

**Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4
durch eine Mausmutante mit einem induzierbaren
RNA-Interferenz System**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Ing. (FH) Boris Thurisch

11. August 1979, Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christof Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

2. Prof. Dr. Christof Dame

3. Prof. Dr. Jörg Bungert

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2007

**Wir denken selten an das, was wir haben,
aber immer an das, was uns fehlt...**

(Arthur Schopenhauer, 1788 - 1860)

Für Keesha & meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 GATA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND IHRE STRUKTUR.....	1
1.2 DIE FAMILIE DER GATA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	2
1.3 EXPRESSION VON GATA-4 IM SICH ENTWICKELNDEN UND ADULTEN ORGANISMUS	4
1.3.1 GATA-4 IST FÜR DIE NORMALE HERZENTWICKLUNG ESSENTIELL.....	4
1.3.2 KEINE FORTPFLANZUNG OHNE GATA-4?.....	7
1.3.3 GATA-4 UND TUMORGENESE	8
1.4 DIE REGULATION VON GATA-4.....	9
1.5 DIE AKTIVIERUNG VON ZIELGENEN DURCH GATA-4 UND SEINE KOFAKTOREN.....	10
1.6 DAS REGULATORISCHE NETZWERK UM GATA-4.....	13
1.7 RNA-INTERFERENZ	16
1.7.1 DIE ANWENDUNG DER RNAI <i>IN VITRO</i>	17
1.7.1.1 DESIGN VON siRNAs	17
1.7.1.2 TRANSIENTE RNA-INTERFERENZ.....	18
1.7.1.3 STABILE RNA INTERFERENZ	19
1.7.1.4 KONDITIONELLE UND INDUZIERBARE RNA INTERFERENZ.....	20
1.7.2 OFF-TARGET EFFEKTE	21
1.7.3 DIE ANWENDUNG DER RNAI <i>IN VIVO</i> – MAUSMODELLE.....	22
1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	24
2 MATERIAL.....	25
2.1 REAGENZIEEN, PUFFER & LÖSUNGEN.....	25
2.2 ENZYME.....	29
2.3 ANTIKÖRPER.....	29
2.4 KITS, MARKER UND TRANSFEKTIONSREAGENZIEEN	30
2.5 BAKTERIEN, ZELLINIEN UND MAUSZUCHT	31
2.5.1 BAKTERIEN	31
2.5.2 ZELLINIEN.....	32
2.5.3 MAUSZUCHT	32
2.6 PLASMIDE	32
2.7 OLIGONUKLEOTIDE.....	32
2.8 NUKLEOTIDE / RADIONUKLEOTIDE	34
2.9 SONSTIGE MATERIALIEN.....	34
2.10 GERÄTE	35
2.11 EDV-PROGRAMME	36

3	METHODEN	37
3.1	ZELLKULTURTECHNIKEN	37
3.1.1	KULTIVIERUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLKULTUREN	37
3.1.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN	37
3.1.3	TRANSFEKTION VON EUKARYONTISCHEN ZELLKULTUREN	37
3.1.3.1	TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT PLASMIDEN	37
3.1.3.2	STABILE TRANSFEKTION MIT PLASMIDEN	38
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	38
3.2.1	DNA-TECHNIKEN	38
3.2.1.1	DNA-ISOLATION AUS BIOPSIEN DURCH PHENOL-CHLOROFORMEXTRAKTION	38
3.2.1.2	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	39
3.2.1.3	AGAROSEGELE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN	39
3.2.1.4	ISOLATION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	40
3.2.1.5	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	40
3.2.1.6	SOUTHERN BLOT	40
3.2.1.7	STRIPPEN EINER HYBRIDISIERTEN NYLONMEMBRAN	41
3.2.2	KLONIERUNGSTECHNIKEN	41
3.2.2.1	PRÄPARATIVER RESTRIKTIONSVERDAU	41
3.2.2.2	DEPHOSPHORYLIERUNG VON VEKTOR-DNA-ENDEN	41
3.2.2.3	PHENOL-CHLOROFORMEXTRAKTION UND REINIGUNG DER DNA	42
3.2.2.4	DNA-FÄLLUNG	42
3.2.2.5	LIGATION VON shRNA-MATRIZEN IN DEN shRNA-EXPRESSIONSVEKTOR	42
3.2.2.6	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	42
3.2.2.7	MINIPRÄPARATION	43
3.2.2.8	MAXIPRÄPARATION	43
3.2.2.9	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	43
3.2.2.10	ANALYTISCHER RESTRIKTIONSVERDAU	43
3.2.2.11	SEQUENZIERUNG	44
3.2.3	RNA-TECHNIKEN	44
3.2.3.1	ISOLIERUNG VON RNA UND QUANTIFIZIERUNG	44
3.2.3.1.1	ISOLIERUNG VON RNA AUS ZELLEN	44
3.2.3.1.2	ISOLATION VON RNA AUS ORGANEN	44
3.2.3.2	REVERSE TRANSKRIPTION	45
3.2.3.3	REAL-TIME PCR	45
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE ARBEITSTECHNIKEN	45
3.3.1	ISOLATION VON PROTEINEN	45
3.3.1.1	GESAMTZELLPROTEIN-EXTRAKTE AUS DER ZELLKULTUR	45
3.3.1.2	GESAMTZELLPROTEIN-EXTRAKTE AUS ORGANEN	45
3.3.2	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD	46
3.3.3	AUFTRENNUNG VON PROTEINEN DURCH SDS-PAGE	46
3.3.4	WESTERN BLOT	46

3.4	IMMUNHISTOCHEMIE	46
3.4.1	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	47
3.4.2	BILDAUFNAHME UND DIGITALE BILDBEARBEITUNG.....	47
3.5	GENERIERUNG TRANSGENER MÄUSE DURCH MIKROINJEKTION	47
3.6	STATISTISCHE ANALYSEN.....	48
4	ERGEBNISSE	49
4.1	ETABLIERUNG DES INDUZIERBAREN GATA-4 RNA-INTERFERENZ SYSTEMS <i>IN VITRO</i>	49
4.1.1	LOKALISATION POTENTIELLER siRNAs GEGEN GATA-4 (siGATA-4).....	49
4.1.2	SUPPRESSION VON GATA-4 <i>IN VITRO</i>	51
4.2	GENERIERUNG VON MAUSMUTANTEN	52
4.2.1	IDENTIFIKATION DER INTEGRATIONSMUSTER DER TRANSGENE.....	55
4.3	ETABLIERUNG DES DOXYZYKLIN-INDUZIERBAREN <i>IN VIVO</i> SYSTEMS AM HERZEN.....	56
4.3.1	UNTERSUCHUNG DER TET ^R -EXPRESSION IN DEN TRANSGENEN MÄUSEN.....	56
4.3.2	OPTIMIERUNG DER DOXYZYKLIN-APPLIKATION	57
4.4	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR SUPPRESSION VON GATA-4 <i>IN VIVO</i>	58
4.4.1	SUPPRESSION VON GATA-4 IM OVAR VON DOX-INDUZIERTEN MAUSMUTANTEN	60
4.4.2	SUPPRESSION VON GATA-4 IM HODEN VON DOX-INDUZIERTEN MAUSMUTANTEN.....	60
4.5	ENTWICKLUNG VON TUMOREN IN MIT DOX-BEHANDELTEN MAUSMUTANTEN	61
5	DISKUSSION.....	65
5.1	DOXYZYKLIN-INDUZIERBARE RNA-INTERFERENZ <i>IN VITRO</i>	65
5.2	GENERIERUNG DER H1:G4/TET ^R MAUSMUTANTEN	66
5.3	OPTIMIERUNG DER DOXYZYKLIN-APPLIKATION IM <i>IN VIVO</i> SYSTEM.....	67
5.4	FUNKTIONALITÄT DER MAUSMUTANTE	68
5.4.1	GATA-4 SUPPRESSION IM HERZEN	68
5.4.1.1	α-MHC EXPRESSION.....	69
5.4.1.2	KOMPENSATORISCHE EFFEKTE	70
5.4.2	GATA-4 SUPPRESSION IN DEN GONADEN UND EINGESCHRÄNKTE FERTILITÄT	70
5.5	AUSLÖSUNG UNSPEZIFISCHER EFFEKTE IN DER MAUSMUTANTE.....	72
5.6	ENTWICKLUNG VON TUMOREN IN MIT DOXYZYKLIN BEHANDELTEN MAUSMUTANTEN.....	73
5.7	SCHLUSSFOLGERUNG.....	75
5.8	AUSBLICK.....	76
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	77
7	DANKSAGUNG	102
8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	104
9	PUBLIKATIONEN.....	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -CA	Cardiac α -Actin
α -MHC	α -Myosin Heavy-Chain
α -SA	Skeletal α -Actin
α -Sm	Smooth Muscle α -Actin
A1AR	A1 Adenosine Receptor
Abb.	Abbildung
Ago2	Argonate 2
ANF	Aterial Natriuretic Factor
Ang-II	Angiotensin-II
AT1aR	Angiotensin II Type I α Receptor
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-2	B-Cell Leukemia/lymphoma 2
bp	Basenpaar
β -MHC	β -Myosin Heavy-Chain
BMP-4	Bone Morphogenic Protein 4
BNP	Brain-type Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CARP	Cardiac-Restricted Ankyrin Repeat Protein
CBP	CREB Binding Protein
cDNA	Copy DNA
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CMV	Cytomegalovirus
Cre	Cyclization Recombination
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
cTnC	Cardiac Troponin C
cTn-I	Cardiac Troponin I
cTnT	Cardiac Troponin T
CYP11A1	Cytochrome P450
Cyp19	Aromatase
dHAND	Heart-and Neural Crest Derivatives-expressed Protein 2
di-siRNA	Diced Small Interfering RNA
Dmrt-1	Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
e	Embryonaltag; Tag der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung

EDTA	E thylenediaminetetraacetic acid
eIF2	E ukaryontischer I nitiationsfaktor 2
EMSA	E lectrophoretic M obility S hift A ssay
EPO	E rythropoietin
ET-1	E ndothelin-1
ERK	E xtrazellulär R egulierte K inase
ES-Zellen	E mbryonale S tammzellen
Fabpl	F atty A cid B inding P rotein L iver
FKS	F etales K älberserum
FOG-2	F riend of G ATA
FSH	F ollikel-stimulierendes H ormon
GAPDH	G lycerinaldehyd-3- P hosphat- D ehydrogenase
GSK-3 β	G lycogen S ynthase K inase 3 β
GnRH	G onadotropin- R eleasing H ormone
H1:G4	shGATA-4 Expressionskonstrukt
HGF	H epatocyte G rowth F actor
HNF	H epatic N uclear F actor
HRP	H orseradish p eroxidase
HSC	h ämatopoietische S tammzellen
IFABP	I ntestinal F atty A cid B inding P rotein
IgG	I mmunglobulin G
IL-5	I nterleukin- 5
ISO	I soproterenol
kDa	K ilodalton
KLF-13	K rüppel- L ike T ranscription F actor 13
LB	L uria B ertani
LH	L uteinisierendes H ormon
LNA	L ocked N ucleic A cid
Luc	L uciferase
MAPK	M itogen-aktivierte P roteinkinase
mRNA	M essenger R NA
MIS	M üllerian I nhibiting S ubstance
MLC1/3	M yosin L ight C hain 1/3
NCX1	N a ⁺ / C a ²⁺ E xchanger 1
MyHC	S low M yosin H eavy C hain
nt	N ukleotid
OAS	2' - 5' - O ligoadenylatsynthetase
OAS2	2' - 5' - O ligoadenylatsynthetase 2
OD	O ptische D ichte
P	P hosphat
PBS	P hosphate B uffered S aline

PCR	P olymerase C hain R eaction
PEG	P oly(e thylenglykol)
PE	P henylephrine
PKR	RNA- A bhängigen P roteinkinase
PMSF	P henyl- M ethyl-sulfonyl-fluorid
RISC	R NA- I nduced S ilencing C omplex
RNA	R ibonucleic acid
RNase	R ibonuklease
RNase-L	R ibonuklease L
Pol II	P olymerase II
Pol III	P olymerase III
RITS	R NAi- I nduced T ranscriptional S ilencing
RNAi	R NA I nterferenz
rpm	R evolutions p er M inute
RT	R everse T ranskription
RXR α	R etinoic A cid R eceptor
SDS	S odium D odecyl S ulfate
SDS-PAGE	SDS - P olyacrylamid- G eleelektrophorese
SF-1	S teroidogenic F actor- 1
shGATA-4	G ATA- 4 S hort H airpin R NA
shRNA	S hort H airpin R NA
SI	S ucrase- I somaltase
siGATA-4	G ATA- 4 S mall I nterfering R NA
siLNA	S mall I nterfering L ocked N ucleic A cid
siRNA	S mall I nterfering R NA
SUMO-1	S mall U biquitin-like M odifier- 1
Star	S teroidogenic A cute R egulatory P rotein
Tbx5	T - B ox- 5
T ₅	5' T hymidin T erminations S ignal von P ol III
TAE	T ris- A ccetat- E DTA
TBE	T ris- B orsäure- E DTA
TBS	T ris B uffered S aline
TBS-T	TBS + T ween [®] 20
TE	T ris E DTA
TREP	T ransactivating R esponse R NA- B inding P rotein
TetO	T etracycline O perator
Tet ^R	T etracycline R epressor
Tris	T ris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	U nit
UTR	U ntranslatierte R egion
UV	U ltraviolett

WT	Wildtyp
YY1	Yin and Yang 1

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Der Transkriptionsfaktor GATA-4 ist für die normale Entwicklung des Endoderms essentiell. Mausmutanten mit einer homozygoten Deletion des *gata-4* Gens versterben zwischen den embryonalen Tagen 8.5 - 10.5 aufgrund einer Störung der ventralen Morphogenese und der Ausbildung des Herzschlauches.

Zielsetzung und experimentelle Strategie: Um die Bedeutung von GATA-4 auch nach der embryonalen Entwicklung untersuchen zu können, wurden doppelt-transgene Mäuse generiert. Diese Mausmutanten exprimieren einen Tetrazyklin-Repressor und eine gegen GATA-4 gerichtete *short hairpin* RNA (shGATA-4). Die Expression der shGATA-4 steht dabei unter der Kontrolle eines H1-Promotors, welcher durch ein Tetrazyklin-Operator Element modifiziert wurde. Dadurch ist das System durch Doxyzyklin induzierbar.

Ergebnisse: Die Integration der Transgene in dem Genom der Maus wurde durch Southern-Blot Analyse nachgewiesen. Die Expression der shGATA-4 wurde durch die Applikation von Doxyzyklin über das Trinkwasser (20 mg/ml) induziert. Langzeitstudien am Herzen haben dabei eine signifikante Suppression von GATA-4 nach 38 Tagen ergeben (80 %). Diese Reduktion konnte durch Western-Blot Analyse bestätigt werden. Obwohl die Expression verschiedener Zielgene von GATA-4 (ANF, BMP-4) ebenfalls herunterreguliert war, fiel bei den transgenen Mäusen kein kardialer Phänotyp auf. Jedoch wurde die GATA-4 Expression in den Hoden und Ovarien transgener Mäuse supprimiert, nachdem shGATA-4 durch die Applikation von Doxyzyklin induziert wurde. Weiterführende Untersuchungen an adulten Mäusen zeigten eine GATA-4 Reduktion von 20 % auch in nicht mit Doxyzyklin-induzierten Mausmutanten. Diese Reduktion könnte durch einen sog. *leaky*-Effekt des shGATA-4 Transgens hervorgerufen worden sein, wodurch die stark eingeschränkte Fertilität dieser Mauslinie erklärt werden könnte. Interessanterweise haben ca. 10 % der mit Doxyzyklin behandelten transgenen Weibchen Ovarial-Teratome ausgebildet. Histologisch wiesen diese Teratome überwiegend (neuro-) ektodermale, vereinzelt mesodermale und nahezu keine endodermalen Strukturen auf.

Schlussfolgerung: In diesem Modell hat die Suppression von GATA-4 keinen Einfluss auf die Funktion des Herzens der adulten Maus. Jedoch scheint GATA-4 für die Fertilität der Maus von großer Bedeutung zu sein. Weiterhin scheint die Suppression von GATA-4 mit der Ausbildung von Ovarial-Teratomen assoziiert zu sein.

ABSTRACT

Background: The transcription factor GATA-4 is crucial for the normal endodermal development. In mice, homozygous deficiency of GATA-4 causes defects in ventral morphogenesis and heart tube formation, resulting in embryonic death between day e8.5 and e10.5.

Aim and experimental strategy: To analyze the implication of GATA-4 beyond embryonic development a double transgenic mouse expressing the tetracycline repressor (Tet^R) and an inducible small interfering RNA directed against GATA-4 was generated. This expression construct contains a H1 promoter modified with a tetracycline operator upstream of the coding region for the GATA-4 short hairpin RNA (shGATA-4).

Results: The integration of the transgenes in FvB mice (H1:G4/Tet^R) was confirmed by Southern blot. To induce the expression of the shGATA-4 construct, transgenic mice were treated with doxycycline (20 mg/ml drinking water). In longitudinal analysis, most efficient GATA-4 suppression was detected after 38 days. Quantitative PCR revealed a GATA-4 reduction of about 80 % in the heart, if normalized against the wildtype. Reduction of GATA-4 was confirmed by Western Blot. Although GATA-4 target genes (ANP, BMP-4) were down regulated, the animals showed no clinical phenotype. In opposite to wildtype mice, GATA-4 expression was undetectable in the ovaries and testis of transgenic mice with induced shGATA-4. Additional analysis in adult transgenic mice, which were not treated with doxycycline, also showed a reduction of GATA-4 expression of about 20 %, probably caused by a leaky-effect of the transgene. This may explain the significantly reduced fertility of the colony. Importantly, 10 % of transgenic females treated with doxycycline developed ovarian teratomas. Histological examination of teratomas showed predominantly (neuro-) ectodermal and to a lower degree mesodermal, but almost no endodermal compounds.

Conclusions: GATA-4 reduction in the adult murine heart is – at least to a certain degree – clinically redundant. GATA-4 seems to be required for normal fertility. In our model GATA-4 deficiency seems to be associated with an increased risk for developing ovarian teratoma.

1 Einleitung

Grundlage vieler biologischer Prozesse ist die transkriptionelle Regulation der Expression von Genen. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt dabei durch verschiedene Faktoren, welche an den regulatorischen Elementen des Zielgens einen Komplex ausbilden und mit der RNA-Polymerase II zur Aktivierung der Transkription beitragen. Diese komplexbildenden Proteine werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Entsprechend ihrer Funktion und ihrer Interaktions-Domäne mit der DNA werden die Transkriptionsfaktoren benannt und unterschieden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung und Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4 in der Maus charakterisiert werden. Dazu wurde ein neuartiges Mausmodell etabliert, welches auf einer induzierbaren RNA-Interferenz beruht.

1.1 GATA-Transkriptionsfaktoren und ihre Struktur

GATA-Transkriptionsfaktoren sind bei Vertebraten eine Gruppe von sechs Zinkfingerproteinen, die eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen spielen.¹ GATA Proteine sind ca. 50 kDa groß.² Sie besitzen zwei hochkonservierte³ Zinkfinger, welche durch 29 Aminosäuren voneinander getrennt werden und die Struktur [(Cys-X₂-Cys)X₁₇(CysX₂Cys)]-X₂₉-[CysX₂Cys]X₁₇(CysX₂) aufweisen (Abbildung 1). Die Zinkfinger werden entsprechend ihrer Position zum Amino- oder Carboxylende als N-terminaler und C-terminaler Finger bezeichnet.¹ Durch die Bindung des C-terminalen Fingers und einer benachbarten basischen Region⁴ an die Nukleotid-Sequenz (A/T)GATA(A/G),^{3,5} können GATA-Transkriptionsfaktoren mit Ziel-Genen und regulatorischen Faktoren interagieren.^{6,7} Der N-terminale Finger verleiht der Bindung eine höhere Spezifität und Stabilität.⁸ Beide Zinkfinger weisen transkriptionelle Aktivierungsdomänen auf^{4,9} und interagieren mit Kofaktoren.^{10,11}

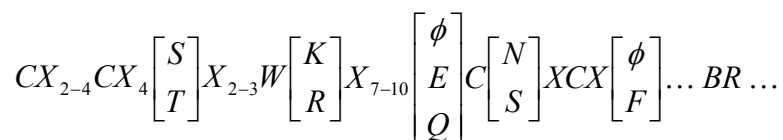


Abbildung 1: Konsensus DNA-Bindungsdomäne der GATA-Transkriptionsfaktoren¹² nach Lowry und Atchley.¹ Dargestellt sind hoch-konservierte Aminosäurebereiche in der Zinkfinger-Region und die folgende basische Region (BR, ca. 20 Aminosäuren), welche für die DNA-Bindung wichtig sind. X: beliebige Aminosäure; ϕ : hydrophobe Aminosäure (A: Adenin; V: Valin; L: Leucin; I: Isoleucin); C: Cystein; E: Glutaminsäure; F: Phenylalanin; K: Lysin; N: Asparagin; Q: Glutamin; R: Arginin; S: Serin; T: Threonin.

1.2 Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren

Basierend auf Sequenzhomologien und Expressionsmustern wird die Familie der GATA-Faktoren in zwei Untergruppen eingeteilt.¹ Die erste Gruppe, zu welcher GATA-1, -2 und -3 gehören, haben wesentliche Funktionen während der Entwicklung und Gen-Regulation der Hämatopoese.¹³

GATA-1 ist ein zentraler Regulator der erythroiden Genexpression.¹⁴ In *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass GATA-1 defiziente (GATA-1^{-/-}) embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht zu reifen Blutzellen differenzieren.¹⁵ GATA-1^{-/-} Mausmutanten erkrankten an einer Anämie.¹⁶ GATA-1 wird weiterhin in Mastzellen, Megakaryozyten und myeloiden Zelllinien exprimiert.¹⁷⁻¹⁹ Außerhalb des hämatopoietischen Systems wird GATA-1 in Sertoli Zellen des Hodens exprimiert.²⁰ In der Hämatopoese weisen GATA-1 und GATA-2 ähnliche Expressionsprofile auf.^{21,22} Während GATA-1 für die terminale Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen verantwortlich ist,¹⁵ belegen Untersuchungen an GATA-2 *knockout* Mäusen²³ (GATA-2^{-/-}) dessen Bedeutung in der frühen Phase der Hämatopoese.²⁴ Die homozygote Deletion von GATA-2 ist aufgrund einer schweren Anämie um den embryonalen Tag 10.5 (e10.5) letal.²⁵ Weiterhin treten bei diesen Mausmutanten Entwicklungsstörungen im Nervensystem^{23,25} und Urogenitaltrakt²⁶ auf. Auf zellulärer Ebene ist GATA-2 an der Regulation der Proliferation und Selbsterneuerung von frühen hämatopoietischen Zellen und Mast-Zellen von Bedeutung.²⁴ Da die Überexpression von GATA-2 ebenfalls zu Störungen in der Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen führt,²⁷ ist das Expressionslevel von GATA-2 für die normale Funktion des Transkriptionsfaktors entscheidend. Weiterhin ist das Verhältnis der intrazellulären Expression von GATA-1 und GATA-2 für die Differenzierung der erythrozytären Vorläuferzellen von großer Bedeutung; GATA-2 aktiviert die Expression von GATA-1, während GATA-1 ab einem bestimmten Expressionslevel die Expression von GATA-2 reprimiert.²⁸ Ein ähnliche Abhängigkeit besteht zwischen GATA-2 und GATA-3. GATA-3 wird im sich entwickelnden Nervensystem der Maus exprimiert, wobei die Expression von GATA-2 abhängig ist.²³ Weiterhin wird GATA-3 in lymphoiden Zellen exprimiert und ist für die Entwicklung von T-Zellen und die Differenzierung von Th2-Helferzellen relevant.²⁹ Mausmutanten mit homozygoter *gata-3* Deletion (GATA-3^{-/-}) versterben aufgrund eines Noradrenalin-Mangels um den Tag e11.5.³⁰ Weiterhin wurden innere Blutungen, ein verzögertes Wachstum, Fehlbildungen des Nervensystems und das Ausbleiben der hepatischen Hämatopoese festgestellt sowie eine Aplasie der Nebenschilddrüse, eine Hypoplasie des Thymus und eine bilaterale Nierenagenese.³¹ Durch die Überexpression von GATA-3 in hämatopoietischen Stammzellen

(HSC) wird die Differenzierung in erythrozytäre und megakaryozytäre Zellreihen begünstigt, wobei deren Proliferationskapazität eingeschränkt wird.³²

Die zweite Gruppe der GATA-Faktoren, welche sich aus GATA-4, -5 und -6 zusammensetzt, ist primär an der Entwicklung und Differenzierung des Endoderms und des Mesoderms beteiligt und somit für die Entwicklung und Funktion von Herz, Darm, Lunge und Gonaden essentiell.^{7,33} In der embryonalen und fetalen Maus werden GATA-4 Transkripte in Herz, Darm, Lunge, Testis, Ovar, Leber, viszeralem und parietalem Endoderm exprimiert.^{2,34} In der adulten Maus wird GATA-4 in Herz, Ovar, Testis, Lunge, Leber und Dünndarm exprimiert.² Homozygote GATA-4 *knockout* Mausmutanten (GATA-4^{-/-}) versterben zwischen den Tagen e8.5 – e10.5. Ursache sind Störungen der Vaskulogenese im Dottersack, der ventralen Morphogenese und der Ausbildung des Herzschlauches.^{35,36} GATA-4^{-/-} ES-Zellen können sich zwar zu Kardiomyozyten entwickeln,³⁷ jedoch bleibt die Differenzierung des viszeralen Endoderms aus.³⁸ Eine Überexpression von GATA-4 in ES-Zellen induziert die Differenzierung des extraembryonalen Endoderms,³⁹ während eine GATA-4 Überexpression in embryonalen Karzinomzellen (P19-Zellen) die terminale Differenzierung zu sich kontrahierenden Kardiomyozyten induziert.⁴⁰

GATA-5 wird während der murinen Embryonalentwicklung in Allantois, Herz, Lunge, Urogenitaltrakt, Blase und Darmepithel exprimiert.⁴¹ In der adulten Maus wird GATA-5 in Dünndarm, Magen, Blase und Lunge exprimiert.⁴¹ GATA-5 nimmt in der Familie der GATA-Faktoren eine Sonderstellung ein, denn die homozygote Deletion von *gata-5* (GATA-5^{-/-}) ist nicht wie bei den anderen fünf GATA-Faktoren während der Embryonalentwicklung letal. Weibliche GATA-5^{-/-} Mutanten zeigen allerdings Anomalien im Urogenitaltrakt.⁴²

GATA-6 wird während der Ontogenese in Allantois, viszeralem Endoderm, Herz, Lunge, Urogenitaltrakt, glatter Gefäßmuskulatur, Magen, Dünndarm und Dickdarm exprimiert.^{34,41,43-45} Im adulten Stadium wird GATA-6 in Herz, Aorta, Magen, Dünndarm, Blase, Leber und Lunge exprimiert.³⁴ GATA-6 defiziente Mausmutanten (GATA-6^{-/-}) versterben zwischen den Tagen e5.5 und e7.5.⁴⁶ Ursache ist eine mangelhafte Ausbildung des viszeralen Endoderms und die daraus resultierenden Einschränkungen der extraembryonalen Differenzierung.⁴⁶ Weiterhin weisen GATA-6^{-/-} Mutanten eine gestörte Entwicklung des Neuroektoderms auf.⁴⁷ GATA-6^{-/-} ES-Zellen differenzieren nicht mehr zu Epithelzellen der Lunge.⁴⁶ Eine Überexpression von GATA-6 in ES-Zellen induziert die Differenzierung des extraembryonalen Endoderms.³⁹

1.3 Expression von GATA-4 im sich entwickelnden und adulten Organismus

GATA-4 ist für die transkriptionelle Regulation fetaler und embryonaler Entwicklungsprozesse essentiell. Bislang werden GATA-4 vor allem Funktionen während der Entwicklung des Herzens^{35,36} und der Gonaden zugesprochen.⁴⁸⁻⁵¹ Aber auch in anderen Organen ist GATA-4 von Bedeutung. So kann GATA-4 bereits in frühen Stadien im Kortex der fetalen Nebenniere des Menschen und der Maus nachgewiesen werden. Postnatal nimmt die GATA-4 Expression in der Nebennierenrinde ab.⁵² Weiterhin wird GATA-4 in Hepatoblasten der embryonalen und fetalen Leber exprimiert.⁵³ Während der weiteren Entwicklung wird die GATA-4 Expression im Hepatozyten herunterreguliert und ist später auf Endothelzellen der Gallengänge beschränkt.⁵³ GATA-4 wird ferner im sich entwickelnden Magen, in exokrinen Zellen des Pankreas sowie im Epithel des sich entwickelnden Gastrointestinaltrakts exprimiert.⁵⁴ In der embryonalen Lunge wurde GATA-4 in mesenchymalen Zellen nachgewiesen; in der späteren Entwicklung in Pulmonalarterie und Pulmonalvene.⁵⁵ Im Urogenitalsystem wurde eine GATA-4 Expression lediglich in den Gonaden festgestellt.⁵⁵ Im Bereich des Neuralrohrs der embryonalen Maus (e7.5) wurde GATA-4 ebenfalls nachgewiesen.⁵⁶ Aufgrund der essentiellen Bedeutung von GATA-4 für die Entwicklung des Herzens und der Gonaden soll im Folgenden die Bedeutung von GATA-4 für diese beiden Organsysteme detaillierter erläutert werden.

1.3.1 GATA-4 ist für die normale Herzentwicklung essentiell

GATA-4^{-/-} Mausmutanten versterben zwischen den Tagen e8.5 - e10.5 aufgrund einer gestörten Ausbildung des Herzschlauchs. Es kommt zur Bildung einer *Cardia Bifida*.^{35,36} Dabei handelt es sich um eine Anomalie, bei der die bilaterale Herzanlage des Embryos nicht fusioniert.⁵⁷ Ein solcher Phänotyp wird auch bei Hühnerembryonen festgestellt, welche mit gegen GATA-4 gerichteten Antisenseoligonukleotiden⁵⁸ oder *small interfering RNAs* (siRNA)⁵⁹ behandelt wurden. Aus GATA-4^{-/-} ES-Zellen entwickeln sich Embryonen mit einer fehlerhaften Ausbildung des Herzschlauchs und einem dünnwandigen Myokard,⁶⁰ wie tetraploide Komplementationsversuche⁶¹ zeigten. Dabei wurden GATA-4-defiziente ES-Zellen in künstlich erzeugte tetraploide Wildtyp-Blastozysten eingebracht.⁶⁰ Der Embryo entwickelt sich nur aus den genetisch manipulierten GATA-4^{-/-} ES-Zellen, während das extraembryonale Gewebe von Wildtypzellen gebildet wird. Dadurch können Defekte, die sich aufgrund einer reduzierten bzw. inhibierten GATA-4 Expression während der Entwicklung des extraembryonalen Endoderms ergeben, umgangen werden.⁶² Konditionelle GATA-4

knockout Mäuse, bei denen *gata-4* in frühen Entwicklungsstadien (e9.5) spezifisch im Herzen deletiert wurde, weisen ebenfalls ein dünnwandiges Myokard und eine gestörte Herzmuskelentwicklung auf.⁶³ Weiterhin liegt bei diesen Mutanten eine Hypoplasie des rechten Ventrikels vor.⁶³ In späteren Stadien führt die Deletion zu einer reduzierten Herzfunktion sowie dem Ausbleiben einer myokardialen Hypertrophie nach Druckbelastung.⁶⁴ Mausmutanten mit heterozygoter *gata-4* Deletion, bei denen das erste kodierende Exon (Exon II) deletiert wurde, zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten.^{35,65} Auch bei Mausmutanten mit einer hypomorphen *gata-4* Mutation, welche in einer 50%igen GATA-4-Reduktion resultiert, wird keine Beeinträchtigung des Herzens festgestellt.⁶⁵ Hingegen wurde kürzlich von einer GATA-4^{+/-} Mausmutante berichtet (ebenfalls Deletion des Exon II), welche bei einer 49%igen GATA-4 Reduktion direkt nach der Geburt verstirbt. Als Ursache werden neben Funktionsstörungen des Herzens Entwicklungsstörungen des Zwerchfells und der Lungen beschrieben. Der abweichende Phänotyp wird mit der Verwendung eines reinen C57BL/6-Stammes begründet;⁶⁶ andere Untersuchungen basieren auf *mixed background* Mäusen (Tabelle 1).^{35,36,65} Der genetische Hintergrund der Versuchsmäuse kann einen erheblichen Einfluss auf den Phänotyp haben.^{67,68} Bei einer weiteren Mausmutante wurde nach heterozygoter Deletion des zweiten *gata-4* Exons eine 58%ige Reduktion der GATA-4 Expression festgestellt. Diese Mutanten weisen eine gestörte Kontraktilität des Myokards auf.⁶⁹ Mausmutanten mit einer 70%igen GATA-4 Reduktion versterben zwischen den Tagen e13.5 und e16.5 aufgrund verschiedener Defekte am Herzen.⁶⁵ Somit scheint das GATA-4 Expressionslevel, welches für die Entwicklung und Funktion des Herzens essentiell ist, zwischen 50 % und 70 % zu liegen. Tabelle 1 fasst alle derzeit beschriebenen GATA-4 Mausmutanten mit ihrem kardialen Phänotypen zusammen.

Auch beim Menschen ist eine GATA-4 Haploinsuffizienz aufgrund von Mutationen im *gata-4* Locus mit angeborenen Herzfehlern assoziiert, die sich unter anderem als *Cardia Bifida* manifestieren.⁷⁰⁻⁷³

Die Relevanz von GATA-4 für die Herzentwicklung zeigt sich weiterhin durch *in vitro* Studien. GATA-4 ist essentiell für die Differenzierung der embryonalen Karzinomzellen P19, welche sich durch Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in sich kontrahierende Kardiomyozyten differenzieren lassen.^{40,74} GATA-4 defiziente P19-Zellen sind nicht mehr durch DMSO differenzierbar und werden apoptotisch.⁴⁰ Diese Defekte scheinen zellunabhängig zu sein, da eine kardiale Differenzierung in GATA-4^{-/-} ES-Zellen ebenfalls nicht mehr erfolgen kann.⁷⁵ Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass GATA-4 für die terminale Differenzierung von Kardiomyozyten nicht von Bedeutung ist.⁵⁴

Tabelle 1: Übersicht derzeit publizierter GATA-4 Mausmutanten. k.A.: keine Angabe, m: mRNA, P: Protein, PGK: Phosphoglyceratkinase, Neo: Neomycin, G4-Exp.: GATA-4 Expression, FOG-2: *Friend of GATA*, dpc: *day post coitum*.

Maus Mutante	Maus Background	genetische Modifikation	G4-Exp.	kardialer Phänotyp	Referenz
GATA4 ^{+/-}	C57BL/6/CD1	heterozygoter Austausch des Exons II durch PGK-Neo-Kassette	k.A.	normale Entwicklung	Kuo et al., 1997 ³⁵
GATA4 ^{-/-}	C57BL/6/CD1	homozygoter Austausch des Exons II durch PGK-Neo-Kassette	0 % ^m	gestörte Ausbildung des Herzschlauchs embryonal letal: 8.5 – 10.5 dpc	Kuo et al., 1997 ³⁵
GATA4 ^{-/-}	C57BL/6/Sv129	homozygoter Austausch aller kodierenden Exons durch Neo-Kassette	0 % ^m	gestörte Ausbildung des Herzschlauchs embryonal letal: 9.5 dpc	Molkentin et al., 1997 ³⁶
GATA-4 ^{+/+ki}	C57BL/6	heterozygote V217G Mutation im N-terminalen Finger, welche die Interaktion mit FOG-2 stört	100 % ^P	normale Entwicklung	Crispino et al., 2001 ⁷⁶
GATA-4 ^{ki/ki}	C57BL/6	homozygote V217G Mutation im N-terminalen Finger, welche die Interaktion mit FOG-2 stört	100 % ^P	gestörte Herzfunktion embryonal letal: 12.5 dpc	Crispino et al., 2001 ⁷⁶
GATA4 ^{-/-}	C57BL/6/SJLF ₁	homozygote Deletion von Exon III, IV und V (enthalten beide Zinkfinger-Bindungsdomänen und Kern-Lokalisations Signal)	0 % ^m	gestörte Ausbildung des Herzschlauchs und Myokardhypoplasie embryonal letal: 9.5 dpc	Watt et al., 2004 ⁶⁰
GATA4 ^{ΔA}	129/C57BL/6	homozygote Deletion des Exons II	k.A.	gestörte ventrale Herzfaltung embryonal letal: 10.5 dpc	Pu et al., 2004 ⁶⁵
GATA4 ^{lox/lox}	129/C57BL/6	hypomorphe Mutation: homozygote loxP-Integration in der 5'-untranslatierten Region des Exons II	100 % ^m 50 % ^P	normale Entwicklung	Pu et al., 2004 ⁶⁵
GATA4 ^{H/H}	129/C57BL/6	hypomorphe Mutation: homozygote loxP-Integration in der 5'-untranslatierten Region des Exons II und Neo-Kassette im Intron II	50 % ^m 30 % ^P	gestörte Herzfunktion embryonal letal: 13.5 – 16.5 dpc	Pu et al., 2004 ⁶⁵
G4 ^{NK}	129/C57BL/6	Herz-spezifische Deletion des Exons II in frühen Entwicklungsstadien (konditionelle homozygote Deletion durch Nkx-2.5 Promotor induzierte Cre-Rekombinase)	10 % ^P	gestörte Herzentwicklung, Myokardhypoplasie und insb. des rechten Ventrikels embryonal letal: 11.5 dpc	Zeisberg et al., 2005 ⁶³
G4 ^{MC}	129/C57BL/6	Herz-spezifische Deletion des Exons II in frühen Entwicklungsstadien (konditionelle homozygote Deletion durch MHC-Promotor induzierte Cre-Rekombinase)	k.A.	gestörte Herzfunktion und Myokardhypoplasie embryonal letal: 14.5 dpc	Zeisberg et al., 2005 ⁶³
GATA4 ^{n/n}	SV129/CD1	homozygote loxP-Integration vor dem Exon III und nach dem Exon V	100 % ^P	normale Entwicklung	Oka et al., 2006 ⁶⁴
GATA4 ^{n/nαMHC-Cre}	SV129/CD1	Herz-spezifische Deletion der Exons III bis V in späten Entwicklungsstadien (12. bis 24. Wochen)	30 % ^P	reduzierte Herzfunktion und keine Hypertrophie nach Druckbelastung	Oka et al., 2006 ⁶⁴
GATA4 ^{n/nβMHC-Cre}	SV129/CD1	Herz-spezifische Deletion der Exons III bis V in späten Entwicklungsstadien (12. bis 24. Wochen)	5 % ^P	reduzierte Herzfunktion und keine Hypertrophie nach Druckbelastung, Dilatation der Ventrikel	Oka et al., 2006 ⁶⁴
GATA4 ^{WT/ex2}	F ₁ C6/BL/6/JFVB/N	heterozygote Deletion des Exons II	48 % ^m 42 % ^P	leichte systolische und diastolische Dysfunktionen sowie Hypoplasie des Herzens	Bisping et al., 2006 ⁶⁹
GATA4 ^{+Δex2}	C57BL/6	heterozygote Deletion des Exons II	51 % ^m	Entwicklungsstörung des Herzens, letal unmittelbar nach Geburt	Jay et al., 2006 ⁷⁷

Die Relevanz von GATA-4 für die kardiale Entwicklung wird weiterhin durch Studien bestätigt, bei denen die Überexpression von GATA-4 *in vitro* und *in vivo* in einer Hypertrophie von Kardiomyozyten bzw. des Myokards resultiert.⁷⁸

1.3.2 Keine Fortpflanzung ohne GATA-4?

GATA-4 ist ebenfalls für die Regulation von Genen, welche bei Fortpflanzung und Entwicklung eine Rolle spielen, essentiell. GATA-4 Transkripte und Proteine werden in den sich entwickelnden Gonaden der Maus exprimiert.^{50,79,80} Postnatal wird GATA-4 hingegen nur noch in Sertoli- und Leydig-Zellen des Hodens der Maus exprimiert.^{50,79} *In vivo* Untersuchungen zur Funktion von GATA-4 in den Gonaden sind aufgrund der embryonalen Letalität (e9.0) der GATA-4^{-/-} Mausmutanten nicht möglich.³⁶ Zwei unterschiedliche Mausmodelle erlauben es jedoch, die Funktion von GATA-4 auch zu späteren Zeitpunkten zu untersuchen: Die GATA-4^{ki/ki} und die Fog2^{-/-} Mausmutante.⁸¹ Die GATA-4^{ki/ki} Mausmutante weist ein GATA-4 *knock-in* Allel auf, welches nicht mit dem Kofaktor FOG-2 interagieren kann. In beiden männlichen Mausmutanten ist der Samenstrang nicht entwickelt und die Synthese von Testosteron bleibt aus. Bei den entsprechenden weiblichen Mausmutanten wurden bislang keine Auffälligkeiten der Gonaden beschrieben, was vermuten lässt, dass die Interaktion von FOG-2 und GATA-4 nur für die Entwicklung der männlichen Gonaden essentiell ist.⁸¹ Da beide Mausmutanten um den Tag e13.5 aufgrund von Fehlbildungen des Herzens versterben,^{76,81} ist die Funktion von GATA-4 im ausgereiften Ovar nicht zu beurteilen.

Weiterhin weisen Untersuchungen darauf hin, dass GATA-4 an der Aktivierung und Regulation von geschlechtsspezifischen Genen beteiligt ist.⁸² So wurde in Leydig- und Granulosa-Zellen die Aktivierung des *Inhibin-α* Promotors durch GATA-4 gezeigt.^{83,84} *Inhibin-α* ist für die Funktion des Ovars bei Säugern von großer Bedeutung. Reporter-Experimente zeigen, dass GATA-4 zudem die Promotoren von *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR),⁵¹ *aromatase (cyp19)*,⁸⁵ *Cytochrome P450 (CYP11A1)*,⁸⁶ *Müllerian inhibiting substance* (MIS) und *steroidogenic factor-1* (SF-1) aktiviert. Diese Gene werden ebenfalls in den Gonaden exprimiert und sind für die Entwicklung und Funktion der männlichen und weiblichen Keimdrüsen von Bedeutung.⁸⁷

Ferner wird GATA-4 als Aktivator des *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) beschrieben,⁸⁸ wodurch GATA-4 auch indirekt für die Fortpflanzung von Bedeutung ist. GnRH wird im Hypothalamus synthetisiert und ins Blut sezerniert. Anschließend induziert GnRH die Freisetzung von luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH),⁸⁹ wodurch in den Gonaden Sexualhormone wie beispielsweise Testosteron und Östrogen ausgeschüttet werden. Bemerkenswert ist, dass während der Steroidsynthese im Ovar der StAR-Promotor nicht nur durch GATA-4⁹⁰, sondern auch durch FSH direkt aktiviert wird.⁵¹

1.3.3 GATA-4 und Tumorgenese

GATA-4 kann als kritischer Faktor für die Tumorgenese angesehen werden, da sowohl eine verstärkte als auch eine reduzierte GATA-4 Expression an der Ausbildung von diversen Tumoren beteiligt sein kann. So zeigen beispielsweise Magen- und Lungentumore eine reduzierte GATA-4 Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe.^{91,92} Ebenso wird eine verminderte oder ausbleibende GATA-4 Expression mit der Ausbildung von Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht.⁹³⁻⁹⁵ Verschiedene humane Ovarialkarzinom-Zelllinien zeigen nur eine geringe oder keine GATA-4 Expression.⁹⁵ Zudem weisen einige an Eierstockkrebs erkrankte Patientinnen eine Mutation im kurzen Arm des Chromosoms 8 auf. Da GATA-4 in der Region 8p23.1 lokalisiert ist, könnte diese Mutation mit dem Verlust der GATA-4 Expression einhergehen.⁹⁴

Neben Mutationen wird auch die Hypermethylierung der *gata-4* Promotorregion als Ursache einer verminderten GATA-4 Expression während der Tumorgenese diskutiert. In primären Magenkarzinomen⁹¹ sowie Tumorzelllinien aus Dickdarm,⁹¹ Speiseröhre⁹⁶ und Lunge⁹⁷ wurden Hypermethylierungen des *gata-4* Promotors identifiziert. Auch in humanen Eierstockkrebslinien wurde eine verstärkte Methylierung der *gata-4* Promotorregion beschrieben.⁹⁵

Im Gegensatz zu diesen Studien gehen andere Untersuchungen von einer verstärkten GATA-4 Expression in der Tumorgenese aus. Besonders gegensätzlich ist, dass bei Granulosazell- und Thekazell-Tumoren des Ovars die GATA-4 Expression deutlich zunimmt.^{98,99} Ferner wird in Tumoren der Nebennierenrinde¹⁰⁰ oder der Speiseröhre¹⁰¹ von einer verstärkten GATA-4 Expression berichtet.¹⁰¹ Weiterhin wurde eine verstärkte GATA-4 Expression in Sertoli- und Leydig-Zelltumoren des Hodens festgestellt; von Keimzellen ausgehende Hodentumore zeigen hingegen keine GATA-4 Expression.¹⁰² Eine verstärkte GATA-4 Expression ist ebenfalls in Dottersacktumoren und sich daraus entwickelnden Teratomen festzustellen, während in ausdifferenzierten Teratomen keine GATA-4 Expression nachweisbar ist.¹⁰³

Obwohl gegenwärtig die molekularen Zusammenhänge zwischen veränderter GATA-4 Expression und Tumorgenese nicht charakterisiert sind, wird GATA-4 als Tumorsuppressorgen diskutiert.⁹¹ Dafür spricht, dass GATA-4 die Expression von MIS⁵⁰ und *Inhibin- α* ⁸³ direkt reguliert (vgl. 1.3.2), welche ebenfalls als Tumorsuppressorgene der TGF- β Superfamilie identifiziert sind.

1.4 Die Regulation von GATA-4

Die vielseitigen Funktionen von GATA-4 (siehe 1.3) erfordern ein komplexes Netzwerk von Regulationsmechanismen. Hierbei kann sowohl die Expression von GATA-4 selbst als auch seine Aktivierung durch posttranslationale Modifikation reguliert werden. So führt beispielsweise ein Mangel an Vitamin A in Wachtel- und Hühner-Embryonen zu einer reduzierten Expression von GATA-4. Die Embryonen weisen eine gestörte Entwicklung des Herzens und des Darmrohrs auf.¹⁰⁴ Durch die Applikation von *retinoic acid* (RA) steigt das Expressionslevel von GATA-4 wieder an, wodurch die Entwicklungsstörungen behoben werden können. Eine Behandlung von P19-Zellen¹⁰⁵ und F9-Zellen² (embryonale Karzinomzellen) mit RA resultiert ebenfalls in einem Anstieg der GATA-4 Expression. Mausmutanten, welche für den *retinoic acid receptor* (RXR α) defizient (RXR $\alpha^{-/-}$) sind, zeigen eine verminderte GATA-4 Expression im Vergleich zum Wildtyp.¹⁰⁶ *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) zeigen, dass sich die GATA-4/DNA-Bindung in Kardiomyozyten durch RA verstärken lässt.¹⁰⁷ Diese Daten deuten auf eine positive Regulation von GATA-4 durch RA hin. Ein weiterer positiver Regulator von GATA-4 ist GATA-6. In GATA-6 defizienten Mausmutanten ist die Expression von GATA-4 herunterreguliert.⁴⁶ Auf der anderen Seite nimmt die GATA-6 Expression in GATA-4 defizienten Mausmutanten zu, was für eine wechselseitige Regulation dieser beiden Faktoren spricht.^{35,36,46}

Weiterhin lässt sich die Aktivität von GATA-4 durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Sumoylierung, verstärken. Die Phosphorylierung von GATA-4 erfolgt über die Signalwege der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)¹⁰⁸⁻¹¹¹ und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK).¹¹⁰ Dabei wird GATA-4 in Position Serin 105 phosphoryliert, was zu einer verstärkten GATA-4/DNA-Bindung führt.^{109,110} Weiterhin kann die Phosphorylierung von GATA-4 durch Druckbelastung des Herzens,¹¹² *isoproterenol* (ISO),¹¹³ *phenylephrine* (PE),^{113,114} *endothelin-1* (ET-1)^{114,115}, *angiotensin-II* (Ang-II),¹¹⁶ *hepatocyte growth factor* (HGF)^{109,117} und RhoA¹¹⁸ induziert werden. In primären Kardiomyozyten wurde hingegen gezeigt, dass die Phosphorylierung von GATA-4 auch zur Reduktion der GATA-4-abhängigen Transkription führen kann. Dabei kommt es zunächst durch die *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK-3 β) zur Phosphorylierung des N-Terminus von GATA-4. Diese Modifikation induziert den Crm1-vermittelten Export von GATA-4 aus dem Zellkern. So entsteht im Nukleus ein GATA-4-Defizit, welches mit einer reduzierten Transkription von GATA-4 Zielgenen einhergeht.¹¹⁹ Die Aktivierung von GATA-4 kann nicht nur durch Phosphorylierung, sondern auch durch Acetylierung erfolgen. Hierbei wird

GATA-4 durch die *histone-acetyltransferase p300* acetyliert, wodurch es ebenfalls zur verstärkten GATA-4/DNA Bindung kommt.¹²⁰ Ferner wird die transkriptionelle Aktivität von GATA-4 durch Sumoylierung verstärkt. Dabei wird GATA-4 an Position Lysin 366 durch *small ubiquitin-like modifier-1* (SUMO-1) modifiziert, wodurch es zur verstärkten Transkription von GATA-4 Zielgenen wie *arterial natriuretic factor (anf)* und *α -myosin heavy-chain (α -mhc)* kommt.¹²¹

Neben diesen physiologischen Regulatoren lässt sich GATA-4 auch durch chemische Agentien regulieren. Das Chemotherapeutikum Doxorubicin supprimiert die Aktivität von GATA-4 durch oxidativen Stress.¹²² Dabei werden unter anderem die Cysteine von Zinkfingerproteinen oxidiert, wodurch die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur gestört wird.¹²³ Untersuchungen in murinen Kardiomyozyten zeigen, dass Doxorubicin die GATA-4/DNA-Bindungsaktivität *in vitro* reduziert.¹²² Durch die oxidativen Radikale werden zudem transkriptionelle und translationelle Regulationsprozesse teilweise inhibiert.¹²⁴ Dadurch weisen mit Doxorubicin-behandelte murine Kardiomyozyten ein generell reduziertes mRNA und Protein Expressionslevel auf.^{122,125} Die Behandlung von murinen Kardiomyozyten mit Doxorubicin führt aufgrund des Mangels an aktivem GATA-4 zur Apoptose.¹²² Auch *in vivo* führt die Applikation von Doxorubicin bei heterozygoten GATA-4 *knock-out* Mäusen (GATA-4^{+/-}) zur Apoptose der Kardiomyozyten.¹²⁵

Auf einen vergleichbaren Mechanismus könnte die Zunahme von GATA-4 Transkripten nach Stimulation von P19-Zellen mit DMSO zurückzuführen sein.^{74,126} Hierbei könnte DMSO als Antioxidationsmittel wirken,¹²⁷ welches einen Teil des durch die Atmungskette freigesetzten radikalen Sauerstoffs bindet.¹²⁸ Werden P19-Zellen mit DMSO stimuliert, so kommt es bereits nach 24 Stunden zu einer deutlichen Zunahme von GATA-4 Transkripten.^{74,126} Nach ca. sechs Tagen differenzieren die Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten, und die Transkripte weiterer herzspezifischer Gene (*anf*, *brain-type natriuretic peptide (bnp)*, *α -mhc* und *β -myosin heavy-chain (β -mhc)*) werden exprimiert.⁷⁴

1.5 Die Aktivierung von Zielgenen durch GATA-4 und seine Kofaktoren

GATA-4 aktiviert die Transkription zahlreicher Gene (Tabelle 2), die hauptsächlich an der Entwicklung und Funktion des Herzens und des Genitaltrakts beteiligt sind. Aufgrund der Komplexität wird in diesem Abschnitt lediglich eine Auswahl an Zielgenen und Kofaktoren vorgestellt. Alle derzeit bekannten GATA-4 Zielgene sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zielgene von GATA-4 mit ihren Expressionsorten und Funktion. Weiterhin sind die derzeit bekannten Kofaktoren bzw. Interaktionspartner von GATA-4 aufgelistet, die im Zusammenspiel mit GATA-4 die Promotoren der Zielgene (teilweise synergistisch) aktivieren (↑) oder supprimieren(↓); im Detail bitte den angegebenen Referenzen entnehmen. (*) Die Expressionsorte und Funktionen beziehen sich auf die gegenwärtigen Erkenntnisse unter Berücksichtigung der angegebenen Referenz(en). Die dabei durchgeführten Untersuchungen zur Expression und Funktion des Zielgens müssen nicht zwingend in den genannten Arbeiten durchgeführt worden sein; in jedem Fall verweisen diese jedoch auf die Originalarbeiten.

Zielgen	Expressionsort*	Funktion*	Kofaktor
<i>A1 adenosine receptor (A1AR)</i> ¹²⁹	Gehirn Herz	neuronale Funktionen Kardioprotektion	↑ <i>Nkx-2.5</i> ¹³⁰
<i>Aromatase (Cyp19)</i> ⁸⁷	Gehirn Gonaden	Steroidhormonbiosynthese	
<i>α-myosin heavy-chain (α-MHC)</i> ^{107,131}	Herz	Kontraktion des Herzens	↑ dHAND ¹³² ↓ FOG-2 ¹³³ ↑ MEF2 ¹³⁴ ↑ <i>Nkx-2.5</i> ¹¹ ↑ p300 ¹³⁵ ↑ SRF ¹³⁶
<i>Angiotensin II type Iα receptor (AT1aR)</i> ¹³⁷	Herz	wird induziert nach Druckbelastung des Herzens, Volumen-Regulation	↑ AP-1 ¹³⁷
<i>Atrial natriuretic factor (ANF)</i> ¹³⁸	Herz	Regulation des Blutvolumens und Blutdrucks	↑ c-FOS ¹³⁹ ↑ dHAND ¹³² ↓ FOG-2 ¹³³ ↑ GATA-6 ¹³¹ ↑ MEF2 ¹³⁴ ↑ <i>Nkx-2.5</i> ^{140,141} ↑ p300 ¹³⁵ ↓ RXRα ¹⁴² ↑ SRF ¹³⁸ ? ↑ TBX-5 ⁷²
<i>β-myosin heavy-chain (β-MHC)</i> ¹³¹	Herz	Kontraktion der Kardiomyozyten	↑ p300 ¹³⁵
<i>Bone morphogenic protein 4 (BMP-4)</i> ⁵³	ubiquitär	induziert Bildung von Knorpel und Knochen, Neurogenese	
<i>Brain natriuretic peptide (BNP)</i> ^{131,138,143}	Herz	Regulation des Blutvolumens und Blutdrucks	↑ Calcineurin ¹⁴⁴ ↑ CBP ¹⁴⁵ ↑ dHAND ¹³² ↓ FOG-2 ¹³³ ↑ GATA-6 ¹³¹ ↑ KLF13 ¹⁴⁶ ↑ MEF2 ¹³⁴ ↑ NFAT-3 ¹⁴⁴ ↑ NFATc4 ¹⁴⁴ ↑ <i>Nkx-2.5</i> ¹¹ ↑ SRF ¹³⁶ ↑ YY1 ¹⁴⁵
<i>B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl-2)</i> ¹⁴⁷	Herz	anti-apoptotisches Gen Kardioprotektion	↑ KLF13 ¹⁴⁸
<i>Cardiac α actin (αCA)</i> ¹⁴⁹	Herz	Strukturprotein Ausbildung des Zytoskelett	↑ <i>Nkx-2.5</i> ¹⁴⁹ ↑ SRF ^{149,150}
<i>Cardiac-restricted ankyrin repeat protein (CARP)</i> ¹⁵¹	Herz Skelettmuskel	Herzentwicklung	↑ <i>Nkx-2.5</i> ¹⁵¹ ↑ TEF-1 ¹⁵²
<i>Cardiac troponin I (cTN-I)</i> ¹³¹	Herz	Kontraktion der Kardiomyozyten	
<i>Cardiac troponin C (cTnC)</i> ¹⁵³	Herz	Kontraktion der Kardiomyozyten	
<i>cardiac troponin T (cTnT)</i> ¹⁵⁴	Herz	Kontraktion der Kardiomyozyten	
<i>c-fos</i> ¹⁵⁵	ubiquitär	Transkriptionsfaktor, involviert in zelluläre Differenzierung und Proliferation	↑ SRF ¹⁵⁵
<i>Corin</i> ¹⁵⁶	Herz	Konversion pro-ANP → ANP und pro-BNP → BNP	
<i>Cytochrome P450 (CYP11A1)</i> ⁸⁶	Ovarien	Freisetzung von Sexualhormonen	
<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt-1)</i> ⁴⁹	Gonaden	Differenzierung Hodengewebe	
<i>Endothelin-1 (ET-1)</i> ¹¹⁴	Herz	Kontraktion und Entwicklung des Herzens	
<i>Erythropoietin (EPO)</i> ¹⁵⁷	fetal: Leber adult: Niere	Hormon, Induktion Erythropoiese	
<i>Lactase</i> ¹⁵⁸	Darm	Abbau von Laktose	
<i>Liver fatty acid binding protein (Fabpl)</i> ¹⁵⁹	Darm Leber	Bindung freie Fettsäuren, intrazellulärer Lipidtransport	↑ HNF-1α ¹⁵⁹
<i>Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)</i> ¹⁶⁰	Gehirn	Freisetzung von Sexualhormonen	

<i>Inhibin-α</i> ^{83,84}	Ovarien	Freisetzung von Sexualhormonen	
<i>Intestinal fatty acid binding protein (IFABP)</i> ¹⁶¹	Darm	Bindung freie Fettsäuren, intrazellulärer Lipidtransport	
<i>Interleukin-5 (IL-5)</i> ¹⁶²	T-Lymphozyten	Immunsystem	
<i>Müllerian inhibiting substance (MIS)</i> ⁸⁷	Testis	Rückgang der Müller-Gänge Entwicklung des Hodens	↓ FOG-2 ¹⁶³ ↑ SF-1 ¹⁶³
<i>Myosin light chain 1/3 (MLC1/3)</i> ¹⁶⁴	Herz	Kontraktion der Kardiomyozyten	
<i>N-cadherin</i> ⁵⁹	Herz	Herzentwicklung	
<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 (NCX1)</i> ^{165,166}	Herz	Kalziumhaushalt des Herzens Kontraktion der Kardiomyozyten	↑ SRF ¹⁶⁵
<i>Nkx-2.5</i> ^{167,168}	Herz	Herzentwicklung	↑ Smad1/4 ¹⁶⁹
<i>Skeletal α-actin (αSA)</i> ¹⁵⁵	Herz	Strukturprotein des Herzens	↑ SRF ¹⁵⁵
<i>Slow myosin heavy chain (MyHC)</i> ¹⁷⁰	Herz	Herzentwicklung Kontraktion des Herzens	
<i>Smooth muscle α-actin (αSm)</i> ¹⁵⁵	glatte Muskulatur	Strukturprotein	↑ SRF ¹⁵⁵
<i>Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i> ⁸⁷	Gonaden	Steroidsynthese	↑ C/EBP β ⁹⁰ ↓ FOG-2 ⁹⁰ ↑ p300/CBP ⁹⁰ ↓ SF-1 ⁹
<i>Steroidogenic factor-1 (SF-1)</i> ⁸⁷	Gonaden	Entwicklung und Funktion der Gonaden	
<i>Sucrase-isomaltase (SI)</i> ¹⁷¹	Darm	Darmentwicklung	↑ Cdx-2 ¹⁷¹ ↑ HNF-1 α ¹⁷¹

Zwei der am ausführlichsten untersuchten GATA-4 Zielgene sind *anf* und das *bnp*. ANF und BNP¹³⁸ werden bereits in frühen Entwicklungsstadien des Herzens exprimiert.^{138,172,173} Die Aktivierung des *anf*-Promotors erfolgt durch GATA-4^{11,141} im Zusammenspiel mit *Cardiac-specific homeobox* (NKX-2.5),^{140,141} T-Box-5 (Tbx5)⁷² bzw. *Heart-and neural crest derivatives-expressed protein 2* (dHand)¹³². Bei dieser Synergie ist GATA-4 essentiell, da die Suppression von GATA-4 durch *Antisense-RNA* in einer verminderten Expression von ANF resultiert.¹³¹ Der *bnp*-Promotor lässt sich durch das Zusammenspiel von GATA-4, *Yin-Yang-1* (YY1) und *cAMP responsive element binding protein* (CREB) *binding protein* (CBP) aktivieren.¹⁴⁵ Weiterhin wird eine synergistische Aktivierung des *bnp*-Promotors durch GATA-4 und dHAND¹³² bzw. *Krüppel-like transcription factor 13* (KLF13)¹⁴⁶ beschrieben.

Einer der am ausführlichsten beschriebenen Kofaktoren von GATA-4 ist *friend of gata* (FOG-2). FOG-2 wird u.a. in Hoden¹⁷⁴, Herz¹³³ und Gehirn¹³³ exprimiert. Die Interaktion von FOG-2 mit dem N-terminalen Finger von GATA-4¹⁷⁵ resultiert überwiegend in einer verminderten Expression der GATA-4 Zielgene (*anf*, *bnp*, *α -mhc*, *mis*, *star*, *inhibin- α*).^{133,174-176} In COS-Zellen wurde zwar von einer synergistischen Koaktivierung des *α -mhc*-Promotors durch FOG-2 und GATA-4 berichtet;¹³³ dies konnte jedoch in primären Kardiomyozyten nicht bestätigt werden. Die Autoren vermuten, dass das jeweilige Promotor/Zellsystem für die FOG-2 vermittelte Suppression bzw. Aktivierung verantwortlich ist. FOG-2 defiziente Mausmutanten (FOG-2^{-/-}) weisen eine gestörte Herzentwicklung auf und sind embryonal letal.^{177,178} Somit ist davon auszugehen, dass FOG-2 für die Herzentwicklung von Bedeutung

ist. Auch während der Gonadendifferenzierung und der Geschlechtsbestimmung ist die Interaktion von FOG-2 mit GATA-4 essentiell, wie Untersuchungen an FOG-2^{-/-} Mausmutanten gezeigt haben (siehe Kapitel 1.3.2).⁸¹

1.6 Das regulatorische Netzwerk um GATA-4

Die Regulation von GATA-4 und die damit verbundene Regulation der GATA-4 Zielgene stellt sich als komplexes Netzwerk dar. Dabei haben Rückkopplungsmechanismen, das (synergistische) Zusammenspiel von GATA-4 mit seinen Kofaktoren (vgl. Tabelle 2) und kompensatorische Effekte eine erhebliche Relevanz. Anhand von BMP-4, Nkx-2.5 und GATA-6 sollen solche Vernetzungen exemplarisch vorgestellt werden:

GATA-4 und BMP-4 weisen während der Embryogenese in Zellen des extraembryonalen Mesoderms des Harnsacks und des präkardialen Mesoderms ähnliche Expressionsmuster auf.⁵³ Der *bmp-4* Promotor enthält zwei konservierte GATA-Elemente und lässt sich dosisabhängig durch GATA-4 aktivieren.⁵³ Da die Inhibition von BMP-4 die GATA-4 Expression supprimiert¹⁷⁹ und die GATA-4 Expression durch BMP-4 induziert werden kann,¹⁸⁰ wird vermutet, dass sich BMP-4 und GATA-4 über einen positiven Rückkopplungsmechanismus gegenseitig regulieren.⁵³ P19-Zellen, bei denen BMP-4 durch Noggin (BMP Antagonist) inhibiert wird, verlieren die Fähigkeit zur Differenzierung in einen kardialen Phänotyp. Werden in diesen Zellen GATA-4 und der Kofaktor Nkx-2.5 überexprimiert, so erlangen P19-Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung in myokardiale Zellen zurück.¹⁸¹ Weiterhin lässt sich der *nkx-2.5* Promotor durch BMPs aktivieren,^{180,182} was vermuten lässt, dass es sich bei Nkx-2.5 um einen *downstream* Effektor im BMP-Signalweg handelt.¹⁸¹ Nkx-2.5 ist einer der frühesten Marker während der Entwicklung des Myokards und wird auch im adulten Herzen exprimiert.¹⁸³ Nkx-2.5 und GATA-4 weisen identische Expressionsmuster¹⁵⁰ auf. Es wurde gezeigt, dass die Nkx-2.5 Expression durch GATA-4-abhängige *Enhancer* reguliert wird.^{167,168} Die Aktivierung kardialer Gene (wie beispielsweise *alar*)¹²⁹ kann über die kooperative Interaktion von GATA-4¹⁸⁴ und Nkx-2.5 mit den im Promotor lokalisierten GATA- bzw. NKE-Elementen erfolgen.¹³⁰ Dabei können weitere Faktoren, wie beispielsweise SRF¹⁵⁵ bei der Aktivierung des *aca*-Promotors^{149,150} eine wichtige Rolle spielen (Tabelle 2). Da GATA-4^{-/-} Mausmutanten keine verminderte Nkx-2.5 Expression, jedoch eine verstärkte Expression von GATA-6 aufweisen,³⁶ wird vermutet, dass der GATA-4-abhängige *Enhancer* im *nkx-2.5* Promotor durch GATA-6 kompensatorisch aktiviert wird.

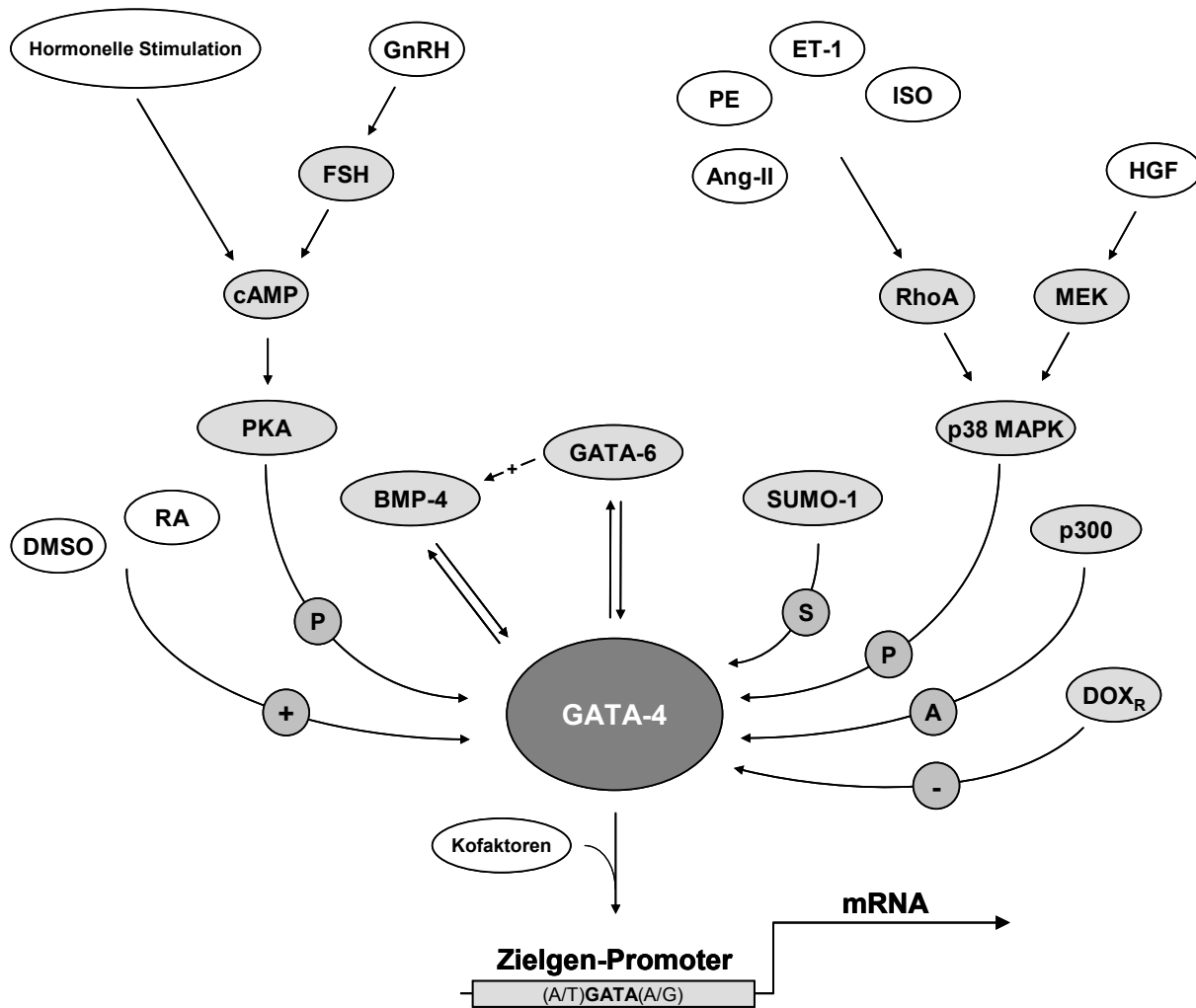


Abbildung 2: Das regulatorische Netzwerk um GATA-4. Dargestellt ist eine Auswahl der in der Arbeit beschriebenen Aktivierungs- und Rückkopplungs-Mechanismen von GATA-4. Ang-II: Angiotensin-II,¹¹⁶ BMP-4: Bone Morphogenic Protein 4,⁵³ DMSO: Dimethylsulfoxid,^{74,126} Dox_R: Doxorubicin,¹²² ET-1: Endothelin-1,^{114,115} FSH: Follikel-stimulierendes Hormon,⁸⁹ GATA-6,³⁶ GnRH: Gonadotropin-releasing hormone,⁸⁸ HGF: Hepatocyte Growth Factor,^{109,117} p300: Histon-Acetyltransferase p300,¹²⁰ ISO: Isoproterenol,¹¹³ MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase / extrazellulär regulierte Kinase, p38 MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase,¹¹⁰ PE: Phenylephrine,^{113,114} PKA: Proteinkinase A, RA: retinoic acid,¹⁰⁵ RhoA,¹¹⁸ SUMO-1: Small Ubiquitin-like modifier-1,¹²¹ cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, (P): Phosphorylierung, (A): Acetylierung, (S): Sumoylierung, (+): Stimulation der GATA-4 Expression, (-): Suppression der GATA-4 Expression.

Ferner wurde gezeigt, dass sich die GATA-4 Expression durch die Überlebens-Faktoren *hepatocyte growth factor* (HGF)^{109,117} und *endothelin-1* (ET-1)¹¹⁵ verstärken lässt. Dabei spielt die durch HGF und ET-1 induzierte Phosphorylierung^{109,115} von GATA-4 eine wichtige Rolle. Diese verstärkt die Bindung zwischen GATA-4 und dem *bcl-2*-Promotor,¹⁸⁵ wodurch dieser sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiviert wird.¹⁴⁷ Werden neonatale Kardiomyozyten der Ratte durch Doxorubicin toxisch geschädigt, führt dies über ein reduziertes GATA-4 Level zur verminderten Expression von Bcl-2. Ein identischer Effekt auf Bcl-2 wird durch RNAi-induzierte Reduktion von GATA-4 beobachtet. In transgenen Mäusen, bei denen GATA-4 im

Herzen überexprimiert wird,⁷⁸ werden nach Applikation von Doxorubicin keine Veränderungen der Bcl-2 Expression festgestellt. Aufgrund der direkten Regulation von Bcl-2 nimmt GATA-4 erheblichen Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose kardialer Zellen, weshalb GATA-4 als myokardial-protektiver Faktor bezeichnet wird.^{147,186}

In den vorherigen Kapiteln wurden die Regulationsmechanismen der GATA-4 Expression ausführlich beschrieben. Es wurde berichtet, dass das Expressionslevel von GATA-4 für die Entwicklung der embryonalen Maus als besonders kritisch zu sehen ist (siehe 1.3.1). Aufgrund der embryonalen Letalität GATA-4 defizienter Mausmutanten war es jedoch bisher nicht möglich, die Auswirkungen einer starken GATA-4 Suppression (> 50 %) in der adulten Maus (vgl. Tabelle 1) zu untersuchen. Viele Zielgene von GATA-4 sind jedoch auch im adulten Organismus relevant. Dies erlaubt die Hypothese, dass GATA-4 auch nach der embryonalen und fetalen Entwicklung von Bedeutung ist.

Um diese Frage zu untersuchen, sollte eine Mausmutante generiert werden, welche ein induzierbares und gegen GATA-4 gerichtetes RNA-Interferenz System trägt. Damit soll es möglich sein, die GATA-4 Expression in der adulten Maus auf ein kritisches Level einzustellen und die Auswirkungen einer verminderten GATA-4 Expression zu untersuchen. Zum besseren Verständnis dieser Technologie wird in den folgenden Kapiteln das Prinzip und die Anwendung der RNA-Interferenz vorgestellt.

1.7 RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen Mechanismus eukaryontischer Zellen, bei welchem die Expression eines Zielgens durch eine *small interfering RNA* (siRNA) supprimiert wird.¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ Evolutionär handelt es sich dabei um einen Schutzmechanismus des Immunsystems gegen Viren oder Transposons: Gelangt eine lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine eukaryontische Zelle, so wird diese durch das *RNase III* Enzym Dicer^{191,192} in kleine RNA-Duplexe von 21 bis 23 Nukleotiden (nt) zerschnitten (siRNAs).^{191,193} Anschließend werden diese Dicer-siRNA Komplexe durch das zelluläre Protein *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) transferiert.^{194,195} Nachfolgend wird der siRNA-Strang mit der schwächeren Bindungsenergie des 5'-Endes in den RISC-Komplex inkorporiert.¹⁹⁶ Dabei sollte es sich um den *Antisense*-Strang der siRNA handeln, da dieser den RISC-Komplex über eine exakte Sequenzerkennung zur komplementären Ziel-mRNA führt.¹⁹⁷ Anschließend wird die Ziel-mRNA durch eine katalytische Untereinheit von RISC, *Argonaute 2* (Ago2), gespalten. Hierbei spielt die sog. *Piwi*-Domäne von Ago2 eine wesentliche Rolle,¹⁹⁸ da diese eine *RNase H-like* Endonuklease Aktivität besitzt, welche eine einzelne Phosphodiesterbindung im Rückgrad der Ziel-mRNA spalten kann.¹⁹⁹

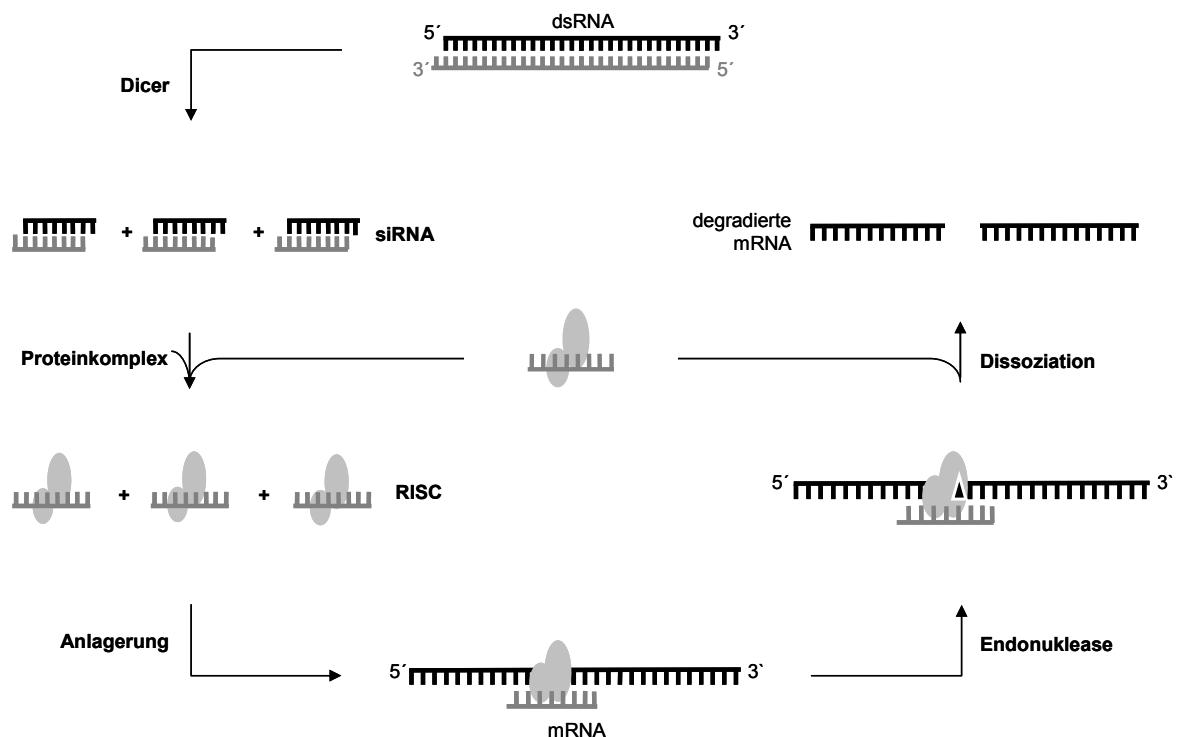


Abbildung 3: Schema der RNA-Interferenz.²⁰⁰ dsRNA wird durch Dicer in 21 bis 23 nt große siRNA-Duplexe zerschnitten. Der Strang mit der geringeren Bindungsenergie am 5'-Ende wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. RISC wird durch den siRNA-Strang zur komplementären mRNA geführt und zerschneidet diese durch eine Endonuklease-Aktivität (schwarzes Dreieck). Nachdem die homologe mRNA degradiert wurde, löst sich der RISC wieder und durchläuft einen neuen Zyklus.

Neben dieser klassischen Variante, welche auch als post-transkriptionelle Expressions-Inhibition beschrieben wird,¹⁸⁷ kann die RNAi Maschinerie noch auf transkriptioneller²⁰¹ und translationeller Ebene wirken.²⁰² Der Mechanismus des *RNAi-induced transcriptional silencing* (RITS) ist noch nicht vollständig geklärt. In humanen Zellen können siRNAs, welche gegen eine Promotor-Sequenz gerichtet sind, die Transkription des Zielgens supprimieren. Dabei werden sowohl die DNA der Zielsequenz als auch Histone methyliert.^{201,203} Unklar dabei ist, wie die siRNA aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt. Es wird vermutet, dass ein aktiver Mechanismus für diesen Transport verantwortlich ist. Weiterhin könnte die siRNA während der Zellteilung in den Zellkern gelangen.²⁰⁴ Als Ursache der Translations-Inhibition wird eine fehlerhafte *Watson-Crick* Basenpaarung zwischen siRNA und Ziel-mRNA diskutiert (sog. *mismatch*).²⁰⁵ Die aktuelle Hypothese besagt, dass diese *mismatch* siRNAs zusammen mit einem Ago-Protein an der 3' untranslatierten Region (UTR) der mRNA binden. Aufgrund der fehlerhaften Basenpaarung kommt es jedoch nicht zur Spaltung der mRNA,^{206,207} sondern zur Blockade der Translation. Zum anderen induziert dieser siRNA-Ago-Komplex eine frühzeitige Dissoziation der translatierenden Ribosomen von der mRNA, so dass es zum Abbruch der Translation kommt.²⁰²

1.7.1 Die Anwendung der RNAi *in vitro*

Die Art der Applikation von siRNAs ist für deren Effekt von großer Bedeutung. Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden diverse Methoden für den Einsatz der RNAi *in vitro* etabliert. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen *transienter*, *stabiler*, *konditioneller* und *induzierbarer* RNA-Interferenz. Dieses Kapitel soll einen kleinen Überblick über das Design von siRNAs und die derzeit verfügbaren Systeme verschaffen sowie ihre Vor- und Nachteile diskutieren.

1.7.1.1 Design von siRNAs

Aufgrund empirischer Studien wurden vor ca. 6 Jahren Empfehlungen für das Design von siRNAs entwickelt; diese basieren auf strukturellen Eigenschaften und dienen als erste Orientierung. Demnach sollte jede siRNA zwischen 21 und 23 nt lang sein,²⁰⁶ über einen Guanin/Cytosin-Gehalt von kleiner als 50 % verfügen,²⁰⁰ am 3'-Ende ein di-Nukleotid-(UU)-Überhang aufweisen²⁰⁶ und möglichst innerhalb der ersten 100 bp *downstream* vom Startkodon nach zwei Adeninen liegen, wobei dieser letzte Punkt umstritten ist.²⁰⁰ Mittlerweile wurden diese Empfehlungen verfeinert (vgl. Abbildung 4):

(1) Da die Thermodynamik der siRNA eine wesentliche Rolle spielt, sollte das 3'-Ende der siRNA (Position 15 - 19 des *Sense* Strangs) mindestens ein Adenin/Uracil-Basenpaar (bp) aufweisen, um die Bindungsenergie in diesem Bereich zu senken und die Effektivität der siRNA zu erhöhen.^{208,209} Aus dem gleichen Grund sollte das 5'-Ende der siRNA (Position 1 des *Sense* Strangs) ein Guanin/Cytosin-bp aufweisen.²⁰⁹ (2) Weiterhin sollte an Position 3 des *Sense*-Strangs ein Adenin und an Position 13 des *Sense*-Strangs ein Guanin vorliegen; die Position 19 des *Sense*-Strangs sollte hingegen *kein* Guanin oder Cytosin aufweisen.²⁰⁸ Generell sollte das letzte Drittel des *Sense*-Strangs (Position 14 – 19) reichhaltig an Adenin und Uracil sein.²⁰⁹ (3) Besonders wichtig scheint ein Uracil an Position 10 des *Sense*-Strangs zu sein, da die Ziel-mRNA an Position 10 zerschnitten wird und RISC – wie viele Endonukleasen²¹⁰ – bevorzugt 3' nach Uracil schneidet.²⁰⁸ (4) Letztlich sollte bei der Auswahl der Sequenz darauf geachtet werden, dass weder Palindrome noch Wiederholungen stark vertreten sind. Diese würden die Faltung von sekundären Strukturen begünstigen und somit die Konzentration an verfügbarer siRNA reduzieren.²⁰⁸ Zudem sollten Guanin/Cytosin-haltige Bereiche auf der gesamten siRNA vermieden werden.²⁰⁹ Um unspezifischen Effekten vorzubeugen, sollten Homologien zwischen der ermittelten Sequenz der siRNA und anderen Genen ausgeschlossen werden.

Position		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
mRNA	5' A A	G	N	A	N	N	N	N	N	N	U	N	N	G	A/U	A/U	A/U	A/U	A/U	U	- - 3'
siRNA (S)	5' - -	G	N	A	N	N	N	N	N	N	U	N	N	G	A/U	A/U	A/U	A/U	A/U	U	U U 3'
siRNA (AS)	3' U U	C	N	U	N	N	N	N	N	N	A	N	N	C	U/A	U/A	U/A	U/A	U/A	A	- - 5'

Abbildung 4: Darstellung des idealen Designs einer siRNA. Basierend auf den empirischen Untersuchungen von Elbashir,^{200,206} Reynolds²⁰⁸ und Ui-Tei²⁰⁹ ist es möglich, die Effektivität einer siRNA zu erhöhen. Dabei ist speziell darauf zu achten, dass das 3'-Ende der siRNA eine möglichst geringe thermodynamische Stabilität aufweist (aus diesem Grund bevorzugt Adenin (A) und Uracil (U) enthält) und mit einem U/A bp abschließt. Das 5'-Ende der siRNA sollte hingegen ein Guanin/Cytosin (G/C) bp enthalten. Anschließend wird der *Antisense* (AS) Strang der siRNA aufgrund seiner geringeren Bindungsenergie am 5'-Ende in den RISC-Komplex inkorporiert. Dieser wird dann zur komplementären mRNA geführt, welche durch die katalytische Untereinheit von RISC (Ago2) an Position 10/11 gespalten wird. Abweichungen von diesem Design (beispielsweise aufgrund der Ziel-mRNA) müssen nicht zwingend mit einem Effektivitätsverlust einhergehen; jedoch sollten, wenn möglich, die fettgedruckten Positionen eingehalten werden. (S): *Sense* Strang der siRNA; N: beliebiges Nukleotid (A, C, G, U).

1.7.1.2 Transiente RNA-Interferenz

Bei der *transienten* RNAi werden siRNAs durch spezielle Transfektionsreagenzien in die Zellen eingeschleust.²⁰⁰ Die Herstellung der siRNAs kann dabei durch drei verschiedene Methoden erfolgen. Bei der einfachsten und schnellsten Methode wird die siRNA durch chemische Synthese hergestellt (synthetische siRNAs).²¹¹ Der Vorteil liegt darin, dass die so

hergestellten siRNAs hochgradig rein sind. Jedoch ist die Synthese kostenintensiv, weshalb sich die Herstellung durch *in vitro* Transkription etabliert hat. Dabei werden von Oligonukleotiden ausgehend kleine RNA-Fragmente synthetisiert; diese lagern sich anschließend zu dsRNA zusammen und werden über eine RNase zur nativen siRNA prozessiert.²¹² Für beide Methoden muss die Sequenz einer funktionierenden siRNA bekannt sein. Andernfalls bietet sich die enzymatische Synthese eines siRNA-Pools an. Dabei werden lange dsRNA-Fragmente durch das Enzym Dicer in multiple und speziell gegen das Zielgen gerichtete siRNAs geschnitten (di-siRNAs).²¹³ Die Transfektion dieser di-siRNAs führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Suppression des Zielgens, wobei es aufgrund der vielen unterschiedlichen siRNAs zu unspezifischen Effekten kommen kann (siehe Kapitel 1.7.2). Ein genereller Nachteil der *transienten* RNAi ist die nur temporäre Suppression des Zielgens, welche – abhängig von der siRNA und der Halbwertszeit des Zielproteins²¹⁴ - in der Regel zwischen 3 und 5 Tagen liegt.²¹⁵ Primär ist dieser Effekt auf die Proliferation der Zellen zurückzuführen, da mit jeder Zellteilung die Menge an verfügbaren siRNAs halbiert wird.²¹⁶ Der Abbau von siRNAs durch zytoplasmatische RNasen ist in diesem Zusammenhang von sekundärer Bedeutung, weshalb auch chemische Modifikationen²¹⁷⁻²¹⁹ das Zeitfenster der Suppression nur bedingt verlängern können.

1.7.1.3 Stabile RNA Interferenz

Bei der *stabilen* RNAi wird ein Vorläufermolekül der siRNA direkt in der Zelle exprimiert, welches als sog. *short-hairpin* RNA (shRNA) bezeichnet wird.²²⁰ Die Matrize für das ca. 50 nt lange Molekül setzt sich aus dem *Sense*-Strang einer siRNA und dem reversen Komplement zusammen, welche durch einen 8 nt langen *Spacer* voneinander getrennt werden.²²¹ Wird diese lineare Matrize transkribiert, kommt es aufgrund der intramolekularen Komplementarität des Moleküls zur spontanen Ausbildung einer zweidimensionalen Haarnadel-Struktur, welche anschließend durch Dicer zu siRNAs prozessiert wird.²²² Die Transkription erfolgt dabei durch die RNA-Polymerase III (Pol III) und wird durch ein Poly-Thymin-Signal (T5) terminiert.^{220,223} Aus diesem Grund muss die Matrize unter die Kontrolle eines Pol III Promotors gestellt und am 3'-Ende durch ein T5-Signal flankiert werden.²²⁴ Der Transfer dieser Konstrukte in die Zelle erfolgt nach Klonierung mit Hilfe von Plasmiden^{225,226} oder viralen Vektoren.^{227,228} Der Vorteil dieser Systeme liegt in der permanenten Expression der shRNA bzw. siRNA, wodurch eine kontinuierliche Suppression des Zielgens erreicht werden kann. Nachteilig könnte sich hingegen eine *Übersättigung* der Zelle durch siRNAs

auswirken, da diese zur Auslösung von unspezifischen Effekten führen kann (siehe Kapitel 1.7.2).²²⁹

1.7.1.4 Konditionelle und induzierbare RNA Interferenz

Bei der *konditionellen* bzw. *induzierbaren* RNAi lässt sich die Expression einer shRNA zu einem definierten Zeitpunkt anschalten. In der Regel wird dies durch eine Modifikation des Pol III Promotors erreicht, wobei Elemente des Cre/LoxP bzw. Tetrazyklin-Systems in die Promotor-Sequenz eingebaut werden.

Bei dem Cre/loxP-System handelt es sich um ein Rekombinationssystem, durch welches DNA-Sequenzen gezielt entfernt werden können. Es besteht aus kleinen DNA-Fragmenten (sog. *loxP-sites*), welche durch das Enzym Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) miteinander rekombiniert werden können. Die dazwischen liegende DNA-Sequenz wird dabei deletiert.²³⁰ Die Bereitstellung der Cre-Rekombinase erfolgt durch einen Expressionsvektor, welcher je nach Fragestellung über einen konstitutiven²³¹ oder induzierbaren²³² Promotor verfügt. Dieses System nutzt man bei der *konditionellen* RNAi, indem in die Promotor-Sequenz ein mit *loxP-Sites* flankiertes (*gefloxtes*) DNA-Fragment eingebaut wird. Nach Integration der *gefloxten* DNA verliert der Promotor seine Aktivität, weshalb eine Transkription der shRNA ausbleibt. Durch die Cre-vermittelte Rekombination der beiden *loxP-sites* wird das *gefloxte* Fragment deletiert, wodurch der Promotor seine Aktivität zurück erlangt und nachfolgend die shRNA transkribiert wird.²³¹⁻²³⁴ Weiterhin wurden Varianten beschrieben, bei denen das *gefloxte* Segment entweder zwischen Transkriptionsstartstelle und shRNA-Matrize²³⁵ oder direkt in die *spacer*-Region einer shRNA-Matrize integriert wurde.^{236,237}

Neben diesen *konditionellen* Systemen wurden *induzierbare* Systeme beschrieben, durch welche die Expression einer shRNA sowohl ein- als auch wieder ausgeschaltet werden kann. In den meisten Fällen basieren diese Systeme auf dem Tetrazyklin-System (Tet-System),²³⁸ wobei zwischen dem Tet^{ON} und Tet^{OFF} System unterschieden wird. Bei dem Tet^{ON}-System bindet ein Tetrazyklin-Repressor (Tet^R) an die Sequenz eines Tetrazyklin-Operators (TetO), welcher in die Pol III Promotor-Region des shRNA-Expressionskonstruktes integriert wurde. Es kommt zur physikalischen Blockade von Pol III, wodurch die Expression der shRNA nicht mehr erfolgen kann – das System ist *ausgeschaltet*. In der Gegenwart des Tetrazyklin-Antibiotikums Doxyzyklin (Dox) ändert der Tet^R seine Konformation und löst sich vom TetO, so dass es zur Pol III vermittelten Expression der shRNA kommt – das System ist

angeschaltet.²³⁹⁻²⁴² Somit ist es möglich, die Expression der shRNA durch die Applikation von Doxyzyklin zu kontrollieren. Bei Tet^{OFF}-Systemen wird hingegen die Expression der shRNA in Gegenwart von Doxyzyklin verhindert.²⁴³

1.7.2 Off-Target Effekte

Je komplexer ein System ist, desto anfälliger ist es auch für Fehler. Das ist bei der RNA Interferenz nicht anders; speziell unter dem Aspekt, dass siRNAs in fundamentale Regulationsmechanismen der Zelle eingreifen. So kann beispielsweise der im Kapitel 1.7 vorgestellte Mechanismus der „Translations-Inhibition“ auch unspezifische Effekte, sog. *off-target effects*, hervorrufen. Dies ist der Fall, wenn ein *mismatch* zwischen siRNA und Ziel-mRNA auftritt. So wurde beschrieben, dass eine Übereinstimmung von 11 - 15 aufeinander folgenden Nukleotiden bereits ausreichen, um eine unspezifische Gen-Suppression zu induzieren.²⁴⁴ Die gleiche Studie berichtet jedoch von einer parallelen Reduktion des korrespondierenden mRNA-Levels.²⁴⁴ Somit bleibt zu diskutieren, ob sich dieser durch *mismatch* siRNA hervorgerufene *off-target effect* tatsächlich bzw. ausschließlich auf translationaler Ebene manifestiert.

Weitaus besser beschrieben ist ein *off-target effect*, welcher mit der Aktivierung des Interferon-Systems einhergeht.^{229,245,246} Dabei handelt es sich um eine Antwort des Immunsystems, welche u.a. durch das Eindringen von doppelsträngiger RNA (z.B. ein Virus) in eukaryontische Zellen induziert wird. Über die Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) und Phosphorylierung des Translationsfaktors *eukaryontischer Initiationsfaktor 2* (eIF2) wird die Proteinbiosynthese unspezifisch inhibiert.²⁴⁷ Zusätzlich wird die Ribonuklease L (RNase L) über die 2'-5'-Oligoadenylsynthetase (OAS) stimuliert, was zu einem unspezifischen Abbau von RNA führt.²⁴⁸ Die dsRNA induzierte Interferonantwort führt zu einer Stimulation der Apoptose.²⁴⁹ Zunächst ist man davon ausgegangen, dass siRNAs aufgrund ihrer Länge nicht in der Lage sind, eine Interferon-Antwort auszulösen.^{193,250} Mit der Zeit wurde jedoch das Gegenteil belegt.^{229,246,251}

Die Ursachen für diese unspezifischen Effekte sind noch nicht vollständig geklärt. Als wichtiger Faktor wird in diesem Zusammenhang das Design der siRNA (siehe 1.7.1.1) und die Überprüfung möglicher Homologien zu anderen Sequenzen angesehen. Weiterhin sollte darauf geachtet werden, dass die Endkonzentration der siRNA *in vitro* und *in vivo* möglichst gering ist; zudem sollte die Methode des Transfers optimiert worden sein.²⁵²

Ein weiterer *off-target effect* könnte durch Inkorporation des *Sense*-Strangs in den RISC-Komplex verursacht werden (vgl. Kapitel 1.7). In ersten Untersuchungen wurden deshalb siRNAs durch *locked nucleic acid* (LNA)²⁵³ chemisch modifiziert (siLNAs).²¹⁸ Dabei werden das 2'-Sauerstoffatom und 4'-Kohlenstoffatom des Ribonukleotids durch eine Methylenbrücke miteinander verbunden; als Folge kommt es zur signifikanten Erhöhung der Bindungsenergie des jeweiligen Nukleotids. Durch die Modifikation der siRNA am 5'-Ende des *Sense*-Strangs kann die Inkorporation in den RISC-Komplex deutlich vermindert werden. Zudem geht man davon aus, dass ein LNA-modifizierter siRNA-Strang die Aktivität von RISC negativ beeinflusst. Somit kann ein unspezifischer Abbau von mRNA durch eine ungewollte Inkorporation des *falschen* Strangs deutlich reduziert werden.²¹⁸ Eine andere Strategie wird beim Einsatz von *Duplex*-siRNAs verfolgt. Dabei handelt es sich um siRNAs, bei denen *beide* Stränge (*Sense und Antisense*) gegen die komplementäre Ziel-mRNA gerichtet sind. Der Aufbau dieser *Duplex*-siRNAs ist partiell palindromisch oder partiell komplementär; zudem verfügen sie über die charakteristischen 3'-überhängenden Enden (vgl. 1.7.1.1) und weisen eine den siRNAs ähnliche Stabilität auf. Da jeder Strang einer *Duplex*-siRNA für ein anderes Zielgen kodieren kann, können mit dieser Methode zwei verschiedene Gene parallel ausschalten werden.²⁵⁴

1.7.3 Die Anwendung der RNAi *in vivo* – Mausmodelle

Seit der Entdeckung der RNAi im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durch Andrew Fire (1998)¹⁸⁷ hat sich diese Technologie rasant weiterentwickelt. So ist es bereits drei Jahre später (2001) zum Durchbruch gekommen, als die Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl die Anwendung der RNAi in humanen Zellen demonstrierte.¹⁹³ Ein weiteres Jahr später (2002) wurden durch David Lewis erste *in vivo* Untersuchungen in der Maus durchgeführt. Dabei injizierte Lewis ein Luciferase (*luc*) exprimierendes Plasmid zusammen mit synthetischen *luc*-siRNAs in die Schwanzvene der Maus. Nach 24 Stunden untersuchte er die Expression von *luc* in verschiedenen Organen und fand dabei eine *luc*-Suppression von bis zu 90%.²⁵⁵ Somit war der Grundstein für die RNA Interferenz *in vivo* gelegt. In den folgenden Jahren wurde an Mäusen und Ratten gezeigt, dass durch intravenöse²⁵⁶⁻²⁶⁰ oder intraperitoneale^{261,262} Injektion von siRNAs eine systematische Suppression des jeweiligen Zielgens in verschiedenen Organen erreicht werden kann. Die Effizienz der siRNAs konnte dabei durch chemische Modifikationen,²⁶³ den Einschluss in und Transfer durch Liposomen,²⁵⁸ sowie durch parallele Injektion mit Transfektionsreagenzien^{259,262} verbessert werden. Auch im Bereich der lokalen Applikation entwickelte sich die Methodik rasch weiter; so wurden

siRNAs beispielsweise direkt hinter das Auge,²⁶⁴ in das Gehirn²⁶³ oder die Nase²⁶⁵ appliziert, sowie durch Elektroporation in Muskelgewebe,²⁶⁶ in Embryonen²⁶⁷ und in die Niere²⁶⁸ eingebracht. Eine Verbesserung der Transferrate und der Effizienz konnte durch den viralen Transfer von shRNA-Konstrukten erreicht werden.²⁶⁹⁻²⁷¹

Die erste auf RNAi basierende Mausmutante wurde im Jahre 2002 von Hidetoshi Hasuwa beschrieben.²⁷² Seitdem wurden ca. 20 verschiedene Modelle etabliert, wobei für die Generierung transgener Mäuse die pronukleare Injektion von DNA-Konstrukten,²⁷² Infektion von Zygoten²⁶⁹ oder ES-Zellen²³³ mit lentiviralen Vektoren, zufällige Integration in ES-Zellen,²⁷³ sowie gezielter *knock-in* eines DNA-Konstruktes in ES-Zellen durch einen Rekombinase-vermittelten Kassetten Austausch²⁷⁴ oder homologe Rekombination²³⁴ zum Einsatz kamen. Diese Mausmutanten basieren auf der Integration von shRNA-Expressionskonstrukten, wobei diese zufällig (bei pronuklearer Injektion, viraler Infektion und zufälliger Integration) oder gezielt (bei Rekombinase-vermitteltem Kassetten Austausch oder homologer Rekombination) erfolgen kann.

Wie bereits für die Anwendung der RNAi *in vitro* beschrieben (siehe Kapitel 1.7.1), kann die Expression der shRNA durch unterschiedliche Promotoren erfolgen. Für die *in vivo* Applikation wurden konstitutive²⁷² und konditionelle (Cre/loxP)²³⁴ Promotoren beschrieben. Bisher wurde dabei die für die Aktivierung des Cre/loxP-Systems erforderliche Cre-Rekombinase lediglich unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gestellt,^{232,235} die Verwendung einer gewebespezifischen Cre-Rekombinase wurde hingegen noch nicht beschrieben. Die Verwendung eines Tet-induzierbaren Pol III Promotors *in vivo* wurde bisher nur in einer Arbeit beschrieben.²⁷⁵

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4 in der adulten Maus genauer zu charakterisieren. Dazu soll eine Mausmutante generiert werden, in welcher die Expression des GATA-4 Gens mittels einer induzierbaren *short hairpin RNA* (shRNA) supprimiert werden kann. Mit dieser Mutante soll untersucht werden, welche Folgen eine Reduktion des GATA-4 Expressionslevels auf den adulten Organismus hat.

Dazu soll zunächst eine gegen GATA-4 gerichtete *small interfering RNA* (siRNA) identifiziert werden. Basierend auf dieser Sequenz soll ein Doxyzyklin-induzierbares *short hairpin RNA* (shRNA) Expressionssystem etabliert werden, welches die induzierbare Suppression von *gata-4 in vitro* ermöglicht. Durch Mikroinjektion der entsprechenden Konstrukte soll dieses System anschließend in die Maus transferiert werden. Nach Etablierung der Kolonie und Optimierung der Doxyzyklin-Applikation *in vivo* sollen schließlich die Auswirkungen einer supprimierten GATA-4 Expression auf die adulte Maus untersucht werden.

2 Material

2.1 Reagenzien, Puffer & Lösungen

Tabelle 3: Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge. Wenn nicht anders angegeben, wurde deionisiertes Wasser (Millipore) als Lösungsmittel verwendet.

Name	Hersteller
Agar-Agar	Invitrogen
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen
Ammoniumacetat	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Sigma
Bromphenol Blue-Xylen Cyanole Dye Solution	Sigma
Chloroform	J.T. Baker
4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Roch
Destilliertes Wasser DNase, RNase frei	Invitrogen
Diethylpyrogencarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DDT)	Invitrogen
Doxycycline Hydrochloride	Sigma
Eisessig	Merck
Ethanol, absolut	Merck
Ethanol 100% v/v denaturiert mit Ethylmethylketon	Herbeta-Arzneimittel
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen
Formaldehyd (37 %)	Merck
Glukose	Roth
Glycerol	Merck
Glycogen	Invitrogen
Glycin	Sigma
Igepal CA-630	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	neoLab Migge Laborbedarf
Kaliumchlorid	Sigma
Natriumacetat	Sigma

Natriumchlorid	Merck
Natrium-Deoxycholat	Acros Organics
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxyd	Merck
Paraformaldehyd	Merck
PEG 6000	Roth
Phenol	Sigma
Phenol:Chloroform (5:1)	Sigma
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma
PMSF	Sigma
Purified BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Promega
Rinderserumalbumin (BSA) (10 mg/ml)	New England Biolabs
Salzsäure	Merck
Sucrose	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Roth
Tris Hydrochlorid	Roth
Tween®20	Sigma
Vectashield Mounting Medium H-1200 mit DAPI	Vector Laboratories
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid)	Roth
XL10-Gold β-Mercaptoethanol (β-ME) Mix	Stratagene
Xylol	Sigma

Tabelle 4: Kommerziell erworbene Puffer.

Name	Hersteller
DNA Ligase Puffer (5 x)	Invitrogen
First-Strand Puffer (5 x)	Invitrogen
Green GoTaq™ Puffer (5 x)	Promega
NEB Restriktionspuffer (10 x)	New England BioLabs

Tabelle 5: Puffer. Wenn nicht anders angegeben, wurde deionisiertes Wasser (Millipore) als Lösungsmittel verwendet.

Name	Zusammensetzung
Alkalischer SDS Puffer	0.2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Blocking-Puffer	0.1 % BSA 10 % FKS in PBS
Denaturierungs-Puffer	1.0 M NaCl 0.5 M NaOH
Depurations-Puffer	0.25 M HCl
GTE-Puffer	50 mM Glukose 25 mM TrisHCL pH 8.0 10 mM EDTA
Hybridisierungspuffer	0.5 M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2) 7 % (w/v) SDS
Ladepuffer (1 x)	0.002 % (w/v) Bromphenol Blue-Xylene Cyanol 5 % (v/v) Glycin
Biopsie-Lysepuffer (pH 8.5)	10 mM Tris-HCl 5 mM 0.5 EDTA 0.2 % (w/v) SDS 200 mM NaCl
Neutralisierungs-Puffer	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.2 mM NaH ₂ PO ₄
Phosphatpuffer (Southern Blot)	0.5 M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2) 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Phosphatgepuffertes Saline (PBS), pH 7.3	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.2 mM NaH ₂ PO ₄
Protein-Ladepuffer	62.5 mM Tris pH 6.8 2 % (w/v) SDS 25 % (v/v) Glycin 0.01 % (w/v) Bromphenol Blue-Xylene Cyanole 100 mM DTT

Protein-Transferpuffer	25 mM Tris-base, pH 8.3 200 mM L-Glycin 20 % Ethanol (frisch dazugeben)
Protein-Laufpuffer	25 mM Tris pH 8.6 192 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl 10 mM EDTA 0.25 % (w/v) Natrium-Deoxycholate 1 % (v/v) Igepal CA-630 0.1 (w/v) % SDS 1 mM PMSF Complete Protease Inhibitoren
SSC (20 x)	3 M NaCl 0.3 M Tri-Natriumcitrat, pH 7.0
TAE-Puffer (pH 8.0)	40 mM Tris 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
TBE (1 x)	89 mM Tris pH 8.3 2.5 mM EDTA 89 mM Borsäure
TBS (1 x)	30 mM TrisHCl pH 7.6 150 mM NaCl
TBS-T	1 x TBS 0.1 % (v/v) Tween [®] 20
TE-Puffer (pH 7.4 oder 8.0)	10 mM Tris 1 mM EDTA
Waschpuffer	0.5 M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7.2) 5 % (w/v) SDS

Tabelle 6: Kommerziell erworbene Lösungen.

Name	Hersteller
Bradford-Reagenz	Biorad
Trizol [®] -Reagenz	Invitrogen

Tabelle 7: Andere Lösungen. Wenn nicht anders angegeben, wurde deionisiertes Wasser (Millipore) als Lösungsmittel verwendet.

Name	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	1 ml DEPC ad 1000 ml Wasser autoklavieren
X-Gal Lösung	10 % (w/v) X-Gal in N,N-Dimethylformamid

2.2 Enzyme

Tabelle 8: Enzyme.

Name	Hersteller
<i>Bgl</i> II (20 U/ μ l)	New England BioLabs
CIAP (1 U/ μ l)	Invitrogen
GoTag TM DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Promega
<i>Hind</i> III (20 U/ μ l)	New England BioLabs
Lysozym	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen
Proteinase K (10 mg/ml)	MBI-Fermentas
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen
<i>Sal</i> I (20 U/ μ l)	New England BioLabs
<i>Sca</i> I (20 U/ μ l)	New England BioLabs
<i>Stu</i> I (20 U/ μ l)	New England BioLabs
T ₄ -DNA-Ligase (1 U/ μ l)	Invitrogen
<i>Xho</i> I (20 U/ μ l)	New England BioLabs

2.3 Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Western-Blot Analysen. Die erstgenannte Verdünnung bezieht sich auf den primären Antikörper, während sich die zweitgenannte Verdünnung auf den korrespondierenden sekundären Antikörper bezieht. MW: Molekulargewicht.

Antigen	Herkunft	Verdünnung	Klon	MW in kDa	Hersteller
α -Tubulin	mouse, monoclonal IgG	1:500 / 1:2000	B-7	55	Santa Cruz
β -Actin	mouse, monoclonal IgG	1:1000 / 1:10000	AC-15	42	Sigma
GATA-2	mouse, monoclonal IgG	1:100 / 1:2000	CG2-96	50	Santa Cruz
GATA-4	goat, polyclonal IgG	1:500 / 1:10000	C-20	50	Santa Cruz
GATA-4	rabbit, polyclonal IgG	1:500 / 1:10000	H-112	50	Santa Cruz
Tet ^R	rabbit, polyclonal IgG	1:1000 / 1:2000	T0951	22	Sigma

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für die Western-Blot Analyse.

Antigen	Kopplung	Hersteller
Goat anti-mouse IgG	Peroxidase (Pferd)	Santa Cruz
Rabbit anti-goat IgG	Peroxidase (Pferd)	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG	Peroxidase (Pferd)	Santa Cruz

Tabelle 11: Primärer Antikörper für die Immunhistochemie.

Antigen	Herkunft	Verdünnung	Klon	Hersteller
GATA-4	Mouse, monoclonal IgG	1:200	J1606	Santa Cruz

Tabelle 12: Sekundärer Antikörper für die Immunhistochemie.

Antigen	Farbstoff	Fluoreszenz	Hersteller
goat anti-mouse, IgG	Alexa Fluor	rot	Invitrogen

2.4 Kits, Marker und Transfektionsreagenzien

Tabelle 13: Kommerzielle Kits.

Name	Hersteller
High Prime DNA Labeling Kit	Roche Applied Bioscience
QiAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
QiAprep [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

Tabelle 14: Murine TaqMan[®] Gene Expression Assays von Applied Biosystems.

Gen	Assay ID
Actin, beta	Mm00607939_s1
GATA binding protein 4	Mm00484689_m1

Tabelle 15: DNA- und Protein-Marker.

Name	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Standard Dual Color	Biorad Laboratories

Tabelle 16: Transfektionsreagenzien.

Name	Hersteller
FuGene 6 Transfection Reagent	Roche

2.5 Bakterien, Zelllinien und Mauszucht

2.5.1 Bakterien

Zur Klonierung von Plasmid-DNA wurden SoloPack[®] Gold Supercompetent Cells (Stratagene) verwendet.

Tabelle 17: Medien und Nährböden für die Bakterienzucht.

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	Für 1 Liter: 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl; pH 7.3
LB-Agar	1 l LB-Medium 15 g Agar
S.O.C. Medium	2 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

Tabelle 18: Antibiotika für die Bakterienzucht.

Name	Verwendete Konzentration	Hersteller
Ampicillin	50 µg/ml	Sigma
Blasticidin	3 µg/ml	Sigma
Zeocin	600 µg/ml	Invitrogen

2.5.2 Zelllinien

Für *in vitro* Versuche wurde die murine Myoblastenzelllinie C2C12 verwendet (American Type Culture Collection / ID: CRL-1772). Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium (Dulbecco's Minimum Eagle's Medium, inklusive 4.5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin, Invitrogen) mit 10 % FKS (Biochrom). Weiterhin wurde dem Medium 10.000 U/ml Penicillin (Biochrom) und 10.000 µg/ml Streptomycin (Biochrom) zugesetzt. Die Zellen wurden unter Verwendung von Trypsin (0.5 %) / EDTA (0.2 %) (Gibco) passagiert.

2.5.3 Mauszucht

Die Mäuse wurden unter SPF (*specific pathogens free*) Bedingungen an der University of Florida generiert, gezüchtet und gehalten. Das Studienprotokoll für die Genehmigung der tierexperimentellen Arbeiten sowie für die Untersuchung der Gewebeproben ist durch die dortige Ethikkommission geprüft und genehmigt worden (Protokoll: D669, Prof. Dr. Bungert, Department of Biochemistry and Molecular Biology).

2.6 Plasmide

Tabelle 19: Plasmide.

Name	Hersteller
pTer+	Dr. van de Wetering ²³⁹
pcDNA6/TR	Invitrogen

2.7 Oligonukleotide

Tabelle 20: PCR-Primer (Invitrogen, 5' ⇒ 3'-Richtung)

Name	Sequenz	NCBI-Nr.
ANF-S	GGG GGT AGG ATT GAC AGG AT	NM_008725
ANF-AS	CAG AGT GGG AGA GGC AAG AC	NM_008725
β-Actin-S	ACT GCT CTG GCT CCT AGC AC	NM_007393
β-Actin-AS	ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC	NM_007393
BMP-4-S	ACC TCA ACT CAA CCA ACC	NM_007554
BMP-4-AS	GTG TGG TAT GTG TAG GTG G	NM_007554
GAPDH-S	AAG GTC ATC CAT GAC AAC TT	XR_004349
GAPDH-AS	TTC AGC TCA GGG ATG ACC TT	XR_004349

GATA-2-S	ACA	CAC	CAC	CCG	ATA	CCC	ACC	TAT	NM_008090
GATA-2-AS	CCT	AGC	CCA	TGG	CAG	TCA	CCA	TGC	NM_008090
GATA-4-S	GAT	GGG	ACG	GGA	CAC	TAC	CTG		NM_008092
GATA-4-AS	ACC	TGC	TGG	CGT	CTT	AGA	TTT		NM_008092
H1:G4-S	GTC	ACT	AGG	CGG	GAA	CAC	C		-
H1 :G4-AS	ACG	GGG	GAG	GGG	CAA	ACA	ACA	G	-
MIS-S	TGC	GCG	AGC	TGA	GTG	TAG	ATC	T	NM_007445
MIS-AS	TAG	CGC	GGA	TTA	CGG	TCA	GAC	T	NM_007445
OAS-2-S	CAA	TAA	TGT	GGG	CAA	AGA	TGA	TGG	NM_145227
OAS-2-AS	ACT	GGG	AGC	GGT	TGG	TTT	TTA	GAG	NM_145227
StAR-S	GAC	CTT	GAA	AGG	CTC	AGG	AGG	AAC	NM_011485
StAR-AS	TAG	CTG	AAG	ATG	GAC	AGA	CTT	GC	NM_011485
TetR-S	TAG	ATA	GGC	ACC	ATA	CTC	ACT	TTT	-
TetR-AS	GGA	CCC	ACT	TTC	ACA	TTT			-
TetR-RT-S	GCT	GTG	GGG	CAT	TTT	ACT	TT		-
TetR-RT-AS	TCG	TAA	TAA	TGG	CGG	CAT	AC		-

Tabelle 21: Oligonukleotide, die die shRNA-Matrizen ausgebildet haben (Invitrogen, 5' ⇒ 3'-Richtung).

Name	Sequenz
shGATA-4 ⁽¹²¹⁴⁻¹²³⁴⁾ -S	GAT CCC TCT CGA TAT GTT TGA TGA CTT CAA GAG AGT CAT CAA ACA TAT CGA GAT TTT TGG AAA
shGATA-4 ⁽¹²¹⁴⁻¹²³⁴⁾ -AS	AGC TTT TCC AAA AAT CTC GAT ATG TTT GAT GAC TCT CTT GAA GTC ATC AAA CAT ATC GAG AGG
shGATA-4 ⁽¹²⁴²⁻¹²⁶²⁾ -S	GAT CCC GGC AGA GAG TGT GTC AAT TTT CAA GAG AAA TTG ACA CAC TCT CTG CCT TTT TGG AAA
shGATA-4 ⁽¹²⁴²⁻¹²⁶²⁾ -AS	AGC TTT TCC AAA AAG GCA GAG AGT GTG TCA ATT TCT CTT GAA AAT TGA CAC ACT CTC TGC CGG
shScarm-S	GAT CCC GTT AAC TTC TTA ATT GTG GTT CAA GAG ACC ACA ATT AAG AAG TTA ACT TTT TGG AAA
shScram-AS	AGC TTT TCC AAA AAG TTA ACT TCT TAA TTG TGG TCT CTT GAA CCA CAA TTA AGA AGT TAA CGG

Tabelle 22: Sequenzier-Primer (Invitrogen, 5' ⇒ 3'-Richtung).

Name	Sequenz
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG

2.8 Nukleotide / Radionukleotide

Tabelle 23: (Radio)-Nukleotide.

Name	Hersteller
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen
Radioaktiv markiertes α - ³² P-dCTP (370 MBq/ml)	Amersham

2.9 Sonstige Materialien

Tabelle 24: Sonstige Materialien.

Name	Hersteller
Autoradiographie Kassette	Fisher Scientific
Whatman-Papier, 46 x 57 cm	BioWORLD
ECL Detection Reagents	Amersham Biosciences
Falcon [®] konische Röhrrchen 50 ml PP	Becton Dickinson
Fastgreen	Sigma
G-25 Spin Säulen	Roche Applied Science
Heringssperma-DNA	Sigma
Intensifying Screen	Fisher Scientific
Kodak BioMax MS Film	Kodak
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG
Milex-GP Steril-Filter (0.45 μ m)	A. Hartenstein
Mini Complete Protease-Inhibitoren	Roche
Nagellack, klar	Black ONYI
Nitrocellulose-Membran	Amersham Bioscience
Novex [®] 4-20% Tris-Glycin-Gele	Invitrogen
elastische Folie	Parafilm
Saran Verpackungsfolie	Dow Chemical Company
Spritzen	Becton Dickinson
Spritzenkanüle (21 G)	Becton Dickinson
Superfrost Objektträger	Langenbrinck
Vectashield Mounting Medium H-1200	Axxora
Zellschaber	Corning
Zentrifugenröhrrchen 50 und 250 ml PP	Sorvall

2.10 Geräte

Tabelle 25: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	GR-MO	A & D Instruments
AxioCAM MRc		Carl Zeiss
AxioPlan 2 Imaging System		Carl Zeiss
β-Counter	9000GMI	Research Products International
Brutschrank	B6	Heraeus
Crosslinker	Stratalinker	Stratagene
Gelelektrophorese für Agarosegele (horizontal)	Midicell® Primo™	Thermo EC
GelCam		Polaroid
Gel Casting System	20 x 20 cm	Fisher Scientific
Gyro-Rocker®		Stuart Scientific
Hybridisierungsofen	Pro-Blot I	Labnet International
Kaltlichtquelle	2500LCD	Leica
Kulturschüttelplattform		Heidolph
Lumat	LB 9501	Berthold
Magnetrührer	TMC 2072	Schott
PCR-Maschine	Mastercycler	Eppendorf
Phosphoimager	IQ 300	Molecular Dynamics
Phosphoimager-Film		Molecular Dynamics
PowerPac	200 und 300	Biorad Laboratories
Rotoren	SLA-1500 und SS-34	Sorvall
Schüttelinkubator	3033	GFL
Sicherheitswerkbank	HSP12	Heraeus
SmartSpec™	3000	Biorad Laboratories
Sonifier	150	Branson Ultrasonics
Stereomikroskop	MZSL3	Leica
Test-Tube-Rotator	LD-79	MBT-Brand
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
UV-Transilluminator	FT-28/254 312	Fisher Scientific
XCell II™ Blot Module		Invitrogen
Xcell SureLock™ Mini-Cell		Invitrogen
Zentrifugen	5415D, 5417R, 5810R	Eppendorf
Zentrifuge	RC 5C Plus	Sorvall

2.11 EDV-Programme

Tabelle 26: Software.

Programm	Hersteller
Axio Vision	Carl Zeiss
Chromas	Carl Zeiss
Clone Manager	Scientific & Educational Software
Ermittlung von siRNA-Konstrukten	Eurogentec (Onlinesoftware: www.Eurogentec.com)
iCycler IQ	Biorad Laboratories
Lasergene	DNASTAR
Phosphorimager Software Image Quant	Molecular Dynamics

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellkulturen

C2C12 Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank und einer Begasung von 5 % CO₂ inkubiert. Zur Zellpassage wurden die adhärennten Zellen zunächst mit 1 x Vol. vorgewärmten (37 °C) PBS gewaschen, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation mit 0.2 x Vol. Trypsin/EDTA bei 37 °C. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurden diese in 0.5 x Vol. vorgewärmten (37 °C) Zellkultur-Medium aufgenommen und für 5 min bei 37 °C und 1.500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen vorgewärmten (37 °C) Mediums aufgenommen und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese trypsinisiert, in Medium resuspendiert, zentrifugiert (1500 x g; 5 min; 4 °C) und in Einfriermedium (25 % DMSO, 25 % FKS, 50 % DMEM) bei -80 °C in einem Isopropanol-Bad eingefroren (Absenkung der Temperatur von 1 °C/min). Eine langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die gefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 7.5 ml Kultur-Medium überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, um das toxische DMSO schnellstmöglich zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet resuspendiert und ausplattiert.

3.1.3 Transfektion von eukaryontischen Zellkulturen

3.1.3.1 Transiente Transfektion mit Plasmiden

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von < 50 % mit dem jeweiligen Plasmid mittels FuGene 6 Transfektionsreagenz in einem Verhältnis von 3:1 FuGene:DNA transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

3.1.3.2 Stabile Transfektion mit Plasmiden

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von $< 80\%$ mit den entsprechenden Expressionsplasmiden mittels FuGene 6 Transfektionsreagenz in einem Verhältnis von 3:1 FuGene:DNA transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Konfluenz von ca. 50 % eingestellt und selektiert. Dabei erfolgte die Selektion je nach dem gewählten Expressionsplasmid mit 3 μg Blastizidin pro ml Medium über 11 Tage bzw. 600 μg Zeocin pro ml Medium über 14 Tage. Alle 2 - 3 Tage wurde das Selektionsmedium gewechselt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, wurde diese wieder auf 50 % eingestellt.

3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1 DNA-Techniken

3.2.1.1 DNA-Isolation aus Biopsien durch Phenol-Chloroformextraktion

0.5 cm einer Schwanzbiopsie der Maus wurden in 500 μl Lysepuffer mit 5 μl frischer Protease K aufgenommen und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die Nukleinsäuren von den Proteinen zu reinigen. Dazu wurden zunächst nicht lösliche Bestandteile (wie z.B. Knochenreste und Haare) durch Zentrifugation (20000 x g) bei Raumtemperatur abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μl Phenol (Tris-gesättigt) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Rotationsrad). Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (15 min, 20000 x g, Raumtemperatur). Der Überstand und die Interphase wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und erneut 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 20000 x g, Raumtemperatur) wurden Überstand und Interphase erneut in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 5 min bei Raumtemperatur unter Rotation gemischt und zentrifugiert (15 min, 20000 x g, Raumtemperatur). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μl kaltem Isopropanol versetzt. Anschließend wurde gemischt, 1 Stunde bei -20 °C gefällt und 30 min bei 4 °C zentrifugiert (20000 x g). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 20000 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 100 μl TE-Puffer pH 8.0 aufgenommen. Es folgte ein RNA-Verdau durch die Zugabe von 1 μl RNase (30 min, 37 °C).

3.2.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung sowie zur Analyse der Expression von unterschiedlichen Genen in Zellen bzw. Geweben wurde eine PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 20) und der genomischen DNA bzw. cDNA aus der jeweiligen Zelllinie bzw. dem Gewebe durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde im 25 µl Gesamtvolumen mit 1 x Green GoTaq™ Puffer, 5 nmol dNTPs, je 5 pmol der beiden Primer und 1 U GoTaq™ DNA Polymerase durchgeführt. Die Proben wurden im Mastercycler (Eppendorf) mit den in Tabelle 27 aufgelisteten Programmen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die korrekte Produktgröße überprüft.

Tabelle 27: PCR-Bedingungen. Dargestellt sind die Programme und die Art des verwendeten Templates (Primersequenzen sind der Tabelle 20 zu entnehmen). Stets wurde das Template für 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden je nach Gen und Probe zwischen 17 und 35 Zyklen durchlaufen (45 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing bei angegebener Temperatur, Elongation bei 72 °C über die angegebene Zeit), gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt (10 min bei 72 °C). cDNA: copy DNA, gDNA: genomische DNA.

Gen	Template	Annealing	Elongation	Größe
		T / °C	t / s	in bp
ANF	cDNA	60	30	272
β-Actin	cDNA	60	30	112
BMP-4	cDNA	60	30	266
GAPDH	cDNA	62	30	191
GATA-2	cDNA	62	60	766
GATA-4	cDNA	62	30	309
H1:G4	gDNA	56	30	402
MIS	cDNA	60	30	119
OAS-2	cDNA	60	30	120
StAR	cDNA	60	60	980
Tet ^R	gDNA	56	30	442
Tet ^R RT	cDNA	59	30	107

3.2.1.3 Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Agarosegele wurden durch Auflösen von 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer für ein 1%-iges Gel (w/v) hergestellt. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50 °C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Die PCR-Produkte enthielten durch den 5x GreenGoTaq™ Buffer bereits einen Ladepuffer, während andere DNA-Proben mit 1x Ladepuffer versetzt wurden. 0.7 µg des 1 Kb Plus DNA Markers wurde als Größenmarker

verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm für 0.5 - 1 h durchgeführt. Die getrennte DNA wurde unter UV-Licht durch das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar.

3.2.1.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die zu eluierenden DNA-Banden ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgte anschließend mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen), wobei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren wurde.

3.2.1.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch Klenow-Polymerase unter Verwendung des High Prime DNA Labeling Kits (Roche Applied Science) radioaktiv mit [α - 32 P] dCTP markiert. Dabei wurde gemäß der Angaben des Herstellers verfahren. Um die bei der radioaktiven Markierung nicht eingebauten Nukleotide von den Oligonukleotiden abzutrennen, wurden G-25 Spin Säulen (Roche) verwendet. Auch hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.2.1.6 Southern Blot

Zur Southern Blot Hybridisierung wurden ca. 10 μ g mit Restriktionsendonukleasen verdaute genomische DNA auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Zum Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde das Gel für 15 min in Depurinations-Puffer, anschließend für 15 min in Denaturierungs-Puffer und schließlich in Neutralisations-Puffer geschwenkt, wobei zwischen den einzelnen Schritten das Gel in Millipore geschwenkt wurde. Danach wurde ein semi dry blot (Kapillarblot) aufgebaut. Dazu wurde das denaturierte Gel auf eine Brücke aus vier Lagen Whatman-Papier gelegt, wobei die beiden Enden des Papiers in ein Reservoir aus 10 x SSC eintauchten. Die seitlichen Ränder des Gels wurden mit Parafilm abgedichtet und die vorbereitete Membran wurde luftblasenfrei auf dem Gel platziert. Darauf wurde dann die positiv geladene Nylonmembran (HybondTM-N+, Amersham Bioscience), vier weitere passgenaue Lagen Whatman-Papier und ein ca. 5 cm dicker Stapel Papiertücher gelegt. Zum Abschluss wurde der Aufbau durch eine Glasplatte und ein zusätzliches Gewicht vervollständigt. Die Blotdauer betrug etwa 20 Stunden. Beim Abbau des Blots wurde die Position der Geltaschen auf der Membran markiert. Anschließend wurde die Membran 5 min mit Phosphatpuffer gewaschen, getrocknet, mit dem Stratalinker von Stratagene gecrosslinked und in 5 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C inkubiert. Nach 10 min

wurden 50 µl Heringssperma-DNA zugefügt und weitere 20 min bei 65 °C inkubiert. Während dessen wurde die radioaktiv markierte Sonde für 5 min bei 95 °C denaturiert und für 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben. In dieser Lösung wurde die Membran dann 24 Stunden inkubiert. Zum Waschen wurde die Membran mit Waschpuffer bei 65 °C inkubiert, wobei der Puffer jeweils nach 40 und 20 min einmal gewechselt wurde. Nach dem Waschen wurde die Membran sofort auf ein in 2 x SSC getränktes Stück Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingepackt und an einen Phosphoimager-Film angelegt. Nach 2 bis 3 Tagen erfolgte die Detektion durch Anlegen des Films an einen Phosphoimager.

3.2.1.7 Strippen einer hybridisierten Nylonmembran

Eine Nylonmembran kann mehrmals für Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden verwendet werden. Um ein vollständiges Entfernen der gebundenen Sonde ermöglichen zu können, ist streng darauf zu achten, dass die Membran unter keinen Umständen eintrocknet. Für ein erfolgreiches Strippen wurde die Nylonmembran für ca. 30 min bei 95 °C mit 0.5 % SDS inkubiert.

3.2.2 Klonierungstechniken

3.2.2.1 Präparativer Restriktionsverdau

Um die für eine Klonierung benötigten DNA-Mengen aus einem Plasmid zu spalten, wurden 50 µg der DNA mit 100 U des Restriktionsenzym unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung des Ansatzes auf einem Agarosegel. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

3.2.2.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

Isolierte DNA wurde durch Zugabe von 1 µl CIAP (1 U/µl) für 5 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl EDTA (250 mM) und Erhitzen auf 65°C für 15 min abgestoppt.

3.2.2.3 Phenol-Chloroformextraktion und Reinigung der DNA

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g wurde die DNA-enhaltende obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf wurde die Extraktion mit einem Volumen Chloroform wiederholt.

3.2.2.4 DNA-Fällung

Die DNA wurde mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat, 2.5 Volumen 100 % (v/v) Ethanol und mit 1 µl Glycogen für 1 Stunde bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (20000 x g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem angemessenen Volumen millipore Wasser gelöst.

3.2.2.5 Ligation von shRNA-Matrizen in den shRNA-Expressionsvektor

100 pmol der sense shRNA-Matrize und 100 pmol der antisense shRNA-Matrize wurden zusammen mit 5 µl Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur gekühlt. 1 µl der annealten shRNA-Matrize wurden anschließend mit 50 ng des geschnittenen shRNA-Expressionsvektors (pTER⁺, geschnitten mit *Bgl*-II und *Hind*-III, publiziert und erhalten von Dr. van de Wetering)²³⁹ ligiert. Die Ligation erfolgte mit einem Fünftel des 5 x DNA Ligase Puffers sowie 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 8 Stunden bei 16 °C. Der Ligationsansatz wurde bis zur Transformation bei 4 °C gekühlt.

3.2.2.6 Transformation von Bakterien

SoloPack[®] Gold Supercompetent Cells (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und anschließend leicht gemischt. Nach Zugabe von 1 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol Mix wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, wobei sie alle 2 min leicht gemischt wurden. 100 ng DNA wurden hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock von 42 °C wurde für 1 min durchgeführt. Nach einer Inkubation für 2 min auf Eis wurden 150 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium hinzugegeben. Der Transformationsmix wurde für 1 h bei 37 °C und 300 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. 10 - 100 µl des Mixes wurden auf

LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin und je nach Bedarf 300 µl/l X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.7 Minipräparation

Für eine Minipräparation der Plasmid-DNA wurden 4 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) mit einer einzelnen Kolonie der SoloPack[®] Gold Supercompetent Cells, die das geeignete Plasmid enthielt, angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C für 12 - 16 h inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde der QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.2.2.8 Maxipräparation

Für eine Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden 150 - 250 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) mit 5 µl einer Minikultur, welche das geeignete Plasmid enthielt, angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C für 12 - 16 h inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.2.2.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem Photometer. Dabei wurden die Lichtabsorptionen bei 260 nm im Vergleich zum reinen Lösungsmittel gemessen, wobei eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von 1.0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt; dieser Wert sollte bei 1.8 liegen.

3.2.2.10 Analytischer Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 2 µg DNA eingesetzt. Diese wurde mit 5 bis 10 U einer entsprechenden Restriktionsendonuklease versetzt. Die Pufferbedingungen wurden nach den Herstellerangaben gewählt. Das Endvolumen betrug 20 µl. Die Inkubation erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

3.2.2.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger²⁷⁶ durch die Firma AGOWA (www.agowa.de).

3.2.3 RNA-Techniken

3.2.3.1 Isolierung von RNA und Quantifizierung

3.2.3.1.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die RNA wurde aus bis zu 5×10^6 Zellen einer $< 80\%$ konfluenten T75 Zellkulturflasche mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die RNA-Isolierung aus in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurde mittels Trizol[®] Reagent-Extraktion nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei $OD_{260} = 1.0$ einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.3.1.2 Isolation von RNA aus Organen

100 mg zerstückeltes Gewebe wurden in 1 ml Trizol[®] Reagent-Extraktion aufgenommen und mit einer Spritzenkanüle (21 G) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 2 °C). Der Überstand wurde abgenommen, es wurden 160 µl Chloroform dazugegeben und 15 s gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurde die Lösung zentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4 °C). Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 625 µl Isopropanol und 1 µl Glycogen versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 75 % Ethanol (v/v) in DEPC-Wasser gewaschen und getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen (10 - 30 µl) DEPC-Wasser gelöst. Die RNA wurde vermessen und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Reverse Transkription

2 µg RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer und 1 µl 10 mM dNTPs für 5 min bei 65 °C in einem Thermomixer denaturiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe eines Mixes aus 4 µl 5 x *First-Strand Buffer*, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin sowie 0.5 µl 200 U/µl MMLV-Reverse Transkriptase wurde die Probe für 50 min bei 37 °C und für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3 Real-time PCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde eine TaqMan Real-time PCR mit kommerziell erhältlichen Primern (TaqMan[®] Gene Expression Assays, Tabelle 14) und dem TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (20 µl-Ansatz, Denaturierung auf 20 s erhöht). Die RNA-Menge wurde anhand von Standardreihen mit dem Programm iCycler IQ 3.1.7050 (Bio-Rad Laboratories) errechnet und im Verhältnis zur Menge der mRNA des Referenzgens angegeben.

3.3 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

3.3.1 Isolation von Proteinen

3.3.1.1 Gesamzellprotein-Extrakte aus der Zellkultur

Zellen wurden bei einer Konfluenz < 80% trypsiniert und in 50 ml-Falcon[®]-Röhrchen pelletiert. Das Pellet wurde mit kaltem 1 x PBS gewaschen, in 5 Volumen RIPA-Puffer aufgenommen und in einem Reaktionsgefäß für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 20800 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Ganzzellprotein-Extrakte wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.1.2 Gesamzellprotein-Extrakte aus Organen

1000 mg zerstückeltes Gewebe wurde in 500 µl RIPA-Puffer aufgenommen und durch Sonifizierung homogenisiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 20800 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Ganzzellprotein-Extrakt wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der Ganzzellprotein-Extrakte wurden mit dem Protein Assay Reagent von Bio-Rad Laboratories nach der Bradford-Methode anhand des Protokolls des Herstellers ermittelt.

3.3.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Proteinextrakte (aus Zellkultur: 20 µg, aus Organen: 50 µg) wurden auf Novex[®] 4 - 20% Tris-Glycin-Gelen (Invitrogen) unter denaturierenden Bedingungen (1 x Laufpuffer) aufgetrennt. Die Elektrophorese der zuvor für 5 min bei 95 °C denaturierten Proben wurde in einem Tank (XCell *SureLock*[™] Mini-Cell, Invitrogen) bei 20 mA für ca. 15 min und dann bei 30 mA für 1 - 2 h durchgeführt. Als Marker für das Molekulargewicht wurde Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad Laboratories) verwendet.

3.3.4 Western Blot

Die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (0.45 µm) mittels Elektrotransfer im Tanksystem überführt. Das Gel wurde in einem fertigen Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich (Invitrogen) auf die Kathodenseite des XCell II[™] Blot Modules (Invitrogen) platziert. Der Transfer wurde im 1x Transferpuffer für 1.5 h bei 30 V/Gel auf Eis durchgeführt. Die Membran wurde anschließend in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilch für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Nach Waschen in TBS-T (3 x 5 min) wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen (2 x abspülen, 1 x 15 min, 2 x 10 min) und mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (2 x abspülen, 1 x 15 min, 2 x 10 min) wurden die Proteine mit ECL Detection Reagents (Amersham Biosciences) detektiert. Tabelle 9 und

Tabelle 10 zeigen die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen.

3.4 Immunhistochemie

Die Paraffin-Einbettung und Anfertigung der Schnittserien der Teratome sowie die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen wurden von Dr. Nanette Sarioglu (Institut für Pathologie

und Paidopathologie CVK, Charité - Universitätsmedizin Berlin) bzw. die GATA-4 immunhistochemischen Färbungen der Teratome von Dr. Anya Ivanova (AG Molekulare Neonatologie) durchgeführt.

3.4.1 Immunhistologische Färbungen

Die Schnitte wurden zunächst mit Xylol entparaffinisiert und durch eine absteigende Ethanolreihe (100 % bis 30 %) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit 1 ml Blocking-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut mit 1 x PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (20 µl pro Gewebeschnitt) bei 4 °C über Nacht. Für Doppelfärbungen wurden beide primären Antikörper gleichzeitig aufgetragen. Negativkontrollen wurden ohne die primären Antikörper inkubiert und durchliefen analog alle weiteren Färbeschritte. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS und 3 mal mit Blocking-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur mit den korrespondierenden sekundären Antikörpern inkubiert und mit PBS gewaschen, gefolgt von 3 Waschschritten mit Blocking-Puffer für jeweils 10 min. Hiernach wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und kurz an der Luft getrocknet, bevor sie mit Vectashield Mounting Medium H-1200 mit DAPI eingedeckelt wurden. Eine Versiegelung der Schnitte erfolgte durch eine Umrandung des Deckgläschens mit klarem Nagellack.

3.4.2 Bildaufnahme und digitale Bildbearbeitung

Die Mikroskopie erfolgte mit einem hochauflösenden Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan 2 Imaging System, Carl Zeiss), an welches eine Digitalkamera (AxioCAM MRc, Carl Zeiss) angeschlossen war. Die Bilder wurden mit dem Programm AxioVision 4.2 (Carl Zeiss) aufgenommen und digital bearbeitet. Bilder der Negativkontrollen wurden mit den gleichen Belichtungszeiten wie die positiv gefärbten Präparate aufgenommen.

3.5 Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion

Die Generierung der transgenen Mäuse erfolgte durch Mikroinjektion der unter 4.2 beschriebenen Konstrukte in den Vorkern von FvB Mausembryonen. Die Arbeiten dazu wurden an der *University of Florida* durch die *Transgenic Mouse Core Facility* durchgeführt.

3.6 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde unter Annahme der Normalverteilung mittels Student's t -Test untersucht. Ein p -Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des induzierbaren GATA-4 RNA-Interferenz Systems *in vitro*

Für die Etablierung des induzierbaren RNA Interferenz (RNAi) Systems *in vitro*, wurde die murine Myoblasten Zelllinie C2C12 als Modellsystem ausgewählt. Diese Zellen exprimieren sowohl GATA-2 als auch GATA-4 (Abbildung 5). GATA-2 soll bei späteren Untersuchungen als Kontrolle für mögliche *off-target effects* (siehe Kapitel 1.7.2) dienen.

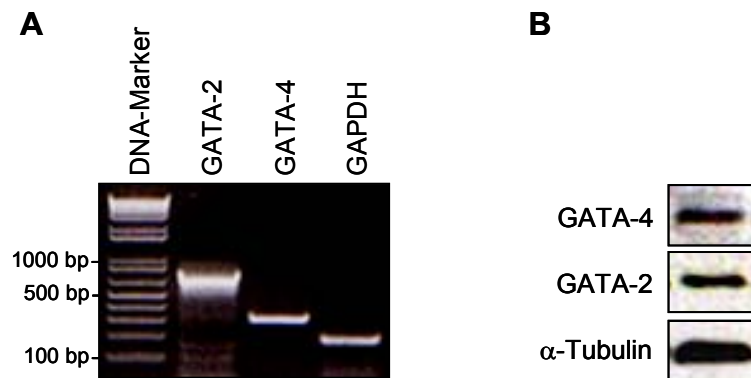


Abbildung 5: Expressionsanalyse von GATA-2 und GATA-4 in murinen Myoblasten (C2C12-Zellen). (A) RT-PCR Analyse der GATA-2, GATA-4 und GAPDH Expression (jeweils 28 Zyklen). Die Auftrennung erfolgte in einem 1.5%igem Agarose-Gel. (B) Western Blot Analyse der GATA-2, GATA-4 und α -Tubulin Expression. Auftrennung von 20 μ g Gesamtzellprotein-Extrakt in einem 4 - 20%igen Tris-Glycin Gel. Detektion durch spezifische Antikörper (siehe 2.3, GATA-4 AK: goat polyclonal).

4.1.1 Lokalisation potentieller siRNAs gegen GATA-4 (siGATA-4)

Das murine GATA-4 Gen befindet sich auf dem Chromosom 14 und ist aus 7 Exons aufgebaut. Die für GATA-4 kodierende Sequenz beginnt im Exon II, 608 nt *downstream* von der Transkriptionsstartstelle und endet im Exon VII an Position 1933. Durch eine Online-Software der Firma Eurogentec (siehe 2.11) wurden auf Grundlage dieser Sequenz zwei potentiell gegen GATA-4 gerichtete siRNA-Konstrukte (siGATA-4) identifiziert (vgl. Abbildung 6). Diese befinden sich an Position 1214-1234 (siGATA-4/1) und 1242-1262 (shGATA-4/2), jeweils bezogen auf die Transkriptionsstartstelle (Abbildung 6 A). Dabei ist siGATA-4/1 exonüberspannend (die ersten 5 nt befinden sich im Exon II, die restlichen 14 nt befinden sich im Exon III) und wurde zudem als funktionierende siGATA-4 in einem humanen Modellsystem beschrieben; die Homologie zur korrespondierenden humanen siRNA-Sequenz beträgt 95 %.¹⁵⁷ Die siGATA-4/2 ist ausschließlich im 5' Bereich des Exon III lokalisiert (Abbildung 6 A).

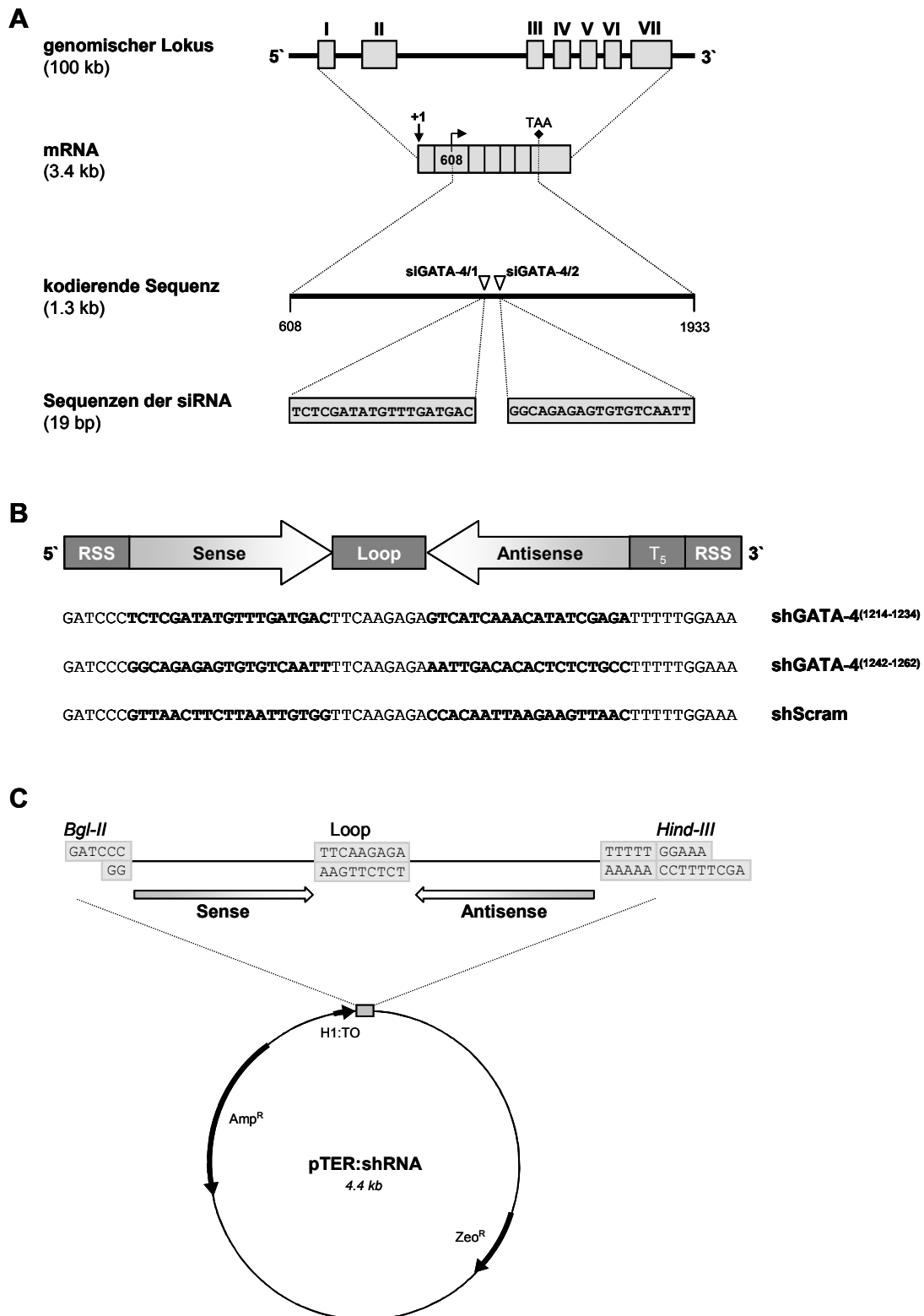


Abbildung 6: Lokalisation der siRNAs gegen GATA-4 und deren Klonierung in einen Expressionsvektor. (A) Schematische Darstellung des genomischen GATA-4 Locus (Chromosom 14, NCBI Gen-Bank Nummer: NT_039606), der GATA-4 mRNA (+1: Transkriptionsstartstelle; 608: Translationsstartstelle; TAA: Stopkodon, NM_008092), der kodierenden mRNA Sequenz (Basenpaar 608 - 1933, bezogen auf die mRNA, NM_008092) und der Lokalisation der gegen GATA-4 gerichteten siRNAs (siGATA-4) auf der mRNA (dargestellt ist jeweils die Sense-Sequenz, Nummern der siGATA-4 beziehen sich auf die Transkriptionsstartstelle (+1)). (B) siGATA-4 kodierende shRNA-Matrizen (RSS: Restriktionsschnittstelle, 5': *Bgl*-II, 3': *Hind*-III; T₅: Poly-T-Signal; shScram: *scramble* shRNA, nicht-kodierende shRNA, Fett: Sense- bzw. Antisense-Strang). (C) Darstellung der Vektorkarte von pTER:shRNA. Klonierung der in (B) dargestellten shRNA-Matrizen in den Basisvektor pTER. **Abkürzungen:** H1:TO: durch den Tetrazyklin-Operator (TO) modifizierter H1-Promotor. Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen, Zeo^R: Zeocin-Resistenzgen.

Basierend auf diesen Sequenzen wurden gegen GATA-4 gerichtete shRNA-Matrizen (shGATA-4), sowie eine nicht kodierende shRNA-Matrize (shScram) entwickelt. Die Nomenklatur der shGATA-4 Konstrukte ist analog zu den siGATA-4 Konstrukten gewählt (Abbildung 6 B). Diese wurden in den induzierbaren shRNA-Expressionsvektor pTER kloniert (pTER:shRNA; Abbildung 6 C) und anschließend sequenziert.²³⁹ pTER verfügt über einen H1-Promotor (Pol III), welcher durch einen Tetrazyklin-Operator (TO) modifiziert wurde (H1:TO). Nach Bindung des Tetrazyklin-Repressors (Tet^R) an diese Sequenz kommt es zur Blockade des H1-Promotors, wodurch die Expression der shRNA nicht mehr erfolgen kann. Durch die Zugabe von Doxyzyklin ändert der Tet^R seine Konformation und löst sich vom TO, wodurch die Transkription der shRNA induziert wird (Abbildung 7).

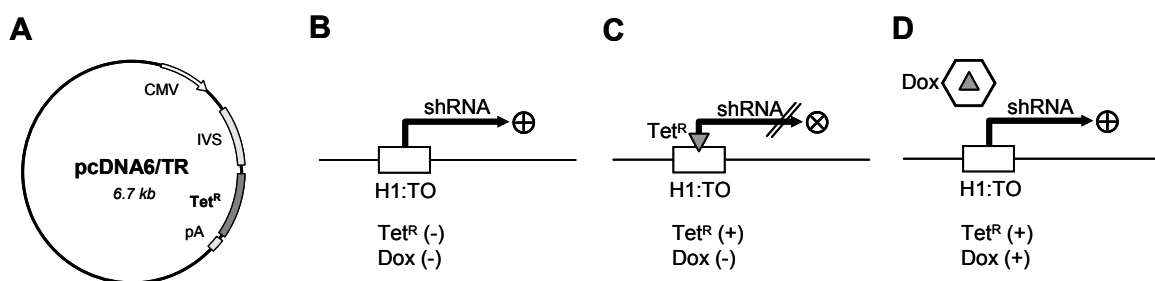


Abbildung 7: Prinzip des durch Doxyzyklin (Dox) induzierbaren RNAi Systems. (A) Vektorkarte des pcDNA6/TR. Das Plasmid kodiert den Tetrazyklin-Repressor (Tet^R), welcher den H1:TO Promotor durch Bindung an den TO blockiert. CMV: Cytomegalievirus-Promotor; IVS: β -Globin Intron II (Hase); Tet^R : Tet^R -Gen; pA: Simian Virus 40 (SV40) Polyadenylierungs-Signal. (B - D) Darstellung des H1:TO Promotors von pTER:shRNA. (B) Bei Abwesenheit des Tet^R ist der Promotor für Pol III zugänglich. (C) Der Promotor wird durch den Tet^R (graues Dreieck) blockiert. (D) Durch die Applikation von Doxyzyklin (Sechseck) ändert der Tet^R seine Konformation und löst sich vom Promotor.

4.1.2 Suppression von GATA-4 *in vitro*

Um die Funktionalität und Spezifität der shGATA-4 Expressionsplasmide (pTER:shGATA-4) zu untersuchen, wurden sowohl C2C12-Zellen als auch Tet^R -exprimierende C2C12-Zellen (C2C12^{TR}) mit pTER:shGATA-4/1 und pTER:shGATA-4/2 transfiziert (Abbildung 8). In C2C12-Zellen wurde dabei durch beide pTER:shGATA-4 die mRNA-Expression von GATA-4 supprimiert, während in C2C12^{TR}-Zellen kein Effekt festzustellen war. Auch die Transfektion von pTER (Leervektor ohne shRNA-Matrize) oder pTER:shScram zeigte in beiden Zelltypen keinen Effekt (Abbildung 8 B). Eine leichte Suppression der Protein-Expression von GATA-4 konnte in C2C12-Zellen nur durch pTER:shGATA-4/1 erreicht werden (Abbildung 8 C). Aufgrund des stärkeren Suppressionspotentials durch pTER:shGATA-4/1 wurden C2C12^{TR}-Zellen mit diesem Plasmid stabil transfiziert (C2C12^{TR/shG4}). Anschließend wurde in diesen Zellen die Induzierbarkeit des shGATA-4

Expressionssystem durch Doxyzyklin untersucht. Dazu wurden C2C12^{TR/shG4}-Zellen mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen über unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert, wobei sowohl nach Applikation von 2.5 µg Doxyzyklin pro ml Medium über 3 Tage, als auch durch die Applikation von 5 µg Doxyzyklin pro ml Medium über 7 Tage eine deutliche Suppression der GATA-4 Protein-Expression induziert wurde (Abbildung 8 D).

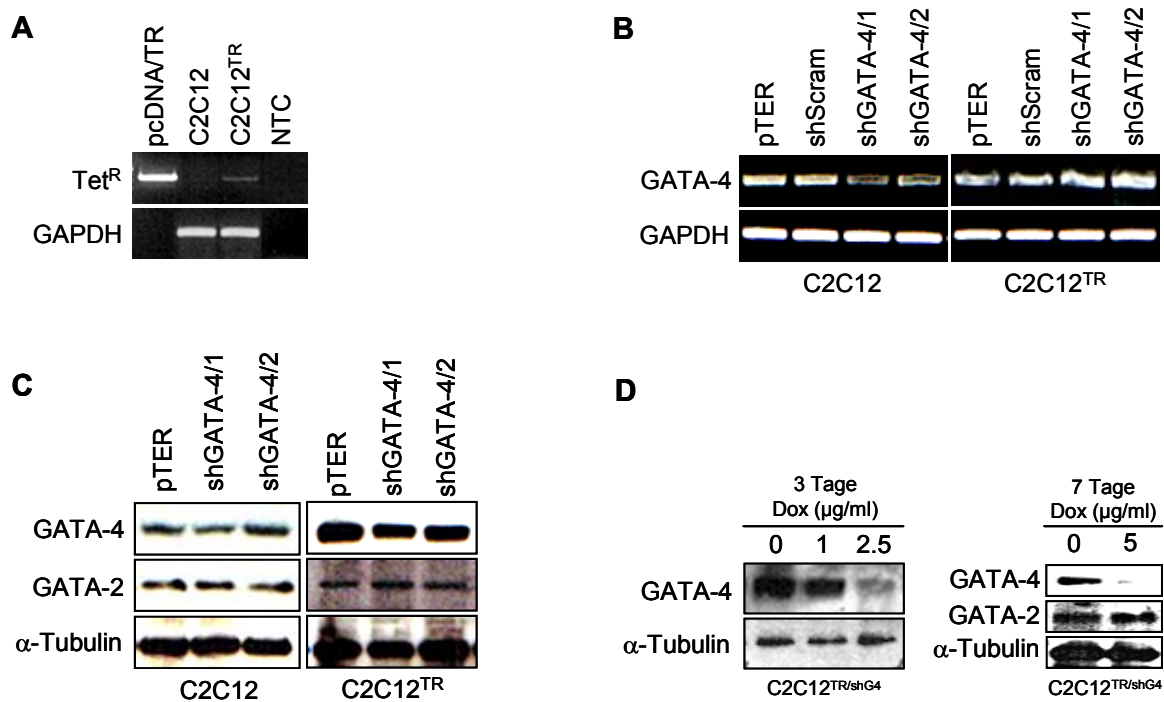


Abbildung 8: Suppression von GATA-4 in C2C12-Zellen. (A) Generierung Tet^R-exprimierender C2C12-Zellen (C2C12^{TR}). C2C12-Zellen wurden mit pcDNA6/TR stabil transfiziert. RNA Extrakte wurden mittels RT-PCR Analyse untersucht. (B) Suppression von GATA-4 durch shGATA-4/1 und shGATA-4/2 in C2C12-Zellen, jedoch nicht in C2C12^{TR}-Zellen. C2C12-Zellen und C2C12^{TR}-Zellen wurden jeweils mit pTER, shScram, shGATA-4/1 und shGATA-4/2 transfiziert. Vier Tage nach Transfektion wurden RNA Extrakte mittels RT-PCR untersucht. (C) Suppression von GATA-4 auf translationaler Ebene durch shGATA-4/1 in C2C12-Zellen, jedoch nicht in C2C12^{TR}-Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit pTER, shGATA-4/1 und shGATA-4/2 transfiziert. Vier Tage nach Transfektion wurden Gesamtzellprotein-Extrakte mittels Western-Blot Analyse untersucht. (GATA-4: goat polyclonal) (D) Suppression von GATA-4 auf translationaler Ebene mittels Doxyzyklin-induzierbarer shGATA-4/1 in C2C12^{TR/shG4} Zellen. C2C12^{TR}-Zellen wurden mit shGATA-4/1 stabil transfiziert (C2C12^{TR/shG4}) und über 3 Tage bzw. 7 Tage mit Doxyzyklin (Dox) inkubiert. Vier Tage nach Transfektion wurden Gesamtzellprotein-Extrakte mittels Western-Blot Analyse untersucht (GATA-4: goat polyclonal). **Abkürzungen:** NTC: *No-Template-Control* (Negativkontrolle); pTER: Leervektor ohne shRNA-Matrize; shScram: pTer-Vektor mit unspezifischer shRNA-Sequenz; shGATA-4/1: pTER-Vektor mit shGATA-4/1-Sequenz; shGATA-4/2: pTER-Vektor mit shGATA-4/2-Sequenz.

4.2 Generierung von Mausmutanten

Mittels Mikroinjektion wurden transgene Mäuse erzeugt, welche das induzierbare shGATA-4/1 Expressionskonstrukt (H1:G4) und das Tet^R-kodierende Konstrukt (Tet^R) tragen (Abbildung 9).



Abbildung 9: Aufbau der H1:G4 und Tet^R Konstrukte. Die Konstrukte wurden durch Restriktionsspaltung der Trägerplasmide und anschließende Auftrennung in einem 1.5%igen Agarosegel isoliert (nicht gezeigt). **(A)** H1:G4 Konstrukt (1.9 kb). Restriktionsspaltung von pTER:shGATA-4⁽¹²¹⁴⁻¹²³⁴⁾ mit *Sca*-I und *Stu*-I. **(B)** Tet^R-kodierende Konstrukt (2.5 kb). Restriktionsspaltung von pcDNA6/TR mit *Sal*-I und *Xho*. **Abkürzungen:** H1:TO: durch den Tetrazyklin-Operator (TO) modifizierter H1-Promotor; Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen; CMV: Cytomegalievirus-Promotor; IVS: β -Globin Intron II (Hase); Tet^R: Tet^R-Gen; pA: Simian Virus 40 (SV40) Polyadenylierungs-Signal.

Dazu wurden die Konstrukte zunächst auf eine Endkonzentration von 2 ng/ μ l je Konstrukt eingestellt und *gepoolt*. Anschließend wurde in den männlichen Vorkern von insgesamt 494 künstlich befruchteten Eizellen der Maus je 1 pl der *gepoolten* DNA-Lösung injiziert. Jeweils ca. 20 der so behandelten Eizellen wurden in insgesamt 25 scheinchwangere Mausweibchen transferiert (Tabelle 28).

Tabelle 28: Mikroinjektionen zur Generierung der transgenen H1:G4/Tet^R Mausmutante

Injektions Nr.	Injizierte Eizellen (IE)	Weibchen	Nachkommen (N)	N/IE	transgene Nachkommen
1	240	12	25	10 %	0
2	40	2	9	23 %	0
3	104	5	61	59 %	0
4	110	6	26	24 %	2

Die insgesamt 121 Nachkommen wurden auf die Integration der DNA-Konstrukte mittels PCR und Southern Blot Analyse (Abbildung 11) untersucht, wobei lediglich zwei transgene Tiere identifiziert wurden. Dabei handelte es sich um ein Männchen, bei welchem beide Transgene nachgewiesen werden konnten, und ein Weibchen, welches lediglich das Tet^R-Konstrukt aufwies. Die Expansion der Kolonie erfolgte durch Verpaarung des transgenen Männchens (H1:G4/Tet^R) mit Wildtyp-Weibchen. Durch anschließende Verpaarung der Nachkommen wurden in der F₂-Generation Mutanten erzeugt, welche 66 ± 4 Kopien des H1:G4 Transgens und 50 ± 8 Kopien des Tet^R Transgens bzw. 30 ± 4 Kopien des H1:G4 Transgens und 20 ± 4 Kopien des Tet^R Transgens aufwiesen (Abbildung 11). Basierend auf diesem Befund wurden die Nachkommen mit der höheren Kopienzahl (> 50 Kopien je Transgen) als „high copy“ und die mit der geringeren Kopienzahl (< 50 Kopien je Transgen) als „low copy“ bezeichnet. Für die weiteren Verpaarungen wurden lediglich „high copy“ Tiere verwendet.

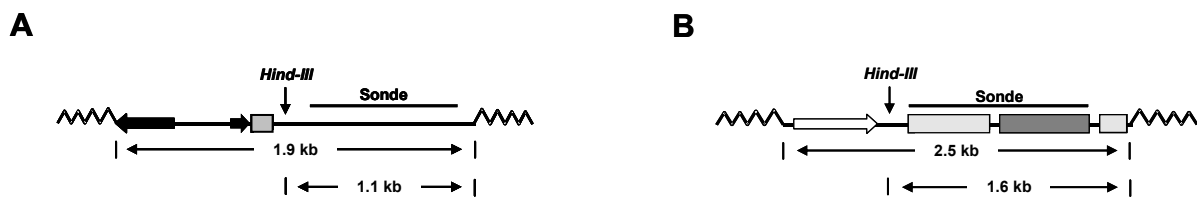


Abbildung 10: Strategie zur Identifikation der Transgene im Genom der Maus durch Southern-Blot Analyse. (A) Das H1:G4 Transgen enthält an Position $\sim + 0.8$ kb eine einzelne Restriktionsschnittstelle für *Hind*-III. Nach Spaltung der genomischen DNA mit *Hind*-III ist ein Fragment von mindestens 1.1 kb zu erwarten. Die für die Detektion erforderliche Sonde (H1:G4-Sonde) wird durch einen *Hind*-III/*Stu*-I Restriktionsverdau des Plasmids pTER:shGATA-4 isoliert (schwarzer Balken). (B) Das Tet^R Transgen enthält an Position ~ 0.9 kb eine einzelne Restriktionsschnittstelle für *Hind*-III. Nach Spaltung der genomischen DNA mit *Hind*-III ist ein Fragment von mindestens 1.6 kb zu erwarten. Die für die Detektion erforderliche Sonde (Tet^R-Sonde) wird durch einen *Hind*-III/*Xho*-I Restriktionsverdau aus dem Plasmid pcDNA6/TR (Abbildung 7 A) isoliert (schwarzer Balken). Gezackte Line: flankierende genomische DNA. Symbole in Analogie zu Abbildung 9.

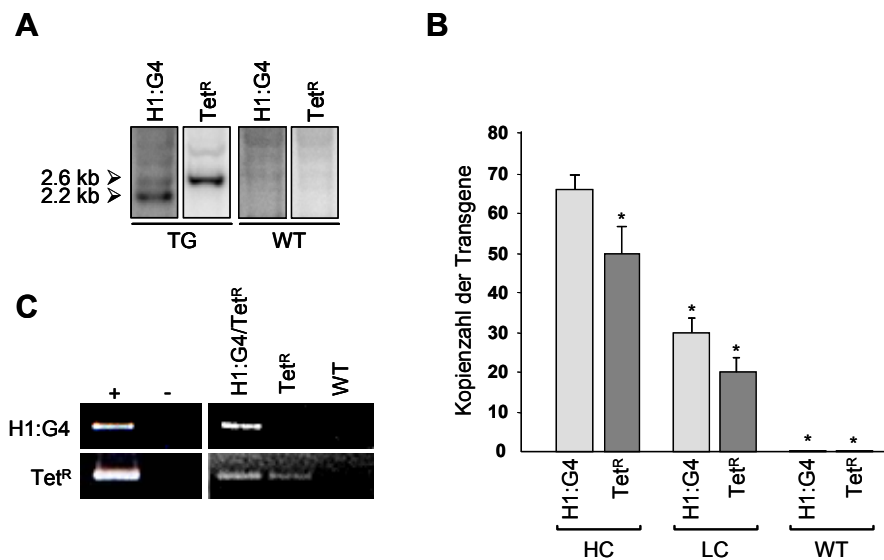


Abbildung 11: Genotypisierung transgener H1:G4/Tet^R Mausmutanten. (A) Southern-Blot Analyse einer transgenen Maus (TG) und einer Wildtyp-Maus (WT). Genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien isoliert, durch *Hind*-III gespalten und in einem 1.5%igem Agarosegel aufgetrennt. Nachweis der Transgene durch die in Abbildung 10 dargestellten Sonden. Fragment-Größen bei TG: H1:G4: 2.2 kb; Tet^R: 2.6 kb (B) Identifikation von „high copy“ (HC) und „low copy“ (LC) Mausmutanten durch Bestimmung der Kopienzahl der Transgene. Die Intensität der Banden aus der Southern-Blot Analyse wurde mittels Densitometrie ermittelt und mit der Intensität der Banden des β -Globin Gens verglichen ($n=3$). Die Kopienzahlen der Transgene beziehen sich auf jeweils eine Kopie des β -Globin Gens. (C) Genotypisierung H1:G4/Tet^R und Tet^R transgener Mausmutanten durch PCR-Analyse. **Abkürzungen:** (+): Positivkontrolle (H1:G4: pTER:shGATA-4, Tet^R: pcDNA6/TR); (-): Negativkontrolle; WT: Wildtyp. H1:G4: induzierbares shGATA-4-Transgen, Tet^R: Tet^R-kodierendes Transgen. Signifikanzen (*) beziehen sich auf das „high copy“ H1:G4-Transgen ($p < 0.05$).

4.2.1 Identifikation der Integrationsmuster der Transgene

Die DNA-Konstrukte sind nach dem Zufallsprinzip in das Mausgenom integriert. Neben Einfachintegrationen kann es zu sog. Tandemintegrationen kommen, bei denen sich die Konstrukte direkt aneinander lagern und sich kettenförmig integrieren (Abbildung 12).

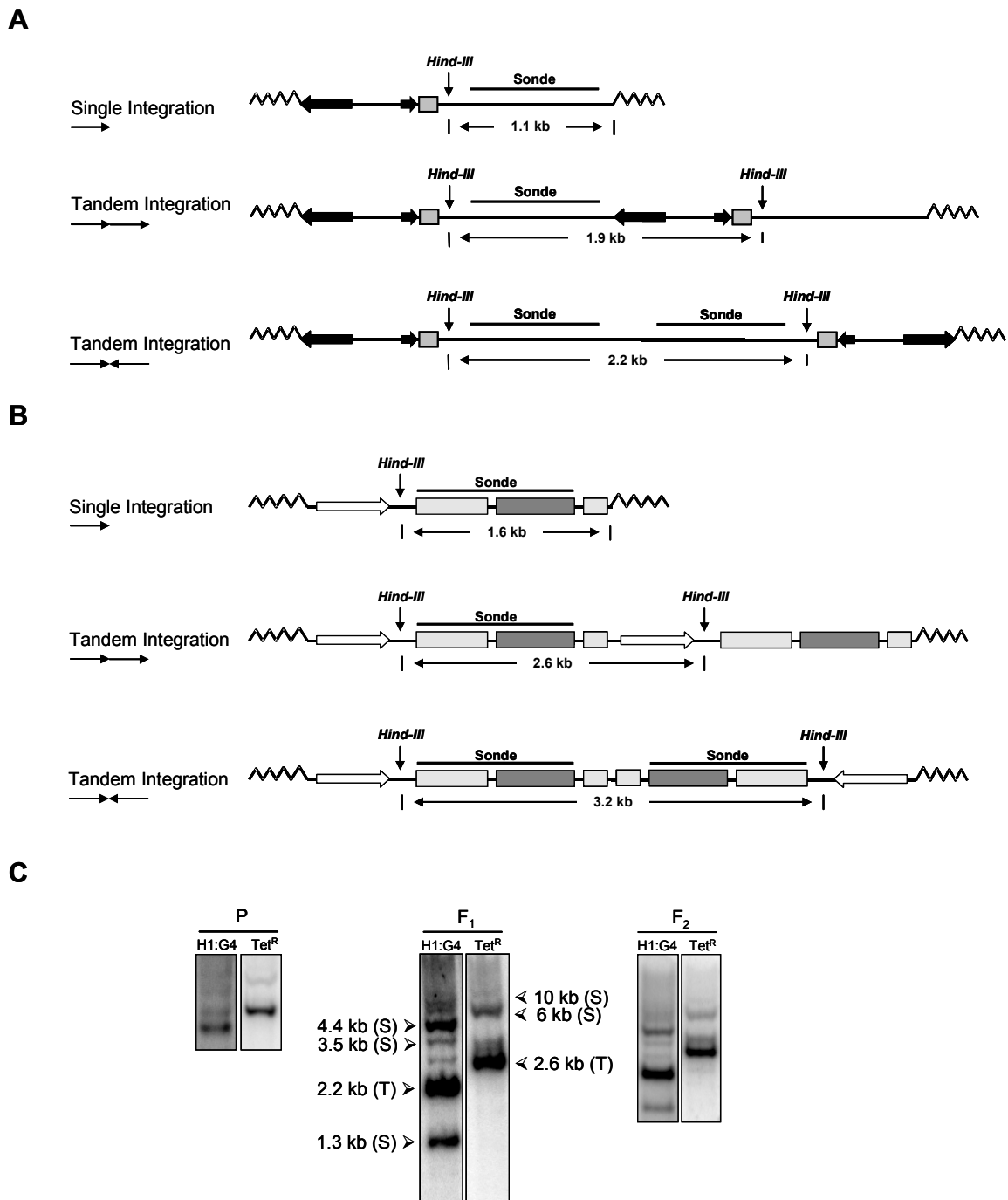


Abbildung 12: Identifikation der Integrationsmuster der Transgene in das Mausgenom. Darstellung der hypothetischen Integrationsmuster des H1:G4-Transgens (A) und des Tet^R-Transgens (B). Gezackte Linie: flankierende genomische DNA. Symbole in Analogie zu Abbildung 9 gewählt. (C) Genotypisierung der parentalen, der F₁ und der F₂ Generation (jeweils „high copy“). Aus einer Gewebeprobe wurde DNA isoliert und mit Hind-III verdaut. Die gespaltene genomische DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran gebロットet. Anschließend wurde diese mit der H1:G4 Sonde respektive Tet^R Sonde hybridisiert. Genotypisierung einer Maus der parentalen Generation (P), der F₁-Generation (F₁) und F₂-Generation (F₂). Single Integration (S) und Tandem Integration (T).

Je nach Integrationstyp ergeben sich im Southern Blot unterschiedliche Bandengrößen, wodurch beide Transgene nach einem *Hind*-III Restriktionsverdau detektiert werden. *Hind*-III schneidet in beiden Fällen Integrationsvarianten innerhalb des Transgens. Die Sonden sind so konzipiert, dass sie in beiden Fällen den Downstream-Bereich des Transgens detektieren. Bei einer Einzelintegration werden im Fall des H1:G4 Transgens Fragmentgrößen von mindestens 1.1 kb erwartet. Im Fall des Tet^R Transgens werden Fragmentgrößen von mindestens 1.6 kb erwartet (Abbildung 12). 5'→3' Tandemintegrationen führen bei Vorliegen des H1:G4 Transgens zu einer Fragmentgröße von 1.8 kb bzw. bei Vorliegen des Tet^R Transgens zu einer Fragmentgröße von 2.6 kb. Hingegen führen 3'→5' Tandemintegrationen zu einer Fragmentgröße von 2.2 kb bei Vorliegen des H1:G4 Transgens und zu einer Fragmentgröße von 3.2 kb bei Vorliegen des Tet^R Transgens. Weiterhin sind kombinierte Tandemintegrationen beider Transgene denkbar. In der Abbildung 12 C wird gezeigt, dass verschiedene Integrationsvarianten in der H1:G4/Tet^R Mausmutante nachweisbar sind und das Integrationsmuster über verschiedene Generationen erhalten bleibt. Somit ist nicht nur von einer Kointegration von H1:G4 und Tet^R, sondern auch von einer konstanten Vererbung der Transgene auszugehen.

4.3 Etablierung des Doxyzyklin-induzierbaren *in vivo* Systems am Herzen

Als Modellorgan für die Untersuchung der Effektivität bzw. Funktionalität des Doxyzyklin-induzierbaren shGATA-4-Systems wurde das Herz gewählt. GATA-4 ist nicht nur für die normale Entwicklung des Herzens von großer Bedeutung.^{35,36} Auch im ausgeprägten Herzen sind zahlreiche Zielgene von GATA-4 identifiziert,^{107,138} weshalb nach der Suppression von GATA-4 ein kardialer Phänotyp zu erwarten war. Alle Mausmutanten wurden im Alter von ca. 3 Monaten untersucht.

4.3.1 Untersuchung der Tet^R-Expression in den transgenen Mäusen

In ersten Untersuchungen wurde auf die Expression des Tet^R in den Herzen homozygoter H1:G4/Tet^R Mausmutanten und in Wildtyp-Mäusen fokussiert. In den transgenen Mäusen wurde dabei sowohl das Transkript als auch das Protein für den Tet^R nachgewiesen (Abbildung 13). Die Stärke der Tet^R-Expression auf mRNA-Level war dabei mit der von GAPDH vergleichbar (Abbildung 13 A).

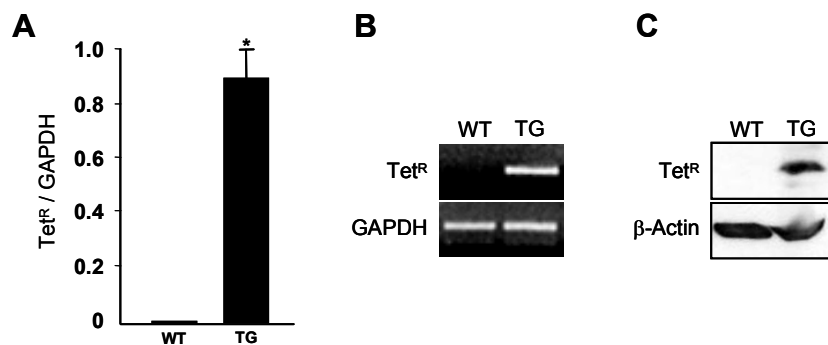


Abbildung 13: Expression des Tet^R in H1:G4/Tet^R Mausmutanten (TG). Aus dem Herzen wurde RNA bzw. Gesamtzellprotein isoliert und die Tet^R Expression untersucht. (A) Real-Time PCR Analyse der Tet^R-Expression im Herzen von WT und TG Mäusen (n=3). * p < 0.05. (B) RT-PCR Analyse und (C) Western-Blot Analyse der Tet^R-Expression.

4.3.2 Optimierung der Doxyzyklin-Applikation

Nachfolgend sollte die Doxyzyklin-Induzierbarkeit der transgenen Mäuse untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp und transgene Tiere mit Doxyzyklin-angereichertem Futter (200 mg Doxyzyklin pro kg Trockenfutter) über unterschiedliche Zeiträume (7 - 28 Tage) behandelt. An den entsprechenden Tagen wurden die Herzen entnommen und per Real-Time PCR die Expression des GATA-4 Gens untersucht. Es konnte jedoch keine Suppression der GATA-4 Expression nachgewiesen werden (n = 8, Daten nicht gezeigt). Laborchemische Untersuchungen (Medizinisches Labor Bremen) zeigten, dass mit der enteralen Doxyzyklin-Applikation über 28 Tage lediglich eine Doxyzyklin-Konzentration von 0.5 mg/l im Serum erreicht wurde, wobei der therapeutische Bereich zwischen 1.0 und 5.0 mg/l Serum liegt. Als Konsequenz wurde nachfolgend Doxyzyklin über das Trinkwasser verabreicht. Dabei wurde nach Applikation von 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose zur Geschmacksverbesserung) über 28 Tage eine ausreichende Doxyzyklin-Konzentration im Serum erreicht (9.0 mg/l Doxyzyklin).

Anschließend sollte die Frage geklärt werden, welchen Effekt die Applikation von 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser auf die GATA-4 Expression in Wildtyp und transgenen Mäusen hat. Um auch die Langzeitfolgen der Applikation zu untersuchen, wurden Wildtyp und transgene Mäuse mit und ohne Doxyzyklin über 70 Tage behandelt. Anschließend wurden die Herzen entnommen und per RT-PCR und Real-Time PCR die Expression des GATA-4 Gens untersucht. Dabei wurde in Wildtyp-Mäusen festgestellt, dass Doxyzyklin keinen Effekt auf die GATA-4 Expression *per se* hat. Bei Doxyzyklin-induzierten transgenen Mäusen wurde eine signifikante Suppression der GATA-4 Expression von 65 % ± 15 % festgestellt; jedoch

zeigten transgene Mäuse auch ohne Doxyzyklin-Induktion eine Suppression von $25 \% \pm 15 \%$ (Abbildung 14).

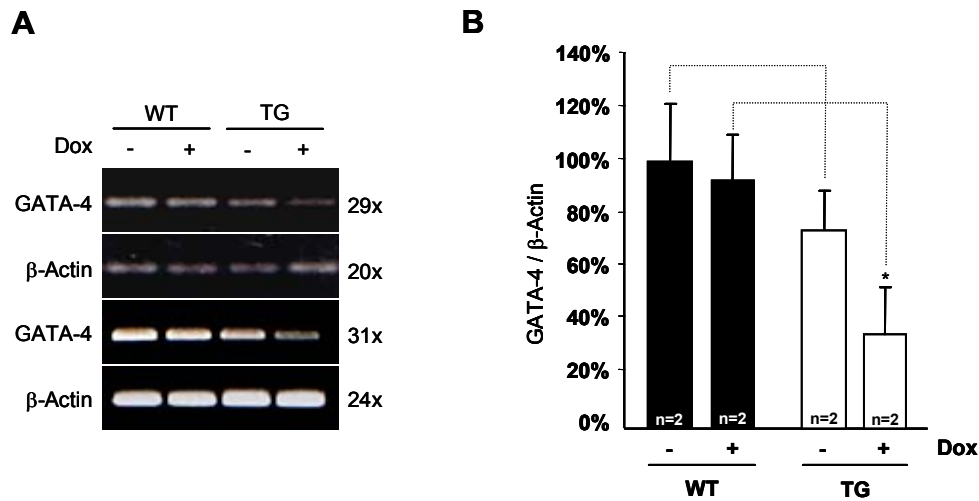


Abbildung 14: Einfluss von Doxyzyklin auf die GATA-4 Expression im Herzen von WT und TG Mäusen. WT und TG Mäuse wurden über 70 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt. **(A)** RT-PCR Analyse von GATA-4 und GAPDH aus WT und TG Maus-Herzen, welche ohne (-) und mit (+) Doxyzyklin (Dox) behandelt wurden. Die Auftrennung erfolgte in einem 1.5%igem Agarosegel. Rechte Spalte: Zyklenanzahl der RT-PCR. **(B)** Real-Time PCR Analyse der GATA-4 Expression im Herzen von WT und TG Mäusen vor (-) und nach (+) Doxyzyklin-Behandlung. * $p < 0.05$.

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass sich die Suppression von GATA-4 in den Herzen transgener Mäuse zwischen 38 Tagen und 70 Tagen Doxyzyklin-Induktion nicht signifikant verändert (Abbildung 15 A). Für die funktionellen Untersuchungen wurde im Folgenden eine maximale Doxyzyklin-Induktionsdauer von 38 Tagen gewählt.

4.4 Funktionelle Untersuchungen zur Suppression von GATA-4 *in vivo*

Transgene und Wildtyp-Mäuse wurden über 14, 29, 38 und 70 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser behandelt (inkl. 2 % Sucrose). Nach 29 Tagen wurde in den Herzen der transgenen Mäuse per Real-Time PCR eine signifikante Suppression der GATA-4 Expression von $67 \% \pm 21 \%$ bzw. nach 38 Tagen von $78 \% \pm 21 \%$ und nach 70 Tagen von $65 \% \pm 15 \%$ per Real-Time PCR festgestellt (Abbildung 15 A). Die Suppression des GATA-4 Proteins nach 38 Tagen wurde durch Western-Blot Analyse (Abbildung 15 B) bestätigt. Zudem war in den Herzen der transgenen Tiere die Expression der GATA-4 Zielgene *atrial natriuretic factor* (ANF) und *bone morphogenic protein 4* (BMP-4) deutlich reduziert; das Expressionslevel des GATA-4 Zielgens *α -myosin heavy-chain* (α -MHC) war hingegen innerhalb der Doxyzyklin-

Behandlungsgruppen unverändert. Die Reduktion von ANF und BMP-4 war unabhängig von der Behandlungsdauer transgener Mäuse mit Doxyzyklin bzw. der GATA-4 Suppression konstant. Hingegen nahm die α -MHC-Expression mit zunehmender Doxyzyklin-Behandlungsdauer sowohl in den Herzproben der Wildtyp-Mäuse als auch der transgenen Mäuse zu. Weiterhin wurde in dem Herzgewebe der transgenen Tiere ein deutlicher Anstieg des Interferon-Zielgens *2'-5'-Oligoadenylat Synthetase* (OAS2) detektiert, welcher bei den Wildtyp-Mäusen ausblieb (Abbildung 15 C).

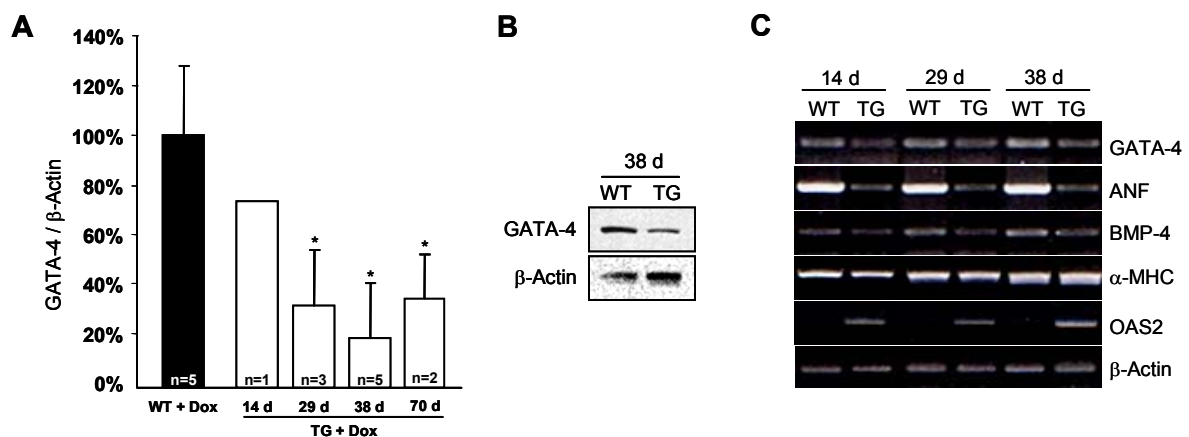


Abbildung 15: Suppression von GATA-4 im Herzen. WT und TG Mäuse wurden über 14, 29, 38 und 70 Tage (d) mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt. **(A)** Real-Time PCR Analyse der GATA-4 Expression. Signifikanzen beziehen sich auf WT + Dox (* $p < 0.05$). **(B)** Western-Blot Analyse von Herzproben einer WT und TG Maus, welche über 38 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (2 % Sucrose) behandelt wurde (GATA-4: rabbit polyclonal). **(C)** RT-PCR Analyse von GATA-4, seinen Zielgenen und der 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase 2 (OAS2). Auftrennung in einem 1.5%igem Gel. **Abkürzungen:** ANF: *atrial natriuretic factor*, BMP-4: *bone morphogenic protein 4*, α -MHC: *α -myosin heavy-chain*.

Neben den in Abbildung 15 dargestellten Effekten wurden bei drei der über 38 Tage mit Doxyzyklin behandelten transgenen Mäuse keine Suppression des GATA-4 Gens festgestellt. Zudem sind 7 weibliche Mausmutanten ohne Doxyzyklin-Induktion verstorben, ohne dass sie phänotypisch auffällig waren. Die Untersuchung weiterer Organe (wie beispielsweise Lunge, Leber, Darm und Uterus) ergab keine signifikante Suppression der GATA-4 Expression (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigten die transgenen Mäuse - die älter als drei Monate waren - eine äußerst reduzierte Fertilität, weshalb eine kontinuierliche Expansion der Kolonie erheblich eingeschränkt war. Um die Ursache dieser eingeschränkten Fertilität zu klären, wurde in den weiteren Untersuchungen die GATA-4 Expression im Ovar und Hoden analysiert.

4.4.1 Suppression von GATA-4 im Ovar von Dox-induzierten Mausmutanten

Transgene und Wildtyp-Mäuse wurden mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser behandelt. Nach 38 Tagen wurde in den Ovarien der transgenen Mäuse per Real-Time PCR eine signifikante Suppression der GATA-4 Expression von $98\% \pm 3\%$ festgestellt (Abbildung 16). Zudem wurde in den Ovarien der transgenen Tiere eine leicht reduzierte Expression der GATA-4 Zielgene *bone morphogenic protein 4* (BMP-4) und *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), sowie eine leichte Reduktion der mRNA der *Müllerian inhibiting substance* (MIS) festgestellt. Auch in den Ovarien der transgenen Tiere wurde ein deutlicher Anstieg des Interferon-Zielgens *2'-5'-Oligoadenylat Synthetase* (OAS2) gefunden, welcher in den Wildtyp-Mäusen nicht detektiert wurde (Abbildung 16 B).

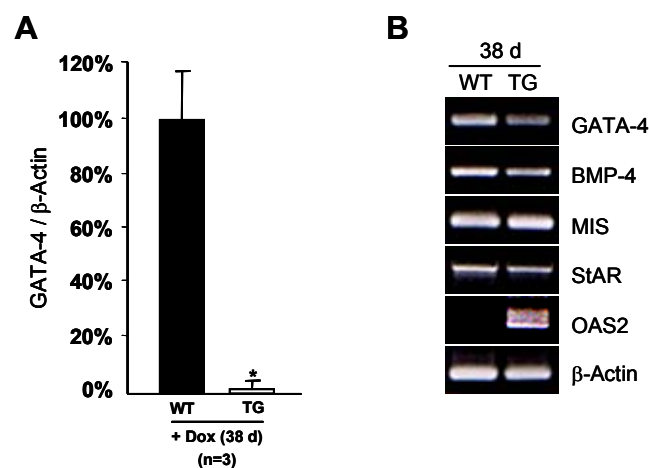


Abbildung 16: Effekt der shGATA-4 auf GATA-4 und seine Zielgene im Ovar. WT und TG Mäuse wurden über 38 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt. **(A)** Real-Time PCR Analyse der GATA-4 Expression im Ovar von WT und TG Mäusen nach Doxyzyklin-Behandlung. * $p < 0.05$. **(B)** RT-PCR Analyse von GATA-4, seinen Zielgenen und der 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase 2 (OAS2) im Ovar von WT und TG Mäusen, welche mit Doxyzyklin behandelt wurden. Die Auftrennung erfolgte in einem 1.5%igem Gel. **Abkürzungen:** BMP-4: *bone morphogenic protein 4*, MIS: *Müllerian inhibiting substance*, StAR: *steroidogenic acute regulatory protein*.

4.4.2 Suppression von GATA-4 im Hoden von Dox-induzierten Mausmutanten

Transgene und Wildtyp-Mäuse wurden mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser behandelt. Nach 29 und 38 Tagen war in den Hoden der transgenen Mäuse keine GATA-4 Expression per Real-Time PCR detektierbar (Abbildung 17 A). Die GATA-4 Suppression nach 38 Tagen wurde durch Western-Blot Analyse (Abbildung 17 C) bestätigt. Zudem wurde im Hoden der über 38 Tage behandelten transgenen Tiere eine reduzierte Expression der GATA-4 Zielgene *Müllerian inhibiting substance* (MIS) und *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) festgestellt. Weiterhin wurde auch in den Hodenproben der transgenen Tiere ein deutlicher

Anstieg des Interferon-Zielgens *2'-5'-Oligoadenylat Synthetase* (OAS2) detektiert, welcher bei den Wildtyp-Mäusen ausblieb (Abbildung 17 D).

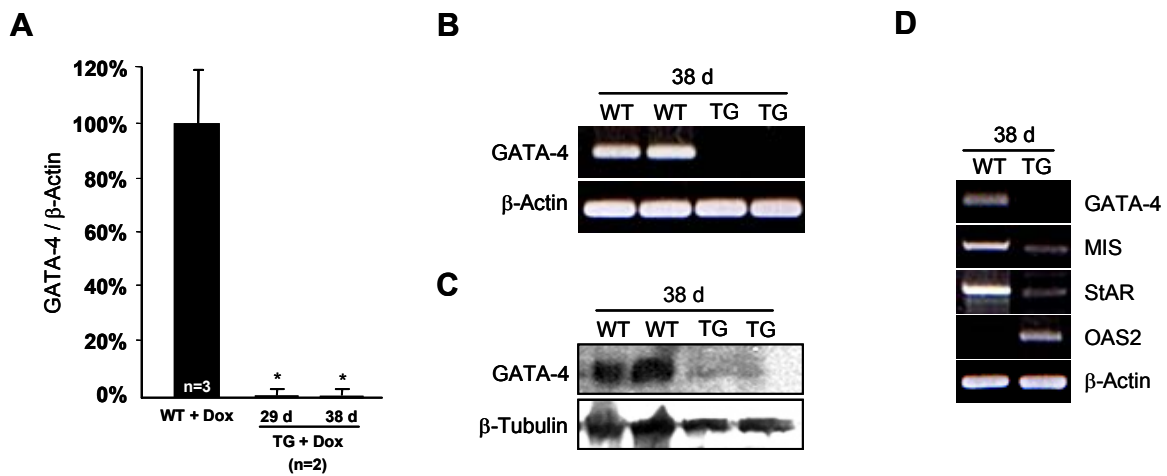


Abbildung 17: Effekt der GATA-4 siRNA auf GATA-4 und seine Zielgene im Hoden. WT und TG Mäuse wurden über 29 und 38 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt. **(A)** Real-Time PCR Analyse der GATA-4 Expression im Hoden von WT und TG Mäusen nach Doxyzyklin-Behandlung über 29 bzw. 38 Tage. * $p < 0.05$. **(B)** RT-PCR Analyse und **(C)** Western-Blot Analyse im Hodengewebe zweier WT und TG Mäuse, welche über 38 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt wurden (GATA-4 AK: rabbit polyclonal). **(D)** RT-PCR Analyse von GATA-4, seinen Zielgenen und der 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase 2 (OAS2) im Hoden von einer WT und TG Maus, nach 38 Tagen Doxyzyklin Behandlung. Die Auftrennung erfolgte in einem 1.5%igem Gel. **Abkürzungen:** MIS: *Müllerian inhibiting substance*, StAR: *steroidogenic acute regulatory protein*.

4.5 Entwicklung von Tumoren in mit Dox-behandelten Mausmutanten

Schließlich sollte die Auswirkung einer supprimierten GATA-4 Expression auf die Embryonal-Entwicklung untersucht werden. Dazu wurde ein transgenes Weibchen mit einem Wildtyp Männchen verpaart. Ab dem Tag e3.5 wurde das Weibchen mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser behandelt. Am Tag e10.5 wurde das Weibchen getötet, um die Embryonen zu isolieren und bezüglich der GATA-4 Expression zu untersuchen. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurde im Bereich des rechten Ovars eine Zyste entdeckt, während das linke Ovar deutlich erhalten war (Abbildung 18).

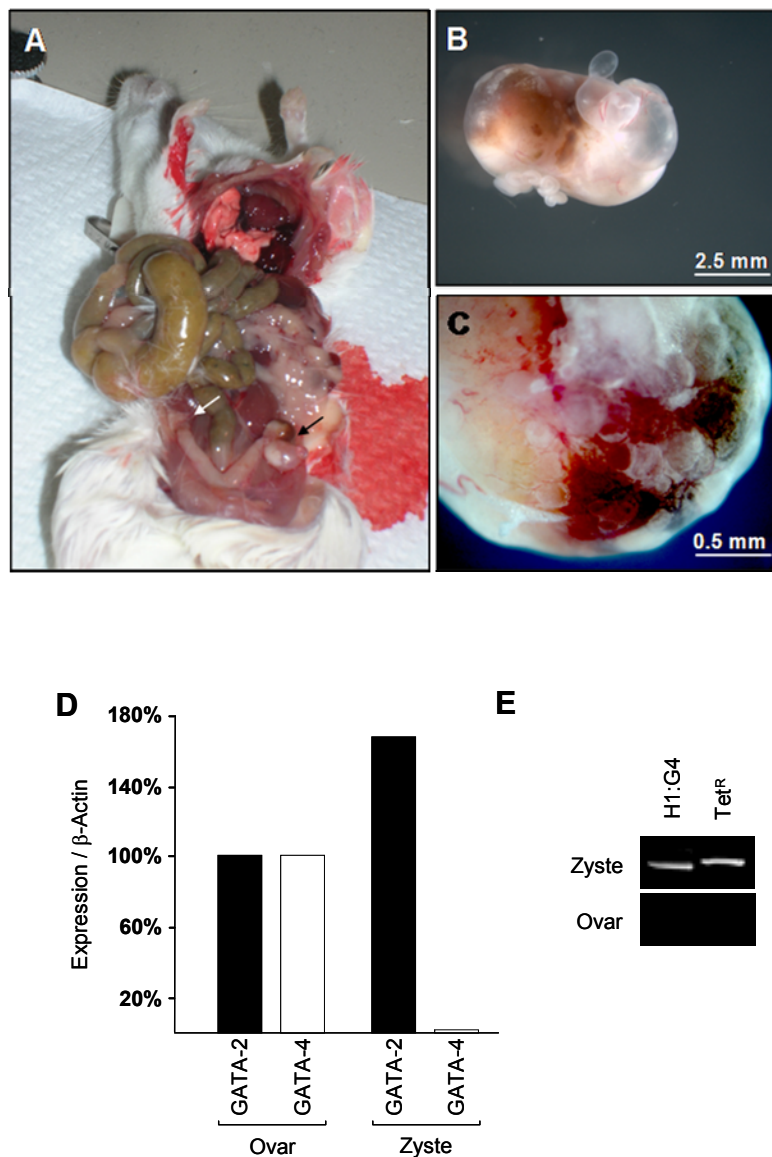


Abbildung 18: Entwicklung einer Ovarialzyste in einem WT Weibchen nach Kreuzung mit einem TG Männchen und anschließender Doxyzyklin-Induktion. Drei Tage nach Plaquebildung (e3.5) wurde das Weibchen mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser (inkl. 2 % Sucrose) behandelt. (A) Am Tag e10.5 wurde im Bereich des rechten Ovars eine Zyste entdeckt (schwarzer Pfeil, das Ovar war nicht mehr zu erkennen), während das linke Ovar deutlich zu erkennen war (weißer Pfeil). (B) 7.19-fache Vergrößerung der isolierten Zyste. (C) 22.7-fache Vergrößerung eines Teils der Zyste. (D) Real-Time PCR Analyse der GATA-2 und GATA-4 Expression in Zyste und Ovar. Zum Vergleich der Expressionen wurde die GATA-2 und GATA-4 Expression des linken Ovars als 100 % definiert. (E) Genotypisierung des linken Ovars und der Zyste durch PCR-Analyse genomischer DNA unter Verwendung transgenspezifischer Primer.

Neben dieser Zyste haben sich in zwei transgenen Weibchen, welche über 14 Tage und 21 Tage mit 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser behandelt wurden, weitaus interessantere Läsionen entwickelt. Diese wurden histologisch als Teratome identifiziert (Dr. Nanette Sarioglu, Institut für Pathologie und Paidopathologie CVK der Charité - Universitätsmedizin Berlin). Definitionsgemäß sind Teratome von pluripotenten Zellen ausgehende Tumore, welche Gewebetypen aller drei Keimblätter aufweisen.²⁷⁷ Bei dem ersten Teratom, welches nach 14-tägiger Doxyzyklin-Behandlung entnommen wurde, handelte es sich um ein reifes

Teratom mit ungeordnetem Arrangement differenzierter Strukturelemente, wobei Abkömmlinge aller drei Keimblätter vertreten waren. Besonders auffällig waren viele zystische Strukturen (Abbildung 19 B) mit z.T. mehrschichtigem verhornendem Plattenepithel mit Hautanhangsgebilden wie mukösem Drüsengewebe, enterokolische Schleimhaut, Fettgewebe, Knorpel und neuronalem Gewebe (Abbildung 19 C). Weiterhin fanden sich Nervenzellen (Abbildung 19 E), zylindrisches Epithel und Drüsengewebe (Abbildung 19 D) sowie Hornperlen (Abbildung 19 F).

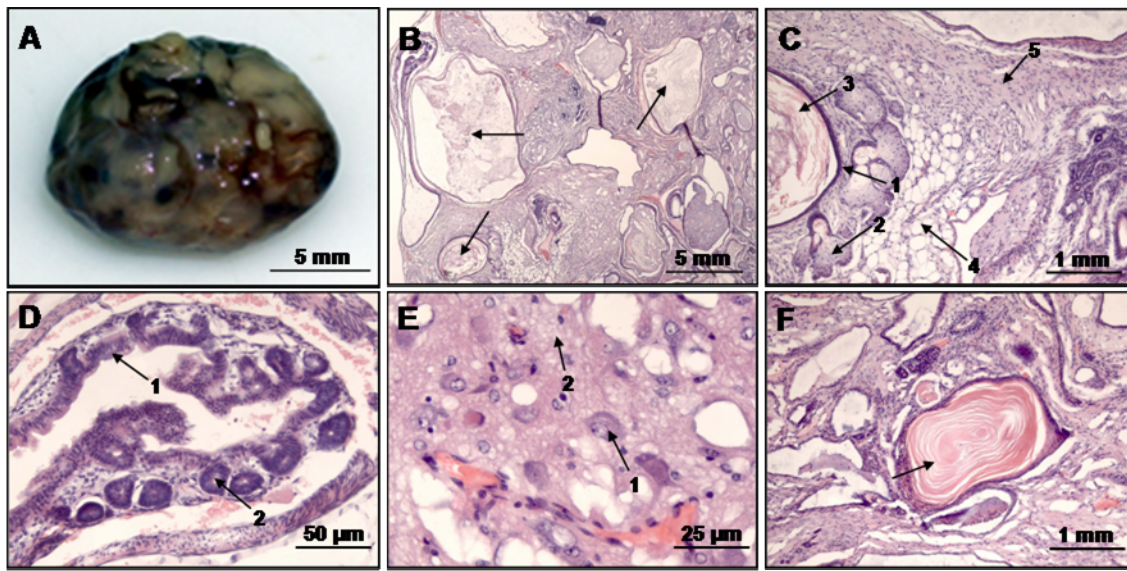


Abbildung 19: Entwicklung eines reifen und differenzierten Ovarialteratoms bei einer weiblichen Mausmutante nach Doxyzyklin-Induktion über 14 Tage. (A) Makroskopie. (B - F) Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen, (B) Übersicht, reifes und differenziertes Ovarialteratom, Pfeile: zystische Strukturen, (C) (1) mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel mit Hautanhangsgebilden wie (2) Drüsengewebe, (3) Epithelzyste, (4) Fettgewebe, ähnlich subkutanem Fettgewebe, (5) neuronales Gewebe, (D) (1) enterokolisches Epithel in einer Darm ähnlichen Schleimhaut, (2) Drüsengewebe, (E) (1) Neuronale Grundsubstanz des Teratoms mit ausgereiften Nervenzellen, (2) reichlich Gliazellen, (F) Hornperle.

Das zweite Teratom, welches nach 21-tägiger Doxyzyklin-Behandlung entnommen wurde, war hingegen anders angelegt. Es zeigte undifferenzierte Strukturen und wies z.T. ausgedehnte nekrotische Bereiche (Abbildung 20 B) sowie zahlreiche Mitosen auf. Es infiltrierte präexistente Wandstrukturen aus glatter Muskulatur. Die Nekrosen und der Mitosenreichtum deuten auf ein schnelles Tumorwachstum hin, die Infiltration ist ein sicheres Zeichen für Malignität.

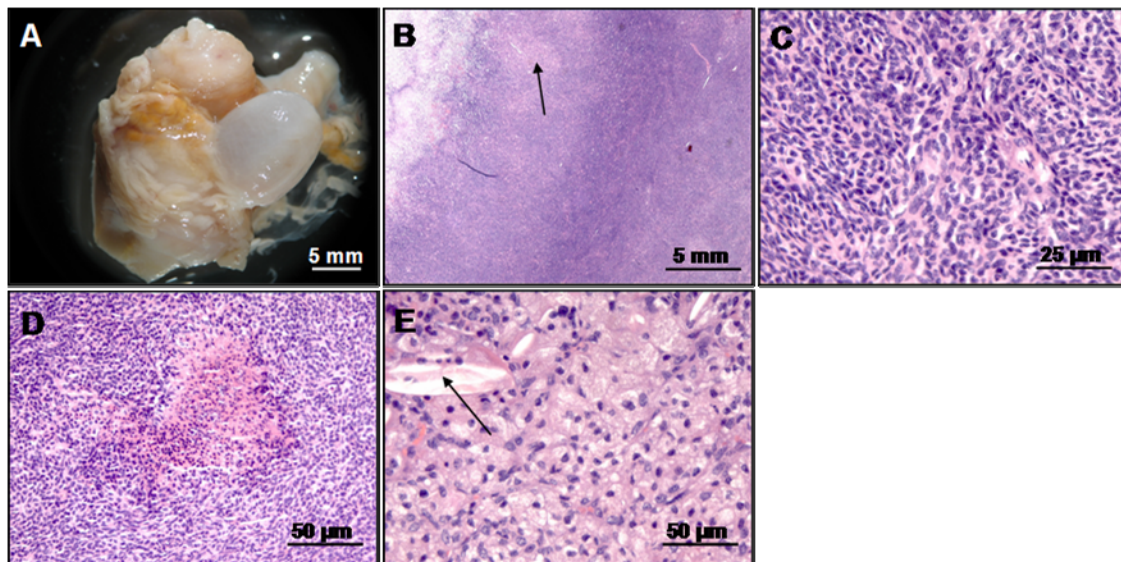


Abbildung 20: Entwicklung eines unreifen Ovarialteratoms bei einer weiblichen Mausmutante nach Doxyzyklin-Induktion über 21 Tage. (A) Makroskopische Aufnahme des Teratoms. (B - E) Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen. (B) Übersicht, undifferenziertes Ovarialteratom mit Nekrosen (Pfeil), (C) homogenes undifferenziertes Gewebe, möglicherweise neuronal, (D) exemplarische Nekrose, (E) Pfeil: Fettnadel.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Generierung und Etablierung eines Doxyzyklin-induzierbaren RNA-Interferenz Systems *in vivo* gezeigt. Mit dieser Mausmutante ist es gelungen, die GATA-4 Expression in der adulten Maus um mehr als 50 % zu supprimieren.

5.1 Doxyzyklin-induzierbare RNA-Interferenz *in vitro*

Die Etablierung des RNAi-Systems *in vitro* erfolgte in der murinen Myoblasten Zelllinie C2C12.²⁷⁸ Diese Zellen weisen eine starke GATA-4 Expression auf (Abbildung 5) und waren somit für diesen Abschnitt der Untersuchungen besonders geeignet. Durch Sequenzanalyse der mRNA von GATA-4 wurden zwei potentiell gegen GATA-4 gerichtete siRNA Sequenzen identifiziert (siGATA-4, Abbildung 6). Dabei wurde die Funktionalität des humanen Homologs der einen siGATA (siGATA-4/1) bereits in humanen Zellen beschrieben¹⁵⁷ und zudem durch weitere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt. Die murinen shRNA-Matrizen wurden in den shRNA-Expressionsvektor pTER²³⁹ kloniert (pTER:shGATA-4), in C2C12-Zellen transfiziert und nach vier Tagen bezüglich des GATA-4 Suppressionspotentials untersucht. Dabei wurde durch beide pTER:shGATA-4 Konstrukte eine leichte Reduktion der GATA-4 mRNA bewirkt (Abbildung 8 B, links), welche jedoch mit keinen phänotypischen Auffälligkeiten einherging. Diese nur leichte Reduktion ist vermutlich auf die geringe Transfektionseffizienz mit FuGene 6 zurückzuführen, welche selten mehr als 50 % beträgt und von vielen Faktoren (wie z.B. der Zelllinie oder dem Verhältnis zwischen Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz) abhängt.²⁷⁹ Da bei der Expressionsanalyse jedoch alle Zellen (transfiziert und untransfiziert) erfasst wurden, stellt die gemessene Suppression einen abgeschwächten Durchschnittswert dar. Somit war trotz des geringen Effekts von der Funktionalität beider pTER:shGATA-4 auszugehen; zudem haben die mitgeführten Kontrollen (pTER, shScram, Abbildung 8 B, links) keine Reduktion des GATA-4 mRNA Levels bewirkt. Zur Verifizierung wurde die GATA-4 Expression auf Protein-Level untersucht. Dabei wurde jedoch lediglich durch pTER:shGATA-4/1 eine Suppression festgestellt (Abbildung 8 C, links). Somit war davon auszugehen, dass pTER:shGATA-4/1 effektiver ist als pTER:shGATA-4/2. Solche Unterschiede in der Effektivität von shRNAs bzw. siRNAs sind primär auf die Komposition der jeweiligen Konstrukte zurückzuführen (vgl. 1.7.1.1).²⁸⁰ So könnte beispielsweise der Abbau der GATA-4 mRNA durch shGATA-4/1 effektiver sein als durch shGATA-4/2. Die Folge wäre eine zeitverzögerte Suppression des GATA-4 Protein-Levels,²⁸¹ welche nach vier Tagen noch nicht erfasst wurde. Aufgrund des

stärkeren Suppressionspotentials von pTER:shGATA-4/1 wurde dieses Konstrukt für die Etablierung des Doxyzyklin-induzierbaren Systems ausgewählt. Dazu wurden C2C12-Zellen stabil mit dem Tetrazyklin-Repressor kodierenden Plasmid pcDNA6/TR und dem pTER:shGATA-4/1 Plasmid transfiziert (Abbildung 8). Durch die Applikation von Doxyzyklin wurde in diesen Zellen die Suppression von GATA-4 auf Protein-Level induziert. Dabei wurde erwartungsgemäß ein dosisabhängiger Effekt festgestellt. Nach der Applikation von 5 µg/ml Doxyzyklin über sieben Tage wurde eine stärkere Suppression induziert als nach der Applikation von 2.5 µg/ml Doxyzyklin. Solche dosisabhängigen Effekte wurden zudem in *in vitro* Systemen beschrieben.²³⁸

5.2 Generierung der H1:G4/Tet^R Mausmutanten

Für die Generierung der H1:G4/Tet^R Mausmutanten wurden Maus-Eizellen des Strangs FvB verwendet. FvB Mäuse eignen sich besonders gut für die Generierung von Mausmutanten durch Mikroinjektion, da die künstlich befruchteten Eizellen große Vorkerne aufweisen, die Mäuse sehr fertil und die Wurfzahlen groß sind.²⁸² Für die Generierung der doppelt-transgenen Mausmutanten waren insgesamt 494 Injektionen künstlich befruchteter Eizellen und der anschließende Transfer von jeweils ca. 20 Embryonen in insgesamt 25 scheinschwangere Weibchen erforderlich (vgl. Tabelle 28), um letztendlich ein transgenes Tier mit der Integration beider Transgene zu erhalten. Durchschnittlich wurden 29 % der transferierten Embryonen ausgetragen, wobei der Anteil an transgenen Nachkommen bei unter 1 % lag. Diese Effizienzen lagen dabei deutlich unter der Erwartung von ca. 5 - 10 %.^{283,284} Obwohl bei der Injektion Nr. 3 (siehe Tabelle 28) aufgrund der sehr hohen und damit unwahrscheinlichen Anzahl ausgetragener Embryonen von 59 % (die Erwartung liegt bei 20 %²⁸⁴) ein technischer Fehler zu vermuten ist, ist die Ursache dieser geringen Effizienz mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das induzierbare shGATA-4 Konstrukt (H1:G4) zurückzuführen. Dafür spricht, dass neben der doppelt-positiven Mausmutante lediglich eine Mutante identifiziert wurde, welche das Konstrukt für den Tetrazyklin-Repressor (Tet^R) trug. Auch nach Verpaarung der doppelt-transgenen Mausmutante wurden lediglich Nachkommen mit beiden Transgenen oder nur dem Tet^R-Transgen identifiziert. Dieses Phänomen ist durch die beschriebene Letalität GATA-4 defizienter Mausmutanten zu erklären.^{35,36} Bei der ausschließlichen Integration des H1:G4-Konstruktes ist dieses aufgrund des Fehlens des Tet^R permanent aktiv. Dies führt zur kontinuierlichen Expression von shGATA-4, was einer homozygoten Deletion des GATA-4 Gens nahe kommt^{35,36} und demnach embryonal letal wäre.

Die Anzahl der Integrationen wurde mittels Southern-Blot Analyse untersucht. Dabei wurden Mutanten mit insgesamt 116 ± 12 Integrationen (H1:G4: 66 ± 4 Kopien, Tet^R: 50 ± 8 Kopien) bzw. 50 ± 8 Integrationen (H1:G4: 30 ± 4 Kopien, Tet^R: 20 ± 8 Kopien) identifiziert, was analog zu beschriebenen Mausmodellen zu erwarten war.^{284,285} Weiterhin wurde eine bevorzugte Integration des H1:G4-Konstrukts (ca. 60 %) gegenüber dem Tet^R-Konstrukt festgestellt.

Das Integrationsmuster der Transgene in dem Genom der Mausmutante wurde durch Southern-Blot Analyse untersucht. Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Tandemintegrationen festgestellt (Abbildung 12 C). Solche Phänomene wurden bereits beschrieben und treten bei der Generierung transgener Tiere durch Mikroinjektion häufig auf.^{285,286} Dieses Integrationsmuster bleibt über verschiedene Generationen erhalten, weshalb durch Kointegration beider Transgene von einer gekoppelten Vererbung auszugehen ist (Abbildung 12 C).

5.3 Optimierung der Doxyzyklin-Applikation im *in vivo* System

In ersten Untersuchungen wurden transgene und Wildtyp-Mäuse über unterschiedliche Zeiträume (7 - 28 Tage) mit Doxyzyklin-angereichertem Futter behandelt (200 mg Doxyzyklin pro kg Trockenfutter). In anschließenden Untersuchungen konnte jedoch keine Suppression der GATA-4 Expression festgestellt werden, was auf eine zu geringe Doxyzyklin-Konzentration im Serum der behandelten Mäuse zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde den Tieren in den weiterführenden Untersuchungen mit Doxyzyklin angereichertes Trinkwasser verabreicht, wobei die verwendeten Konzentrationen denen in der Literatur entsprachen (1 bis 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser).²⁸⁷⁻²⁹² Dabei wurde durch die Applikation von 20 mg Doxyzyklin pro ml Trinkwasser und ab einer Behandlungsdauer von 29 Tagen eine signifikante Suppression des GATA-4 Expressionslevels erreicht (Abbildung 15 A). Demnach war die Applikation des Doxyzyklins über das Trinkwasser effizienter, was ebenfalls durch die Bestimmung der Doxyzyklin-Konzentration im Serum der behandelten Mäuse bestätigt wurde (vgl. 4.3.2). Vergleicht man die verabreichten Doxyzyklin-Mengen (200 mg/kg Trockenfutter bzw. 20 mg/ml Trinkwasser) unter Berücksichtigung der physiologischen Eigenschaften der Maus (Futteraufnahme: 3 - 6 g pro Tag, Wasseraufnahme: 4 - 7 ml pro Tag), so lässt sich dieser Befund zudem aus theoretischer Sicht bestätigen (Doxyzyklin-Aufnahme über das Futter: 0.6 - 1.2 mg pro Tag, Doxyzyklin-Aufnahme über das Trinkwasser: 80 - 140 mg pro Tag). Es bleibt jedoch unklar, warum für

die Induktion der shGATA-4 diese hohe Doxyzyklin-Dosierung von 20 mg/ml notwendig ist. Möglicherweise steht die Doxyzyklin-Konzentration im Serum mit den in der Maus zur Verfügung stehenden Tet^R-Proteinen bzw. der Anzahl der integrierten Tet^R-Transgene im dosisabhängigen Zusammenhang. Diese Frage kann jedoch nicht eindeutig geklärt werden, da Mausmutanten, die ebenfalls auf dem Tetrazyklin-System basieren und für die Induktion eine deutlich geringere Doxyzyklin-Konzentration benötigen, nicht bezüglich der Anzahl der Transgene untersucht wurden.^{275,287,289} Es ist jedoch davon auszugehen, dass durch die Verwendung von 20 mg/ml Doxyzyklin keine toxischen Effekte ausgelöst wurden. Dies wurde durch eine Langzeituntersuchung belegt, bei welcher Wildtyp-Mäuse mit 20 mg/ml Doxyzyklin über 70 Tage behandelt wurden. Während des Versuchs haben sich die Mäuse weder auffällig verhalten noch sind sie erkrankt oder haben eine toxische Doxyzyklin-Konzentration von 30 mg/l im Serum erreicht (vgl. 4.3.2). Weiterhin wurden bei der anschließenden Autopsie keine Auffälligkeiten festgestellt. Ferner hatte die Langzeitbehandlung mit Doxyzyklin keinen Effekt auf die GATA-4 Expression der Wildtyp-Mäuse (Abbildung 14).

5.4 Funktionalität der Mausmutante

Anhand des optimierten Applikationsprotokolls für Doxyzyklin (20 mg/ml über das Trinkwasser) wurden longitudinale Untersuchungen zur Suppression von GATA-4 am adulten Herzen transgener Mäuse durchgeführt. Dabei wurde ab 29 Tagen Doxyzyklin-Behandlung eine signifikante Suppression von GATA-4 festgestellt. Die maximale Suppression wurde nach 38 Tagen erreicht, wobei sich die Effizienz der Suppression zwischen den jeweiligen Endpunkten (29 Tage, 38 Tage und 70 Tage) nicht signifikant unterschieden hat. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen eine maximale Doxyzyklin-Behandlungsdauer von 38 Tagen gewählt.

5.4.1 GATA-4 Suppression im Herzen

Die Behandlung von H1:G4/Tet^R Mausmutanten mit Doxyzyklin führte zeitabhängig zu einer signifikanten GATA-4 Suppression von maximal 78 % nach 38 Tagen (Abbildung 15 A). Obwohl diese Mäusen eine dramatische Suppression der Expression von GATA-4-Zielgenen (ANF, BMP-4) zeigten (Abbildung 15 C), wurden keine phänotypischen Auffälligkeiten festgestellt. Dies lässt vermuten, dass sich das hier erreichte Expressionslevel von GATA-4 für die Funktion des Herzens der adulten Maus nicht so kritisch darstellt wie es bei der

Entwicklung der embryonalen Maus beschrieben wurde.^{35,36} Diese Hypothese lässt sich durch eine kürzlich erschienene Studie bestätigen, in welcher eine konditionelle *gata-4* Deletionsmutante generiert wurde (vgl. 1.3.1).⁶⁴ Diese Mausmutante weist einen geflochtenen *gata-4* Locus auf (Exon III, IV und V), welcher sich durch eine Cre-Rekombinase deletieren lässt. Die Cre-Rekombinase steht dabei unter der Kontrolle eines α -MHC oder β -MHC-Promotors. α -MHC und β -MHC werden im murinen Herzen entwicklungsabhängig exprimiert, wodurch eine herzspezifische Deletion von *gata-4* zu verschiedenen Zeitpunkten möglich ist. Nach Deletion des *gata-4*-Gens war die GATA-4 Expression um 70 % (α -MHC-Promotor) bzw. 95 % (β -MHC-Promotor) reduziert. Auch diese Mausmutanten zeigten trotz einer deutlichen Reduktion von GATA-4-Zielgenen (z.B. ANF) keine phänotypischen Auffälligkeiten. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch Dysfunktionen des Herzens, welche sich mit abnehmender GATA-4 Expression verstärken. Zudem blieb bei den Mutanten nach Druckbelastung eine myokardiale Hypertrophie aus. Die Lebenserwartung der Mutanten war hingegen uneingeschränkt.⁶⁴ Bei den mit Doxyzyklin induzierten H1:G4/Tet^R Mausmutanten wurden keine routinemäßigen Analysen zur Funktion des Herzens durchgeführt. Stichprobenartig wurde jedoch die Herzfunktion einer induzierten Mutante mittels Elektrokardiogramm (EKG) untersucht, welches unauffällig war (Daten nicht gezeigt). Auch wenn die (biologischen) Varianzen innerhalb der einzelnen Gruppen mit ca. 20 % relativ groß waren (Abbildung 15 A), handelte es sich bei der GATA-4-Suppression nach 29, 38 und 70 Tagen um signifikante Effekte ($p < 0.05$). Zudem wurde die Suppression von GATA-4 sowohl durch RT-PCR (Abbildung 15 C) als auch durch Western-Blot Analyse (Abbildung 15 B) bestätigt. Letztendlich nahm in den mit Doxyzyklin behandelten Mausmutanten die Expression der GATA-4 Zielgene ANF und BNP-4 deutlich ab (Abbildung 15 C). Diese Daten belegen die Funktionalität der induzierbaren shGATA-4 Mausmutante.

5.4.1.1 α -MHC Expression

Überraschend war, dass die supprimierte GATA-4 Expression keinen Einfluss auf das Expressionslevel des GATA-4 Zielgens α -MHC hatte, obwohl α -MHC als ein direktes Zielgen von GATA-4 beschrieben wurde.^{107,131} Die α -MHC-Expression nahm mit zunehmender Dauer der Doxyzyklin-Behandlung sowohl in den Mausmutanten als auch in den Wildtyp-Mäusen zu (Abbildung 15 C). Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise durch die Biologie von α -MHC und β -MHC erklären: Während der Embryogenese wird im embryonalen Herzen primär β -mhc exprimiert. Direkt nach der Geburt wird die Expression

von β -*mhc* durch Schilddrüsenhormone reprimiert, während die Expression von α -*mhc* stimuliert wird.²⁹³ Der kontinuierliche Anstieg der α -*mhc* Expression zwischen den Versuchsgruppen könnte somit auf das Alter der Tiere zurückzuführen sein.

Weiterhin ist denkbar, dass die α -*mhc* Expression im Zusammenhang mit der Applikation von Doxyzyklin steht. So wurde beschrieben, dass die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit Doxyzyklin zu einer schwarzen Pigmentierung der Schilddrüse führen kann.^{294,295} Auch wenn in den mit Doxyzyklin behandelten Mäusen keine Auffälligkeiten der Schilddrüse festgestellt wurden, könnte die Applikation von Doxyzyklin zu einer vergleichbaren Veränderung der Schilddrüse geführt haben. In Folge dessen könnte es zur verstärkten Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen gekommen sein, wodurch die Expression von α -*mhc* deutlich stimuliert wurde. In diesem Fall würde zudem eine durch ein supprimiertes GATA-4-Expressionslevel induzierte Reduktion von α -*mhc* kompensiert werden.

5.4.1.2 Kompensatorische Effekte

Mausmutanten mit einer deutlichen Suppression von GATA-4 (> 50 %) zeigten keine kardialen Auffälligkeiten. Somit ist zu vermuten, dass eine schwache GATA-4 Basisexpression bereits für die normale Funktion des adulten Herzens ausreichend ist. Zudem sind kompensatorische Effekte durch andere Faktoren - wie beispielsweise GATA-6 - denkbar. So weisen GATA-4 defiziente Mausmutanten eine verstärkte Expression von GATA-6 auf.³⁶ Weiterhin zeigen Mausmutanten mit heterozygoter *gata-4* oder *gata-6* Deletion keine phänotypischen Auffälligkeiten, während Mutanten mit einer heterozygoten Doppeldeletion von *gata-4* und *gata-6* um den Tag e13.5 versterben.²⁹⁶ Ferner werden GATA-4 und GATA-6 aufgrund ähnlicher Expressionmuster redundante Funktionen zugesprochen.^{53,78,131}

5.4.2 GATA-4 Suppression in den Gonaden und eingeschränkte Fertilität

Während der Untersuchungen wurde erstaunlicherweise eine stark eingeschränkte Fertilität der H1:G4/Tet^R Mausmutante beobachtet. Da GATA-4 in den Gonaden der Maus exprimiert wird^{50,79,80} und an der Regulation zahlreicher geschlechtsspezifischer Gene^{51,82-87,90} beteiligt ist, wurde die GATA-4 Expression im Ovar und Hoden induzierter Mausmutanten untersucht. Dabei wurde nach 38 Tagen Doxyzyklin-Behandlung eine nahezu vollständige Suppression von GATA-4 sowohl im Ovar (Abbildung 16) als auch im Hoden (Abbildung 17) festgestellt. Weiterhin wurde in Ovar und Hoden der induzierten Mutanten eine deutliche Suppression von

geschlechtsspezifischen Zielgenen (MIS, StAR) festgestellt. Die Zielgene des Hodens wurden dabei weitaus stärker supprimiert als die im Ovar. Dieses Phänomen könnte u.a. an der Verfügbarkeit des Kofaktors FOG-2 liegen. FOG-2 wird im Hoden der adulten Maus stärker exprimiert als im Ovar.⁷⁹ Da die Interaktion von FOG-2 und GATA-4 die Expression der Zielgene überwiegend reprimiert,^{133,174-176} könnte die Effizienz der Suppression im Hoden somit auf die FOG-2 Expression zurückzuführen sein.

Weiterhin war auffällig, dass die Doxyzyklin-induzierte shGATA-4 das GATA-4 Expressionslevel in den Gonaden wesentlich effektiver supprimierte als im Herzen (Abbildung 15). Dieser Effekt könnte u.a. auf multipotente Stammzellen des Herzens zurückzuführen sein, welche nach kardialen Stress zu Kardiomyozyten differenzieren.²⁹⁷ So wäre es möglich, dass Kardiomyozyten mit stark supprimierter GATA-4 Expression aufgrund einer verminderten Bcl-2 Expression apoptotisch werden und durch neue Kardiomyozyten ersetzt werden. Diese würden zunächst eine normale GATA-4 Expression zeigen und in Folge dessen den Effekt durch shGATA-4 abschwächen. Weiterhin zeigen gestresste kardiale Muskelzellen, die noch nicht apoptotisch sind, eine temporäre Zunahme der GATA-4 Expression.²⁹⁸ Diese Zunahme an GATA-4 könnte zudem den Effekt durch shGATA-4 abschwächen. Ferner wurde gezeigt, dass durch eine Doxyzyklin-Behandlung embryonaler Stammzellen die Expression von GATA-4 stimuliert wird. Parallel wurde das kardiale Markergen Nkx2.5 induziert.²⁹⁹ Somit wäre es möglich, dass ein Teil der kardialen Stammzellen durch die Doxyzyklinbehandlung *per se* zu Kardiomyozyten differenzieren und den Effekt der GATA-4 Suppression kompensieren. Eine Kombination der *kompensatorischen* Effekte hat vermutlich dazu geführt, dass shGATA-4 in den Gonaden wesentlich effizienter war als im Herzen.

Die dramatische Reduktion der Fertilität ist vermutlich auf diese Effizienz der shGATA-4 in den Gonaden zurückzuführen. In anfänglichen Untersuchungen wurde die Expression von GATA-4 in transgenen Mäusen ohne Doxyzyklin-Behandlung untersucht. Dabei zeigten die Mausmutanten eine GATA-4-Suppression von 25 % (Abbildung 14). Diese Suppression ist auf einen *Leaky*-Effekt des verwendeten Induktionssystems zurückzuführen, welcher bei dieser Art von Systemen häufig beobachtet wurde.^{275,300,301} Ausgelöst werden diese Effekte durch eine schwache und unkontrollierbare Basisexpression des jeweiligen Transkripts, welches unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors steht. So wurde vermutlich in den H1:G4/Tet^R Mausmutanten die shGATA permanent exprimiert, was über die Suppression von essentiellen GATA-4 Zielgenen der Gonaden zu der dramatischen Einschränkung der Fertilität führte. Dieser Effekt manifestierte sich als Folge einer permanenten und zeitabhängigen

Zunahme an funktionellen siGATA-4s in der Maus, weshalb das Problem bei Mäusen im Alter von 4 - 8 Wochen noch nicht aufgetreten war. Die starke Ausprägung des *Leaky*-Effekts von 25 % ist vermutlich auf die hohe Anzahl integrierter H1:G4-Konstrukte (66 ± 4 Kopien) in den Mausmutanten zurückzuführen (Abbildung 11 und 5.2). Obwohl die Expression des Tet^R mit der Expression des stark-exprimierten *housekeeping*-Gens GAPDH vergleichbar war (Abbildung 13 A), erfolgte vermutlich keine vollständige Absättigung der TO-Bindungsstellen. Diese Effekte könnten möglicherweise durch das gezielte Einbringen von nur einer Kopie des jeweiligen Konstruktes bzw. einem einzelnen Konstrukt, welches beide Elemente trägt, vermieden werden. Dass solche Ansätze prinzipiell funktionieren, wurde kürzlich durch die Generierung einer Mausmutante belegt, bei welcher nur eine Kopie eines shRNA-Transgens pro Zelle für einen ubiquitären *knockdown* ausreichend war.²⁷⁴ Die in dieser Arbeit angewandte Strategie zielte jedoch ursprünglich auf die Generierung von Mausmutanten mit unterschiedlichen Integrationsverhältnissen der beiden Transgene. Anhand dieser sollte die optimale Konstellation der Konstrukte bezüglich der Doxyzyklin-Induzierbarkeit des H1:G4-Transgens bestimmt werden. Da jedoch nur eine Mausmutante mit dem angestrebten Genotyp generiert werden konnte (Tabelle 28), war es nicht möglich, diesen Aspekt zu untersuchen.

Möglicherweise hätte die Infertilität der Mausmutanten durch eine hormonelle Behandlung mit FSH bzw. LH therapiert werden können. Die Freisetzung dieser Hormone erfolgt über die Stimulation durch GnRH, welches als Zielgen von GATA-4 beschrieben wurde.⁸⁸ Ob diese Therapie den erwünschten Erfolg gebracht hätte, ist jedoch fraglich, da nicht alle Zielgene von GATA-4 durch diese Signalkaskade aktiviert werden.

5.5 Auslösung unspezifischer Effekte in der Mausmutante

Bei allen induzierten Mausmutanten wurde neben den spezifischen Effekten auch ein Anstieg der OAS2-Expression festgestellt (Abbildung 15 C, Abbildung 16 B, Abbildung 17 D), wobei OAS2 durch eine unspezifische Interferonantwort induziert wird (1.7.2). Die Auslösung der Interferonantwort ist dabei auf eine Übersättigung der Zellen mit shGATA-4 bzw. siGATA-4 zurückzuführen, welche aufgrund der vielen H1:G4-Transgene entstehen. Bei den induzierten Mausmutanten ist jedoch von keiner starken Interferonantwort auszugehen, was durch folgende Punkte erläutert werden soll:

- (1) Mäuse mit einer ausgeprägten Interferonantwort werden teilweise tot geboren³⁰² bzw. versterben innerhalb von 8 Wochen.³⁰³
- (2) Bei allen durchgeführten Experimenten wurden keine Unterschiede in der mRNA- und Protein-Expression der Kontrollgene festgestellt, so dass weder von einer unspezifischen Inhibition der Proteinbiosynthese²⁴⁷ noch von einem unspezifischen Abbau von RNA²⁴⁸ auszugehen ist (1.7.2). Bei einer ausgeprägten Interferonantwort wurde ein solcher Abbau beschrieben. Aufgrund der eigenen Langzeituntersuchungen (Abbildung 14) ist weiterhin auszuschließen, dass innerhalb des gewählten Zeitfensters ein möglicher Abbau der stark exprimierten *housekeeping* Gene nicht erfasst wurde.
- (3) Die H1:G4-Transgene wurden über die Generationen weitergegeben, was bei einigen transgenen Mäusen mit einer deutlichen Interferonantwort nicht der Fall war.³⁰²

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die induzierte Immunantwort für die Funktion und das Überleben der Mausmutanten nicht relevant war. Zudem könnten weitere Parameter bei der Ausprägung sowie bei der Kompensation von diesen und anderen Effekten eine Rolle spielen, wie beispielsweise der Mausstrang^{67,68} und das Individuum *per se*. So sind während der Untersuchungen sieben weibliche Mausmutanten ohne Doxyzyklin-Induktion spontan verstorben, während bei drei mit Doxyzyklin behandelten Mausmutanten keine Suppression von *gata-4* festgestellt wurde. Solche Phänomene wurden ebenfalls in anderen Arbeiten beschrieben,²⁷³ jedoch konnten die genauen Ursachen nicht geklärt werden.

5.6 Entwicklung von Tumoren in mit Doxyzyklin behandelten Mausmutanten

Ein besonders interessanter Befund war die Ausbildung von Tumoren nach Doxyzyklin-Induktion. Dabei wurden sowohl die Ausbildung einer Ovarialzyste als auch zwei Ovarialteratome beobachtet. Die Ovarialzyste entstand in einem Wildtyp-Weibchen (Abbildung 18 A), welches zuvor mit einem transgenen Männchen verpaart und anschließend mit Doxyzyklin behandelt wurde. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass diese Zyste transgen war (Abbildung 18 E) und kein GATA-4 exprimierte (Abbildung 18 D). Die Ursache der Entstehung der Zyste ist unklar, jedoch ist aufgrund des transgenen Charakters die Fehlentwicklung einer befruchteten Eizelle denkbar. Diese könnte dabei auf die Induktion der shGATA-4 am Embryonaltag 3.5 zurückzuführen sein. In diesem Fall wäre jedoch ein ähnlicher Verlauf wie bei den homozygoten GATA-4 *knockout*-Mäusen zu erwarten,^{35,36} bei welchem die Embryonen um den Tag e8.5 und e10.5 versterben. Zudem bilden sich bei der

Entwicklung bzw. dem Absterben der GATA-4 *knockout* Embryonen keine Ovarialzysten aus. Somit ist zu vermuten, dass die Doxyzyklin-Behandlung *per se* mit der Fehlentwicklung des Embryos bzw. der Entwicklung der Zyste assoziiert ist. Dafür spricht, dass die Behandlung von schwangeren Mäusen mit Doxyzyklin teilweise zum Absterben von Embryonen führte.²⁸⁸ Wahrscheinlich hat jedoch die Kombination beider Effekte die Ausbildung dieser Ovarialzyste begünstigt. Weiterhin bleibt zu diskutieren, ob es sich bei der Ovarialzyste um die Vorstufe eines Ovarialteratoms handelte. So könnte das kurze Versuchsdesign über sieben Tage nicht ausreichend gewesen sein, um die Entwicklung eines Ovarialteratoms zu unterstützen.

Weiterhin bildeten sich in zwei transgenen Weibchen Ovarialteratome aus. Das erste Teratom entwickelte sich nach einer Doxyzyklin-Behandlung über 14 Tage und war stark differenziert (Abbildung 19), während das zweite Teratom nach einer Doxyzyklin-Behandlung über 21 Tage entstand und undifferenziert erschien (Abbildung 20). Histologisch konnte in dem differenzierten Teratom die Anlage aller drei Keimblätter nachgewiesen werden. So wurden sowohl endodermale Strukturen (zylindrisches Epithel und Drüsengewebe, Abbildung 19 D), mesodermale Strukturen (Fettgewebe, Abbildung 19 C) und ektodermale Strukturen (neurales Gewebe, Abbildung 19 E) identifiziert. Das undifferenzierte Teratom zeigte hingegen überwiegend ektodermale Strukturen (möglicherweise neuronal, Abbildung 20 C). Zudem deuteten zahlreiche nekrotische Bereiche (Abbildung 20 B) und Fettnadeln (Abbildung 20 E) auf ein schnelles Wachstum hin. Da in den histologischen Präparaten nur wenig Gefäßanschnitte sichtbar waren, sind die Nekrosen vermutlich aufgrund einer verminderten Blutversorgung entstanden. GATA-4 ist primär an der Entwicklung und Differenzierung des Endoderms und Mesoderms beteiligt,^{7,33} weshalb die dominanten ektodermalen Strukturen des undifferenzierten Teratoms auf die supprimierte GATA-4 Expression in der Mausmutante zurückzuführen sein könnten. Durch immunhistochemische Untersuchungen sollte die GATA-4-Expression in den Teratomen untersucht werden, wobei weder in den Teratomen noch in den Positivkontrollen (embryonales Herz, e11.5) GATA-4 detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit war von einer (Hitze) Beschädigung der GATA-4 Epitope während der Paraffineinbettung auszugehen. Diese Vermutung wurde durch immunhistochemische Untersuchungen kryokonservierter Positivkontrollen (embryonale Herzen, e11.5) bestätigt, bei welchen eine deutliche Detektion von GATA-4 gelang (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die Daten eine Beteiligung von GATA-4 an der (ovariellen) Tumorgenese vermuten lassen, sind die genauen molekularen Ursachen in diesem Modell nicht geklärt. So haben ca. 10 % der mit Doxyzyklin behandelten transgenen Weibchen Ovarialteratome ausgebildet,

während die verbleibenden 90 % solche phänotypischen Auffälligkeiten nicht zeigten. Ursache dafür könnte das Zusammentreffen verschiedener Faktoren sein (Stärke der GATA-4 Suppression, genetischer Hintergrund, das Individuum *per se*), welche die Tumorentstehung begünstigen. Zudem könnte der Integrationsort der Konstrukte in dem Genom der Maus an der Entstehung der Teratome beteiligt sein.

Ob die Ausbildung der Teratome möglicherweise durch ein reduziertes GATA-4 Expressionslevel induziert wurde, ist jedoch nicht klar, da das Zellzyklus-Protein Cyclin D1 durch GATA-4 und *Kruppel-like factor 13* (KLF13) aktiviert wird.¹⁴⁸ Cyclin D1 ist bei der Zellteilung und dem anschließenden Übergang von der G1-Phase in die S-Phase von Bedeutung.³⁰⁴ Eine reduzierte GATA-4 Expression würde demnach mit einer verminderten Expression von Cyclin D1 einhergehen und einer Tumorbildung entgegenwirken. Zudem würde die Apoptose der Zellen begünstigt werden, da in somatischen Zellen des Ovars das Bcl-2 Gen durch GATA-4 aktiviert wird.³⁰⁵ Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass kompensatorische Effekte diesen Signalkaskaden entgegenwirken.

5.7 Schlussfolgerung

Für die Funktion des adulten Maus Herzens hat der Transkriptionsfaktor GATA-4 offensichtlich nur eine begrenzte Relevanz. Mausmutanten, bei denen die GATA-4 Expression um ca. 80 % supprimiert wurde, zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Diese Ergebnisse werden durch eine Arbeit bestätigt, in welcher die GATA-4 Expression des Herzens sogar um 95 % supprimiert wurde.⁶⁴ Bei diesen Mäusen wurden jedoch leichte Dysfunktionen des Herzens festgestellt, welche unter Druckbelastung verstärkt auftraten. Diese Resultate waren erstaunlich, da GATA-4 für die Entwicklung des embryonalen Herzens essentiell ist.^{35,36}

Für die Funktion der Gonaden scheint GATA-4 hingegen essentiell zu sein. So führt der nahezu vollständige *knockdown* von GATA-4 zur deutlichen Suppression gonadenspezifischer Zielgene. Dabei wurden die Zielgene im Hoden stärker supprimiert als die Zielgene im Ovar. Aufgrund eines *Leaky*-Effekts der Mausmutante und der damit einhergehenden Suppression des GATA-4 Expressionslevels wurde eine ausgeprägte Infertilität der Kolonie beobachtet.

Weiterhin könnte eine reduzierte GATA-4 Expression mit der Ausbildung von Ovarialteratomen assoziiert sein. Inwieweit die Ausbildung dieser Teratome zudem mit der genetischen Modifikation der Mausmutanten in Verbindung steht ist nicht geklärt.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die besondere Relevanz des Transkriptionsfaktors GATA-4 für die Reproduktionsorgane gezeigt. Aufgrund der technisch bedingten Infertilität der Mausekolonie konnten bislang keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden. In weiterführenden Untersuchungen sollte deshalb die Bedeutung von GATA-4 für den reproduktiven Apparat näher charakterisiert werden. Dazu könnten zum einen konditionelle *knockout*-Mausmutanten generiert werden, bei welchen *gata-4* gezielt in den Reproduktionsorganen ausgeschaltet werden kann. Auch die Applikation von siRNAs gegen GATA-4 über die Schwanzvene wäre denkbar. Weiterhin sollte bei Infertilität das Expressionslevel von GATA-4 in Ovar und Hoden untersucht werden. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Ovarialzysten, -Tumoren und -Teratomen und GATA-4 untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Lowry, J. A. & Atchley, W. R.** Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol* 50, 103-15 (2000).
2. **Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H. & Wilson, D. B.** Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235-46 (1993).
3. **Ko, L. J. & Engel, J. D.** DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13, 4011-22 (1993).
4. **Morrissey, E. E., Ip, H. S., Tang, Z. & Parmacek, M. S.** GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem* 272, 8515-24 (1997).
5. **Merika, M. & Orkin, S. H.** DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 3999-4010 (1993).
6. **Mackay, J. P. & Crossley, M.** Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci* 23, 1-4 (1998).
7. **Molkentin, J. D.** The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-52 (2000).
8. **Yang, H. Y. & Evans, T.** Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol* 12, 4562-70 (1992).
9. **Tremblay, J. J., Hamel, F. & Viger, R. S.** Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology* 143, 3935-45 (2002).
10. **Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. & Crossley, M.** Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J* 18, 2812-22 (1999).
11. **Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J. & Nemer, M.** The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 16, 5687-96 (1997).
12. **Patient, R. K. & McGhee, J. D.** The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 12, 416-22 (2002).
13. **Weiss, M. J. & Orkin, S. H.** GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23, 99-107 (1995).
14. **Orkin, S. H.** GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-81 (1992).

15. **Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H. & Costantini, F.** Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-60 (1991).
16. **Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. & Orkin, S. H.** Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-8 (1996).
17. **Martin, D. I., Zon, L. I., Mutter, G. & Orkin, S. H.** Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344, 444-7 (1990).
18. **Crotta, S., Nicolis, S., Ronchi, A., Ottolenghi, S., Ruzzi, L., Shimada, Y., Migliaccio, A. R. & Migliaccio, G.** Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF-dependent myeloid cell lines. *Nucleic Acids Res* 18, 6863-9 (1990).
19. **Romeo, P. H., Prandini, M. H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G. & Uzan, G.** Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 344, 447-9 (1990).
20. **Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J. D. & Yamamoto, M.** Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362, 466-8 (1993).
21. **Orlic, D., Anderson, S., Biesecker, L. G., Sorrentino, B. P. & Bodine, D. M.** Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4601-5 (1995).
22. **Labbaye, C., Valtieri, M., Barberi, T., Meccia, E., Masella, B., Pelosi, E., Condorelli, G. L., Testa, U. & Peschle, C.** Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest* 95, 2346-58 (1995).
23. **Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. & Orkin, S. H.** Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 210, 305-21 (1999).
24. **Tsai, F. Y. & Orkin, S. H.** Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-43 (1997).
25. **Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W. & Orkin, S. H.** An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-6 (1994).
26. **Zhou, Y., Lim, K. C., Onodera, K., Takahashi, S., Ohta, J., Minegishi, N., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Yamamoto, M. & Engel, J. D.** Rescue of the embryonic lethal

-
- hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *Embo J* 17, 6689-700 (1998).
27. **Persons, D. A., Allay, J. A., Allay, E. R., Ashmun, R. A., Orlic, D., Jane, S. M., Cunningham, J. M. & Nienhuis, A. W.** Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* 93, 488-99 (1999).
 28. **Ohneda, K. & Yamamoto, M.** Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol* 108, 237-45 (2002).
 29. **Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F. & Karis, A.** Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol* 29, 1912-8 (1999).
 30. **Lim, K. C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F. & Engel, J. D.** Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet* 25, 209-12 (2000).
 31. **Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D. & Lindenbaum, M. H.** Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11, 40-4 (1995).
 32. **Chen, D. & Zhang, G.** Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis. *Exp Hematol* 29, 971-80 (2001).
 33. **Charron, F. & Nemer, M.** GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol* 10, 85-91 (1999).
 34. **Morrissey, E. E., Ip, H. S., Lu, M. M. & Parmacek, M. S.** GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 177, 309-22 (1996).
 35. **Kuo, C. T., Morrissey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C. & Leiden, J. M.** GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-60 (1997).
 36. **Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A. & Olson, E. N.** Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-72 (1997).
 37. **Narita, N., Bielinska, M. & Wilson, D. B.** Wild-type endoderm abrogates the ventral developmental defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol* 189, 270-4 (1997).
 38. **Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C. A., Narita, N., Saffitz, J. E., Simon, M. C., Leiden, J. M. & Wilson, D. B.** Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* 121, 3877-88 (1995).
-

-
39. **Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki Ji, J. & Niwa, H.** Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* 16, 784-9 (2002).
 40. **Grepin, C., Nemer, G. & Nemer, M.** Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 124, 2387-95 (1997).
 41. **Morrissey, E. E., Ip, H. S., Tang, Z., Lu, M. M. & Parmacek, M. S.** GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* 183, 21-36 (1997).
 42. **Molkentin, J. D., Tymitz, K. M., Richardson, J. A. & Olson, E. N.** Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Mol Cell Biol* 20, 5256-60 (2000).
 43. **Suzuki, E., Evans, T., Lowry, J., Truong, L., Bell, D. W., Testa, J. R. & Walsh, K.** The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics* 38, 283-90 (1996).
 44. **Narita, N., Heikinheimo, M., Bielinska, M., White, R. A. & Wilson, D. B.** The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle. *Genomics* 36, 345-8 (1996).
 45. **Huggon, I. C., Davies, A., Gove, C., Moscoso, G., Moniz, C., Foss, Y., Farzaneh, F. & Towner, P.** Molecular cloning of human GATA-6 DNA binding protein: high levels of expression in heart and gut. *Biochim Biophys Acta* 1353, 98-102 (1997).
 46. **Morrissey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S. & Parmacek, M. S.** GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3579-90 (1998).
 47. **Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R. & Grosveld, F.** The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126, 723-32 (1999).
 48. **Nef, S. & Parada, L. F.** Hormones in male sexual development. *Genes Dev* 14, 3075-86 (2000).
 49. **Lei, N. & Heckert, L. L.** Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol* 24, 377-88 (2004).
 50. **Viger, R. S., Mertineit, C., Trasler, J. M. & Nemer, M.** Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 125, 2665-75 (1998).
 51. **Silverman, E., Eimerl, S. & Orly, J.** CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem* 274, 17987-96 (1999).
-

-
52. **Kiiveri, S., Liu, J., Westerholm-Ormio, M., Narita, N., Wilson, D. B., Voutilainen, R. & Heikinheimo, M.** Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology* 143, 3136-43 (2002).
 53. **Nemer, G. & Nemer, M.** Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev Biol* 254, 131-48 (2003).
 54. **Narita, N., Bielinska, M. & Wilson, D. B.** Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development* 124, 3755-64 (1997).
 55. **Tremblay, J. J. & Viger, R. S.** Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol* 13, 1388-401 (1999).
 56. **Heikinheimo, M., Scandrett, J. M. & Wilson, D. B.** Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 164, 361-73 (1994).
 57. **Rosenquist, G. C.** Cardia bifida in chick embryos: anterior and posterior defects produced by transplanting tritiated thymidine-labeled grafts medial to the heart-forming regions. *Teratology* 3, 135-42 (1970).
 58. **Jiang, Y., Tarzami, S., Burch, J. B. & Evans, T.** Common role for each of the cGATA-4/5/6 genes in the regulation of cardiac morphogenesis. *Dev Genet* 22, 263-77 (1998).
 59. **Zhang, H., Toyofuku, T., Kamei, J. & Hori, M.** GATA-4 regulates cardiac morphogenesis through transactivation of the N-cadherin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1033-8 (2003).
 60. **Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J. & Duncan, S. A.** GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12573-8 (2004).
 61. **Duncan, S. A., Nagy, A. & Chan, W.** Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124, 279-87 (1997).
 62. **Capo-Chichi, C. D., Rula, M. E., Smedberg, J. L., Vanderveer, L., Parmacek, M. S., Morrissey, E. E., Godwin, A. K. & Xu, X. X.** Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 286, 574-86 (2005).
 63. **Zeisberg, E. M., Ma, Q., Juraszek, A. L., Moses, K., Schwartz, R. J., Izumo, S. & Pu, W. T.** Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest* 115, 1522-31 (2005).
 64. **Oka, T., Maillet, M., Watt, A. J., Schwartz, R. J., Aronow, B. J., Duncan, S. A. & Molkenstin, J. D.** Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 98, 837-45 (2006).

-
65. **Pu, W. T., Ishiwata, T., Juraszek, A. L., Ma, Q. & Izumo, S.** GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol* 275, 235-44 (2004).
 66. **Jay, P. Y., Bielinska, M., Erlich, J. M., Mannisto, S., Pu, W. T., Heikinheimo, M. & Wilson, D. B.** Impaired mesenchymal cell function in Gata4 mutant mice leads to diaphragmatic hernias and primary lung defects. *Dev Biol* 301, 602-14 (2007).
 67. **Yoshiki, A. & Moriwaki, K.** Mouse phenome research: implications of genetic background. *Ilar J* 47, 94-102 (2006).
 68. **Linder, C. C.** Genetic variables that influence phenotype. *Ilar J* 47, 132-40 (2006).
 69. **Bisping, E., Ikeda, S., Kong, S. W., Tarnavski, O., Bodyak, N., McMullen, J. R., Rajagopal, S., Son, J. K., Ma, Q., Springer, Z., Kang, P. M., Izumo, S. & Pu, W. T.** Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14471-6 (2006).
 70. **Srivastava, D. & Olson, E. N.** A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407, 221-6 (2000).
 71. **Pehlivan, T., Pober, B. R., Brueckner, M., Garrett, S., Slaugh, R., Van Rheeden, R., Wilson, D. B., Watson, M. S. & Hing, A. V.** GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 83, 201-6 (1999).
 72. **Garg, V., Kathiriya, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N., Butler, C. A., Rothrock, C. R., Eapen, R. S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J. C. & Srivastava, D.** GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424, 443-7 (2003).
 73. **Nemer, G., Fadlalah, F., Usta, J., Nemer, M., Dbaibo, G., Obeid, M. & Bitar, F.** A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat* 27, 293-4 (2006).
 74. **Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T. & Nemer, M.** Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15, 4095-102 (1995).
 75. **Soudais, C., Wilson, D. B., Simon, M. C., Ip, H. S., Parmacek, M. S. and Leiden, J. M.** Targeted disruption of the GATA-4 gene in embryonic stem cells abolishes cardiac myocyte development in differentiating embryoid bodies. *Circulation* 90, 178 (1994).
 76. **Crispino, J. D., Lodish, M. B., Thurberg, B. L., Litovsky, S. H., Collins, T., Molkentin, J. D. & Orkin, S. H.** Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev* 15, 839-44 (2001).

-
77. **Jay, P. Y., Bielinska, M., Erlich, J. M., Mannisto, S., Pu, W. T., Heikinheimo, M. & Wilson, D. B.** Impaired mesenchymal cell function in Gata4 mutant mice leads to diaphragmatic hernias and primary lung defects. *Dev Biol* (2006).
78. **Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E. & Molkentin, J. D.** The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276, 30245-53 (2001).
79. **Anttonen, M., Ketola, I., Parviainen, H., Pusa, A. K. & Heikinheimo, M.** FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod* 68, 1333-40 (2003).
80. **Heikinheimo, M., Ermolaeva, M., Bielinska, M., Rahman, N. A., Narita, N., Huhtaniemi, I. T., Tapanainen, J. S. & Wilson, D. B.** Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138, 3505-14 (1997).
81. **Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M. & Orkin, S. H.** Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129, 4627-34 (2002).
82. **Bielinska, M., Seehra, A., Toppari, J., Heikinheimo, M. & Wilson, D. B.** GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Dev Dyn* (2006).
83. **Ketola, I., Rahman, N., Toppari, J., Bielinska, M., Porter-Tinge, S. B., Tapanainen, J. S., Huhtaniemi, I. T., Wilson, D. B. & Heikinheimo, M.** Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 140, 1470-80 (1999).
84. **Anttonen, M., Parviainen, H., Kyronlahti, A., Bielinska, M., Wilson, D. B., Ritvos, O. & Heikinheimo, M.** GATA-4 is a granulosa cell factor employed in inhibin-alpha activation by the TGF-beta pathway. *J Mol Endocrinol* 36, 557-68 (2006).
85. **Cai, Z., Kwintkiewicz, J., Young, M. E. & Stocco, C.** Prostaglandin E2 increases cyp19 expression in rat granulosa cells: Implication of GATA-4. *Mol Cell Endocrinol* (2006).
86. **Sher, N., Yivgi-Ohana, N. & Orly, J.** Transcriptional Regulation of the P450_{scc} Gene (CYP11A1) Revisited: Binding of GATA, CREB and AP-1 Proteins to a Distal Novel Cluster of cis-Regulatory Elements Potentiates AP-2 and SF-1 Dependent Gene Expression in the Rodent Placenta and Ovary. *Mol Endocrinol* (2007).
87. **Tremblay, J. J. & Viger, R. S.** GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142, 977-86 (2001).
88. **Lawson, M. A. & Mellon, P. L.** Expression of GATA-4 in migrating gonadotropin-releasing neurons of the developing mouse. *Mol Cell Endocrinol* 140, 157-61 (1998).

-
89. **Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R. M., Debeljuk, L. & White, W. F.** Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173, 1036-8 (1971).
90. **Silverman, E., Yivgi-Ohana, N., Sher, N., Bell, M., Eimerl, S. & Orly, J.** Transcriptional activation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: GATA-4 and CCAAT/enhancer-binding protein beta confer synergistic responsiveness in hormone-treated rat granulosa and HEK293 cell models. *Mol Cell Endocrinol* 252, 92-101 (2006).
91. **Akiyama, Y., Watkins, N., Suzuki, H., Jair, K. W., van Engeland, M., Esteller, M., Sakai, H., Ren, C. Y., Yuasa, Y., Herman, J. G. & Baylin, S. B.** GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 23, 8429-39 (2003).
92. **Bai, Y., Akiyama, Y., Nagasaki, H., Yagi, O. K., Kikuchi, Y., Saito, N., Takeshita, K., Iwai, T. & Yuasa, Y.** Distinct expression of CDX2 and GATA4/5, development-related genes, in human gastric cancer cell lines. *Mol Carcinog* 28, 184-8 (2000).
93. **Capo-chichi, C. D., Roland, I. H., Vanderveer, L., Bao, R., Yamagata, T., Hirai, H., Cohen, C., Hamilton, T. C., Godwin, A. K. & Xu, X. X.** Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. *Cancer Res* 63, 4967-77 (2003).
94. **Lassus, H., Laitinen, M. P., Anttonen, M., Heikinheimo, M., Aaltonen, L. A., Ritvos, O. & Butzow, R.** Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab Invest* 81, 517-26 (2001).
95. **Wakana, K., Akiyama, Y., Aso, T. & Yuasa, Y.** Involvement of GATA-4/5 transcription factors in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett* (2005).
96. **Guo, M., House, M. G., Akiyama, Y., Qi, Y., Capagna, D., Harmon, J., Baylin, S. B., Brock, M. V. & Herman, J. G.** Hypermethylation of the GATA gene family in esophageal cancer. *Int J Cancer* 119, 2078-83 (2006).
97. **Guo, M., Akiyama, Y., House, M. G., Hooker, C. M., Heath, E., Gabrielson, E., Yang, S. C., Han, Y., Baylin, S. B., Herman, J. G. & Brock, M. V.** Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7917-24 (2004).
98. **Laitinen, M. P., Anttonen, M., Ketola, I., Wilson, D. B., Ritvos, O., Butzow, R. & Heikinheimo, M.** Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3476-83 (2000).
99. **Anttonen, M., Unkila-Kallio, L., Leminen, A., Butzow, R. & Heikinheimo, M.** High GATA-4 expression associates with aggressive behavior, whereas low anti-
-

- Mullerian hormone expression associates with growth potential of ovarian granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6529-35 (2005).
100. **Kiiveri, S., Siltanen, S., Rahman, N., Bielinska, M., Lehto, V. P., Huhtaniemi, I. T., Muglia, L. J., Wilson, D. B. & Heikinheimo, M.** Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. *Mol Med* 5, 490-501 (1999).
 101. **Lin, L., Aggarwal, S., Glover, T. W., Orringer, M. B., Hanash, S. & Beer, D. G.** A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. *Cancer Res* 60, 1341-7 (2000).
 102. **Ketola, I., Pentikainen, V., Vaskivuo, T., Ilvesmaki, V., Herva, R., Dunkel, L., Tapanainen, J. S., Toppari, J. & Heikinheimo, M.** Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3925-31 (2000).
 103. **Siltanen, S., Anttonen, M., Heikkila, P., Narita, N., Laitinen, M., Ritvos, O., Wilson, D. B. & Heikinheimo, M.** Transcription factor GATA-4 is expressed in pediatric yolk sac tumors. *Am J Pathol* 155, 1823-9 (1999).
 104. **Ghatpande, S., Ghatpande, A., Zile, M. & Evans, T.** Anterior endoderm is sufficient to rescue foregut apoptosis and heart tube morphogenesis in an embryo lacking retinoic acid. *Dev Biol* 219, 59-70 (2000).
 105. **Angello, J. C., Kaestner, S., Welikson, R. E., Buskin, J. N. & Hauschka, S. D.** BMP induction of cardiogenesis in P19 cells requires prior cell-cell interaction(s). *Dev Dyn* (2006).
 106. **Makita, T., Duncan, S. A. & Sucov, H. M.** Retinoic acid, hypoxia, and GATA factors cooperatively control the onset of fetal liver erythropoietin expression and erythropoietic differentiation. *Dev Biol* 280, 59-72 (2005).
 107. **Molkentin, J. D., Kalvakolanu, D. V. & Markham, B. E.** Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 14, 4947-57 (1994).
 108. **Clement, S. A., Tan, C. C., Guo, J., Kitta, K. & Suzuki, Y. J.** Roles of protein kinase C and alpha-tocopherol in regulation of signal transduction for GATA-4 phosphorylation in HL-1 cardiac muscle cells. *Free Radic Biol Med* 32, 341-9 (2002).
 109. **Kitta, K., Day, R. M., Kim, Y., Torregroza, I., Evans, T. & Suzuki, Y. J.** Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 278, 4705-12 (2003).
 110. **Liang, Q., Wiese, R. J., Bueno, O. F., Dai, Y. S., Markham, B. E. & Molkentin, J. D.** The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 21, 7460-9 (2001).

-
111. **Sugden, P. H.** An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 35, 871-86 (2003).
 112. **Hautala, N., Tokola, H., Luodonpaa, M., Puhakka, J., Romppanen, H., Vuolteenaho, O. & Ruskoaho, H.** Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1. *Circulation* 103, 730-5 (2001).
 113. **Saadane, N., Alpert, L. & Chalifour, L. E.** Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol* 127, 1165-76 (1999).
 114. **Morimoto, T., Hasegawa, K., Kaburagi, S., Kakita, T., Wada, H., Yanazume, T. & Sasayama, S.** Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275, 13721-6 (2000).
 115. **Kitta, K., Clement, S. A., Remeika, J., Blumberg, J. B. & Suzuki, Y. J.** Endothelin-1 induces phosphorylation of GATA-4 transcription factor in the HL-1 atrial-muscle cell line. *Biochem J* 359, 375-80 (2001).
 116. **Hautala, N., Tenhunen, O., Szokodi, I. & Ruskoaho, H.** Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways. *Pflugers Arch* 443, 362-9 (2002).
 117. **Roggia, C., Ukena, C., Bohm, M. & Kilter, H.** Hepatocyte growth factor (HGF) enhances cardiac commitment of differentiating embryonic stem cells by activating PI3 kinase. *Exp Cell Res* (2006).
 118. **Charron, F., Tsimiklis, G., Arcand, M., Robitaille, L., Liang, Q., Molkentin, J. D., Meloche, S. & Nemer, M.** Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev* 15, 2702-19 (2001).
 119. **Morisco, C., Seta, K., Hardt, S. E., Lee, Y., Vatner, S. F. & Sadoshima, J.** Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276, 28586-97 (2001).
 120. **Kawamura, T., Ono, K., Morimoto, T., Wada, H., Hirai, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Heike, T., Nakahata, T., Kita, T. & Hasegawa, K.** Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem* 280, 19682-8 (2005).
 121. **Wang, J., Feng, X. H. & Schwartz, R. J.** SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *J Biol Chem* 279, 49091-8 (2004).
 122. **Kim, Y., Ma, A. G., Kitta, K., Fitch, S. N., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, A. R., Evans, T. & Suzuki, Y. J.** Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 63, 368-77 (2003).

-
123. **Webster, K. A., Prentice, H. & Bishopric, N. H.** Oxidation of zinc finger transcription factors: physiological consequences. *Antioxid Redox Signal* 3, 535-48 (2001).
 124. **Potashkin, J. A. & Meredith, G. E.** The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 8, 144-51 (2006).
 125. **Aries, A., Paradis, P., Lefebvre, C., Schwartz, R. J. & Nemer, M.** Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6975-80 (2004).
 126. **Ohara, Y., Atarashi, T., Ishibashi, T., Ohashi-Kobayashi, A. & Maeda, M.** GATA-4 gene organization and analysis of its promoter. *Biol Pharm Bull* 29, 410-9 (2006).
 127. **Macdonald, J., Galley, H. F. & Webster, N. R.** Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 90, 221-32 (2003).
 128. **McCord, J. M.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108, 652-9 (2000).
 129. **Rivkees, S. A., Chen, M., Kulkarni, J., Browne, J. & Zhao, Z.** Characterization of the murine A1 adenosine receptor promoter, potent regulation by GATA-4 and Nkx2.5. *J Biol Chem* 274, 14204-9 (1999).
 130. **Durocher, D., Chen, C. Y., Ardati, A., Schwartz, R. J. & Nemer, M.** The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol Cell Biol* 16, 4648-55 (1996).
 131. **Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G. & Nemer, M.** Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol* 19, 4355-65 (1999).
 132. **Dai, Y. S., Cserjesi, P., Markham, B. E. & Molkenin, J. D.** The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem* 277, 24390-8 (2002).
 133. **Lu, J. R., McKinsey, T. A., Xu, H., Wang, D. Z., Richardson, J. A. & Olson, E. N.** FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 19, 4495-502 (1999).
 134. **Morin, S., Charron, F., Robitaille, L. & Nemer, M.** GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *Embo J* 19, 2046-55 (2000).
 135. **Dai, Y. S. & Markham, B. E.** p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *J Biol Chem* 276, 37178-85 (2001).
 136. **Morin, S., Paradis, P., Aries, A. & Nemer, M.** Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol* 21, 1036-44 (2001).

-
137. **Herzig, T. C., Jobe, S. M., Aoki, H., Molkentin, J. D., Cowley, A. W., Jr., Izumo, S. & Markham, B. E.** Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7543-8 (1997).
138. **Grepin, C., Dagnino, L., Robitaille, L., Haberstroh, L., Antakly, T. & Nemer, M.** A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 14, 3115-29 (1994).
139. **McBride, K., Charron, F., Lefebvre, C. & Nemer, M.** Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* 22, 8403-12 (2003).
140. **Lee, Y., Shioi, T., Kasahara, H., Jobe, S. M., Wiese, R. J., Markham, B. E. & Izumo, S.** The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Cell Biol* 18, 3120-9 (1998).
141. **Durocher, D. & Nemer, M.** Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev Genet* 22, 250-62 (1998).
142. **Clabby, M. L., Robison, T. A., Quigley, H. F., Wilson, D. B. & Kelly, D. P.** Retinoid X receptor alpha represses GATA-4-mediated transcription via a retinoid-dependent interaction with the cardiac-enriched repressor FOG-2. *J Biol Chem* 278, 5760-7 (2003).
143. **Thuerauf, D. J., Hanford, D. S. & Glembotski, C. C.** Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 269, 17772-5 (1994).
144. **Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. & Olson, E. N.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-28 (1998).
145. **Bhalla, S. S., Robitaille, L. & Nemer, M.** Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem* 276, 11439-45 (2001).
146. **Lavallee, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M. E. & Nemer, M.** The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *Embo J* 25, 5201-13 (2006).
147. **Kobayashi, S., Lackey, T., Huang, Y., Bisping, E., Pu, W. T., Boxer, L. M. & Liang, Q.** Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *Faseb J* 20, 800-2 (2006).
148. **Nemer, M. & Horb, M. E.** The KLF family of transcriptional regulators in cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Cell Cycle* 6, 117-21 (2007).
-

149. **Sepulveda, J. L., Belaguli, N., Nigam, V., Chen, C. Y., Nemer, M. & Schwartz, R. J.** GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol* 18, 3405-15 (1998).
150. **Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N. & Schwartz, R. J.** Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem* 277, 25775-82 (2002).
151. **Kuo, H., Chen, J., Ruiz-Lozano, P., Zou, Y., Nemer, M. & Chien, K. R.** Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* 126, 4223-34 (1999).
152. **Maeda, T., Sepulveda, J., Chen, H. H. & Stewart, A. F.** Alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac ankyrin repeat protein gene in cardiac myocytes. *Gene* 297, 1-9 (2002).
153. **Ip, H. S., Wilson, D. B., Heikinheimo, M., Tang, Z., Ting, C. N., Simon, M. C., Leiden, J. M. & Parmacek, M. S.** The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol* 14, 7517-26 (1994).
154. **Azaki, A., Fineman, J. R. & He, Y.** Myocardial transcription factors are modulated during pathologic cardiac hypertrophy in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 132, 1262-71 (2006).
155. **Belaguli, N. S., Sepulveda, J. L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M. & Schwartz, R. J.** Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol Cell Biol* 20, 7550-8 (2000).
156. **Pan, J., Hinzmann, B., Yan, W., Wu, F., Morser, J. & Wu, Q.** Genomic structures of the human and murine corin genes and functional GATA elements in their promoters. *J Biol Chem* 277, 38390-8 (2002).
157. **Dame, C., Sola, M. C., Lim, K. C., Leach, K. M., Fandrey, J., Ma, Y., Knopfle, G., Engel, J. D. & Bungert, J.** Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* 279, 2955-61 (2004).
158. **Fang, R., Olds, L. C., Santiago, N. A. & Sibley, E.** GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G58-67 (2001).
159. **Divine, J. K., Staloch, L. J., Haveri, H., Jacobsen, C. M., Wilson, D. B., Heikinheimo, M. & Simon, T. C.** GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G1086-99 (2004).
160. **Lawson, M. A., Whyte, D. B. & Mellon, P. L.** GATA factors are essential for activity of the neuron-specific enhancer of the gonadotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Biol* 16, 3596-605 (1996).

-
161. **Gao, X., Sedgwick, T., Shi, Y. B. & Evans, T.** Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 2901-11 (1998).
162. **Yamagata, T., Nishida, J., Sakai, R., Tanaka, T., Honda, H., Hirano, N., Mano, H., Yazaki, Y. & Hirai, H.** Of the GATA-binding proteins, only GATA-4 selectively regulates the human interleukin-5 gene promoter in interleukin-5-producing cells which express multiple GATA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15, 3830-9 (1995).
163. **Tremblay, J. J., Robert, N. M. & Viger, R. S.** Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 15, 1636-50 (2001).
164. **McGrew, M. J., Bogdanova, N., Hasegawa, K., Hughes, S. H., Kitsis, R. N. & Rosenthal, N.** Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus. *Mol Cell Biol* 16, 4524-34 (1996).
165. **Cheng, G., Hagen, T. P., Dawson, M. L., Barnes, K. V. & Menick, D. R.** The role of GATA, CArG, E-box, and a novel element in the regulation of cardiac expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene. *J Biol Chem* 274, 12819-26 (1999).
166. **Nicholas, S. B. & Philipson, K. D.** Cardiac expression of the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *Am J Physiol* 277, H324-30 (1999).
167. **Lien, C. L., Wu, C., Mercer, B., Webb, R., Richardson, J. A. & Olson, E. N.** Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development* 126, 75-84 (1999).
168. **Searcy, R. D., Vincent, E. B., Liberatore, C. M. & Yutzey, K. E.** A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development* 125, 4461-70 (1998).
169. **Brown, C. O., 3rd, Chi, X., Garcia-Gras, E., Shirai, M., Feng, X. H. & Schwartz, R. J.** The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer. *J Biol Chem* 279, 10659-69 (2004).
170. **Wang, G. F., Nikovits, W., Jr., Schleinitz, M. & Stockdale, F. E.** A positive GATA element and a negative vitamin D receptor-like element control atrial chamber-specific expression of a slow myosin heavy-chain gene during cardiac morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 6023-34 (1998).
171. **Boudreau, F., Rings, E. H., van Wering, H. M., Kim, R. K., Swain, G. P., Krasinski, S. D., Moffett, J., Grand, R. J., Suh, E. R. & Traber, P. G.** Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 277, 31909-17 (2002).

-
172. **Habets, P. E., Moorman, A. F., Clout, D. E., van Roon, M. A., Lingbeek, M., van Lohuizen, M., Campione, M. & Christoffels, V. M.** Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev* 16, 1234-46 (2002).
173. **Zeller, R., Bloch, K. D., Williams, B. S., Arceci, R. J. & Seidman, C. E.** Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis. *Genes Dev* 1, 693-8 (1987).
174. **Robert, N. M., Tremblay, J. J. & Viger, R. S.** Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology* 143, 3963-73 (2002).
175. **Svensson, E. C., Tufts, R. L., Polk, C. E. & Leiden, J. M.** Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 956-61 (1999).
176. **Svensson, E. C., Huggins, G. S., Dardik, F. B., Polk, C. E. & Leiden, J. M.** A functionally conserved N-terminal domain of the friend of GATA-2 (FOG-2) protein represses GATA4-dependent transcription. *J Biol Chem* 275, 20762-9 (2000).
177. **Tevosian, S. G., Deconinck, A. E., Tanaka, M., Schinke, M., Litovsky, S. H., Izumo, S., Fujiwara, Y. & Orkin, S. H.** FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101, 729-39 (2000).
178. **Svensson, E. C., Huggins, G. S., Lin, H., Clendenin, C., Jiang, F., Tufts, R., Dardik, F. B. & Leiden, J. M.** A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2. *Nat Genet* 25, 353-6 (2000).
179. **Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. & Zaret, K. S.** Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009 (2001).
180. **Andree, B., Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H. H. & Brand, T.** BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* 70, 119-31 (1998).
181. **Monzen, K., Shiojima, I., Hiroi, Y., Kudoh, S., Oka, T., Takimoto, E., Hayashi, D., Hosoda, T., Habara-Ohkubo, A., Nakaoka, T., Fujita, T., Yazaki, Y. & Komuro, I.** Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* 19, 7096-105 (1999).
182. **Schultheiss, T. M., Burch, J. B. & Lassar, A. B.** A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11, 451-62 (1997).
183. **Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I. & Harvey, R. P.** Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-31 (1993).
-

-
184. **Brewer, A. C., Alexandrovich, A., Mjaatvedt, C. H., Shah, A. M., Patient, R. K. & Pizzey, J. A.** GATA factors lie upstream of Nkx 2.5 in the transcriptional regulatory cascade that effects cardiogenesis. *Stem Cells Dev* 14, 425-39 (2005).
185. **Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-2 (1988).
186. **Chagnon, F., Metz, C. N., Bucala, R. & Lesur, O.** Endotoxin-induced myocardial dysfunction: effects of macrophage migration inhibitory factor neutralization. *Circ Res* 96, 1095-102 (2005).
187. **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11 (1998).
188. **Hutvagner, G. & Zamore, P. D.** RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-32 (2002).
189. **Sharp, P. A.** RNA interference--2001. *Genes Dev* 15, 485-90 (2001).
190. **Waterhouse, P. M., Wang, M. B. & Lough, T.** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-42 (2001).
191. **Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6 (2001).
192. **Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. & Plasterk, R. H.** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-9 (2001).
193. **Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8 (2001).
194. **Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. & Shiekhattar, R.** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-4 (2005).
195. **Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A. & Filipowicz, W.** TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6, 961-7 (2005).
196. **Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. & Tuschl, T.** Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-74 (2002).
197. **Chiu, Y. L. & Rana, T. M.** RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 10, 549-61 (2002).
-

-
198. **Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J.** The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733-42 (2002).
199. **Kim, K., Lee, Y. S. & Carthew, R. W.** Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *Rna* 13, 22-9 (2007).
200. **Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T.** Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213 (2002).
201. **Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. & Looney, D. J.** Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289-92 (2004).
202. **Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. & Sharp, P. A.** Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-42 (2006).
203. **Morris, K. V.** siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell Mol Life Sci* 62, 3057-66 (2005).
204. **Kawasaki, H., Taira, K. & Morris, K. V.** siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* 4, 442-8 (2005).
205. **Doench, J. G., Petersen, C. P. & Sharp, P. A.** siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-42 (2003).
206. **Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T.** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-88 (2001).
207. **Martinez, L. A., Naguibneva, I., Lehrmann, H., Vervisch, A., Tchenio, T., Lozano, G. & Harel-Bellan, A.** Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14849-54 (2002).
208. **Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. & Khvorova, A.** Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-30 (2004).
209. **Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R. & Saigo, K.** Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32, 936-48 (2004).
210. **Donis-Keller, H.** Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res* 7, 179-92 (1979).
211. **Micura, R.** Small interfering RNAs and their chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 2265-9 (2002).
-

-
212. **Yu, J. Y., DeRuiter, S. L. & Turner, D. L.** RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6047-52 (2002).
213. **Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B. & Radmark, O.** Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* 21, 5864-74 (2002).
214. **Medema, R. H.** Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochem J* 380, 593-603 (2004).
215. **Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. & Prydz, H.** Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-66 (2002).
216. **Maliyekkel, A., Davis, B. M. & Roninson, I. B.** Cell cycle arrest drastically extends the duration of gene silencing after transient expression of short hairpin RNA. *Cell Cycle* 5, 2390-5 (2006).
217. **Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K. & Kaufmann, J.** Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2705-16 (2003).
218. **Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T. & Wahlestedt, C.** Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 33, 439-47 (2005).
219. **Braasch, D. A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M. A. & Corey, D. R.** RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967-75 (2003).
220. **Kunath, T., Gish, G., Lickert, H., Jones, N., Pawson, T. & Rossant, J.** Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 21, 559-61 (2003).
221. **Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S.** Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-58 (2002).
222. **Kawasaki, H. & Taira, K.** Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* 31, 700-7 (2003).
223. **Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. & Engelke, D. R.** Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 505-8 (2002).
224. **Tuschl, T.** Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20, 446-8 (2002).
225. **Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3 (2002).
-

-
226. **Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y. & Forrester, W. C.** A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-20 (2002).
227. **Devroe, E. & Silver, P. A.** Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2, 15 (2002).
228. **Sliva, K. & Schnierle, B. S.** Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukemia virus genome. *Virology* 351, 218-25 (2006).
229. **Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. & Iggo, R.** Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-4 (2003).
230. **Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I. & Kellendonk, C.** When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* 529, 116-21 (2002).
231. **Tiscornia, G., Tergaonkar, V., Galimi, F. & Verma, I. M.** CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7347-51 (2004).
232. **Coumoul, X., Li, W., Wang, R. H. & Deng, C.** Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res* 32, e85 (2004).
233. **Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., McManus, M., Sharp, P. A., Van Parijs, L., Jaenisch, R. & Jacks, T.** Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10380-5 (2004).
234. **Oberdoerffer, P., Kanellopoulou, C., Heissmeyer, V., Paeper, C., Borowski, C., Aifantis, I., Rao, A. & Rajewsky, K.** Efficiency of RNA interference in the mouse hematopoietic system varies between cell types and developmental stages. *Mol Cell Biol* 25, 3896-905 (2005).
235. **Chang, H. S., Lin, C. H., Chen, Y. C. & Yu, W. C.** Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. *Am J Pathol* 165, 1535-41 (2004).
236. **Kasim, V., Miyagishi, M. & Taira, K.** Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 32, e66 (2004).
237. **Fritsch, L., Martinez, L. A., Sekhri, R., Naguibneva, I., Gerard, M., Vandromme, M., Schaeffer, L. & Harel-Bellan, A.** Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs. *EMBO Rep* 5, 178-82 (2004).
238. **Freundlieb, S., Schirra-Muller, C. & Bujard, H.** A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1, 4-12 (1999).
239. **van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R. & Clevers, H.**
-

- Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4, 609-15 (2003).
240. **Matsukura, S., Jones, P. A. & Takai, D.** Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 31, e77 (2003).
241. **Czuderna, F., Santel, A., Hinz, M., Fechtner, M., Durieux, B., Fisch, G., Leenders, F., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. & Kaufmann, J.** Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* 31, e127 (2003).
242. **Kuninger, D., Stauffer, D., Eftekhari, S., Wilson, E., Thayer, M. & Rotwein, P.** Gene disruption by regulated short interfering RNA expression, using a two-adenovirus system. *Hum Gene Ther* 15, 1287-92 (2004).
243. **Raoul, C., Barker, S. D. & Aebischer, P.** Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 13, 487-95 (2006).
244. **Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. & Linsley, P. S.** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-7 (2003).
245. **Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. & Hartmann, G.** Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-70 (2005).
246. **Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. & Williams, B. R.** Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-9 (2003).
247. **Levin, D. & London, I. M.** Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1121-5 (1978).
248. **Pandey, M., Bajaj, G. D. & Rath, P. C.** Induction of the interferon-inducible RNA-degrading enzyme, RNase L, by stress-inducing agents in the human cervical carcinoma cells. *RNA Biol* 1, 21-7 (2004).
249. **Gil, J. & Esteban, M.** Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5, 107-14 (2000).
250. **Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R. A.** Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-7 (2001).
251. **Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. & MacLachlan, I.** Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-62 (2005).

-
252. **Aigner, A.** Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 124, 12-25 (2006).
253. **Kauppinen, S., Vester, B. & Wengel, J.** Locked nucleic acid: high-affinity targeting of complementary RNA for RNomics. *Handb Exp Pharmacol*, 405-22 (2006).
254. **Hossbach, M., Gruber, J., Osborn, M., Weber, K. & Tuschl, T.** Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNA Biol* 3, 82-9 (2006).
255. **Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A. & Herweijer, H.** Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-8 (2002).
256. **McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L. & Kay, M. A.** Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21, 639-44 (2003).
257. **Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. & Lieberman, J.** RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-51 (2003).
258. **Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C. S., Jeffs, L. B., Judge, A., MacLachlan, I. & Polisky, B.** Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1002-7 (2005).
259. **Hassan, A., Tian, Y., Zheng, W., Ji, H., Sandberg, K. & Verbalis, J. G.** Small interfering RNA-mediated functional silencing of vasopressin V2 receptors in the mouse kidney. *Physiol Genomics* 21, 382-8 (2005).
260. **Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. & Vornlocher, H. P.** Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-8 (2004).
261. **Sorensen, D. R., Leirdal, M. & Sioud, M.** Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327, 761-6 (2003).
262. **Verma, U. N., Surabhi, R. M., Schmaltieg, A., Becerra, C. & Gaynor, R. B.** Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 1291-300 (2003).
263. **Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczak, M., Barclay, J., Natt, F. J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., Wishart, W. & Hall, J.** siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32, e49 (2004).
-

-
264. **Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J. & Tolentino, M. J.** Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9, 210-6 (2003).
265. **Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P. W., Abraham, N. G., Kappas, A. & Lee, P. J.** Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 279, 10677-84 (2004).
266. **Golzio, M., Mazzolini, L., Moller, P., Rols, M. P. & Teissie, J.** Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther* 12, 246-51 (2005).
267. **Bai, J., Ramos, R. L., Ackman, J. B., Thomas, A. M., Lee, R. V. & LoTurco, J. J.** RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6, 1277-83 (2003).
268. **Takabatake, Y., Isaka, Y., Mizui, M., Kawachi, H., Shimizu, F., Ito, T., Hori, M. & Imai, E.** Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther* 12, 965-73 (2005).
269. **Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L. & Van Parijs, L.** A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-6 (2003).
270. **Hommel, J. D., Sears, R. M., Georgescu, D., Simmons, D. L. & DiLeone, R. J.** Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9, 1539-44 (2003).
271. **Krom, Y. D., Fallaux, F. J., Que, I., Lowik, C. & van Dijk, K. W.** Efficient in vivo knock-down of estrogen receptor alpha: application of recombinant adenovirus vectors for delivery of short hairpin RNA. *BMC Biotechnol* 6, 11 (2006).
272. **Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T. & Okabe, M.** Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532, 227-30 (2002).
273. **Carmell, M. A., Zhang, L., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Rosenquist, T. A.** Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10, 91-2 (2003).
274. **Seibler, J., Kuter-Luks, B., Kern, H., Streu, S., Plum, L., Mauer, J., Kuhn, R., Bruning, J. C. & Schwenk, F.** Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res* 33, e67 (2005).
275. **Seibler, J., Kleinriders, A., Kuter-Luks, B., Niehaves, S., Bruning, J. C. & Schwenk, F.** Reversible gene knockdown in mice using a tight, inducible shRNA expression system. *Nucleic Acids Res* (2007).
276. **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7 (1977).
-

-
277. **Ulbright, T. M.** Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod Pathol* 18 Suppl 2, S61-79 (2005).
278. **Yaffe, D. & Saxel, O.** Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-7 (1977).
279. **Jacobsen, L. B., Calvin, S. A., Colvin, K. E. & Wright, M.** FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 33, 104-12 (2004).
280. **Amarzguioui, M. & Prydz, H.** An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1050-8 (2004).
281. **Scherr, M., Morgan, M. A. & Eder, M.** Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* 10, 245-56 (2003).
282. **Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T. & et al.** FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2065-9 (1991).
283. **Wall, R. J.** A new lease on life for transgenic livestock. *Nat Biotechnol* 15, 416-7 (1997).
284. **Wall, R. J.** Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3, 209-20 (2001).
285. **Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L.** Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680-3 (1985).
286. **Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R. & Palmiter, R. D.** Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27, 223-31 (1981).
287. **Lottmann, H., Vanselow, J., Hessabi, B. & Walther, R.** The Tet-On system in transgenic mice: inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells. *J Mol Med* 79, 321-8 (2001).
288. **Moutier, R., Tchang, F., Caucheteux, S. M. & Kanellopoulos-Langevin, C.** Placental anomalies and fetal loss in mice, after administration of doxycycline in food for tet-system activation. *Transgenic Res* 12, 369-73 (2003).
289. **Fedorov, L. M., Tyrsin, O. Y., Krenn, V., Chernigovskaya, E. V. & Rapp, U. R.** Tet-system for the regulation of gene expression during embryonic development. *Transgenic Res* 10, 247-58 (2001).
290. **Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. & Bujard, H.** Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10933-8 (1996).

-
291. **Kerrison, J. B., Duh, E. J., Yu, Y., Otteson, D. C. & Zack, D. J.** A system for inducible gene expression in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2932-9 (2005).
292. **Hayashi, M., Hayashi, Y., Liu, C. Y., Tichelaar, J. W. & Kao, W. W.** Over expression of FGF7 enhances cell proliferation but fails to cause pathology in corneal epithelium of Kerapr-rtTA/FGF7 bitransgenic mice. *Mol Vis* 11, 201-7 (2005).
293. **Morkin, E.** Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech* 50, 522-31 (2000).
294. **Miller, B. T., Lewis, C. & Bentz, B. G.** Black thyroid resulting from short-term doxycycline use: case report, review of the literature, and discussion of implications. *Head Neck* 28, 373-7 (2006).
295. **Attwood, H. D. & Dennett, X.** A black thyroid and minocycline treatment. *Br Med J* 2, 1109-10 (1976).
296. **Xin, M., Davis, C. A., Molkenstin, J. D., Lien, C. L., Duncan, S. A., Richardson, J. A. & Olson, E. N.** A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11189-94 (2006).
297. **Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C. A., Bussani, R., Beltrami, A. P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J. & Anversa, P.** Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8692-7 (2005).
298. **Suzuki, Y. J.** Stress-induced activation of GATA-4 in cardiac muscle cells. *Free Radic Biol Med* 34, 1589-98 (2003).
299. **Wegmuller, D., Raineri, I., Gross, B., Oakeley, E. J. & Moroni, C.** A cassette system to study ES cell differentiation by inducible RNA interference. *Stem Cells* (2007).
300. **Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P. & Ray, A.** Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11, 473-82 (1999).
301. **Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F. & Zabel, B.** Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11, 115-32 (2002).
302. **Cao, W., Hunter, R., Strnatka, D., McQueen, C. A. & Erickson, R. P.** DNA constructs designed to produce short hairpin, interfering RNAs in transgenic mice sometimes show early lethality and an interferon response. *J Appl Genet* 46, 217-25 (2005).
303. **Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. & Kay, M. A.** Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-41 (2006).
-

304. **Swanton, C.** Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 5, 27-36 (2004).
305. **Kryonlahti, A., Huhtaniemi, I., Unkila-Kallio, L., Butzow, R., Leminen, A., Molkenin, J. D., Heikinheimo, M. & Anttonen, M.** Colocalization and cooperation of GATA-4 and Bcl2 in ovarian granulosa cells. *EMBO Workshop on: The role and control of GATA factors in tissue development and disease, Capri, Italy, 14 - 17 April 2007* (2007).

7. DANKSAGUNG

Herrn **Prof. Dr. Christof Dame**, als Leiter der Arbeitsgruppe für Molekulare Neonatologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, möchte ich herzlich für die Bereitstellung des spannenden Themas, die hervorragende Betreuung sowie für die gewissenhafte und fachliche Durchsicht der Doktorarbeit danken. Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die damit verbundene Möglichkeit bedanken, knapp zwei Jahre meiner Dissertation an der Universität von Florida verbringen zu dürfen.

Herrn **Prof. Dr. Jörg Bungert** gilt ebenfalls mein ganz besonderer Dank für die warme Aufnahme in seine Arbeitsgruppe an der Universität von Florida, die hervorragende Betreuung und die gewissenhafte und fachliche Durchsicht der Doktorarbeit. Weiterhin möchte ich mich für die zahlreichen *Tips & Tricks* rund um die Generierung transgener Mäuse bedanken sowie für die permanent offene Tür in seinem Labor, in welchem ich stets willkommen war.

Ein großer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Uckert** für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I und die damit verbundene Möglichkeit der Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften.

Weiterhin möchte ich mich bei der **Studienstiftung des Deutschen Volkes**, dem **Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD)** und der **Charité – Universitätsmedizin Berlin** für die Gewährung von Promotionsstipendien bedanken. Der Studienstiftung gilt mein besonderer Dank für die Gewährung zweier weiterer Auslandsstipendien für die USA, welche mir einen kontinuierlichen Austausch mit der Universität von Florida ermöglicht haben sowie für die hervorragende ideelle Förderung. Meinem Vertrauensdozenten bei der Studienstiftung, Herrn **Prof. Dr. Thomas Lohse**, danke ich herzlich für das stetige Vertrauen in meine Arbeit, die permanente Unterstützung und die sozialen Aktivitäten.

Ein besonders großes Dankeschön gilt meinen lieben Kollegen in nah und fern für die fachliche Unterstützung sowie für das freundschaftliche Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei **Hannes Sallmon** für die hervorragende Zusammenarbeit, die großartigen fachlichen Diskussionen, die gewissenhafte Durchsicht meiner Doktorarbeit und nicht zuletzt für die Freundschaft bedanken. Weiterhin gilt mein Dank den guten Engeln der Labore **Christiane Hussels** und **JoAnne Anderson** für das professionelle Management des Laboralltags. **Dr. Nanette Sarioglu** aus dem Institut für Pathologie und Paidopathologie CVK der Charité - Universitätsmedizin Berlin danke ich für die pathologische Untersuchung der Teratome sowie **Dr. Anya Ivanova** für die immunhistochemische GATA-4 Färbung der

Teratome. **Markus Gluth** gilt mein Dank für die Durchführung des Tet^R-Western-Blots. Weiterhin gilt mein Dank **Victoria Hoene** für zahlreiche fachliche Gespräche, die außerordentlich nette und unkomplizierte Zusammenarbeit in den GATA-4 Projekten sowie für die gewissenhafte Durchsicht meiner Doktorarbeit. **Iwona Palaszewski** danke ich für die zahlreichen Hinweise rund um das Promovieren und das gemeinsame Leiden während des Verfassens der Doktorarbeit. Bei **Dr. Juan Zhang** und **Sandy Schwerdtner-Hanßke** bedanke ich mich für den fachlichen Austausch und die *smalltalks* nebenbei. Weiterhin gilt mein Dank **Juliane Langer, Anika Hartmann, Katharina Bartz, Kristin Höwing, Dr. Malte Cremer** und **Dr. Sven Weber** und **Frederik Baumkötter** für die nette Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Ein weiterer Dank gilt **Takeesha Roland, Dr. Padraic Levings, Dr. Karen Vieira, Valerie Crusselle-Davis, Zhuo Zhou** und **Linda I-Chun** für die außerordentlich nette Aufnahme im *Bungert Lab* an der Universität von Florida sowie **Shermi Liang** für ihre Unterstützung im GATA-4 Projekt und **Dr. Felicie Andersen** für den fachlichen Austausch. **Mike Rule** von der *Transgenic Mice Core Facility* der Universität von Florida danke ich für die Einweisung in die Bedienung der Mikroinjektionsapparatur sowie für die Generierung der transgenen Mäuse.

Ein weiterer Dank gilt **Prof. Dr. Joachim Fandrey** aus dem Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen für die freundliche Aufnahme in seinem Labor während eines wissenschaftlichen Austauschs.

Besonders möchte ich mich bei meinen **Freunden** in Berlin und Gainesville bedanken, die mich bereits seit vielen Jahren auf meinem Weg begleiten und mir stets Mut und Kraft geben weiterzumachen.

Weiterhin gilt mein großer Dank meiner ehemaligen Diplom-Mutter **Prof. Dr. Astrid Speer** und meiner Patentante **Heidelore Hagemeister** für die gewissenhafte und sorgfältige Durchsicht der Doktorarbeit.

Meiner Freundin **Takeesha Roland** danke ich besonders für das entgegengebrachte Vertrauen, die USA zu verlassen und mit mir nach Deutschland zu kommen sowie für ihre Unterstützung und Geduld, während ich diese Arbeit verfasst habe.

Schließlich sei besonders meinen Eltern **Hannelore Thurisch & Dietmar Thurisch** für die jahrelange Unterstützung meiner Ausbildung, das hervorragende familiäre Verhältnis, den jederzeit bereitgestellten Rat und das immer offene Ohr für Sorgen und Pläne, ebenso wie für die gewissenhafte und sorgfältige Durchsicht der Doktorarbeit gedankt.

8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Boris Thurisch (geboren am 11.08.1979 in Berlin), an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4 durch eine Mausmutante mit einem induzierbaren RNA-Interferenz System“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Alle verwendeten Hilfsmittel und Ausführungen aus anderen Quellen wurden als solche kenntlich gemacht. Zudem versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht Gegenstand eines anderen Prüfungs- oder Promotionsverfahrens war. Weiterhin habe ich noch keinen Doktorgrad erlangt oder zu erlangen versucht. Die Inhalte der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin sind mir bekannt.

Berlin, 10.12.2007

9. Publikationen

In Fachzeitschriften

Thurisch BM, Liang S, Sarioglu N, Bungert J, Dame C. Transgenic mice expressing inducible GATA-4 short hairpin RNA develop ovarian teratomas and show dramatic infertility. (*in preparation*)

Sallmon H, Hussels CS, **Thurisch BM**, Knöpfle G, Dame C. Developmental expression of GATA-6 in the human liver and its role in hepatic erythropoietin gene regulation. (*in preparation*)

Konferenzbeiträge

Sallmon H, Hussels CS, **Thurisch BM**, Knöpfle G, Dame C. Developmental expression of GATA-6 in the human liver and its role in hepatic erythropoietin gene regulation. Poster-Präsentation. EMBO Workshop on the Role and Control of GATA Factors in Tissue Development and Disease, Capri, Italy, 14.04. - 17.04.07.

Thurisch BM, Liang S, Sarioglu N, Bungert J, Dame C. Transgenic mice expressing inducible GATA-4 short hairpin RNA exhibit reduced fertility and develop ovarian teratomas. Poster-Präsentation. EMBO Workshop on the Role and Control of GATA Factors in Tissue Development and Disease, Capri, Italy, 14.04. - 17.04.07.

Sallmon H, Hussels CS, **Thurisch BM**, Knöpfle G, Dame C. Entwicklungsabhängige Expression des Transkriptionsfaktors GATA-6 in der Leber und seine Bedeutung für die hepatische Erythropoietin-Expression. Poster-Präsentation. 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Hamburg, Germany, 14.06. - 16.06.07.

Thurisch BM, Dame C, Liang S, Bungert J. Transgenic mice expressing inducible GATA-4 short hairpin RNA. Poster-Präsentation. South East Regional Interdisciplinary Symposium (SERIS), Gainesville, Florida, USA, 19.05. - 21.05.06.

Davis VJ, Andersen F, Levings PP, Roland TL, **Thurisch BM**, Bungert J. β -Globin locus control region structure and function. Poster-Präsentation. 15th Conference on Hemoglobin Switching, Orcas Island, Washington State, USA, 10.09 - 14.09.2004.

Thurisch BM, Bungert J, Dame C. Suppression of GATA-4 by an inducible small-interfering RNA. Poster-Präsentation. Keystone Symposium: siRNAs and miRNAs. Keystone, Nevada, USA, 19.04 - 23.04.2004.

Abschlußarbeiten

Thurisch BM. Strategien zur gezielten Expressions-Inhibition des murinen FMIP-Gens. Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin, Berlin, Germany, 08.10.2003.