regeneration der Myofibrillen nach Verletzungen deutlich beeinträchtigt. Das gestörte Muskel-spezifische Genexpressionsprogramm impliziert zusätzlich eine allgemeine Unterentwicklung der SRF-defizienten Skelettmuskeln (Charvet et al. 2006).

Diese molekulargenetischen *knockout*-Studien *in vivo* beweisen die absolute Notwendigkeit von SRF während der Muskelzelldifferenzierung und -funktion. Somit ist die transkriptionelle Regulation von SRF-Zielgenen für einen einwandfreien Muskelaufbau und Kontraktionsapparat essentiell.

Glattmuskel-spezifisch

<i>SM α-actin</i>	<i>SM-Calponin</i>
<i>SM γ-actin</i>	<i>Smoothelin-A und -B</i>
<i>SM22α (Transgelin)</i>	<i>α-actinin</i>
<i>SM-myosin heavy chain (SM-MHC)</i>	

Skelettmuskel-spezifisch

<i>Skeletal α-actin (SK α-actin)</i>	<i>β-Tropomyosin (Tnp2)</i>
<i>Skeletal myosin heavy chain (SK-MHC)</i>	<i>slow skeletal muscle troponin (TnnT1)</i>
<i>Muscle creatine kinase (MCK)</i>	<i>MyoD</i>
<i>Myogenin</i>	

Herzmuskel-spezifisch

<i>Cardiac α-actin</i>
<i>Cardiac myosin heavy chain</i>
<i>Cardiac Troponin C</i>
<i>Nkx2.5</i>

Tabelle 1.1: Beispiele SRF-regulierter, muskelspezifischer Gene

1.2 Das Glattmuskelgewebe

1.2.1 Allgemeines

Glatte Muskulatur ist vorwiegend in den Hohlorganen eines Organismus zu finden, wie z. B. in Blutgefäßen, im Gastrointestinaltrakt oder im Urogenitalsystem, und ist für deren Kontraktilität und somit für deren Funktionalität verantwortlich. Die Struktur des Glattmuskelgewebes unterscheidet sich deutlich von der der Skelett- oder Herzmuskelstruktur. So zeichnet sich die glatte Muskulatur durch das Fehlen einer sichtbaren Sarkomerstruktur (Querstreifung) aus, welche für Herz- und Skelettmuskel charakteristisch ist (**Abb. 1.12**).

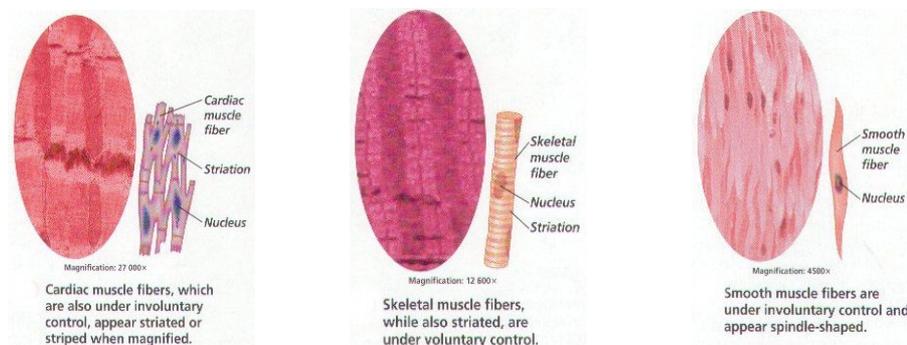


Abb. 1.12: Vergleich der Struktur der drei unterschiedlichen Muskeltypen

Glatte Muskulatur (rechts) grenzt sich deutlich durch das Fehlen einer sichtbaren Querstreifung von der Herz- (links) und Skelettmuskulatur (mitte) ab (Quelle: www.rogers.k12.ar.us/users/ehutches/musclenotes.html).

Durch strukturelle Unterschiede und die daraus resultierenden funktionellen Unterschiede, ist eine Unterteilung des glatten Muskelgewebes in den *“single unit”*- und den *“multi unit”*-Typ möglich, wobei auch Mischformen dieser Typen häufig sind (z. B. in der Gefäßmuskulatur).

“Single unit”-Typ

Der *“Single unit”*-Typ kommt bevorzugt in der Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, des Uterus, der Blase und des Harnleiters vor, ist aber auch in der Muskelschicht größerer Blutgefäße zu finden. Der *“Single unit”*-Typ bildet durch eine Vielzahl an *“gap junctions”* elektrisch-gekoppelte Zellverbände aus, wodurch eine sehr schnelle

Ausbreitung der Erregung, und somit eine nahezu synchrone Kontraktion des Zellverbandes ermöglicht wird ("funktionelles Synzytium"). Die Muskelzellen werden dabei nicht durch nervale Strukturen erregt, sondern durch eine spontane Depolarisierung morphologisch nicht abgrenzbarer Schrittmacherzellen (myogener Tonus), wobei jedoch eine Modulation durch vegetative Nervenfasern möglich ist.

"Multi unit"-Typ

Eine von Nachbarzellen abhängige Kontraktion finden beim "Multi unit"-Typ nicht bzw. nur sehr begrenzt statt. Jede einzelne Muskelzelle wird durch Nervenfasern des vegetativen Nervensystems gesondert innerviert (neurogener Tonus). Dieser Typ der glatten Muskulatur kommt u. a. in den inneren Augenmuskeln, im Bronchialsystem und in den Blutgefäßen vor.

1.2.2 Ultrastruktur der Glattmuskelzelle

Glattmuskelzellen sind spindelförmig und besitzen einen zentral gelegenen Nukleus. Die Länge der glatten Muskelzellen variiert in Abhängigkeit von Organ und jeweiligem Funktionszustand von 15 bis 20 μm , bis hin zu 400 μm .

Die Aktinfilamente der Glattmuskelzelle sind durch die Verankerung an zytoplasmatische "*dense bodies*" organisiert (**Abb.1.13**). Diese enthalten α -Aktinin, ein auch in der Z-Bande des Skelettmuskels vorkommendes Protein, weshalb die "*dense bodies*" als Z-Bande-Äquivalent angesehen werden (Small 1985). Diese Anheftungsplaques sind ebenfalls an der Plasmamembran (Sarkolemm) zu finden, enthalten neben α -Aktinin, u.a. Talin, Vinculin und Calponin (Small and Gimona 1998). Glattmuskelzellen sind reich an Intermediärfilamenten, die hauptsächlich zwei spezifische Proteine, Desmin und Vimentin, in einzelnen Fällen auch Zytokeratine, enthalten. Morphologische Studien haben gezeigt, dass diese eine mechanische Funktion haben, der Zelle Stabilität verleihen und eine Kraftübertragung während der Kontraktion gewährleisten (Small and Gimona 1998).

An der Zellperipherie ist eine Vielzahl an Einstülpungen der Plasmamembran zu finden. Diese Caveolae, die auch in der quergestreiften Muskulatur vorkommen, dienen als Endozytosevesikel und der Übertragung von Signalen auf die Zelle. In der glatten Muskulatur ersetzen die Caveolae möglicherweise das gering ausgebildete Sarko-

plasmatische Retikulum (SR), weshalb glatte Muskelzellen auf externe Kalzium-Quellen angewiesen sind. An den Stellen, wo Caveolen ausgebildet sind, ist die Plasmamembran mit Cholesterin und Shingolipiden angereichert, wobei an der zytoplasmatischen Seite Caveolin an Cholesterin gebunden ist (Daniel et al. 2006; Hardin and Vallejo 2006).

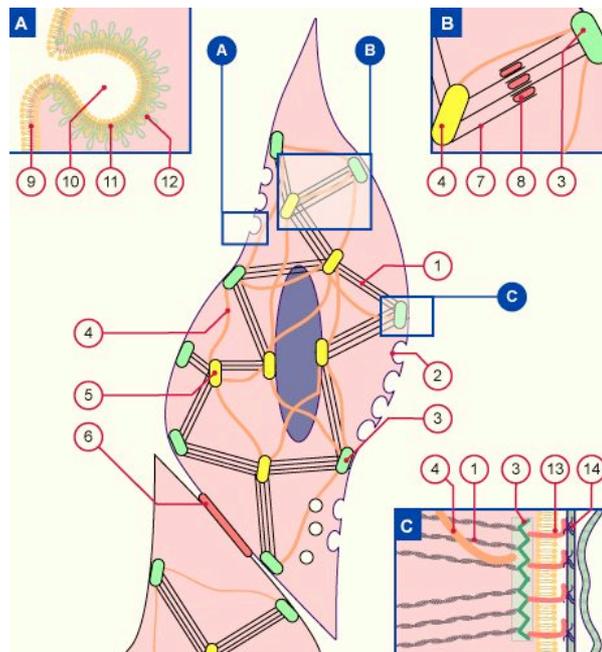


Abb. 1.13: Ultrastruktur einer Glattmuskelzelle

Erläuterungen der zellulären Strukturen sind im Text zu finden. (1) Aktin-Myosin-Komplex, (2) Caveolae, (3) *dense plaques*, (4) Intermediärfilament, (5) *dense bodies*, (6) *gap junctions*, (7) Aktinfilament, (8) Myosinfilament, (9) Plasmamembran/Sarkolemm, (10) Caveolae, (11) Cholesterin, (12) Caveolin, (13) Integrin, (14) Basalmembran (Quelle: www.unifr.ch/anatomy)

1.2.3 Heterogenität und phänotypische Plastizität von Glattmuskelzellen

Glattmuskelzellen entwickeln sich während der Embryogenese aus vielen verschiedenen Vorläuferzellen und stellen eine äußerst heterogene Zellpopulation dar. Glatte Muskelzellen der dorsalen Aorta und großer Arterien entwickeln sich aus dem Mesenchym des lateralen Mesoderms und aus Zellen der Neuralleiste, während die Muskelzellen der Herzkranzarterien aus proepikardialen Zellen stammen, welche am Herzen entlang migrieren und anschließend einer epithelialen-mesenchymalen Transformation unterliegen. Arterielle und venöse Glattmuskelzellen, sowie ver-

schiedene Klassen von viszerale Glattmuskelzellen bestimmter Organe, weisen eine enorme Diversität bezüglich ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Funktionalität und des spezifischen Genexpressionsmusters auf. Allerdings ist die molekulare Basis dieser Heterogenität bis heute nicht vollständig geklärt, wobei einige Studien an Glattmuskel-spezifischen Promotoren den Einfluss von SRF auf diese Diversität untermauern (Kim et al. 1997; Li et al. 1997; Chang et al. 2001).

Glattmuskelzellen stellen hochspezialisierte Zellen dar, die ein einzigartiges Repertoire an kontraktilen Proteinen, Ionenkanälen und Signalmolekülen exprimieren, welches für deren grundlegende Funktion – Kontraktion – notwendig sind. Während Herz- und Skelettmuskelzellen einer endgültigen Differenzierung unterliegen, sind glatte Muskelzellen in der Lage, zwischen einem proliferativen/synthetischen und einem differenzierten/kontraktilen Status zu wechseln (Owens 1995; Halayko and Solway 2001) – ein Prozeß, der als phänotypische Plastizität/Modulation bezeichnet wird. Durch Gefäßverletzung können differenzierte Glattmuskelzellen die Expression Glattmuskel-spezifischer, kontraktiler Gene einstellen und stattdessen in einen proliferierenden Status übergehen, um die vaskuläre Verletzung zu beheben (Regan et al. 2000).

Die Expression nahezu jedes analysierten Glattmuskel-spezifischen Gens wird durch SRF reguliert (Beispiele siehe **Tabelle 1.1**), wobei SRF aber auch für Zellproliferation verantwortlich ist (siehe Abschnitt 1.1.7.2). Wie SRF jedoch beide, sich gegenseitig ausschließende Prozesse, Proliferation und Differenzierung, regulieren kann, ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Ein Mechanismus zur transkriptionellen Regulation von Proliferation und Differenzierung stellt die reversible Interaktion von Myocardin mit SRF dar. Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren aktiviert den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg, was zu einer Phosphorylierung der TCFs führt. Phosphoryliertes Elk-1 wird zu Glattmuskel-spezifischen Genen, welche eine TCF-Bindestelle neben der CA₂G-Box aufweisen, rekrutiert, worauf es an SRF-gebundenes Myocardin verdrängen kann, was zu einer Deaktivierung Muskel-spezifischer Gene und zu einer Aktivierung von Proliferationsgenen führt (vgl. Abschnitt 1.1.6.1.3) (Dandre and Owens 2004; Wang et al. 2004). Die Tatsache, dass nicht alle Glattmuskel-spezifischen Gene eine TCF-Bindestelle in deren Promotoren aufweisen, spricht jedoch für die Existenz weiterer Regulationsmechanismen, die entweder ebenfalls eine durch SRF/Myocardin-induzierte Genexpression negativ beeinflussen oder andere Myocardin-unabhängige, negative Effekte erzielen.

Neueste Ergebnisse haben gezeigt, dass die SRF-abhängige, Glattmuskel-spezifische Genregulation zusätzlich von der Chromatinstruktur Glattmuskel-spezifischer Promotoren reguliert wird. So wurden Glattmuskel-spezifische, posttranslationale Histonmodifikationen innerhalb des CArG-Box-Chromatins Glattmuskel-spezifischer Gene identifiziert, welche die Eigenschaften von SRF bezüglich der Chromatin-Bindung kontrollieren (McDonald and Owens 2007).

Während der Aktivierung Glattmuskel-spezifischer Gene kann eine erhöhte SRF-Myocardin-Bindung an zugänglichem Chromatin innerhalb der CArG-Box festgestellt werden, das sich durch dimethyliertes Histon-H3 und acetyliertes Histon-H4 auszeichnet. Bei einer Repression Glattmuskel-spezifischer Genexpression rekrutiert der myogene Repressor "*Kruppel-like-factor 4*" (KLF4) die H4-Histondeacetylase an den Promotor und verhindert dabei die Bindung von SRF und Myocardin an das CArG-Box-Chromatin mit methylierten Histonen (**Abb. 1.14**). Diese Ergebnisse belegen eine Glattmuskel-spezifische, epigenetische Kontrolle der SRF-Bindung an Chromatin während der Glattmuskel-spezifischen Genregulation (McDonald et al. 2006; McDonald and Owens 2007).

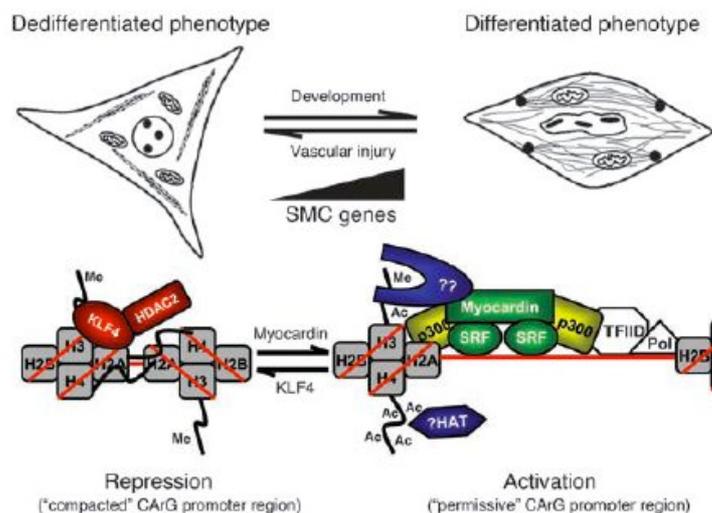


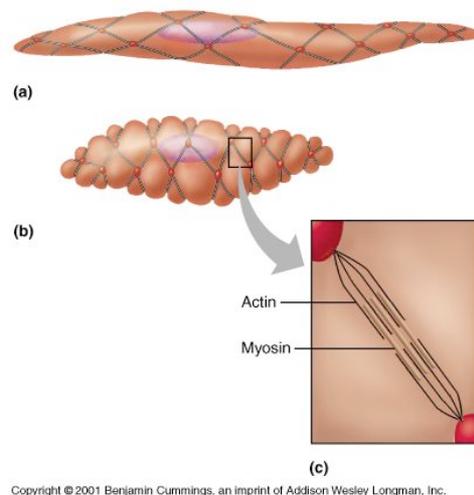
Abb. 1.14: Modell der epigenetischen Kontrolle der SRF-Bindung an CArG-Box-Chromatin

Durch z. B. vaskuläre Verletzung verursachte Repression der Myocardin-Aktivität und/oder Aktivierung KLF4-abhängiger HDACs führt zu Repression Glattmuskel-spezifischer Genexpression. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Abwesenheit von KLF4 eine Bindung von SRF und Myocardin an zugänglichem Chromatin durch acetyliertes Histon H4 und dimethyliertes Histon H3, was in Induktion Glattmuskel-spezifischer Genexpression und damit in Glattmuskelzellendifferenzierung resultiert (aus McDonald, Wamhoff et al. 2006).

1.2.4 Kontraktion der Glattmuskelzellen

1.2.4.1 Grundlagen der Glattmuskelkontraktion

Die Kontraktion der Glattmuskulatur erfolgt durch einen ATP-abhängigen Querbrückenzyklus, der durch die sogenannte "Gleitfilamenttheorie" beschrieben wird. Die Verkürzung der Muskulatur erfolgt durch das zyklische Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten (**Abb. 1.15**). Die kontraktile Charakteristiken und Mechanismen der Kontraktion glatter Muskelzellen entsprechen somit im Wesentlichen derer der Herz- und Skelettmuskulatur. Jedoch ist die Glattmuskelkontraktion durch langsame und andauernde, tonische Kontraktionen gekennzeichnet, während Herz- und Skelettmuskulatur schnelle und kurz andauernde Kontraktionen ausübt. Dafür entwickelt der glatte Muskel bei einem sehr viel geringeren Energieaufwand eine höhere Kraft.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Abb. 1.15: Kontraktion einer Glattmuskelzelle

Schematische Darstellung einer Glattmuskelzelle im relaxierten (a) und kontrahierten (b) Zustand mit Aktin-Myosin-Gleitmodell (c).

Glattmuskelkontraktion kann durch elektromechanische oder durch pharmakomechanische Stimuli (Pharmaka, Neurotransmitter und Hormone) ausgelöst werden, wobei auch eine passive Dehnung der glatten Muskelzellen Kontraktionen verursachen kann, welche durch die Glattmuskelzellen an sich initiiert wird (myogene Kontraktion).

All diese Stimuli führen zu einer erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration, die durch Kalzium-Influx über Kalziumkanäle und/oder über Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speicherorganellen (Sarkoplasmatisches Retikulum, SR) erreicht wird. Die Besonderheit der glatten Muskulatur liegt darin, dass die Aktin-Myosin Interaktionen einer anderen Regulation als in quergestreifter Muskulatur unterliegen: Das freigesetzte Kalzium bindet Calmodulin, ein spezielles Kalzium-bindendes Protein, wonach dieser Calmodulin-Kalzium-Komplex die *“myosin light chain kinase”* (MLCK) aktiviert. Der essentielle Schritt zur Initiation der Muskelkontraktion stellt die Phosphorylierung von Serin 19 der 20 kDa-regulatorischen *“myosin light chain”* (MLC₂₀) durch die MLCK dar, wodurch die ATPase-Aktivität des Myosins, also die Interaktion von Myosin mit Aktin-Filamenten, und folglich Kontraktion ermöglicht wird (**Abb. 1.16**) (Kamm and Stull 1985; Gallagher et al. 1997). Eine Abnahme der Kalzium-Konzentration durch Kalzium-Efflux oder Wiederaufnahme in die intrazellulären Speicher inaktiviert die MLCK und ermöglicht eine Dephosphorylierung der MLC₂₀ durch die *“myosin light chain”*-Phosphatase, was zur Deaktivierung der ATPase-Aktivität des Myosins und somit zur Relaxation führt (Driska et al. 1989; Gong et al. 1992).

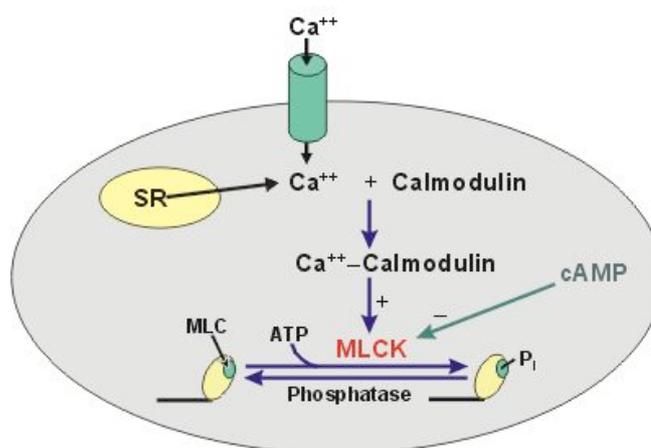


Abb. 1.16: Mechanismus der Kalzium-abhängigen Regulation der Initiation der Glattemuskulaturkontraktion

Eine intrazellulär erhöhte Kalzium-Konzentration führt zur Bindung von Kalzium an Calmodulin. Dieser aktive Kalzium-Calmodulin-Komplex ist in der Lage, die *“myosin light chain kinase”* (MLCK) zu aktivieren, welche die regulatorische Untereinheit des Myosins, die *“myosin light chain”* (MLC₂₀), phosphoryliert. Dieser essentielle Schritt zur Initiation der Glattemuskulaturkontraktion verleiht dem Myosin ATPase-Aktivität und ermöglicht somit die Interaktion mit den Aktinfasern. Ein Sinken der Kalzium-Konzentration führt zur Dephosphorylierung der MLC₂₀ durch die *“myosin light chain”*-Phosphatase und somit zur Relaxation. (Quelle: www.cvphysiology.com).

1.2.4.2 Kontraktion der Glattmuskulatur des Gastrointestinaltraktes

Die Glattmuskulatur des Gastrointestinaltraktes weist besondere funktionale Eigenschaften auf, die sie deutlich von anderen Typen viszeraler (z. B. der Gallenblase) oder vaskulärer Glattmuskulatur abgrenzen. So durchläuft die glatte Muskulatur des Magens, des Dünndarms und des Dickdarms durch zyklische Membrandepolarisation und –repolarisation verursachte, rhythmische Kontraktionen (“peristaltischer Reflex”), welche einen nach anal gerichteten Transport des Darminhaltes gewährleisten (Murthy 2006). Diese spontane, rhythmische Motilität wird vor allem durch hoch spezialisierte Schrittmacherzellen (*pacemaker cells*, die “*Interstitial Cells of Cajal*”, Interstitielle Zellen von Cajal, ICCs) erzeugt, die netzwerkartig inter- und intramuskulär lokalisiert sind, wobei auch das enterische Nervensystem eine bedeutende Rolle während der Muskelkontraktion übernimmt (Takaki 2003).

1.2.4.2.1 Das enterische Nervensystem

Der Gastrointestinaltrakt weist das größte Netzwerk an Neuronen außerhalb des Zentralnervensystems auf. Es sind zwei Nervengeflechte beschrieben, der “*Plexus nervorum submucosus*” und der “*Plexus nervorum myentericus*”, die das enterische Nervensystem (ENS) bilden, welches sich klar vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem abgrenzt (Holzer et al. 2001). Eine zentrale Aufgabe des ENS besteht in der Steuerung der gastrointestinalen Motilität, welche die Grundlage für Aufnahme, Passage, Verdauung und Resorption der Nahrung, für die Exkretion von Kot und für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase des Organismus darstellt (Kunze and Furness 1999). Im enterischen Nervensystem können drei funktionell verschiedene Zelltypen unterschieden werden: die intrinsischen, primären afferenten Neuronen (IPANs), die Interneurone und die efferenten Neuronen. Diese unterschiedlichen Zelltypen und ca. 25 Neurotransmitter werden benötigt, um die verschiedenen Funktionen des ENS zu steuern (McConlogue and Furness 1994).

1.2.4.2 Interstitielle Zellen von Cajal (ICCs)

Ein Teil der glatten Muskulatur besitzt Zellen, welche spontane Membrandepolymerisationen auslösen können und somit eine "Schrittmacherfunktion" übernehmen (Hanani and Freund 2000). Diese Zellen kommen vorwiegend im glatten Muskel der Hohlorgane des Gastrointestinaltraktes vor, sind aber auch in Gefäßmuskelzellen zu finden (Povstyan et al. 2003). Diese "Interstitiellen Zellen von Cajal" (ICC) stellen hoch spezialisierte Glattmuskelzellen dar. Diese liegen im "*Plexus nervorum myentericus*", ein Nervenplexus zwischen der Zirkulär- und der Longitudinalmuskulatur, und gelten als Bindeglied zwischen den autonomen Nerven und der glatten Muskulatur. Die ICCs sind durch *gap junctions* mit den glatten Muskelzellen elektrisch gekoppelt und bestimmen so die Spontanaktivität, wodurch eine synchrone Kontraktion des Muskelgewebes erzielt wird.

1.2.4.2.3 Signalwege zur Kontraktion der Glattmuskulatur des Intestinaltraktes

Die Signaltransduktion zur Muskelkontraktion erfolgt über drei Komponenten membrangebundener Proteine: (a) die Transmembran-Rezeptoren, (b) die Rezeptor-gebundenen GTP-Bindeproteine und (c) die Effektor-Enzyme der intrazellulären Signalkaskaden. Die Liganden für die Rezeptoren werden entweder durch enterische Motoneuronen (z. B. Acetylcholin), von den Glattmuskelzellen selbst (z. B. S1P und LPA) oder von Nebenzellen bereitgestellt. Es existiert eine Vielzahl an Rezeptoren und Rezeptor-Unterklassen, die Muskelkontraktionen vermitteln können. Diese beinhaltet Protein- (für z. B. Endothelin und Motilin), Amin- (für z. B. Histamin), Pyrimidin/Purin- (für UTP und ATP) und Lipid-Rezeptoren (für LPA und S1P). Die muscarinischen Rezeptoren *m2* und *m3* sind die vorwiegenden Rezeptor-Typen der Glattmuskelzellen, wobei nur der *m3*-Rezeptor Kontraktionen vermittelt. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Rezeptoren gleichmäßig über die Glattmuskelzellen der äußeren Longitudinal- und der inneren Zirkulär-Muskelschicht des Darms verteilt (Murthy 2006).

1.2.4.2.4 Kalzium-abhängige, initiale Kontraktion

Die Initiation der Glattmuskelkontraktion erfolgt über die essentielle Kalzium-Calmodulin-abhängige Phosphorylierung der MLC_{20} durch die MLCK (siehe Abschnitt 1.2.4.1). Über die Aktivierung des $m3$ -Rezeptors erfolgt die Bindung der Phospholipase C- $\beta 1$ (PLC- $\beta 1$) an das Rezeptor-gebundene G-Protein $G\alpha_q$. In der zirkulären Darmmuskulatur, sowie in den meisten Glattmuskulatur-Typen, stellt Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) das bevorzugte Substrat der PLC- $\beta 1$ dar. Das durch die Hydrolyse von PIP_2 gebildete Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) bindet mit hoher Affinität an die Kalzium-Kanäle des Sarkoplasmatischen Retikulums und induziert dadurch die Ausschüttung von Kalzium und damit die initiale Kontraktion (**Abb. 1.17**) (Murthy 2006).

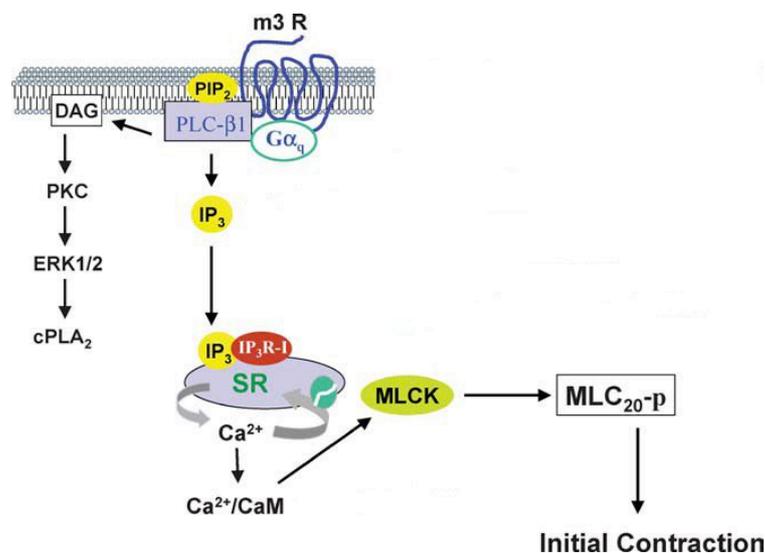


Abb. 1.17: Signalweg zur Kalzium-abhängigen, initialen Glattmuskelkontraktion der zirkulären Muskulatur des Darms

Die Phosphorylierung der MLC_{20} und initiale Kontraktion wird ausschließlich über $m3$ -Rezeptoren vermittelt. $G\alpha_q$ rekrutiert PLC- $\beta 1$, die eine Hydrolyse von PIP_2 katalysiert. Das gebildete IP_3 bindet mit hoher Affinität an die Kalzium-Kanäle des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), was eine Ausschüttung von Kalzium (Ca^{2+}) bewirkt. Kalzium bindet an Calmodulin (Ca^{2+}/CaM) und aktiviert die MLCK, welche schließlich MLC_{20} phosphoryliert und Kontraktion initiiert ("initial contraction") (aus Murthy 2006).

Parallel oder anstelle dieses Mechanismus der Kalzium-abhängigen Kontraktion kann eine Hormonstimulation zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führen. Diese Kanäle tragen zu Kontraktionen unterschiedlichen Ausmaßes bei, die vom Muskeltyp abhängig ist (Moosmang et al. 2003; Wegener et al. 2004).

1.2.4.2.5 Kalzium-unabhängige, anhaltende Kontraktion

Die initiale Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration stellt nur einen transienten Prozess dar, wodurch die Kalzium-abhängige Aktivierung der MLCK von sehr kurzer Dauer ist. Jedoch hält die Phosphorylierung der MLC₂₀, und damit eine Muskelkontraktion (Tonus) weiter an, was einen Kalzium-unabhängigen Kontraktionsmechanismus impliziert (Kalziomsensibilisierung).

Die anhaltende Kontraktion umfasst (a) die Aktivierung der G-Proteine G_q und/oder G₁₃, (b) die regulierte Inhibition der MLC-Phosphatase und (c) die Phosphorylierung von MLC₂₀ durch eine Kalzium-unabhängige MLCK. Der bedeutende Unterschied zwischen der initialen und der anhaltenden Glattmuskelkontraktion besteht also in der Regulation des Gleichgewichts zwischen der MLCK- und der MLC-Phosphatase-Aktivität.

Die Signalwege, die zur Inhibierung der MLC-Phosphatase führen, werden durch die sequentielle Aktivierung der G-Proteine G_{αq}/G_{α13}, der RhoGEFs (Rho-Guanin Exchange Factor) und von RhoA eingeleitet und resultieren in der Rho-Kinase (ROCK)-vermittelten Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit der MLC-Phosphatase (MYPT1) und/oder in der PKC-vermittelten Phosphorylierung von CPI-17, einem endogenen MLC-Phosphatase-Inhibitor. Die anhaltende Phosphorylierung von MLC₂₀ scheint die Kalzium-unabhängige MLCK "zipper-interacting protein" (ZIP)-Kinase zu induzieren (**Abb. 1.18**) (Murthy 2006).

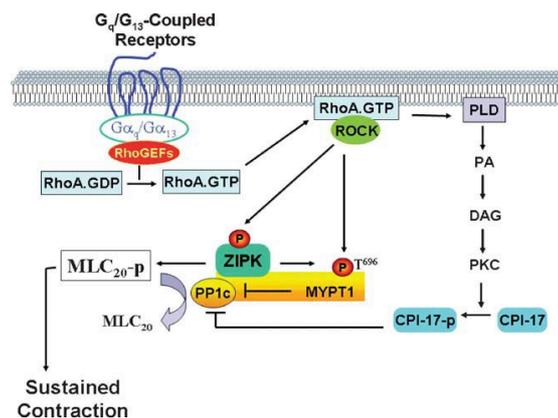


Abb. 1.18: Signalwege der Kalzium-unabhängigen, anhaltenden Kontraktionsphase der Glattmuskelkontraktion im Darm

Anhaltende MLC₂₀ Phosphorylierung und Muskelkontraktion werden durch die G_{αq}/G_{α13}-abhängige Aktivierung von RhoA initiiert. Translokation des aktivierten RhoA (RhoA.GTP) an die Membran aktiviert zwei Signalwege, welche die Rho-Kinase (ROCK) und die Proteinkinase C (PKC) involvieren und eine Inhibition der MLC-Phosphatase hervorrufen. ROCK phosphoryliert die regulatorische Untereinheit der MLC-Phosphatase (MYPT1) an Threonin 696, was eine Dissoziation, und damit eine Inhibition der katalytischen Untereinheit der MLC-Phosphatase (PP1c) bewirkt. PKC phosphoryliert den endogenen MLC-Phosphatase-Inhibitor CPI-17 wodurch dessen inhibitorische Aktivität verstärkt wird. MLC₂₀-Phosphorylierung erfolgt durch die Kalzium-unabhängige MLCK ZIP-Kinase (ZIPK) (aus Murthy 2006).

1.3 Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Systems

Durch zufällige Integration von Transgenen oder durch gezielte Veränderungen von Genen mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen, besteht die Möglichkeit, das Mausgenom genetisch zu verändern, um die Funktion einzelner Gene zu analysieren (Jaenisch 1988; Capecchi 1994). Da diese Techniken potentiell eine permanente, genetische Modifikation im Genom der Keimbahn der Maus erzeugen, führt die konstitutive Deletion eines Gens (**Abb. 1.20 A**) während der prä- und postnatalen Entwicklung zum Verlust der Genfunktion in allen Zellen. Der große Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass die erzeugten Gendefekte häufig zu embryonaler Letalität oder stark reduzierter Lebenserwartung der Mutanten führen kann. Zudem ist es nicht möglich, genaue Aussagen über die Zelltyp- und Zeit-spezifische Funktion des deletierten Gens zu treffen. Aus diesem Grund wurden die Methoden der konstitutiven Deletion von Genen mit einem Rekombinationssystem kombiniert, das einen durch Rekombinasen katalysierten Austausch (häufig Deletion) zwischen zwei kurzen DNA-Erkennungssequenzen ermöglicht. Das inzwischen am häufigsten verwendete Rekombinationssystem ist das Cre/loxP-System, welches sich in Säugerzellen als besonders effizient erwiesen hat und dazu verwendet wird, gezielte genetische Veränderungen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder in somatischen Zellen der Maus zu induzieren (Rajewsky et al. 1996).

Die Cre (*“causes/cyclization recombination”*)-Rekombinase ist ein 38 kDa-Protein, das aus dem Bakteriophagen P1 stammt. Cre katalysiert die Rekombination zwischen zwei spezifischen 34 bp-Erkennungssequenzen, den loxP (*“locus of crossing(X)-over of P1”*)-sites, und benötigt hierzu keinerlei Kofaktoren. Je nach Orientierung der loxP-Erkennungssequenzen zueinander kann man durch die Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, eine Exzision/Integration (Deletion) oder eine Translokation von DNA-Segmenten erzielen (**Abb. 1.19**).

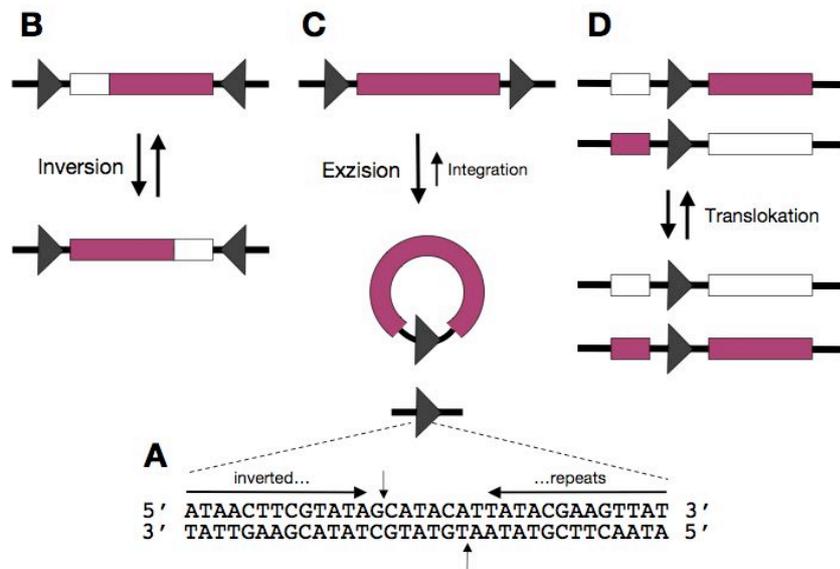


Abb. 1.19: Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Die Cre-Rekombinase verursacht eine Rekombination zwischen zwei 34 bp langen *loxP*-Erkennungssequenzen (Dreiecke). **(A)** Die *loxP*-Sequenz besteht aus zwei 13 bp-Palindromen ("inverted repeats"), die eine asymmetrische 8 bp-"core"-Sequenz flankieren. Die Spaltung der Phosphodiesterbindung durch die Cre-Rekombinase ist mit senkrechten Pfeilen gekennzeichnet. **(B)** Die Rekombination zwischen zwei entgegengesetzten *loxP*-sites im selben DNA-Molekül führt zur Inversion der dazwischenliegenden Sequenz. **(C)** Die Rekombination zwischen zwei gleichorientierten *loxP*-Sequenzen im selben DNA-Molekül resultiert in der Exzision des flankierten Segments. Befinden sich die *loxP*-sites auf unterschiedlichen DNA-Molekülen, kann eine Integration **(C)** oder eine Translokation **(D)** der DNA erreicht werden.

Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem eignet sich für eine Vielzahl an Genmodifikationen, wobei es *in vivo* am häufigsten zur Deletion von Genen durch die Cre-vermittelte Exzision *loxP*-flankierter ("gefloxter") Exons oder größerer Gensegmente eingesetzt wird (Nagy 2000). Eine Exzision kann sowohl *in vitro* in ES-Zellen (Gu et al. 1993) oder in befruchteten Eizellen (Araki et al. 1995) durch transiente Cre-Expression, als auch in Cre-transgenen Mäusen (Orban et al. 1992) stattfinden. Dazu werden sogenannte Cre-"deleter"-Mäuse (wie z. B. CMV-Cre) mit "gefloxten" Mäusen gekreuzt, was zur Exzision *loxP*-flankierter DNA-Segmente, "gefloxter" Markergene oder kodierender Gensegmente aus dem Genom von Keimzellen führt (Rajewsky et al. 1996).

Eine wichtige Anwendung des Cre/*loxP*-Systems stellt die konditionale, somatische Mutagenese in der Maus dar, durch die eine Zelltyp- oder Gewebe-spezifische **(Abb. 1.20 B)** und/oder eine zeitlich steuerbare **(Abb. 1.20 C)** Generierung von Mutationen erzielt werden kann (Metzger and Chambon 2001). Dies wird durch die Zelltyp- oder Gewebe-spezifische Expression der Cre-Rekombinase mittels Nutzung geeigneter

Gewebe- oder Zelltyp-spezifischer Promotoren und/oder zusätzlich durch Verwendung Liganden-aktivierbarer und somit zeitlich kontrollierbarer Cre-Proteine erreicht (Feil et al. 1996; Brocard et al. 1997).

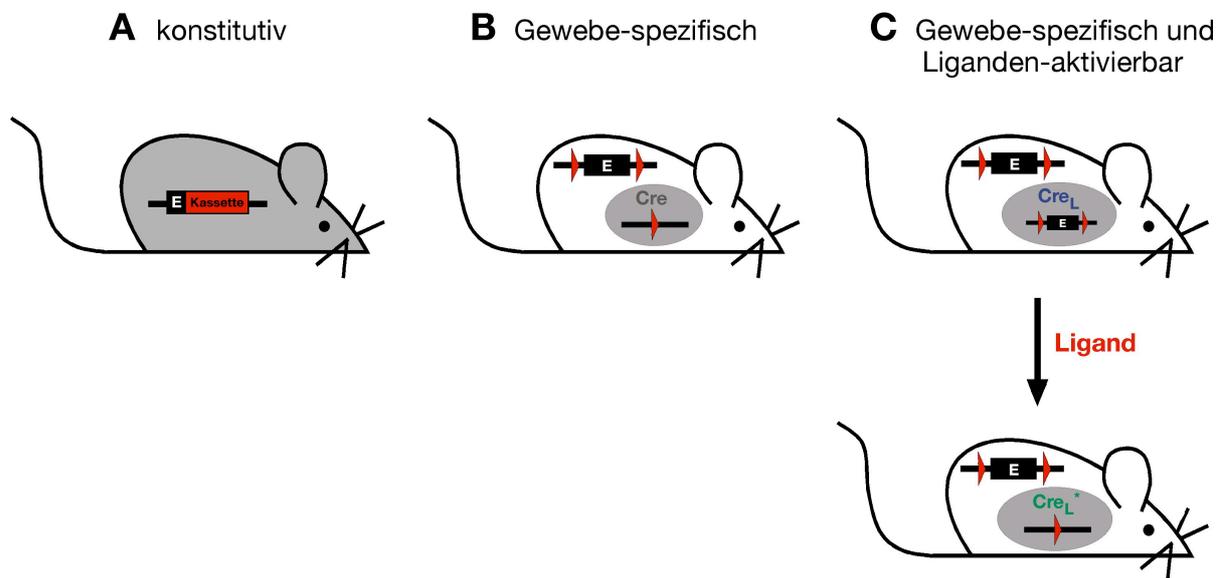


Abb. 1.20: Konstitutive und konditionale Mutagenese in der Maus

(A) Konstitutive Inaktivierung eines Gens durch Einführung einer DNA-Kassette in das Exon (E). (B) Gewebe-spezifische Inaktivierung eines Gens durch Exzision eines loxP-flankierten (Dreiecke) Exons in allen Cre-exprimierenden Zellen (graues Oval). (C) Die Verwendung einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase (Cre_L) erlaubt eine zeitliche Kontrolle der Rekombination. Dieses modifizierte Cre-Protein ist zunächst inaktiv und wird erst in Anwesenheit eines synthetischen Liganden (*) aktiviert (Cre_L*). Eine örtliche und zeitliche Regulation der Rekombination wird durch die Gewebe-spezifische Expression einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase ermöglicht.

Die Problematik vieler transgener Cre-exprimierender Mauslinien besteht darin, dass die Rekombinase zu unerwünschten Zeitpunkten und/oder in unerwünschten Geweben exprimiert wird und/oder aktiv ist (*“leakiness”*). Oftmals sind die Gewebe-spezifischen Promotoren, welche die Cre-Expression steuern, nur in einem Teil der Zellen des Gewebes aktiv, was den Anteil der rekombinierten Zellen im Zielgewebe vermindert (*“mosaicness”*). Wenn die Rekombinase bereits während der frühen Embryonalentwicklung ektopisch aktiv ist, kann der *“geflochte”* Genlocus in einer Vielzahl an Zellen des adulten Tieres bereits deletiert sein, was zu unspezifischen Phänotypen führen kann. Auch eine unvollständige Rekombination innerhalb eines Gewebes kann die Analyse eines Phänotyps erheblich erschweren.

1.3.1 Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinasen

Um den Zeitpunkt der Cre-vermittelten Rekombination *loxP*-flankierter Gensegmente kontrollieren zu können, wurden modifizierte Cre-Rekombinasen entwickelt, die durch synthetische Stoffe aktivierbar sind, sogenannte Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinasen (**Abb. 1.20 C**). Die Fusion von Cre mit mutierten Ligandenbindungsdomänen (LBDs) verschiedener Steroidhormonrezeptoren resultiert in chimären Cre-Rekombinasen, deren Rekombinaseaktivität durch synthetische, nicht aber durch natürliche Liganden des jeweiligen Rezeptors induziert werden kann (Metzger and Feil 1999).

Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinasen wurden durch die Fusion von Cre mit mutierten LBDs des Östrogenrezeptors (*Estrogen Receptor*, ER) konstruiert. CreER-Rekombinasen sind zunächst inaktiv und können durch den partiellen ER-Antagonisten Tamoxifen bzw. dessen aktiven Metaboliten 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT) aktiviert werden. Für die Aktivierung dieser modifizierten Cre-Rekombinasen existiert folgendes Modell: Das CreER-Fusionsprotein wird zunächst durch die Bindung an "Heat shock"-Proteine (Hsp) im Zytoplasma der Zelle verankert und ist dadurch nicht aktiv (Picard 1994). Die Bindung von Tamoxifen an die mutierte Ligandenbindungsdomäne (LBD) führt zur Dissoziation des Hsp-CreER-Proteinkomplexes und erlaubt somit die Translokation der CreER-Rekombinase in den Zellkern, wo sie Rekombination katalysiert (**Abb. 1.21**).

Durch die Einführung spezifischer Punktmutationen in die ER-LBD kann eine Aktivierung durch das körpereigene Hormon Östradiol ausgeschlossen werden, weshalb die mutierten, sensitiven CreER-Derivate CreER^T und CreER^{T2} zur kontrollierbaren Rekombination im Maussystem Anwendung finden (Feil et al. 1997).

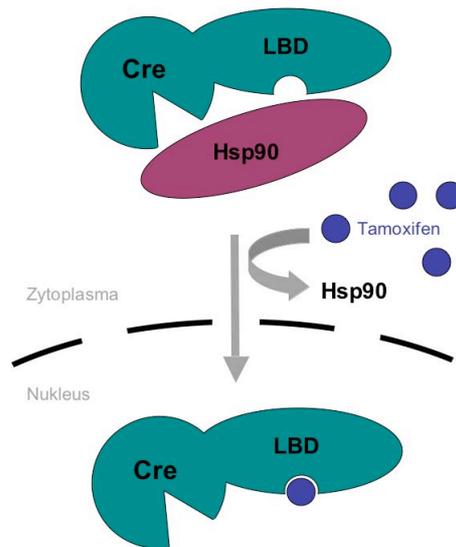


Abb. 1.21: Modell der Aktivierung der CreER-Rekombinasen durch Tamoxifen

Das CreER-Fusionsprotein (CreLBD) wird zunächst durch die Bindung des "Heat shock"-Proteins 90 (Hsp90) im Zytoplasma verankert. Die Bindung von Tamoxifen an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) der Rekombinase führt zur Dissoziation des Proteinkomplexes, wodurch das "freigesetzte" Cre-Protein in den Zellkern translozieren und Rekombination katalysieren kann.

1.4 Der Mausstamm mit "geflochten" *Srf*-Allelen: *Srf*^{flex1}

Eine konstitutive, homozygote Deletion des murinen *Srf*-Gens führt zur frühen embryonalen Letalität an Tag E6.5, wobei ein schwerer Gastrulationsdefekt auftritt und keine mesodermalen Zellen nachgewiesen werden können (Arsenian et al. 1998). Um die Rolle von SRF in späteren Phasen der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus zu untersuchen, wurde ein genomisch "gefloxtes" *Srf*-Allel (*Srf*^{flex1}) konstruiert, welches eine konditionale Cre-vermittelte Deletion des *Srf*-Allels ermöglicht (**Abb. 1.22**) (Wiebel et al. 2002).

Die Deletion des *Srf*-Gens umfasst die gesamte kodierende Region des Exon 1. Die erste *loxP*-Sequenz befindet sich im 5'-untranslatierten Bereich, während die zweite *loxP*-Sequenz im Intron 1 des *Srf*-Gens lokalisiert ist (**Abb. 1.22**).

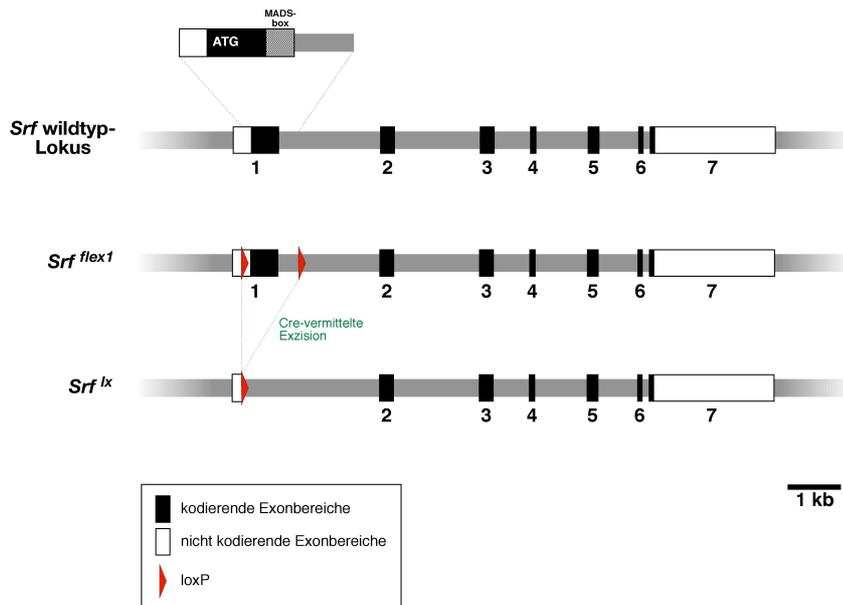


Abb. 1.22: Schematische Darstellung des "gefloxten" *Srf*-Allels (*Srf^{flex1}*) und des durch Cre-vermittelte Rekombination deletierten *Srf^{lx}*-Allels

Im "gefloxten" *Srf^{flex1}*-Allel ist der kodierende Bereich des Exon1 von zwei *loxP*-sites (Dreiecke) flankiert. Cre-vermittelte Rekombination führt zur Exzision des kodierenden Exon1 und damit zur Generierung des deletierten *Srf^{lx}*-Allels. Die Nummern geben die jeweiligen Exons des *Srf*-Gens an.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der bereits klar beschriebenen essentiellen Funktion von SRF sowohl in der Entwicklung, als auch in der Funktion von Herz- und Skelettmuskelzellen, wurde SRF als zentraler Transkriptionsfaktor der Muskelzelle identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die noch unbekannte physiologische Funktion von SRF in adulten Glattmuskelzellen *in vivo* untersucht werden.

Dazu sollte eine zeitlich-induzierbare, Glattmuskel-spezifische, SRF-defiziente Mauslinie generiert und phänotypisch analysiert werden. Um dies zu erreichen, sollte der Mausstamm mit "gefloxtem" Exon1 des *Srf*-Gens (*Srf^{flex1}*) (Wiebel et al. 2002) mit einer transgenen Cre-Mauslinie [*SM22-CreER^{T2}(ki)*] gekreuzt werden, welche eine induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *SM22α*-Promotors ausschließlich in Glattmuskelzellen exprimiert (Kuhbandner et al. 2000). Unter Verwendung der so hergestellten induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mauslinie sollten anhand physiologischer, zellulärer und molekularbiologischer Analysen die phänotypischen Auswirkungen der SRF-Defizienz in adulten Glattmuskelzellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Die *Srf*^{flex1}-Mauslinie

Die Mauslinie mit “geflochten” *Srf*-Allelen (*Srf*^{flex1}, für “floxed exon 1”) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Nordheim generiert, in dessen Genom der kodierende Bereich des Exons1 des *Srf*-Gens durch zwei gleich orientierte *loxP*-Erkennungssequenzen flankiert ist (**Abb. 2.1**) (Wiebel et al. 2002). Diese genetische Modifikation erlaubt eine konditionale Mutagenese des *Srf*-Gens mithilfe des *Cre/loxP*-Rekombinationssystems. Die *Cre*-vermittelte Rekombination des “geflochten” *Srf*-Lokus verursacht eine vergleichbare Deletion des *Srf*-Gens, die bereits in der konstitutiven *Srf*-“*knockout*“-Mauslinie beschrieben wurde (Arsenian et al. 1998). Die Mäuse hatten einen reinen C57BL/6N Hintergrund und wurden während dieser Arbeit mit dem Auszuchtstamm NMRI (Charles River Laboratories, Germany) auf einen gemischten genetischen Hintergrund gekreuzt (C57BL/6N-NMRI).

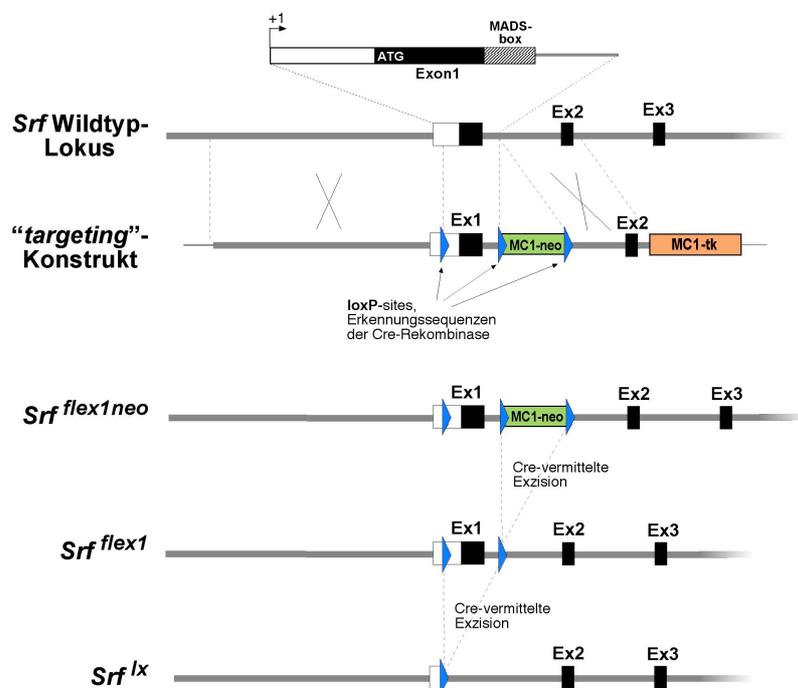


Abb. 2.1: “Targeting” Strategie zur Generierung des *Srf*^{flex1}-Allels

Ex1: Exon 1; Ex2: Exon 2; Ex3: Exon 3 des *Srf*-Gens. +1 gibt die Startstelle der Transkription an. Die Dreiecke symbolisieren die *loxP*-Erkennungssequenzen für die *Cre*-Rekombinase (modifiziert nach Wiebel et al., 2002).

2.1.2 Die Glattmuskel-spezifische Cre-Mauslinie [*SM22-CreER^{T2}(ki)*]

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Feil wurde eine transgene Mauslinie generiert [*SM22-CreER^{T2}(ki)*], die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase, CreER^{T2}, unter der Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen *SM22 α* -Promotors exprimiert (**Abb. 2.2**) (Kuhbandner et al. 2000). Intraperitoneale Applikation von Tamoxifen erlaubt eine zeitlich kontrollierbare, Glattmuskel-spezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase. Die transgene Mauslinie hatte einen reinen C57BL/6 Hintergrund und wurden im Laufe dieser Arbeit mit dem Auszuchtstamm NMRI (Charles River Laboratories, Germany) auf einen gemischten genetischen Hintergrund gekreuzt (C57BL/6N-NMRI).

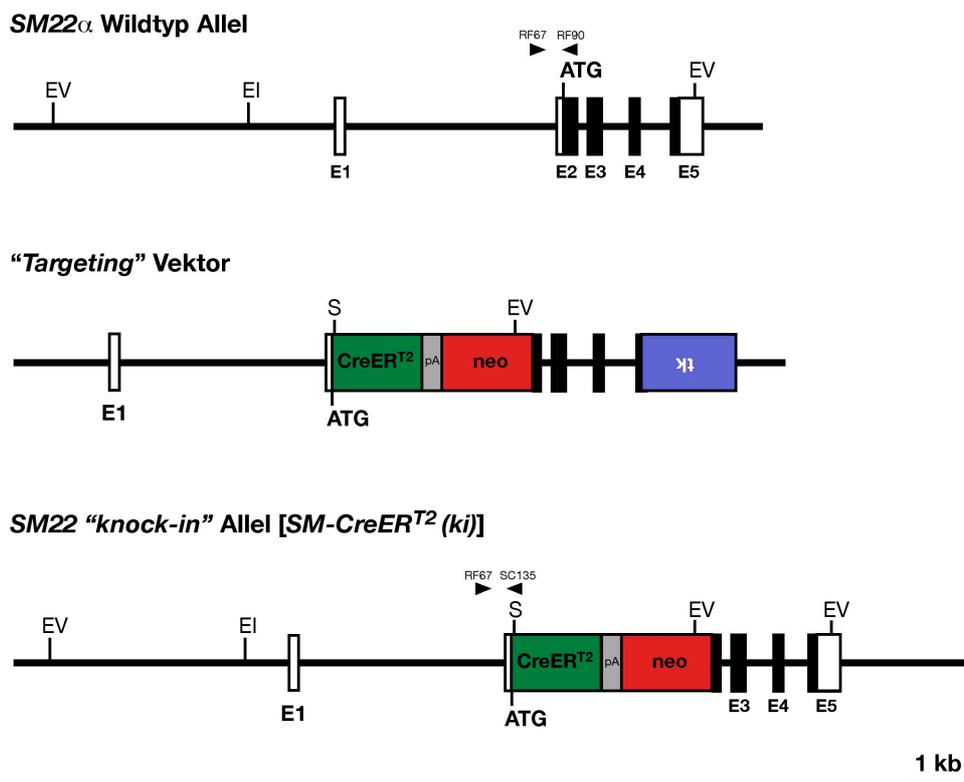


Abb. 2.2: “Targeting” Strategie zur Generierung des *SM22-CreER^{T2}”knock-in”-Allels* (modifiziert nach Kühbandner et al., 2000)

2.1.3 Genotyp-basiertes Zuchtschema zur Generierung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer, Tamoxifen-induzierbarer *Srf*-Deletion

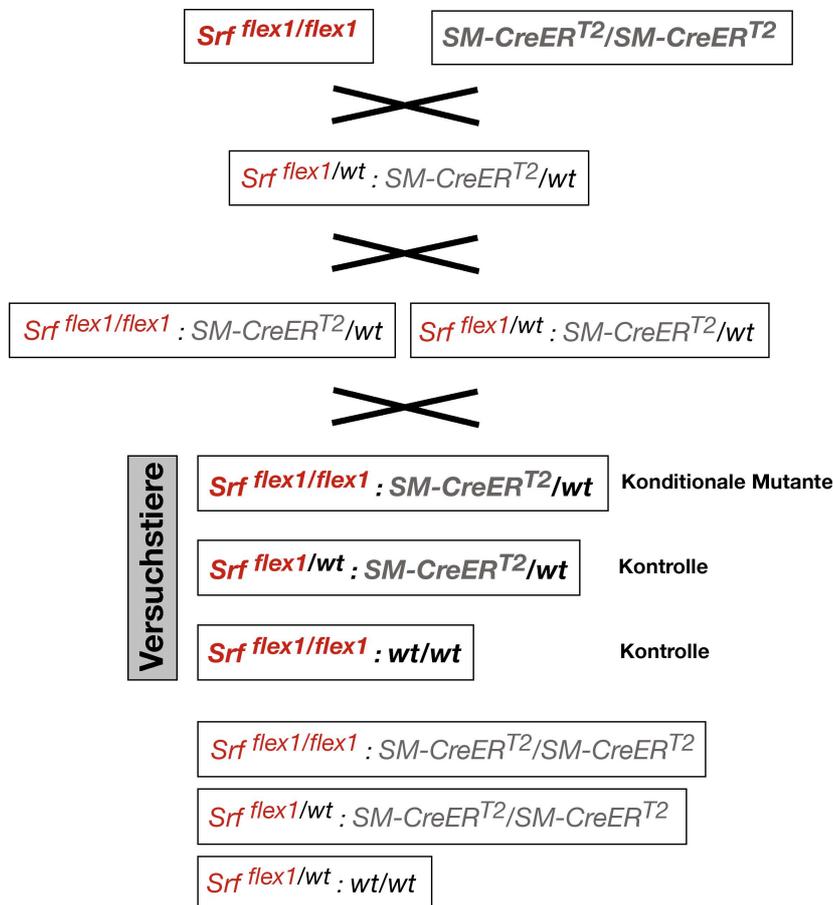


Abb. 2.3: Genotyp-basiertes Zuchtschema zur Generierung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer, Tamoxifen-induzierbarer *Srf*-Deletion

2.1.4 Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden, den Anforderungen entsprechend, in einer geeigneten Tierhaltung des Instituts für Zellbiologie im Verfügungsgebäude der Universität Tübingen gehalten. Zur Zucht wurden meist zwei weibliche Tiere mit geeignetem Alter (ab 6 Wochen) mit einem Bock (möglichst gleichen Alters) verpaart. Die Nachkommen wurden im Alter von ca. 20 Tagen abgesetzt und mittels PCR-Analyse mit DNA aus Schwanzspitzenbiopsien genotypisiert.

2.2 Generierung Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*-Mäuse

2.2.1 Präparation und Verabreichung von Tamoxifen

Reagenzien:

Tamoxifen (free-base, Sigma)	100 mg
Ethanol (p.a.)	400 µl
Sonnenblumenöl (handelsüblich)	9.6 ml

Das Tamoxifen wurde in Ethanol resuspendiert bis alle Verklumpungen gelöst waren. Nach Zugabe von Sonnenblumenöl wurde das Gemisch auf Eis für ca. 2 min zur vollständigen Lösung sonifiziert (50% Pulslänge, Leistung 5; Branson Sonifier® W-250). Die Tamoxifensuspension (10 mg/ml) wurde in geeigneten Aliquots bei –20°C bis zu maximal 4 Wochen gelagert.

Applikation von Tamoxifen:

Den Versuchstieren wurden im Alter von 6 bis 12 Wochen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je 1 mg Tamoxifen (100 µl der Tamoxifensuspension) oder 100 µl Sonnenblumenöl (Vehikel-Kontrolle) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Mäuse wurden nach durchschnittlich 5-7 Tagen mit deutlich ausgeprägtem Phänotyp mittels CO₂ getötet und weiteren Analysen unterzogen.

2.3 Analyse genetisch veränderter Mäuse

2.3.1 Genotypisierung genetisch veränderter Mäuse mittels PCR

2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Gewebe

Lösungen:

“Tail-Lysis”-Puffer	100 mM	Tris-Cl, pH 8.3
	200 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	0.2 %	SDS
	Zugabe von Proteinase K (final: 200 µg/ml)	

Proteinase K (Roche) aus *Pichia pastoris*, ~15 mg/ml in Lösung

Zur Genotypisierung gezüchteter, genetisch veränderter Mäusen wurde den Tieren ca. 0.3-0.5 cm der Schwanzspitze amputiert und in 300 µl “Tail-Lysis”-Puffer inkl. Proteinase K über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach gründlichem Vortexen wurde das Schwanzspitzen-Lysat für 15 min bei 98°C zur Inaktivierung der Proteinase K erhitzt, anschließend 3 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und als “*template*” in der PCR Reaktion eingesetzt.

Zur Analyse der Rekombination des *Srf*-Allels in verschiedenen Geweben wurden die Gewebeprouben in 500 µl “Tail-Lysis”-Puffer inkl. Proteinase K über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach gründlichem Vortexen wurde die DNA aus dem Gewebelysat aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.1.2). Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wurde die DNA als “*template*” in der PCR Reaktion eingesetzt.

2.3.1.2 Aufreinigung von genomischer DNA aus Gewebelysaten

Zur Analyse der Rekombination in verschiedenen Geweben mittels PCR wurde die genomische DNA aus dem Gewebelysat gefällt und als *“template”* in der PCR-Analyse eingesetzt.

Reagenzien:

5 M NaCl

Isopropanol

70% Ethanol (p.a.)

10 mM Tris, pH 8.0

Die Gewebelysate wurden gründlich gevortext, für 3 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Nach Zugabe von 200 µl 5 M NaCl-Lösung und gründlicher Mischung wurden 600 µl Isopropanol dazugegeben und durch mehrmaliges Invertieren die DNA gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm), mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und in einem geeigneten Volumen (100-300 µl) 10 mM Tris, pH 8.0 unter Schütteln gelöst (10 min bei 65°C, 1 h bei 37°C). Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bei -20°C.

2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Ultraspec 3000, Pharmacia). Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem verwendeten Verdünnungsfaktor und einem für DNA oder RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1.0

→ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA

→ 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

Aus dem Verhältnis der OD_{260}/OD_{280} erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Nukleinsäurelösung:

Reine DNA-Lösung: $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$

Reine RNA-Lösung: $OD_{260}/OD_{280} \geq 2.0$

2.3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung transgener Mauslinien

Allgemeine Lösungen und Reagenzien:

10xRed Hot[®]-Reaktionspuffer 750 mM Tris-Cl, pH 8.8

(Abgene) 200 mM $(NH_4)_2SO_4$
15 mM $MgCl_2$
0.1% (v/v) Tween[®]20

$MgCl_2$ (Perkin Elmer) 25 mM

DMSO (Sigma) 99.5% GC

dNTPs (Promega) 10 mM dATP
10 mM dCTP
10 mM dGTP
10 mM dTTP
in H_2O_{bidest}

Primer (Purimex) 100 μM

Red Hot[®] DNA-Polymerase (Abgene) 1 U/ μl

2.3.1.4.1 Genotypisierung des *Srf*-Lokus

Zur Genotypisierung des *Srf*-Lokus wurde das Primerpaar *Aw-MADS/Bw-3pri* (Sequenzen siehe Abschnitt 2.4.1) verwendet (Wiebel et al. 2002). Abbildung 2.4 zeigt schematisch die PCR-Strategie mit den erwarteten Fragmentgrößen. Das *Srf*-Wildtyp-Allel ist durch das 0.65 kb-Fragment, das *Srf*^{*flex1*}-Allel durch das 0.73 kb-Fragment repräsentiert.

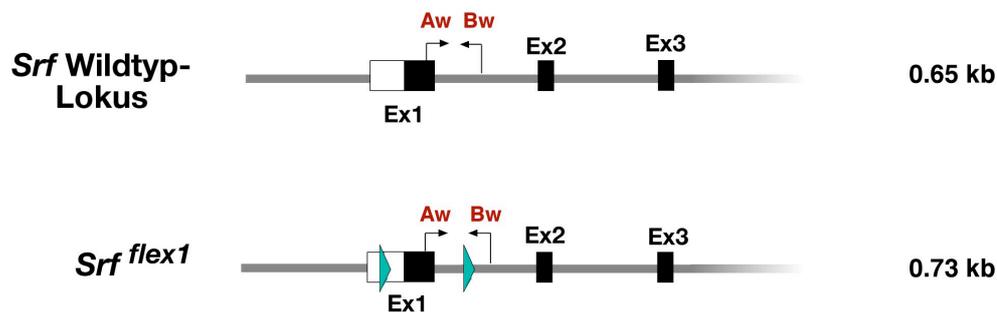


Abb. 2.4: Graphische Darstellung des *Srf*-Wildtyp- und des *Srf*^{*flex1*}-Allels mit entsprechender PCR-Strategie und resultierenden PCR-Fragmentgrößen.

Aw: Primer *Aw-MADS*, (E); Bw: Primer *Bw-3pri*, (R), (modifiziert nach Wiebel, Rennekampff et al., 2002).

PCR-Reaktionsansatz: 50 µl

H₂O_{bidest}	34,2 µl	
10xRed Hot[®]-Reaktionspuffer	5 µl	10% (v/v)
MgCl₂	0.8 µl	0.4 mM
DMSO	2.5 µl	5% (v/v)
dNTPs	1 µl	0.2 mM of each dNTP
Primer <i>Aw-MADS</i>	1.5 µl	0.3 µM
Primer <i>Bw-3pri</i>	1.5 µl	0.3 µM
Template	1.5 µl	3% (v/v)
Red Hot[®]-Polymerase	2.0 µl	2.0 U

Das PCR-Programm setzte sich aus vier Segmenten zusammen. Segment 2 durchlief 35 Zyklen.

Segment 1:	94°C	2 min	
Segment 2:	94°C	30 sec	(35 Zyklen)
	65°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Segment 3:	72°C	7 min	
Segment 4:	4°C	∞	

Zur Auswertung wurden die PCR-Fragmente nach der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel) analysiert.

2.3.1.4.2 Genotypisierung des *SM22 α* -Lokus

Zur Unterscheidung des *SM22 α* -Wildtyp- und des *SM-CreER^{T2}(ki)*-Lokus wurden in der PCR-Reaktion die Primer *RF67*, *RF90* und *SC135* (Sequenzen siehe Abschnitt 2.4.1) verwendet (Kuhbandner et al. 2000). Die Position der Primer ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Das *SM22 α* -Wildtyp-Allel wird durch ein amplifiziertes 280 bp-Fragment, das *SM-CreER^{T2}(ki)*-Allel durch ein 220 bp-Fragment repräsentiert.

PCR-Reaktionsansatz: 50 μ l

H₂O_{bidest}	36 μ l	
10xRed Hot[®]-Reaktionspuffer	5 μ l	10% (v/v)
dNTPs	1 μ l	0.2 mM of each dNTP
Primer <i>RF67</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Primer <i>RF90</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Primer <i>SC135</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Template	1.5 μ l	3% (v/v)
Red Hot[®]-Polymerase	2.0 μ l	2.0 U

Das PCR-Programm setzte sich aus vier Segmenten zusammen. Segment 2 durchlief 33 Zyklen.

Segment 1:	94°C	2 min	
Segment 2:	94°C	30 sec	(33 Zyklen)
	60°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Segment 3:	72°C	7 min	
Segment 4:	4°C	∞	

Zur Auswertung wurden die PCR-Fragmente nach der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel) analysiert.

2.3.1.5 Rekombinationsanalyse des *Srf^{flex1}*-Lokus mittels PCR

2.3.1.5.1 PCR-Analyse mit Primerpaar *Lw-lox* und *Bw-3pri*

Zur Feststellung des Grades der Cre-vermittelten Rekombination des *Srf^{flex1}*-Lokus wurde eine PCR-Analyse mit Primern durchgeführt, die eine Unterscheidung des nicht-rekombinierten *Srf^{flex1}*-Allels und des deletierten Allels (*Srf^{lx}*) ermöglicht. Dabei repräsentiert die Amplifikation des 1.34 kb-Fragments den undeletierten *Srf^{flex1}*-Lokus, während nach Rekombination ein 380 bp-Fragment amplifiziert wird (**Abb. 2.5**).

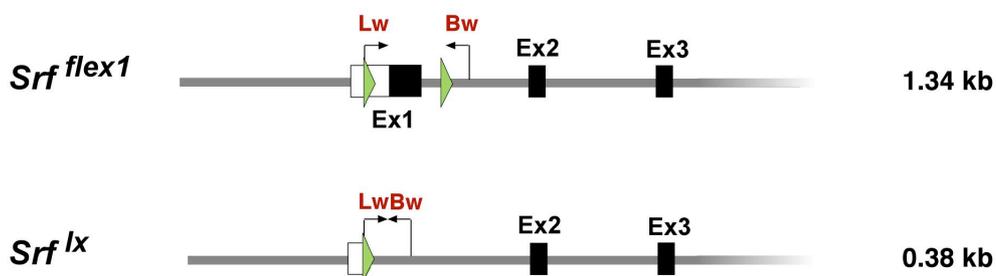


Abb. 2.5: Graphische Darstellung des *Srf^{flex1}*-Lokus vor und nach Cre-vermittelter Rekombination mit entsprechender Lw-Bw-PCR-Strategie.

Lw: Primer *Lw-lox* (L), Bw: Primer *Bw-3pri* (R), (modifiziert nach Wiebel et al., 2002).

PCR-Reaktionsansatz: 40µl

H₂O_{bidest}	26.9 µl	
10xRed Hot[®]-Reaktionspuffer	4 µl	10% (v/v)
DMSO	2 µl	5% (v/v)
dNTPs	1.2 µl	0.3 mM of each dNTP
Primer <i>Lw-lox</i>	1.2 µl	0.3 µM
Primer <i>Bw-3pri</i>	1.2 µl	0.3 µM
Template	1.5 µl	3.75% (v/v)
Red Hot[®]-Polymerase	2.0 µl	2.0 U

Das PCR-Programm setzte sich aus vier Segmenten zusammen. Segment 2 durchlief 38 Zyklen.

Segment 1:	94°C	2 min	
Segment 2:	94°C	30 sec	(38 Zyklen)
	63°C	30 sec	
	72°C	70 sec	
Segment 3:	72°C	7 min	
Segment 4:	4°C	∞	

Zur Auswertung wurden die PCR-Fragmente nach der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) analysiert.

2.3.1.5.2 PCR-Analyse mit Primern *Srf-KO8-fw*, *Srf-KO8-bw* und *Lox2*

Eine weitere Strategie zur Analyse der Rekombination des *Srf^{flex1}*-Lokus stellt die PCR mit Verwendung der Primer *Srf-KO8-fw*, *Srf-KO8-bw* und *Lox2* dar (Sequenzen siehe Abschnitt 2.4.1). Hierbei wird vom nicht-rekombinierten *Srf^{flex1}*-Lokus ein 244 bp- und, unter optimalen PCR-Bedingungen, ein 1.04 kb-Fragment amplifiziert, während nach Deletion des *Srf^{flex1}*-Allels ein 110 bp-Amplikon entsteht (**Abb. 2.6**). Der Vorteil dieser PCR besteht darin, dass die je nach Locus entstehenden Amplikons eine vergleichbare

Länge aufweisen. Somit kann eine Bevorzugung der Amplifikation eines kürzeren PCR-Produkts innerhalb der Reaktion ausgeschlossen werden, was einer Verfälschung der Ergebnisse entgegenwirkt.

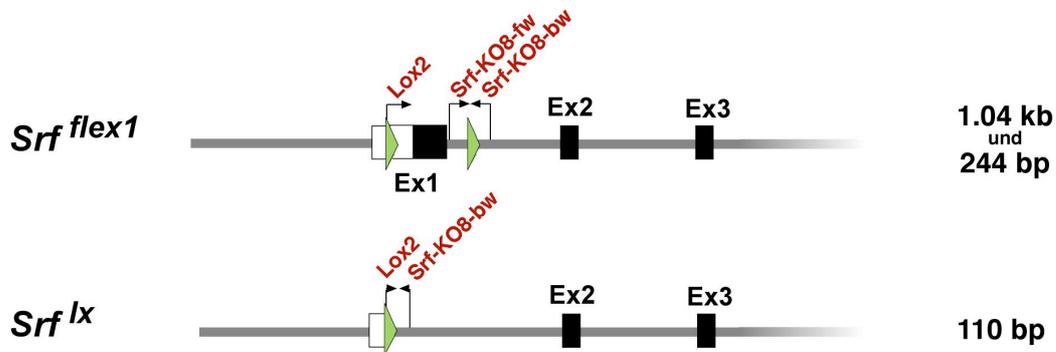


Abb. 2.6: Graphische Darstellung des *Srf^{flex1}*-Lokus vor und nach Cre-vermittelter Rekombination mit entsprechender PCR-Strategie unter Verwendung der Primer *Srf-KO8-fw*, *Srf-KO8-bw* und *Lox2*.

PCR-Reaktionsansatz: 50 μ l

H₂O_{bidest}	33.5 μ l	
10\timesRed Hot[®]-Reaktionspuffer	5 μ l	10% (v/v)
DMSO	2.5 μ l	5% (v/v)
dNTPs	1 μ l	0.3 mM of each dNTP
Primer <i>Srf-KO8-fw</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Primer <i>Srf-KO8-bw</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Primer <i>Lox2</i>	1.5 μ l	0.3 μ M
Template	1.5 μ l	3.75% (v/v)
Red Hot[®]-Polymerase	2.0 μ l	2.0 U

Das PCR-Programm setzte sich aus vier Segmenten zusammen. Segment 2 durchlief 33 Zyklen.

Segment 1:	94°C	2 min	
Segment 2:	94°C	30 sec	(33 Zyklen)
	60°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Segment 3:	72°C	7 min	
Segment 4:	4°C	∞	

Zur Auswertung wurden die PCR-Fragmente nach der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) analysiert.

2.3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurden die amplifizierten PCR-Produkte mittels einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese (1-2%ige Agarosegele, je nach erwarteter Fragmentgrößen) analysiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden 500 ng eines DNA-Längenstandards (*“DNA ladder“*) aufgetragen. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese wurde 1×TAE-Puffer verwendet. Die angelegte Spannung betrug 10 V pro cm der Gelkammer. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

Reagenzien:

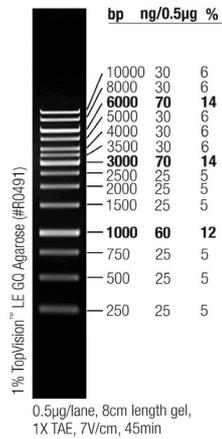
Agarose (Invitrogen)	Ultra Pure, <i>electrophoresis grade</i>
50×TAE	2 M Tris-Base (Sigma) 5,71% (v/v) Essigsäure (AppliChem) 50 mM Na ₂ EDTA, pH 8.0 (AppliChem)

Ethidiumbromid (AppliChem) 1%ige Stammlösung (10 mg/ml)

**1 kb-DNA Größenstandard
(GeneRuler™, Fermentas)**

DNA-Fragmentlängen (in bp):

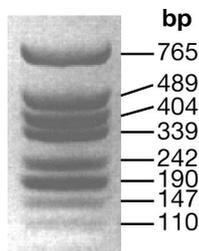
10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500,
2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.



**DNA-Größenstandard
(selbst hergestellt)**

DNA-Fragmentlängen (in bp):

765, 489, 404, 339, 242, 190, 147, 110



Die Agarose (1-2%, je nach Anwendung) wurde in 1xTAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml Agaroselösung konnte das Gel gegossen werden.

2.3.2 Analyse von RNA aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen

2.3.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen

Gesamt-RNA wurde aus den homogenisierten Gewebe- oder Glattmuskelzell-Extrakten mit Hilfe des *RNeasy*[®]-Kits (QIAGEN) isoliert.

2.3.2.1.1 Stabilisierung von RNA aus Gewebe mittels *RNAlater*

***RNAlater*:** 25 mM Natriumcitrat (AppliChem)
 (100 ml) 10 mM EDTA (AppliChem)
 70 g Ammoniumsulfat (Merck)
 in H₂O_{bidest}
 pH 5.2

Natriumcitrat und EDTA wurden in H₂O_{bidest} gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes wurde das Endvolumen der Lösung eingestellt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von Ammoniumsulfat. Zur Stabilisierung von RNA im Gewebe wurden die entnommenen Gewebeproben (ca. 30-50 mg) in kalte *RNAlater*-Lösung (mind. 10-faches Volumen) gegeben und 24 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die langfristige Lagerung des isolierten Gewebes in *RNAlater* erfolgte bei –80°C.

2.3.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *RNAlater*-stabilisierten Geweben mittels des *RNeasy*[®]-Kits (QIAGEN)

Reagenzien:

70% Ethanol (p.a.)

***RNeasy*[®]-Kit (QIAGEN) mit:**

Puffer RLT Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben.

Vor der Verwendung:

Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT Puffer

Puffer RW1 Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben

Puffer RPE Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben
RNase-freies H₂O

Das *RNAlater*-stabilisierte Gewebe (max. 30 mg) wurde zunächst in 600 µl RLT-Puffer inkl. β-Mercaptoethanol mittels eines Homogenisators (Polytron, Kinematica AG) bei 4°C vollständig homogenisiert. Nach Zentrifugation (3 min, 13000 rpm) wurde der Überstand 1:1 mit 70% Ethanol versetzt und die RNA durch Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm an die Silicamembran der *RNeasy*[®] Säulen gebunden. Danach wurde die Membran mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran getrocknet. Schließlich wurde die gereinigte RNA mit 40-50 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 rpm von der Säule eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –80°C.

2.3.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herz, Muskel und Haut mittels des *RNeasy*[®]-Kits (QIAGEN)

Isolierung von Gesamt-RNA von Muskel- und Hautgewebe gestaltet sich aufgrund des hohen Anteils an kontraktilen Proteinen, Kollagen und Bindegewebe schwierig. Daher wurde für diese Gewebetypen ein spezielles Protokoll verwendet, in welchem diese störende Proteine vor der eigentlichen RNA-Isolierung entfernt wurden (vgl. *RNeasy Mini Handbook*, Third Edition, Appendix C, QIAGEN).

Reagenzien:

Proteinase K (Roche) aus *Pichia pastoris*, ~15 mg/ml in Lösung
100% Ethanol (p.a.)
RNeasy[®]-Kit (QIAGEN)

Das *RNAlater*-stabilisierte Gewebe (max. 30 mg) wurde zunächst in 300 µl RLT-Puffer inkl. β-Mercaptoethanol mittels eines Homogenisators (Polytron, Kinematica AG) bei 4°C vollständig homogenisiert. Nach Zentrifugation der Gewebelysate erfolgte ein

Proteinase K-Verdau, indem dem Überstand 590 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 10 μl Proteinase K zugegeben wurde. Der Verdau wurde bei 55°C für 15 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 10000 rpm). Zu dem Überstand (ca. 900 μl) wurden 450 μl 100% Ethanol gegeben. Es folgten die bereits in Abschnitt 2.3.2.1.2 beschriebenen Arbeitsschritte zur RNA-Isolierung.

2.3.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus primären Glattmuskelzellen mittels des RNeasy®-Kits (QIAGEN)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus primären Glattmuskelzellen erfolgte von konfluent bewachsenen 6-well-Platten. Zur Zellernte und -lyse wurden 350 μl RLT-Puffer inkl. β -Mercaptoethanol direkt auf die Zellkulturschale pipettiert und das Zelllysat mit einem Zellkulturschaber geerntet. Nach Homogenisieren des Lysats mittels Zentrifugation durch eine QIAshredder Säule (QIAGEN) wurden 350 μl 70% Ethanol zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und anschließend auf die RNeasy® Säulen übertragen. Es folgten die bereits in Abschnitt 2.3.2.1.2 beschriebenen Arbeitsschritte zur RNA-Isolierung.

2.3.2.2 DNase I-Verdau von RNA-Lösungen

Um mögliche Kontaminationen der RNA-Lösungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde nach der RNA-Isolierung ein DNase I-Verdau durchgeführt.

Reagenzien:

10×DNase I-Puffer	400 mM Tris-Cl, pH 7.5
	100 mM NaCl
	60 mM MgCl_2

DNase I (RNase-frei, Roche)	10 U/ μl
------------------------------------	---------------------

Der RNA-Lösung wurde 1×DNase I-Puffer und 10 Units DNase I pro 50 µl RNA-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C mit anschließendem Inaktivierungsschritt für 20 min bei 65°C.

Im Anschluss wurde die Konzentration und die Reinheit der RNA-Lösung photometrisch bestimmt. Dazu wurde eine 1:40 Verdünnung der RNA-Lösung in Wasser hergestellt.

2.3.2.3 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurden zwei verschiedene Strategien angewandt:

- cDNA-Synthese mit Oligo-*dT*₁₅-Primern
- cDNA-Synthese mit "*Random-Hexamer*"-Primern (*dN*₆)

Für Primerpaare, die in der Nähe des 5'-Endes des analysierten Genes liegen, ist es von Vorteil, die cDNA-Synthese mit "*Random-Hexamer*"-Primern durchzuführen, da die Gefahr eines Strangbruchs bei langen transkribierten Fragmenten unter Verwendung von Oligo-*dT*-Primern, welche am 3'-*Poly-A*-Ende binden, relativ hoch ist.

Reagenzien:

M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)	200 U/µl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 200 mM NaCl 0.1 mM EDTA 1 mM DTT 0.01% Nonidet [®] P-40 50% (v/v) Glycerol
5×MLV-RT Puffer (Promega)	250 mM Tris/HCl, pH 8.3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 50 mM DTT

RNase-Inhibitor (Fermentas)	40 U/ μ l
Oligo-dT (Purimex)	(dT) ₁₅ 500 ng/ml (\approx 100 μ M)
“Random Hexamer” (Purimex)	(dN) ₆ ; 100 μ M
dNTPs (Promega)	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP in H ₂ O _{bidest}

Zu 1 μ g RNA wurde 1 μ l Oligo-(dT)₁₅- bzw. 5 μ l “Random-Hexamer“-Primer gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 12.5 μ l aufgefüllt. Die Lösung wurde zur Zerstörung von RNA-Sekundärstrukturen und zur Bindung der Primer für 10 min auf 70°C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Dieser Ansatz wurde mit 4 μ l 5 \times MLV-RT Puffer, 1 μ l dNTP-Lösung und 0.5 μ l RNase-Inhibitor versehen und für 2 min auf 42°C erwärmt (*hot start*). 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase wurde zur Reaktion, nicht aber zur Kontrollreaktion zum Nachweis von Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA, hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 50 min, gefolgt von Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min. Nach Abkühlen auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurde die cDNA-Lösung und die Negativkontrolle mit 30 μ l Wasser auf 50 μ l Endvolumen verdünnt. Die Lagerung der cDNA-Lösungen erfolgte bei -20°C.

2.3.2.4 Semi-quantitative RT-PCR

Nach erfolgreicher RNA-Isolierung mit anschließendem DNaseI-Verdau wurde die synthetisierte cDNA als “*template*” für die semi-quantitative RT-PCR eingesetzt. Diese wurde mittels SYBR[®] Green-Technologie (Applied Biosystems) in Kombination mit dem ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) durchgeführt und

erlaubt eine kontinuierliche Quantifizierung der im Laufe der PCR gebildeten Produktmenge.

Reagenzien:

cDNA-Lösung

2×Power SYBR[®] Green PCR Mastermix (Applied Biosystems)

RT-PCR-Primer Sequenzen siehe Abschnitt 2.4.2

Es wurden stets 10 µl Ansätze angesetzt, die sich aus 5 µl 2×SYBR[®] Green PCR Master Mix, 300 nM Primer-A, 300 nM Primer-B und 2 µl cDNA-Lösung zusammensetzten. Alle cDNA-Ansätze wurden in Duplikaten gemessen. Für jede cDNA wurden neben den Ansätzen mit den Primerpaaren für die jeweiligen Zielsequenzen, entsprechenden Ansätze mit einem Primerpaar für eine Referenzsequenz (*GAPDH*) angesetzt, die bei der späteren Auswertung als interne Standards für die relative Konzentration einer Zielsequenz dienen. Außerdem wurden die zu den cDNA gehörigen Negativkontrollen (cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase) mit dem jeweiligen Primerpaar der Zielsequenz angesetzt. Die Ansätze wurden in ThermoFast[®]-96-Loch-Mikrotiterplatten (Abgene) pipettiert, versiegelt, abzentrifugiert (Heraeus megafuge 2.0 R) und zur PCR im *ABI Prism 7000 Sequence Detector* (Applied Biosystems) eingesetzt. Das PCR-Programm setzte sich aus drei Segmenten zusammen:

Segment 1 : 50°C für 2 min

Segment 2: 95°C für 10 min

Segment 3: 95°C für 15 sec, dann 60°C für 1 min

Segment 3 wurde 40 mal durchlaufen.

Die PCR wurde mit der "7000 System SDS 1.2.3"-Software ausgewertet.

Die Quantifizierung des gebildeten Produkts beruht auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR[®] Green an doppelsträngige DNA, die eine verstärkte Fluoreszenz hervorruft. Durch Messen der Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus lässt sich der Verlauf der PCR kontinuierlich verfolgen. Graphische Auftragung der Fluoreszenz

gegen die Zahl der Amplifikationszyklen ergibt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, da die PCR gegen Ende nicht länger exponentiell verläuft und schließlich zum Erliegen kommt. Zur Auswertung wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert definiert. Erreicht die Fluoreszenz den Schwellenwert wird die dazugehörige Zyklenzahl abgelesen. Dies ergibt den so genannten C_t -Wert (*cycle threshold*).

Durch die verwendeten PCR-Bedingungen, besonders durch die geringe Länge der gewählten Amplikons (<200 bp), ist die Vollständigkeit jedes Amplifikationszyklus generell gewährleistet, d.h. mit jedem Zyklus verdoppelt sich im Idealfall die Menge des PCR-Produkts. Dies ermöglicht es, aus dem C_t -Wert die relative Konzentration der Zielsequenz zu bestimmen. Dazu wird der ΔC_t -Wert berechnet:

$$C_t (\text{Zielsequenz}) - C_t (\text{Referenzsequenz}) = \Delta C_t$$

Ein positiver ΔC_t -Wert zeigt an, dass in der cDNA-Lösung weniger Zielsequenz als Referenzsequenz vorhanden war. Wegen der Verdopplung des PCR-Produkts mit jedem Zyklus lässt sich das Verhältnis von Ziel- und Referenzsequenz durch

$$\text{Konzentration}_{(\text{Zielsequenz})} / \text{Konzentration}_{(\text{Referenzsequenz})} = 2^{-\Delta C_t}$$

ausdrücken. Der so erhaltene, dimensionslose Wert stellt die Konzentration einer Zielsequenz relativ zur Referenzsequenz dar.

Sofern die cDNA-Lösung frei von Verunreinigungen mit genomischer DNA ist, lässt sich von den relativen Konzentrationen einer Zielsequenz auf die relative Konzentration der entsprechenden mRNA im ursprünglichen Zellextrakt schließen. Dies wird als gegeben angesehen, wenn der für eine cDNA-Lösung mit Primern für die Referenz gemessene C_t -Wert um mindestens den Wert 10 kleiner war als der C_t -Wert der zugehörigen Negativkontrolle mit der gleichen Primern, d.h. wenn die Ausgangskonzentration der Referenzsequenz in der Negativkontrolle weniger als 1‰ der Ausgangskonzentration der Referenzsequenz in der cDNA-Lösung betrug.

2.3.3 Analyse von Proteinen aus Gewebe und primären Glattmuskelzellen

2.3.3.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Proteinlysate wurden durch Homogenisieren (Polytron, Kinematica AG) von Gewebeproben in Protein-Extraktionspuffer hergestellt.

Protein-Extraktionspuffer 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
 100 mM NaCl
 + Zugabe von Protease-Inhibitoren vor Verwendung
 (siehe Tabelle 2.1)

Inhibitor	Stammlösung	Volumen an Stammlösung pro ml Extraktionspuffer	Endkonzentration
DTT	100 mM ^{1,4}	25 µl	2.5 mM
EDTA	500 mM ¹	5 µl	2.5 mM
Benzamidin	200 mM ^{1,3}	12.5 µl	2.5 mM
PMSF	100 mM ^{2,4}	25 µl	2.5 mM
Leupeptin	1 mg/ml ^{2,4}	1 µl	1 µg/ml

¹In H₂O_{bidest} ²in Ethanol ³Lagerung bei 4°C ⁴Lagerung bei -20°C

Tabelle 2.1: Protease-Inhibitoren mit verwendeten Konzentrationen

Die Gewebeproben (ca. 100 mg) wurden in 300-600 µl Protein-Extraktionspuffer homogenisiert (Polytron, Kinematica AG), anschließend für 30 min bei 14000 rpm, 4°C abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

2.3.3.2 Proteinisolierung aus primären Glattmuskelzellen

Proteinextrakte primärer Glattmuskelzellen wurden durch Fällung der Proteine aus dem ersten Durchfluss durch die *RNeasy*[®] Säulen während der RNA-Isolation hergestellt.

Reagenzien:

Aceton (VWR)

Harnstoff-Puffer 9 M Urea (AppliChem)
 4% (w/v) CHAPS (AppliChem)
 1% DTT (AppliChem)

Die Proteine wurden durch Zugabe von ca. 1.5 ml Aceton zu dem Durchfluss aus der RNA-Präparation (ca. 700 µl) und anschließender Inkubation bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (30 min bei 14000 rpm, 4°C) wurden die gefällten Proteine in 50-100 µl Urea-Puffer gelöst. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C .

2.3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Reagenzien:

Bradford-Reagenz 20% (v/v) Bradford 5×Farbstoff-Konzentrat (BioRad)
 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$; gefiltert

BSA-Stammlösung 100 mg/ml BSA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinextrakten wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Dafür wurde das Bradford-Reagenz (Biorad) 1:5 mit Wasser verdünnt und gefiltert. 30 µl des BSA-Eichstandards bzw. der Proben wurden 1:1 mit 0.1 M HCl gemischt und mit 240 µl Wasser verdünnt. 25 µl dieser Mischung wurden mit 875 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Für die

Referenzmessung wurde der verwendete Lysepuffer auf die gleiche Weise behandelt. Zur Ermittlung absoluter Proteinkonzentrationen wurde eine Eichkurve herangezogen, die mit bekannten BSA-Konzentrationen ermittelt wurde.

2.3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

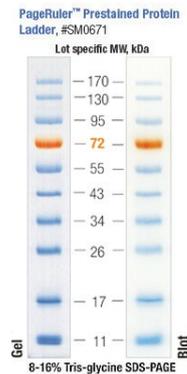
Reagenzien:

Acrylamid-Lösung 40% (AppliChem) Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 29:1

“Upper Tris”	0.5 M Tris-HCl 0.4 % SDS in H ₂ O _{bidest} pH 6.8
“Lower Tris”	1.5 M Tris-HCl 0.4 % SDS in H ₂ O _{bidest} pH 8.8
10% APS-Lösung	10% (w/v) Ammoniumpersulfat (AppliChem) in H ₂ O _{bidest}
TEMED (AppliChem)	mind. 99%
6xProtein-Ladepuffer	300 mM Tris-HCl, pH 6.8 600 mM β-Mercaptoethanol 6% (w/v) SDS 60 % Glycerol 0.04% Bromphenolblau (gefiltert)

10×SDS-Laufpuffer 250 mM Tris
 1.92 M Glycin
 1% SDS
 in H₂O_{bidest}

Protein-Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Lot-spezifisch
(Fermentas)



Coomassie-Färbelösung 10% (v/v) Essigsäure
 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (G-250)
 in H₂O_{dest}

Coomassie-Entfärbelösung 10% (v/v) Essigsäure
 40% (v/v) Methanol
 in H₂O_{dest}

Es wurde ein diskontinuierliches Lämmli-Gelsystem verwendet (Bio-Rad Apparatur, **Abb. 2.7**). Das Trenngel hatte standardmäßig eine Acrylamidkonzentration von 10% bzw. 12%, das Sammelgel eine Konzentration von 5%.

Trenngel	10%		12%	
	1 Gel (10 ml)	2 Gele (20 ml)	1 Gel (10 ml)	2 Gele (20 ml)
H ₂ O	5 ml	10 ml	4.5 ml	9 ml
Lower Tris (final: 375 mM)	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	5 ml
40% Acrylamid (29:1)	2.5 ml	5 ml	3 ml	6 ml
10% APS	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl
TEMED	15 µl	30 µl	15 µl	30 µl

Tabelle 2.2: Zusammensetzung von 10- bzw. 12%igen Trenngelen

Sammelgel	5%	
	1 Gel (7 ml)	2 Gele (14 ml)
H ₂ O	4.3 ml	8.7 ml
Upper Tris (final: 125 mM)	1.75 ml	3.5 ml
40% Acrylamid (29:1)	875 µl	1.75 ml
10% APS	40 µl	80 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Tabelle 2.3: Zusammensetzung von 5%igen-Sammelgelen

Je nach Experiment wurden 20 bis 60 µg Gesamtprotein mit 6×Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl des *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt und kurz nach Herauslaufen der Ladepuffer-Lauffront beendet (ca. 120 min). Im Anschluss wurde das Proteingel für die Western Blot-Analyse verwendet (siehe Abschnitt 2.3.3.5).

2.3.3.5 Western Blot-Analyse

Die Anwesenheit und Expressionsstärke bestimmter Proteine in Zell- und Gewebelysaten wurde durch Western Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteinlysate zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und elektrophoretisch nach dem Nass-Blot-Verfahren vom Proteingel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Proteine konnten durch spezifische Bindung primärer Antikörper, welche durch Enzymgekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzym-Substrat-vermittelte Chemolumineszenz detektiert werden. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper ist unter Abschnitt 2.5 zu finden. Eine gleichmäßige Beladung unterschiedlicher Proteinproben wurde durch eine zweite Antikörperinkubation der Membran mit dem GAPDH-Antikörper nachgewiesen (Ladekontrolle).

Reagenzien:

10xTransfer-Puffer	0.25 M Tris 1.92 M Glycin in H ₂ O _{dest}
1xTransfer-Puffer	1xTransfer-Puffer in H ₂ O inkl. 20% (v/v) Methanol
PVDF Membran (Millipore)	Immobilon-P (0.45 µm)
Filterpapier (Whatman®)	3 mm-Stärke
10xTBS	0.5 M Tris 1.5 M NaCl in H ₂ O _{dest}
TBST	1xTBS 0.1% (v/v) Tween-20

Blockierungs-Lösung	10% Magermilchpulver (AppliChem) in 1×TBST
Chemolumineszenz- HRP-substrat (Millipore)	Immobilon™ Western 50% (v/v) Peroxidase-Lösung 50% (v/v) Luminol-Reagenz
Röntgenfilm (CEA)	RP new, Medical X-ray screen; film blue sensitive

Für den elektrophoretischen Transfer wurde die *“Mini-Trans-Blot-Cell”*-Apparatur von Bio-Rad (**Abb. 2.7**) verwendet. Nach Beenden der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine kurz zuvor in 100% Methanol und anschließend in 1×Transferpuffer getauchte PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde das Proteingel, die Membran, die Filterpapiere und die Schwämme folgendermaßen zusammengebaut. Dabei war darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Komponenten keine Luftblasen befanden:

Schwarze Seite der Transfer-Kassette

- (1) Schwamm
- (2) Whatman-Filterpapier
- (3) Proteingel
- (4) PVDF-Membran
- (5) Whatman-Filterpapier
- (6) Schwamm



Abb. 2.7: *“Mini-Trans-Blot-Cell”*-Apparatur (BioRad)

Helle Seite der Transfer-Kassette

Der Transfer fand in vorgekühltem 1×Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V (60 min) statt (inkl. Eisblock in Transfer-Apparatur). Die Membran wurde mind. 1h in Blockierungs-Lösung inkubiert und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper für eine Stunde bei RT, meist jedoch über Nacht bei 4°C in einem Falconröhrchen unter

Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1×TBST für 15-20 min wurde die PVDF-Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase (*“horseradish peroxidase“*, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) für mind. 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1×TBST für 15-20 min wurde der Blot zur Detektion der Peroxidaseaktivität mit einer 1:1 Mischung aus Peroxidase-Lösung und Luminol-Reagenz (Millipore) für 5 min benetzt. Hiernach wurde die Lumineszenz mit einem Röntgenfilm detektiert.

2.3.3.5.1 Quantifizierung transferierter Proteine

Zur Quantifizierung spezifisch-nachgewiesener Proteine (Western Blot), wurden die entwickelten Röntgenfilme mittels eines Densitometers (*Personal Densitometer SI*, Molecular Dynamics) eingescannt und ausgewertet (*ImageQuant5.1* Software).

2.3.4 Analyse primärer Glattmuskelzellen

2.3.4.1 Isolierung und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen

Primäre Glattmuskelzellen wurden mittels eines enzymatischen Verdaus aus murinen Aorten (vaskuläre Glattmuskelzellen; *v*ascular *s*mooth *m*uscle *c*ells, VSMS) oder aus dem abpräparierten Glattmuskelgewebe des Dickdarms (viszerale Glattmuskelzellen, *colon* SMCs) isoliert und kultiviert. Experimente wurden entweder direkt mit der Primärkultur (Passage 0) oder mit der 1. Passage durchgeführt.

Reagenzien und Medien:

PBS (Invitrogen)	w/o CaCl ₂ , MgCl ₂
DMEM (Invitrogen)	1×DMEM, + 4.5 g/L Glucose, + L-Glutamin, w/o Pyruvat

Trypsin (Invitrogen)	0.5% Trypsin-EDTA
Pen/Strep (Invitrogen)	Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml
FCS (PAA)	Fetales Kälberserum (PAA, A15-043) Lot: A04305-0230
SMC-Medium	DMEM 10% FCS 100 U/ml Pen/Strep bei 4°C für max. 4 Wochen lagern
Ca²⁺-freies Medium	10 mM HEPES (AppliChem) 60 mM NaCl (AppliChem) 85 mM Na-Glutamat (AppliChem) 5.6 mM KCl (AppliChem) 2.0 mM MgCl ₂ (Merck) in H ₂ O _{bidest} pH 7.4 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern
Enzymlösung 1	1 mg/ml BSA (AppliChem) 1 mg/ml DTT (AppliChem) 1.4 mg/ml Papain (Sigma P-4762) frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren (2 ml für 3-6 Aorten oder 2 Dickdarmstücke)
Enzymlösung 2	1 mg/ml BSA 2 mg/ml Hyaluronidase (Sigma H-3506) 2 mg/ml Collagenase (Sigma C-7926) frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren

Enzym/Reagenz	Stammlösung in Ca ²⁺ -freiem Medium (-20°C)	Eingesetzte Endkonzentration
Papain	7 mg/ml	1.4 mg/ml
Collagenase	10 mg/ml	2 mg/ml
Hyaluronidase	10 mg/ml	2 mg/ml
BSA	100 mg/ml	1 mg/ml
DTT	100 mg/ml	1 mg/ml

Tabelle 2.4: Enzym-Stammlösungen für die Isolierung von primären Glattmuskelzellen

Während der Isolierungsprozedur sollte möglichst steril gearbeitet werden.

Die Aorten bzw. Dickdarmstücke wurden in eine Petrischale mit PBS überführt, das Fettgewebe entfernt und mit einer Schere grob zerkleinert. Für die Präparation der Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm musste vor Zerkleinerung die Muskelschicht abpräpariert werden. Die Gewebestücke wurden anschließend mit einer Pinzette in **Enzymlösung 1** (pro Dickdarm/2-3 Aorten ca. 1 ml) überführt und bei 37°C inkubiert bis eine leichte Zersetzung des Gewebes einsetzte (ca. 45 min).

Nach Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Gewebe in **Enzymlösung 2** suspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C (mit zwischenzeitlichem Durchmischen) bis einzelne Zellen vorhanden waren (ca. 20-25 min; nicht zu lange verdauen, da sonst die Zellen zerstört werden).

Zuletzt wurde zu jeder Präparation 6 ml SMC-Medium zugegeben, der Ansatz anschließend abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm), und der Überstand vorsichtig verworfen. Die Zellen wurden schließlich in 3 ml SMC-Medium pro Ansatz suspendiert und in einer geeigneten Zelldichte ausplattiert. (Primärkultur; ca. $2-4 \times 10^5$ Zellen/6-well; 1×10^5 Zellen/24-well). Die Kultivierung der primären Glattmuskelzellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in SMC-Medium.

2.3.4.2 *In vitro*-Tamoxifen-Behandlung primärer Glattmuskelzellen

Reagenzien:

Tamoxifen (free-base, Sigma)

Ethanol (p.a.)

SMC-Medium

DMEM

10% FCS

100 U/ml Pen/Strep

bei 4°C für max. 4 Wochen lagern

Zur Herstellung einer 50 mM Tamoxifen-Stammlösung wurde das Tamoxifen in Ethanol resuspendiert bis alle Verklumpungen gelöst waren. Die Lagerung erfolgte bei –20°C. Die Tamoxifen-Stammlösung wurde in einer Endkonzentration von 1 µM in SMC-Medium verwendet. Primäre Glattmuskelzellen wurden 48 bis 72 Stunden in Tamoxifen-haltigem Medium kultiviert. Zur Kontrolle wurden Glattmuskelzellen in SMC-Medium, welchem dasselbe Volumen an Ethanol wie zur Tamoxifen-Behandlung zugegeben wurde, kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere Analysen verwendet.

2.3.4.3 Untersuchung der Viabilität von Glattmuskelzellen

Die Viabilität von primären Glattmuskelzellen wurde mittels des Trypanblau-Ausschluss-Tests untersucht. Diese Methode ermöglicht eine Bestimmung der Anzahl lebender Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Das Prinzip basiert auf der Tatsache, dass lebende Zellen eine intakte Zellmembran aufweisen, die das Eindringen von Substanzen (in diesem Falle Trypanblau) in die Zelle verhindert. Bei toten oder absterbenden Zellen ist aufgrund der degradierten Zellmembran diese Barrierefunktion nicht mehr gewährleistet, und der Farbstoff dringt in die Zelle ein.

Reagenzien:

PBS (Invitrogen) w/o CaCl₂, MgCl₂

Trypanblau (Fluka) 0.2% in PBS

Die Glattmuskelzellen wurden zunächst abtrypsinisiert, für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 1:1 mit 0.2% Trypanblau versetzt und für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die ungefärbten (lebende Zellen) und die blau-gefärbten (tote Zellen) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der prozentuale Anteil an lebenden Zellen errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Lebende Zellen (\%)} = (\text{Anzahl an lebender Zellen} \div \text{Gesamtzellzahl}) \times 100$$

2.3.4.4 MTT-Proliferationsanalyse

Der MTT-Test dient zur Analyse der Proliferation von Zellen und basiert auf der chemischen Reduktion von Tetrazolium-Salzen durch lebende Zellen. Das gelbe Tetrazolium (MTT) wird durch, in metabolisch-aktiven Zellen vorkommende Enzyme, wie z. B. Hydrogenasen, zu dem violett-roten Formazan reduziert, das in kristalliner Form intrazellulär vorliegt. Durch Lösung des Formazans und anschließender Absorptionsbestimmung kann die Menge des Farbstoffs ermittelt werden, die direkt proportional zu der Zellzahl gebildet wird.

Reagenzien:

MTT-Reagenz (Sigma) *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide*; MTT
5 mg/ml in PBS

Solubilisierungs-Reagenz 15% SDS
 0.15 mM HCl
 in H₂O_{bidest}

5×10³ Zellen/*well* wurden in exakt 100 µl Kulturmedium in einer Flachboden-96-*well*-Platte ausgesät. Pro Genotyp wurden für jeden analysierten Zeitpunkt Triplikate angefertigt. Alle 24 h wurden 10 µl des MTT-Reagenz pro *well* dazupipettiert und gut durchmischt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C, in der sich die Formazan-Kristalle ausbilden konnten, wurden zur Lösung der Kristalle 100 µl des Solubilisierungsreagenz dazupipettiert. Die Solubilisierung erfolgte über Nacht im Inkubator. Am nächsten Morgen wurde die Absorption der gebildeten violett-roten Formazan-Lösung mit dem ELISA-Reader bei 550 nm (650 nm Referenzfilter) bestimmt. Zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen wurde eine Eichgerade herangezogen, die aus definierten Zellzahlen ermittelt wurde.

2.3.4.5 Immunfluoreszenz an primären Glattmuskelzellen

Reagenzien:

Glas-Deckgläser (Marienfeld) 18 mm Durchmesser

37% Formaldehyd-Lösung (AppliChem)

PBS (Invitrogen) w/o CaCl₂, MgCl₂

PBST PBS
 0.1% Triton-X-100 (AppliChem)

Blockierungslösung 3% Magermilchpulver in PBST

Texas Red[®]-X Phalloidin (Molecular Probes)	200 U/ml in Methanol
Vectashield (Vector Laboratories)	Einbettmedium für Immunfluoreszenz mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Die Anwesenheit und Verteilung bestimmter Proteine in primären Glattmuskelzellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen auf 18-mm-Glas-Deckgläschen ausplattiert, welche auf Parafilm in der Kulturschale angehaftet waren. Nach deren Kultivierung für 12-24 h wurden die Zellen zunächst mit 3% Formaldehyd in PBS für 7 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBST gewaschen und permeabilisiert. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 30 min mit Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 3% Trockenmilchpulver/PBST für mind. 1 h Stunde bei RT. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen (dreimal mit PBST) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Wenn gewünscht, erfolgte nun, nach drei weiteren Waschschritten, die Inkubation mit Texas Red[®]-X Phalloidin für 30 min bei RT. Die Zellen wurden anschließend nochmals gewaschen (dreimal mit PBST), die Deckgläser mit *Vectashield* auf Objektträgern aufgebracht und mit Nagellack fixiert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Axioplan2 (Zeiss) mit Verwendung der *AxioVision4.5* Software.

2.3.4.6 Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Test

Der Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Test ermöglicht eine histochemische Detektion von β -Galaktosidase-Aktivität bei einem pH von 6.0, ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen (Dimri et al. 1995).

Reagenzien:

10×Fixativ-Lösung	20% Formaldehyd 2% Glutaraldehyd in PBS
1×Fixativ-Lösung	10×Fixativ-Lösung in H ₂ O _{bidest} verdünnt
1×Färbe-Puffer	40 mM Citrat-NaPhosphat-Puffer, pH 6.0 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ in H ₂ O _{bidest}
100×Färbe-Zusatz A	500 mM K ₄ [Fe ²⁺ (CN) ₆] (Merck) in H ₂ O _{bidest}
100×Färbe-Zusatz B	500 mM K ₃ [Fe ³⁺ (CN) ₆] (Merck) in H ₂ O _{bidest}
20× X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml X-Gal (Applichem) in DMF (Fluka)
Färbelösung	930 μ l Färbe-Puffer 10 μ l 100×Färbe-Zusatz A 10 μ l 100×Färbe-Zusatz B 50 μ l 20× X-Gal-Stammlösung

Für den Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Test wurden konfluent bewachsene 6-well-Zellkulturschalen verwendet. Nach Abziehen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 1×Fixativ-Lösung für 10-15 min bei RT fixiert. Währenddessen wurde die Färbelösung frisch angesetzt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde 1 ml der Färbelösung auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop (Axiovert25 (Zeiss); 200- bis 400-fache Vergrößerung) auf Blaufärbung analysiert, fotografiert und schließlich ausgezählt. Zur langfristigen Lagerung bei 4°C wurden die Zellen nach Entfernung der Färbelösung mit 70% Glycerol überschichtet.

2.3.5 Röntgenkontrast-Computertomographie zur Analyse der Intestinalmotilität

Die Darmmotilität von Mäusen wurde durch Röntgenkontrast-Computertomographie visualisiert. Dies wurde in Kollaboration mit Dr. B. Pichler am Institut für Klinische Bildgebung und Bildgebungstechnologie des Tübinger Universitätsklinikums durchgeführt.

Reagenzien:

Isofluran[®]

Gastrolux[®] (Sanochemia Diagnostics)

Isotonische NaCl-Lösung

Den zu untersuchenden Mäusen wurde nach einer Fastenperiode von 12 h 80 μ l Gastrolux[®], verdünnt in 200 μ l isotonischer Kochsalzlösung, p.o. verabreicht. Während der Aufnahmen befanden sich die Tiere unter Betäubung (1.5% Isofluran, 0.8L/min O₂). Zwischen den Aufnahmen waren die Tiere wach und erhielten reguläres Futter und Wasser. Die Bilderfassung erfolgte mittels des hoch-auflösenden *microCAT-II* Computertomographen (Siemens Preclinical Solutions, USA) jeweils 2 h, 4 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Kontrastmittelverabreichung. Für die Aufnahmen wurde eine Röntgenspannung von 75 kVp angelegt und die Expositionszeit pro Projektion betrug 425 ms. Die Analyse und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem *Amira*-Softwarepaket.

2.3.6 Isometrische Kraftmessungen an intakten Organen

Die isometrischen Kraftmessungen an intakten Organen erfolgte in Kollaboration mit Dr. J. W. Wegener am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.

Reagenzien:

Messpuffer	137 mM NaCl
	5.4 mM KCl
	1.8 mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
	12 mM NaHCO ₃
	0.42 mM NaH ₂ PO ₄
	5.6 mM Glukose

Die Mäuse wurden durch Dekapitation getötet, und Segmente von Dünn- und Dickdarm, sowie die Blase, wurden zügig in den Messpuffer überführt, welcher mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast wurde. Die Organproben wurden von Bindegewebe befreit und gründlich gespült, bevor diese longitudinal in den Myograph (Myograph 601, www.dmt.dk) eingespannt wurden. Die Ruhespannung wurde auf 6 bis 12 mN gesetzt. Die Kraftmessung wurde isometrisch bei 37°C ± 1°C aufgenommen. Die gemessene Kraft (in N) wurden in Bezug auf das Nassgewicht (in g) der jeweiligen Organproben normalisiert.

2.3.7 Histologische Färbungen

2.3.7.1 Anfertigung von Gewebe-Paraffinschnitten

Reagenzien:

Fixativ	4% PFA (AppliChem) in PBS
Ethanol	vergällt mit Methylethylketon
Xylol	
Paraffin	Paraplast (Sherwood)

Die entnommenen Organe wurden für mind. 48 h bei 4°C unter Rotation fixiert. Die fixierten Gewebe wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe mittels eines Entwässerungsautomaten (Citadel™1000, Shandon AG) dehydratisiert:

30% Ethanol	2 h
70% Ethanol	2 h
90% Ethanol I+II	2x2 h
100% Ethanol I+II+III	3x2 h
50% Xylol/50% Ethanol	2 h
100% Xylol I+II	2x3 h

Nach der Dehydratisierung wurden die Gewebe in flüssiges Paraffin überführt, mind. 2h darin gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet (Ausgießstation *Histo-centre2*, Shandon AG).

Mit einem Microtom (Leica RM2155) wurden 7 µm-Paraffin-Gewebeschnitte angefertigt, diese im 50°C heißem Wasserbad (Leica) gestreckt, auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Fa. Langenbrinck) aufgezogen und auf einer Heizplatte (42°C) getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden anschließend zur vollständigen Trocknung bei 60°C über Nacht inkubiert. Bis zur histologischen Färbung konnten die Schnitte bei RT gelagert werden.

2.3.7.1.1 Rehydratisierung von Paraffin-Gewebeschnitten

Um die Paraffin-Gewebeschnitte histologisch färben zu können, mussten diese zuvor mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydratisiert werden:

100% Xylol I+II	2×5 min
100% Ethanol I+II	2×5 min
96% Ethanol	2 min
80% Ethanol	2 min
70% Ethanol	2 min
PBS	5 min

2.3.7.2 Färbung nach Hämatoxylin und Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Färbeverfahren, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Hämalaun färbt alle sauren/basophilen Strukturen blau (DNA, Zellkern, rauhes ER etc.), während Eosin (synthetischer, saurer Farbstoff) alle acidophilen/eosinophilen/ basischen Strukturen (v.a. Zellplasmaproteine) rot färbt.

Reagenzien:

Hämatoxylin Mayers Hämalaunlösung (Merck)

Eosin G (Merck) 1% (w/v) in in H₂O

Entellan[®] Neu (Merck)

Nach Entparaffinisierung und Rehydratisierung der Paraffin-Gewebeschnitte wurden diese 2 min in Mayers Hämalaunlösung gefärbt und danach so lange unter fließendem, entsalztem Leitungswasser (H₂O_{dest}) gespült bis keine Farbe mehr abgegeben wurde. Nach kurzem Spülen der Schnitte unter Leitungswasser (H₂O) wurden diese für 3 min in 1% Eosinlösung inkubiert, anschließend erneut unter fließendem Leitungswasser (H₂O) gespült bis keine Farbe abgegeben wurde.

Vor dem Einbetten mussten die gefärbten Schnitte dehydratisiert werden:

70% Ethanol	1 min
96% Ethanol	1 min
100% Ethanol	2 min
100% Xylol	2 min

Im Anschluss erfolgte das Eindeckeln mit Entellan. Die Auswertung der Färbung wurde am Axioplan2 (Zeiss) mit der Software *Axiovision 4.5* durchgeführt.

2.3.7.3 Immunhistologische Färbungen

Die Anwesenheit bestimmter Proteine im Gewebe wurde durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen. Dazu wurden Paraffin-Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern inkubiert, deren Bindung durch biotinylierte Sekundärantikörper, Avidin-gekoppelte Enzymkomplexe mit anschließender Enzym-Substrat-vermittelten Farb-reaktion, detektiert wurde (ABC-Methode, **Abb. 2.8**).

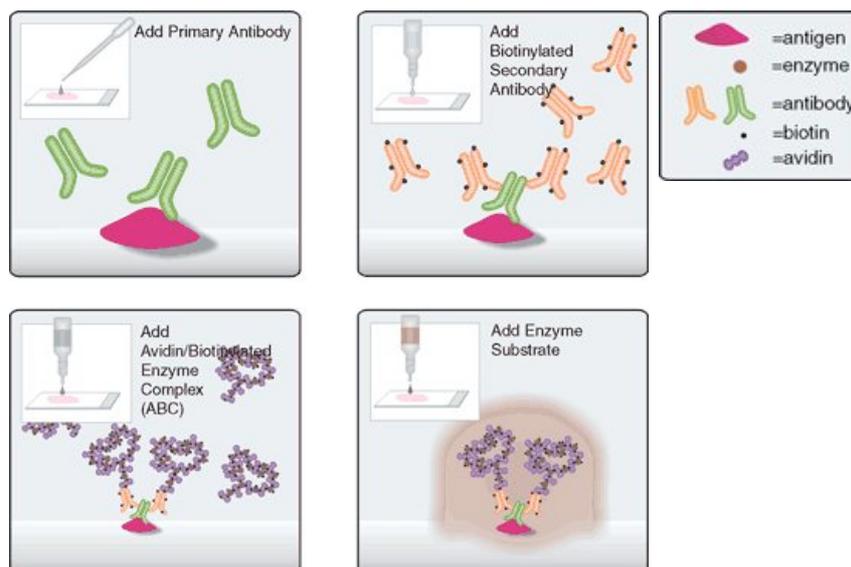


Abb. 2.8: Prinzip der ABC-Methode (Vector Laboratories, www.vectorlabs.com)

Reagenzien:

3% H₂O₂-Lösung 3% H₂O₂ (AppliChem)
in H₂O_{dest}

Na-Citrat-Lösung 10 mM Natrium-Citrat (AppliChem)
in H₂O_{dest}, pH 6.0

“Normal Goat Serum” (Vector Laboratories)

1.5% in PBS

ABC-Lösung Vectastain[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories)
1:50 Reagenz A (Avidin)
1:50 Reagenz B (biotinyliertes Enzym)
in PBS, mind. 30 min vor Gebrauch herstellen

DAB-Lösung DAB Peroxidase-Substrat-Kit (Vector Laboratories)
2.5 ml H₂O_{bidest} +
1 Tropfen Puffer-Stammlösung, gut mischen
2 Tropfen DAB-Stammlösung, gut mischen,
1 Tropfen Wasserstoff-Peroxid-Lösung, gut mischen

Nach dem letzten Schritt der absteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol) des Entparaffinisierungs- und Rehydratisierungsprotokolls wurden die endogenen Peroxidasen durch eine 10-minütige Inkubation in 3% H₂O₂-Lösung inaktiviert. Danach wurden die Schnitte zweimal für 3 min in PBS gewaschen.

Zur idealen Antigen-Präsentation im Gewebe (*“antigen-retrieval”*) wurden die Schnitte in Na-Citrat-Lösung für ca. 10 min im Mikrowellengerät aufgeköcht (2 min bei 600 W, 7-10 min bei 360 W) und anschließend auf RT abgekühlt.

Nach dem Waschen (dreimal 2 min in PBS) wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fett-Stift (*ImmEdgePen[®]*, Vector Laboratories) umrandet. Die Blockierung erfolgte für mind. 30 min mit 1.5% *“normal goat serum”*/PBS, gefolgt von

der Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper in 1.5% "*normal goat serum*"/PBS über Nacht bei 4°C.

Nach Absaugen des primären Antikörpers und sorgfältigem Waschen (dreimal 5 min in PBS) wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (in 1.5% "*normal goat serum*"/PBS) für mind. 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für je 5 min in PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte mit ABC-Lösung für mind. 30 min bei RT inkubiert, worauf die ungebundenen Komplexe zweimal mit PBS von den Schnitten gewaschen wurden. Zur Detektion wurde die DAB-Lösung auf die Schnitte gegeben. Die Farbreaktion wurde unter dem Binokular verfolgt und nach erwünschter Farbintensität mit PBS abgestoppt. Zuletzt erfolgte ein zweimaliger Waschschrift für je 5 min in PBS. Vor dem Einbetten mussten die gefärbten Schnitte dehydratisiert werden:

70% Ethanol	1 min
96% Ethanol	1 min
100% Ethanol	2 min
100% Xylol	2 min

Im Anschluss erfolgte das Eindeckeln mit Entellan. Die Auswertung der Färbung wurde am Axioplan2 (Zeiss) mit der Software *Axiovision 4.5* durchgeführt.

2.4 Synthetische Oligonukleotide

2.4.1 Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktion

Primer	Gen/Bindungsstelle	Sequenz in 5'→3' Richtung
Aw-MADS	<i>Srf</i> Exon1 →	AGTTCATCGACAACAAGCTGCGG
Bw-3pri	<i>Srf</i> Intron1 ←	GAGATTTCCACAGAAAGCAACGG
Lw-lox	loxP-site →	GCTCGCAGCGGGCGGCCAGAT
Srf-KO8-fw	<i>Srf</i> Intron1 →	CCGGGGAAATATGGGGAGAGGGGAGAT
Srf-KO8-bw	<i>Srf</i> Intron1 ←	CTTCGCGCACACCAGGACACAGAGGAT
Lox2	loxP-site →	GCTCGCAGCGGGCGGCCAGATCTATAAC
RF67	<i>SM22α</i> Intron1 →	CTCAGAGTGGAAGGCCTGCTT
RF90	<i>SM22α</i> Exon2 ←	CACACCATTCTTCAGCCACA
SC135	<i>Cre</i> ←	GGCGATCCCTGAACATGTCC

→ vorwärts, ← rückwärts

2.4.2 Oligonukleotide für semi-quantitative-RT-PCR

Primer	Gen/Bindungsstelle	Sequenz in 5'→3' Richtung
mSrf-exon4-fw	<i>Srf</i> Exon4 →	TGTGCAGGCCATTCATGTG
mSrf-exon5-bw	<i>Srf</i> Exon5 ←	ACAGACGACGTCATGATGGTG
RT-Srf-ex1-fw	<i>Srf</i> Exon1 →	CACGACCTTCAGCAAGAGGAA
RT-Srf-ex2-bw	<i>Srf</i> Exon2 ←	CAAAGCCAGTGGCACTCATTC
TM-SM-act-fw	<i>SMactin</i> →	CAGCAAACAGGAATACGACGAA
TM-SM-act-bw	<i>SMactin</i> ←	TGTGTGCTAGAGGCAGAGCAG
TM-SM-MHC-fw	<i>SM-MHC</i> →	CATGGACCCGCTAAATGACA
TM-SM-MHC-bw	<i>SM-MHC</i> ←	CAATGCGGTCCACATCCTTC
TM-SM22 α -fw	<i>SM22α</i> →	GATGTAGGCCGCCCAGATC
TM-SM22 α -bw	<i>SM22α</i> ←	ATCACACCATTCTTCAGCCACA
RT-SmoothelinA-fw	<i>SmtnA</i> →	TCCAATGATGGCACTCAGACG
RT-SmoothelinA-Bw	<i>SmtnA</i> ←	AGCGCCTCATGAAACTGGACT
TM-c-fos-fw	<i>c-fos</i> →	CTTGCCCCTTCTCAACGA
TM-c-fos-bw	<i>c-fos</i> ←	GCTCCACGTTGCTGATGCT
TM-egr-1-fw	<i>egr-1</i> →	GCCGAGCGAACAACCCTAT
TM-egr-1-bw	<i>egr-1</i> ←	TCCACCATCGCCTTCTCATT
TM-egr-2-fw	<i>egr-2</i> →	GTTGACTGTCACTCCAAGAAATGG
TM-egr-2-bw	<i>egr-2</i> ←	AGCGCAGCCCTGTAGGC

→ vorwärts, ← rückwärts

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
α SRF	rabbit, polyclonal	Santa Cruz sc-335, Lot: L015	1:1000
α SRF	rabbit, polyclonal	abcam ab36747	1:1000
α actin	mouse, monoclonal	Linaris LCU9001 Lot: 512018436	1:1000
α SM α -actin	mouse, monoclonal	Chemicon CBL171	1:500
α Cre	rabbit, polyclonal	Novagen 69050-3	1:1000
α GAPDH	mouse, monoclonal	HyTest 5G4	1:20000

2.5.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Herkunft	Referenz	Verdünnung
<i>Western Blot Analyse</i>			
αrabbit IgG-HRP	donkey, polyclonal	Amersham NA934V Lot: 340346	1:5000
αmouse IgG-HRP	sheep, polyclonal	Santa Cruz	1:5000
<i>Immunfluoreszenz-Färbungen</i>			
αrabbit IgG-Alexa488	goat, polyclonal	Molecular Probes A-11008	1:1000
<i>Immunhistochemische Färbungen</i>			
αrabbit IgG-biotinylated	goat, polyclonal	Vector Laboratories BA-1000 Lot: P0512	1:1000

3 Ergebnisse

3.1 Zucht der *Srf*^{flex1}-Mauslinie

Die Mauslinie *Srf*^{flex1}, dessen Exon1 des *Srf*-Gens von zwei *loxP*-Erkennungssequenzen flankiert ist, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nordheim generiert (**Abb. 3.1 A**) (Wiebel et al. 2002).

Die homozygot "Srf-gefloxten" Tiere (*Srf*^{flex1/flex1}) waren phänotypisch vollkommen unauffällig und verpaarten sich normal nach den Mendelschen Regeln. Die Genotypisierung der Tiere wurde mittels PCR-Analyse mit genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien durchgeführt (**Abb. 3.1 B**).

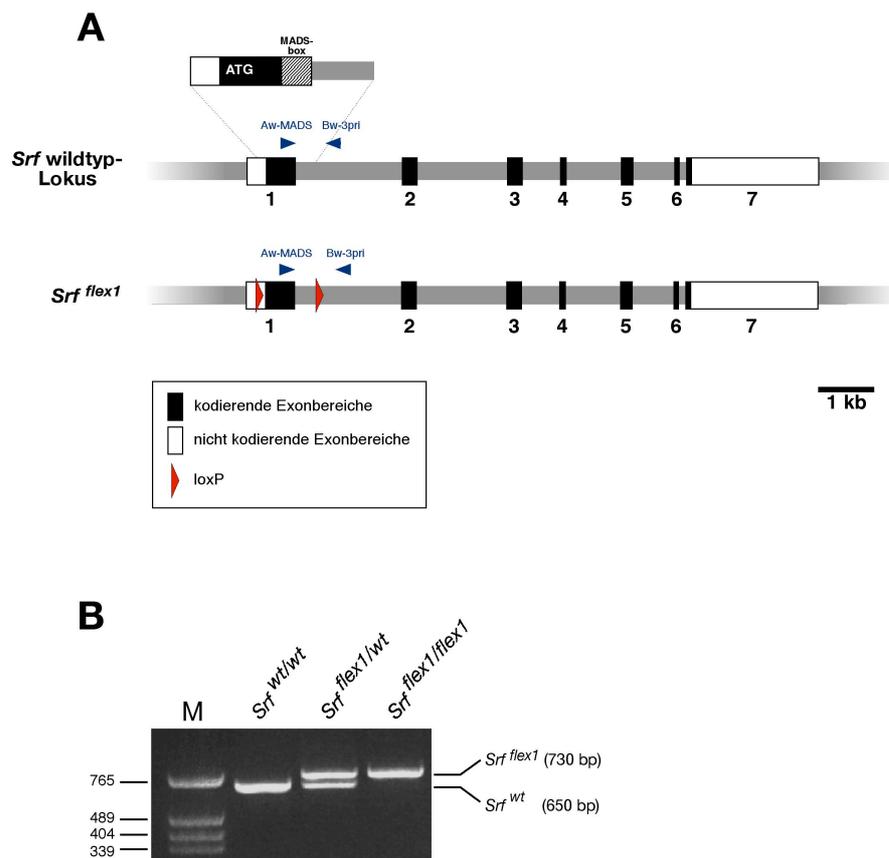


Abb. 3.1: Genotypisierung der *Srf*^{flex1}-Mauslinie

(A) Graphische Darstellung des *Srf*^{wt}- und des "gefloxten" *Srf*^{flex1}-Genlokus. Die zur Genotypisierung verwendeten Primer sind eingezeichnet. (B) Genotypisierung mittels PCR-Analyse mit den Primern *Aw-MADS* und *Bw-3pri*. Der *Srf*^{wt}-Lokus wird durch das 650 bp-Fragment, der *Srf*^{flex1}-Lokus durch das 730 bp-Fragment repräsentiert. (M) DNA-Größenstandard.

3.2 Zucht der Glattmuskel-spezifischen Cre-Mauslinie: *SM-CreER^{T2}*

Die unter dem *SM22 α* -Promotor Cre-exprimierende Mauslinie *SM-CreER^{T2}* wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Feil generiert (**Abb. 3.2 A**) (Kuhbandner et al. 2000). Dabei handelt es sich um ein *SM22 α -knock-in* Allel, weshalb durch die genomische Insertion des *CreER^{T2}*-Allels in den *SM22 α* -Lokus ein *SM22 α -Nullallel* entsteht. Sowohl die heterozygot, als auch die homozygot modifizierten *SM-CreER^{T2}-knock-in* Tiere waren trotz fehlender *SM22 α* -Expression phänotypisch vollkommen unauffällig und verpaarten sich normal nach den Mendelschen Regeln. Die Genotypisierung der Tiere wurde mittels PCR-Analyse mit genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien durchgeführt (**Abb. 3.2 B**).

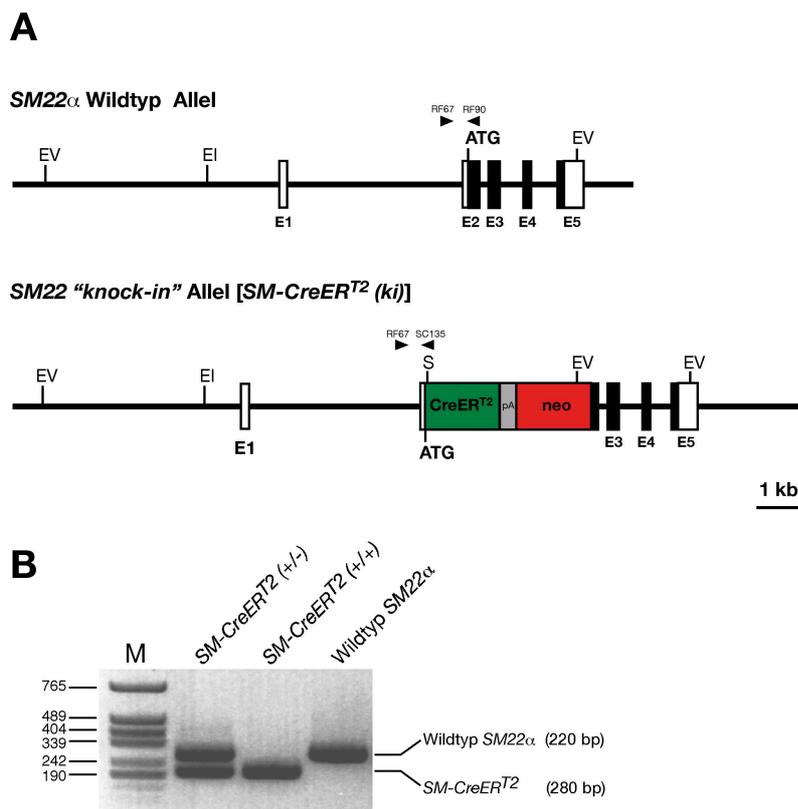


Abb. 3.2: Genotypisierung der transgenen *SM-CreER^{T2}*-Mauslinie

(A) Graphische Darstellung des *SM22 α* Wildtyp- und des modifizierten *SM22 α -knock-in*-Allels *SM-CreER^{T2}*. Die für die Genotypisierung verwendeten Primer sind eingezeichnet. (B) Genotypisierung der *SM-CreER^{T2}*-Mauslinie mittels PCR-Analyse mit Verwendung der Primer *RF67*, *RF90* und *SC135*. Das *SM22 α* -Wildtyp-Allel wird durch das 280 bp-Fragment, das modifizierte *SM22 α -knock-in*-Allel durch das 220 bp-Fragment repräsentiert. (M) DNA-Größenstandard.

3.3 Generierung der Tamoxifen-induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mauslinie

Zur Generierung der Mauslinie mit zeitlich-kontrollierbarer, Glattmuskel-spezifischer, *Srf*-Deletion wurde die *Srf^{flex1}*-Mauslinie mit der Glattmuskel-spezifischen Cre-Mauslinie *SM-CreER^{T2}* gekreuzt (**Abb. 3.3**) (vgl. Abschnitt 2.1.3). Bei fehlender Tamoxifen-Induktion sollte die dadurch generierte Mauslinie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine phänotypischen Veränderungen aufweisen, da die Deletion des *Srf*-Lokus durch Cre-vermittelte Exzision des Exon1 des *Srf*-Gens unter zeitlich-induzierbarer Kontrolle steht. Die CreER^{T2}-Rekombinase wird bereits durch sehr geringe Mengen von intraperitoneal (i.p.)-appliziertem Tamoxifen aktiviert und ist vor allem in viszeralen, aber auch in vaskulären Glattmuskelzellen katalytisch aktiv (Kuhbandner et al. 2000).

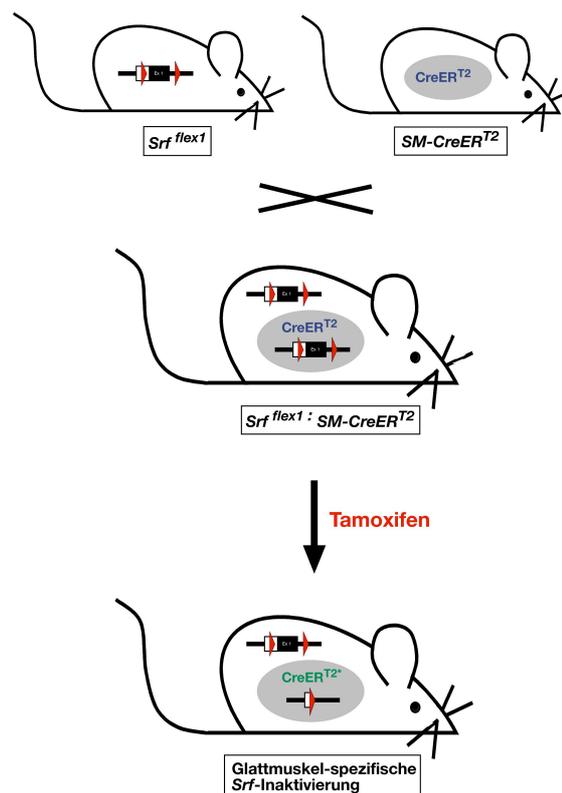


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Generierung der induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mauslinie

Durch die Kreuzung der *Srf^{flex1}*-Mauslinie und der Glattmuskel-spezifischen, Cre-exprimierenden *SM-CreER^{T2}*-Mauslinie entsteht die Tamoxifen-induzierbare, Glattmuskel-spezifische, SRF-defiziente Mauslinie *Srf^{flex1} : SM-CreER^{T2}*. Die Induktion der Cre-vermittelten Rekombination durch Tamoxifen führt zur Generierung der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Maus.

3.3.1 Genotypen der verwendeten Versuchs- und Kontrolltiere

Zur Generierung Glattmuskel-spezifischer, SRF-defizienter Versuchstiere wurden ausschließlich Tiere verwendet, die einen homozygot “gefloxten” *Srf*-Lokus, und nur ein *SM-CreER^{T2}*-Allel aufwiesen (*Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*). Diese Tiere erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneale Tamoxifen-Injektionen und werden im Folgenden als *Srf-knockout*-Tiere oder Mutanten bezeichnet.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus Tieren mit folgenden drei verschiedenen Genotypen zusammen, die entweder mit Tamoxifen oder mit Vehikel (Sonnenblumenöl) behandelt wurden:

Srf^{flex1/flex1}: wt/wt → Tamoxifen-Behandlung

Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt → Tamoxifen-Behandlung

[*Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt* → Vehikel-Behandlung]*

Die für einen jeweiligen Versuch verwendeten Kontrolltiere sind im Text angegeben.

* Aufgrund der Problematik der nachgewiesenen “leakiness” des Rekombinationssystems (vgl. Abschnitt 3.4.1 und 3.4.3.1.1) ist diese Genotyp-Kontrolle kritisch zu betrachten!

3.4 Analyse der Glattmuskel-spezifischen *SRF-knockout*-Mäuse

3.4.1 Rekombinationsanalysen in verschiedenen Organen mittels PCR

Um die Rekombination nach Induktion der Cre-vermittelten Deletion des *Srf*-Lokus in verschiedenen Organen der Maus zu verfolgen, wurden PCR-Analysen mit DNA aus den isolierten Organen der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere und der entsprechenden Kontrolltiere durchgeführt.

Bei homozygot “*Srf*-gefloxten” Kontroll-Tieren, welche keine Cre-Rekombinase exprimierten (*Srf^{flex1/flex1}: wt/wt*), war nach einer Tamoxifen-Behandlung in allen untersuchten Organen erwartungsgemäß keine Rekombination detektierbar (**Abb. 3.4**, untere Reihe).

Eine effiziente, Cre-vermittelte Exzision des “geflochtenen” Exon1 des *Srf*-Gens nach Tamoxifen-Induktion konnte deutlich in den Organen nachgewiesen werden, die einen hohen Anteil an Glattmuskelgewebe aufweisen, wie z. B. der Gastrointestinaltrakt, die Blase oder die Aorta. Die geringe, aber dennoch detektierbare Rekombination in nicht-glattmuskulären Organen, wie z. B. Leber, Herz-, oder Skelettmuskel, ist vermutlich auf die im Gewebe enthaltenen Glattmuskelzellen der Blutgefäße zurückzuführen (**Abb. 3.4**, Mitte). Unerwarteterweise zeigten die Vehikel-behandelten Kontrolltiere des Genotyps *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt* (Vehikel-Kontrolle) eine detektierbare Rekombination des “geflochtenen” *Srf*-Lokus im Herz, im Gastrointestinaltrakt und ganz besonders deutlich in der Blase (**Abb. 3.4**, obere Reihe). Diese Tatsache implizierte eine “leakiness” des Rekombinationssystems, also die partielle, unkontrollierte Aktivität der *CreER*^{T2}-Rekombinase ohne Induktion durch Tamoxifen.

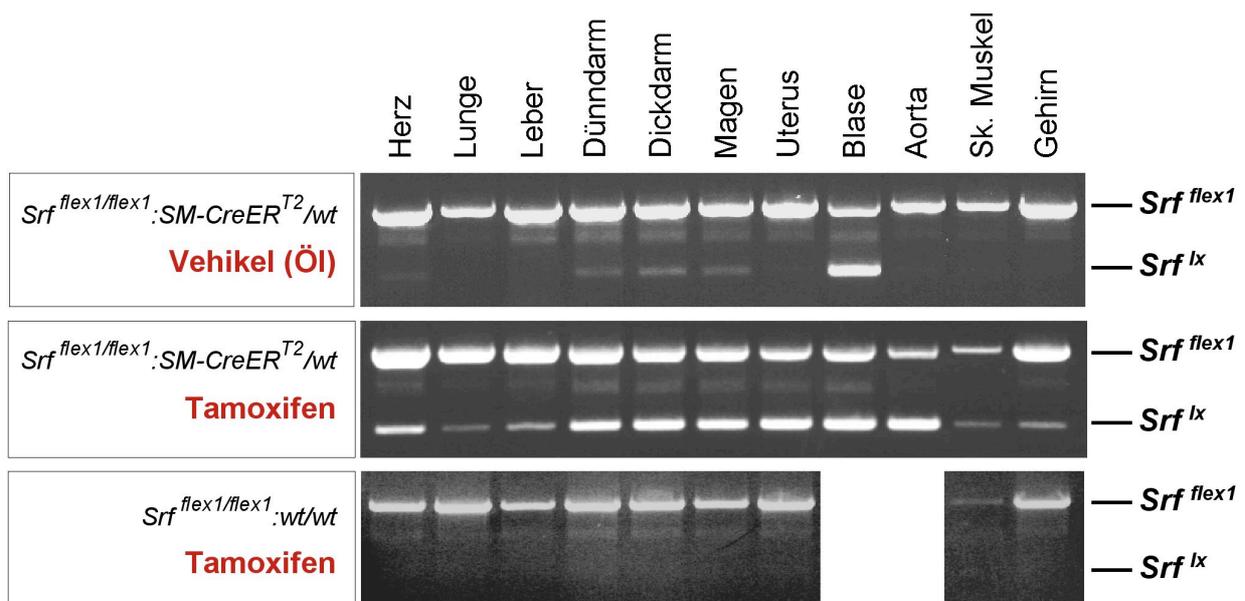


Abb. 3.4: PCR zur Rekombinationsanalyse in verschiedenen Organen Tamoxifen- und Vehikel-behandelter Mäuse

Acht Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- oder *Srf*^{flex1/flex1}: *wt/wt*-Tiere wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1 mg Tamoxifen oder mit Sonnenblumenöl (Vehikel) behandelt und sieben Tage nach der letzten Injektion getötet. Nach DNA-Isolation aus verschiedenen Organen wurde eine PCR-Analyse mit den Primern *Lw-lox* und *Bw-3pri* durchgeführt. Das *Srf*^{flex1}-Allel wird durch das 1.34 kb-Fragment, das deletierte *Srf*^{lx}-Allel durch das 380 bp-Fragment repräsentiert. (**Oben**) Vehikel-behandelte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Maus (Kontrolle). (**Mitte**) Tamoxifen-behandelte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Maus (*Srf*-knockout). (**Unten**) Tamoxifen-behandelte *Srf*^{flex1/flex1}: *wt/wt*-Maus (Kontrolle). Aus technischen Gründen fehlt in diesem Experiment eine Rekombinationsanalyse der Blase und der Aorta.

Die in **Abb. 3.4** dargestellten Daten stehen repräsentativ für alle analysierten *Srf*-knockout- und Kontroll-Tiere, da nur sehr geringe Schwankungen bezüglich der Rekombinationsrate oder –effizienz zwischen einzelnen Tieren festzustellen waren.

3.4.2 Expressionsanalyse des *Srf*-Lokus in verschiedenen Organen

Die Analyse der Expression des SRF-Proteins in verschiedenen Geweben Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*-Tiere (*Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*) und entsprechender Kontrolltiere erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Dazu wurden Proteinlysate aus glattmuskulären Organen, wie z. B. dem Gastrointestinaltrakt oder der Blase, und aus nicht-glattmuskulären Kontroll-Organen, wie z. B. Herz- oder Skelettmuskulatur, hergestellt und analysiert.

Bei allen analysierten Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tieren (*Srf-ko*) zeigte der Western Blot eine signifikante Reduktion der SRF “full-length”-Protein-Expressions-mengen in Organen mit hohem Anteil an glatter Muskulatur. Im Dickdarm und im Magen war im Vergleich zu Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren eine Reduktion um ca. 70%, in der Blase sogar bis um $\geq 90\%$ festzustellen. Im Gegensatz dazu wiesen die nicht-glattmuskulären Organe der *Srf-knockout*- und der Kontrolltiere, wie das Herz, der Skelettmuskel und das Gehirn, eine unveränderte SRF-Proteinexpression auf (**Abb. 3.5**).

Die Inkubation der Membran mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz) resultierte, neben der Detektion der SRF-“full-length”-Bande bei ca. 67 kDa, in der Erkennung einer zusätzlichen Bande bei ca. 36 kDa (**Abb. 3.5 A** und **Abb. 3.6**, *). Diese war vor allem in Magen- und Blasen-Proteinextrakten der *Srf-knockout*-Tiere deutlich sichtbar, also in Organen, in welchen eine hohe Rekombinationsrate nachgewiesen werden konnte (**Abb. 3.5** und **Abb. 3.6**). Während Magen- und Blasenextrakte Tamoxifen-behandelter *Srf*^{flex1/flex1}: *wt/wt*-Kontroll-Tiere nur eine äußerst schwache ~36 kDa-Bande zeigten (**Abb. 3.5 A** und nicht gezeigte Daten), war diese ~36 kDa-Bande in Vehikel-behandelten *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Kontrolltieren in vergleichbarer Intensität nachzuweisen (**Abb. 3.6**, Magen und Blase, *). Aufgrund der festgestellten “leakiness” des Rekombinationssystems (siehe Abschnitt 3.4.1, **Abb. 3.4**) kann somit ein direkter Zusammenhang zwischen der Existenz der ~36 kDa-Bande und dem Rekombinationsereignis nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Im Dickdarm war weder in *Srf-knockout*-Tieren, noch in Tamoxifen- oder Vehikel-behandelten Kontrolltieren, diese zusätzliche Bande zu erkennen (**Abb. 3.5 A** und nicht gezeigte Daten).

Auch in anderen nicht-glattmuskulären Organen, in denen keine Rekombination und damit keine Deletion des *Srf*-Lokus stattfand, konnte diese zusätzliche ~36 kDa-Bande ebenfalls nicht detektiert werden (**Abb. 3.5 A**, Herz, Skelettmuskel und Gehirn; **Abb. 3.6**, Skelettmuskel).

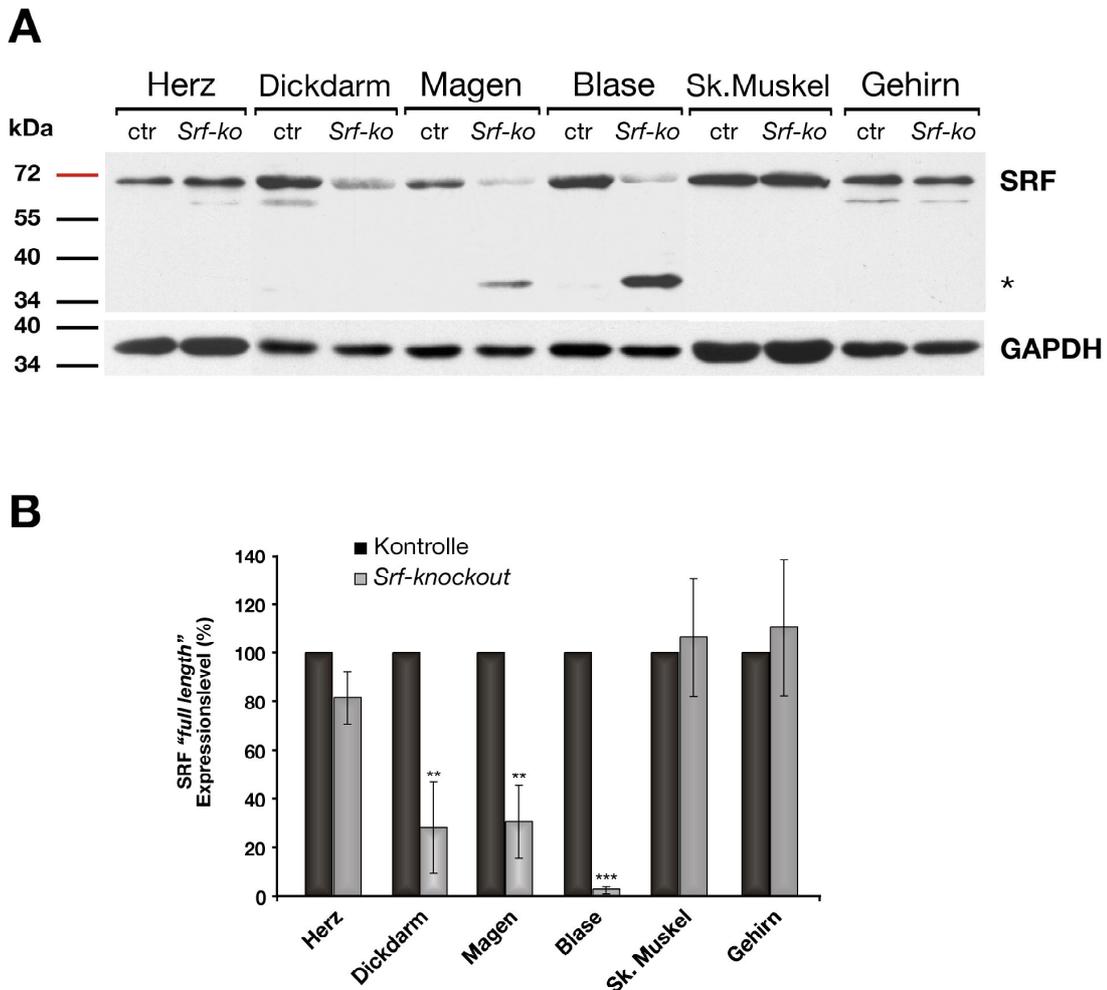


Abb. 3.5: Analyse der SRF-Proteinexpression in verschiedenen Organen Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*- und Kontroll-Tiere mittels Western Blot-Analyse

Acht Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*, *Srf-ko*) und *Srf^{flex1/flex1}; wt/wt*-Tiere (Kontrolle, ctr) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen und wurden sieben Tage nach der letzten Injektion getötet. Nach Entnahme der entsprechenden Organe und Herstellung der Organ-Proteinlysate wurde die Western Blot-Analyse mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015) durchgeführt (**A**). Dickdarm-, Magen- und Blasengewebe der *Srf-knockout*-Tiere (*Srf-ko*) zeigten eine signifikante Reduktion der SRF-*full-length*-Proteinmenge (Bande bei 67 kDa), während die nicht-glattmuskulären Organe (Herz, Skelettmuskel und Gehirn) vergleichbare SRF-Proteinmengen aufwiesen. Zur Ladekontrolle wurde dieselbe Membran "gestrippt" und mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert. (**B**) Quantifizierung der SRF-*full-length*-Proteinmengen. Die SRF-Proteinmenge der Kontrolltiere (schwarze Balken) wurde auf 100% gesetzt. Jeder Balken (grau) der *Srf-knockout*-Tiere repräsentiert den Durchschnitt aus vier verschiedenen *Srf-knockout*-Tieren in unabhängigen Experimenten (n=4). Die Fehlerbalken geben die Standard-abweichung (SD) an. **, P<0.01; ***, P<0.001; Student's *t*-test.

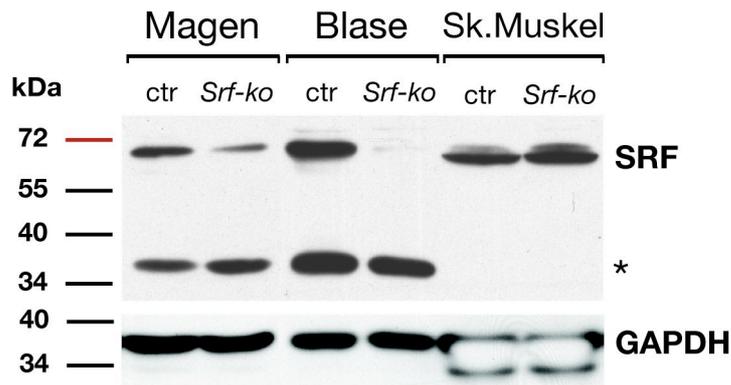


Abb. 3.6: Analyse der SRF-Proteinexpression in Magen, Blase und Skelettmuskel Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*- und Kontroll-Tiere mittels Western Blot-Analyse

Sieben Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt* (*Srf-knockout*, *Srf-ko*) und *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Vehikel-Kontrolle, ctr) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen- bzw. Vehikel-Injektionen und wurden fünf Tage nach der letzten Injektion getötet. Nach Entnahme der entsprechenden Organe und Herstellung der Organ-Proteinlysate wurde die Western Blot-Analyse mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015) durchgeführt. Magen- und Blasengewebe zeigten eine deutliche Reduktion der SRF-“full-length“-Proteinmenge, während die Skelettmuskulatur vergleichbare SRF-Proteinmengen aufwies. Im Magen und in der Blase von *Srf-knockout*- und Kontroll-Tieren war die ~36 kDa-Bande in vergleichbarer Intensität detektierbar (*). Zur Ladekontrolle wurde dieselbe Membran “gestrippt” und mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert.

Die Herkunft dieser zusätzlichen ~36 kDa-Bande ist nicht geklärt. Einerseits könnte es sich lediglich um einen unspezifischen Antikörperartefakt handeln. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die Cre-vermittelte Exzision von Exon1 des *Srf*-Gens nicht in einem *Srf*-Nullallel, sondern nur in einem modifizierten, verkürzten *Srf*-Lokus resultiert, von welchem eine verkürzte *Srf*-mRNA transkribiert werden kann, die wiederum in ein verkürztes SRF-Protein translatiert werden könnte. Diese Problematik wird im späteren Verlauf dieser Arbeit nochmals aufgegriffen und diskutiert (siehe Abschnitt 4.3.3).

3.4.2.1 SRF-Expressionsanalyse anhand immunhistologischer Färbungen an Dün- und Dickdarmgewebe

Um die Expression von SRF in Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mäusen auf Organebene zu überprüfen, wurden immunhistologische Färbungen angefertigt. Dazu wurde Dick- und Dünndarmgewebe Tamoxifen-behandelter *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt* Mäuse (*Srf-knockout*) und der entsprechenden Kontrolltiere isoliert, 7 µm-Paraffin-Gewebeschnitte angefertigt und diese mit einem SRF-Antiserum immunhistologisch gefärbt.

Die immunhistologischen Färbungen von Darmgeweben der Kontrolltiere zeigten eine deutliche, klar abgrenzbare SRF-Kernfärbung in der Glattmuskelschicht (*Tunica muscularis*) des Dick- und Dünndarmgewebes (**Abb. 3.7 A und B**, linke Spalte, Pfeile). Leider trat mit Verwendung des SRF-Antikörpers eine sehr hohe Hintergrundfärbung innerhalb der Darmschleimhaut auf, weshalb bezüglich der Expression von SRF in der Schleimhaut keine exakte Aussage getroffen werden konnte.

In der Muskelschicht des Dick- und Dünndarms der *Srf-knockout*-Tiere war die in den Kontrollgeweben beobachtete Färbung der Zellkerne nicht nachzuweisen. Vielmehr konnte ein diffuses Hintergrundsignal von angefärbten Zellen innerhalb der Glattmuskelschicht beobachtet werden (**Abb. 3.7 A und B**, rechte Spalte). Die Glattmuskelzellen des Dünndarms der SRF-defizienten Tiere schienen sogar eher eine zytoplasmatische Färbung aufzuweisen (**Abb. 3.7 B**, *), während im Zellkern kein SRF-Signal detektiert werden konnte. Ob es sich hierbei um eine spezifische SRF-Färbung oder um ein unspezifisches Signal des SRF-Antikörpers handelt, blieb unklar.

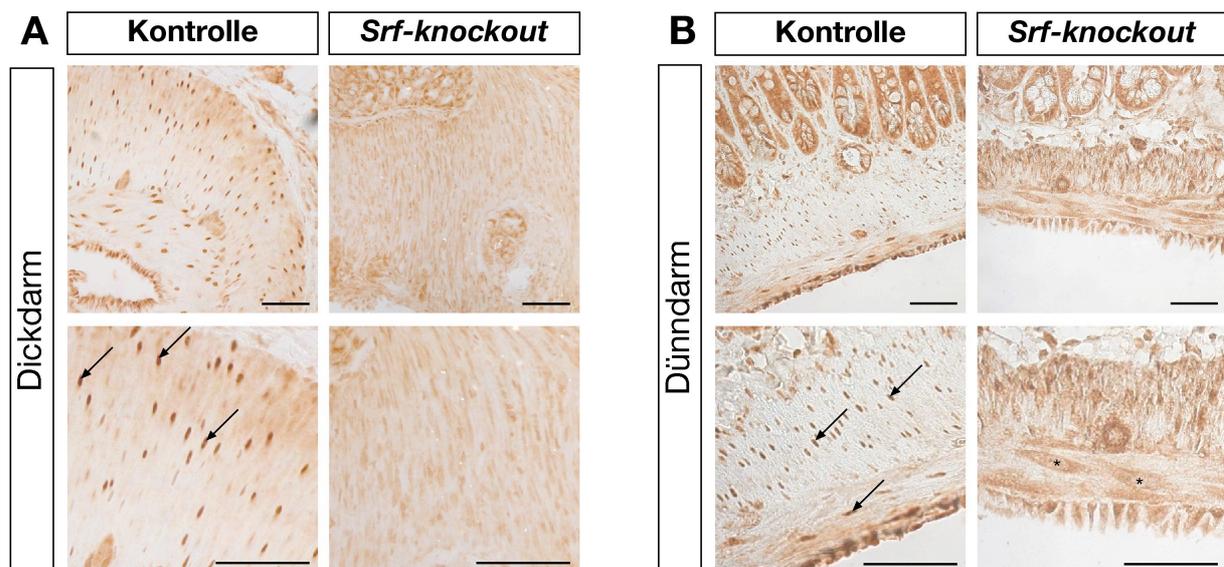


Abb. 3.7: SRF-Expressionsanalyse in Dick- und Dünndarmgewebe anhand immunhistologischer Färbungen

(A) Dickdarmgewebeschnitte von neun Wochen alten, Tamoxifen-behandelten *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt*-Tieren (*Srf-knockout*) und Kontrolltieren (*Srf^{flex1/flex1}; wt/wt*; Kontrolle) wurden mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015) gefärbt. Die Kontrollschnitte zeigten eine deutliche SRF-Kernfärbung (Pfeile) der Glattmuskelzellen (linke Spalte). In Dickdarmschnitten der *Srf-knockout*-Tiere konnte keine vergleichbare Kernfärbung festgestellt werden, wobei jedoch ein erhöhtes Hintergrundsignal innerhalb der Glattmuskulatur auftrat (rechte Spalte). (B) Dünndarmgewebeschnitte von acht Wochen alten, Tamoxifen-behandelten *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt* Tieren (*Srf-knockout*) und Kontrolltieren (*Srf^{flex1/wt}; wt/wt*; Kontrolle) wurden mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015) gefärbt. Im Dünndarm der Kontrolltiere war eine deutliche SRF-Kernfärbung (linke Spalte, Pfeile) festzustellen, während die Färbung der *Srf-knockout*-Dünndarmschnitte in einem diffusen zytoplasmatischen Signal in den Glattmuskelzellen resultierte (rechte Spalte). (*) Zellkern einer Glattmuskelzelle. Maßstabbalken 50 μ m.

3.4.3 Phänotypische und funktionelle Analysen der Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Tiere

3.4.3.1 Phänotypische Veränderungen der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mäuse

Zwei bis vier Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion war eine deutlich reduzierte Beweglichkeit der *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (*Srf-knockout*) festzustellen. Diese wiesen eine buckelige, verkrampfte Körperhaltung und ein stark gesträubtes Fell auf, was als deutliches Anzeichen eines krankhaften Zustandes gilt. Die Gruppe der Kontrolltiere (Tamoxifen-behandelte *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*- und *Srf^{flex1/flex1}: wt/wt*-Tiere oder Vehikel-behandelte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere) zeigten hingegen keinerlei Auffälligkeiten und waren von anderen unbehandelten Geschwistertieren nicht zu unterscheiden. Das untere Abdomen der *Srf-knockout*-Tiere war extrem aufgebläht und verhärtet. Zu diesem Zeitpunkt stellten die kranken Tiere die Nahrungs- und Wasseraufnahme ein, während zudem keine Exkretion von Kot zu beobachten war. Die Krankheitssymptome, die mit einer starken Abmagerung einhergingen, verschlechterten sich schnell und die Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere starben frühestens mit Beginn des achten Tages nach der ersten Tamoxifen-Injektion (**Abb. 3.8**).

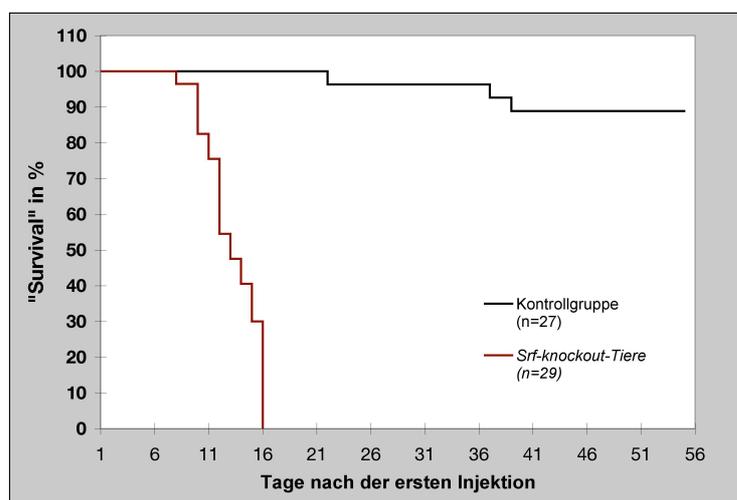


Abb. 3.8: Überlebenskurve der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere und der Kontrollgruppe

Sechs bis zwölf Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (*Srf-knockout*, n=29) wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit Tamoxifen behandelt, während die Tiere der Kontrollgruppe (n=27) entweder Tamoxifen- (*Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*- und *Srf^{flex1/flex1}: wt/wt*-Tiere) oder Vehikel-Injektionen (*Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere) erhielten. Die Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere zeigten eine 100%ige Letalität innerhalb von sechzehn Tagen nach der ersten Tamoxifen-Injektion (rote Kurve). Über einen beobachteten Zeitraum von 56 Tagen war innerhalb der Kontrollgruppe eine Letalität von nur 10% festzustellen (schwarze Kurve), welche nicht auf durch Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz verursachte krankhafte Veränderungen zurückzuführen war.

Innerhalb von sechzehn Tagen nach der ersten Applikation von Tamoxifen war eine 100%ige Letalität der *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (*Srf-knockout*) festzustellen. Alle Tiere zeigten dieselben krankhaften Veränderungen, weshalb von einer 100%igen Penetranz der durch Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz verursachten phänotypischen Veränderungen ausgegangen werden konnte. Innerhalb der Kontrollgruppe war über einen beobachteten Zeitraum von 56 Tagen nach der ersten Injektion von Tamoxifen bzw. Vehikel eine Letalität von nur 10% festzustellen. Da jedoch die verstorbenen Kontrolltiere keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen oder sonstige Krankheitssymptome aufwiesen, war diese 10%ige Letalität mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf durch SRF-Defizienz hervorgerufene Ursachen zurückzuführen.

Die nähere Analyse der durch Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz verursachten Krankheitssymptome der *Srf-knockout*-Tiere zeigte schwerwiegende krankhafte Veränderungen des Gastrointestinaltraktes.

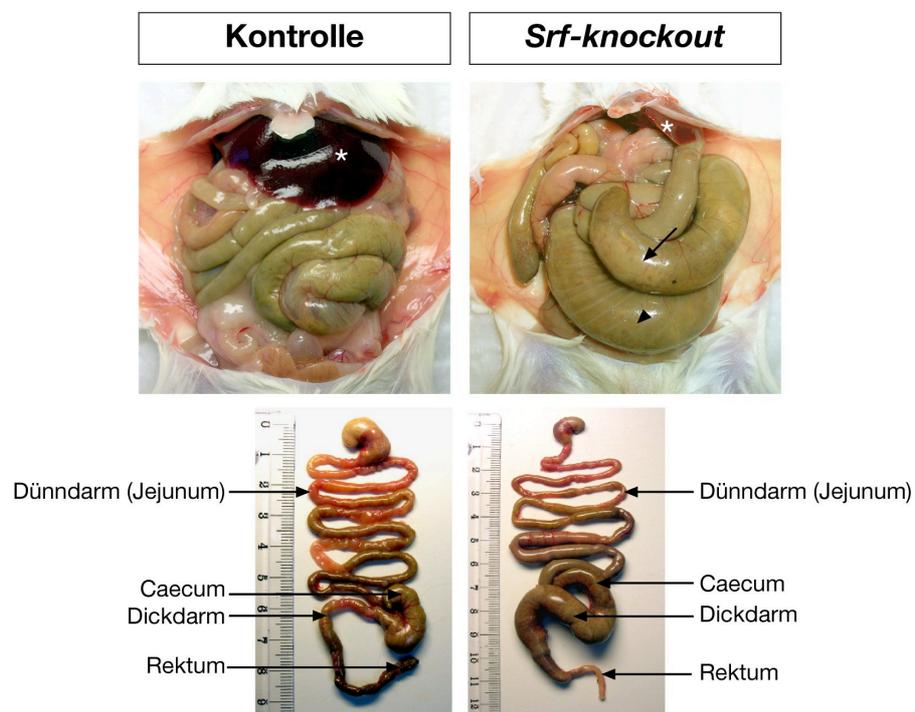


Abb. 3.9: Makroskopische Analyse des Gastrointestinaltraktes Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*- und Kontroll-Tiere

Die Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mäuse (*Srf-knockout*) zeigten schwerwiegende krankhafte Veränderungen des Gastrointestinaltraktes mit einem massiv dilatiertem, überfülltem und verstopfem Caecum (Blinddarm, Pfeil) und Dickdarm (Pfeilspitze). Der komplette Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) war im Vergleich zu den Veränderungen des Dickdarms kaum bzw. nur sehr schwach verändert. Die anderen Organe in der Bauchhöhle der SRF-defizienten Tiere schienen durch den stark vergrößerten Darm massiv gequetscht und größenreduziert (*, Leber).

Die *Srf-knockout*-Tiere wiesen einen massiv dilatierten, überfüllten und verstopften Dickdarm (**Abb. 3.9**, Pfeilspitze) und Blinddarm (Caecum, **Abb. 3.9**, Pfeil) auf. Die anderen Organe in der Bauchhöhle der SRF-defizienten Tiere schienen durch den stark vergrößerten Darm massiv gequetscht und Größenreduziert (**Abb. 3.9**, * Leber). Der komplette Dünndarmbereich (mit Duodenum, Jejunum und Ileum) schien weniger oder kaum phänotypisch verändert zu sein, wobei bei einigen kranken Tiere ebenfalls eine schwache Dilatation des Dünndarms zu erkennen war. Diese Symptome ähnelten stark derer des beim Menschen auftretenden, durch Darmlähmung verursachten Darmverschlusses, welcher als "*Ileus paralyticus*" bezeichnet wird. Die Todesursache der *Srf-knockout*-Tiere war letztendlich auf diese beschriebenen Symptome eines schwerwiegenden Darmverschlusses zurückzuführen (persönliche Mitteilung des Tierärztlichen Dienstes der Universität Tübingen), wobei weitere, durch die Glattnuskel-spezifische SRF-Defizienz hervorgerufene Todesursachen, wie z. B. Defekte im Kardio-vaskulärsystem, nicht ausgeschlossen werden konnten.

3.4.3.1.1 Einfluss des Genotyps, der "leakiness" und des genetischen Hintergrundes der Mauslinie innerhalb des SM-CreER^{T2}-Rekombinationssystems

Wie bereits durch die Rekombinationsanalysen mittels PCR festgestellt werden konnte, war das induzierbare SM-CreER^{T2}-Rekombinationssystem in Zusammenhang mit dem *Srf*^{flex1}-Lokus nicht 100% stringent, d.h. in einigen Organen konnte eine schwache Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus ohne Aktivierung der CreER^{T2}-Rekombinase detektiert werden (siehe Abschnitt 3.4.1 und **Abb. 3.4**). Diese sogenannte "*leakiness*" des Rekombinationssystems hatte bei der Verwendung des *Srf*^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-Genotyps zur Generierung Glattnuskel-spezifischer *Srf-knockout*-Mäuse keine negativen Auswirkungen, da die in den Experimenten verwendeten, Vehikel-behandelten *Srf*^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-Kontrolltiere keine phänotypischen Veränderungen aufwiesen. Jedoch konnte bei der Zucht zur Generierung der induzierbaren *Srf*^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-Tiere eine kontinuierliche Letalität von unbehandelten Mäusen innerhalb unterschiedlicher Würfe festgestellt werden. Die Genotypisierung zeigte, dass all diese verstorbenen Tiere den *Srf*^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/ SM-CreER^{T2}-Genotyp aufwiesen und somit zwei modifizierte Cre-exprimierende SM22 α -Allele enthalten waren. Die Gruppe der Tiere mit diesem Genotyp zeigte eine 100%ige

Letalität innerhalb des Zeitraums von 45 Tagen nach der Geburt (**Abb. 3.10**), beginnend an 27. Tag nach der Geburt, wobei deutlich zu betonen ist, dass keine Tamoxifen- oder Vehikel-Behandlung durchgeführt wurde. Als Vergleichsgruppe dienten Tiere, die ebenfalls homozygot in Bezug auf den *SM-CreER^{T2}*-Lokus waren, jedoch nur ein "gefloxtes" *Srf*-Allel aufwiesen (*Srf^{flex1/wt}*; *SM-CreER^{T2}/SM-CreER^{T2}*). Während des Beobachtungszeitraumes waren die Tiere innerhalb dieser Kontrollgruppe phänotypisch völlig unauffällig und gesund (0% Letalität).

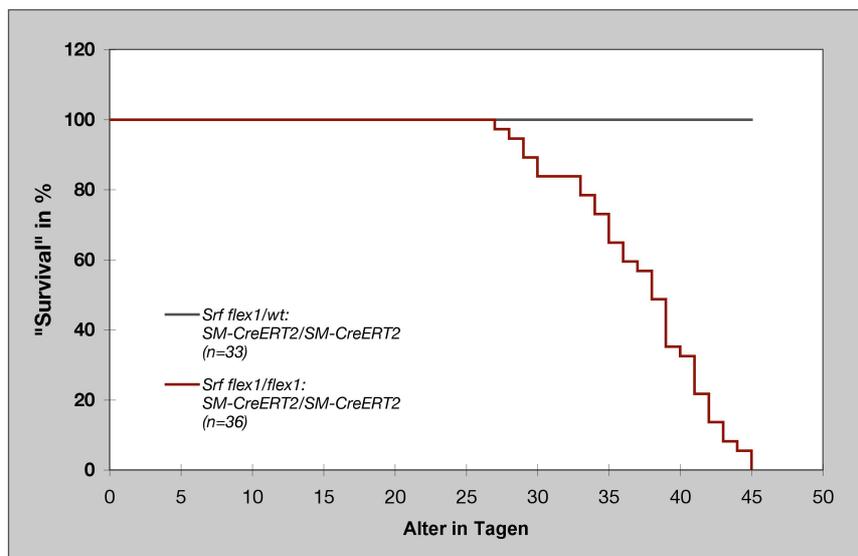


Abb. 3.10: Überlebenskurve unbehandelter *Srf^{flex1/flex1}*; *SM-CreER^{T2}/SM-CreER^{T2}*- und entsprechender Kontroll-Tiere

Unbehandelte Tiere mit den Genotypen *Srf^{flex1/flex1}*; *SM-CreER^{T2}/SM-CreER^{T2}* und *Srf^{flex1/wt}*; *SM-CreER^{T2}/SM-CreER^{T2}* wurden über einen Zeitraum von 50 Tagen beobachtet. *Srf^{flex1/flex1}*; *SM-CreER^{T2}/SM-CreER^{T2}*-Tiere wiesen innerhalb von 45 Tagen nach der Geburt eine 100%ige Letalität aufgrund der bereits beschriebenen krankhaften Veränderungen des Gastrointestinaltraktes auf. Die Tiere der Kontrollgruppe waren phänotypisch völlig unauffällig und gesund.

Da all diese verstorbenen Tiere die exakt gleichen phänotypischen krankhaften Veränderungen des Gastrointestinaltraktes wie die Tamoxifen-induzierten, Glattnuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere aufwiesen (siehe Abschnitt 3.4.3.1 und **Abb. 3.9**), konnte die vermutete "leakiness" des induzierbaren *SM-CreER^{T2}*-Rekombinations-systems *in vivo* bestätigt werden. Zudem kann von einem "Gendosis-Effekt" ausgegangen werden, da zwei Cre-exprimierende Allele diese uninduzierte Letalität verursachten, während nur ein Cre-exprimierendes Allel keine phänotypischen Veränderungen, zumindest in einem Zeitraum von bis zu 50 Tagen, bewirkte. Leider

konnten aufgrund experimenteller Planungen keine ausreichenden Daten zur Erstellung einer Überlebenskurve von unbehandelten *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tieren über einen längeren Zeitraum erfasst werden. Jedoch existierten unbehandelte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere, die im Alter von ca. 90 bis 100 Tagen keine phänotypischen Veränderungen zeigten.

Die nachgewiesene "leakiness" des induzierbaren SM-CreER^{T2}-Rekombinations-systems schien zusätzlich in verschiedenen genetischen Hintergründen der Mauslinien unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Die kongene C57BL/6-Mauslinie mit induzierbarer, Glattmuskel-spezifischer *Srf*-Deletion zeichnete sich durch eine höhere Anfälligkeit für eine partielle, unkontrollierte Aktivität der CreER^{T2}-Rekombinase ohne Induktion durch Tamoxifen aus. So konnte eine 100%ige Letalität der unbehandelten Tiere mit dem *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Genotyp im reinen C57BL/6 Hintergrund innerhalb eines Zeitraumes von drei bis fünf Monaten nach Geburt aufgrund der krankhaften Veränderungen des Gastrointestinaltraktes beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abschnitt 4.3.1). *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere im gemischten genetischen Hintergrund (C57BL/6-NMRI) überlebten hingegen diesen Zeitpunkt und zeigten keine phänotypischen Veränderungen des Intestinaltraktes innerhalb des beobachteten Zeitraumes von bis zu 100 Tagen nach der Geburt. Aus diesem Grund erfolgten die gesamten Analysen des Mausstammes mit induzierbarer, Glattmuskel-spezifischer *Srf*-Deletion ausschließlich im gemischten genetischen Hintergrund (C57BL/6-NMRI).

3.4.3.2 Funktionelle Analysen anhand Glattmuskel-spezifischer SRF-defizienter Tiere

Da sich die Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz schwerwiegend auf die Funktionalität des Gastrointestinaltraktes auswirkte, wurden die physiologischen Funktionen der Glattmuskulatur des Magen-Darm-Traktes ausführlich untersucht.

3.4.3.2.1 *Darstellung der intestinalen Motilität mittels Röntgenkontrast-Computertomographie (CT)*

Die *Srf-knockout*-Tiere zeigten eine massive Störung der Verdauung, was zu einer letalen Verstopfung führte. Um die Vermutung eines durch SRF-Defizienz verursachten "*Ileus paralyticus*", also einer massiv gestörten intestinalen Motilität, zu bestätigen, wurde die Motilität des Gastrointestinaltraktes mittels Röntgenkontrast-Computertomographie (CT) analysiert. Diese Untersuchungen wurden in Kollaboration mit Dr. Bernd Pichler am Institut für Präklinische Bildgebung und Bildgebungstechnologie des Tübingerer Universitätsklinikums durchgeführt.

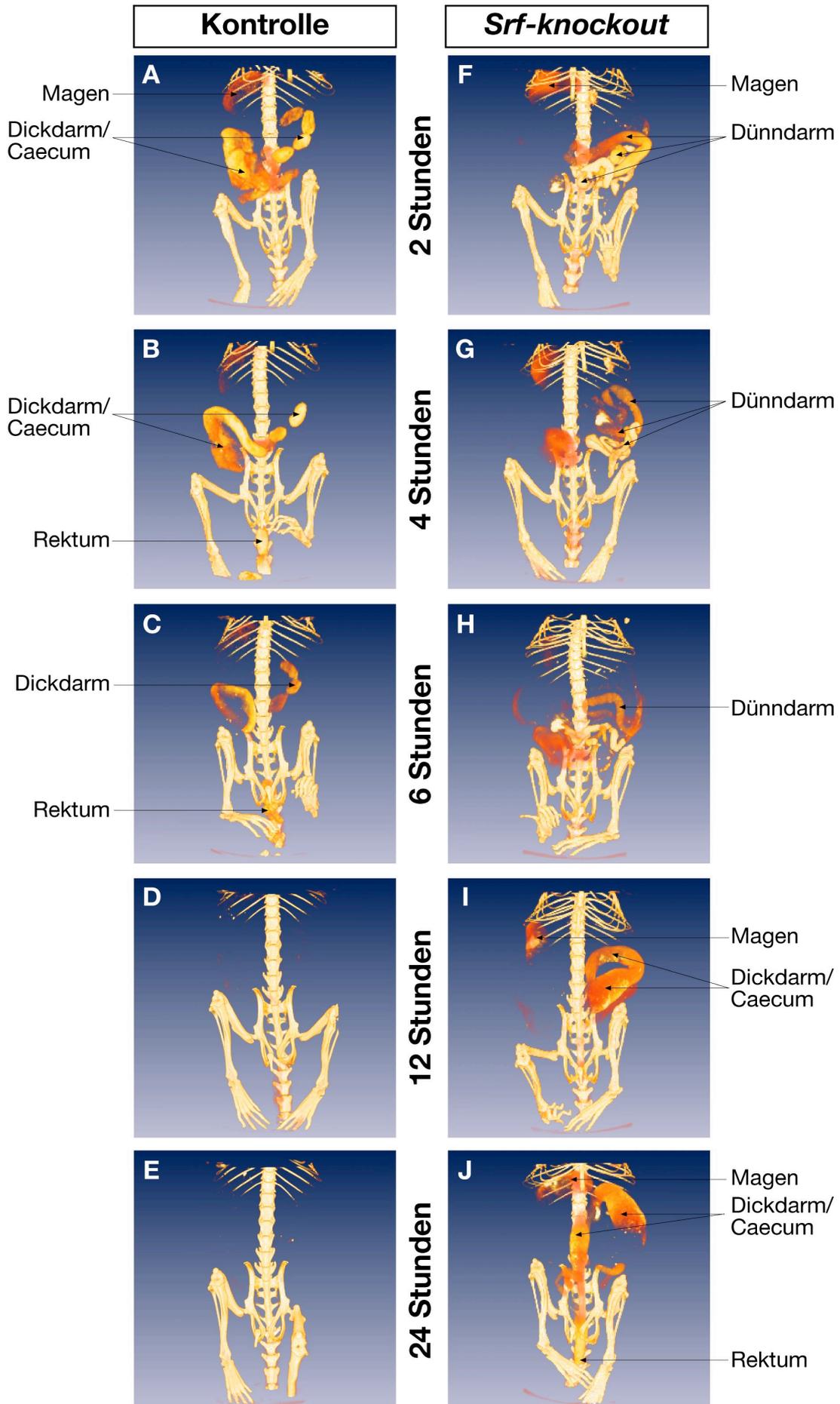
Den *Srf-knockout*-Tieren, die den intestinalen Phänotyp deutlich entwickelt hatten, und den entsprechenden Kontrolltieren wurde ein Kontrastmittel (Gastrolux[®]) oral verabreicht. Nach zwei Stunden, in denen die vorher gefasteten Tiere Nahrung aufnehmen konnten, wurden die ersten CT-Röntgenbilder angefertigt. Weitere Bilder wurden vier, sechs, zwölf und 24 Stunden nach Kontrastmittelverabreichung aufgenommen, um eine zeitliche Darstellung der Nahrungspropulsion im Gastrointestinaltrakt zu erhalten (**Abb. 3.11**).

Bei den Kontrolltieren hatte das Kontrastmittel den Magen und den Dünndarm innerhalb von zwei Stunden passiert und konnte bereits im Dickdarm und im Caecum detektiert werden, wobei der Magen weiterhin kontrasthaltiges Agens enthielt (**Abb. 3.11 A**). Bereits nach vier Stunden war das Signal im Rektum nachzuweisen (**Abb. 3.11 B**), was daraufhin deutet, dass das Mittel bereits nach dieser Zeit durch den gesamten Magen-Darm-Trakt transportiert wurde. Eine vollständige Ausscheidung des Kontrastmittels war bereits nach 12 Stunden zu beobachten, da kein Signal detektiert werden konnte (**Abb. 3.11 D und E**). Dieser bildlich nachgewiesene, zeitliche Verlauf der Nahrungspropulsion bei den Kontrolltieren stimmte somit vollständig mit der bereits bekannten Darmpassagezeit bei Mäusen von ca. 3 bis 4 Stunden überein.

Die Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mäuse wiesen hingegen eine erheblich verminderte Intestinalmotilität auf, was durch die massiv verzögerte Propulsion des Kontrastmittels durch den Magen-Darm-Trakt nachgewiesen wurde. Zu Beginn der Analyse, also zwei Stunden nach der Verabreichung, konnte das Kontrastmittel im Dünndarm detektiert werden, wobei im Magen, wie bei den Kontrolltieren, weiterhin ein schwaches Signal auftrat (**Abb. 3.11 F**). Während das kontrasthaltige Mittel bei den Kontrollen bereits nach 4 und 6 Stunden ausgeschieden wurde, befand sich der Nahrungs- und Kontrastmittelbrei weiterhin erst im Dünndarm der SRF-defizienten Mäuse (**Abb. 3.11 G und H**). Sogar nach 12 und 24 Stunden war weiterhin ein sehr starkes Signal im massiv dilatierten Dickdarm und Caecum detektierbar, also in den Darmbereichen, die am stärksten betroffen zu sein schienen. Auch der Magen zeigte bis zur Abschlussuntersuchung nach 24 Stunden ein deutliches Signal (**Abb. 3.11 I und J**). Erstaunlicherweise erreichte das Kontrastmittel nach 24 Stunden auch das Rektum der *Srf-knockout*-Tiere, wobei keine Ausscheidung von Kot festgestellt werden konnte (**Abb. 3.11 J**).

Abb. 3.11: Analyse der intestinalen Motilität mittels Röntgenkontrast-Computertomographie

Zwölf Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*, **F-J**) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Kontrolle, **A-E**) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen- bzw. Vehikel-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, also nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurde die Röntgenkontrast-Computertomographie durchgeführt. Den Tieren wurde nach 12-stündigem Fasten das Kontrastmittel (Gastrolux®) oral verabreicht. 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach der Verabreichung wurden die Tiere analysiert. Während der Aufnahmen befanden sich die Tiere in Narkose (1.5% Isofluran). Zwischen den Aufnahmen waren die Tiere wach und erhielten reguläres Futter und Wasser. (Durchführung der Röntgenkontrast-Computertomographie fand in Kollaboration mit Dr. B. Pichler am Institut für Präklinische Bildgebung und Bildgebungstechnologie des Tübinger Universitätsklinikums statt).



Diese Analyse der Darmperistaltik mittels Röntgenkontrast-Computertomographie bestätigte die bereits vermuteten schwerwiegenden Defekte in der intestinalen Motilität der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere, die sich bereits in einer verminderten Peristaltik des Dünndarms äußerte und sich entlang des Dickdarms und des Caecums massiv verschlimmerte. Dieser Defekt führte zu einer Nahrungsstauung und folglich zur Verstopfung des Gastrointestinaltraktes der SRF-defizienten Mäuse, was als Ursache der Letalität angesehen werden konnte.

3.4.3.2.2 Isometrische Kraftmessungen an intakten Intestinalgeweben

Die massiv reduzierte Motilität des Intestinaltraktes der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere ließ einen durch SRF-Defizienz verursachten Defekt in der Kontraktilität der Glattmuskelzellen vermuten. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden *ex vivo* isometrische Kraftmessungen an intakten Dün- und Dickdarm-Abschnitten und an der Blase durchgeführt. Diese Daten entstanden in Kollaboration mit Dr. Jörg W. Wegener am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München.

3.4.3.2.2.1 Spontanaktivität der Längsmuskulatur von Dün- und Dickdarm

Bereits bei der Präparation des Gastrointestinaltraktes war bei den Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutlich verminderte Spontanperistaltik zu beobachten. Deshalb wurde zunächst die spontane Kontraktion des Dün- (Jejunum) und Dickdarms untersucht. Diese setzt sich aus rhythmischen Kontraktionen zusammen, die anhand der Frequenz und der Amplitude analysiert werden können.

Die Frequenz der Spontanaktivität des Längsmuskels des Jejunum unterschied sich nicht zwischen den Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Sie reichte von 32 (± 1) Kontraktionen pro Minute bei den Kontroll-Mäusen und bis zu 35 (± 1) Kontraktionen pro Minute bei den *Srf-knockout*-Tieren, während der Längsmuskel des Jejunum von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen 34 Kontraktionen pro Minute zeigte (**Abb. 3.12 A, B und D**).

Die Amplituden der spontanen Kontraktionen der Längsmuskulatur des Dünndarms der *Srf-knockout*-Tiere waren jedoch signifikant kleiner und erreichten durchschnittlich nur

51% des Wertes der Amplituden, die bei Kontrolltieren gemessen wurden. Sie lagen bei nur 0.23 (± 0.03) Newton pro Gramm Nassgewicht (N/g) ($n=15$), während bei den Kontrollen 0.44 (± 0.05) N/g ($n=15$) und bei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen 0.35 (± 0.01) N/g ($n=61$) nachgewiesen wurden (**Abb. 3.12 A-C**).

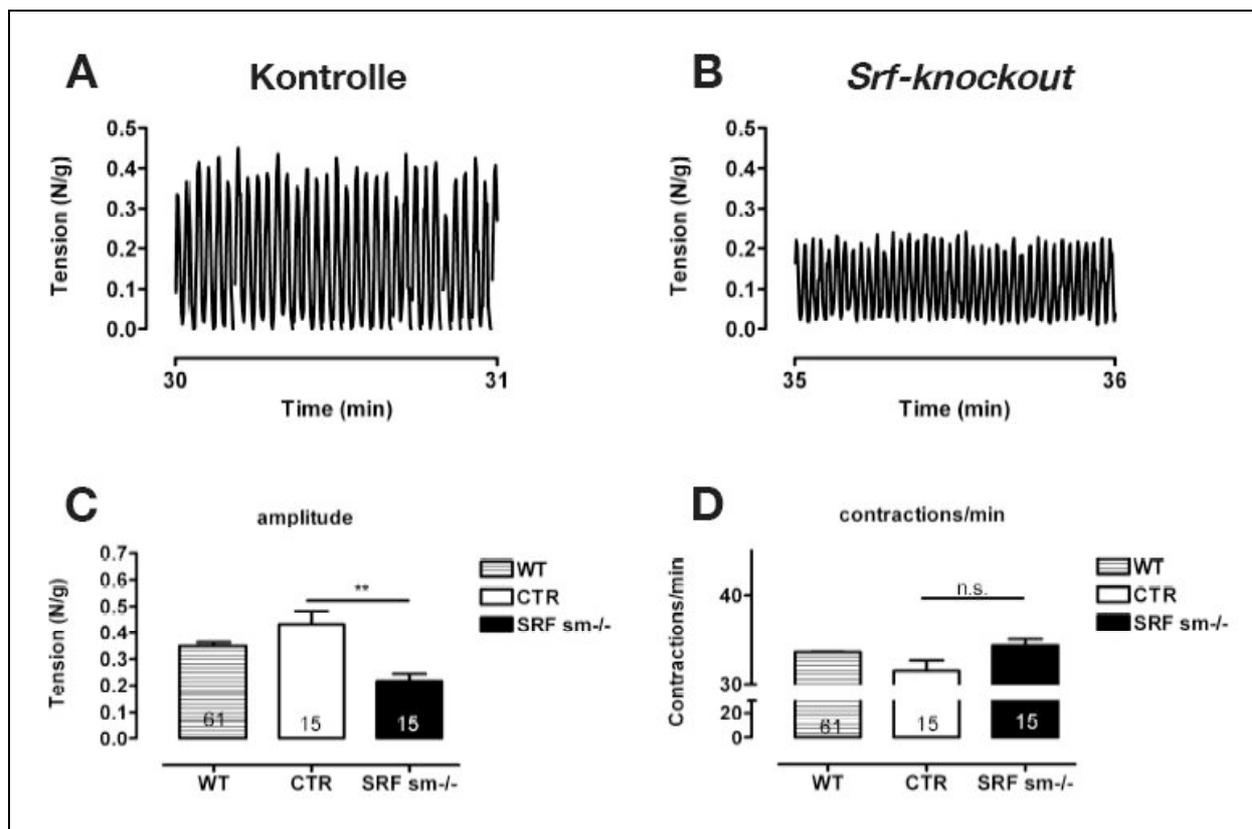


Abb. 3.12: Spontanaktivität des glatten Längsmuskels im Dünndarm (Jejunum)

Elf bis zwölf Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*, *SRF sm*^{-/-}) und *Srf*^{flex1/wt}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle, CTR) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, also nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Spontankontraktionen der Längsmuskulatur des Jejunums isometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Originalaufzeichnungen (**A, B**) und die graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der durchschnittlichen Amplituden (**C**) und der Frequenzen (**D**) der Spontankontraktionen. Die Spontankontraktionen der Längsmuskulatur der *Srf-knockout*-Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduzierte Amplituden, wobei in der Frequenz der Kontraktionen keine Unterschiede festzustellen waren. **, $P < 0.01$; Student's *t*-test.

Die Analyse der Spontanaktivität der Längsmuskulatur des Dickdarms der Glattmuskelspezifischen *Srf-knockout*-Mäuse erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Während im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der spontanen Kontraktionen festgestellt wurde – die *Srf-knockout*-Tiere zeigten eine Frequenz von 10 (± 2) Kontraktionen pro 5 Minuten ($n=12$), die Kontrolltiere und die

C57BL/6-Wildtyp-Mäuse eine Frequenz von $15 (\pm 2)$ ($n=10$) bzw. $10 (\pm 1)$ ($n=19$) Kontraktionen pro 5 Minuten (**Abb. 3.13 A, B und D**) – waren die Amplituden der abgeleiteten Spontanaktivität signifikant kleiner. Sie lagen durchschnittlich bei nur $0.175 (\pm 0.03)$ Newton pro Gramm Nassgewicht (N/g) ($n=12$) ($\approx 57\%$ im Vergleich zur Kontrolle), während bei den Kontrollen $0.3 (\pm 0.04)$ N/g ($n=10$) und bei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen $0.23 (\pm 0.03)$ N/g ($n=19$) nachgewiesen wurden (**Abb. 3.13 A-C**).

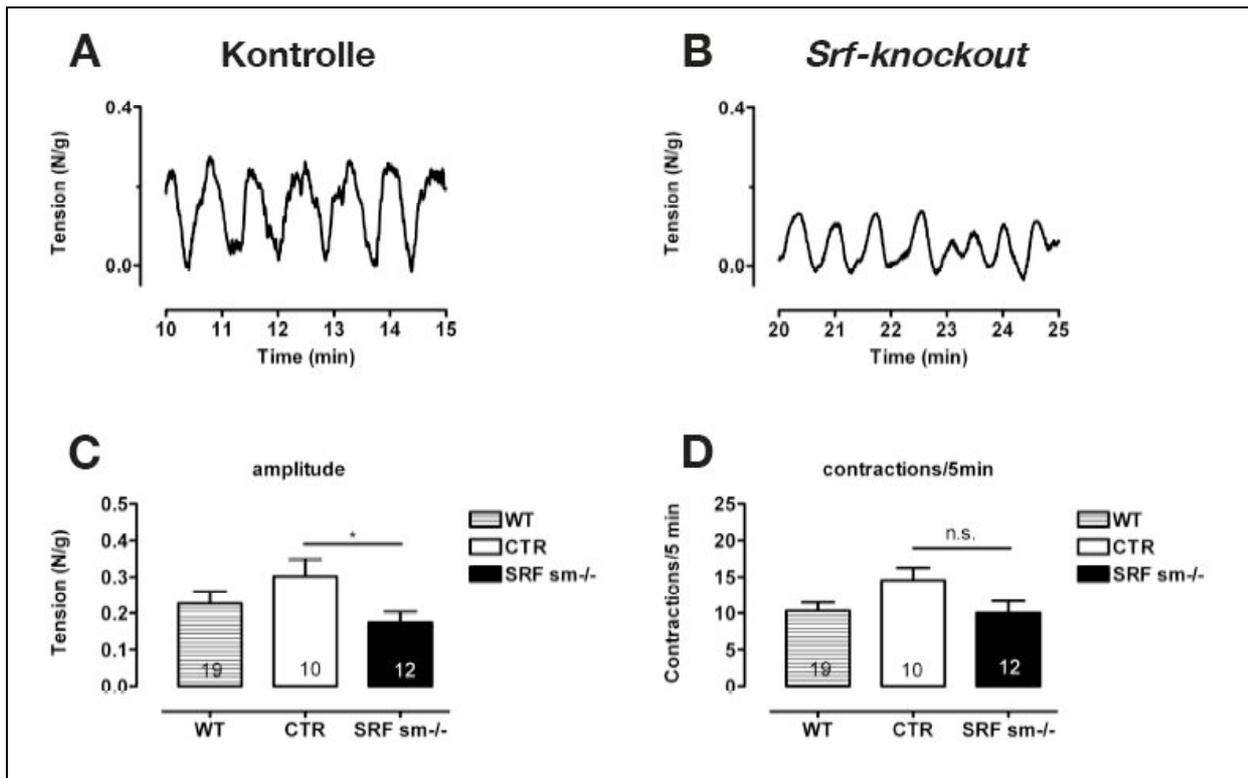


Abb. 3.13: Spontanaktivität des glatten Längsmuskels im Dickdarm

Elf bis zwölf Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2/wt}- (*Srf-knockout*, *SRF sm*^{-/-}) und *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2/wt}-Tiere (Kontrolle, CTR) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, also nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Spontankontraktionen der Längsmuskulatur des Dickdarms isometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Originalaufzeichnungen (**A, B**) und die graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der durchschnittlichen Amplituden (**C**) und der Frequenzen (**D**) der Spontankontraktionen. Die Spontankontraktionen der Längsmuskulatur der *Srf-knockout*-Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduzierte Amplituden, wobei in der Frequenz der Kontraktionen keine Unterschiede festzustellen waren. *, $P < 0.05$; Student's *t*-test.

Diese Ergebnisse der Analyse der Spontanaktivität der Längsmuskulatur des Dünndarm- und Dickdarms implizierten eine verringerte Kraftentwicklung (kleinere Amplituden in SRF-defizienten Geweben) während der spontanen Kontraktion der SRF-defizienten Glattmuskeln, wobei eine grundsätzliche Innervation (gleiche Frequenzen in mutanten und Kontrollgeweben) nicht gestört zu sein schien.

3.4.3.2.2.2 *Carbachol-induzierte Kontraktionen der Muskulatur des Dün- und Dickdarms und von der Blase*

Die Stimulation der glatten Muskulatur durch Hormone oder Neurotransmitter (z. B. Acetylcholin) führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zur Kontraktion. Die Hormonstimulation am longitudinalen Muskel des Dün- oder Dickdarms bewirkt zunächst einen raschen Kraftanstieg (phasische Kontraktion). Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums fällt die Kraft ab, bis sie ein Plateau erreicht (tonische Kontraktion). Carbachol (CCh), ein Strukturanalogon des Acetylcholins, bindet muscarine Rezeptoren wodurch Muskelkontraktion ausgelöst wird (Abschnitt 1.2.4.2).

Im Dünndarm (Jejunum) der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere konnten signifikant verringerte Amplituden der phasischen und der tonischen Kontraktionsphase nachgewiesen werden. Die Amplitude des Maximums der mutanten Tieren lag bei 0.4 (± 0.05) N/g (n=16), die der Kontrolltiere bei 0.6 (± 0.1) N/g (n=15) (**Abb. 3.14 A bis C**). Die tonische Kontraktionsphase der SRF-defizienten Längsmuskulatur zeigte eine durchschnittliche Amplitude von 0.1 (± 0.02) N/g (n=16), die der Kontrolltiere eine Amplitude von 0.3 (± 0.05) N/g (n=15) (**Abb. 3.14 A, B und D**).

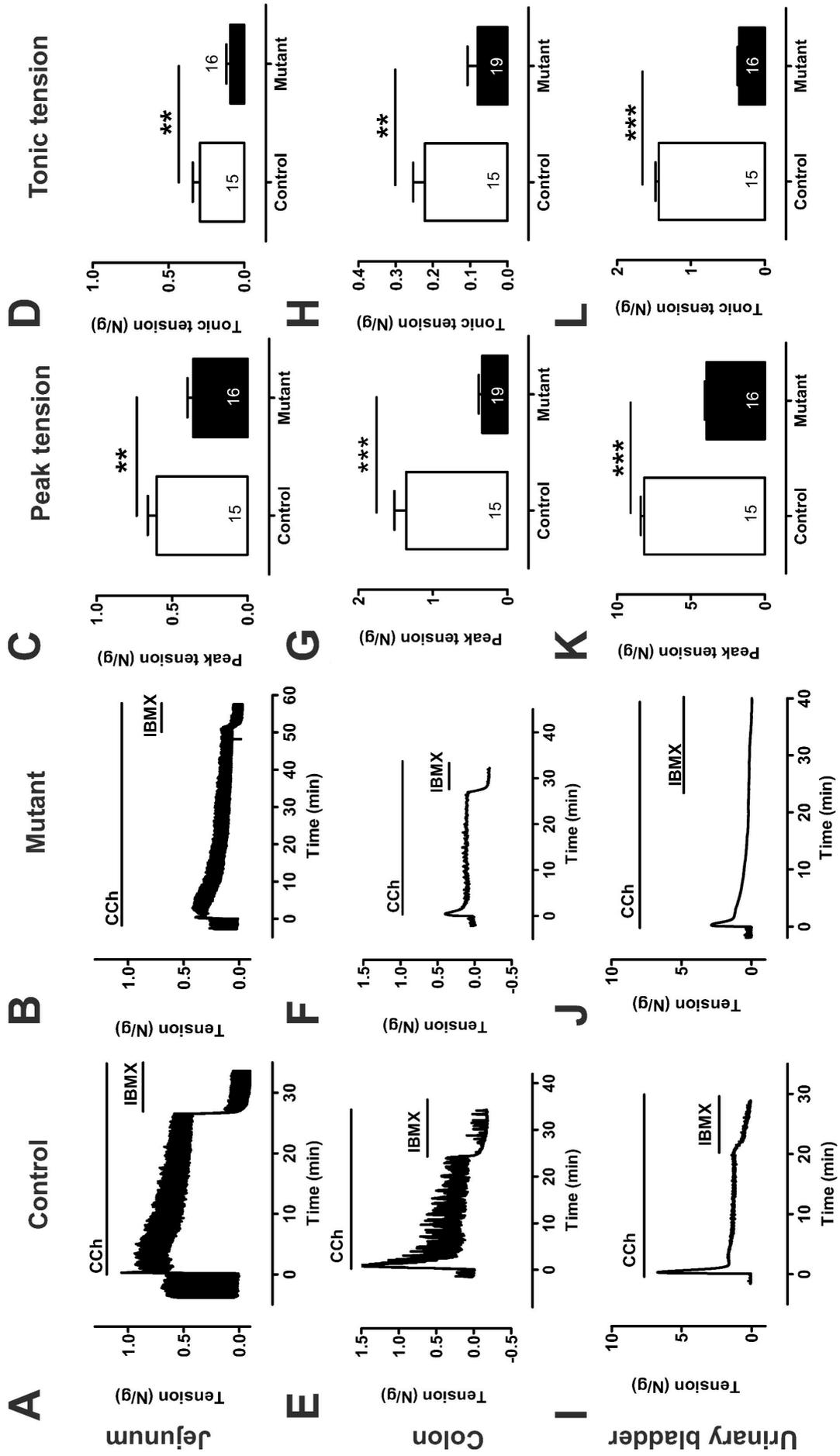


Abb. 3.14: Isometrische Kraftmessungen an intakten Dün- und Dickdarmabschnitten und an der Blase

Elf bis zwölf Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt*- (*Srf-knockout, mutant*) und *Srf^{flex1/wt}; SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Kontrolle, *control*) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, also nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die isometrischen Kraftmessungen an Jejunum (**A bis D**), Dickdarm (*Colon*, **E bis H**) und an der Blase (*Urinary bladder*, **I bis L**) durchgeführt. Gezeigt sind die Originalaufzeichnungen (**A, B, E, F, I, J**) und die graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der durchschnittlichen Amplituden der phasischen (*peak tension*, **C, G, K**) und der tonischen Kontraktionsphase (*tonic tension*, **D, H, L**). Die Amplituden beider Kontraktionsphasen von Organen der *Srf-knockout*-Tiere waren signifikant verringert. Die Anzahl *n* der gemessenen Präparate ist in den Balken angegeben. Der Querbalken in den Originalaufzeichnungen repräsentiert die Anwesenheit der verschiedenen Substanzen (CCh, Carbachol, 10 μ M; IBMX, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin, 100 μ M). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Student's *t*-test.

Die Stimulation der glatten Längsmuskulatur des Dickdarms mit Carbachol erbrachte analoge Ergebnisse, wobei die Unterschiede in den Amplitudenhöhen zwischen Kontroll- und *Srf-knockout*-Tieren noch deutlicher ausgeprägt waren. Die Amplitude der maximalen, phasischen Kontraktion der Kontrolltiere lag bei 1.3 (± 0.2) N/g ($n=15$), während die der mutanten Tieren einen durchschnittlich maximalen Wert von 0.3 (± 0.04) N/g ($n=19$) erreichten ($\approx 25\%$ im Vergleich zur Kontrolle) (**Abb. 3.14 E bis G**). Die tonische Kontraktionsphase der SRF-defizienten Längsmuskulatur des Dickdarms zeigte eine durchschnittliche Amplitude von 0.09 (± 0.03) N/g ($n=19$) ($\approx 36\%$ im Vergleich zur Kontrolle), die der Kontrolltiere eine Amplitude von 0.3 (± 0.05) N/g ($n=15$) (**Abb. 3.14 E, F und H**).

In dieser Versuchsreihe wurde auch die Kontraktion der Blase untersucht, die jedoch bei den bisherigen phänotypischen Analysen keine direkten krankhaften Veränderungen zeigte. Ebenso wie in Dün- und Dickdarm, traten bei den isometrischen Kraftmessungen bei einer Carbachol-induzierten Kontraktion auch in der Blase erhebliche Unterschiede auf. Wiederum wurden signifikant verringerte Amplituden der phasischen und der tonischen Kontraktionsphase nachgewiesen. Die Amplitude des Maximums lag bei den SRF-defizienten Blasen bei 4 (± 0.2) N/g ($n=16$), während bei den Kontrolltieren eine Amplitudenhöhe von 8 (± 0.5) N/g ($n=15$) festgestellt wurde (**Abb. 3.14 I bis K**). Die tonische Kontraktionsphase der Blasen der Kontrolltiere zeigte eine durchschnittliche Amplitude von 1.4 (± 0.06) N/g ($n=15$), die der *Srf-knockout*-Tiere von nur 0.3 (± 0.03) N/g ($n=16$) (**Abb. 3.14 I, J und L**).

Zusammenfassend wurden in allen analysierten Organen der *Srf-knockout*-Tiere, d.h. in Dün- und Dickdarm, sowie in der Blase, signifikante Verringerungen der Amplituden sowohl bei der phasischen, als auch bei der tonischen Kontraktionsphase der

Glattmuskulatur festgestellt. Während der tonischen Kontraktion der Glattmuskulatur des Dünndarms und der Blase konnte eine zeitabhängige Signalabnahme im Verlauf der Messung beobachtet werden (**Abb. 3.14 A, B, I und J**), ein beschriebenes Phänomen, das als *“Rundown”* bezeichnet wird. Dieses *“Rundown”*-Phänomen war in den Organen der SRF-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren zusätzlich deutlicher ausgeprägt (**Abb. 3.14 B und J**), wobei die Ursache dieses verstärkten Effektes unklar blieb.

Die Zugaben von 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) resultierte erwartungsgemäß in einer abrupten Relaxation der glatten Muskulatur aller untersuchten Organe. Die Tatsache, dass durch die Zugabe von IBMX keine Relaxation der Blase von *Srf-knockout*-Tieren nachgewiesen werden konnte, zeigte, dass diese selbst nach Inkubation mit Carbachol keine Kontraktion ausüben konnte (**Abb. 3.14 J**).

3.5 Analyse von SRF-defizienten, adulten, primären Glattmuskulzellen

Um nähere zellbiologische Erkenntnisse der Auswirkungen der SRF-Defizienz auf adulte Glattmuskulzellen zu erhalten, wurden primäre Glattmuskulzellen aus der Aorta und dem Dickdarm isoliert, *in vitro* kultiviert und auf zell- und molekularbiologische Veränderungen analysiert.

3.5.1 Isolierung und Kultivierung von primären Glattmuskulzellen aus der Aorta und aus dem Dickdarm

Die Isolierung von adulten, primären Glattmuskulzellen erfolgte durch einen enzymatischen Verdau der gesamten Aorta (vaskuläre Glattmuskulzellen, VSMCs, *v*ascular *s*mooth *m*uscle *c*ells) oder der abpräparierten Glattmuskulschicht des Dickdarms (viszerale Glattmuskulzellen des Dickdarms, *colon* SMCs). Die Identität der dadurch isolierten Glattmuskulzellen wurde immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen das Glattmuskul-spezifische α -Aktin, SM (*s*mooth *m*uscle) α -Aktin, überprüft. Mehr als 90% der isolierten und kultivierten Zellen wurden angefärbt und zeigten die für

SM α -Aktin typischen, faserartigen Strukturen (**Abb. 3.15**). Die Anwesenheit von nicht angefärbten Zellen (ca. 10%) impliziert eine geringe Verunreinigung der Glattmuskelzellkultur mit anderen Zelltypen, wie z. B. Endothelzellen.

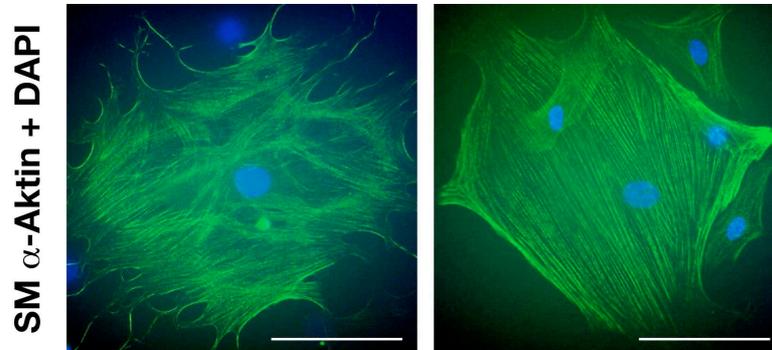


Abb. 3.15: Fluoreszenzfärbung gegen SM α -Aktin an isolierten Glattmuskelzellen der Aorta

Die Glattmuskelzellen wurden wie beschrieben isoliert, kultiviert und immunzytochemisch mit dem SM α -Aktin-Antikörper (Chemicon) gefärbt. Gezeigt sind Glattmuskelzellen aus der Aorta (VSMCs) unbehandelter *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2/wt}-Mäuse. Mehr als 90% der isolierten und kultivierten Zellen wurden angefärbt und zeigten die für SM α -Aktin typischen, faserartigen Strukturen. Maßstab Balken 100 μ m.

3.5.2 *In vitro*-Induktion der Cre-vermittelten Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus in primären Glattmuskelzellen durch Tamoxifen

Zur Induktion der Cre-vermittelten Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus wurden adulte, primäre Glattmuskelzellen aus der Aorta (vaskuläre Glattmuskelzellen, VSMCs) von *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2/wt}-Tieren *in vitro* mit Tamoxifen bzw. Vehikel (Ethanol) behandelt.

Zum Nachweis der Tamoxifen-induzierten Translokation des CreER^{T2}-Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern, wurden Tamoxifen- bzw. Vehikel-behandelte Glattmuskelzellen immunzytochemisch mit einem Cre-Antikörper gefärbt. In Glattmuskelzellen, die mit Ethanol behandelt wurden, konnte das Cre-Protein ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden, während keine Färbung der Zellkerne zu beobachten war (**Abb. 3.16 A**). Die Behandlung der VSMCs mit Tamoxifen führte zur Translokation des CreER^{T2}-Proteins vom Zytoplasma in den Nukleus, was durch eine deutliche Zunahme des Signals im Zellkern, einhergehend mit der Abnahme der zytoplasmatischen Färbung, gezeigt werden konnte (**Abb. 3.16 B**).

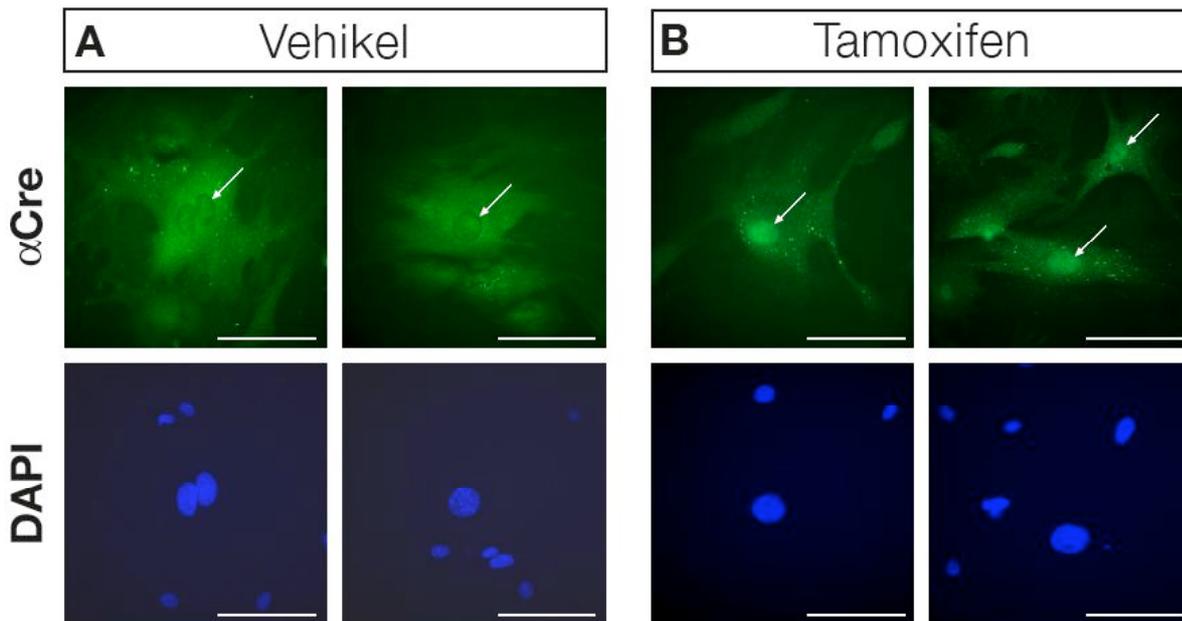


Abb. 3.16: Immunocytochemischer Nachweis der Tamoxifen-induzierten CreER^{T2}-Translokation in den Zellkern

Die Glattmuskelzellen aus der Aorta unbehandelter *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER^{T2}/wt*-Mäuse wurden wie beschrieben isoliert und kultiviert. Nach einer Behandlung der Zellen mit Tamoxifen (1 μM) bzw. Vehikel (Ethanol) für 72 Stunden wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch mit einem Cre-Antikörper (Novagen) gefärbt (obere Reihe). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch das im Einbettmedium enthaltene DAPI (untere Reihe). **(A)** Vehikel-behandelte Zellen zeigten eine ausschließlich zytoplasmatische Cre-Färbung, während die Zellkerne kein Signal aufwiesen (Pfeile). **(B)** Tamoxifen-Behandlung der Zellen führte zur Translokation des Cre-Proteins in den Zellkern, was durch die deutliche nukleäre Cre-Färbung gezeigt wurde (Pfeile). Maßstab Balken 100 μM.

Die Analyse der Rekombination mittels PCR zeigte eine deutliche, nahezu vollständige Tamoxifen-induzierte Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus im Vergleich zu Vehikel-behandelten Glattmuskelzellen, wobei eine Inkubation der Zellen mit Vehikel ebenfalls Rekombination bewirkte (**Abb. 3.17 A**). Jedoch konnte beobachtet werden, dass selbst bei unbehandelten VSMCs direkt nach der Isolation Rekombination detektiert werden konnte, was daraufhin deutet, dass die Deletion des *Srf*^{flex1}-Lokus bereits *in vivo* aufgrund der nachgewiesenen "leakiness" (vgl. Abschnitt 3.4.3.1.1) stattfand (Daten nicht gezeigt). Die Western Blot-Analyse zeigte im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrolle eine klare Reduktion der SRF-"full-length"-Proteinmenge (67 kDa) in Tamoxifen-behandelten Glattmuskelzellen (**Abb. 3.17 B**). Wie auch in einigen Organen von *Srf*-knockout-Mäusen festgestellt, konnte auch in den Lysaten der VSMCs die zusätzliche ~36 kDa-Bande sowohl in den Vehikel-, als auch in den Tamoxifen-behandelten Ansätzen detektiert werden (**Abb. 3.17 B, ***), wobei diese in Tamoxifen-behandelten Zellen stärker zu sein schien.

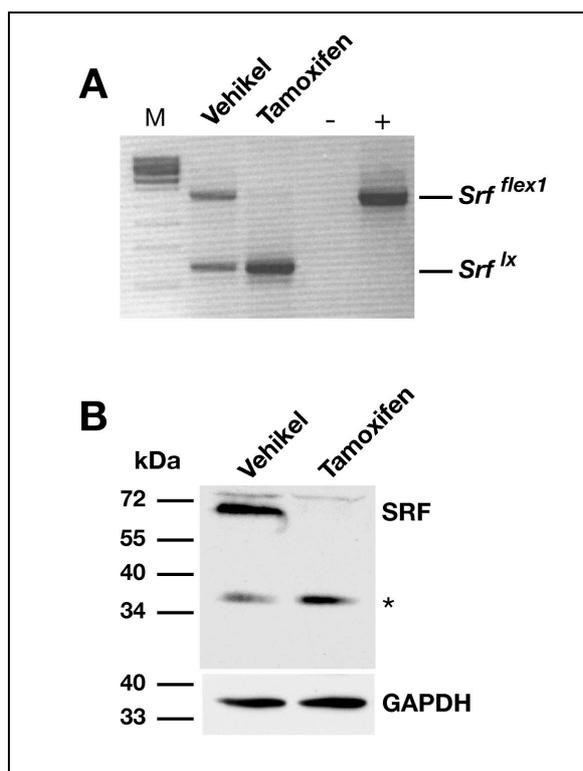


Abb. 3.17: Rekombinations- und Western Blot-Analyse Tamoxifen- und Vehikel-behandelter, vaskulärer Glattmuskelzellen

Die vaskulären Glattmuskelzellen aus der Aorta (VSMCs) un behandelter *Srf^{flex1flex1}; SM-CreER^{T2}/wt*-Mäuse wurden wie beschrieben isoliert und kultiviert. Zellen der 1. Passage wurden entweder mit Tamoxifen (1 μ M) oder mit Vehikel (Ethanol) für 72 Stunden behandelt, woraufhin DNA isoliert und Proteinlysate hergestellt wurden. **(A)** Rekombinationsanalyse der behandelten Zellen mittels PCR mit Verwendung der Primer *Lw-lox* und *Bw-3pri*. Das *Srf^{flex1}*-Allel wird durch das 1.34 kb-Fragment, das deletierte *Srf^{lx}*-Allel durch das 380 bp-Fragment repräsentiert. (M, DNA-Größenstandard, (-) Wasserkontrolle, (+) Positivkontrolle, gereinigte *Srf^{flex1flex1}*-DNA). **(B)** Western Blot-Analyse der behandelten Glattmuskelzellen mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015). Tamoxifen-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen eine deutliche Reduktion der SRF-*full-length*-Proteinmenge (Bande bei 67kDa). Die zusätzliche Bande bei ~36 kDa ist gekennzeichnet (*). Eine gleichmäßige Beladung wurde durch die GAPDH-Ladekontrolle bestätigt.

Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche Induktion der Rekombination des *Srf^{flex1}*-Lokus *in vitro*. Dadurch ist ein neuartiges experimentelles *in vitro*-System zur Generierung SRF-defizienter Glattmuskelzellen etabliert, welches Analysen der Auswirkungen der SRF-Defizienz zu exakt gewählten Zeitpunkten und unter verschiedensten Bedingungen erlaubt.

Die durch SRF-Defizienz verursachten Veränderungen der adulten Glattmuskelzellen werden im Folgenden genauer beschrieben.

3.5.3 Zellbiologische und molekularbiologische Analysen anhand SRF-defizienter Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm

Um die Auswirkungen des durch SRF-Defizienz verursachten, schweren Störungen der intestinalen Motilität auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen, wurden primäre Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm der *Srf-knockout*-Tiere und der entsprechenden Kontrolltiere isoliert, kultiviert und analysiert.

Srf^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*) und *Srf*^{flex1/wt}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) wurden mit Tamoxifen behandelt. Nach deutlicher Ausprägung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse wurden die Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung zeigte die PCR-Analyse erwartungsgemäß eine nahezu vollständige Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus (*Srf*^{lx}), sowohl in den homozygot "gefloxten" *Srf-knockout*-, als auch in den heterozygot "gefloxten" Kontrollzellen, wobei das vorhandene Wildtyp-Allel ebenfalls durch die PCR nachgewiesen werden konnte (**Abb. 3.18 A**). Dementsprechend konnte eine deutliche Reduktion der SRF-Proteinmenge in den *Srf-knockout*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (**Abb. 3.18 B**). Die bereits beschriebene zusätzliche Bande bei ~36 kDa, konnte im Gegensatz zu vaskulären Glattmuskelzellen (VSMCs) in diesen viszerale Glattmuskelzellen aus dem Darm nicht nachgewiesen werden.

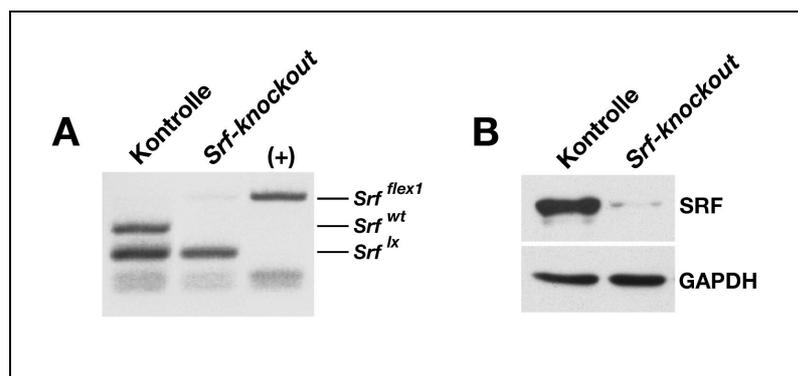


Abb. 3.18: Rekombinations- und Western Blot-Analyse von kultivierten Glattmuskelzellen aus dem Darm Tamoxifen-behandelter Mäuse

Acht bis zehn Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*) und *Srf*^{flex1/wt}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung erfolgte die DNA-Isolation und die Herstellung von Proteinextrakten (Urea-Puffer) aus Glattmuskelzellen der Passage 0. **(A)** Zur PCR-Analyse wurden die Primer *Srf-KO8-fw*, *Srf-KO8-bw* und *Lox2* verwendet, welche das *Srf*^{flex1}-, das *Srf*^{lx}- und das *Srf*^{wt}-Allel amplifizieren können. Die Glattmuskelzellen zeigten eine nahezu vollständige Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus. (+) Positivkontrolle, aufgereinigte *Srf*^{flex1}-DNA. **(B)** Western Blot-Analyse der Glattmuskelzellen aus *Srf-knockout*- und Kontrolltieren mit dem SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015). Primäre Glattmuskelzellen der *Srf-knockout*-Tiere zeigten im Vergleich zu den Zellen der Kontrolltiere eine deutliche Reduktion der SRF-Proteinmenge. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch die GAPDH-Ladekontrolle bestätigt.

Die Analyse der *Srf*-mRNA-Expressionsmenge der Tamoxifen-behandelten *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf*-knockout) und *Srf*^{flex1/wt}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) mittels semi-quantitativer RT-PCR erbrachte ein widersprüchliches Ergebnis. Mit einem Primerpaar, welches ein Amplikon über den Grenzbereich zwischen Exon 4 und 5 des *Srf*-Gens definiert, war in drei Glattmuskelzellpopulationen verschiedener *Srf*-knockout-Tiere nur eine ~35-40%ige Reduktion der *Srf*-mRNA-Menge nachzuweisen (**Abb. 3.19**, links). Mit einem anderen Primerpaar, das ein Amplikon über den Grenzbereich zwischen Exon 1 und 2 des *Srf*-Gens definiert, konnte zwar eine höhere *Srf*-mRNA-Reduktion (~60-80%ige Reduktion) festgestellt werden (**Abb. 3.19**, rechts), was aber weiterhin im Widerspruch zu der drastischen Reduktion der SRF-Proteinmenge stand. Die genaue Ursache der relativ hohen *Srf*-mRNA-Expressionsmenge konnte nicht geklärt werden, könnte aber auf eine unvollständige Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus innerhalb der Zellpopulationen oder auf eine DNA-Kontamination durch einen unvollständigen DNaseI-Verdau während der RNA-Isolierung zurückzuführen sein.

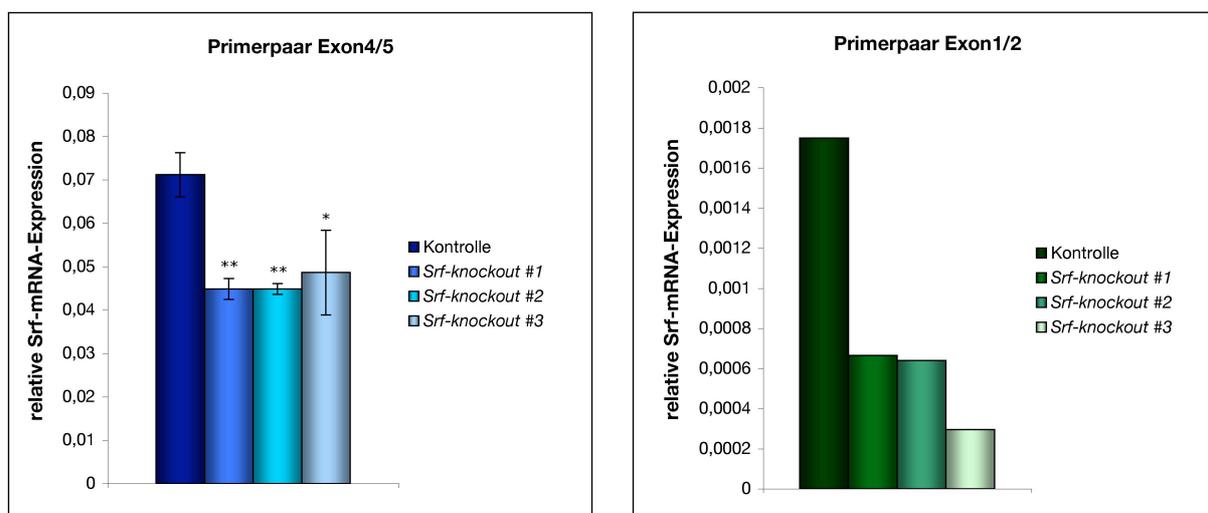


Abb. 3.19: Analyse der *Srf*-mRNA-Expression in kultivierten Darm-Glattmuskelzellen Tamoxifen-behandelter Mäuse

Acht bis zehn Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf*-knockout) und *Srf*^{flex1/wt}: *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf*-knockout-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung erfolgte die RNA-Isolierung mit anschließender semi-quantitativen RT-PCR. Gezeigt sind die relativen *Srf*-mRNA-Expressionsmengen von drei Glattmuskelzellpopulationen aus drei verschiedenen *Srf*-knockout-Mäusen (*Srf*-knockout #1-3), die mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Exon4/5 und Exon1/2) erfasst wurden. (**Rechts**) Die Analysen mit dem Primerpaar Exon 1/2 wurde nur zweimal durchgeführt, weshalb keine statistischen Analysen erfolgen konnten. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis der RT-PCR. (**Links**) Die Balken der relativen *Srf*-mRNA-Mengen zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. *, P<0.05; **, P<0.01; Student's *t*-test.

3.5.3.1 Zellmorphologische Veränderungen der SRF-defizienten Glattmuskelzellen

Nach Isolierung und siebentägiger Kultivierung der adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm Tamoxifen-behandelter *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt-* Tiere (Kontrolle) wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Die Depletion von SRF verursachte drastische zellmorphologische Veränderungen. Die Glattmuskelzellen zeigten eine stark vergrößerte, abgeflachte, sternförmige Morphologie und wiesen einen hohen Anteil an zytoplasmatischen Vakuolen auf (**Abb. 3.20** rechte Spalte). Die für Glattmuskelzellen charakteristische spindelförmige Morphologie mit deutlich ausgeprägten Zellfortsätzen, wie sie die Kontrollzellen zeigten, (**Abb. 3.20**, linke Spalte, Pfeile), konnte in den *Srf-knockout*-Zellen nicht nachgewiesen werden und die Zellfortsätze waren massiv verkürzt oder nicht ausgeprägt.

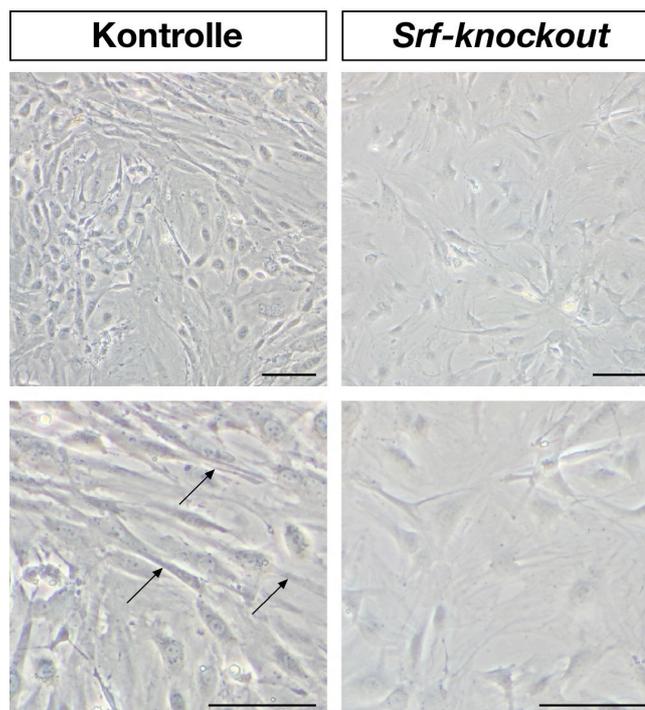


Abb. 3.20: Veränderung der Zellmorphologie in SRF-defizienten adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm

Acht bis zehn Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt-* Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung erfolgte die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie mit Glattmuskelzellen der Passage 0. Die Kontrollzellen zeigten die für Glattmuskelzellen charakteristische spindelförmige Morphologie mit ausgeprägten Zellfortsätzen (Kontrolle, linke Spalte, Pfeile). Die SRF-depletierten Glattmuskelzellen wiesen eine vergrößerte, abgeflachte, sternförmige Morphologie auf, die typischen Zellfortsätze waren stark verkürzt bzw. nicht ausgeprägt. Maßstab Balken 50 μ M.

Die beobachteten Veränderungen der Morphologie der SRF-defizienten adulten Glattmuskelzellen, legte die Vermutung nahe, dass diese die für Glattmuskelzellen spezifischen Eigenschaften verloren hatten und vermutlich einen reduzierten Differenzierungsgrad aufwiesen.

3.5.3.2 Analyse der Viabilität SRF-defizienter, adulter Glattmuskelzellen

Aufgrund der durch SRF-Defizienz verursachten drastischen Veränderungen der Morphologie der Glattmuskelzellen, wurde zunächst die Viabilität der *Srf-knockout*-Zellen mittels des Trypan-Blau-Ausschluss-Tests untersucht.

Diese Methode ermöglicht eine Bestimmung der Anzahl lebender Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Tatsache, dass lebende Zellen eine intakte Zellmembran aufweisen, die das Eindringen von Substanzen (hier Trypanblau) in die Zelle verhindert. Bei toten oder absterbenden Zellen ist aufgrund der degradierten Zellmembran diese Barrierefunktion nicht mehr gewährleistet und der Farbstoff dringt in die Zelle ein.

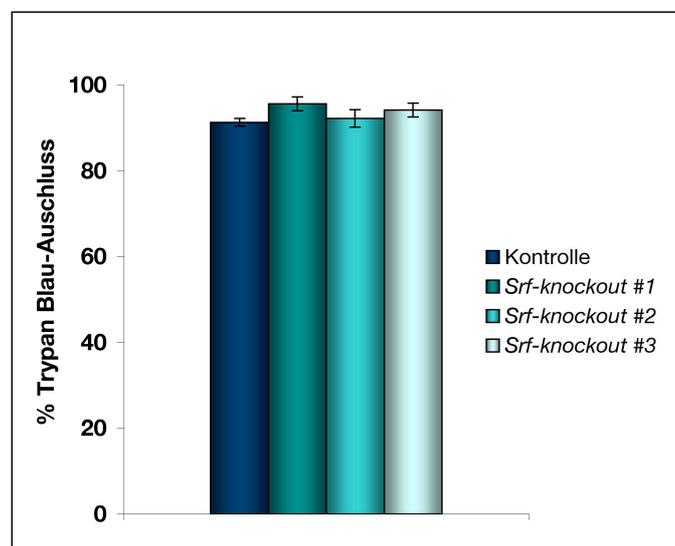


Abb. 3.21: Analyse der Viabilität der SRF-defizienten Glattmuskelzellen

Acht bis zehn Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt-*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung wurde der Trypan-Blau-Ausschluss-Test mit Glattmuskelzellen der Passage 0 durchgeführt. Sowohl die Kontroll-, als auch drei unterschiedlichen Glattmuskelzellkulturen aus drei verschiedenen *Srf-knockout*-Mäusen (*Srf-knockout* #1-3), wiesen eine 90-95%ige Viabilität auf.

Im Viabilitätstest konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Glattmuskelzellen der Kontrolltiere und den SRF-defizienten Glattmuskelzellen der *Srf-knockout*-Tiere festgestellt werden. Sowohl die Kontroll-, als auch die *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen (*Srf-knockout* #1-3) zeigten eine 90-95%ige Viabilität (**Abb. 3.21**). Daher konnte ein durch SRF-Defizienz verursachter Zelltod (Apoptose) der Zellen ausgeschlossen werden.

3.5.3.3 Analyse der Proliferation der SRF-depletierten adulten Glattmuskelzellen

Da gezeigt wurde, dass SRF für die Proliferation einiger somatischen Zelllinien *in vitro* essentiell (Gauthier-Rouviere et al. 1991; Soulez et al. 1996), jedoch für die Proliferation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) verzichtbar ist (Schratt et al. 2001), wurde die initiale Proliferation der SRF-defizienten, primären Glattmuskelzellen untersucht. Dazu wurde direkt nach Isolierung der adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm Tamoxifen-behandelter *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt-* Tiere (Kontrolle) das Proliferationsverhalten mittels eines MTT-Assays und einer herkömmlichen Proliferationskinetik (Zellzählung) über einen Zeitraum von 5 bzw. 6 Tagen analysiert.

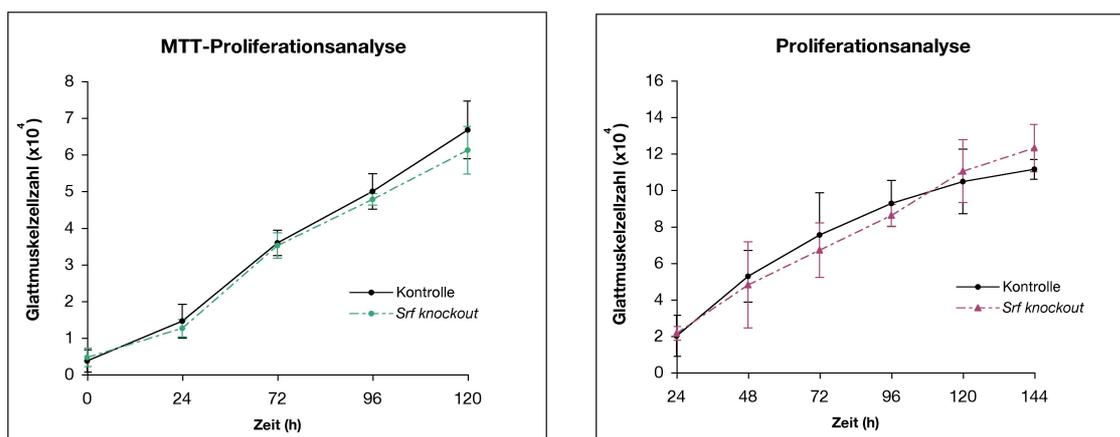


Abb. 3.22: Proliferationsanalyse von SRF-defizienten, adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm

Acht Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt-* bzw. *Srf^{flex1/flex1}: wt/wt-* Tiere (Kontrollen) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Die initiale Proliferation der SRF-defizienten Glattmuskelzellen direkt nach der Isolierung zeigte keinerlei Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. (**Links**) MTT-Proliferations-Assay über einen Zeitraum von 120 h. (**Rechts**) Proliferationskinetik mittels Analyse der Zellzahl über einen Zeitraum von 144 h. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte der Glattmuskelzellzahlen dreier verschiedener Tiere (n=3). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 5 bis 6 Tagen konnten keine Unterschiede im Proliferationsverhalten der SRF-defizienten, primären Glattmuskelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (**Abb. 3.22**), was eine Verzichtbarkeit von SRF in der frühen Proliferation von primären, adulten Glattmuskelzellen implizierte. Jedoch ist eine Ausprägung von negativen Effekten der SRF-Defizienz auf die spätere Proliferationsphase der Glattmuskelzellen nicht ausgeschlossen, weshalb die Proliferation der Zellen über einen längeren Zeitraum untersucht werden müsste. Für die anfängliche, frühe Proliferationsphase scheint SRF jedoch keine bedeutende Rolle zu spielen.

3.5.3.4 Erhöhte Seneszenz in SRF-defizienten adulten Glattmuskelzellen

Die durch SRF-Depletion verursachten, morphologischen Veränderungen der *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen ähneln den Eigenschaften von vaskulären Glattmuskelzellen, die sich in replikativer Seneszenz (*in vitro*) befinden (Goldstein 1990). Zelluläre Seneszenz stellt einen irreversiblen Zellzyklusarrest dar, dem die Zellen selbst durch Stimulation mit mitogenen Faktoren nicht entgehen können. Als spezifischer Marker präseneszenten und seneszenten Zellen *in vitro* und *in vivo* dient die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität, welche durch eine Färbung spezifisch nachgewiesen werden kann (Dimri et al. 1995; Kurz et al. 2000).

Nach Isolierung und Kultivierung der adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm Tamoxifen-behandelter *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Kontrolle) wurde ein Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Test durchgeführt, durch den die endogene β -Galaktosidase-Aktivität bei pH 6.0 ermittelt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass die SRF-defizienten, adulten Glattmuskelzellen eine deutlich erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität und damit eine erhöhte Seneszenzrate aufwiesen (**Abb. 3.23**, rechte Spalte). Die Anzahl an Zellen, mit der für seneszenten Zellen charakteristischen perinukleären Blaufärbung, war in den *Srf-knockout*-Glattmuskelzellpopulationen im Vergleich zu den Kontrollen 7- bis 10-fach erhöht (**Abb. 3.23 A und B**; *, Zellkerne).

Zelluläre Seneszenz kann durch eine Vielzahl verschiedener Arten von Stress, wie z. B. Schädigung der DNA, Mangel an Nährstoffen und/oder Wachstumsfaktoren oder fehlerhafte Zellkontakte, ausgelöst werden (Ben-Porath and Weinberg 2005). Die

genaue Ursache der erhöhten Seneszenz in SRF-depletierten Glattmuskelzellen *in vitro* blieb jedoch unklar und stellt weiterhin eine interessante Thematik für weiterführende Studien dar.

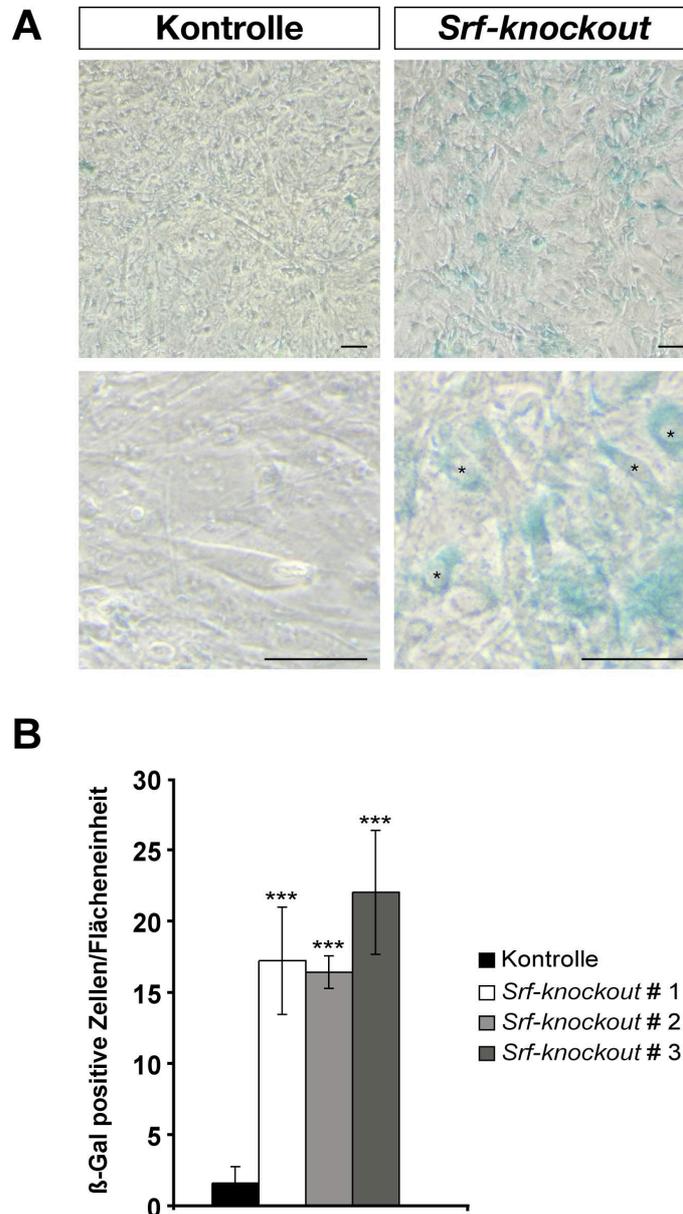


Abb. 3.23: SRF-defiziente, adulte Glattmuskelzellpopulationen zeigen erhöhte Seneszenz

Acht bis zehn Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*) und *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach 10-tägiger Kultivierung wurde der Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Test mit Glattmuskelzellen der Passage 1 durchgeführt. **(A)** Die SRF-defizienten Glattmuskelzellpopulationen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich erhöhte Anzahl an Zellen mit perinukleärer Blaufärbung (* markieren die Zellkerne). Maßstab Balken 50 μ M. **(B)** Quantifizierung des Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Tests. Drei unterschiedliche Glattmuskelzellpopulationen verschiedener *Srf-knockout*-Tiere (*Srf-knockout* #1-3) zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Anzahl an β -Gal-positiven Zellen pro Flächeneinheit. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Student's *t*-test.

Durch die nachgewiesene erhöhte Seneszenz innerhalb der SRF-defizienten Glattmuskelzellpopulationen *in vitro* war der Nachweis einer möglichen Reduktion der Glattmuskelzellzahl *in vivo* im Darm der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mäuse von großem Interesse. Um die Anzahl der Glattmuskelzellen des Dickdarms *in vivo* zu bestimmen, wurde bei der Isolierung der primären Zellen die Zellzahl bestimmt und auf das Nassgewicht der abpräparierten Glattmuskelschicht normalisiert.

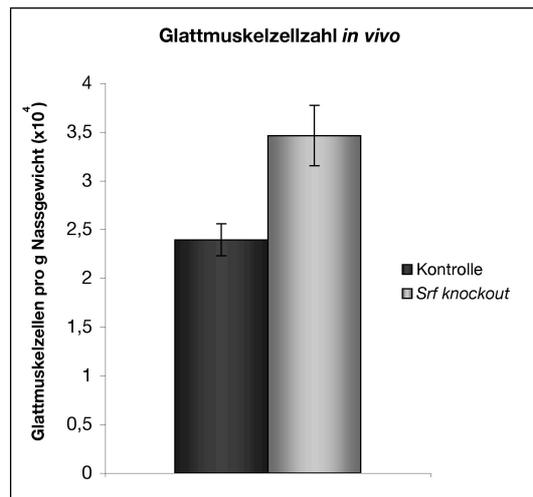


Abb. 3.24: *In vivo*-Glattmuskelzellzahlen im Dickdarm SRF-defizienter Tiere

Acht Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*) und *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*- bzw. *Srf*^{flex1/flex1}; *wt/wt*-Tiere (Kontrollen) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Fünf Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurde die Glattmuskelschicht des Dickdarms abpräpariert und gewogen. Im Anschluss wurden die Anzahl der gewonnenen Glattmuskelzellen bestimmt und auf das Nassgewicht der Glattmuskelschicht normalisiert. Die Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere zeigten keine Reduktion der Anzahl an Glattmuskelzellen des Dickdarms. Vielmehr konnte eine leicht erhöhte Anzahl an Zellen bestimmt werden. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Zellzahlen aus der Glattmuskelschicht des Dickdarms dreier verschiedener Mäuse (n=3). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Es konnte keine Reduktion der Anzahl an Glattmuskelzellen im Dickdarm SRF-defizienter Tiere festgestellt werden (**Abb. 3.24**). Vielmehr war eine leichte Erhöhung der Zellzahlen pro g Nassgewicht zu verzeichnen. Durch die geringe Anzahl von je drei untersuchten Tieren ist jedoch durch eine Erhöhung der Versuchstieranzahl eine Angleichung der Zellzahlen zu erwarten. Auch eine Analyse der Glattmuskelschicht anhand histologischer Schnitte erbrachte keinerlei Hinweise auf eine Reduktion der Anzahl und/oder Dichte der Glattmuskelzellen im Darm der *Srf-knockout*-Tiere (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die festgestellte erhöhte Seneszenz der SRF-defizienten Glattmuskelzellen *in vitro* keine Reduktion der Anzahl an Glattmuskelzellen *in vivo* verursachte.

3.5.3.5 Auswirkungen der SRF-Defizienz auf das Aktin-Zytoskelett adulter Glattmuskelzellen aus dem Darm

Glattmuskelzellen besitzen ein hoch dynamisches Verhalten (z. B. Wechsel zwischen differenziertem und proliferativem Zustand) und können sich unterschiedlichen strukturellen und chemischen Umgebungen der verschiedenen Organe, welche sie besiedeln, anpassen. Im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur, in welcher die Aktinfilamente der Sarkomere stabile Strukturen bilden (Weber et al. 1994), ist eine dynamische Aktinpolymerisation und –depolymerisation während der Kontraktion der Glattmuskulatur essentiell (Adler et al. 1983; Tseng et al. 1997; Mehta and Gunst 1999). Da SRF essentielle Funktionen in der Organisation eines intakten Aktinzytoskeletts, sowie für die Zellmigration und für die Kontraktilität von adulten Herzmuskelzellen einnimmt (Schratt et al. 2002; Alberti et al. 2005; Miano et al. 2007), wurden die Auswirkungen der SRF-Defizienz auf das Aktinzytoskelett primärer, adulter Glattmuskelzellen aus dem Darm untersucht.

Nach Isolierung und Kultivierung der adulten Glattmuskelzellen Tamoxifen-behandelter *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Kontrolle) wurden die Zellen fixiert und das filamentöse Aktin mittels fluoreszierendem Phalloidin angefärbt. Das SRF-Protein wurde mittels einer Antikörperfärbung nachgewiesen. Während in den Glattmuskelzellen der *Srf^{flex1/wt}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (Kontrolle) die Expression von SRF durch die deutliche Kernfärbung nachgewiesen werden konnte, war in den Zellen der *Srf^{flex1/flex1}: SM-CreER^{T2}/wt*-Tiere (*Srf-knockout*) kein Signal zu detektieren (**Abb. 3.25**, mittlere Reihe). Die SRF-depletierten Glattmuskelzellen wiesen ein massiv degeneriertes Aktin-Stressfaser-Netzwerk auf, was durch die stark reduzierte Phalloidin-Färbung gezeigt werden konnte (**Abb. 3.25**, obere Reihe). Die Aktin-Stressfasern, die in den Kontrollzellen den kompletten Zellkörper durchziehen, waren in den *Srf-knockout*-Zellen nicht nachweisbar, wobei im Vergleich zu den Kontrollen eine verstärkte, lokale Anhäufung von kortikalem Aktin an der Plasmamembran detektiert werden konnte (**Abb. 3.25 B**, Pfeile). Diese Beobachtungen untermauern die in SRF-defizienten ES-Zellen nachgewiesenen Defekte bei der Zelladhäsion und Migration, die ebenfalls auf degenerierte Aktin-Stressfasern und fokale Adhäsionskontakte zurückzuführen sind, und einen direkten, funktionalen Zusammenhang von SRF und der Ausbildung und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts darlegen (Schratt et al. 2002).

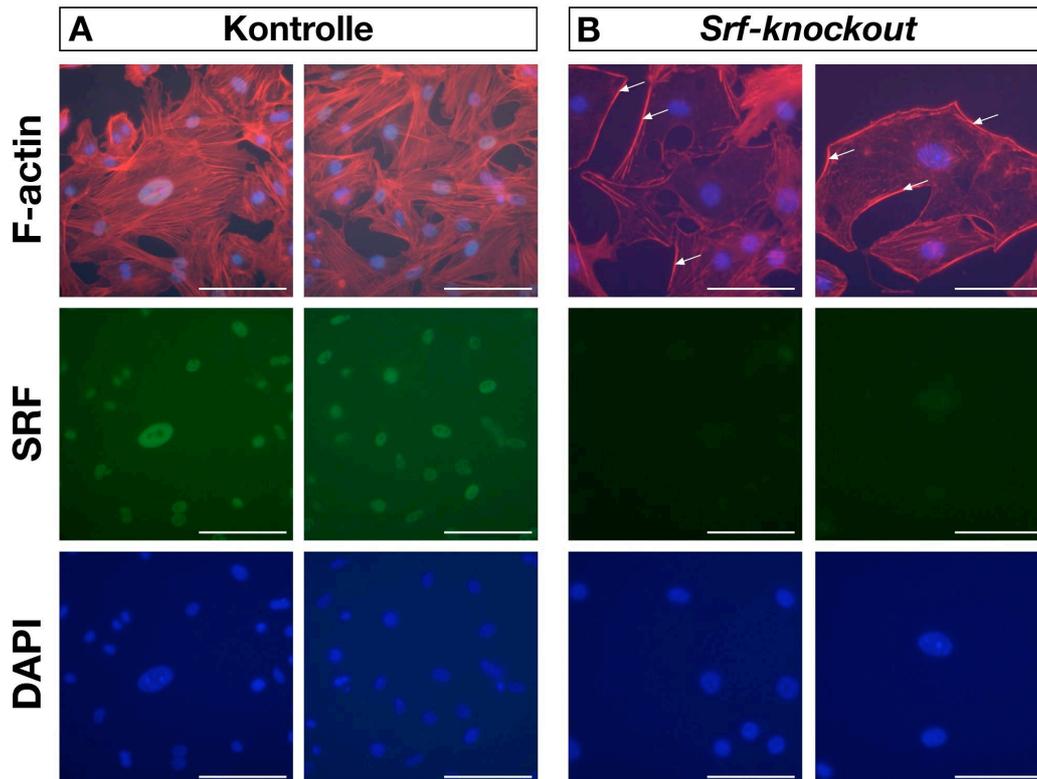


Abb. 3.25: SRF-defiziente, adulte Glattmuskelzellen weisen ein degeneriertes Aktin-Stressfaser-Netzwerk auf

Acht bis zehn Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}; SM-CreER^{T2}/wt-*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach fünftägiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und mit Texas Red[®]-X-Phalloidin, SRF-Antiserum (Santa Cruz, Lot: L015) und DAPI gefärbt. Die Expression von SRF in den Kontrollzellen wurde durch die deutliche Kernfärbung nachgewiesen, während in den Glattmuskelzellen der *Srf-knockout*-Tiere kein Signal detektierbar war. Die *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen (**B**) wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen (**A**) ein massiv degeneriertes Aktin-Stressfaser-Netzwerk mit lokaler Anhäufung von kortikalem Aktin an der Plasmamembran (Pfeile) auf. Maßstabbalken 100 μ M.

Da das für Glattmuskelzellen spezifische *SM α -Aktin*-Gen ein wichtiges SRF-Zielgen darstellt (Mack and Owens 1999), wurde dessen Expression in SRF-defizienten Glattmuskelzellen auf RNA- und Proteinebene analysiert. Die relative Expression der *SM α -Aktin*-mRNA war in drei unabhängigen Glattmuskelzellpopulationen von verschiedenen *Srf-knockout*-Mäusen (*Srf-knockout* #1-3) um 90% bis 99% reduziert (**Abb. 3.26 A**). Übereinstimmend konnte eine signifikante Reduktion der *SM α -Aktin*-Proteinmenge um 80% in SRF-depletierten Glattmuskelzellen nachgewiesen werden (**Abb. 3.26 B und C**). Eine Analyse der *SM α -Aktin*-Expression in SRF-depletierten VSMCs aus der Aorta erbrachte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) und bestätigte dadurch die durch SRF-Defizienz verursachte reduzierte Expression des *SM α -Aktin*s in viszeralen und vaskulären Glattmuskelzellen.

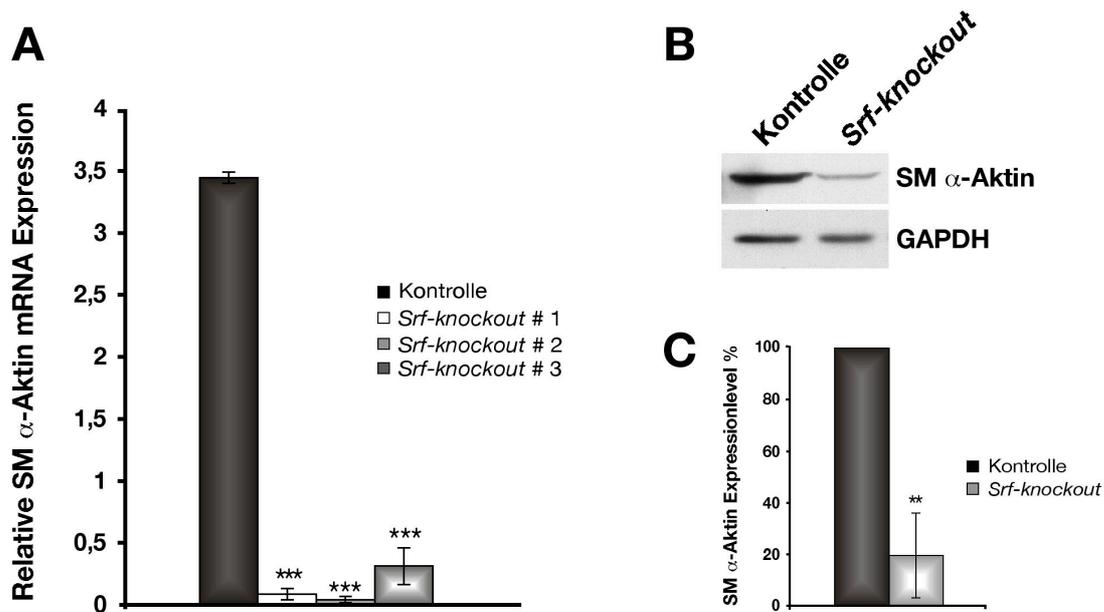


Abb. 3.26: SM α -Aktin-mRNA- und Protein-Expressionsanalyse in *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen

Acht bis zehn Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}; SM-CreER^{T2}/wt-* Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach siebentägiger Kultivierung erfolgte die RNA- und Proteinisolierung. **(A)** Semi-quantitative RT-PCR von Kontroll- und *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen von drei verschiedenen Tieren (*Srf-knockout* #1-3) zeigte eine Reduktion der SM α -Aktin-mRNA-Expression um 90%-99%. Die Balken der relativen SM α -Aktin-mRNA-Mengen zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Student's t-test. **(B)** Die Western Blot-Analyse zeigte übereinstimmend eine signifikante Reduktion der SM α -Aktin-Proteinmenge um 80%. **(C)** Quantifizierung der SM α -Aktin-Proteinexpression. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) mit Glattmuskelzellextrakten dreier unterschiedlicher *Srf-knockout*-Tiere. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Student's t-test.

Da das Aktin-Zytoskelett die entscheidende Funktion in Muskelzellen, die Generierung, die Aufrechterhaltung und die Übertragung von Kraft gewährleistet, ließ der Nachweis eines degenerierten Aktin-Stressfaser-Netzwerks in SRF-defizienten, adulten Glattmuskelzellen vermuten, dass die massiv reduzierte Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur des Intestinaltraktes in erster Linie auf das gestörte Aktin-Zytoskelett zurückzuführen war.

3.5.4 Expressionsanalysen von Glattmuskel-spezifischen und *IEG*-SRF-Zielgenen in SRF-defizienten Glattmuskelzellen und in verschiedenen Organen Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*-Mäuse

Genomische Studien haben belegt, dass nahezu die Hälfte der SRF-regulierten Zielgene für Proteine kodieren, deren Funktion auf Aktin-Dynamik, auf die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien und auf Muskelkontraktion begrenzt ist (Miano et al. 2007). Glattmuskelzellen zeichnen sich durch die Expression einer Reihe von Glattmuskel-spezifischen, zytoskelettalen und kontraktile Proteinen aus, von welchen ca. 70% eine oder mehrere CArG-Boxen in den Promoterregionen der korrespondierenden Gene aufweisen (Beispiele siehe **Tabelle 1.1**) (Miano 2003; Owens et al. 2004). Deshalb wurde die Expression einiger dieser wichtigen Glattmuskel-spezifischen SRF-Zielgene in SRF-defizienten, adulten Glattmuskelzellen und in verschiedenen Organen Glattmuskel-spezifischer *Srf-knockout*-Mäuse mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert.

Es wurde gezeigt, dass die Expression der Glattmuskel-Markergene *SM22 α* , *SM-MHC* und *Smoothelin-A* in allen drei unterschiedlichen Glattmuskelzellpopulationen unterschiedlicher Mäuse signifikant reduziert war (**Abb. 3.27**). Die relative mRNA-Menge von *SM22 α* zeigte eine Reduktion um ca. 90%, wobei dabei berücksichtigt wurde, dass bereits ein Allel des *SM22 α* -Lokus aufgrund des Cre-*“knock-in`s”* der SMCreER^{T2}-Tiere deletiert war (**Abb. 3.27 A**). Die Expression von *SM-MHC*, einem weiteren Glattmuskel-spezifischen Markergen, war in den *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um ca. 70% reduziert (**Abb. 3.27 B**). *Smoothelin-A*, ein weiteres wichtiges SRF-Zielgen, das ein zytoskelettales Markerprotein in viszerale Glattmuskelzellen kodiert, ist für eine funktionstüchtige Kontraktion der Glattmuskulatur des Intestinaltraktes essentiell (Niessen et al. 2005; Rensen et al. 2006). In SRF-defizienten Glattmuskelzellen konnte eine signifikante Reduktion der Expression der *Smoothelin-A*-mRNA nachgewiesen werden, wobei innerhalb der verschiedenen Glattmuskelzellpopulationen eine höhere Varianz in der Reduktion festzustellen war, die von ca. 50% bis 80% reichte (**Abb. 3.27 C**).

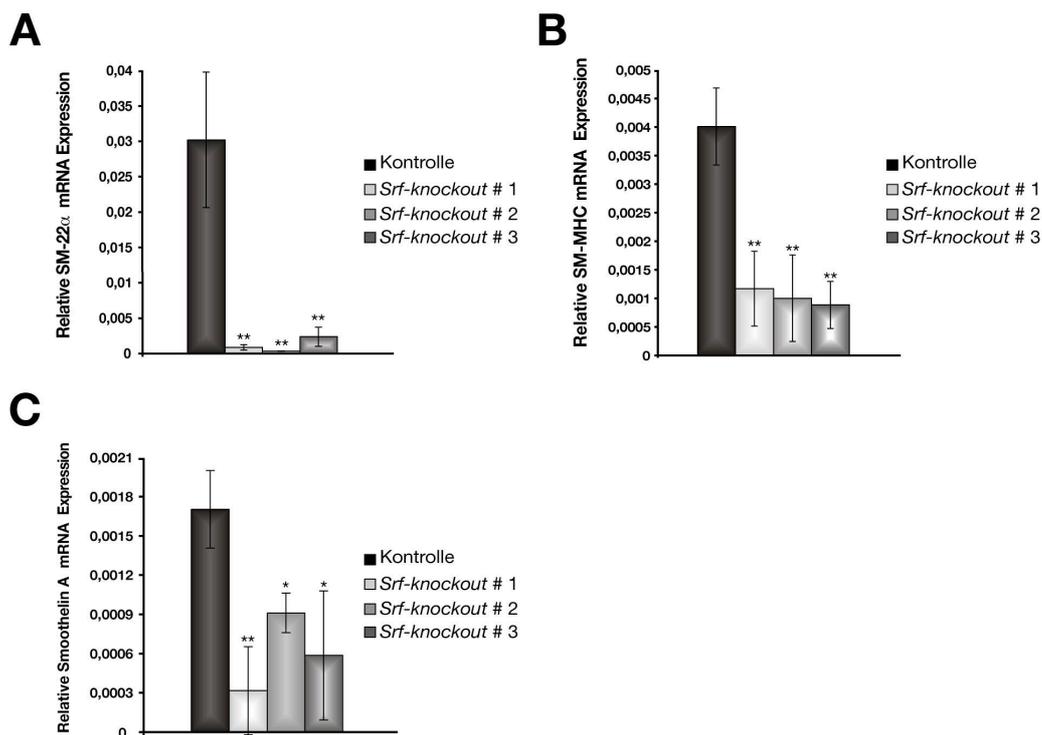


Abb. 3.27: Analyse Glattmuskel-spezifischer SRF-Zielgene in primären, adulten Glattmuskelzellen SRF-defizienter Mäuse

Acht bis zehn Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf-knockout*) und *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach achttägiger Kultivierung erfolgte die RNA-Isolierung und die semi-quantitative RT-PCR-Analyse. Gezeigt sind die relativen mRNA-Mengen von Kontroll- und *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen von drei verschiedenen Tieren (*Srf-knockout* #1-3). Die Expression der Glattmuskel-Markergene *SM22 α* (**A**), *SM-MHC* (**B**) und *Smoothelin-A* (**C**) war in allen drei unterschiedlichen Glattmuskelzellpopulationen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Die Balken der relativen mRNA-Mengen zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Student's *t*-test.

Die in SRF-defizienten, primären Glattmuskelzellen nachgewiesene reduzierte Expression wichtiger Glattmuskel-spezifischer Markergene sollte zusätzlich in Gewebeproben der *Srf-knockout*-Tiere bestätigt werden. Dazu erfolgte eine mRNA-Isolation aus verschiedenen Organproben, die mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert wurden. Die drastische Reduktion der Glattmuskel-Markergene *SM α -Aktin*, *SM22 α* und *SM-MHC* konnte auch in den glattmuskulären Organen der *Srf-knockout*-Tiere, dem Dünndarm, Dickdarm und Magen bestätigt werden (**Abb. 3.28**). In nicht-glattmuskulären Organen, wie dem Herz oder der Skelettmuskulatur, war eine Expression der Glattmuskel-spezifischen Markergene erwartungsgemäß äußerst gering. Der Nachweis dieser niedrigen Expression war vermutlich auf die in den Blutgefäßen vorkommenden, vaskulären Glattmuskelzellen zurückzuführen.

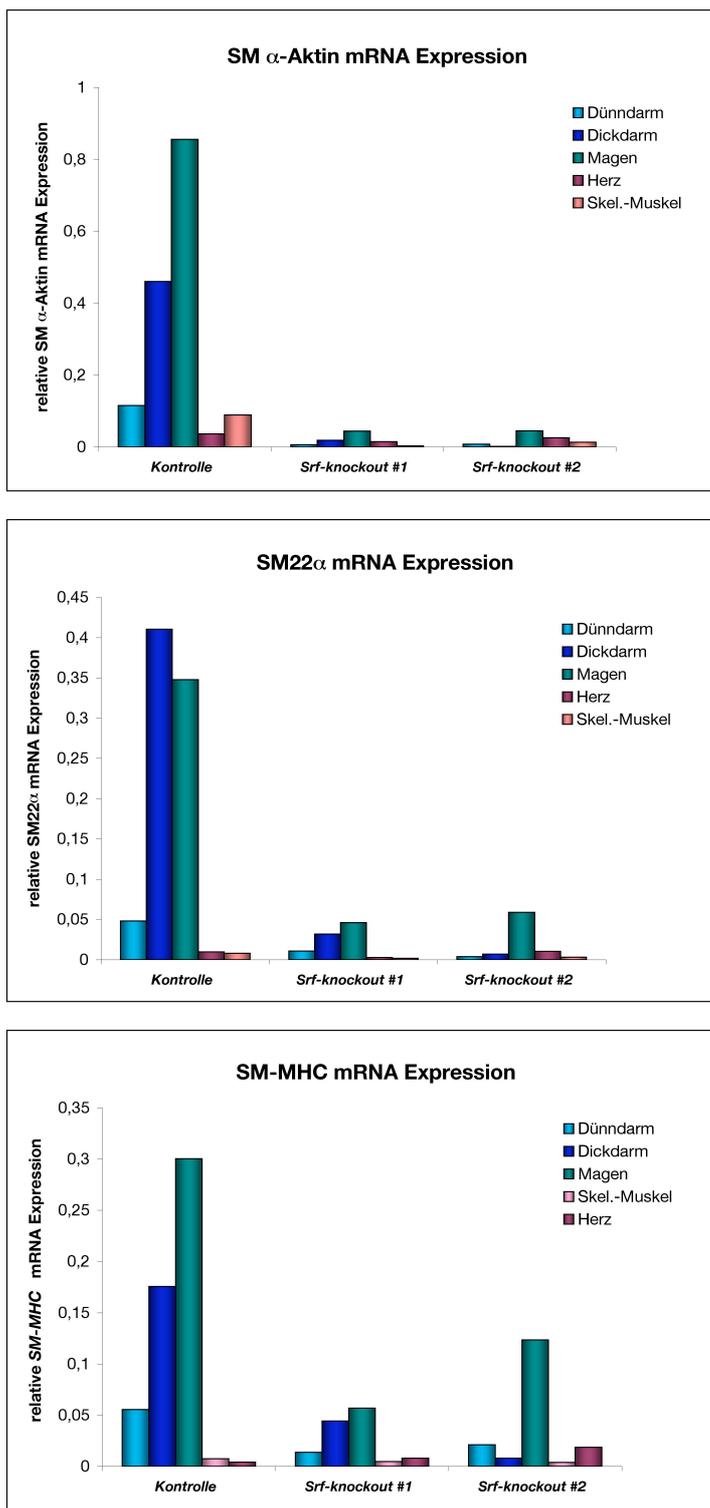


Abb. 3.28: Analyse Glattmuskel-spezifischer SRF-Zielgene in verschiedenen Organen SRF-defizienter Mäuse

Acht bis zwölf Wochen alte *Srf*^{flex1/flex1}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*- (*Srf*-knockout) und *Srf*^{flex1/flex1}; *wt/wt*- bzw. *Srf*^{flex1/wt}; *SM-CreER*^{T2}/*wt*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sieben Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf*-knockout-Mäuse, erfolgte die Organentnahme mit anschließender RNA-Isolation und semi-quantitativer RT-PCR-Analyse. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse der relativen mRNA-Mengen von Organen der Kontroll- und *Srf*-knockout-Tiere. Die Expression der Glattmuskel-Markergene *SM α -Aktin* (**oben**), *SM22 α* (**mitte**) und *SM-MHC* (**unten**) zeigte in glattmuskulären Organen, wie Dünndarm, Dickdarm und Magen, im Vergleich zu den Kontrolltieren eine stark reduzierte Expression.

Die deutliche Reduktion der Glattmuskel-spezifischen Markergene *SM α -Aktin*, *SM22 α* , *SM-MHC* und *Smoothelin-A* bestätigte, dass SRF in primären, adulten Glattmuskelzellen eine essentielle Rolle bei der Regulation der Expression dieser wichtigen Glattmuskel-spezifischen Markergene spielt. Somit konnte auch mittels des im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Mausmodells SRF eine bedeutende Funktion bei der Aufrechterhaltung des Glattmuskelzellphänotyps zugeschrieben werden.

Da SRF auch die transkriptionelle Induktion vieler verschiedener “*immediate early*”-Gene (*IEGs*) reguliert, wurde zusätzlich zu den Glattmuskel-spezifischen Markergenen die basale Expression einiger *IEGs* untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die SRF-defizienten, primären Glattmuskelzellen ebenfalls eine signifikant reduzierte basale Expression von *c-fos* (Reduktion um ca. 65%), *egr-1* (Reduktion um ca. 80%) und *egr-2* (Reduktion um ca. 55%) aufwiesen (**Abb. 3.29**).

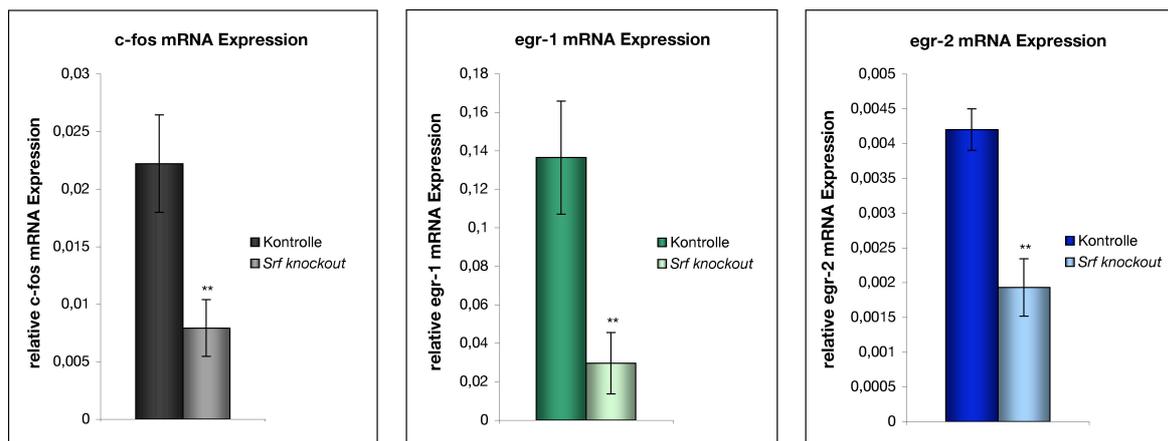


Abb. 3.29: Analyse der “*immediate early*”-Genexpression in primären, adulten Glattmuskelzellen SRF-defizienter Mäuse

Acht bis zehn Wochen alte *Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/wt-* (*Srf-knockout*) und *Srf^{flex1/wt}; SM-CreER^{T2}/wt-*-Tiere (Kontrolle) erhielten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen-Injektionen. Sechs Tage nach der letzten Injektion, nach deutlicher Entwicklung des intestinalen Phänotyps der *Srf-knockout*-Mäuse, wurden die Glattmuskelzellen aus dem Darm isoliert und in Kultur genommen. Nach achttägiger Kultivierung erfolgte die RNA-Isolierung und die semi-quantitative RT-PCR-Analyse. Gezeigt sind die relativen mRNA-Mengen von Kontroll- und *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen. Die Expression der “*immediate early*”-Gene *c-fos* (**links**), *egr-1* (**mitte**) und *egr-2* (**rechts**) war in SRF-defizienten Glattmuskelzellen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduziert. Die Balken der relativen mRNA-Mengen zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; Student’s *t*-test.

Die Tatsache, dass SRF essentiell an der Regulation der *IEGs* beteiligt ist (Hill et al. 1993; Johansen and Prywes 1994; Schrott et al. 2001), konnte somit auch in primären, adulten Glattmuskelzellen bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Konditional SRF-defiziente Mäuse – Möglichkeiten und Grenzen

Konstitutive SRF-Defizienz führt zur frühen embryonalen Letalität an Tag E6.5 der Embryonalentwicklung, weshalb die Funktion von SRF weder zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung, noch im adulten Tier analysiert werden konnte (Arsenian et al. 1998). Um die embryonalen Letalität umgehen zu können, wurden Strategien zur konditionalen, d.h. Gewebe-spezifischen *Srf*-Inaktivierung entwickelt, welche erfolgreiche Analysen der SRF-Funktion in verschiedensten Geweben, sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch in adulten Mäusen, ermöglichten. Hierzu zählt das genetisch vermittelte *Cre/loxP*-Rekombinationssystem, das bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben wurde.

Die somatische Mutagenese mithilfe des *Cre/loxP*-Rekombinationssystems kann jedoch auch einige Probleme bzw. Nachteile mit sich bringen:

Oftmals sind die Gewebe-spezifischen Promotoren, welche die *Cre*-Expression steuern, nur in einem Teil der Zellen des gewünschten Gewebes aktiv, was den Anteil der rekombinierten Zellen im Zielgewebe vermindert (*“mosaicness”*). Zudem kann mangelnde Gewebespezifität zu einer unerwarteten Expression des *Cre*-Proteins in anderen Zellen führen, wodurch Rekombination auch in unerwünschten Geweben auftreten kann. Die Verwendung Liganden-induzierbarer *Cre*-Rekombinasen zur zeitlichen Steuerung der Rekombination ist nicht nur stark von der Gewebespezifität, sondern zusätzlich von der Stringenz der Kontrollierbarkeit der Rekombinaseaktivität abhängig. Somit besteht die Gefahr eines unkontrollierten Rekombinationsereignisses ohne direkte Aktivierung des *Cre*-Proteins (*“leakiness”*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels des *Cre/loxP*-Rekombinationssystems eine zeitlich-induzierbare, Glattmuskel-spezifische, SRF-defiziente Mauslinie generiert, welche die Analyse der Funktion von SRF in adulten Glattmuskelzellen erlaubt. Für die Analyse des Phänotyps der Mausmutanten war es notwendig, möglichst homogene

Versuchstiergruppen zu erhalten. Hierzu wurden die konditionalen *Srf*-Mutanten und geeignete Kontrolltiere nach einem optimalen Verkreuzungsschema gezüchtet (**Abb. 2.3**). Die so erzeugten, transgenen Mäuse sollten die Cre-Rekombinase ausschließlich in Glattmuskelzellen exprimieren, was eine Glattmuskel-spezifische, Tamoxifen-induzierbare Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus zum deletierten *Srf*^{lx}-Lokus gewährleistete (vgl. Abschnitt 1.3.1). In allen anderen nicht Cre-exprimierenden Gewebe- oder Zelltypen sollte das *Srf*^{flex1}-Allel intakt bleiben.

4.2 Die Funktion von SRF in Muskelgeweben

Der Serum Response Faktor (SRF) stellt einen ubiquitär exprimierten MADS-Box-Transkriptionsfaktor dar, der die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, welche verschiedenste zellulärer Prozesse beeinflussen. Bis heute sind mehr als 200 Gene identifiziert, die in deren Promotorregionen eine oder mehrere SRF-Bindestellen aufweisen. Mehr als die Hälfte dieser SRF-Zielgene kodieren Proteine, deren Funktion in Zusammenhang mit der Aktinzytoskelett-Dynamik und zellulärer Kontraktion gebracht werden kann (Miano et al. 2007).

Viele Geninaktivierungsstudien *in vivo* haben gezeigt, dass die Expression von SRF für das Überleben eines Organismus unbedingt essentiell ist. Die konstitutive Inaktivierung von SRF führt zu früher embryonaler Letalität während der Gastrulation, wobei die Embryonen kein Mesoderm entwickeln und eine drastische Reduktion der *IEG*-Expression zeigen (Arsenian et al. 1998). Eine Gewebe-spezifische Inaktivierung von SRF erfolgte bisher v.a. zur Aufklärung der Funktion von SRF im Gehirn und im Muskel der Maus. So konnte gezeigt werden, dass eine Herzmuskelzell-spezifische Deletion des *Srf*-Gens während der Entwicklung zu embryonaler Letalität aufgrund von Defekten in der Herzmuskulatur führt (Parlakian et al. 2004), während die induzierte Depletion von SRF im adulten Herzmuskel 8 bis 10 Wochen nach der *Srf*-Deletion zu einem Herzfehler in Form einer dilatierten Kardiomyopathie und schließlich zum Tode führt (Parlakian et al. 2005). Auch in der Entwicklung und Funktion der Skelettmuskulatur übernimmt SRF essentielle Funktionen, da SRF-Defizienz in einer gestörten Skelettmuskelentwicklung und damit in perinataler Letalität resultiert (Li et al. 2005), sowie Wachstums- und Regenerationsdefekte des adulten Skelettmuskels verursacht (Charvet et al. 2006). Eine Depletion von SRF im Kardivaskulärsystem während der

Embryonalentwicklung resultiert in einer gestörten Myofibrillen-Ausbildung im Herzmuskel und in Störungen zytoskelettaler Strukturen in Glattmuskelzellen der Aorta. Zudem konnte eine verminderte Migration der SRF-defizienten Zellen zur dorsalen Aorta nachgewiesen werden, was mit einer mangelnden Ausbildung von Lamellipodien der glatten Muskelzellen einherging (Miano et al. 2004).

Obwohl die essentielle Rolle von SRF in der Entwicklung von Glattmuskelzellen während der Embryogenese dargelegt wurde (Miano et al. 2004), war die Funktion von SRF in adulten Glattmuskelzellen *in vivo* bisher unbekannt.

Um die genaue Rolle von SRF in der glatten Muskulatur *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie einer zeitlich-steuerbaren, konditionalen Inaktivierung des *Srf*-Gens in Glattmuskelzellen adulter Mäuse entwickelt. Dazu wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem Glattmuskel-spezifischen *SM22 α* -Promotor exprimiert (Kuhbandner et al. 2000). Durch die Kreuzung dieser Cre-Mauslinie mit der transgenen *Srf*^{*flex1*}-Mauslinie, dessen Exon1 des *Srf*-Gens von zwei Cre-Erkennungssequenzen (*lox-P sites*) flankiert ist (Wiebel et al. 2002) und durch Cre-vermittelte Exzision entfernt werden kann, wurden zeitlich-induzierbare, Glattmuskel-spezifische, SRF-defiziente Mäuse generiert, welche eine Analyse der Auswirkungen der SRF-Defizienz in adulten Glattmuskelzellen erlauben.

4.3 Analyse der *in vivo*-Funktion von SRF im Glattmuskelgewebe adulter Mäuse

4.3.1 Generierung Glattmuskel-spezifischer, SRF-defizienter Mäuse

Zur Generierung der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mäuse wurden ausschließlich Tiere mit dem Genotyp *Srf*^{*flex1/flex1*}: *SMCreER*^{*T2*}/*wt* an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit Tamoxifen induziert. Da es sich bei dem modifizierten *SM22 α* -Lokus um ein "*knock-in*"-Allel handelt, wodurch aufgrund der genomischen Insertion des *CreER*^{*T2*}-Allels ein *SM22 α* -Nullallel generiert wird, sollte das weiterhin vorhandene *SM22 α* -Wildtyp-Allel mögliche, durch *SM22 α* -Defizienz verursachte unspezifische Veränderungen grundlegend ausschließen. Zwar konnte gezeigt werden, dass *SM22 α* -Defizienz keinerlei negativen Auswirkungen auf die Glattmuskelzellendifferenzierung und

–funktion während der Embryonalentwicklung bewirkt (Zhang et al. 2001). Jedoch schreiben aktuelle Studien SM22 α eine entscheidende Funktion bei der Regulation einer Kalzium-unabhängigen Kontraktion der Gefäßmuskulatur zu (Je and Sohn 2007). Als geeignete Kontrolltiere dienten Tamoxifen-induzierte Mäuse, die entweder ein intaktes *Srf*-Wildtyp-Allel aufwiesen (*Srf*^{flex1/wt}: *SMCreER*^{T2/wt}) oder keine Cre-Rekombinase exprimierten (*Srf*^{flex1/flex1}: *wt/wt*). *Srf*^{flex1/flex1}: *SMCreER*^{T2/wt}-Tiere, die Vehikel-Injektionen erhielten, mussten aufgrund der beobachteten “leakiness” des induzierbaren Rekombinationssystems als ungeeignete Kontrolle betrachtet werden. Auf diese Weise war jede mögliche Kontrolle abgedeckt, wodurch sowohl die Spezifität der durch SRF-Defizienz verursachten Veränderungen, als auch ein potentiell durch die Tamoxifen-Injektionen hervorgerufener negativer Effekt nachgewiesen werden konnte.

Innerhalb von drei bis fünf Tagen nach der letzten Tamoxifen-Applikation entwickelten die adulten *Srf*^{flex1/flex1}: *SMCreER*^{T2/wt} Tiere schwerwiegende phänotypische Veränderungen, wobei alle Kontrolltiere keinerlei Krankheitssymptome aufwiesen. So waren die krankhaften Veränderung der *Srf-knockout*-Tiere allein auf die induzierte SRF-Depletion in den Glattmuskelzellen zurückzuführen. Innerhalb von 16 Tagen nach erster Applikation von Tamoxifen war eine 100%ige Letalität der *Srf-knockout* Mäuse zu verzeichnen, wobei auch 10% der Tiere in der Kontrollgruppe innerhalb eines Zeitraums von 56 Tagen starben. Da diese Kontrolltiere jedoch keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen zeigten, war eine mit einer Glattmuskel-spezifischen SRF-Defizienz in Zusammenhang stehende Todesursache auszuschließen. Da die Gefahr besteht, die Tiere durch die intraperitonealen Injektionen innerlich zu verletzen, könnte die Letalität innerhalb der Kontrollgruppe auf mögliche Organschädigungen zurückzuführen sein.

Vor der Analyse des durch SRF-verursachten Phänotyps war es zunächst von großer Bedeutung, die Rekombination des “gefloxten” *Srf*-Lokus (*Srf*^{flex1}) und die Expression des SRF Proteins in verschiedenen Organen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Tamoxifen zu einer deutlich nachweisbaren Rekombination des *Srf*-Lokus (*Srf*^{lx}) selektiv in glattmuskulären Organen, wie im Gastrointestinaltrakt, in der Blase oder im Uterus, führte. Der Nachweis einer detektierbaren Rekombination in nicht-glattmuskulären Organen, wie z. B. im Herzmuskel oder im Gehirn, ist vermutlich durch die Anwesenheit vaskulärer Glattmuskelzellen in den Gefäßen zu erklären. Da zur Genotypisierung komplette Organlysate verwendet wurden, in denen auch

andere Zelltypen enthalten waren, die keine Cre-Rekombinase exprimierten, wurde der Nachweis einer vollständigen Rekombination nicht erwartet.

Im Western Blot konnte ausschließlich in glattmuskulären Organen (Gastrointestinaltrakt, Blase) eine signifikante Reduktion der *“full length”*-SRF-Proteinmenge nachgewiesen werden, während in Kontrollorganen mit einem geringen Anteil an Glattmuskulatur (Herz, Gehirn, Skelettmuskel) erwartungsgemäß keine Unterschiede in der SRF-Expression festgestellt wurden. Da auch bei der Expressionsanalyse Proteinlysate aus kompletten Organproben verwendet wurden, war auch hier keine vollständige Reduktion der SRF-Proteinmenge zu erwarten. Die Abwesenheit des SRF-Proteins in den Glattmuskulaturzellen einzelner Organe wurde zusätzlich auf histologischer Ebene anhand von Dün- und Dickdarmschnitten bewiesen.

4.3.2 Das Problem der *“leakiness”* des CreER^{T2}-Rekombinationssysteme

Erstaunlicherweise zeigten die Vehikel-behandelten *Srf*^{flex1/flex1}: *SMCreER^{T2}/wt*-Tiere eine schwache, aber dennoch detektierbare Rekombination in Organen mit hohem Anteil an glatter Muskulatur, was auf eine *“leakiness”*, also eine unkontrollierte Aktivität der Cre-Rekombinase ohne Tamoxifen-vermittelte Induktion des *SMCreER^{T2}*-Rekombinationssysteme deutete. Allerdings konnte diese *“leakiness”* in anderen Studien, die ebenfalls den *SMCreER^{T2}*-Mausstamm nutzten, nicht beobachtet werden (Wolfsgruber et al. 2003; Boesten et al. 2006; Doring et al. 2006); (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Feil). Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache unterschiedlicher Chromatinstrukturen innerhalb verschiedener Gene. Somit müsste der *Srf*-Lokus eine leicht zugängliche Chromatinstruktur aufweisen, wodurch schon eine sehr geringe Aktivität der Cre-Rekombinase eine effiziente Rekombination bewirken könnte. Die Tatsache, dass Tiere, die zwei Cre-exprimierenden Allele aufwiesen, ohne Induktion innerhalb eines Zeitraums von 45 Tagen nach der Geburt eine 100%ige Letalität zeigten, lässt im Rahmen der *“leakiness”* zusätzlich einen deutlichen Gendosis-Effekt von *Cre* vermuten.

Das Ausmaß der unkontrollierten *Cre/loxP*-Rekombination schien zusätzlich vom genetischen Hintergrund der verwendeten Mäuse beeinflusst zu sein. Tiere im reinen C57BL/6-Hintergrund wiesen im Vergleich zu Tieren in einem gemischten genetischen

Hintergrund (C57BL/6-NMRI) eine deutlich frühere, durch das Phänomen der "leakiness" verursachte Letalität auf. Eine mögliche Erklärung bietet das Prinzip der induzierbaren Cre-Rekombinase, das auf die Verankerung des Enzyms im Zytoplasma durch die Bindung an Hitzeschockproteine ("*heat shock proteins*", Hsp; vgl. Abschnitt 1.3.1) beruht. So könnten mögliche Unterschiede in der Expression verschiedener Hitzeschockproteine innerhalb unterschiedlicher Mausstämme die effiziente Verankerung des Cre-Proteins im Zytoplasma und dadurch das Ausmaß der Hintergrundrekombination beeinflussen.

4.3.3 Das p36-Protein

Besondere Aufmerksamkeit bedarf die Existenz der vor allem in der Blase und im Magen der *Srf-knockout*-Tiere aufgetretenen, zusätzlichen Western Blot-Bande bei ca. 36 kDa, die von dem SRF-Antiserum erkannt wurde. Da diese nach der Rekombination des *Srf*-Lokus verstärkt auftrat, aber dennoch auch in Kontrolltieren schwach erkennbar war, kann die Existenz eines vom deletierten *Srf*-Lokus (*Srf^{lx}*) translatierten, verkürzten SRF-Proteins nicht ausgeschlossen werden. Die Cre-vermittelte Exzision von Exon1, das den Großteil der MADS-Box und die Kernlokalisationssequenz kodiert, könnte theoretisch in einer verkürzten *Srf*-mRNA resultieren, in welcher der korrekte Leserahmen erhalten bliebe. Ein von dieser mRNA translatiertes SRF-Protein würde eine stark verkürzte MADS-Box aufweisen, weshalb von einer verlorenen Dimerisierungs- und DNA-Bindungs-fähigkeit ausgegangen werden kann (Sharrocks et al. 1993). Der Verlust der Kernlokalisationssequenz würde zusätzlich auf eine zytoplasmatische Lokalisation des verkürzten SRF-Proteins hindeuten, da dieses Motiv für die nukleäre Lokalisation des SRF-Proteins absolut essentiell ist (Rech et al. 1994; Gauthier-Rouviere et al. 1995). Dennoch würde das verkürzte SRF-Protein die komplette C-terminale Transaktivierungsdomäne enthalten, die SRF eine Interaktion mit der Vielzahl an Interaktionspartnern ermöglicht. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht klar, ob es sich bei der zusätzlich detektierten Bande bei ~36 kDa tatsächlich um ein verkürztes SRF-Protein oder lediglich um einen unspezifischen Antikörper-Artefakt handelt. In ersten Experimenten, in welchen ein neues SRF-Antiserum getestet wurde, das ebenfalls gegen den C-Terminus des SRF-Proteins gerichtet ist, konnte keine zusätzliche Bande nachgewiesen werden, was die Vermutung einer möglichen

unspezifischen Antikörperbindung verstärkt (Daten nicht gezeigt). Repräsentiert diese ~36 kDa-Bande tatsächlich ein verkürztes SRF-Protein, kann zumindest in Bezug auf diese Arbeit ein möglicher transdominant-negativer Effekt ausgeschlossen werden: Erstens konnte die Bande ebenfalls in vergleichbarer Intensität in der Blase und im Magen von Vehikel-behandelten *Srf^{flex1/flex1}:SMCreER^{T2}/wt*-Tieren nachgewiesen werden (**Abb. 3.6**), die jedoch keinerlei phänotypischen Veränderungen zeigten und sich nicht von unbehandelten Geschwistertieren unterschieden. Zudem zeigten auch Tamoxifen-behandelte *Srf^{flex1/flex1}:wt/wt*-Tiere, die keine Cre-Rekombinase exprimierten, diese ~36 kDa-Bande, wenn auch nur in sehr geringen Ausmaß (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtungen kann eine mögliche Existenz einer weiteren SRF-Isoform, deren Translationsstart in Exon2 liegen könnte und die auch unabhängig von der Rekombination des "gefloxten" *Srf*-Lokus exprimiert werden kann, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Um den genauen Ursprung und die Identität der zusätzlich detektierten Bande bei ~36 kDa nachzuweisen, bedarf es weiterer Untersuchungen, die eine Isolierung dieses Proteins mit anschließender massenspektrometrischer Analyse umfassen.

4.3.4 Funktionelle Analyse der Glattmuskel-spezifischen *Srf*-knockout Mäuse

4.3.4.1 Glattmuskel-spezifische SRF-Defizienz verursacht einen letalen "Ileus paralyticus"

Die wichtigsten Aufgaben der gastrointestinalen Motorik stellen die Durchmischung, die Propulsion und der portionierte Transport des Darminhalts dar. Dafür ist eine hoch koordinierte Aktivität der Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur verantwortlich, die sich durch zeitlich und räumlich ablaufende Zyklen (peristaltischer Reflex, tonische Kontraktionen) charakterisieren lässt und einen anal gerichteter Transport des Darminhaltes bewirkt (Holzer et al. 2001).

Es wurde gezeigt, dass eine Glattmuskel-spezifische SRF-Depletion zu schwerwiegenden Defekten in der intestinalen Motilität führt. Die Mutanten wiesen einen extrem aufgeblähten, mit Nahrungsbrei überfüllten Gastrointestinaltrakt auf, was auf Störungen der Darmperistaltik mit einhergehender Darmlähmung hindeutete. Mittels

Röntgenkontrast-Computertomographie wurde eine stark beeinträchtigte Nahrungspropulsion bestätigt, die in einem Nahrungsstau, einhergehend mit einer starker Dilatation des Dickdarms und des Caecums, resultierte, wobei der Dünndarm weniger betroffen zu sein schien. Durch isometrische Kraftmessungen anhand intaktem Dün- und Dickdarmgewebe wurde eine modulierte Spontanaktivität nachgewiesen, wobei sowohl im Dick- als auch im Dünndarm (Jejunum) nur die Amplitude um ca. 50% deutlich verringert war, während in der Frequenz der Kontraktionen im Vergleich zu Geweben der Kontrolltiere keine Unterschiede festzustellen waren. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die SRF-defiziente, viszerale Glattmuskulatur zwar zu spontanen Kontraktionen grundsätzlich befähigt ist, aber deutliche Verminderungen in der Kraftentwicklung während der Kontraktion aufweist. Dies wurde zusätzlich anhand von isometrischen Kraftmessungen während der Carbachol-induzierten, tonischen Kontraktion bestärkt. Die Glattmuskulatur des Dün- und Dickdarms wies eine stark reduzierte Kontraktionsfähigkeit während der phasischen und tonischen Kontraktion auf, was durch die verringerten Amplituden der abgeleiteten Kontraktionen nachgewiesen wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der durch eine Darmlähmung hervorgerufene Darmverschluss (*Ileus paralyticus*) auf die durch SRF-Defizienz verursachte reduzierte Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur im Intestinaltrakt zurückzuführen ist.

Die klaren und schwerwiegenden Symptome des *Ileus paralyticus*, die zu Vergiftungen (Levine 1999), fortschreitenden Entzündungen des Bauchraumes und Mangelernährung führen können, wurden letztendlich als Todesursache der *Srf-knockout*-Tiere vermutet (persönliche Mitteilung des Tierärztlichen Dienstes). Da sich das Darmepithel nicht von dem der Kontrolltiere unterschied (Daten nicht gezeigt), war eine verringerte Resorption von Nährstoffen eher unwahrscheinlich. Weitere potentiell letalen Defekte, wie z. B. im Kardiovaskulärsystem, konnten dennoch nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu überprüfen bedarf es weiterer Analysen, welche die Auswirkungen der SRF-Defizienz auf die Funktion weiterer glattmuskulärer Organe (z. B. Kardiovaskulärsystem) untersuchen.

Aufgrund der Entwicklung des starken intestinalen Krankheitsbildes der Glattmuskelspezifischen *Srf-knockout*-Tiere konzentrierten sich die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie auf den Intestinaltrakt. Andere glattmuskulären Organe, wie z. B. die Aorta, der Uterus oder die Speiseröhre, zeigten keine offensichtlichen,

krankhaften Veränderungen. Dennoch konnte auch in der Blase eine stark verringerte Kontraktionsfähigkeit beobachtet werden, die jedoch keine krankhaften Auswirkungen auf die Funktionalität zu haben schien. Die *Srf-knockout*-Tiere waren bis zum Tod in der Lage Urin abzugeben. Eventuelle Unterschiede in der abgegebenen Urinmenge wurden nicht untersucht, könnten aber in zukünftigen Experimenten durch die Haltung der Tiere in metabolischen Käfigen bestimmt werden. Da der durch die SRF-Defizienz verursachte *Ileus paralyticus* zu einem sehr schnellen Tod der *Srf-knockout*-Tiere führte, bestand die Wahrscheinlichkeit, weitere interessante, phänotypische Veränderungen in anderen glattmuskulären Organen zu versäumen, die sich eventuell zu späteren Zeitpunkten nach der induzierten SRF-Defizienz entwickeln könnten. Mittels des hier beschriebenen Mausmodells könnte durch lokal-begrenzte Verabreichungen von Tamoxifen dieser starke intestinale Phänotyp umgangen werden, um in Zukunft präzisere Aussagen über die Funktion von SRF *in vivo* in adulten Glattmuskelzellen unterschiedlicher Organe treffen zu können (Zadelaar et al. 2006).

4.3.5 Die Rolle von SRF in adulten Glattmuskelzellen

Um nähere zellbiologische Erkenntnisse der Auswirkungen der SRF-Defizienz auf adulte Glattmuskelzellen zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Glattmuskelzellen aus dem Dickdarm isoliert, *in vitro* kultiviert und auf zell- und molekularbiologische Veränderungen analysiert.

Um sicherzustellen, dass eine Depletion von SRF in den Glattmuskelzellen vollständig stattgefunden hat und um zu gewährleisten, dass die gewonnenen Erkenntnisse der Auswirkungen der SRF-Defizienz auf adulte Glattmuskelzellen *in vitro* direkt mit der *in vivo*-Situation in Zusammenhang gebracht werden kann, wurden die primären, adulten Glattmuskelzellen aus Tamoxifen-induzierten *Srf^{flex1/flex1}: SMCreER^{T2}/wt*-Tieren isoliert, welche das intestinale Krankheitsbild deutlich entwickelt hatten und kurz vor dem Sterben waren.

Die Rekombinationsanalyse zeigte eine nahezu vollständige Rekombination des *Srf^{flex1}*-Lokus und auf Proteinebene war eine ebenso nahezu vollständige Depletion des SRF-Proteins festzustellen (**Abb. 3.18**). Da vermutlich nur eine geringe Verunreinigung der Glattmuskelzellpopulation mit anderen Zelltypen (wie z. B. Endothelzellen) gegeben war, konnte davon ausgegangen werden, dass mindestens 95% der kultivierten

Glattmuskelzellen den rekombinierten *Srf*^{lx}-Lokus aufwiesen. Erstaunlicherweise konnte auf mRNA-Ebene mit einem Primerpaar, welches ein Amplikon über den Grenzbereich von Exon 4 und Exon 5 des *Srf*-Gens definierte, nur eine 35% bis 40% Reduktion der *Srf*-mRNA festgestellt werden (**Abb.3.19**, links), was im deutlichen Widerspruch zu der nachgewiesenen drastischen Reduktion der SRF-“full-length“-Proteinmenge stand (**Abb. 3.18**). Eine Analyse mit einem weiteren Primerpaar, welches ein Amplikon über den Grenzbereich von Exon 1 und Exon 2 des *Srf*-Gens definierte, zeigte zwar eine deutlich höhere, dennoch keine vollständige *Srf*-mRNA-Reduktion (**Abb.3.19**, rechts). Diese Beobachtungen konnten einerseits auf Verunreinigungen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zurückzuführen sein, andererseits unterstützten die mit dem Primerpaar Exon 4/5 detektierten hohen Mengen an *Srf*-mRNA die Vermutung der Expression einer eventuell vom deletierten *Srf*^{lx}-Lokus transkribierten, verkürzten mRNA, die in ein verkürztes SRF-Protein (~36 kDa) translatiert werden könnte (siehe Abschnitt 4.3.3).

Die Kontrolle der Stabilität von mRNAs stellt eine bedeutende Komponente in der Regulation der Genexpression in Eukaryoten dar (Shim and Karin 2002; Newbury 2006). Eine erhöhte mRNA-Stabilität als Ursache der hohen *Srf*-mRNA-Expression war jedoch unwahrscheinlich, da Untersuchungen der Stabilität der *Srf*-mRNA in murinen embryonalen Fibroblasten eine rapide Abnahme der *Srf*-mRNA innerhalb von 6 Stunden nach Deletion des *Srf*^{flex1}-Lokus implizierten (M. Angstenberger, D. Nittner, unpubliziert).

Da aufgrund der Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus der Primer im Exon 1 nicht mehr hybridisieren kann, aber dennoch ein Nachweis einer *Srf*-mRNA möglich war, war die Annahme einer unvollständigen Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus innerhalb der Glattmuskelzellpopulation letztendlich als Ursache der hohen *Srf*-mRNA-Mengen sehr naheliegend.

4.3.5.1 Die entscheidene Funktion von SRF bei der Aufrechterhaltung des Glattmuskel-Phänotyps

Die Depletion von SRF verursachte drastische zellmorphologische Veränderungen der adulten Glattmuskelzellen, die sich durch einen stark vergrößerten, abgeflachten und sternförmigen Zellkörper mit einem hohen Anteil an cytoplasmatischen Vakuolen

auszeichneten. Die für Glattmuskelzellen typischen Zellfortsätze waren deutlich verkürzt und degeneriert (**Abb. 3.20**). Obwohl die Zellen in ihrer Vitalität beeinträchtigt zu sein schienen, zeigten die SRF-defizienten Glattmuskelzellen keine verminderte Viabilität (**Abb. 3.21**). Bereits die beobachteten morphologischen Veränderungen ließen einen Verlust der für Glattmuskelzellen spezifischen Eigenschaften vermuten, was durch einen reduzierten Differenzierungsgrad verursacht sein konnte.

Differenzierte Glattmuskelzellen stellen hochspezialisierte Zellen dar und zeichnen sich durch die Expression einer Vielzahl kontraktiler und zytoskelettaler Proteine aus (Owens 1995; Miano 2003; Owens et al. 2004). Wie bereits erwähnt, weisen mehr als 70% dieser bekannten Glattmuskel-spezifischen Gene eine oder mehrere funktionelle CArG-Boxen in deren Promotorregion auf und sind daher direkt durch SRF reguliert (Beispiele siehe **Tabelle 1.1**) (Miano 2003; Owens et al. 2004). Durch die Analyse der Expression einiger Glattmuskel-Markergene in SRF-depletierten, adulten Glattmuskelzellen konnte eine drastische Reduktion der Expression von *SM α -Aktin*, *SM22 α* , *SM-MHC* und *Smoothelin-A* nachgewiesen werden (**Abb. 3.26** und **3.27**). Diese Beobachtungen bestätigen eine essentielle Funktion von SRF bei der Aufrechterhaltung des Glattmuskel-Phänotyps in adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in humanen, vaskulären Glattmuskelzellen aus der Aorta nachgewiesen werden, deren SRF-Expression durch siRNA-Technologie unterdrückt wurde (Werth et al., unpubliziert).

Die gestörte Kontraktionsfähigkeit des Intestinaltraktes der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Mäuse konnte daher auf die stark beeinträchtigte Expression dieser spezifischen Glattmuskel-Markergene zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird zusätzlich durch eine Studie untermauert, in der die essentielle Funktion von Smoothelin-A bei der Kontraktion des Intestinaltraktes bewiesen wurde (Niessen et al. 2005). Neueste Ergebnisse belegen zusätzlich eine Notwendigkeit von *SM22 α* bei einer Agonist-induzierten Kontraktion der Aorta (Je and Sohn 2007). All diese Beobachtungen erhärten somit die Theorie, dass die drastisch reduzierte Expression vieler SRF-abhängiger Glattmuskel-Markergene die kontraktile Funktionalität des Intestinaltraktes der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere stark beeinträchtigt.

Die Phosphorylierung von Serin 19 der 20 kDa-regulatorischen "*myosin light chain*" (MLC₂₀) durch die "*myosin light chain kinase*" (MLCK) stellt den essentiellen Schritt zur Initiation der Muskelkontraktion dar, wodurch die ATPase-Aktivität des Myosins, also die Interaktion von Myosin mit Aktin-Filamenten und folglich Kontraktion ermöglicht wird

(**Abb. 1.16**) (Kamm and Stull 1985; Gallagher et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Glattmuskel-spezifischen 130 kDa-MLCK durch die Anwesenheit einer CArG-Box im Promotor des *MYLK* (*“myosin light chain”*)-Gens direkt von SRF reguliert ist (Yin et al. 2006). Erste Experimente in adulten, SRF-defizienten Glattmuskelzellen implizierten eine reduzierte Expression der MLCK (Daten nicht gezeigt). Bestätigen sich diese Vermutungen, so könnte bereits die Initiation der Glattmuskelkontraktion durch die SRF-Defizienz beeinträchtigt sein, was als zusätzliche Ursache der stark reduzierten Kontraktionsfähigkeit angesehen werden könnte (Daten nicht gezeigt). *MLCK-knockout*-Mäuse sterben ca. 1 bis 5 Stunden nach der Geburt aufgrund von Defekten in der Entwicklung der Koronararterien und des Myokards und Versuche am embryonalen Glattmuskel zeigten eine verringerte Sensitivität des Muskels auf Kalzium, was eine verlangsamte Kraftentwicklung während der Kontraktion zur Folge hatte. Da jedoch in Glattmuskelzellen aus MLCK-defizienten Embryonen (E14.5) eine Phosphorylierung der 20 kDa-regulatorischen *“myosin light chain”* (MLC₂₀) nachgewiesen werden konnte, ist die Existenz einer Kalzium-abhängigen Kinase, welche die Funktion der MLCK während der Embryonalentwicklung übernimmt, nicht ausgeschlossen (Somlyo et al. 2004). Weiterführende Experimente mit adulten, SRF-defizienten Glattmuskelzellen sind deshalb von großem Interesse, um eine entscheidende Rolle der MLCK in der reduzierten Kontraktionsfähigkeit der *Srf-knockout*-Mäuse definieren zu können.

4.3.5.2 SRF – ein wichtiger Regulator zur Aufrechterhaltung des Aktin-Zytoskeletts adulter Glattmuskelzellen

Glattmuskelzellen stellen hoch dynamische Zellen dar, die sich an verschiedenste physiologische Umgebungen innerhalb unterschiedlicher Organe, die sie besiedeln, anpassen können – ein Phänomen, das durch die hohe Plastizität der Glattmuskelzellen zu erklären ist. Das Aktin-Zytoskelett übernimmt wichtige Funktionen um diese hohe Plastizität zu bewahren, wie z. B. einerseits die Generierung und Übertragung von Kraft oder die Formgebung der Zelle, andererseits die Transduktion extrazellulärer Signale zur Modulation des Genexpressionsprogramms. Viele Ergebnisse deuten daraufhin, dass Aktin-Dynamik, also die Polymerisation und Depolymerisation von Aktin, während der Kontraktion von Glattmuskelzellen unbedingt notwendig ist (Adler et

al. 1983; Obara and Yabu 1994; Mehta and Gunst 1999; Cipolla et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist die Dynamik der Aktinfilamente in der quergestreiften Muskulatur durch die Bindung des CapZ-Proteins am Plus- und von Tropomodulin am Minus-Ende ausgeschlossen, weshalb die Aktinfilamente eine starre, fast kristalline Struktur bilden (Weber et al. 1994; dos Remedios et al. 2003).

Durch eine große Vielzahl an Studien innerhalb der letzten Jahre konnte belegt werden, dass SRF als zentraler transkriptioneller Regulator des dynamischen Aktin-Zytoskeletts und des kontraktiven Apparates gilt. Nahezu die Hälfte der bis heute bekannten SRF-Zielgene regulieren die Aktin-Dynamik und –Funktion, die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien und die Muskelkontraktion (Miano et al. 2007).

In Glattmuskelzellen SRF-defizienter Mäuse konnte ein massiv degeneriertes Aktin-Stressfaser-Netzwerk nachgewiesen werden (**Abb. 3.25**), was mit einer drastisch reduzierten Expression des Glattmuskel-spezifischen SM α -Aktins einherging (**Abb. 3.26**). Allein diese Degeneration des Aktin-Zytoskeletts, welche vermutlich zu schwerwiegenden Defekten bei der Erzeugung von Kontraktionen führt, könnte als Hauptursache der gestörten Kontraktionsfähigkeit SRF-depletierter Glattmuskelzellen angesehen werden. Frühere *in vitro*-Studien, welche die Auswirkungen der SRF-Defizienz in unterschiedlichen Zellsystemen (ES-Zellen, Neuronen) untersuchten, haben bereits eine drastische Reduktion intakter Aktin-Stressfasern belegt (Schratt et al. 2002; Alberti et al. 2005; Knoll et al. 2006). Auch SRF-Inaktivierungsstudien in Skelett- und Herzmuskelzellen *in vivo* zeigten massiv reduzierte Expression von Aktin, was vermutlich die dargestellten Defekte in der Muskelentwicklung und –funktion verursachte (Li et al. 2005; Parlakian et al. 2005; Balza and Misra 2006; Charvet et al. 2006). Die durch SRF-Defizienz verursachten Aktin-zytoskelettalen Defekte in adulten Glattmuskelzellen bestätigen somit erneut die absolut essentielle Funktion von SRF zur Aufrechterhaltung intakter Aktin-zytoskelettaler Strukturen, um damit die kontraktiven Eigenschaften von Muskelzellen zu gewährleisten.

4.3.5.3 SRF – ein entscheidender Faktor zur Inhibierung zellulärer Seneszenz?

Die durch SRF-Depletion verursachte stark veränderte Morphologie der adulten Glattmuskelzellen ähnelte stark den charakteristischen Eigenschaften seneszenter vaskulärer Glattmuskelzellen *in vitro* (Goldstein 1990). Die Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität, ein Nachweis präseneszenter und seneszenter Zellen *in vitro* und *in vivo* (Dimri et al. 1995; Kurz et al. 2000), zeigte einen 7- bis 10-fach erhöhten Anteil an seneszenten Glattmuskelzellen innerhalb der SRF-depletierten Glattmuskelzellpopulation (**Abb. 3. 23**).

Zelluläre Seneszenz ist durch einen irreversiblen Zellzyklus-Arrest charakterisiert, dem die Zellen selbst durch Stimulation mit mitogenen Faktoren nicht entgehen können. Seneszente Zellen sind dennoch über einen langen Zeitraum lebensfähig, erfahren aber fundamentale Veränderungen in ihrer Morphologie (siehe Abschnitt 3.5.3.1), in der Genexpression und im Metabolismus (Ben-Porath and Weinberg 2004). Damit übereinstimmend war weder eine gestörte Viabilität der kultivierten Glattmuskelzellen, noch offensichtliche Verringerungen der Glattmuskelzellzahl innerhalb der Dickdarm-Muskelschicht SRF-defizienter Mäuse nachzuweisen (**Abb. 3.21** und **3.24**).

Zelluläre Seneszenz stellt ein wichtiges zelluläres Programm dar, das durch eine Vielzahl verschiedener Arten von physiologischem Stress ("Stress-induzierte Seneszenz"), wie z. B. DNA-Schädigung, Nährstoff- und Wachstumsfaktoren-Mangel, oxidativer Stress oder fehlerhafte Zellkontakte, oder durch eine Verkürzung der Telomere aufgrund fortgeschrittener Proliferation ("replikative Seneszenz"), induziert werden kann (Ben-Porath and Weinberg 2004; Ben-Porath and Weinberg 2005).

Wie bereits beschreiben, erfahren die SRF-defizienten Glattmuskelzellen einen Verlust des Glattmuskel-Phänotyps, einhergehend mit drastischen Veränderungen des spezifischen Genexpressionprogramms und einer massiven Degeneration des Aktin-Zytoskeletts. In ES-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass SRF-Defizienz zusätzlich in einer durch gestörte fokale Adhäsionskontakte hervorgerufenen, mangelnden Zelladhäsion resultiert (Schratt et al. 2002). Letzteres wurde zwar in *Srf-knockout*-Glattmuskelzellen bisher nicht untersucht, kann aber zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen schwerwiegenden Veränderungen in SRF-defizienten Glattmuskelzellen, als Stressfaktor und damit als Auslöser der erhöhten

Seneszenzrate innerhalb der *Srf-knockout*-Glattmuskelzellpopulation angesehen werden.

Die spezifische Repression der Expression von *c-fos* gilt als charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen und übernimmt somit eine wichtige Rolle im Prozess der Seneszenz (Seshadri and Campisi 1990). In SRF-depletierten, seneszenten Glattmuskelzellen konnte übereinstimmend eine deutliche Reduktion der basalen Expressionsmengen der "immediate-early"-Gene (*IEGs*) *c-fos*, *egr-1* und *egr-2* nachgewiesen werden (**Abb. 3.29**). Eine weitere Studie belegte eine Protein-Kinase C δ -induzierte SRF-Inaktivierung in seneszenten Fibroblasten, einhergehend mit Inhibierung der *IEG*-Expression, wobei unklar ist, ob die SRF-Inaktivierung Voraussetzung oder Folge der Seneszenz ist (Wheaton and Riabowol 2004). Zusätzlich zeigte eine andere Untersuchung die Inhibierung der Kernlokalisierung von SRF in seneszenten Zellen (Ding et al. 2001). All diese Ergebnisse, zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, implizieren eine bedeutende Funktion von SRF bei der Inhibierung der zellulären Seneszenz. Ob SRF dabei eine direkte Funktion zur Regulierung Seneszenz-reprimierender Gene übernimmt, oder ob die durch SRF-Defizienz verursachten zellulären Defekte indirekt Seneszenz induzieren, stellt weiterhin eine höchst interessante Fragestellung für zukünftige Studien dar.

Obwohl die Mechanismen und molekularen Signalwege der Seneszenz in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden, bleibt die exakte physiologische Funktion der Seneszenz weitgehend unklar, weshalb ein direkter Zusammenhang zwischen der durch SRF-Defizienz induzierten Seneszenz und dem Verlust der Kontraktionsfähigkeit der Glattmuskelzellen weitgehend ungeklärt bleibt.

Im Widerspruch zur erhöhten Seneszenz steht jedoch die Tatsache, dass in SRF-depletierten Glattmuskelzellen kein Defekt in der initialen Phase der Proliferation, trotz deutlicher Reduktion der basalen Expression der "immediate-early"-Gene, festgestellt wurde (**Abb. 3.22**). Eine weitere Studie mit SRF-depletierten CASMCs ("*coronary artery smooth muscle cells*") bewies zwar ebenfalls eine erhöhte Seneszenzrate, jedoch waren die CASMCs zusätzlich durch einen deutlichen Zellzyklus-Arrest in der G1/S-Phase charakterisiert (Werth et al., unpubliziert). Auch in einigen somatischen Zelllinien wurde ein deutlicher Proliferationsdefekt aufgrund SRF-Inaktivierung nachgewiesen (Gauthier-Rouviere et al. 1991; Soulez et al. 1996), wobei im Gegensatz dazu SRF-

defiziente, murine embryonale Stammzellen (Schratt et al. 2001) oder Herzmuskelzellen eine normale Proliferationsrate aufwiesen (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004). Eine andere Studie zeigte sogar eine erhöhte Proliferation und Migration in SRF-depletierten, vaskulären Glattmuskelzellen (Kaplan-Albuquerque et al. 2005).

Aufgrund dieser gegensätzlichen Ergebnisse ist es in Zukunft von großem Interesse, die detaillierte Funktion von SRF bei der Zellproliferation adulter Glattmuskelzellen zu definieren. Da die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Proliferationsstudien mit Glattmuskelzellen der Passage 0, also direkt nach der Präparation durchgeführt wurden und somit nur eine Aussage über die initiale Proliferation der Zellen getroffen werden konnte, kann ein Seneszenz-induzierter Proliferationsdefekt, der möglicherweise erst nach längerer Kultivierung der Zellen auftritt, nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass in frisch-präparierten Glattmuskelzellen ein verbleibender Anteil an SRF-Protein vorhanden sein könnte, wodurch ein eventueller Proliferationsdefekt übersehen werden kann.

4.4 Glattmuskel-spezifische *Srf*-knockout-Mäuse: Mausmodell für intestinale Erkrankungen?

Störungen der intestinalen Motilität können auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein, wie z. B. eine Fehlentwicklungen des enterischen Nervensystems, der ICCs oder Anomalien in der Kontraktilität der Glattmuskelzellen. All diese Defekte führen zu verminderter gastrointestinaler Propulsion. Darmlähmungen, einhergehend mit Symptomen eines Darmverschlusses, die keine offensichtlichen Verletzungen als Ursache haben, werden als "chronische intestinale Pseudo-Obstruktion, CIPO" bezeichnet (De Giorgio et al. 2004; Connor and Di Lorenzo 2006). Die CIPO stellt eine komplizierte Erkrankung des menschlichen Organismus dar, die zusätzlich durch mangelnde Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten erschwert wird. Während die Ursachen dieser Erkrankung bisher hauptsächlich in Störungen des enterischen Nervensystem vermutet wurden (Kapur 2001), scheint eine durch Erkrankungen oder Veränderungen der Glattmuskulatur hervorgerufenen CIPO nicht selten zu sein (Moore et al. 2002).

Das in dieser Arbeit beschriebene Mausmodell beschreibt klinische Manifestationen, deren Ausmaß dem Krankheitsbild der CIPO sehr ähnlich ist. Mutationen im *Srf*-Gen oder Veränderungen in der SRF-Expression könnten daher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Erkrankungen des Glattmuskulgewebes, wie z. B. die CIPO oder andere Glattmuskelerkrankungen der Hohlorgane, spielen. Somit bietet das hier beschriebene Mausmodell eine einzigartige Möglichkeit, den Zeitpunkt der SRF-Inaktivierung exakt zu bestimmen und den Verlauf der krankhaften Veränderungen von Beginn an umfassend zu analysieren, was einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der komplizierten CIPO liefern könnte.

Interessanterweise wurde kürzlich der Verlust der Expression des SRF-Zielgens *SM α -Aktin* in der zirkulären Glattmuskelschicht des Dünndarms (Jejunum) als Biomarker der CIPO vorgeschlagen, was einen potentiellen Zusammenhang der CIPO mit fehl-regulierter SRF-abhängiger Genexpression unterstreicht (Knowles et al. 2004). Eine reduzierte Expression weiterer SRF-Zielgene, wie z. B. *SM-MHC* und *Smoothelin-A*, wurde zusätzlich in Dickdarmbiopsien von Patienten, die an der "Hirschsprung-Krankheit" ("*Megacolon congenitum*"), an einem idiopathischen, toxischen Megacolon oder an Darmträgheit leiden, nachgewiesen (Wedel et al. 2006). Bestätigt sich in Zukunft die Hypothese, dass der Verlust oder die Reduktion der Expression Glattmuskelspezifischer Proteine als Ursache einiger schwerwiegender Darmerkrankungen gilt, könnten Strategien zur Stimulierung der SRF-Aktivität im Intestinaltrakt vielversprechende Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von diversen Darmerkrankungen darstellen.

5 Zusammenfassung

Um die Funktion von SRF in adulten Glattmuskelzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie einer zeitlich-steuerbaren, konditionalen Deletion im genomischen *Srf*-Lokus in Glattmuskelzellen adulter Mäuse entwickelt. Durch die Kreuzung der *Srf*^{flex1}-Mauslinie, in deren Genom das Exon1 des *Srf*-Gens von zwei Cre-Erkennungssequenzen (*lox-P sites*) flankiert ist und somit durch Cre-vermittelte Exzision entfernt werden kann (Wiebel et al. 2002), mit einer Cre-Mauslinie, welche eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem Glattmuskel-spezifischen *SM22 α* -Promotor exprimiert (Kuhbandner et al. 2000), wurden zeitlich-induzierbare, Glattmuskel-spezifische, SRF-defiziente Mäuse generiert, welche eine Analyse der Auswirkungen der SRF-Defizienz in adulten Glattmuskelzellen erlaubt.

Durch die Applikation von Tamoxifen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen konnte eine effiziente Rekombination des *Srf*^{flex1}-Lokus in vaskulären und viszeralen Glattmuskelzellen *in vivo* und damit eine signifikante Reduktion der SRF-Proteinmengen in ausschließlich glattmuskulären Organen erzielt werden. Innerhalb von 16 Tagen nach der ersten Applikation von Tamoxifen war eine 100%ige Letalität der Glattmuskel-spezifischen *Srf-knockout*-Tiere nachzuweisen. *Ex vivo* isometrische Kraftmessungen an intakten Intestinalgewebe zeigten eine drastisch reduzierte Kontraktionsfähigkeit der intestinalen Glattmuskulatur, was schwerwiegende Defekte in der Nahrungspropulsion und folglich einen letalen "*Ileus paralyticus*" verursachte.

Anhand zell- und molekularbiologischer Untersuchungen von isolierten, adulten, SRF-defizienten Glattmuskelzellen aus dem Darm wurde gezeigt, dass die Depletion von SRF drastische Veränderungen der Glattmuskelzellen verursachte. Die stark veränderte Morphologie der Glattmuskelzellen, einhergehend mit einem gestörten Expressionsprogramm Glattmuskel-spezifischer Markergene, bestätigte die essentielle Funktion von SRF bei der Aufrechterhaltung des Glattmuskel-Phänotyps. Zusätzlich implizierte die erhöhte Seneszenzrate innerhalb SRF-defizienter Glattmuskelzellpopulationen eine bedeutende Rolle von SRF bei der Inhibierung zellulärer Seneszenz. Gleichzeitig zeigten SRF-depletierte Glattmuskelzellen ein massiv degeneriertes Aktin-Zytoskelett, was erneut die essentielle Funktion von SRF bei der Aufrechterhaltung intakter Aktin-zytoskelettaler Strukturen bestätigte.

Die genaue Ursache der verminderten Kontraktionsfähigkeit der SRF-defizienten Glattmuskulatur des Intestinaltraktes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Jedoch schienen die durch SRF-Depletion hervorgerufenen zellulären Defekte der Glattmuskelzellen, charakterisiert durch einen Verlust Glattmuskel-spezifischer Eigenschaften und schwere Defekte des Aktin-Zytoskeletts, für die letalen Störungen der intestinalen Motilität verantwortlich zu sein. Mutationen im *Srf*-Gen oder Veränderungen in der SRF-Expression könnten somit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Erkrankungen des Glattmuskelgewebes, wie z. B. bei der CIPO, spielen.

Die vorliegende Arbeit vervollständigt somit vorausgegangene Studien zur Analyse der Funktion von SRF in Muskelzellen, sowohl während der Entwicklung (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004; Li et al. 2005), als auch im adulten Muskelgewebe (Parlakian et al. 2005; Charvet et al. 2006). Durch die gewonnenen Ergebnisse kann dem Transkriptionsfaktor SRF eine essentielle Rolle zur Aufrechterhaltung Glattmuskel-spezifischer Eigenschaften und zur Gewährleistung der kontraktilen Funktionalität adulter Glattmuskelzellen zugeschrieben werden.

6 Summary

To determine the function of SRF in adult smooth muscle cells (SMCs) *in vivo*, we conditionally mutated the *Srf* gene in SMCs by crossing mice carrying a floxed *Srf* allele (*Srf^{flex1}*), in which the exon1 is flanked by recognitions sites (*loxP* sites) for the cre recombinase allowing cre mediated excision (Wiebel et al. 2002), with *SM-CreER^{T2}(ki)* transgenic mice, which express a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of the SM-specific *SM22 α* promoter (Kuhbandner et al. 2000). Induction of recombination initiates the desired *Srf* mutation in a cell type-specific fashion at any experimentally chosen time allowing to analyse the effects of SRF deficiency in adult SMCs.

Application of tamoxifen on five consecutive days resulted in efficient recombination of the *Srf^{flex1}* locus in vascular and visceral SMCs *in vivo*, and therefore in significant reduction of SRF protein levels exclusively in SM-organs. Within 16 days after the first tamoxifen injection there was 100% lethality of the SM-specific *Srf-knockout* mice. *Ex-vivo* tension recordings with intestinal SM-tissues showed a drastic reduced contractile activity of the intestinal SM-layer leading to severe defects in food propulsion and finally to a lethal “*Ileus paralyticus*”.

Cellular and molecular analyses of isolated adult, SRF-deficient SMCs of the colon showed that SRF-depletion led to drastic alterations of the SMCs. Obvious morphological changes, accompanied by an altered expression profile of SM-specific marker genes, confirmed essential functions of SRF to maintain the SM-phenotype. Additionally, elevated senescence within the SRF-deficient SMC populations implicated a significant role of SRF in the process of inhibiting cellular senescence.

Concomitant, SRF-depleted SMCs showed a clearly degenerated actin stress fiber network, again underlining the importance of SRF to ensure actin cytoskeletal network structures.

In the course of this work, the definite cause of the defects in the contractile activity of the SRF-depleted intestinal smooth muscle layers could not be fully clarified. However, the severe cellular defects, characterized by the loss of SM-specific features and severe defects in the actin cytoskeletal network, caused by SRF deficiency, could be responsible for the lethal intestinal dysfunction. Mutations of the *Srf* gene or alterations

of the SRF expression may therefore play an important role in the development of diseases of the smooth muscle tissue, e.g. CIPO.

In conclusion, the presented work extends previous analyses addressing SRF function in developing (Miano et al. 2004; Parlakian et al. 2004; Li et al. 2005) and adult (Parlakian et al. 2005; Charvet et al. 2006) muscle cells. These results demonstrate that the transcription factor SRF fulfils vital functions in adult SMCs to maintain fundamental SM-specific properties and to ensure contractile functions.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti, alpha
Abb.	Abbildung
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
AS	<u>A</u> minos <u>ä</u> ure
ATP	<u>A</u> denosine 5'- <u>t</u> riphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BPB	<u>B</u> romphenol <u>b</u> lau
BSA	Rinderserumalbumin (<i><u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin</i>)
CASMC	<i><u>c</u>oronary <u>a</u>rtery <u>s</u>mooth <u>m</u>uscle <u>c</u>ell</i>
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
Cre	<i><u>c</u>auses/<u>c</u>yclization <u>r</u>ecombination</i>
CREB	<i><u>c</u>AMP responsive element binding protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
ctr	<i>control</i> , Kontrolle
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco`s <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i>
DMF	<u>D</u> imethylformamid
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxiribonuclease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
ECL	<i><u>e</u>nhanced <u>c</u>hemiluminescence</i>
ECM	<i><u>e</u>xtra<u>c</u>ellular <u>m</u>atrix</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
Elk-1	<i><u>E</u>ts-<u>l</u>ike-<u>t</u>ranscription factor-<u>1</u></i>
ER	Endoplasmatisches <u>R</u> etikulum

ER	<i><u>e</u>strogen <u>r</u>eceptor</i>
ERK	<i><u>e</u>xtracellular signal <u>r</u>elated <u>k</u>inase</i>
ES-Zelle	<i><u>e</u>mbryonale <u>S</u>tammzelle</i>
EtBr	<i><u>E</u>thidium<u>b</u>romid</i>
Ets	<i><u>E</u>-<u>t</u>wenty-<u>s</u>ix, <i>E26 transformation specific</i></i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
<i>flex1</i>	<i><u>f</u>loxed <u>e</u>xon<u>1</u></i>
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GAPDH	<i><u>G</u>lycerinaldehyd-3-<u>P</u>hosphat-<u>D</u>ehydrogenase</i>
GTP	<i><u>G</u>uanosin<u>t</u>riphosphat</i>
h	<i>hour/s</i>
HCL	Salzsäure
HDAC	<i><u>H</u>iston-<u>D</u>e<u>a</u>cetylase</i>
Hsp	<i><u>h</u>eat <u>s</u>hock <u>p</u>rotein</i>
HRP	<i><u>h</u>orse<u>r</u>adish <u>p</u>eroxidase</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal
<i>IEG</i>	<i><u>i</u>mmEDIATE-<u>e</u>arly <u>g</u>ene</i>
i.p.	<i><u>i</u>ntra<u>p</u>eritoneal</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JAK	<i><u>J</u>anus<u>k</u>inase</i>
JNK	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminale <u>K</u> inase
ko	<i><u>k</u>nock<u>o</u>ut</i>
ki	<i><u>k</u>nock-<u>i</u>n</i>
kb	Kilobase
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kvp	<i><u>K</u>ilo<u>v</u>olts <u>p</u>ea<u>k</u></i>
L	Liter
LBD	<i><u>L</u>iganden-<u>B</u>indungs<u>D</u>omäne</i>
<i>loxP</i>	<i><u>l</u>ocus of <u>c</u>rossing(<u>X</u>)-over of <u>P</u>1</i>

LPA	L- α -Lysophosphatidsäure (Oleoyl-sn-Glycerin-3-Phosphat)
M	Mol
MADS	MCM1/Arg80/Agamous/Deficiens/SRF
MAL	<i>megakaryocytic acute leukemia</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase I</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	<i>minute/s</i>
MKL	<i>megakaryoblastic leukemia</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRTF	<i>myocardin-related transcription factor</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide</i>
MYLK	<i>Myosin light chain kinase-gene</i>
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
N-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleotridtriphosphat
OD	optische Dichte
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
O ₂	Oxygen, Sauerstoff
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP ₃	<u>P</u> hosphat <u>i</u> dylinositol-1,4,5-trisphosphat
PKC	<u>P</u> roteink <u>i</u> nase <u>C</u>
p.o.	<i>per os</i> , peroral
PTC	<u>p</u> remature <u>t</u> ermination <u>c</u> odon
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> nfluorid
Raf	<i>v-raf murine leukemia viral oncogene homolog</i> (<u>r</u> as- <u>a</u> ctivated <u>f</u> actor)
Ras	<i>v- ha-ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROCK	Rho-Kinase
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute, Umdrehungen pro Minute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	<u>r</u> eal- <u>t</u> ime – <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
Sap-1	<u>S</u> RF <u>a</u> ccessory <u>p</u> rotein-1
SD	<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
sec	<i>second/s</i>
SEM	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror <u>M</u> ean
SM	<u>s</u> mooth <u>m</u> uscle, Glatte Muskulatur
SMC	<u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ell, Glattmuskelzelle
SM-MHC	<u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>m</u> yosin <u>h</u> eavy <u>c</u> hain
SR	<u>S</u> arkoplasmatisches <u>R</u> etikulum
SRE	<u>s</u> erum <u>r</u> esponse <u>e</u> lement
<i>Srf</i>	<u>s</u> erum <u>r</u> esponse <u>f</u> actor-Gen
SRF	Protein des wildtypischen <u>s</u> erum <u>r</u> esponse <u>f</u> actors
TAD	<u>T</u> rans <u>a</u> ktivierungs <u>d</u> omäne
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orate- <u>E</u> DTA
TCF	<u>t</u> ernary <u>c</u> omplex <u>f</u> actor
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylendj <u>a</u> min
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol, Polyethylenglykol-p-isooctylphenoether
U	<u>U</u> nit of enzyme activity
UV	<u>U</u> ltraviolett
VSMC	<u>v</u> ascular <u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ell
V	<u>V</u> olt
vgl.	vergleiche
v/v	<u>v</u> olume to <u>v</u> olume
w/o	<u>w</u> ith <u>o</u> t
w/v	<u>w</u> eight to <u>v</u> olume
WT	<u>W</u> ildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
→	vorwärts
←	rückwärts

8 Literaturverzeichnis

8.1 Zitierte Publikationen

Adler, K. B., J. Krill, T. V. Alberghini and J. N. Evans (1983). "Effect of cytochalasin D on smooth muscle contraction." Cell Motil **3**(5-6): 545-51.

Alberti, S., S. M. Krause, O. Kretz, U. Philippar, T. Lemberger, E. Casanova, F. F. Wiebel, H. Schwarz, M. Frotscher, G. Schutz and A. Nordheim (2005). "Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6148-53.

Araki, K., M. Araki, J. Miyazaki and P. Vassalli (1995). "Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(1): 160-4.

Arber, S., F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, O. Bernard and P. Caroni (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature **393**(6687): 805-9.

Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther and A. Nordheim (1998). "Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis." Embo J **17**(21): 6289-99.

Balza, R. O., Jr. and R. P. Misra (2006). "Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes." J Biol Chem **281**(10): 6498-510.

Belaguli, N. S., J. L. Sepulveda, V. Nigam, F. Charron, M. Nemer and R. J. Schwartz (2000). "Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators." Mol Cell Biol **20**(20): 7550-8.

Belaguli, N. S., W. Zhou, T. H. Trinh, M. W. Majesky and R. J. Schwartz (1999). "Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets." Mol Cell Biol **19**(7): 4582-91.

Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2004). "When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence." J Clin Invest **113**(1): 8-13.

Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-76.

Boesten, L. S., S. M. Zadelaar, S. De Clercq, S. Francoz, A. van Nieuwkoop, E. A. Biessen, F. Hofmann, S. Feil, R. Feil, A. G. Jochemsen, C. Zurcher, L. M. Havekes, B. J. van Vlijmen and J. C. Marine (2006). "Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death." Cell Death Differ **13**(12): 2089-98.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brocard, J., X. Warot, O. Wendling, N. Messaddeq, J. L. Vonesch, P. Chambon and D. Metzger (1997). "Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14559-63.
- Buchwalter, G., C. Gross and B. Wasylyk (2004). "Ets ternary complex transcription factors." Gene **324**: 1-14.
- Cahill, M. A., R. Janknecht and A. Nordheim (1996). "Signalling pathways: jack of all cascades." Curr Biol **6**(1): 16-9.
- Capecchi, M. R. (1994). "Targeted gene replacement." Sci Am **270**(3): 52-9.
- Carnac, G., M. Primig, M. Kitzmann, P. Chafey, D. Tuil, N. Lamb and A. Fernandez (1998). "RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts." Mol Biol Cell **9**(7): 1891-902.
- Cen, B., A. Selvaraj, R. C. Burgess, J. K. Hitzler, Z. Ma, S. W. Morris and R. Prywes (2003). "Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes." Mol Cell Biol **23**(18): 6597-608.
- Chai, J., D. Baatar and A. Tarnawski (2004). "Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing." Gastroenterology **126**(7): 1809-18.
- Chai, J. and A. S. Tarnawski (2002). "Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing." J Physiol Pharmacol **53**(2): 147-57.
- Chang, D. F., N. S. Belaguli, D. Iyer, W. B. Roberts, S. P. Wu, X. R. Dong, J. G. Marx, M. S. Moore, M. C. Beckerle, M. W. Majesky and R. J. Schwartz (2003). "Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors." Dev Cell **4**(1): 107-18.
- Chang, P. S., L. Li, J. McAnally and E. N. Olson (2001). "Muscle specificity encoded by specific serum response factor-binding sites." J Biol Chem **276**(20): 17206-12.
- Charvet, C., C. Houbron, A. Parlakian, J. Giordani, C. Lahoute, A. Bertrand, A. Sotiropoulos, L. Renou, A. Schmitt, J. Melki, Z. Li, D. Daegelen and D. Tuil (2006). "New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways." Mol Cell Biol **26**(17): 6664-74.
- Chen, C. Y. and R. J. Schwartz (1996). "Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac alpha-actin gene transcription." Mol Cell Biol **16**(11): 6372-84.

Chen, F., H. Kook, R. Milewski, A. D. Gitler, M. M. Lu, J. Li, R. Nazarian, R. Schnepf, K. Jen, C. Biben, G. Runke, J. P. Mackay, J. Novotny, R. J. Schwartz, R. P. Harvey, M. C. Mullins and J. A. Epstein (2002). "Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development." Cell **110**(6): 713-23.

Cipolla, M. J., N. I. Gokina and G. Osol (2002). "Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior." Faseb J **16**(1): 72-6.

Connor, F. L. and C. Di Lorenzo (2006). "Chronic intestinal pseudo-obstruction: assessment and management." Gastroenterology **130**(2 Suppl 1): S29-36.

Copeland, J. W. and R. Treisman (2002). "The Diaphanous-related Formin mDia1 Controls Serum Response Factor Activity through its Effects on Actin Polymerization." Mol Biol Cell **13**(11): 4088-99.

Dalton, S., R. Marais, J. Wynne and R. Treisman (1993). "Isolation and characterization of SRF accessory proteins." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **340**(1293): 325-32.

Dalton, S. and R. Treisman (1992). "Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element." Cell **68**(3): 597-612.

Dandre, F. and G. K. Owens (2004). "Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2042-51.

Daniel, E. E., A. El-Yazbi and W. J. Cho (2006). "Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis." J Cell Mol Med **10**(2): 529-44.

De Giorgio, R., G. Sarnelli, R. Corinaldesi and V. Stanghellini (2004). "Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction." Gut **53**(11): 1549-52.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.

Ding, W., S. Gao and R. E. Scott (2001). "Senescence represses the nuclear localization of the serum response factor and differentiation regulates its nuclear localization with lineage specificity." J Cell Sci **114**(Pt 5): 1011-8.

Doring, B., O. Shynlova, P. Tsui, D. Eckardt, U. Janssen-Bienhold, F. Hofmann, S. Feil, R. Feil, S. J. Lye and K. Willecke (2006). "Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1715-22.

dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry and N. J. Nosworthy (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." Physiol Rev **83**(2): 433-73.

- Driska, S. P., P. G. Stein and R. Porter (1989). "Myosin dephosphorylation during rapid relaxation of hog carotid artery smooth muscle." Am J Physiol **256**(2 Pt 1): C315-21.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger and P. Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10887-90.
- Feil, R., J. Wagner, D. Metzger and P. Chambon (1997). "Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 752-7.
- Frost, J. A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P. E. Shaw and M. H. Cobb (1997). "Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins." Embo J **16**(21): 6426-38.
- Gallagher, P. J., B. P. Herring and J. T. Stull (1997). "Myosin light chain kinases." J Muscle Res Cell Motil **18**(1): 1-16.
- Gauthier-Rouviere, C., J. C. Cavadore, J. M. Blanchard, N. J. Lamb and A. Fernandez (1991). "p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period." Cell Regul **2**(7): 575-88.
- Gauthier-Rouviere, C., M. Vandromme, N. Lautredou, Q. Q. Cai, F. Girard, A. Fernandez and N. Lamb (1995). "The serum response factor nuclear localization signal: general implications for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in control of nuclear translocation." Mol Cell Biol **15**(1): 433-44.
- Gauthier-Rouviere, C., M. Vandromme, D. Tuil, N. Lautredou, M. Morris, M. Soulez, A. Kahn, A. Fernandez and N. Lamb (1996). "Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts." Mol Biol Cell **7**(5): 719-29.
- Geneste, O., J. W. Copeland and R. Treisman (2002). "LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics." J Cell Biol **157**(5): 831-8.
- Gilman, M. Z., R. N. Wilson and R. A. Weinberg (1986). "Multiple protein-binding sites in the 5'-flanking region regulate c-fos expression." Mol Cell Biol **6**(12): 4305-16.
- Giovane, A., A. Pintzas, S. M. Maira, P. Sobieszczuk and B. Wasyluk (1994). "Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras." Genes Dev **8**(13): 1502-13.
- Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: the human fibroblast comes of age." Science **249**(4973): 1129-33.
- Gong, M. C., P. Cohen, T. Kitazawa, M. Ikebe, M. Masuo, A. P. Somlyo and A. V. Somlyo (1992). "Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle." J Biol Chem **267**(21): 14662-8.

- Gu, H., Y. R. Zou and K. Rajewsky (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell **73**(6): 1155-64.
- Guillemin, K., J. Groppe, K. Ducker, R. Treisman, E. Hafen, M. Affolter and M. A. Krasnow (1996). "The pruned gene encodes the Drosophila serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system." Development **122**(5): 1353-62.
- Halayko, A. J. and J. Solway (2001). "Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells." J Appl Physiol **90**(1): 358-68.
- Hanani, M. and H. R. Freund (2000). "Interstitial cells of Cajal--their role in pacing and signal transmission in the digestive system." Acta Physiol Scand **170**(3): 177-90.
- Hardin, C. D. and J. Vallejo (2006). "Caveolins in vascular smooth muscle: form organizing function." Cardiovasc Res **69**(4): 808-15.
- Hautmann, M. B., C. S. Madsen, C. P. Mack and G. K. Owens (1998). "Substitution of the degenerate smooth muscle (SM) alpha-actin CC(A/T-rich)6GG elements with c-fos serum response elements results in increased basal expression but relaxed SM cell specificity and reduced angiotensin II inducibility." J Biol Chem **273**(14): 8398-406.
- Hill, C. S., R. Marais, S. John, J. Wynne, S. Dalton and R. Treisman (1993). "Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex." Cell **73**(2): 395-406.
- Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1994). "Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain." Embo J **13**(22): 5421-32.
- Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-70.
- Hipskind, R. A., V. N. Rao, C. G. Mueller, E. S. Reddy and A. Nordheim (1991). "Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF." Nature **354**(6354): 531-4.
- Holzer, P., R. Schicho, U. Holzer-Petsche and I. T. Lippe (2001). "The gut as a neurological organ." Wien Klin Wochenschr **113**(17-18): 647-60.
- Huet, A., A. Parlakian, M. C. Arnaud, J. M. Glandieres, P. Valat, S. Fermandjian, D. Paulin, B. Alpert and C. Zentz (2005). "Mechanism of binding of serum response factor to serum response element." Febs J **272**(12): 3105-19.
- Iyer, D., N. Belaguli, M. Fluck, B. G. Rowan, L. Wei, N. L. Weigel, F. W. Booth, H. F. Epstein, R. J. Schwartz and A. Balasubramanyam (2003). "Novel phosphorylation target in the serum response factor MADS box regulates alpha-actin transcription." Biochemistry **42**(24): 7477-86.

Iyer, D., D. Chang, J. Marx, L. Wei, E. N. Olson, M. S. Parmacek, A. Balasubramanyam and R. J. Schwartz (2006). "Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4516-21.

Jaenisch, R. (1988). "Transgenic animals." Science **240**(4858): 1468-74.

Janknecht, R., W. H. Ernst, T. Houthaeve and A. Nordheim (1993). "C-terminal phosphorylation of the serum-response factor." Eur J Biochem **216**(2): 469-75.

Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud and A. Nordheim (1993). "Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases." Embo J **12**(13): 5097-104.

Janknecht, R., R. A. Hipskind, T. Houthaeve, A. Nordheim and H. G. Stunnenberg (1992). "Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties." Embo J **11**(3): 1045-54.

Je, H. D. and U. D. Sohn (2007). "SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice." Mol Cells **23**(2): 175-81.

Johansen, F. E. and R. Prywes (1993). "Identification of transcriptional activation and inhibitory domains in serum response factor (SRF) by using GAL4-SRF constructs." Mol Cell Biol **13**(8): 4640-7.

Johansen, F. E. and R. Prywes (1994). "Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor." Mol Cell Biol **14**(9): 5920-8.

Kamm, K. E. and J. T. Stull (1985). "The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 593-620.

Kaplan-Albuquerque, N., V. Van Putten, M. C. Weiser-Evans and R. A. Nemenoff (2005). "Depletion of serum response factor by RNA interference mimics the mitogenic effects of platelet derived growth factor-BB in vascular smooth muscle cells." Circ Res **97**(5): 427-33.

Kapur, R. P. (2001). "Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models." J Pathol **194**(3): 277-88.

Kemp, P. R. and J. C. Metcalfe (2000). "Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity." Biochem J **345 Pt 3**: 445-51.

Kim, S., H. S. Ip, M. M. Lu, C. Clendenin and M. S. Parmacek (1997). "A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages." Mol Cell Biol **17**(4): 2266-78.

Knoll, B., O. Kretz, C. Fiedler, S. Alberti, G. Schutz, M. Frotscher and A. Nordheim (2006). "Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus." Nat Neurosci **9**(2): 195-204.

- Knowles, C. H., D. B. Silk, A. Darzi, B. Veress, R. Feakins, A. H. Raimundo, T. Crompton, E. C. Browning, G. Lindberg and J. E. Martin (2004). "Deranged smooth muscle alpha-actin as a biomarker of intestinal pseudo-obstruction: a controlled multinational case series." Gut **53**(11): 1583-9.
- Kuhbandner, S., S. Brummer, D. Metzger, P. Chambon, F. Hofmann and R. Feil (2000). "Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle." Genesis **28**(1): 15-22.
- Kunze, W. A. and J. B. Furness (1999). "The enteric nervous system and regulation of intestinal motility." Annu Rev Physiol **61**: 117-42.
- Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113 (Pt 20)**: 3613-22.
- L'Honore, A., N. J. Lamb, M. Vandromme, P. Turowski, G. Carnac and A. Fernandez (2003). "MyoD distal regulatory region contains an SRF binding CArG element required for MyoD expression in skeletal myoblasts and during muscle regeneration." Mol Biol Cell **14**(5): 2151-62.
- L'Honore, A., V. Rana, N. Arsic, C. Franckhauser, N. J. Lamb and A. Fernandez (2007). "Identification of a New Hybrid SRF and MEF2-binding Element in MyoD Enhancer Required for MyoD Expression during Myogenesis." Mol Biol Cell.
- Levine, C. D. (1999). "Toxic megacolon: diagnosis and treatment challenges." AACN Clin Issues **10**(4): 492-9.
- Li, L., Z. Liu, B. Mercer, P. Overbeek and E. N. Olson (1997). "Evidence for serum response factor-mediated regulatory networks governing SM22alpha transcription in smooth, skeletal, and cardiac muscle cells." Dev Biol **187**(2): 311-21.
- Li, S., M. P. Czubyrt, J. McAnally, R. Bassel-Duby, J. A. Richardson, F. F. Wiebel, A. Nordheim and E. N. Olson (2005). "Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1082-7.
- Liu, S. H., J. T. Ma, A. Y. Yueh, S. P. Lees-Miller, C. W. Anderson and S. Y. Ng (1993). "The carboxyl-terminal transactivation domain of human serum response factor contains DNA-activated protein kinase phosphorylation sites." J Biol Chem **268**(28): 21147-54.
- Ma, Z., S. W. Morris, V. Valentine, M. Li, J. A. Herbrick, X. Cui, D. Bouman, Y. Li, P. K. Mehta, D. Nizetic, Y. Kaneko, G. C. Chan, L. C. Chan, J. Squire, S. W. Scherer and J. K. Hitzler (2001). "Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia." Nat Genet **28**(3): 220-1.
- Mack, C. P. and G. K. Owens (1999). "Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions." Circ Res **84**(7): 852-61.

Marais, R., J. Wynne and R. Treisman (1993). "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain." Cell **73**(2): 381-93.

McConalogue, K. and J. B. Furness (1994). "Gastrointestinal neurotransmitters." Baillieres Clin Endocrinol Metab **8**(1): 51-76.

McDonald, O. G. and G. K. Owens (2007). "Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics." Circ Res **100**(10): 1428-41.

McDonald, O. G., B. R. Wamhoff, M. H. Hoofnagle and G. K. Owens (2006). "Control of SRF binding to CArG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo." J Clin Invest **116**(1): 36-48.

Mehta, D. and S. J. Gunst (1999). "Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle." J Physiol **519 Pt 3**: 829-40.

Mercher, T., M. B. Coniat, R. Monni, M. Mauchauffe, F. Nguyen Khac, L. Gressin, F. Mugneret, T. Leblanc, N. Dastugue, R. Berger and O. A. Bernard (2001). "Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5776-9.

Metzger, D. and P. Chambon (2001). "Site- and time-specific gene targeting in the mouse." Methods **24**(1): 71-80.

Metzger, D. and R. Feil (1999). "Engineering the mouse genome by site-specific recombination." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 470-6.

Miano, J. M. (2003). "Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 577-93.

Miano, J. M., X. Long and K. Fujiwara (2007). "Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C70-81.

Miano, J. M., N. Ramanan, M. A. Georger, K. L. de Mesy Bentley, R. L. Emerson, R. O. Balza, Jr., Q. Xiao, H. Weiler, D. D. Ginty and R. P. Misra (2004). "Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17132-7.

Minty, A. and L. Kedes (1986). "Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif." Mol Cell Biol **6**(6): 2125-36.

Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou and R. Treisman (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." Cell **113**(3): 329-42.

- Miranti, C. K., D. D. Ginty, G. Huang, T. Chatila and M. E. Greenberg (1995). "Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase." Mol Cell Biol **15**(7): 3672-84.
- Mo, Y., W. Ho, K. Johnston and R. Marmorstein (2001). "Crystal structure of a ternary SAP-1/SRF/c-fos SRE DNA complex." J Mol Biol **314**(3): 495-506.
- Moore, S. W., J. W. Schneider and R. O. Kaschula (2002). "Unusual variations of gastrointestinal smooth muscle abnormalities associated with chronic intestinal pseudo-obstruction." Pediatr Surg Int **18**(1): 13-20.
- Moosmang, S., V. Schulla, A. Welling, R. Feil, S. Feil, J. W. Wegener, F. Hofmann and N. Klugbauer (2003). "Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation." Embo J **22**(22): 6027-34.
- Murthy, K. S. (2006). "Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut." Annu Rev Physiol **68**: 345-74.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.
- Newbury, S. F. (2006). "Control of mRNA stability in eukaryotes." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 30-4.
- Niessen, P., S. Rensen, J. van Deursen, J. De Man, A. De Laet, J. M. Vanderwinden, T. Wedel, D. Baker, P. Doevendans, M. Hofker, M. Gijbels and G. van Eys (2005). "Smoothelin-a is essential for functional intestinal smooth muscle contractility in mice." Gastroenterology **129**(5): 1592-601.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock and R. Treisman (1988). "Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element." Cell **55**(6): 989-1003.
- Norman, C. and R. Treisman (1988). "Analysis of serum response element function in vitro." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **53 Pt 2**: 719-26.
- Obara, K. and H. Yabu (1994). "Effect of cytochalasin B on intestinal smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **255**(1-3): 139-47.
- Orban, P. C., D. Chui and J. D. Marth (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-5.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." Physiol Rev **75**(3): 487-517.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.

Parlakian, A., C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J. D. Molkenin, G. Gary-Bobo, L. J. De Windt, M. A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil and Z. Li (2005). "Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart." Circulation **112**(19): 2930-9.

Parlakian, A., D. Tuil, G. Hamard, G. Tavernier, D. Hentzen, J. P. Concordet, D. Paulin, Z. Li and D. Daegelen (2004). "Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality." Mol Cell Biol **24**(12): 5281-9.

Parmacek, M. S. (2007). "Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation." Circ Res **100**(5): 633-44.

Pellegrini, L., S. Tan and T. J. Richmond (1995). "Structure of serum response factor core bound to DNA." Nature **376**(6540): 490-8.

Philippar, U., G. Schrott, C. Dieterich, J. M. Muller, P. Galgoczy, F. B. Engel, M. T. Keating, F. Gertler, R. Schule, M. Vingron and A. Nordheim (2004). "The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF." Mol Cell **16**(6): 867-80.

Picard, D. (1994). "Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins." Curr Opin Biotechnol **5**(5): 511-5.

Pipes, G. C., E. E. Creemers and E. N. Olson (2006). "The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis." Genes Dev **20**(12): 1545-56.

Poser, S., S. Impey, K. Trinh, Z. Xia and D. R. Storm (2000). "SRF-dependent gene expression is required for PI3-kinase-regulated cell proliferation." Embo J **19**(18): 4955-66.

Posern, G., A. Sotiropoulos and R. Treisman (2002). "Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor." Mol Biol Cell **13**(12): 4167-78.

Povstyan, O. V., D. V. Gordienko, M. I. Harhun and T. B. Bolton (2003). "Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein." Cell Calcium **33**(4): 223-39.

Prywes, R. and R. G. Roeder (1986). "Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer." Cell **47**(5): 777-84.

Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U. A. Betz, W. Muller, J. Roes and F. Schwenk (1996). "Conditional gene targeting." J Clin Invest **98**(3): 600-3.

Ramanan, N., Y. Shen, S. Sarsfield, T. Lemberger, G. Schutz, D. J. Linden and D. D. Ginty (2005). "SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability." Nat Neurosci **8**(6): 759-67.

Reason, A. J., H. R. Morris, M. Panico, R. Marais, R. H. Treisman, R. S. Haltiwanger, G. W. Hart, W. G. Kelly and A. Dell (1992). "Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor." J Biol Chem **267**(24): 16911-21.

Rech, J., I. Barlat, J. L. Veyrone, A. Vie and J. M. Blanchard (1994). "Nuclear import of serum response factor (SRF) requires a short amino-terminal nuclear localization sequence and is independent of the casein kinase II phosphorylation site." J Cell Sci **107 (Pt 11)**: 3029-36.

Regan, C. P., P. J. Adam, C. S. Madsen and G. K. Owens (2000). "Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury." J Clin Invest **106**(9): 1139-47.

Rensen, S. S., P. M. Niessen, X. Long, P. A. Doevendans, J. M. Miano and G. J. van Eys (2006). "Contribution of serum response factor and myocardin to transcriptional regulation of smoothelins." Cardiovasc Res **70**(1): 136-45.

Rivera, V. M., C. K. Miranti, R. P. Misra, D. D. Ginty, R. H. Chen, J. Blenis and M. E. Greenberg (1993). "A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity." Mol Cell Biol **13**(10): 6260-73.

Rudnicki, M. A. and R. Jaenisch (1995). "The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis." Bioessays **17**(3): 203-9.

Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold and R. Jaenisch (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." Cell **75**(7): 1351-9.

Schratt, G., U. Philippar, J. Berger, H. Schwarz, O. Heidenreich and A. Nordheim (2002). "Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells." J Cell Biol **156**(4): 737-50.

Schratt, G., B. Weinhold, A. S. Lundberg, S. Schuck, J. Berger, H. Schwarz, R. A. Weinberg, U. Ruther and A. Nordheim (2001). "Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells." Mol Cell Biol **21**(8): 2933-43.

Sepulveda, J. L., S. Vlahopoulos, D. Iyer, N. Belaguli and R. J. Schwartz (2002). "Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity." J Biol Chem **277**(28): 25775-82.

Seshadri, T. and J. Campisi (1990). "Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts." Science **247**(4939): 205-9.

Sharrocks, A. D., H. Gille and P. E. Shaw (1993). "Identification of amino acids essential for DNA binding and dimerization in p67SRF: implications for a novel DNA-binding motif." Mol Cell Biol **13**(1): 123-32.

- Shaw, P. E., H. Schroter and A. Nordheim (1989). "The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter." Cell **56**(4): 563-72.
- Shim, J. and M. Karin (2002). "The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli." Mol Cells **14**(3): 323-31.
- Shin, C. H., Z. P. Liu, R. Passier, C. L. Zhang, D. Z. Wang, T. M. Harris, H. Yamagishi, J. A. Richardson, G. Childs and E. N. Olson (2002). "Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein." Cell **110**(6): 725-35.
- Shore, P. and A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." Eur J Biochem **229**(1): 1-13.
- Small, J. V. (1985). "Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: the localisations of vinculin and alpha-actinin." Embo J **4**(1): 45-9.
- Small, J. V. and M. Gimona (1998). "The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell." Acta Physiol Scand **164**(4): 341-8.
- Sobue, K., K. Hayashi and W. Nishida (1999). "Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation." Mol Cell Biochem **190**(1-2): 105-18.
- Somlyo, A. V., H. Wang, N. Choudhury, A. S. Khromov, M. Majesky, G. K. Owens and A. P. Somlyo (2004). "Myosin light chain kinase knockout." J Muscle Res Cell Motil **25**(3): 241-2.
- Sotiropoulos, A., D. Gineitis, J. Copeland and R. Treisman (1999). "Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics." Cell **98**(2): 159-69.
- Soulez, M., C. G. Rouviere, P. Chafey, D. Hentzen, M. Vandromme, N. Lautredou, N. Lamb, A. Kahn and D. Tuil (1996). "Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor." Mol Cell Biol **16**(11): 6065-74.
- Sun, Q., G. Chen, J. W. Streb, X. Long, Y. Yang, C. J. Stoeckert, Jr. and J. M. Miano (2006). "Defining the mammalian CArGome." Genome Res **16**(2): 197-207.
- Takaki, M. (2003). "Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC)." J Smooth Muscle Res **39**(5): 137-61.
- Treisman, R. (1986). "Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors." Cell **46**(4): 567-74.
- Treisman, R. (1994). "Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 96-101.

- Tseng, S., R. Kim, T. Kim, K. G. Morgan and C. M. Hai (1997). "F-actin disruption attenuates agonist-induced $[Ca^{2+}]$, myosin phosphorylation, and force in smooth muscle." Am J Physiol **272**(6 Pt 1): C1960-7.
- Wang, D., P. S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. A. Richardson, E. Small, P. A. Krieg and E. N. Olson (2001). "Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor." Cell **105**(7): 851-62.
- Wang, D. Z., S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schrott, J. A. Richardson, A. Nordheim and E. N. Olson (2002). "Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14855-60.
- Wang, Z., D. Z. Wang, D. Hockemeyer, J. McAnally, A. Nordheim and E. N. Olson (2004). "Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression." Nature **428**(6979): 185-9.
- Wang, Z., D. Z. Wang, G. C. Pipes and E. N. Olson (2003). "Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7129-34.
- Weber, A., C. R. Pennise, G. G. Babcock and V. M. Fowler (1994). "Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1627-35.
- Wedel, T., G. J. Van Eys, D. Waltregny, W. Glenisson, V. Castronovo and J. M. Vanderwinden (2006). "Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders." Neurogastroenterol Motil **18**(7): 526-38.
- Wegener, J. W., V. Schulla, T. S. Lee, A. Koller, S. Feil, R. Feil, T. Kleppisch, N. Klugbauer, S. Moosmang, A. Welling and F. Hofmann (2004). "An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function." Faseb J **18**(10): 1159-61.
- Wheaton, K. and K. Riabowol (2004). "Protein kinase C delta blocks immediate-early gene expression in senescent cells by inactivating serum response factor." Mol Cell Biol **24**(16): 7298-311.
- Whitmarsh, A. J., S. H. Yang, M. S. Su, A. D. Sharrocks and R. J. Davis (1997). "Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors." Mol Cell Biol **17**(5): 2360-71.
- Wiebel, F. F., V. Rennekampff, K. Vintersten and A. Nordheim (2002). "Generation of mice carrying conditional knockout alleles for the transcription factor SRF." Genesis **32**(2): 124-6.
- Wolfsgruber, W., S. Feil, S. Brummer, O. Kuppinger, F. Hofmann and R. Feil (2003). "A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13519-24.

Yin, F., A. M. Hoggatt, J. Zhou and B. P. Herring (2006). "130-kDa smooth muscle myosin light chain kinase is transcribed from a CArG-dependent, internal promoter within the mouse mylk gene." Am J Physiol Cell Physiol **290**(6): C1599-609.

Zadelaar, S. M., L. S. Boesten, N. M. Pires, A. van Nieuwkoop, E. A. Biessen, W. Jukema, L. M. Havekes, B. J. van Vlijmen and K. Willems van Dijk (2006). "Local cre-mediated gene recombination in vascular smooth muscle cells in mice." Transgenic Res **15**(1): 31-6.

Zhang, J. C., S. Kim, B. P. Helmke, W. W. Yu, K. L. Du, M. M. Lu, M. Strobeck, Q. Yu and M. S. Parmacek (2001). "Analysis of SM22alpha-deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function." Mol Cell Biol **21**(4): 1336-44.

Zhang, X., G. Azhar, C. Huang, C. Cui, Y. Zhong, S. Huck and J. Y. Wei (2007). "Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate gene expression of serum response factor." Gene.

Zhou, J., G. Hu and B. P. Herring (2005). "Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1." Mol Cell Biol **25**(22): 9874-85.

Zinck, R., M. A. Cahill, M. Kracht, C. Sachsenmaier, R. A. Hipskind and A. Nordheim (1995). "Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1." Mol Cell Biol **15**(9): 4930-8.

8.2 Eigene Publikationen

Angstenberger, M., Wegener, J.W., Judenhofer, M.S., Pichler, B.J., Feil, S., Alberti, S., Feil, R. and Nordheim, A. (2007). "Severe intestinal obstruction upon induced smooth muscle-specific ablation of the transcription factor SRF in adult mice." Accepted for publication in Gastroenterology, in press.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Graphische Darstellung des <i>Srf</i> -Gens	1
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen “Serum Response Factors” mit seinen funktionellen Proteindomänen	2
Abb. 1.3: Alternative <i>Splice</i> -Varianten von SRF	3
Abb. 1.4: Der SRF-“core”-DNA-Komplex	4
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der <i>Ternary Complex Factor</i> (TCF)-Familie	6
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Ternär-Komplex Bildung am <i>c-fos</i> Promotor.	6
Abb. 1.7: Schematische Darstellung der “ <i>Myocardin-Related Transcription Factor</i> ” (MRTF)-Familie.....	7
Abb. 1.8: Signaltransduktionswege zur Aktivierung von SRF	9
Abb. 1.9: Schematische Darstellung des Rho-Aktin-Signalwegs mit den zwei Modellen zur SRF-Aktivierung durch MAL.....	11
Abb. 1.10: Modell der sich gegenseitig ausschließenden Bindung von MAL und TCFs an SRF-DNA-Komplexe.....	12
Abb. 1.11: Modell der zwei prinzipiellen Signalwege zur Regulation der SRF-Aktivität.....	13
Abb. 1.12: Vergleich der Struktur der drei unterschiedlichen Muskeltypen.....	20
Abb. 1.13: Ultrastruktur einer Glattmuskelzelle	22
Abb. 1.14: Modell der epigenetischen Kontrolle der SRF-Bindung an CA ₂ G-Box-Chromatin.....	24
Abb. 1.15: Kontraktion einer Glattmuskelzelle.....	25
Abb. 1.16: Mechanismus der Kalzium-abhängigen Regulation der Initiation der Glattmuskelkontraktion.....	26
Abb. 1.17: Signalweg zur Kalzium-abhängigen, initialen Glattmuskelkontraktion der zirkulären Muskulatur des Darms.....	29
Abb. 1.18: Signalwege der Kalzium-unabhängigen, anhaltenden Kontraktionsphase der Glattmuskelkontraktion im Darm	30
Abb. 1.19: Das <i>Cre/loxP</i> -Rekombinationssystem.....	32
Abb. 1.20: Konstitutive und konditionale Mutagenese in der Maus	33
Abb. 1.21: Modell der Aktivierung der CreER-Rekombinasen durch Tamoxifen.....	35
Abb. 1.22: Schematische Darstellung des “gefloxten” <i>Srf</i> -Allels (<i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>}) und des durch Cre-vermittelte Rekombination deletierten <i>Srf</i> ^{<i>lx</i>} -Allels	36
Abb. 2.1: “ <i>Targeting</i> ” Strategie zur Generierung des <i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>} -Allels	37
Abb. 2.2: “ <i>Targeting</i> ” Strategie zur Generierung des <i>SM22-CreER</i> ^{<i>T2</i>} -“ <i>knock-in</i> ”-Allels.....	38
Abb. 2.3: Genotyp-basiertes Zuchtschema zur Generierung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer, Tamoxifen-induzierbarer <i>Srf</i> -Deletion.....	39
Abb. 2.4: Graphische Darstellung des <i>Srf</i> -Wildtyp- und des <i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>} -Allels mit entsprechender PCR-Strategie und resultierenden PCR-Fragmentgrößen.....	44
Abb. 2.5: Graphische Darstellung des <i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>} -Lokus vor und nach Cre-vermittelter Rekombination mit entsprechender Lw-Bw-PCR-Strategie.	46
Abb. 2.6: Graphische Darstellung des <i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>} -Lokus vor und nach Cre-vermittelter Rekombination mit entsprechender PCR-Strategie unter Verwendung der Primer <i>Srf-KO8-fw</i> , <i>Srf-KO8-bw</i> und <i>Lox2</i>	48
Abb. 2.7: “ <i>Mini-Trans-Blot-Cell</i> ”-Apparatur (BioRad)	64
Abb. 2.8: Prinzip der ABC-Methode (Vector Laboratories, www.vectorlabs.com).....	77
Abb. 3.1: Genotypisierung der <i>Srf</i> ^{<i>flex1</i>} -Mauslinie	85
Abb. 3.2: Genotypisierung der transgenen <i>SM-CreER</i> ^{<i>T2</i>} -Mauslinie	86
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Generierung der induzierbaren, Glattmuskel-spezifischen, SRF-defizienten Mauslinie	87
Abb. 3.4: PCR zur Rekombinationsanalyse in verschiedenen Organen Tamoxifen- und Vehikel-behandelter Mäuse.....	89

Abb. 3.5: Analyse der SRF-Proteinexpression in verschiedenen Organen Glattmuskel-spezifischer <i>Srf-knockout</i> - und Kontroll-Tiere mittels Western Blot-Analyse.....	91
Abb. 3.6: Analyse der SRF-Proteinexpression in Magen, Blase und Skelettmuskel Glatt-muskel-spezifischer <i>Srf-knockout</i> - und Kontroll-Tiere mittels Western Blot-Analyse....	92
Abb. 3.7: SRF-Expressionsanalyse in Dick- und Dünndarmgewebe anhand immunhisto-logischer Färbungen.....	93
Abb. 3.8: Überlebenskurve der Glattmuskel-spezifischen <i>Srf-knockout</i> -Tiere und der Kontrollgruppe.....	94
Abb. 3.9: Makroskopische Analyse des Gastrointestinaltraktes Glattmuskel-spezifischer <i>Srf-knockout</i> - und Kontroll-Tiere	95
Abb. 3.10: Überlebenskurve unbehandelter <i>Srf^{flex1/flex1}; SM-CreER^{T2}/ SM-CreER^{T2}</i> - und entsprechender Kontroll-Tiere	97
Abb. 3.11: Analyse der intestinalen Motilität mittels Röntgenkontrast-Computertomographie ...	100
Abb. 3.12: Spontanaktivität des glatten Längsmuskels im Dünndarm (Jejunum).....	103
Abb. 3.13: Spontanaktivität des glatten Längsmuskels im Dickdarm.....	104
Abb. 3.14: Isometrische Kraftmessungen an intakten Dünn- und Dickdarmabschnitten und an der Blase.....	107
Abb. 3.15: Fluoreszenzfärbung gegen SM α -Aktin an isolierten Glattmuskelzellen der Aorta	109
Abb. 3.16: Immunzytochemischer Nachweis der Tamoxifen-induzierten CreER ^{T2} -Trans-lokation in den Zellkern	110
Abb. 3.17: Rekombinations- und Western Blot-Analyse Tamoxifen- und Vehikel-behandelter, vaskulärer Glattmuskelzellen.....	111
Abb. 3.18: Rekombinations- und Western Blot-Analyse von kultivierten Glattmuskelzellen aus dem Darm Tamoxifen-behandelter Mäuse	112
Abb. 3.19: Analyse der <i>Srf</i> -mRNA-Expression in kultivierten Darm-Glattmuskelzellen Tam-oxifen-behandelter Mäuse	113
Abb. 3.20: Veränderung der Zellmorphologie in SRF-defizienten adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm	114
Abb. 3.21: Analyse der Viabilität der SRF-defizienten Glattmuskelzellen	115
Abb. 3.22: Proliferationsanalyse von SRF-defizienten, adulten Glattmuskelzellen aus dem Darm.....	116
Abb. 3.23: SRF-defiziente, adulte Glattmuskelzellpopulationen zeigen erhöhte Seneszenz	118
Abb. 3.24: <i>In vivo</i> -Glattmuskelzellzahlen im Dickdarm SRF-defizienter Tiere.....	119
Abb. 3.25: SRF-defiziente, adulte Glattmuskelzellen weisen ein degeneriertes Aktin-Stressfaser-Netzwerk auf	121
Abb. 3.26: SM α -Aktin-mRNA- und Protein-Expressionsanalyse in <i>Srf-knockout</i> -Glatt-muskelzellen	122
Abb. 3.27: Analyse Glattmuskel-spezifischer SRF-Zielgene in primären, adulten Glatt-muskelzellen SRF-defizienter Mäuse.....	124
Abb. 3.28: Analyse Glattmuskel-spezifischer SRF-Zielgene in verschiedenen Organen SRF-defizienter Mäuse.....	125
Abb. 3.29: Analyse der " <i>immediate early</i> "-Genexpression in primären, adulten Glattmuskel-zellen SRF-defizienter Mäuse.....	126
Tabelle 1.1: Beispiele SRF-regulierter, muskelspezifischer Gene	19
Tabelle 2.1: Protease-Inhibitoren mit verwendeten Konzentrationen.....	58
Tabelle 2.2: Zusammensetzung von 10- bzw. 12%igen Trenngelen	62
Tabelle 2.3: Zusammensetzung von 5%igen-Sammelgelen.....	62
Tabelle 2.4: Enzym-Stammlösungen für die Isolierung von primären Glattmuskelzellen.....	67

10 Acknowledgements

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Alfred Nordheim für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit, sowie die Möglichkeit diese unter hervorragenden Bedingungen anfertigen zu können.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollaborationspartnern bedanken: Prof. Dr. Robert Feil und Dr. Susanne Feil danke ich für die Bereitstellung der SM-CreER^{T2}-Mauslinie, für die Hilfe beim Erlernen der Glattmuskelzell-Präparation und für die konstruktiven Ideen und Vorschläge. Dr. Jörg W. Wegener für die Durchführung der *“tension recordings”* und Dr. Bernd J. Pichler für die faszinierenden CT-Aufnahmen.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich dem gesamten “Maus-Labor”:

Siggi Alberti danke ich für seine große Hilfsbereitschaft bei diversen Problemen des Laboralltags und für die Beantwortung aller “Maus-Fragen”, Seba Raimundo (*“Gaucha”*) für den nie abbreißenden Informationsfluss inner- und außerhalb der Labormauern, sowie Barbara Habermehl und Nicole Hecht für unsere amüsanten Raucherpausen.

All meinen Doktoranden-Kollegen kann ich nicht genug danken, für die konstante Hilfe und den Austausch untereinander und ganz besonders dafür, einfach gute Freunde zu sein: Bilge Ergin, meine engste und tapferste Leidensgenossin (*“Geteiltes Leid ist halbes Leid”*), Nina Konjer, Jenny Sandström, Tine Stritt, David Hertfelder, Natalia Martinez, Stefan Ohrnberger und Anja Gaugel.

Danke auch an alle Mitglieder der gesamten Arbeitsgruppe Nordheim, die den oft so grauen Laboralltag um einiges erträglicher gemacht haben:

PD Olaf Heidenreich (*“das OTH”*) für seine unendliche Hilfsbereitschaft und seine aufbauenden Worte, Christine Weinl und Andreas Gessner (*“meine Landsleute”*), die gesamte AG Knöll und AG Autophagie.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern “hinter den Kulissen” für deren Unterstützung und Hilfsbereitschaft: Heide Neu, Elena Kullmann (*“Danke für die hervorragende Organisation der Spülküche”*), Heidemie Riehle und unser “Hausmeister

Schorsch – die gute Seele des Hauses“. Ganz besonders bedanke ich mich bei Gaby Aichele für das hervorragende Labormanagement!

Meinem Freund Jan bin ich unendlich dankbar, dafür, dass er immer für mich da war, alle Höhen und Tiefen mit mir meisterte und mir stets deutlich machte, dass auch eine Welt hinter den Labormauern existiert.

"Last but not least" gilt mein größter Dank meiner Familie:

Meinen lieben Eltern – Danke dafür, dass ihr stets fest an mich geglaubt und mir durch eure unendliche Unterstützung und euren Rückhalt diese Ausbildung überhaupt erst ermöglicht habt!

Meiner lieben Schwester Jenny, meinem lieben Schwager Hans, meiner kleinen Nichte Pia und meinen geliebten "Ersatzhunden" Puschkin und Luna – ihr wart für mich ein unentbehrliches Stück Familie in Tübingen...!

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Meike Angstenberger
Geburtsdatum	15. September 1976
Geburtsort	Müllheim/Baden

Schulbildung

09/1983 – 12/1984	Grundschule Staufen im Breisgau
01/1985 – 06/1987	Grundschule Burgau
09/1987 – 06/1996	Maria-Ward-Gymnasium Günzburg
06/1996	Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1996 – 05/2003	Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität in Tübingen Studienschwerpunkt: Zell- und Molekularbiologie Nebenfächer: Mikrobiologie und Biochemie
06/1998	Vordiplom
06/2002 – 05/2003	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Alfred Nordheim am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie der Eberhard Karls Universität in Tübingen mit dem Titel: <i>“Ausarbeitung und Anwendung einer neuen Strategie zur Erzeugung SRF-defizienter muriner embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten”.</i>
05/2003	Universitätsabschluss (Diplom, Note <i>“sehr gut”</i>)

Dissertation

seit 09/2003	Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Alfred Nordheim am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie der Eberhard Karls Universität in Tübingen mit dem Titel: <i>“Analyse der in vivo-Funktion des Transkriptionsfaktors SRF in adulten Glattmuskelzellen der Maus”.</i>
08/2006 – 04/2007	Anleitung und Betreuung eines Diplomanden während der Diplomarbeit mit dem Titel: <i>“Protein transduction into murine embryonic fibroblasts for site-specific gene deletion”.</i>

Publikationen

M. Angstenberger, J. W. Wegener, M. S. Judenhofer, B. J. Pichler, S. Feil, S. Alberti, R. Feil und A. Nordheim
“Severe intestinal obstruction upon induced smooth muscle-specific ablation of the transcription factor SRF in adult mice”.
 Submitted 03/2007, accepted for publication in *Gastroenterology* 06/2007, in press.

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Meike Angstenberger

Hohe Steige 6

72076 TÜBINGEN