

# Hoe veroorzaken GATA4 mutaties Atriële Fibrillatie?



Sharon van den Brink  
24 mei 2013  
Amsterdam

# Hoe veroorzaken GATA4 mutaties Atriële Fibrillatie?



Auteur: Sharon van den Brink

Onderwijsinstelling: Hogeschool Utrecht  
Faculteit Natuur en Techniek  
Institute for Life Science & Chemistry  
F.C. Donderstraat 65  
3707 LG Utrecht

Afstudeerrichting: Biomolecular research

Stagedocent: Dr. J. Gent

Afstudeerplaats: Academisch Medisch Centrum  
Meibergdreef 9  
1100 DD Amsterdam

Begeleiders: Dr. A.V Postma  
Dhr A. Ilgun

Periode: november 2012 – juni 2013

## Voorwoord

Dit afstudeerverslag is geschreven als onderdeel van mijn afstudeerstage aan de Hogeschool Utrecht, Institute of Life Science & Chemistry, afstudeerrichting Biomolecular research. Gedurende de afgelopen zeven maanden heb ik mijn afstudeeropdracht uitgevoerd op de afdeling Anatomie, Embryologie en Fysiologie (AEF) in het academisch medisch centrum (AMC) te Amsterdam.

Tijdens deze periode heb ik kennis kunnen maken met een research laboratorium, waar op deze afdeling onderzoek gedaan wordt naar het hart. De afgelopen maanden heb ik met plezier aan mijn afstudeeropdracht gewerkt.

Graag wil ik Alex Postma bedanken voor de samenwerking en begeleiding op de momenten dat ik het nodig had. Ik vond het fijn om de afgelopen zeven maanden met jou samen te werken. Daarnaast wil ik Aho Ilgun bedanken voor zijn begeleiding in het lab. Naast het leren van de verschillende technieken heeft hij mij ook geholpen met het interpreteren van de resultaten.

Voor de rest wil ik iedereen van de hele afdeling bedanken voor de gezellige en leerzame periode.

## Samenvatting

De ontwikkeling van het hart tijdens de embryogenese is een belangrijk proces. Tijdens de ontwikkeling zijn er meerdere processen betrokken voor het ontwikkelen van de kamers. Eén van deze factoren zijn transcriptiefactoren. Een niet goed ontwikkeld hart veroorzaakt congenitale heart disease.

Atriële fibrillatie is een hartafwijking die ongecontroleerde activatie van de atria geeft. Atriële fibrillatie komt meestal voor in combinatie met andere hartafwijkingen of risicofactoren. Daarnaast is het ontwikkelen van atriële fibrillatie mogelijk door genetische oorzaken. Dan is er sprake van een mutatie in een gen.

GATA4 is een transcriptiefactor en is belangrijk voor de ontwikkeling van het hart. Daarnaast heeft GATA4 sterke interactie met andere transcriptiefactoren, namelijk Nkx2.5 en Tbx5. Een mutatie van GATA4 veroorzaakt in de meeste gevallen congenitale heart disease. In verschillende onderzoeken zijn mutaties gevonden in GATA4 in patiënten met atriële fibrillatie.

Tijdens dit onderzoek is onderzocht wat de verschillen zijn van GATA4 mutanten ten opzichte van GATA4 wildtype. Met behulp van PCR mutagenese zijn de verschillende mutaties gemaakt. Daarna zijn met miniprep, midiprep en sequenzen de constructen gecontroleerd en gezuiverd voor transfectie. Na de transfectie zijn twee technieken uitgevoerd nucleair trafficking en luciferase assay.

Uit de resultaten is gekomen dat alle mutanten terug naar de kern worden getransporteerd. Daarnaast zijn er twee mutanten H28D en Y38D die een verhoogde transcriptionele activiteit hebben op de atriale natriuretisch peptide. De overige negen mutanten hebben geen grote verschillen in transcriptionele activiteit ten opzichte van de wild type.

De conclusie van dit onderzoek is dat een mutatie in GATA4 met het fenotype atriële fibrillatie geen effect heeft op het nucleair transport. Verder zijn er twee van de 11 mutanten die effect hebben op de transcriptionele activiteit van GATA4. De andere negen mutanten hebben geen effect op de transcriptionele activiteit.

## Summary

The development of the heart during embryogenesis is an important process. During the development, there are multiple processes involved in the development of the chambers. Transcription factors are important for the development of the heart. Poorly developed heart causes congenital heart disease.

Atrial fibrillation is a heart condition and is recognized by uncontrolled activation of the atria. Atrial fibrillation usually occurs in combination with other heart defects or risk factors. In addition, it is possible that the development of atrial fibrillation have genetic causes.

GATA4 is a transcription factor and is important for the development of the heart. It provides cardiogenesis. In addition GATA4 has a strong interaction with two other transcription factors: Nkx2.5 and Tbx5. In the most of cases a mutation in GATA4 caused congenital heart defects. Several studies found mutation in GATA4 with the phenotype atrial fibrillation.

In the period of the study there was looked for differences between GATA4 mutants and GATA4 wild type. The mutations were made with PCR mutagenesis. Then with miniprep, midiprep and sequence we checked whether the construct was good and purified for the transfection. After the transfection, two techniques were carried out, nuclear trafficking and luciferase assay.

The results demonstrated came that all mutations are going back from the cytoplasm to the core. In addition two mutants H28D and Y38D have an increased transcriptional activity on the atrial natriuretic peptide. The other nine mutants do not have a lot differences in transcriptional activity compared to the wild type.

The conclusion of this study is that a mutation in GATA4 with the phenotype atrial fibrillation has no effect on the nuclear transport. Furthermore, there are two of the 11 mutants that have an effect on the transcriptional activity of GATA4. The other nine mutants have no effect on the transcriptional activity.

## Afkortingenlijst

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| AF            | Atriële fibrillatie              |
| ANF           | Atriële natriuretisch factor     |
| ASD           | Atriële Septum Defect            |
| ASDs          | Atriële septatie defecten        |
| AVSD          | Atrioventriculair Septum Defect  |
| BNP           | B-type natriuretisch peptide     |
| Bp            | Basepaar                         |
| BSA           | Bovine serum albumine            |
| DAPI          | 4',6-diamidino-2-phenylindole    |
| DMEM          | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA           | Desoxyribonucleïnezuur           |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>          |
| FCS           | Foetal kalfs serum               |
| GFP           | Groen fluorescent proteïne       |
| HLH           | Hypoplastisch linkerhartsyndroom |
| IgG           | Immunoglobuline G                |
| Kt            | Kamertemperatuur                 |
| LB            | Luria Broth                      |
| MCS           | Multi Cloning Site               |
| NPC           | Nuclear Pore Complex             |
| PBS           | Phosphate buffered saline        |
| PCR           | Polymerase Chain Reaction        |
| PEI           | Polyethylenimine                 |
| Rpm           | Revolutions per minuut           |
| TOF           | Tetralogie van Fallot            |
| UV            | Ultra violet                     |
| VSD           | Ventriculaire Septum Defect      |
| VSDs          | Ventriculaire septum defecten    |
| WT            | Wildtype                         |

# Inhoudsopgave

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Voorwoord.....                                                                                      | 3  |
| Samenvatting .....                                                                                  | 4  |
| Summary.....                                                                                        | 5  |
| Afkortingenlijst.....                                                                               | 6  |
| 1. Inleiding.....                                                                                   | 8  |
| 1.1 Algemene inleiding.....                                                                         | 8  |
| 1.2 Het hart.....                                                                                   | 9  |
| 1.3 Atriële fibrillatie.....                                                                        | 12 |
| 1.4 GATA4.....                                                                                      | 14 |
| 2. Materiaal en methoden.....                                                                       | 18 |
| 2.1 PCR mutagenese.....                                                                             | 19 |
| 2.2 Transformatie.....                                                                              | 19 |
| 2.3 Miniprep.....                                                                                   | 20 |
| 2.4 Midiprep.....                                                                                   | 20 |
| 2.5 Restrictie.....                                                                                 | 21 |
| 2.6 Sequencen.....                                                                                  | 21 |
| 2.7 Nucleair trafficking .....                                                                      | 21 |
| 2.8 Luciferase assay.....                                                                           | 22 |
| 3. Resultaten .....                                                                                 | 23 |
| 3.1 Maken GATA4 DNA constructen.....                                                                | 23 |
| 3.2 Controleren van constructen GATA4 – NLS, GATA4 mutaties in NLS en GATA4 met<br>alleen NLS ..... | 26 |
| 3.3 Nucleair trafficking .....                                                                      | 26 |
| 3.4 Luciferase assay .....                                                                          | 29 |
| 4. Conclusie/discussie .....                                                                        | 30 |
| 5. Referenties.....                                                                                 | 33 |
| Bijlage 1 pcDNA3.1 restrictie map .....                                                             | 35 |
| Bijlage 2 pcDNA-DEST47.....                                                                         | 36 |
| Bijlage 3 Protocol Transformatie.....                                                               | 37 |
| Bijlage 4 Protocollen Midiprep .....                                                                | 40 |
| Bijlage 5 Protocol Sequencen.....                                                                   | 41 |
| Bijlage 6 Protocol Luciferase assay .....                                                           | 45 |
| Bijlage 7 Resultaten sequence midiprep.....                                                         | 50 |

# 1. Inleiding

## 1.1 Algemene inleiding

Atriële fibrillatie (AF) is een hartafwijking die wordt gekarakteriseerd door ongecontroleerde activaties van de atria. Het is de meest voorkomende cardiale aritmie en AF komt meestal voor in combinatie met andere hartafwijkingen of risicofactoren. Daarnaast is het ontwikkelen van AF mogelijk door puur genetische oorzaken. Daarbij is dan sprake van een mutatie in een gen. Recent zijn er onderzoeken geweest naar het GATA4 gen. Dit is een transcriptiefactor die belangrijk is voor de vorming van het hart. In verschillende onderzoeken zijn mutaties gevonden in families waarvan geen sprake is van een aangeboren hartafwijking wat meestal gezien wordt bij een mutatie van GATA4, maar deze mensen hebben alleen AF. Deze onderzoeken beschreven niet wat de mogelijke oorzaken en mechanismen zouden kunnen zijn die tot GATA4 gerelateerde AF leiden. In totaal zijn er 11 verschillende mutaties gevonden, deze mutaties bevinden zich over het hele gen.

### **Doelstelling**

Doordat het niet bekend is wat de oorzaak is, is het hoofddoel van mijn onderzoek, te achterhalen wat mogelijk het mechanisme zou kunnen zijn van een mutatie in GATA4 die alleen leidt tot het AF fenotype.

Dit is één grote hoofdvraag die verdeeld kan worden in verschillende deelvragen. Hierbij wordt dan vooral gekeken wat de verschillen zijn van GATA4 mutanten ten opzichte van GATA4 wildtype (WT).

### **Hoe is de kern trafficking van de GATA4 mutanten ten opzichte van GATA4 wild type?**

Het is belangrijk om te weten waar de GATA4 mutant zich bevindt. Het GATA4 eiwit wordt afgeschreven in het cytoplasma, maar moet vervolgens terug de kern in. Het is mogelijk dat een GATA4 mutant niet terug de kern in kan. Om deze vraag te kunnen beantwoorden wordt gekeken naar de nucleair trafficking. Bij deze techniek, wordt er met een antilichaam gekeken naar de plek waar de GATA4 mutant zich bevindt in de cel ten opzichte van de GATA4 wildtype (WT).

### **Wat is de activiteit van de GATA4 mutanten aan het DNA ten opzichte van GATA4 wild type?**

GATA4 is een transcriptiefactor en bindt op het DNA om genen te activeren. Mogelijk is de transcriptionele activiteit van GATA4 versterkt of verminderd als GATA4 een mutatie heeft. Om deze vraag te kunnen beantwoorden wordt een luciferase assay uitgevoerd waarbij gekeken wordt hoeveel GATA4 mutant wordt geactiveerd ten opzichte van GATA4 WT.

## 1.2 Het hart

### Ontwikkeling

Embryogenese is een belangrijke fase van de ontwikkeling. Tijdens deze fase is het hart het eerste orgaan dat wordt gevormd en ook zijn functie kan uitoefenen. Het hart wordt gevormd uit het mesoderm. In het mesoderm vormt een cardiogene plaat, dit is een groepje cellen die zich aan de kant van het hoofd van het embryo bevindt. Uit deze cellen vormt een gespierde buis, deze buis trekt peristaltisch samen. Op het moment dat de buis verder groeit, buigen de uiteinden van de buis naar het midden waardoor er een soort hoefijzer ontstaat. De uiteinden van de buizen komen naar elkaar toe en buigen zich met elkaar samen waardoor een lus ontstaat. Dit wordt ook wel de vroege hartbuis genoemd. De wand van de vroege hartbuis bestaat uit primair myocard wat weer bestaat uit cardiomyocyten. In dit stadium is de geleiding van elektriciteit door het hart laag. [1]

In de hartbuis zijn er celdelingen en cel differentiatie van de cardiomyocyten op verschillende plaatsen. Dit zorgt voor het begin van het vormen van de kamers. [1]

Voor het ontwikkelen van de kamers worden primair myocardcellen gedifferentieerd naar werkmyocardcellen. Deze cellen hebben snellere geleidingseigenschappen, dan de primaire cardiomyocyten. Dit is van belang, omdat een embryonaal hart nog geen kleppen heeft waardoor de kamers niet mogen ontspannen doordat het bloed één richting op stroomt. In figuur 1 is te zien hoe de verschillende stadia van de ontwikkeling van het hart eruit zien.

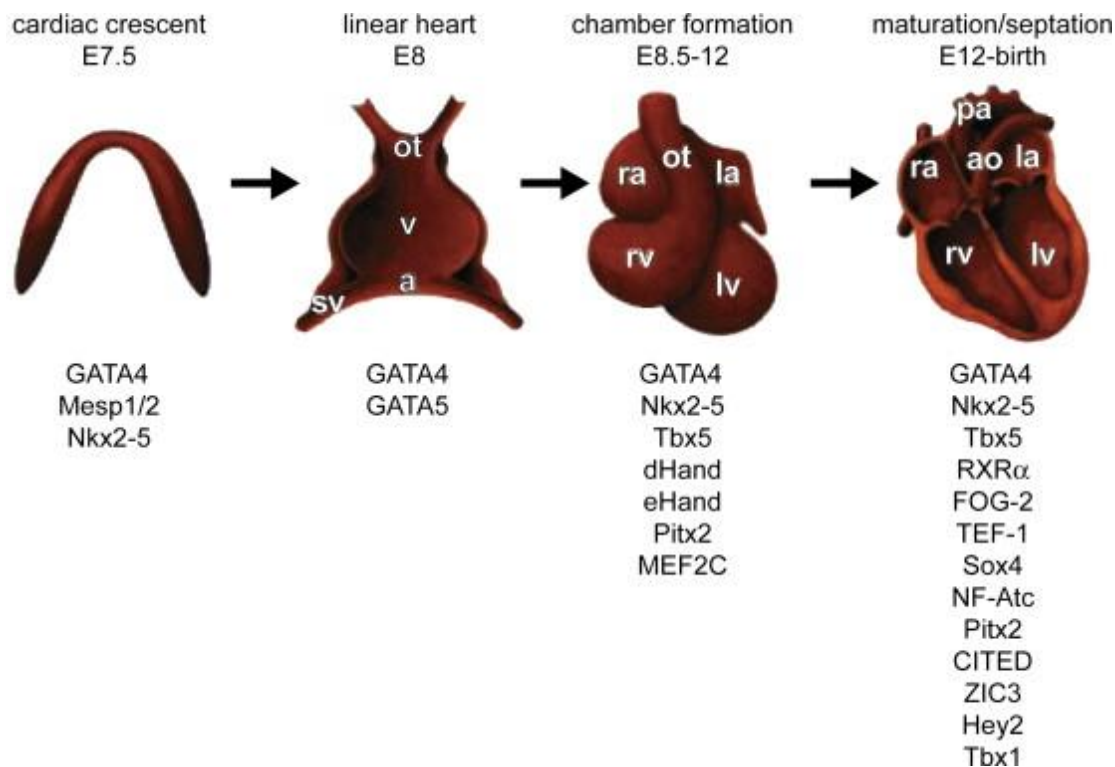
Defecten in de communicatie voor het vormen van de kamers kunnen zorgen voor aangeboren hartafwijkingen of wel congenital heart disease (CHD). [2]

De myocyten van de componenten van het geleidingssysteem zoals de sinusknoop, atrioventriculaire knoop differentiëren niet naar het werkmyocard, maar blijven primaire myocardcellen. Wat zorgt voor een lagere contractie dan de kamers. Dit is belangrijk voor het voortbrengen van elektrische impulsen.

Het vormen van verschillende weefsels in het hart is een moeilijk proces. Transcriptiefactoren zijn belangrijk voor genregulatie voor het vormen van de verschillende weefsels. Hoe het mechanisme precies in elkaar zit is niet bekend. Wel is bekend dat GATA4 een belangrijke transcriptiefactor is die tijdens het begin van de ontwikkeling van het hart tot expressie wordt gebracht. Daarnaast zijn Nkx2.5 en Tbx5 ook belangrijke transcriptiefactoren voor het vormen van het hart die een samenwerking aangaan met GATA4.[1,2] GATA4 wordt in hoofdstuk 1.4 meer in detail uitgelegd. Naast deze drie transcriptiefactoren zijn er nog meer transcriptiefactoren bekend die invloed hebben op de cardiogenese. (zie figuur 1)

Nkx2.5 speelt een rol als marker voor cardiale voorlopercellen en komt tot expressie in de vroege hartbuis. Daarnaast speelt Nkx2.5 een belangrijke rol in de eerste stappen van de ontwikkeling van het hart. De expressie van Nkx2.5 bevindt zich in atrioventriculaire kanalen, de ventrikels en atria. Uit onderzoeken is gebleken dat Nkx2.5 nodig is voor de transcriptionele activatie van genen zoals atrial natriuretisch factor (ANF) voor het vormen van de kamers.

Tbx5 komt het meest tot expressie in de atria, het linker ventrikel en linker ventriculaire septum. In het rechter ventrikel komt Tbx5 minder tot expressie. Tbx5 speelt een rol bij de ontwikkeling van de hartbuis en dan vooral de uitflow van het hart.



Figuur 1: Een aantal verschillende stadia van de ontwikkeling van het hart met bij elk stadia een overzicht van de verschillende transcriptiefactoren die tot expressie komen voor de cardiogenese [2]

Na 22 dagen zal het hart voor het eerst kloppen en na 24 dagen zal voor het eerst bloed door het hart gepompt worden.

Aan het einde van de twaalfde week is het hart volledig ontwikkeld. Alleen is er nog een opening tussen de atria. Dit is omdat de foetus nog niet zelfstandig kan ademen en daarom via de placenta zuurstof krijgt. Boven op de foramen ovale (de opening) zit een weefsel laag genaamd de septum primum. Op het moment dat de baby wordt geboren, neemt de druk in de rechter kant van het hart af en de druk in de longen neemt toe. Door deze twee processen wordt het foramen ovale door het septum primum gesloten en kan de baby zelfstandig ademen.

## Aangeboren hartafwijkingen

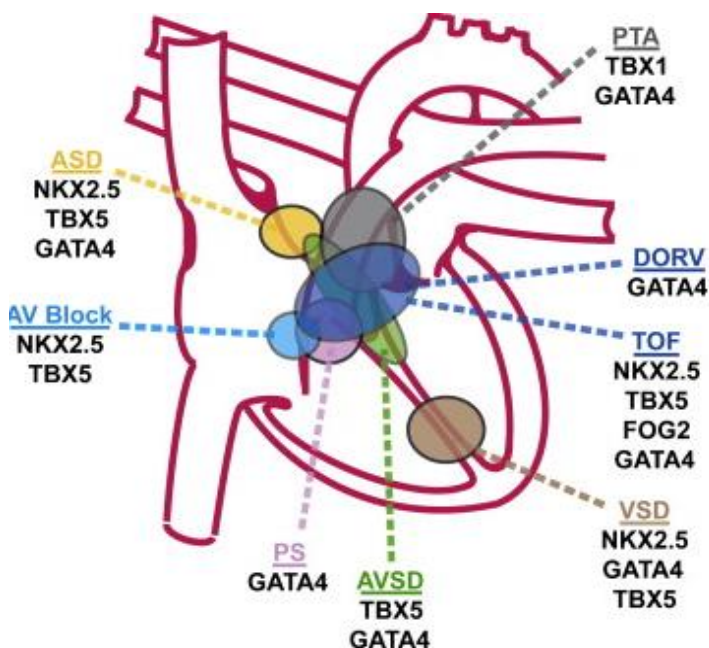
Tijdens de ontwikkeling van het hart is het mogelijk dat het hart een afwijking ontwikkeld. Dit wordt in de Engelse literatuur congenital heart disease (CHD) genoemd en in de Nederlandse volksmond een aangeboren hartafwijking. Dit is de meest voorkomende aangeboren afwijking bij pasgeborenen. Per jaar worden in de wereld ongeveer 1,35 miljoen baby's geboren met een aangeboren hartafwijking. De prevalentie van CHD is per land verschillend. Ongeveer 75% van kinderen die het eerste levensjaar overleven, kunnen een volwassen leven leiden. [3]

De oorzaak van CHD kan zowel genetisch als niet genetisch zijn. Bij niet genetische CHD kan er sprake zijn van infecties of bijvoorbeeld alcohol misbruik. Bij genetische CHD is er sprake van een mutatie of mutaties in genen. Dit zijn vaak transcriptiefactoren, zoals bijvoorbeeld het GATA4 gen. (zie figuur 2) Genetische CHD wordt dan ook vaak binnen families gezien. Er zijn veel verschillende mutaties in verschillende genen bekend dat CHD veroorzaakt. Het is niet altijd precies bekend hoe een mutatie CHD veroorzaakt. [2,3,4]

CHD is onder te verdelen in verschillende ziektebeelden. De meest voorkomende is Atrial Septum Defect (ASD). Bij deze hartafwijking is er sprake van het niet goed afsluiten van de foramen ovale na de geboorte. Hierdoor blijft er een opening tussen de atria waardoor zuurstofrijk bloed van het linker atrium naar het rechter atrium kan stromen doordat de druk in het linker atrium groter is dan het rechter atrium. Dit kan ervoor zorgen dat er een overbelasting is van het rechter atrium. Doordat er bloed naar het rechter atrium lekt en zo weer in de longen komt is er te weinig zuurstof in het lichaam waardoor het hart sneller moet gaan pompen om de juiste hoeveelheid bloed door het lichaam rond te pompen. Doordat het hart sneller moet gaan kloppen wordt het hart groter. [1]

Daarnaast is ventriculaire septum defect (VSD) ook een vaak voorkomende CHD. Dit is een hartafwijking wat meestal met een andere hartafwijking aanwezig. Door deze afwijking is er geen goede communicatie tussen de ventrikels. [5]

Naast deze twee hartafwijkingen zijn er nog meer CHD, waaronder het tetralogie van Fallot (TOF), hypoplastisch linkerhartsyndroom (HLH) en atrioventriculair septum defect (AVSD). In figuur 2 is een overzicht te zien van meerdere CHD's.



Figuur 2: Overzicht van verschillende CHD's. Verschillende transcriptiefactoren veroorzaken verschillende CHD's en bij verschillende CHD's zijn er meerdere transcriptiefactoren die zorgen voor de afwijking.

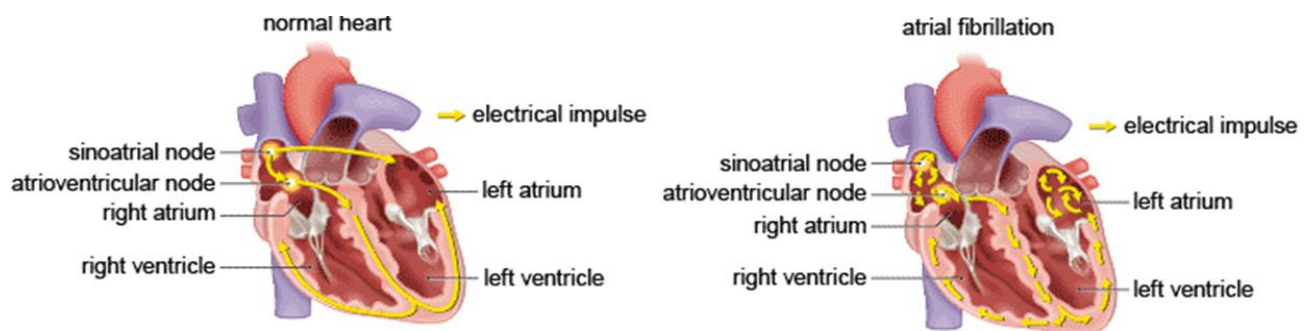
ASD, atriale septum defect, AV-blok, atrioventriculair blok; AVSD, atrioventriculair septum defect; DORV, double- outlet ventricle, PS, pulmonale stenose, PTA, tricuspidalis atresie; TOF, tetralogie van Fallot, VSD, ventrikel septum defect. [2]

## 1.3 Atriële fibrillatie

### Algemeen

Zoals eerder beschreven is atriële fibrillatie (AF) een hartafwijking die ervoor zorgt dat de atria ongecontroleerd samentrekken met ongeveer 400-600 slagen per minuut. Het is de meest voorkomende vorm van cardiale aritmie en werd voor het eerst beschreven in 1906. [6,7] In figuur 3 is een te hart te zien van een gezond persoon en van een persoon met AF. Het geleidingssysteem is verstoord, doordat er zoveel prikkels zijn.

De prevalentie van AF wereldwijd is ongeveer 1%. Bij ouderen van 80 jaar en ouder is dat zelfs 10%. In de Verenigde Staten (VS) hebben 3 miljoen mensen AF. In Europa zijn dat 6 miljoen mensen. De verwachting is dat deze getallen over 50 jaar verdubbeld zijn [7,8]. Mensen met AF hebben een grotere kans op een beroerte of plotse hartdood. AF is geassocieerd met andere hartafwijkingen zoals tachycardiomyopathie, cardiomyopathies, atrium septum defect en cardiale hypertrofie. Naast andere hartafwijkingen zijn er ook andere risicofactoren die de kans op AF vergroten. Leeftijd speelt een rol in de ontwikkeling van AF en mannen hebben een grotere kans op AF dan vrouwen. Ook obesitas, diabetes mellitus en COPD kunnen zorgen voor een grotere kans op AF.



Figuur 3: Linker een hart met een normaal geleidingssysteem. Rechter een hart met AF waardoor het geleidingssysteem niet meer normaal werkt.[11]

### Oorzaak

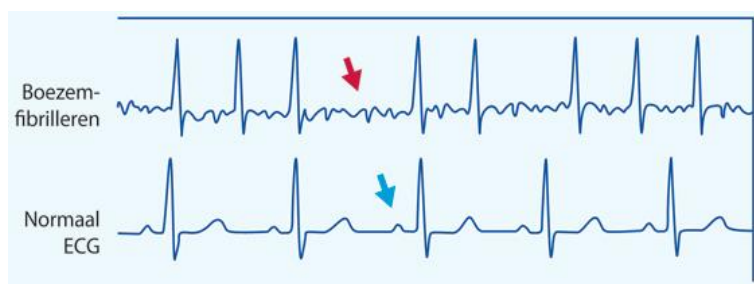
Er is geen duidelijke oorzaak voor het ontwikkelen van AF, maar AF kan ontstaan door de veranderingen van de atria door bijvoorbeeld verhoogde bloeddruk en/of andere hartafwijkingen. Daardoor is er een kans dat er ook remodelling optreedt van de atria. Dit komt door de vorming van bindweefsel wat ook wel endomyocardiale fibrose wordt genoemd. Het spierweefsel wordt dan vervangen door bindweefsel waardoor er een toename is van het aantal slagen per minuut. Ook ouderdom kan remodelling veroorzaken. Dit zou één van de oorzaken kunnen zijn. Ook is het mogelijk dat AF ontstaat na het gebruik van alcohol of na stress.

Naast dat ouderen AF ontwikkelen is het bekend dat er ook personen zijn met AF op jonge- of middelbare leeftijd. Dit is in ongeveer 30-40% van de gevallen. Deze personen hebben geen andere risicofactoren, waardoor de oorzaak vaak niet te vinden is. Dit wordt dan ook wel lone AF genoemd. [6] Van deze 30-40% is ongeveer 15% gerelateerd aan genetische AF in de familie. Over het algemeen is bij AF geen sprake van een erfelijke aandoening, met uitzondering van een aantal families met AF. De oorzaak van genetische AF is een mutatie in een gen. Er zijn diverse genen bekend waarvan een mutatie zorgt voor AF. De meeste genen coderen voor een kalium- of een natriumkanal. [6]

## Symptomen en diagnose

Niet alle personen met AF, hebben ook symptomen. Een aritmie kan een dag, maar ook een week duren. Er zijn diverse symptomen van AF zoals hartkloppingen, duizeligheid, vermoeidheid, maar ook acuut longoedeem en kortademigheid zijn. [10]

De diagnose van AF kan gesteld worden m.b.v. een ECG [11]. Mensen met AF hebben geen p golf op een ECG. Normaal is na de contractie van de atria repolarisatie gevolgd door depolarisatie van de atria, waardoor de p golf waarneembaar is op een ECG. Bij een persoon met AF zijn er zoveel contracties per minuut waardoor er steeds depolarisatie is. Hierdoor is de p golf niet waarneembaar op een ECG (zie figuur 4). Niet alle episodes zijn waarneembaar op een ECG. [10]



**Figuur 4: Resultaat van een ECG van een gezond persoon en van een persoon met AF. Bovenin het resultaat van een ECG van een persoon met AF. De p-golf ontbreekt. Onderin een ECG van een gezond persoon met een duidelijk p-golf. [III]**

## Behandeling

De behandeling van AF kan in verschillende stappen beschreven worden. Als eerst wordt geprobeerd om een beroerte te voorkomen door het gebruik van bloedverdunners. Dit wordt pas gebruikt als een persoon twee dagen of langer last heeft van AF. Tijdens AF is het mogelijk dat er bloedstolsels vormen in het hart dat een beroerte kan veroorzaken. Daarnaast zijn er risicofactoren en voedingsmiddelen dat de kans op AF verhoogd. Als deze factoren vermeden worden is de kans op AF kleiner. [11]

Als een persoon last blijft houden van AF is het mogelijk om medicijnen te gebruiken die de hartslag verlaagt. De medicijnen die meestal gebruikt worden zijn bètablokkers en calcium antagonisten. Deze medicijnen zorgen ervoor dat geleiding via de AV-knoop wordt vertraagd waardoor er minder slagen zijn per minuut. [8,11]

Het is mogelijk dat een persoon last blijft houden ondanks dat de hartslag normaal is. Voor deze personen kunnen er medicijnen gebruikt worden waardoor het sinusritme weer normaal wordt. Naast medicijnen is er nog een mogelijkheid om het sinusritme weer normaal te krijgen. Door cardioversie. Er wordt dan met een apparaat een elektrische impuls door de hartspier geleid waardoor het hartritme weer hersteld wordt.

## 1.4 GATA4

### GATA factoren

GATA4 staat voor GATA eiwitbinding 4 en is een transcriptie factor die onderdeel is van de familie van GATA factoren. In totaal zijn er zes GATA factoren bekend in het genoom van een zoogdier. Alle GATA factoren hebben twee dezelfde zinkvingers, namelijk Cys-Xaa<sub>2</sub>-Cys-Xaa<sub>17</sub>-Cys-Xaa<sub>2</sub>-Cys. Deze vingers herkennen en binden een sequentie consensus motief in het DNA die bekend staat als de GATA motief: 5'-(A/T(GATA)A/G)-3'. Deze sequentie komt veel voor in promoters van verschillende genen. De C-terminal zinkvinger zorgt voor binding van het DNA en de N-terminal zinkvinger stabiliseert het DNA-eiwit interactie, maar ook eiwit-eiwit interacties. [12,13]

GATA4/5/6 wordt tot expressie gebracht in het cardiovasculaire systeem en komen in een hoog percentage met elkaar overeen (80-90%). Terwijl GATA1/2/3 in het hematopoietische systeem tot expressie wordt gebracht. [12]

### Functie

GATA4 komt tot expressie tijdens de embryogenese in cardiale cellen. Het is een regulator voor genexpressie en cellulaire activiteiten. GATA4 brengt verschillende genen tot expressie waarvan ANF en B-type natriuretisch peptide (BNP) er twee zijn. Het is bekend dat GATA4 in totaal 30 verschillende promoters direct kan aanzetten voor transcriptie van genen. [2,13]

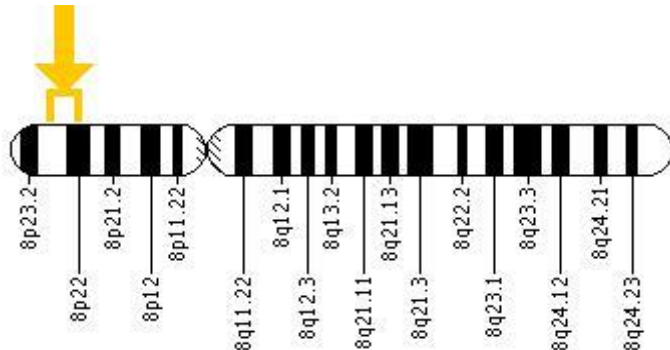
De expressie van GATA4 tijdens de embryogenese vindt waarschijnlijk zowel autonoom als niet autonoom plaats. Het vormen van cardiomyocyten vanuit embryonale stamcellen is niet autonoom en bij autonoom worden de mesodermcellen gedwongen om GATA4 aan te maken om samen met een andere factor BAF60C ervoor te zorgen dat cardiomyocyten markers tot expressie worden gebracht. Tijdens de ontwikkeling van het hart komt GATA4 tot expressie in het proepicardium, epicardium, myocardium en endocardium. Embryo's met een deficiënte van GATA4 hebben een onontwikkelde myocardium en geen proepicardium. [13]

De transcriptiefactor komt tijdens de hele levensduur van de mens tot expressie. In een recente studie is gebleken dat GATA4 in aanwezigheid met TBX5 en transcriptiefactor MEF2C zorgt voor cardiomyocyten differentiatie en kan fibroblasten reprogrammeren naar cardiomyocyten. [4]

Daarnaast speelt GATA4 een belangrijke rol in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie, door de activatie van expressie van genen. Dit zijn o.a. ANF en BNP. [14] Dit kan gebeuren door de acetylering van GATA4. Een mutatie op de positie waarop acetylering plaats vindt kan zorgen voor cardiale hypertrofie doordat GATA4 tot overexpressie wordt gebracht. Hierdoor kunnen andere genen ook tot overexpressie gebracht worden. GATA4 wordt naast acetylering ook gefosforyleerd. Dit kan ook zorgen voor cardiale hypertrofie.

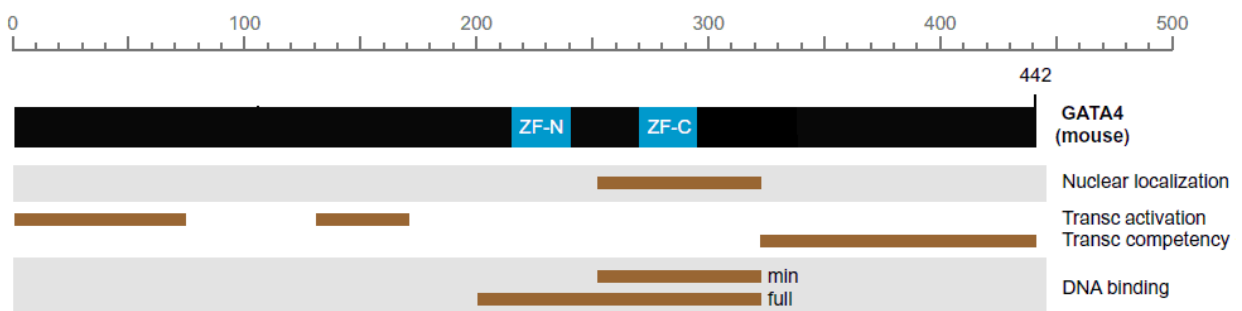
## GATA4 eiwit structuur

GATA4 bevindt zich op de korte arm van chromosoom 8. (zie figuur 5) De exacte positie is van basepaar 11.561.716 tot en met 11.617.508. Het eiwit bestaat uit 7 exonen, 422 aminozuren en in totaal 1329 bp. [6,15]



Figuur 5: positie van GATA4 op chromosoom 8. [IV]

Het GATA4 eiwit bestaat uit een transcriptionele activatie domein dat zich bevindt op positie 1 - 74 en op positie 130 – 177. Verder zijn er twee zinkvingers N-terminal en C-terminal die bevinden zich op positie 215 - 240 en op positie 270 – 324. Deze zinkvingers zijn belangrijk voor de binding van het DNA. Daarnaast heeft GATA4 een nucleair lokalisatie signaal (NLS) dat bevindt zich op positie 254 – 324. Dit signaal is nodig voor het transport vanaf het cytoplasma naar de kern. In figuur 7 is een plaatje te zien van GATA4 met de verschillende regio's. [12,13]



Figuur 6: Eiwitstructuur van GATA4. [12]

## Interacties met andere transcriptiefactoren en cofactoren

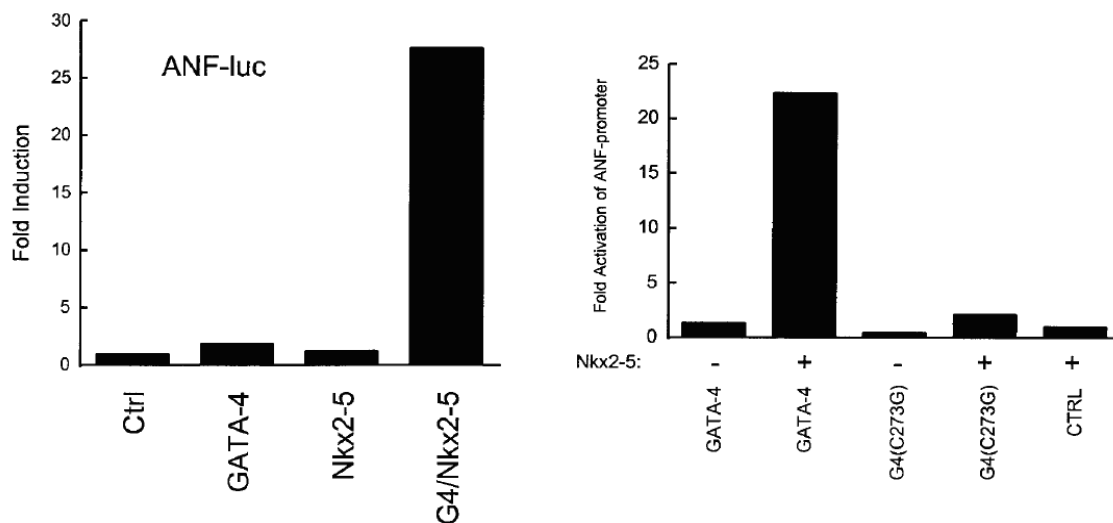
GATA4 gaat interacties aan met andere transcriptie factoren om gen transcriptie te activeren. Genen die o.a. een interactie met GATA4 aangaan zijn: Nkx2.5, GATA6, Fog1/2, TBX5, SRF en MEF2. [13] Daarvan zijn Nkx2.5 en TBX5 samen met GATA4 de belangrijkste transcriptiefactoren voor het ontwikkelen van het hart zie hoofdstuk 1.2.

### Nkx2.5

Nkx2.5 is een eiwit dat codeert voor een transcriptie factor en is familie van de Nk2 factoren. Het eiwit heeft een homeodomein. Op dit domein kan een ander eiwit de sequentie herkennen en vervolgens op de sequentie binden. [16] Eén van deze eiwitten is GATA4. Nkx2.5 homeodomein bindt op de C-terminal van GATA4 en de interactie van Nkx2.5 op GATA4 zorgt voor transcriptionele activatie van reporter genen. Naast het homeodomein heeft Nkx2.5 ook C- en N-terminal domeinen.

Net zoals GATA4 is Nkx2.5 belangrijk voor de ontwikkeling van het hart en komt het ook tot expressie gedurende de hele levensduur van de mens. Een mutatie in het gen kan diverse hartafwijkingen veroorzaken.

Zowel GATA4 als Nkx2.5 gebruiken ANF als transcriptionele target. Er is een onderzoek geweest naar de interactie tussen de twee transcriptiefactoren. Uit het onderzoek is gebleken dat GATA4 een sterke interactie aangaat met Nkx2.5. (Zie figuur 7) In het figuur is te zien dat een combinatie van beide transcriptiefactoren de activiteit sterk verhoogd. Dit duidt erop dat de twee transcriptiefactoren samen zorgen voor het verhogen van de activiteit. [17]



Figuur 7: Resultaat van luciferase assay met GATA4 met een interactie van Nkx2.5 [11]

## TBX5

Een interactie met TBX5 en GATA4 zorgt ervoor dat reporter gen transcriptie wordt geactiveerd. TBX5 kan op hele eiwit van GATA4 binden. Als de interactie niet goed kan plaatsvinden door bijvoorbeeld een mutatie G296S in GATA4 is het mogelijk dat er sprake is van misvorming van het hart. [13]

## Transport van GATA4

GATA4 wordt net als alle kerneiwitten gesynthetiseerd in het cytoplasma van de cel, maar moet vervolgens terug de kern in om de functie te kunnen uitvoeren. Dit transport gaat via de nucleaire envelop. GATA4 is een eiwit en kan niet passief door het membraan, daarvoor is actief transport nodig. Voor GATA4 is bekend dat de nucleaire lokalisatie signaal (NLS) aanwezig is in het DNA bindend domein van het eiwit. Dit is een stuk sequentie waarop  $\beta$  importine kan binden. Normaal bindt op deze sequentie een  $\alpha$  importine, maar GATA4 heeft geen herkenningssite van  $\alpha$  importine. Vervolgens kan GATA4 naar de kern. Er zijn vier verschillende residuen waar  $\beta$  importine kan binden. Mutaties in één van de residuen zorgen ervoor dat er een verminderde activatie en transcriptie van GATA4 is. [18]

## **Mutaties GATA4**

Er zijn verschillende mutaties bekend in GATA4 die verschillende hartafwijkingen veroorzaken. Dit zijn vooral puntmutaties waardoor er een verandering van aminozuur optreedt. Ook zijn frameshifts en deleties gevonden.

Atriële septatie defecten (ASDs) zijn eerder besproken. Er zijn diverse mutaties bekend in GATA4 die een ASD veroorzaken. Eén van deze mutaties is G886A. De G staat voor glycine dat wordt veranderd in een A van alanine. Daarnaast is er ook een frameshift gevonden op positie 359.[19]

Verder zijn er mutaties gevonden die Ventriculaire septum defecten (VSDs) veroorzaken. Eén van de mutaties is E359K. Dit is een mutatie waarvan ook beschreven is dat het AF veroorzaakt. Een andere mutatie is A442V. Dit is één aminozuur verder, dan een mutatie die alleen AF veroorzaakt. [5]

Daarnaast kunnen GATA4 mutaties Tetralogy van Fallot (TOF) veroorzaken. Er is een mutatie gevonden P407Q, maar ook een deletie van 3 bp op positie 354.[5]

In tegenstelling tot de hierboven beschreven mutaties die aangeboren hartafwijkingen veroorzaken, zijn er ook GATA4 mutaties gevonden die enkel AF veroorzaken. Deze mutaties bevinden zich over het hele GATA4 gen.

## 2. Materiaal en methoden

In totaal zijn 11 constructen gebruikt voor het onderzoek. Zie tabel 1 voor het overzicht van de verschillende constructen. Dit zijn puntmutaties in GATA4 waardoor een verandering van aminozuur optreedt. Van de 11 constructen waren er al vijf gemaakt (S70T, S160T, M247T, L325V en A411V). De andere zes constructen moesten nog gemaakt worden. Als eerst moest GATA4 in pcDNA3.1 plasmide geligeerd worden. Dit was al uitgevoerd. Zie bijlage 1 voor de vector. In de afgelopen zes maanden is het volgende uitgevoerd: PCR mutagenese om de specifieke mutatie aan te brengen in de verschillende constructen. Daarna zijn de constructen getransformeerd voor vermeerdering van het plasmide en vervolgens is het DNA uit *E.coli* geïsoleerd. Dan is een selectie gemaakt welke constructen goed zijn voor sequencen d.m.v. miniprep. Daarna zijn midipreps uitgevoerd voor de transfecties. Vanuit de transfecties zijn de volgende technieken uitgevoerd met nucleair trafficking en luciferase assay. De constructen werden opgeslagen in de -20°C. De technieken worden verder in het hoofdstuk beschreven.

**Tabel 1: Overzicht van de 11 mutanten met de verandering van aminozuur. Eerste letter staat voor het aminozuur wat het normaal is. De cijfers geven aan op welke plek het aminozuur zit en de laatste letter staat voor het aminozuur waarin het veranderd is na een mutatie.**

| Mutant | Vorig aminozuur | Triplet | Veranderd aminozuur | Triplet |
|--------|-----------------|---------|---------------------|---------|
| G16C   | Glycine         | GGT     | Cysteine            | TGT     |
| H28D   | Histidine       | CAC     | Asparaginezuur      | GAC     |
| Y38D   | Tyrosine        | TAC     | Asparaginezuur      | GAC     |
| S70T   | Serine          | AGC     | Threonine           | ACC     |
| P103A  | Proline         | CCG     | Alanine             | GCG     |
| S160T  | Serine          | AGC     | Threonine           | ACC     |
| M247T  | Methionine      | ATG     | Threonine           | ACG     |
| L325V  | Leucine         | CTG     | Valine              | GTG     |
| K329N  | Lysine          | AAG     | Asparagine          | AAT     |
| E359K  | Glutaminezuur   | GAG     | Lysine              | AAG     |
| A411V  | Alanine         | GCG     | Valine              | GTG     |

Voor de controle van de nucleair trafficking zijn constructen afkomstig uit Australië gebruikt, omdat er in het AMC geen positieve controle constructen waren voor de nucleair trafficking van GATA4. Daarvan is eerst een transformatie uitgevoerd. Gevolgd door een miniprep, midiprep en sequencen. Vervolgens is nucleair trafficking uitgevoerd van de verschillende constructen. GATA4 is gekloneerd in pDEST47 volgens the gateway system. Daarbij zijn CMr en ccdB eruit gehaald en daarvoor in de plaats is GATA4 geligeerd. Zie bijlage 2 voor de vector. In tabel 2 is een overzicht te zien van de verschillende constructen.

**Tabel 2: Overzicht van de drie verschillende constructen**

| Construct                                |
|------------------------------------------|
| pDEST47-GATA4 Δ270-324                   |
| pDEST47-GATA4- 282,283,317,319A mutaties |
| pDEST-GATA4 alleen NLS 210- 329          |

## 2.1 PCR mutagenese

PCR mutagenese is uitgevoerd om de specifieke mutaties te maken in GATA4. Dit is uitgevoerd volgens een zelf opgesteld protocol. Voor elk construct zijn zelf ontwikkelde primers gebruikt. Dit omdat de primers specifieke mutaties bevatten. In tabel 3 is een overzicht te zien van de primers van de zes constructen die nog gemaakt moesten worden.

Voor de PCR is de volgende PCR mix gebruikt voor één construct. H<sub>2</sub>O; 10 µl Betaïne (5M); 5 µl Buffer (10x); 1 µl dNTP's (kit); 1,25 µl Primer F (125 ng/µl); 1,25 µl Primer R (125 ng/µl), pcDNA3.1+GATA4 WT (100 ng/µl) en 1 µl pfuTurbo (2,5 U/µl). Het totaal volume was 51.1 µl.

Dit totaal volume is vervolgens verdeeld in vijf verschillende epjes (5x 10 µl). Dit omdat de PCR een gradiënt PCR is. Voor de annealing zijn vijf verschillende temperaturen gebruikt (57-58-59-60-61°C).

De rest van het PCR programma zag er als volgt uit: 3' 97°C; (0,45' 97°C; 1' ---°C; 9' 68°C) 25x; 15' 72°C.

Na de PCR zijn de PCR producten behandeld met *DpnI* om het gemethyleerd DNA kapot te maken.

Tabel 3: Overzicht van de verschillende primers

| Mutant | Forward/reverse | Primer sequentie                         |
|--------|-----------------|------------------------------------------|
| G16C   | Forward         | 5'CACGGGCGCCCCCCTGTGCCTACGAGGCGGGC 3'    |
|        | Reverse         | 5'GCCCCGCCTCGTAGGCACAGGGGGGCGGCCCGTG 3'  |
| H28D   | Forward         | 5' CCCGGCGCCTTCATGGACGGCGCGGGCGCCGCG 3'  |
|        | Reverse         | 5' CGCGGCGCCCCGCGCCGTCCATGAAGGCGCCGGG 3' |
| Y38D   | Forward         | 5' GCGTCCTCGCCAGTCGACGTGCCACACCGCGG 3'   |
|        | Reverse         | 5'CCGCGGTGTGGGCACCTCGACTGGCGAGGACGC 3'   |
| P103A  | Forward         | 5' GCTTACACCCCGCCGCGCCGTGTCGCCGCGCTTC 3' |
|        | Reverse         | 5' GCTTACACCCCGCCGCGCCGTGTCGCCGCGCTTC 3' |
| K329N  | Forward         | 5' CCTGAATAAATCTAATACACCAGCAGCTCC 3'     |
|        | Reverse         | 5' GGAGCTGCTGGTGTATTAGATTTATTCAGG 3'     |
| E359K  | Forward         | 5' CCAGCAGCAGCAAGGAGATGCGTCCC 3'         |
|        | Reverse         | 5' GGGACGCATCTCCTTGCTGCTGCTGG 3'         |

## 2.2 Transformatie

Transformatie is uitgevoerd om het plasmide te vermeerderen. Dit is uitgevoerd volgens het standaard protocol AELW\_EG01 (zie bijlage 3). De transformatie werd uitgevoerd volgens de heat shock methode. Door de cellen eerst op ijs te incuberen en daarna kort te verhitten bij 42°C. Hierdoor wordt het DNA door de bacterie opgenomen. Door het daarna te recoveren in Luria Broth (LB) medium gaan de cellen zich vermeerderen. Voor het transformeren zijn competente *E.coli* cellen gebruikt. De opslag van deze cellen is in de -80°C.

In totaal werd 100 µl competente cellen gebruikt voor transformatie. Aan de 100 µl cellen werd 10 µl PCR product toegevoegd en 30 min geïncubeerd op ijs. Daarna volgde de heatshock van 30-45 sec bij 42°C. Dan weer op ijs voor ongeveer 5 min. Vervolgens 900 µl LB medium toegevoegd en 1 á 2 uur recoveren bij 37°C, 250 rpm schudstoof. Daarna werden de cellen uitgeplaat op een LB plaat met Ampiciline (100 mg/ml) en overnacht geïncubeerd bij 37°C.

### 2.3 Miniprep

Miniprep werd uitgevoerd om het DNA van GATA4 uit *E.coli* cellen te isoleren en is volgens een aangepast protocol uitgevoerd.

Een losliggende kolonie werd aangeprikt en overnacht geïncubeerd bij 37°C, 250 rpm schudstoof. Dan werd de gegroeide cultuur 6 min 6000 rpm gecentrifugeerd en vervolgens pellet opgelost in 300 µl resuspending buffer. Daarna werd 300 µl lysis buffer toegevoegd en 5 min geïncubeerd op kamertemperatuur. Na incubatie werd 300 µl neutralisatiebuffer toegevoegd, 15 min geïncubeerd op ijs en vervolgens 15 min max. rpm op kamertemperatuur (kt) gecentrifugeerd. Dan werd 750 µl supernatant overgebracht in een nieuw epje met 750 µl isopropanol dat vervolgens 30-45 min gecentrifugeerd werd op max. rpm, 4°C. Daarna werd het DNA pellet gewassen met 250 µl 70% Ethanol, door het 20 min te centrifugeren op max. rpm, 4°C. Na het drogen van de pellet, werd de pellet opgelost in H<sub>2</sub>O.

### 2.4 Midiprep

De midiprep werd uitgevoerd om het DNA uit de *E.coli* te isoleren en te zuiveren d.m.v. een kolom. Midiprep werd uitgevoerd volgens een purificatie kit. Tijdens het onderzoek zijn twee verschillende kits gebruikt. NucleoBond Xtr midi en Jetstar purification midi. Dit vanwege dat er niet voldoende kolommen aanwezig waren van NucleoBond Xtr midi. Het verschil tussen de twee kits is dat NucleoBond Xtr midi een extra filter heeft.

De midiprep is uitgevoerd voor alle constructen. Om daarmee vervolgens transfecties uit te voeren.

Voor de midiprep kunnen verschillende start culturen gebruikt worden voor de groei. Dit kan een cultuur zijn van een miniprep, glycerol stock uit de -80°C of vanuit de plaat rechtstreeks een kolonie aANFrikken en laten opgroeien. Vervolgens werd dit overnacht geïncubeerd met 100 ml LB medium en Ampiciline bij 37°C 250 rpm schudstoof.

De rest van de twee verschillende protocollen zijn te vinden in bijlage 4.

## 2.5 Restrictie

Ter controle of tijdens de miniprep of midiprep de juiste pcDNA3.1 GATA4 is geïsoleerd werd een restrictie uitgevoerd. Dit is volgens een zelf opgestelde protocol uitgevoerd. Er is één restrictie enzym gebruikt, namelijk *PmeI*. pcDNA3.1 heeft 2 restrictie sites van *PmeI* dat zowel in het begin als aan het uiteinde van de Multi Cloning Site (MCS) zit. Zie bijlage 1.

Voor de constructen uit Australië is gebruik gemaakt van *XhoI* en *Ascl*.

Voor de miniprep werd in totaal 5 µl DNA gebruikt en bij de midiprep werd een DNA concentratie gebruikt van 1 µg/µl.

De restrictiemix voor één construct bestond uit: H<sub>2</sub>O; 3,5 µl Neb4 buffer (10x); 0,3 µl *PmeI* (10 U/µl) en 0,35 µl BSA (10 mg/ml). Het totaal volume was 35 µl. Vervolgens werd het 1 á 2 uur geïncubeerd bij 37°C en gelelectroforese uitgevoerd.

Nadat de juiste minipreps en midipreps de juiste constructen bevatten werden de constructen gesequenced.

## 2.6 Sequenzen

Sequenzen werd uitgevoerd ter controle of de juiste mutatie in elk construct aanwezig was en werd uitgevoerd volgens het standaard protocol AELW\_EE07 (zie bijlage 5).

Sequenzen is zowel bij de miniprep als bij de midiprep uitgevoerd. Bij de miniprep is het hele insert gesequenced waarbij gekeken werd naar de mutatie, startcodon, stopcodon en naar eventuele andere mutaties. Bij de midiprep werd alleen de mutatie gesequenced. Zie tabel 1 voor de posities van de verschillende mutaties.

Sequence PCR mix voor één construct bestond uit: H<sub>2</sub>O; 1 µl sequentie buffer; 1 µl Betaïne (5 M); 1 µl BDT; 10 pmol/µl F primer en 1,2 µg plasmide.

In totaal zijn drie verschillende primers gebruikt vanwege de posities waar de mutaties zitten.

- Primer 1                      5'GCCGTCGTTTTCTCTCCC 3'
- Primer 2                      5'GCTTACACCCCGCCGGCCGTGTCGCCGCGCTTC 3'
- Primer 3                      5'CAAGATGAACGGCATCAACC 3'

De PCR programma zag er als volgt uit: 1' 98°C; (0,15' 98°C; 0,15' 50°C; 4' 60°C) 33x; 12' 12°C.

## 2.7 Nucleair trafficking

Met nucleair trafficking werd gekeken naar de lokalisatie van GATA4 in de cel. Normaal wordt GATA4 afgeschreven in het cytoplasma en wordt vervolgens terug naar de kern getransporteerd om de functie als transcriptiefactor te kunnen uitvoeren. In het geval van een mutatie is het mogelijk dat GATA4 niet terug meer de kern in kan. Met deze techniek werd gekeken naar het nucleair transport. Nucleair trafficking werd uitgevoerd volgens een zelf opgesteld protocol.

Alle stappen zijn op kt uitgevoerd of het moest anders vermeld zijn. COS7 cellen groeiden onder de standaard condities DMEM 41966 met 10% FCS en antibiotica voor 24-48 uur in een 37°C, 5% CO<sub>2</sub> stoof. Dan werden de cellen uitgeplaat in 12 wells-platen. De dichtheid

per 12 wells plaat was  $1.2 \times 10^6$  cellen. Vervolgens werd pcDNA3.1 GATA4 eerst behandeld met PEI. De ratio was 1:3 (1  $\mu$ g DNA + 3  $\mu$ g PEI). Één epje bevatte 1  $\mu$ g DNA met 250  $\mu$ l DMEM zonder FCS en 1 epje bevatte 3  $\mu$ g PEI met 250  $\mu$ l DMEM zonder FCS. Beide epjes moesten gemengd worden en PEI werd druppelsgewijs overgebracht in het epje met DNA. Vervolgens 25-30 min geïncubeerd op kt. Dan werd het verpakte DNA druppelsgewijs aan de cellen met 1 ml DMEM met FCS toegevoegd en 5 min gecentrifugeerd bij 1200 rpm. Na 2-6 uur incubatie werden de cellen gewassen en vers DMEM met FCS toegevoegd. De cellen werden in totaal ongeveer 24 uur geïncubeerd bij 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Na de transfectie werden de cellen gewassen met 1x PBS (2x snel), dan 12 min gefixeerd 1% PFA en vervolgens 15 min gepermeabiliseerd waardoor er grotere gaten in de celwand komen. Vervolgens was er een block stap met BSA 1% voor 1 uur. Dan volgde de incubatie van het eerste antilichaam, GATA4 (C-20), 1:500 PBS 1% BSA overnacht. De volgende dag werden de cellen gewassen met 1x PBS (2x snel, 3x 5 min, 50-100 rpm). Vervolgens incubatie van het tweede antilichaam, Alexa488-conjugated donkey anti-goat IgG, 1:500 PBS 1% BSA 2 uur. Gevolgd door wassen met 1x PBS (2x snel, 1x 5 min 50-100 rpm). Daarna 1x PBS + DAPI (0,25  $\mu$ g/ml), 15 min 50-100 rpm. Dan werden de cellen bekeken onder een UV microscoop en foto's gemaakt van alle kernen en alleen GATA4.

## 2.8 Luciferase assay

Luciferase assay werd uitgevoerd om de transcriptionele activiteit van GATA4 te meten. Luciferase met toevoeging van het luciferine zorgt ervoor dat luciferase met Mg<sup>2+</sup> en ATP luciferine wordt afgebroken waarbij licht vrijkomt. Dit licht kan bij een bepaalde golflengte 560 nm gemeten worden met een luminometer. Dit is uitgevoerd volgens een standaard protocol AELW\_EH03 (zie bijlage 6).

Alle stappen zijn op kt uitgevoerd of het moest anders vermeld zijn. H10 cellen groeiden onder de standaard condities DMEM 41966 met 10% FCS en antibiotica voor 24-48 uur in een 33°C, 5% CO<sub>2</sub> stoof. Dan werden de cellen uitgeplaat in 12 wells-platen. De dichtheid per 12 wells plaat was  $1.2 \times 10^6$  cellen. Vervolgens werd het DNA eerst behandeld met PEI. De ratio was 1:3 (1  $\mu$ g DNA + 3  $\mu$ g PEI). Één epje bevatte in totaal 1  $\mu$ g DNA ANF 700 ng/ $\mu$ l, 200 ng/ $\mu$ l GATA4 of 100 ng/ $\mu$ l vector. De rest werd opgevuld met leeg pcDNA3.1 tot 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. met 75  $\mu$ l DMEM zonder FCS en 1 epje bevatte 3  $\mu$ g PEI met 75  $\mu$ l DMEM zonder FCS. Beide epjes moesten gemengd worden en PEI werd druppelsgewijs overgebracht in het epje met DNA. Vervolgens 25-30 min geïncubeerd op kt. Dan werd het verpakte DNA druppelsgewijs aan de cellen met 1 ml DMEM met FCS toegevoegd en 5 min gecentrifugeerd bij 1200 rpm. Na 6-8 uur incubatie werden de cellen gewassen en vers DMEM met FCS toegevoegd. De cellen werden in totaal ongeveer 48 uur geïncubeerd bij 33°C, 5% CO<sub>2</sub>.

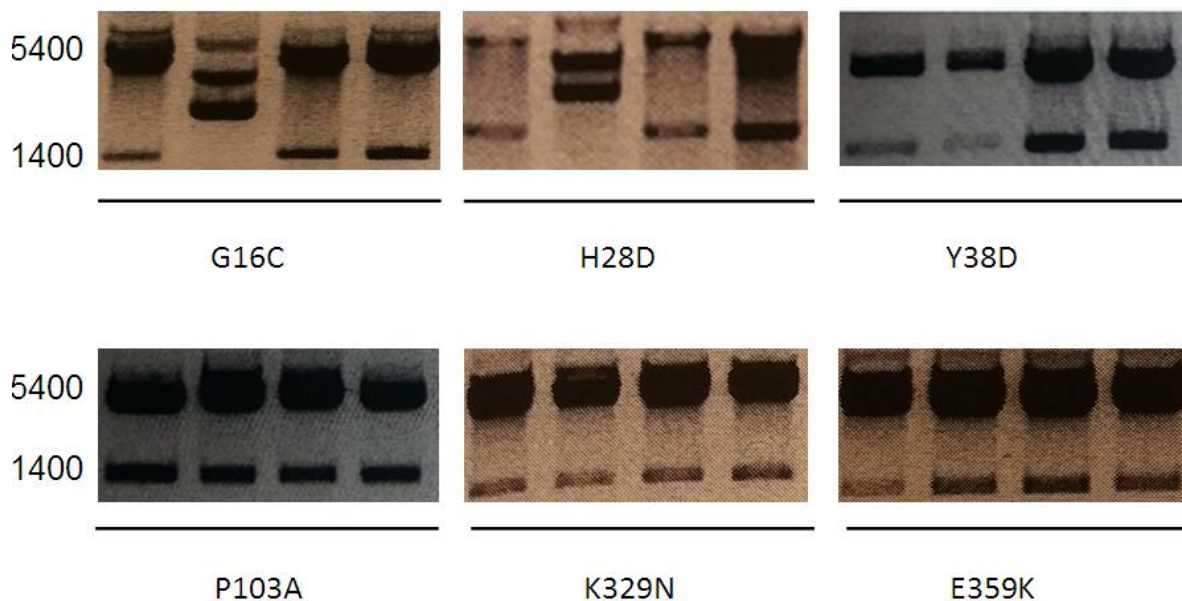
Na de transfectie werden de cellen gewassen met 1x PBS. Dan werd 150  $\mu$ l lysisbuffer (1:5) toegevoegd voor het kapot maken van de cellen. Dit werd 15 min geïncubeerd bij kamertemperatuur op de schudtafel. Dan werden de kapotte cellen bij elkaar geschraapt en overgebracht in een 1,5 ml epje en vervolgens 5 min gecentrifugeerd bij 4°C. De cellysaten werden tijdelijk bewaard op ijs. Vervolgens werd 10  $\mu$ l van het lysaat overgebracht in een 1,5 ml epje. Vervolgens werden de concentraties gemeten met een luminometer.

### 3. Resultaten

#### 3.1 Maken GATA4 DNA constructen

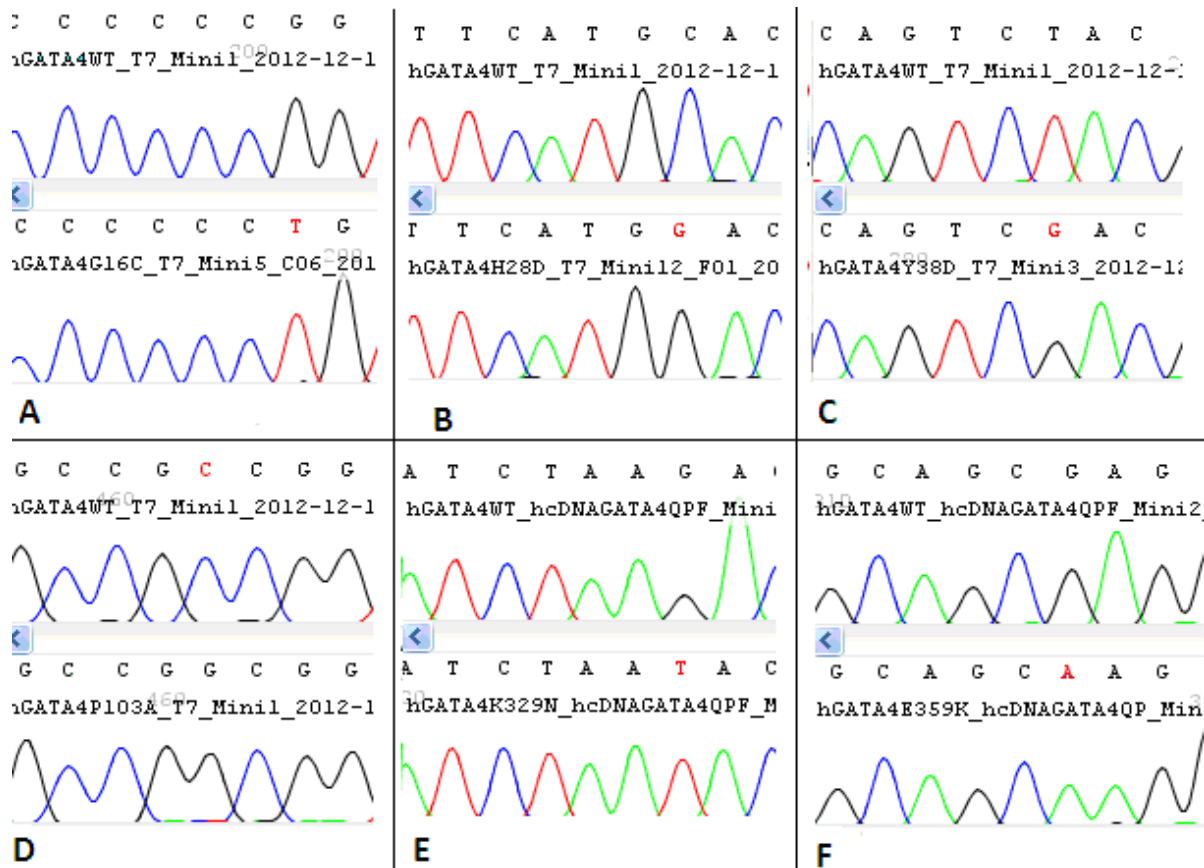
Als eerste zijn de zes overige constructen gemaakt. Daarvan is een site directed PCR mutagenese uitgevoerd om zo de juiste mutatie te verkrijgen. Na de PCR zijn de constructen getransformeerd en vervolgens kolonies aangeprikt voor het minipreppen. Daarna is een restrictie uitgevoerd met *PmeI* en op een 1% agarose gel geanalyseerd. De verwachting was dat er twee banden zichtbaar waren op de gel. Eén band met een grootte van ongeveer 5400 bp. Dit is het plasmide en een band van een grootte van ongeveer 1400 bp. Dit is GATA4.

In figuur 8 zijn per mutant vier resultaten te zien van minipreps van de in totaal 10 aangeprikte kolonies. De overige 6 resultaten zijn niet in het verslag opgenomen, maar gaven een vergelijkbaar resultaat. Bij G16C zijn drie samples te zien met de twee juiste banden. Een bandje van ongeveer 5400 bp en een bandje van ongeveer 1400 bp. Eén sample heeft drie banden te zien op de gel met verkeerde hoogtes. Dit is geen pcDNA3.1 met GATA4. Dit geldt ook voor H28D. Bij de andere mutanten hebben alle vier de samples twee banden op de gel met de juiste grootte.



**Figuur 8: Resultaten miniprep na restrictie met *PmeI*.**

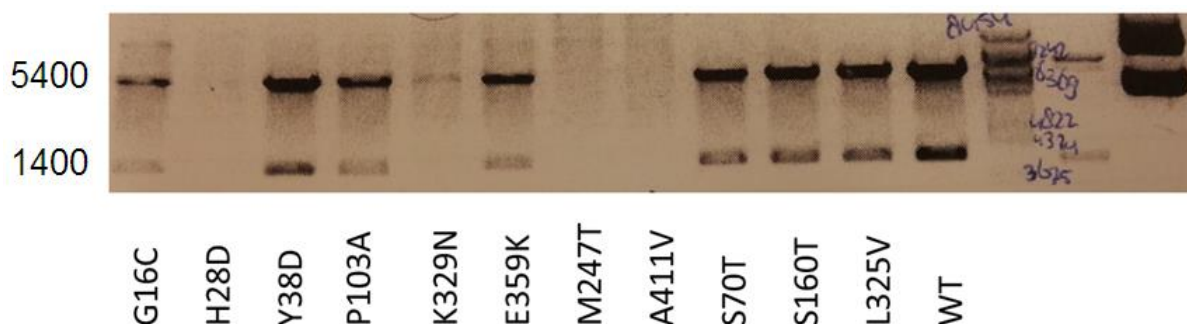
Van elk construct zijn meerdere minipreps gesequenced op de mutatie. Van elk mutant is één resultaat van de sequentie te zien in figuur 9. Er is te zien dat bij elk construct de juiste mutatie aanwezig is. Zie tabel 1 voor het overzicht van de veranderingen van aminozuren. Daarna is heel GATA4 gesequenced ter controle of er geen andere mutaties aanwezig waren en of het startcodon en stopcodon aanwezig waren. Er waren geen andere mutaties gevonden en alle samples hadden zowel het startcodon als het stopcodon.



**Figuur 9:** Resultaten van de miniprep na het sequencen. Per figuur is de bovenste sequence de wildtype en de onderste sequence de mutant. De rode letter geeft de positie aan waar de mutatie zit. A: mutant G16C, B: mutant H28D, C: mutant Y38D, D: mutant P103A, E: mutant K329N en F: mutant E359K.

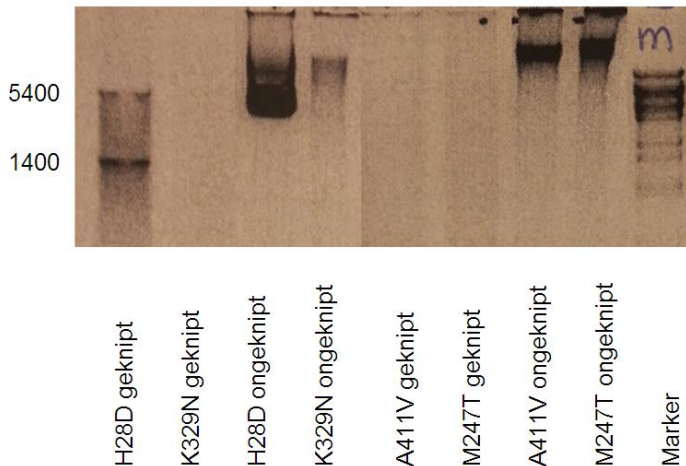
Van het overige opgroeide medium van de miniprep dat over was, is vervolgens een midiprep uitgevoerd. Van de constructen die al gemaakt waren is er vanuit een glycerol stock opgegroeid en de midiprep uitgevoerd. Na restrictie zijn de constructen op een 1% agarose gel geanalyseerd.

In figuur 10 zijn alle constructen te zien. Daarop is te zien dat bij H28D, K329N, M247T en A411V geen banden te zien zijn op de gel. Bij de andere constructen zijn twee banden te zien op de gel. Eén band van ongeveer 5400 bp en een band van ongeveer 1400 bp. G16C, P103A en E359K hebben bij GATA4 een zwakker bandje dan bij de andere mutanten. De concentratie  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  was dan ook lager dan bij de andere mutanten.



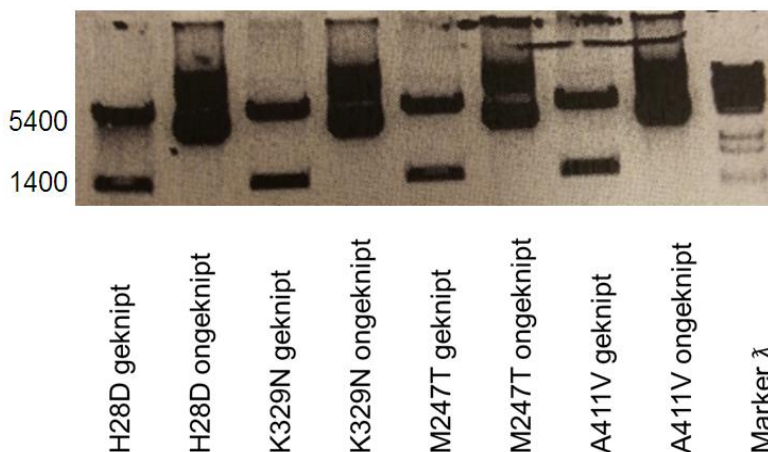
**Figuur 10:** Resultaat midiprep na restrictie met PmeI

Van de constructen H28D, K329N, M247T en A411V is de midiprep herhaald maar er was weer geen product te zien op de gel, of er was genomisch DNA te zien. Dit is te herkennen aan de banden boven in de gel. Dit werd ook gezien in figuur 11. Van geknipt M247T en A411V waren geen banden te zien op de gel, maar bij het ongeknipte DNA was een band te zien boven in de gel, wat genomisch DNA kan zijn. Bij K329N is zowel geknipt als ongeknipt geen banden te zien op de gel, dit betekent dat er helemaal geen pcDNA3.1 met GATA4 aanwezig was. H28D geknipt lijkt goed te zijn, maar er is wel afbraak en de band bij 5400 bp is zwakker, dan bij de band van 1400 bp.



**Figuur 11: Resultaat van herhaling midiprep na restrictie met PmeI**

Voor deze constructen is besloten opnieuw een miniprep (die al was gesequenced) voor hertransformatie in te zetten en vanuit een kolonie een midiprep ingezet. De resultaten daarvan zijn te zien in figuur 12. Er is te zien dat voor al deze constructen er twee banden zichtbaar zijn op de gel. Eén bandje met een grootte van 5400 bp en een bandje met een grootte van 1400 bp.



**Figuur 12: Resultaat van herhaling midiprep na restrictie met PmeI**

Na alle midipreps zijn de constructen weer gesequenced ter controle of de midiprep wel de juiste mutatie bevatte. Het resultaat daarvan is te zien in bijlage 7. Alle constructen hadden de juiste mutatie.

### **3.2 Controleren van constructen GATA4 – NLS, GATA4 mutaties in NLS en GATA4 met alleen NLS**

Als positieve controle voor de nucleair trafficking is gebruik gemaakt van constructen afkomstig uit Australië, omdat op het AMC geen construct aanwezig was waar de NLS van GATA4 uitgehaald was. Daarnaast zijn er nog twee andere constructen opgegroeid. GATA4 met in de NLS vier verschillende mutaties en GATA4 met alleen de NLS. Van deze constructen is transformatie, miniprep, midiprep en nucleair trafficking uitgevoerd.

Na miniprep en sequenzen waren de constructen goed. Dit geldt ook voor de midiprep en de sequentie. Data zijn niet getoond.

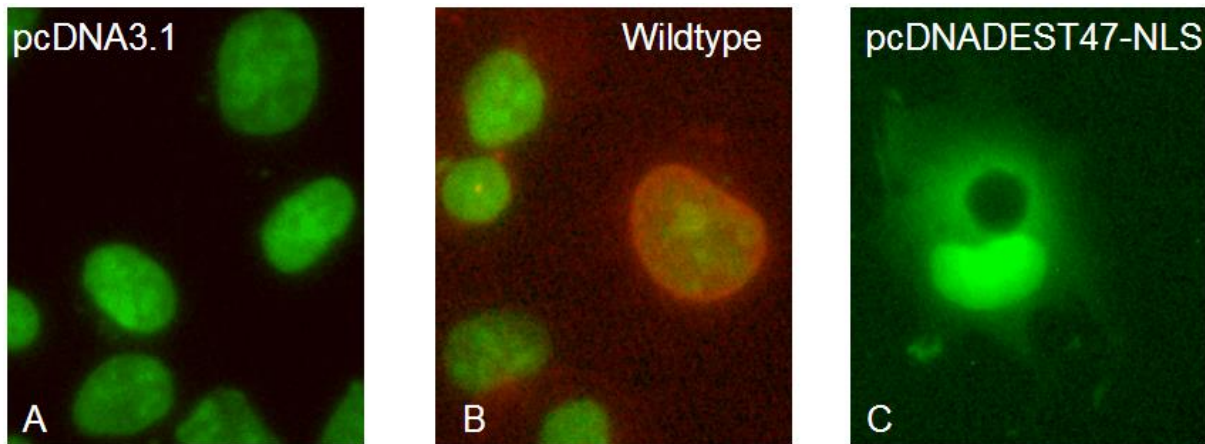
### **3.3 Nucleair trafficking**

Nadat de constructen waren gemaakt is nucleair trafficking uitgevoerd. Bij deze techniek is gekeken of de GATA4 mutanten, nadat het is afgeschreven als eiwit in het cytoplasma, weer terug de kern ingaan waar het eiwit zijn functie kan uitvoeren. Voor het experiment zijn COS7 cellen gebruikt. Als eerst is een transfectie uitgevoerd en na 6 uur medium ververs. Vervolgens na ongeveer 24 uur is GATA4 met antilichamen gebonden. Daarnaast zijn alle kernen gekleurd met DAPI. Dit is een kleurstof dat alle kernen aankleurt. M.b.v. een UV microscoop zijn de cellen bekeken.

In figuur 13 zijn de controles te zien. Figuur 13A is een negatieve controle, dit is pcDNA3.1 zonder GATA4. Zoals verwacht is er geen kleuring van de kernen voor GATA4. In figuur 13B is een controle te zien die toont hoe het er normaal uit hoort te zien. Deze controle bevatte pcDNA3.1 met GATA4 WT. De verwachting hiervoor is dat GATA4 weer terug de kern in zou gaan. Dit is ook te zien op de foto. Er zijn zowel groene als rode kernen. Dit heeft te maken met de transfectie efficiëntie. Deze was gemiddeld tussen de 30-40%.

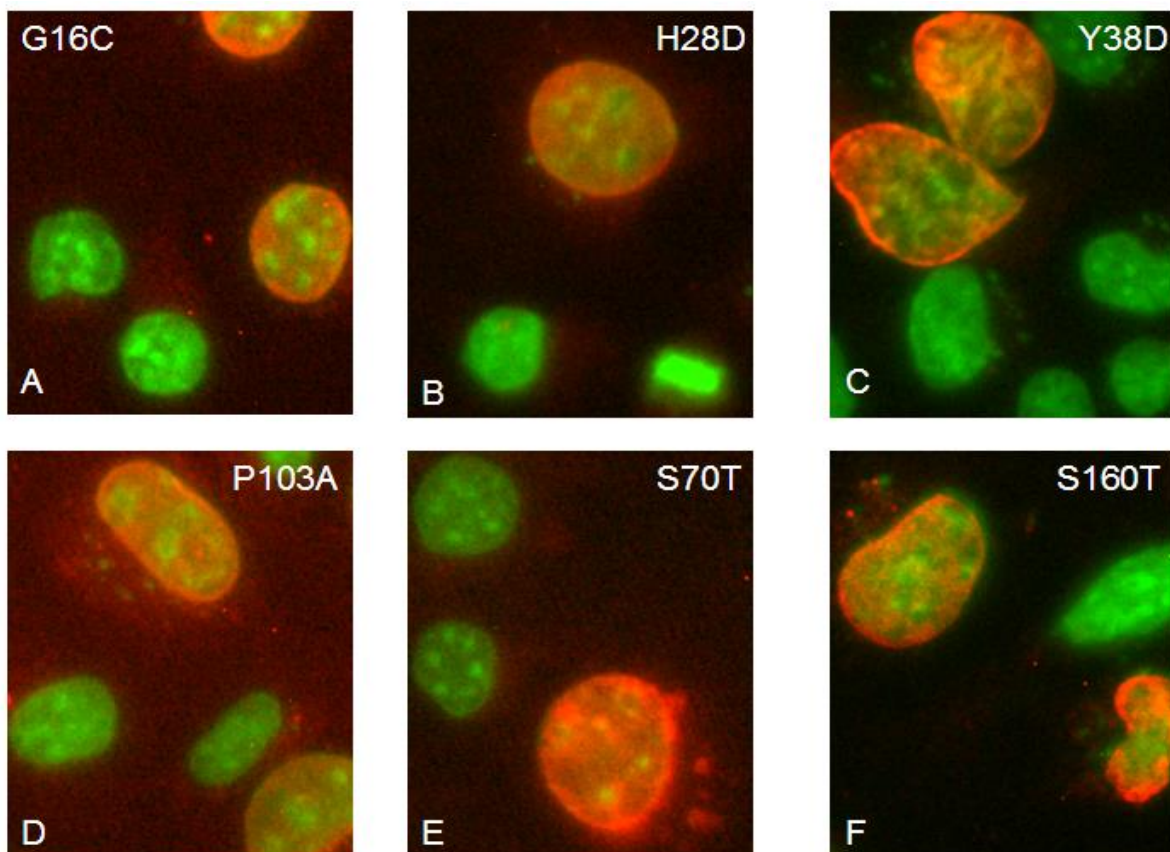
Als positieve controle is GATA4 min de NLS getransfecteerd. Dit construct is zoals eerder beschreven afkomstig uit Australië waar GATA4 is onderzocht voor nucleair trafficking. Het construct is eerst getransformeerd en gezuiverd voordat transfectie is uitgevoerd. Na 6 uur is het medium ververs en na 24 uur zijn de cellen bekeken met een UV microscoop. Uit het onderzoek kwam dat GATA4 min de NLS zowel in het cytoplasma als in de kern aanwezig is. Uit eigen onderzoek is het zelfde resultaat gevonden. In figuur 13C is een cel te zien dat zowel een gekleurde kern heeft als gekleurd cytoplasma. In het midden van de cel is een zwarte lege ronde bol te zien. Mogelijk is dit een vacuole of zou de cel in het begin stadium zitten voor apoptose. Er is alleen een groene kleur te zien omdat er niet met antilichamen en DAPI gekleurd is waardoor er maar één kleur te zien is. Dit omdat het construct in frame is gekloneerd met groen fluorescent proteïne (GFP).

Van de andere twee constructen zijn geen resultaten. Dit omdat bij de transfectie van de constructen geen fluorescentie te zien was.



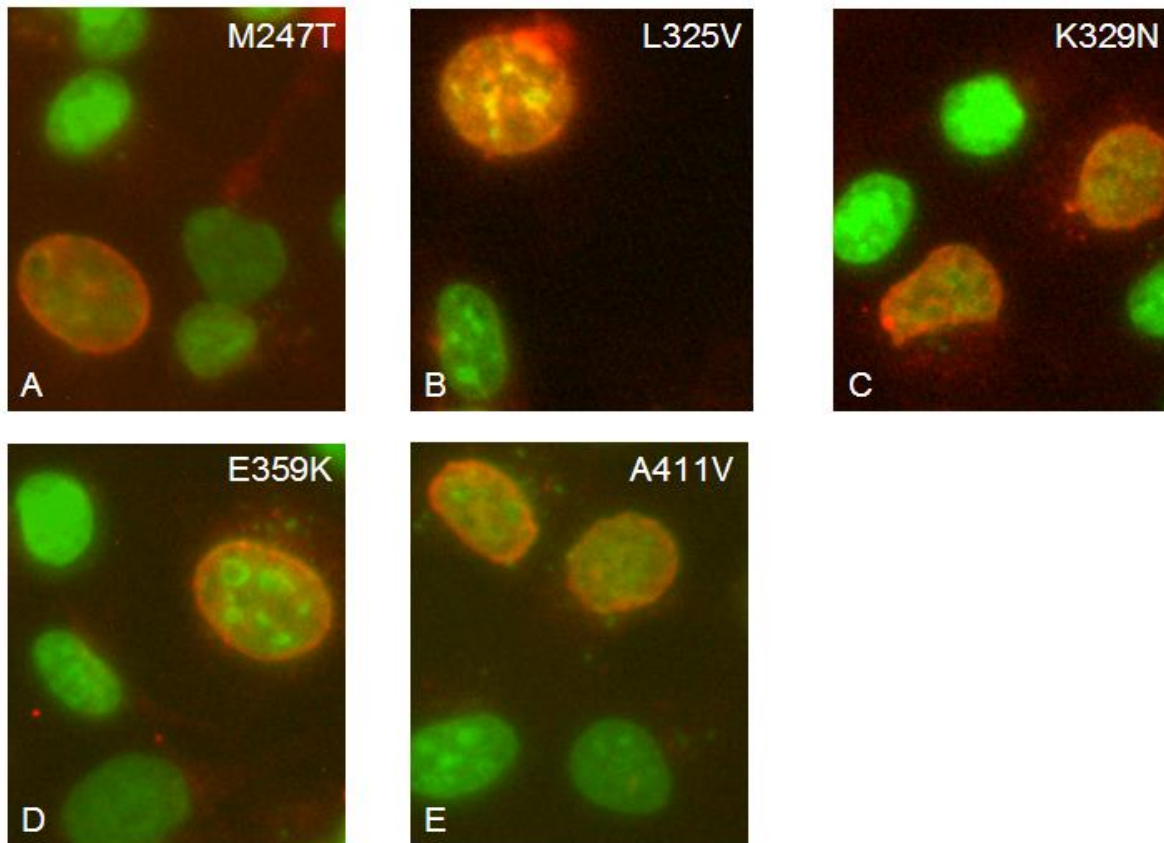
**Figuur 13: Resultaat controles van de nucleair trafficking.** Voor figuren A en B: Groen: zijn de gekleurde kernen. Rood: GATA4. C: groen GFP, GATA4. A: pcDNA3.1, B: GATA4 Wildtype, C: GATA4 min de NLS

In figuur 14 zijn de mutanten G16C, H28D, Y38D, P103A, S70T en S160T te zien. Bij alle mutanten zijn zowel groene als rode kernen te zien wat betekent dat GATA4 terug de kern is getransporteerd. De verschillende mutaties in GATA4 hebben geen effect op het nucleair transport.



**Figuur 14: Resultaten van nucleair trafficking.** A: mutant G16C, B: mutant H28D, C: mutant Y38D, D: mutant P103A, E: mutant S70T en F: mutant S160T.

In figuur 15 zijn de mutanten M247T, L325V, K329N, E359K en A411V te zien. Net zoals bij de mutanten van het vorige figuur zijn er bij deze mutanten zowel rode als groene kernen te zien op de foto's. Dit betekent dat bij deze GATA4 mutanten het eiwit weer terug naar de kern wordt getransporteerd.



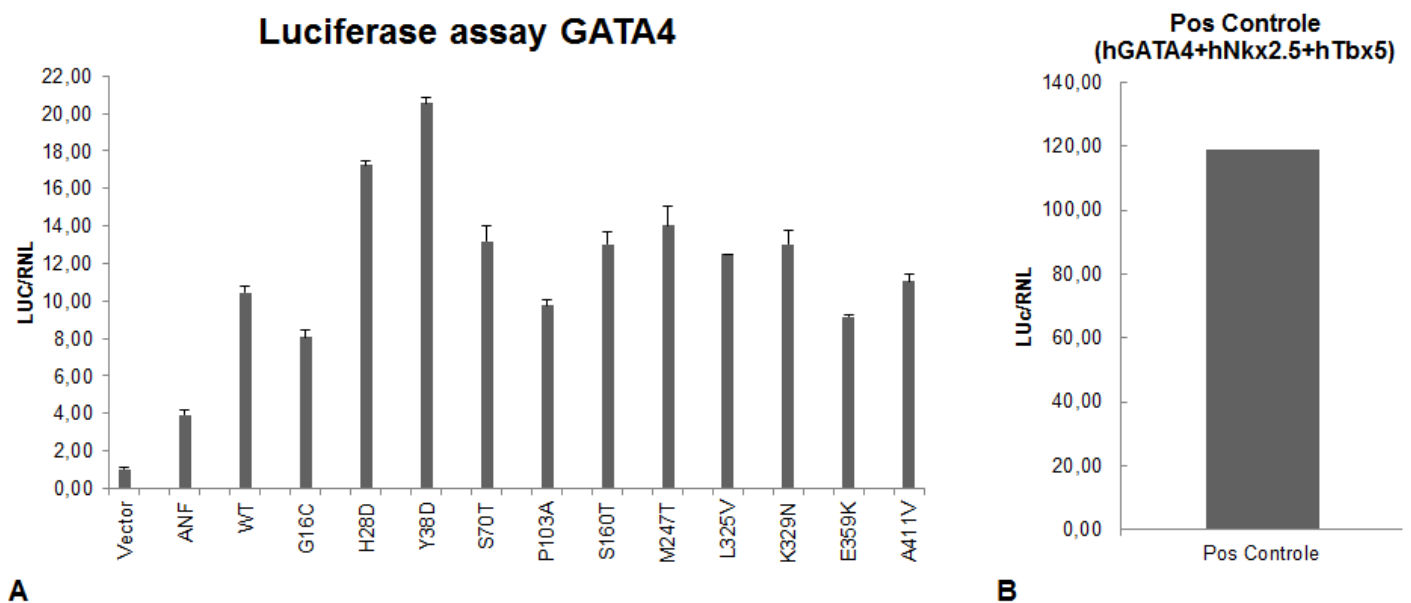
**Figuur 15: Resultaten van nuclear trafficking. A: mutant M247T, B: mutant L325V, C: mutant K329N, D: mutant E359K en E: mutant A411V.**

### 3.4 Luciferase assay

Na de nucleair trafficking is van alle mutanten een luciferase assay uitgevoerd. Daarbij is gekeken wat de activiteit is van de verschillende GATA4 mutanten ten opzichte van de WT. Voor het experiment zijn H10 cellen gebruikt. Voordat de luciferase assay uitgevoerd kon worden, is eerst een transfectie uitgevoerd en na 6 uur medium ververscht. Na 48 uur zijn de resultaten gemeten met een luminometer. Er is zowel luciferase als renilla gemeten. Met renilla wordt er een correctie gemaakt, want er wordt niet in elke well even veel plasmide opgenomen door de cellen.

In figuur 16A zijn de resultaten te zien van de luciferase assay. Als eerst is de lege vector. Deze bevat geen GATA4 en ANF promotor, en hoort geen activiteit te geven en dient als achtergrond. De vector is genormaliseerd op 1. Dan volgt de ANF promotor, waarbij geen GATA4 getransfecteerd is. De verwachting was dat er geen activiteit zou zijn, omdat er geen GATA4 is, dat ANF kan activeren. In het figuur is te zien dat de ANF promotor wel een activiteit heeft ten opzichte van de alleen de vector. Dit is ongeveer 3x zo veel. Verder is in het figuur te zien dat GATA4 WT een verhoogde activiteit geeft met ANF promotor. Dit was ook de verwachting. GATA4 activeert de ANF promotor. Van de mutanten H28D en Y38D is er een verhoogde activiteit, respectievelijk 7 en 10 keer zoveel dan de WT. Mutanten S70T, S160T, M247T, L325V, K329N en A411V hebben een licht verhoogde activiteit ten opzichte van de WT. Terwijl mutanten G16C, P103A en E359K een licht verminderde activiteit hebben dan de WT. Maar voor de laatste 9 genoemde mutanten zijn dit geen grote verschillen dan met de WT.

In figuur 16B is de positieve controle te zien. Deze controle bestaat uit GATA4, Nkx2.5 en Tbx5. In het figuur is een hoge activiteit te zien. Dit is meer dan 10 keer sterker dan met alleen GATA4. De controle is niet in het andere figuur opgenomen vanwege de hoge activiteit.



**Figuur 16: Resultaten van de luciferase assay. A: activiteit van GATA4 WT en de verschillende GATA4 mutanten getransfecteerd met ANF promotor in H10 cellen. B: activiteit van de positieve controle bestaande uit GATA4, NKx2.5 en Tbx5.**

## 4. Conclusie/discussie

Het doel van het onderzoek was de verschillen in transport en activatie van de 11 GATA4 mutanten vergelijken ten opzichte van GATA4 WT.

Voordat de experimenten uitgevoerd konden worden, moesten eerst zes van de 11 mutaties gemaakt worden. De overige vijf mutaties waren al aanwezig. Dit is uitgevoerd d.m.v. sitedirect PCR mutagenese. Vervolgens zijn deze getransformeerd en is er een miniprep uitgevoerd. Daarvan is vervolgens een sequence ingezet en de midiprep uitgevoerd. Uit de sequence analyse bleek dat alle zes de constructen de juiste mutaties hadden. Daarnaast zijn er geen andere mutaties gevonden in GATA4.

Tijdens het maken van de constructen zijn er problemen geweest met de midiprep.. Het probleem was het opgroeien van de *E.coli* bacteriën. De groei na ongeveer 16 uur was troebel en witachtig, wat normaal wel troebel, maar meer geelachtig eruit ziet. Er was dus wel groei, maar de constructen met het troebel witachtig medium bevatten geen plasmide DNA, want na precipitatie was er geen DNA pellet te zien. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het overige cultuur van de miniprep te oud was. Dit geldt ook voor de glycerolstocks die zijn gebruikt voor de constructen die al gemaakt waren. Want na een hertransformatie en daarna een verse kolonie was aangeprikt voor de midiprep was de midiprep gelijk goed. Dit verklaard echter niet waarom het ene construct wel in één keer goed is gegaan en bij de ander zo veel problemen zijn geweest. Voor een volgende keer kan het beste zijn eerst een hertransformatie uit te voeren en dan pas een verse kolonie aan te prikken voor het beste resultaat.

Nadat de constructen waren gemaakt is nucleair trafficking uitgevoerd waarbij gekeken is naar het transport van GATA4 van het cytoplasma naar de kern. Daarbij is GATA4 WT vergeleken met de GATA4 mutanten. Uit een onderzoek blijkt dat een enkele mutatie in GATA4 in de NLS geen verandering geeft in het transport. Mutaties die zich buiten de NLS bevinden zouden dan net zoals een enkel mutatie in de NLS geen effect hebben op het transport vanuit het cytoplasma naar de kern. De onderzochte mutanten bevinden zich niet in de NLS, en zoals de verwachting was werden alle GATA4 mutanten terug naar de kern getransporteerd in COS7 cellen. Bij alle mutanten was duidelijk te zien dat de kernen rood gekleurd waren, wat aangaf dat GATA4 aanwezig was.

De fluorescentie van GATA4 was niet optimaal. Daardoor konden er moeilijk goede foto's gemaakt worden. Een reden waar dat mogelijk aan kan liggen is het tweede antilichaam met de fluorescente label. Het was bekend dat dit antilichaam al oud was en mogelijk was de fluorescentie verminderd. Daarnaast zou het ook aan de microscoop hebben gelegen. Bij een ander fluorescentie microscoop was de fluorescentie beter, maar omdat deze microscoop geen DAPI filter had, wat nodig was om van alle kernen een foto te maken, kon deze microscoop niet gebruikt worden. Om uit te sluiten dat het daadwerkelijk ligt aan het tweede antilichaam zou de nucleair trafficking herhaald moeten worden met het nieuwe antilichaam.

De positieve controle die is gebruikt en afkomstig is uit Australië had zowel GATA4 in het cytoplasma als in kern, terwijl eigenlijk de verwachting zou zijn dat GATA4 niet meer terug naar de kern getransporteerd kan worden als GATA4 geen NLS meer heeft. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat bij COS7 en HeLa cellen die gebruikt zijn bij de studie er sprake is van passief transport door het nucleaire pore complex waardoor GATA4 zonder NLS toch gedeeltelijk naar de kern kan. Dit kan mogelijk komen door conformatie verandering van

GATA4. Waarom GATA4 in cardiomyocyten wel terug naar de kern atriële gaan heeft mogelijk te maken met een exportine dat COS7 en HeLa cellen waarschijnlijk niet hebben, doordat elke celtypen weer andere importines en exportines hebben.

Voor dit onderzoek zijn alleen COS7 cellen gebruikt en geen cardiomyocyten. Dit omdat de verwachting was dat er geen verschillen te zien zouden, omdat een puntmutatie geen verandering zou geven op het nucleair transport van GATA4. Dit experiment kan herhaald worden, maar dan met cardiomyocyten om te kunnen vergelijken dat er geen verschillen zijn in de cellijnen. Daarnaast kan vergeleken worden of het construct afkomstig uit Australië hetzelfde resultaat heeft als die van de studie.

Daarnaast is een luciferase assay uitgevoerd om de activiteit van de verschillende mutanten te vergelijken met de WT. Uit de resultaten is gekomen dat alleen H28D en Y38D een verhoogde activiteit hebben. Het betekent dus dat bij deze twee mutanten in GATA4 er voor zorgt dat GATA4 meer geactiveerd wordt en zo meer de ANF promotor kan activeren, dan bij de WT. Beide mutanten bevinden zich in het transcriptie activatie domein, dus het is mogelijk dat de transcriptie activatie verhoogd wordt. Bij de andere mutanten waren er geen grote verschillen in activiteit ten opzichte van de WT. Deze mutanten hebben geen effect op transcriptie activatie op de ANF promotor.

Daarnaast heeft de positieve controle, die bestond uit GATA4 WT, Nkx2.5 en Tbx5, een sterk verhoogde transcriptionele activatie. Dat was ook verwachting, want zoals eerder beschreven gaan deze drie transcriptiefactoren interacties met elkaar aan om de transcriptie activiteit te verhogen. Tijdens dit experiment zijn alleen GATA4 mutanten getest op de activiteit, maar nog niet in combinatie met de twee andere transcriptiefactoren: Nkx2.5 en Tbx5. Voor een vervolg experiment kan zowel GATA4 met Nkx2.5, GATA4 met Tbx5 en GATA4 met Nkx2.5 en Tbx5 een luciferase assay uitgevoerd worden. Nkx2.5 bindt op de C-terminal van GATA4. Mogelijk is de interactie verminderd of juist versterkt bij mutatie L325V. De C-terminal bevindt zich op de positie 270 – 324. Mutant L325V bevindt zich op positie 325. Dit is één aminozuur verder dan de C-terminal. Daarnaast is het mogelijk dat de andere mutanten ook invloed hebben op de interactie met Nkx2.5. Tbx5 kan op het hele GATA4 binden. Het is mogelijk dat alle mutanten kunnen invloed hebben op de interactie met Tbx5. Een combinatie van beide transcriptiefactoren kan ook invloed hebben op de interactie met GATA4 mutant.

Voor dit onderzoek zijn H10 cellen gebruikt. Er is daarvoor gekozen om te onderzoeken wat een GATA4 mutant voor effect heeft op de transcriptionele activatie in een voorloper cel van de cardiomyocyt. H10 cellen hebben hart componenten wat de transcriptionele activatie kan beïnvloeden. COS7 cellen hebben deze componenten niet en daarom kan zelf bepaald worden wat in de cel getransfecteerd wordt en daarom zijn ze makkelijker te gebruiken voor transfectie. Omdat voor dit onderzoek H10 cellen zijn gebruikt kan de luciferase assay herhaald worden met COS7 cellen en kunnen de resultaten met elkaar vergeleken worden of er grote verschillen zijn in de cellijnen.

Met de luciferase assay wordt alleen gekeken naar de activiteit van GATA4 op de ANF promotor. Om de bindingsaffiniteit van GATA4 te kunnen bepalen moet een elektromobility shift assay uitgevoerd worden. Met deze techniek wordt gekeken naar de DNA-eiwit binding. Mogelijk zorgt één van de mutanten ervoor dat de binding van GATA4 op het DNA verminderd of juist versterkt is.

Daarnaast is bekend dat post translationele modificaties belangrijk zijn voor de activiteit van GATA4. GATA4 wordt gefosforyleerd en gemethyleerd. Er zijn diverse posities in GATA4 waar deze post translationele modificaties plaats vinden. De gevonden mutaties zitten niet op één van de posities van de post translationele modificaties, maar mogelijk zorgt een mutatie toch voor een verstoring van de vorm van GATA4. Er zou een onderzoek gedaan kunnen worden naar de twee post translationele modificaties.

## **Eindconclusie**

De conclusie uit het onderzoek is dat de elf verschillende GATA4 mutanten met het fenotype atriële fibrillatie geen effect hebben op het nucleair transport. Nadat het eiwit in het cytoplasma is afgeschreven wordt het terug naar de kern getransporteerd. Daarnaast hebben twee van de elf mutanten een verhoogde transcriptionele activiteit ten opzichte van GATA4 WT. Deze twee mutanten zorgen ervoor dat er meer ANF promotor wordt geactiveerd. De andere mutanten hebben geen grote verschillen in transcriptionele activiteit dan de WT.

## 5. Referenties

1. Wong L, Moorman A, Barnett P. Basic cardiac development: The heart and its electrical components. In: *Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart*. Springer; 2012:177-206
2. Nemer M. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovascular Pathology*. 2008;17(1):48-54.
3. Fahed AC, Gelb BD, Seidman J, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease the glass half empty. *Circ Res*. 2013;112(4):707-720.
4. Wang E, Sun S, Qiao B, et al. Identification of functional mutations in GATA4 in patients with congenital heart disease. *PLOS ONE*. 2013;8(4):e62138.
5. Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, Li Z. GATA4 mutations in 486 chinese patients with congenital heart disease. *Eur J Med Genet*. 2008;51(6):527-535.
6. Yang YQ, Wang MY, Zhang XL, et al. GATA4 loss-of-function mutations in familial atrial fibrillation. *Clin Chim Acta*. 2011;412(19-20):1825-1830.
7. Xiao J, Liang D, Chen Y. The genetics of atrial fibrillation: From the bench to the bedside. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2011;12:73-96.
8. Gutierrez C, Blanchard DG. Atrial fibrillation: Diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2011;83(1):61-68.
9. Gelder I. Atriale ritmestoornissen. *Cardiologie*. 2008:269-277.
10. Falk RH. Atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1067-1078.
11. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation the task force for the management of atrial fibrillation of the european society of cardiology (ESC). *Europace*. 2010;12(10):1360-1420.
12. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63(2):196-207.
13. Zhou P, He A, Pu WT. Regulation of GATA4 transcriptional activity in cardiovascular development and disease. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:143-169.
14. Pikkarainen S, Tokola H, Majalahti-Palviainen T, et al. GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23807-23816.
15. Jiang JQ, Shen FF, Fang WY, Liu X, Yang YQ. Novel GATA4 mutations in lone atrial fibrillation. *Int J Mol Med*. 2011;28(6):1025-1032.

16. Pradhan L, Genis C, Scone P, Weinberg EO, Kasahara H, Nam H. Crystal structure of the human NKX2. 5 homeodomain in complex with DNA target. *Biochemistry (N Y)*. 2012;51(32):6312-6319.
17. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J*. 1997;16(18):5687-5696.
18. Philips AS, Kwok JC, Chong BH. Analysis of the signals and mechanisms mediating nuclear trafficking of GATA-4. loss of DNA binding is associated with localization in intranuclear speckles. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24915-24927.
19. Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424(6947):443-447.

### Internet sites:

I) Hartstichting

Geraadpleegd op 22-04-2013

[http://www.hartstichting.nl/hart\\_en\\_vaten/aangeboren\\_hartafwijking/soorten\\_aandoeningen/atriumseptumdefect\\_asd/](http://www.hartstichting.nl/hart_en_vaten/aangeboren_hartafwijking/soorten_aandoeningen/atriumseptumdefect_asd/)

II) St. Joseph hospital

Geraadpleegd op 14-04-2013

<http://www.stjosephsatlanta.org/center-for-robotic-surgery/heart/atrial-fibrillation.htm>

III) Boezemfibrilleren.nl

Geraadpleegd op 24-04-2013

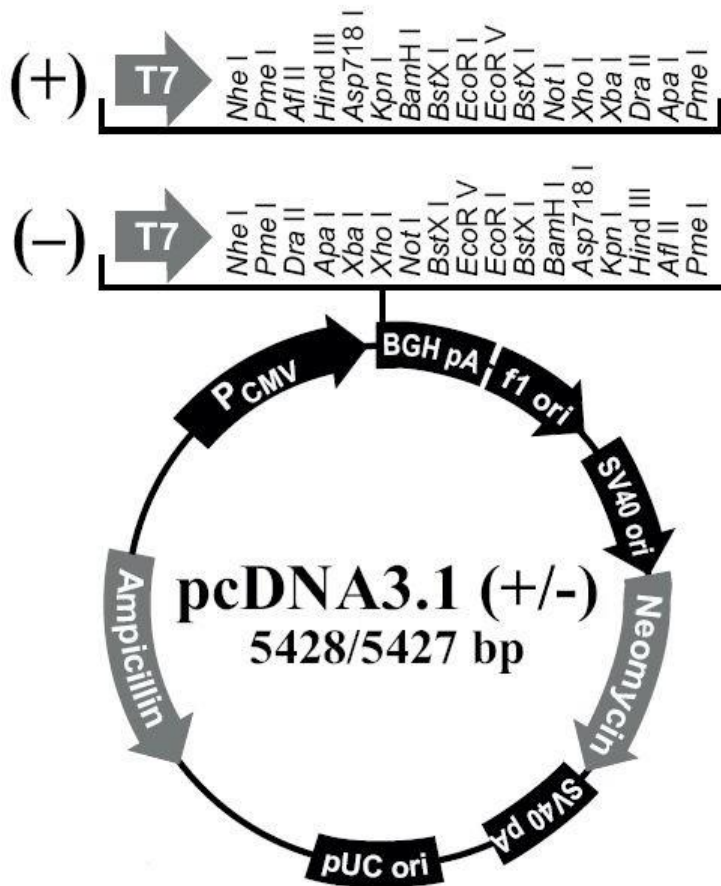
<http://www.boezemfibrilleren.nl/diagnose-en-behandelen/boezemfibrilleren-en-de-diagnose>

IV) Genetics home reference

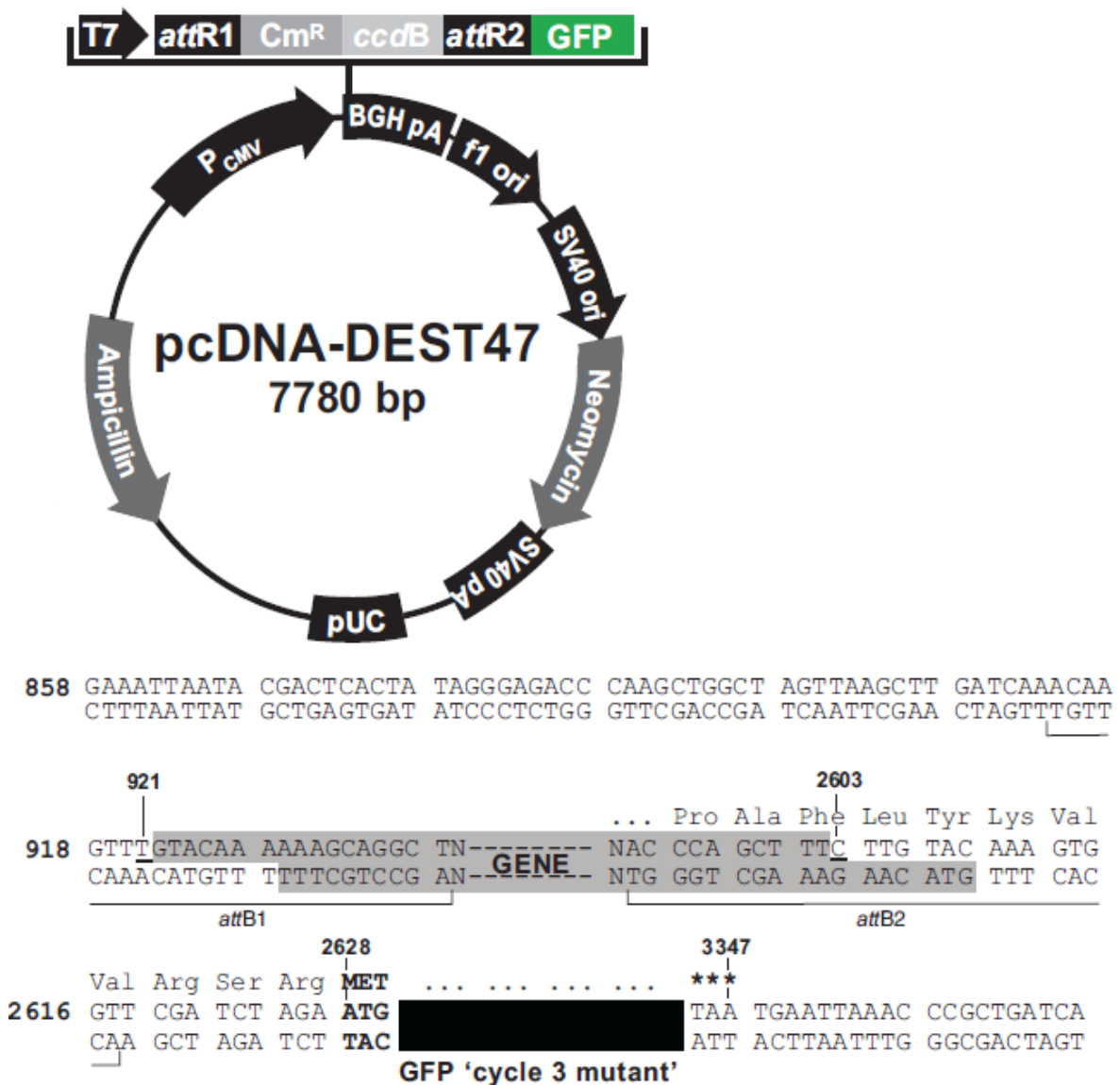
Geraadpleegd op 17-03-2013

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GATA4>

## Bijlage 1 pcDNA3.1 restrictie map



## Bijlage 2 pcDNA-DEST47



## Bijlage 3 Protocol Transformatie

AELW\_EG01 (07).doc Modified 16-Jan-12

|                        | Name              | Function        | Initials |
|------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Author                 | V. Wakker         | Technician      |          |
| Authorization          | V.M. Christoffels | Project Leader  |          |
| Quality/<br>SOP coord. | A.A.M. Buffing    | SOP coordinator |          |

| Version number | Date       | Description of introduced changes                                              |
|----------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| AELW_EG01 (03) | 16-08-2005 | lay out; 5: new website                                                        |
| AELW_EG01 (03) | 08-02-2006 | standard abbreviation/name: 4: LB = Luria Broth Base; 6.1 LB broth = LB medium |
| AELW_EG01 (05) | 16-01-2008 | changes in content                                                             |
| AELW_EG01 (05) | 15-12-2009 | lay-out; revision                                                              |
| AELW_EG01 (07) | 16-01-2012 | lay-out; revision                                                              |

### 1 TRANSFORMATION OF COMPETENT E. COLI (heat shock method)

V. Wakker

### 2 INTRODUCTION

This method for the preparation and transformation of competent E. coli cells is one of the easiest, very reliable and highly efficient. If care is taken that the cells are kept at 0°C after growth, the transformation efficiency should exceed  $5 \times 10^6$  colonies per  $\mu\text{g}$  of plasmid (pBluescript). For an optimal transformation, the DNA volume should not exceed 10% of the volume of the competent cells and the cells should be handled with care, e.g. no vortexing etc. Each batch of competent cells should be checked after aliquoting and freezing by transformation with a standard plasmid, e.g. 10 pg of pBluescript. Most modern vectors contain a multiple cloning site in the lacZ gene. Insertion into this site disrupts the  $\alpha$ -complementation ability of the plasmid, resulting in white colonies when plated on IPTG/X-gal plates, while non-recombinant plasmids give blue colonies on these plates. However, in frame ligations of a piece of coding sequences may give blue colonies because the reading frame is not interrupted. Likewise, false positives may arise from the (artificial) ligation of two restriction sites of the polylinker.

### 3 AREA OF APPLICANCE/LIMITATIONS

### 4 DEFINITIONS AND TERMS

LB      Luria Broth Base  
X-Gal   5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside  
DMF    N,N-dimethylformamide  
IPTG    isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

### 5 SAFETY

Storage, handling and discarding of the chemicals used in this protocol, should be performed according to the AMC regulations.

See Lab info site: chapter 2

## DMF

R61-E20/21-36 S 53-45

May cause harm to the unborn child. Also harmful by inhalation and in contact with skin. Irritating to eyes.

## **6 CHEMICALS**

LB (Millers LB Broth Base)      Invitrogen 12795-027

agar

Ampicilline

Tetracycline

Ethanol absolute

IPTG

X-gal

DMF

### 6.1 Working solutions

LB medium      Luria broth base, 25 g/l in bidest, autoclaved.

LB plates      LB medium supplemented with 1.5% agar; autoclaved.

Ampicillin      50 mg/ml in bidest; sterilize by filtration. Store at -20°C.

Amp-plates      after autoclaving and cooling to 55°C ampicillin is added to the LB-agar solution to a final concentration of 100 µg/ml.

Chlorineamphenicol      25 mg/ml in absolute ethanol.

Chl-plates      after autoclaving and cooling to 55°C chlorineamphenicol is added to the LB-agar solution to a final concentration of 50 µg/ml.

Kanamycin      25 mg/ml in bidest: sterilize by filtration. Store at -20°C.

Kan-plates      after autoclaving and cooling to 55°C kanamycin is added to the LB-agar solution to a final concentration of 50 µg/ml.

Tetracycline      5 mg/ml in absolute ethanol.

Tet-plates:      After autoclaving and cooling to 55°C tetracycline is added to the LB-agar solution to a final concentration of 50 µg/ml (do not use tetracycline in media containing magnesium salts!).

X-gal      2% 20 mg/ml in DMF. Store in the dark at -20°C.

IPTG-stock:      1 M (0.2383 g/ml) in bidest, sterilize by filtration. Store at -20°C.

IPTG      10mM dilute IPTG stock 100 µl with sterile bidest.

## **7 MATERIALS / EQUIPMENT**

1.5 ml Eppendorf tubes

drawn-out Pasteur pipette

50 ml falcon tubes

water bath 42°C

incubator 37°C

rocking-incubator 225 rpm, 37°C

## **8 METHODS/PROCEDURES**

### 8.1 Transformation procedure

1. Thaw the frozen cells on ice. For preparation of competent cells use the Sem-Hanneham method (AELW\_EG03).

2. Transfer 100 µl aliquots into an 1.5 ml eppendorf tube and keep on ice.
3. Add the DNA in at most 10 µl.
4. Incubate on ice for 20 minutes.
5. Heat shock the mixture for 45 seconds at 42°C in the waterbath.
6. Immediately chill on ice for 5 minutes.
7. Add 900 µl of LB medium and incubate for at least 30 minutes at 37°C while shaking at 225 rpm.  
*OPTIONAL, for blue white screening:*  
*Before plating the cells add to each plate: 100 µl IPTG 10 mM and 100 µl X-GAL 2% (add them separately, never mix before adding!).*
8. Choose for option 8a or 8b to plate your cells.
  - 8a. Plate 100 µl on an LB plate with antibiotic using a draw-out pipette.
  - 8b. Centrifuge the culture 2 min at 3000 rpm. Pour off ~85% of the supernatant and carefully resuspend the pellet in the remaining medium by pipetting. Plate this on a LB plate with antibiotic using a drawout pipette.
9. Incubate the plate overnight at 37°C.

## **9 QUALITY CONTROL**

## **10 PROCESSING THE RESULTS**

## **11 ACCURACY AND PRECISION**

## **12 REMARKS**

Comments on this protocol can be mailed to [hfr-protocol@amc.uva.nl](mailto:hfr-protocol@amc.uva.nl) or for members of the department of Anatomy, Embryology & Physiology, see Lab Info, Kwaliteitshandboek, Hoofdstuk 13, Beheer documentatie, Wijzigen SOPs.

## **13 DOCUMENTS APPLICABLE**

AELW\_EG03                      Preparation of competent cells: SEM-Hanneman method

## **14 FORMS APPLICABLE**

## **15 REFERENCE**

## Bijlage 4 Protocollen Midiprep

### NucleoBond Xtr midi

### Jetstar purification midi

#### Plasmid DNA Purification (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi) Protocol-at-a-glance (Rev. 09)

|                                                                          | Midi                                                                                    | Maxi                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 Cultivate and harvest bacterial cells                                  | 4,500–6,000 x g<br>4°C, 15 min                                                          |                                                                                           |
| 2 Cell lysis<br>(Important:<br>Check Buffer LYS for<br>precipitated SDS) | High-copy / low-copy<br>8 mL / 16 mL Buffer RES<br>8 mL / 16 mL Buffer LYS<br>RT, 5 min | High-copy / low-copy<br>12 mL / 24 mL Buffer RES<br>12 mL / 24 mL Buffer LYS<br>RT, 5 min |
| 3 Equilibration of the<br>column and filter                              | 12 mL<br>Buffer EQU                                                                     | 25 mL<br>Buffer EQU                                                                       |
| 4 Neutralization                                                         | 8 mL / 16 mL Buffer NEU                                                                 | 12 mL / 24 mL Buffer NEU                                                                  |
| 5 Clarification and<br>loading of the lysate                             | Invert the tube 3 times<br>Load lysate on NucleoBond® Xtra Column Filter                |                                                                                           |
| 6 1 <sup>st</sup> Washing                                                | 5 mL<br>Buffer EQU                                                                      | 15 mL<br>Buffer EQU                                                                       |
| 7 Discard NucleoBond®<br>Xtra Column Filter                              | Discard NucleoBond®<br>Xtra Column Filter                                               | Discard NucleoBond®<br>Xtra Column Filter                                                 |
| 8 2 <sup>nd</sup> Washing                                                | 8 mL<br>Buffer WASH                                                                     | 25 mL<br>Buffer WASH                                                                      |
| 9 Elution                                                                | 5 mL<br>Buffer ELU                                                                      | 15 mL<br>Buffer ELU                                                                       |
| 10 Precipitation                                                         | NucleoBond®<br>Xtra Midi                                                                | NucleoBond®<br>Xtra Midi Plus                                                             |
|                                                                          | 3.5 mL<br>Isopropanol<br>5–15,000 x g<br>4°C, 30 min                                    | 3.5 mL<br>Isopropanol<br>RT, 2 min<br>Load NucleoBond®<br>Finalizer                       |
| 11 Wash and dry DNA<br>pellet                                            | 2 mL<br>70% ethanol<br>5–15,000 x g<br>RT, 5 min<br>5–10 min                            | 2 mL<br>70% ethanol<br>/                                                                  |
| 12 Reconstitute DNA                                                      | Appropriate<br>volume of<br>TE buffer                                                   | 200–800 µL<br>Buffer TRIS                                                                 |

#### Midiprep Procedure

##### Before Starting

- Add RNase A to the Cell Resuspending Buffer (E1) according to the label on the tube.
- Warm Lysis Buffer (E2) briefly at 37°C to redissolve any particulate matter.
- Grow transformed *E. coli* in LB medium. Use 15–25 mL (high copy number plasmid) or 25–100 mL (low copy number plasmid) of an overnight culture.

##### Midiprep Plasmid Purification

1. **Equilibrate.** Apply 10 mL Equilibration Buffer (E4) to the JetStar® Midi Column. Allow the solution in the column to drain by gravity flow.
2. **Harvest.** Pellet cells by centrifuging the overnight LB-culture at 12,000 × g for 2–3 minutes. Remove all medium.
3. **Resuspend.** Add 4 mL Cell Resuspending Buffer (E1) to the cell pellet and resuspend the pellet until it is homogenous.
4. **Lyse.** Add 4 mL Lysis Buffer (E2). Mix gently by inverting the capped tube until the mixture is homogenous. Do not vortex. Incubate the tube at room temperature for 5 minutes.
5. **Precipitate.** Add 4 mL Precipitation Buffer (E3). Mix immediately by inverting the tube until the mixture is homogeneous. Do not vortex. Centrifuge the lysate at >12,000 × g for 10 minutes at room temperature.
6. **Bind.** Load the supernatant onto the equilibrated column with a pipette. Allow the solution in the column to drain by gravity flow.
7. **Wash.** Wash the column twice with 10 mL Wash Buffer (E5). Allow the solution in the column to drain by gravity flow after each wash. Discard the flow-through.
8. **Elute.** Place a sterile 15-mL centrifuge tube under the column. Add 5 mL Elution Buffer (E6) to the column to elute the DNA. Allow the solution to drain by gravity flow. The elution tube contains the purified DNA.
9. **Precipitate and Wash.** Add 3.5 mL isopropanol to the eluate. Mix well. Centrifuge the tube at >12,000 × g for 30 minutes at 4°C. Remove and discard the supernatant. Wash the DNA pellet in 3 mL 70% ethanol. Centrifuge the tube at >12,000 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard the supernatant.
10. **Resuspend.** After air-drying the pellet for 10 minutes, resuspend the DNA pellet in a suitable volume of buffer (i.e., 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, TE Buffer, or water). Store the purified DNA at –20°C (long-term) or at 4°C (short-term).

## Bijlage 5 Protocol Sequenzen

AELW\_EE07 (03).doc Modified 1-Oct-12

|                        | Name           | Function        | Initials |
|------------------------|----------------|-----------------|----------|
| Author                 | A. Ilgun       | Technician      |          |
| Authorization          | A.V. Postma    | Project Leader  |          |
| Quality/<br>SOP coord. | A.A.M. Buffing | SOP coordinator |          |

| Version number | Date       | Description of introduced changes |
|----------------|------------|-----------------------------------|
| AELW_EE07 (01) | 12-02-2008 | New                               |
| AELW_EE07 (02) | 30-03-2010 | Minor changes                     |
| AELW_EE07 (03) | 01-10-2012 | Lay-out                           |

### 1 BIGDYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING

A. Ilgun

### 2 INTRODUCTION

DNA samples are sequenced using Applied Biosystems BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (v1.1). Sequencing is outsourced to the AMC Sequence Facility (Lab Neurozintuigen, K2). Following, the BigDye Cycle Sequence sequencing reaction at our own department, samples are brought to the sequence lab. After clean up, samples are then resolved by capillary electrophoresis on an automated sequencer which interprets the fluorescent signals into the corresponding DNA sequence. Results are retrieved via LIMS from the sequence facility.

The total procedure covers the following steps

1. Performing the BigDye Cycle Sequence reaction.
2. Creating sample sheet (an excel template is available).
3. Registration/Log samples for sequencing via LIMS.
4. Sample submission for sequencing via LIMS.
5. Retrieving samples via LIMS.
6. Analyzing the chromatograms with CodonCode Aligner or another suitable program

This SOP describes only the first step. For all the other steps (excluding step 6) the reader is referred to appendices B01/B02 for a general introduction into sequencing.

### 3 AREA OF APPLICANCE/LIMITATIONS

The BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit provides the required reagent components for the sequencing reaction in a ready reaction, pre-mixed format. You need only provide your template and template-specific primer. Reaction can be performed on:

- PCR products
- Plasmid, Cosmid, BAC DNA
- Bacterial genomic DNA
- Single- and double-stranded DNA

### 4 DEFINITIONS AND TERMS

### 5 SAFETY

Storage, handling and discarding of the chemicals used in this protocol, should be performed according to the AMC regulations.

See Lab info site: chapter 2.

## 6 CHEMICALS

### 6.1 Working solutions

| Materials/Chemicals                                                                      | Amount (ml) | Storage (°C) | Storage life |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| BDT, BigDye Terminator v1.1 ready reaction mix                                           | 10X0.8      | -20          | See kit      |
| pGEM®-3Zf(+) double-stranded DNA Control Template                                        | 0.25        | -20          | See kit      |
| -21 M13 Control Primer (forward)                                                         | 0.2         | -20          | See kit      |
| Buffer v1.1, v3.1 (5x)                                                                   | 12.0        | 4            | See kit      |
| Buffer (400 mM Tris pH=9, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , sterile) -- <b>&gt;self prepared</b> | 12.0        | 4/RT         | 1 year       |
| Betaine 5 M                                                                              | 0.5-2.0     | -20          | 1 year       |
| DMSO                                                                                     | 0.5-2.0     | -20          | 1 year       |
| d H <sub>2</sub> O (sterile)                                                             | 1-10        | RT           | 1 month      |

- Keep all the components in the, for this purpose intended freezer drawer!
- Avoid excess (that is, no more than 5 to 10) freeze-thaw cycles. Aliquot in smaller amounts:
- **BigDye**: thaw out (1 tube at the time), mix well, centrifuge briefly and fill out in aliquots of 50 µl. **Buffer**: fill out in aliquots of 75 µl (fill out 16 tubes at the time).
- Keep thawed materials on ice during use. Do not leave reagents at RT for extended periods.
- In case you take out the before last tube of aliquot, please fill out new one!
- In case you take out the last tube or the stock has run out, please order a new kit!

## 7 MATERIALS/EQUIPMENT

PCR machine, PCR tubes & plates (RNase and DNase free), Filtertips.

## 8 METHODS/PROCEDURES

### 8.1 Sample preparation

- Thaw all required reagents to room temperature, mix well, spin briefly and place on ice.
- Pipet per sample, at lab-bench (not Pre PCR lab!), the following solutions in PCR tube/plate.
- In case of multiple samples, prepare a master mix and fill out. Keep solutions on ice!

|                             | 1x (µl)    |
|-----------------------------|------------|
| H <sub>2</sub> O            | 7.0-x      |
| BDT                         | 0.5-0.7*** |
| Buffer                      | 1.0        |
| Primer (10 pmol/ µl)        | 1.0        |
| Template (e.g. PCR product) | x          |
| Total                       | 10.0 µl    |

**\*\*\* Fragment < 500 bps use 0.5 µl BDT**

**Fragment 500 - 700 bps use 0.6 µl BDT**

**Fragment > 700 bps use 0.7 µl BDT**

**BDT is very expensive/pricy, therefore the friendly request to stick to this rule and never to use more then 0.7 µl/reaction !**

- Per 10 reactions prepare ½ reaction more.
- Mix well, spin briefly using a PCR-centrifuge and place tube(s)/plate on ice.
- Add DNA. The amount of the DNA is dependent of the length of the template (see *table below*).

**Recommended amount of *unpurified* PCR product to use in sequencing reactions**

Concerning the use of PCR product as template. Quantification of unpurified PCR product, by measuring the absorbance at 260 nm, is not possible. Thus, concentration is estimated by agarose gel electrophoresis. Depending on the intensity seen on gel the PCR is diluted up to 12x times (to get rid of primers, dilution of residual buffer salt and detergent). Then 1 up to 5 µl is used for the sequence reaction.

**Recommended amounts of *purified* DNA to use in sequencing reactions**

| Template                     | Quantity (ng) |
|------------------------------|---------------|
| <b>PCR product</b>           |               |
| 100-200 bp                   | 1-3           |
| 200-500 bp                   | 3-10          |
| 500-1000 bp                  | 5-20          |
| 1000-2000 bp                 | 10-50         |
| >2000 bp                     | 20-50         |
| <b>Single stranded</b>       | 25-50         |
| <b>Double stranded</b>       | 100-300       |
| <b>Cosmid, BAC</b>           | 500-1000      |
| <b>Bacterial genomic DNA</b> | 2000-3000     |

*Note*

- In general, higher DNA quantities give higher signal intensities. Higher DNA quantities may also give shorter read lengths and top-heavy data. The template quantities given above should work with all primers. You may be able to use even less DNA when using capillary instruments for detection. The amount of PCR product to use in sequencing also depends on the length and purity of the PCR product.
- DNA template quality is extremely important for obtaining good sequence data. Poor template quality is the most common cause of sequencing problems. The following are characteristics of this:
  - noisy data or peaks under peaks
  - no usable sequence data
  - weak signal

Potential contaminants include (depending on the source of your DNA):

- proteins
  - RNA
  - chromosomal DNA
  - excess PCR primers, dNTPs, enzyme and buffer components
  - residual salts, organic chemicals such as phenol, chloroform, and ethanol
  - residual detergents
- If possible, quantify the amount of purified DNA by measuring the absorbance at 260 nm or by agarose gel electrophoresis. Purified DNA should run as a single band on an agarose gel. Uncut plasmid DNA can run as three bands: supercoiled, nicked, and linear.
- Agarose gels reveal the presence of contaminating DNAs and RNAs, but not proteins. Spectrophotometry can indicate presence of protein contamination, but not DNA and RNA contamination. Use these methods together to get most information about your DNA before sequencing.
- The choice of sequencing primer sequence, method of primer synthesis, and approach to primer purification can have a significant effect on the quality of the sequencing data. Thereby, always optimize PCR conditions for your primer (forward or reversed) and order/develop a new one in case quality remains poor. These decisions are particularly important when sequencing is done.

- For GC rich regions, try either 5% or 10% DMSO or 1 M (end concentration) betaïne in the reaction.
- Sometimes you can also have GT-rich sequences in your sequence; sequence shows a drop in the peaks You can try to lower the temperature of the elongation step (lower the elongation temp with 2°C).
- EDTA inhibits the polymerase. Thus, instead of dissolving template in TE or diluted TE, use H<sub>2</sub>O.

## 8.2 PCR

Always check the settings of the program you wan to run! Place PCR plate or tube(s) in a PCR machine and run the following program (usually listed as sequence):

- set to the correct volume (10 µl)
- step 1: 10 sec 96°C (pre-denaturation)
- step 2: 30 sec 96°C (denaturation)
- step 2: 15 sec 50°C (prime annealing)
- step 3: 4 min 60°C (elongation)
- step 4: 25-40x go to step 2
- step 5: 30 min 4°C
- step 6: End

### Note

- Optimizing the PCR conditions for specific template, primers combinatory is sometimes needed.
- Ramping time is very important. If the thermal ramping time is too fast (>1°/sec), poor (noisy) data may result.

In case the samples are not sequenced the same or following day, store the samples at -20°C.

### *Hand in samples to sequence facility after having*

1. Created a sample sheet (excel template is available).
2. Registration/Log-in of this sheet via LIMS.

### *At the sequence facility*

3. Submit samples for sequencing via LIMS.

Place samples/plates in the for this purpose intended freezer.

Before 16:00 leave samples/plates at the bench

Samples are processed as soon as there are enough entries for a run.

Results are usually returned 24-48 hours after submission via e-mail and LIMS.

Analyze/view the chromatograms with CodonCode Aligner or another suitable program

## 9 QUALITY CONTROL

## 10 PROCESSING THE RESULTS

## 11 ACCURACY AND PRECISION

## 12 REMARKS

Comments on this protocol can be mailed to [hfr-protocol@amc.uva.nl](mailto:hfr-protocol@amc.uva.nl) or for members of the department of Anatomy, Embryology & Physiology, see Lab Info, Kwaliteitshandboek, Hoofdstuk 13, Beheer documentatie, Wijzigen SOPs.

## 13 DOCUMENTS APPLICABLE

## 14 FORMS APPLICABLE

## 15 REFERENCE

## Bijlage 6 Protocol Luciferase assay

AELW\_EH03 (06).doc Modified 1-Oct-12

|                        | Name              | Function        | Initials |
|------------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Author                 | P. Barnett        | Project Leader  |          |
| Authorization          | V.M. Christoffels | Project Leader  |          |
| Quality/<br>SOP coord. | A.A.M. Buffing    | SOP coordinator |          |

| Version number | Date       | Description of introduced changes |
|----------------|------------|-----------------------------------|
| AELW_EH03 (03) | 16-08-2005 | lay out; 5: new website           |
| AELW_EH03 (04) | 13-02-2008 | Total revision                    |
| AELW_EH03 (05) | 12-10-2010 | lay-out                           |
| AELW_EH03 (06) | 01-10-2012 | lay-out                           |

### 1 TRANSFORMATION OF COMPETENT E. COLI (heat shock method)

P. Barnett

### 2 INTRODUCTION

Genetic reporters are used commonly in (molecular) cell biology to study gene expression and other cellular events coupled to gene expression, such as monitoring the binding activity of transcription factors (up- or down regulation of target gene), receptor activity, intracellular signal transduction, mRNA processing, protein folding and protein-protein interactions. Suitable vectors for this purpose are, for example, the Firefly Luciferase Reporter Vectors.

This protocol describes a sensitive and convenient method for determining the level of Firefly luciferase (Luc) expression in extracts derived from mammalian cells transfected with these vectors. The reaction catalyzed by Luc, a 62kDa monomeric protein, is the oxidation of D-luciferin in an ATP-dependent process generating light of 560 nm which decreases quickly due to product inhibition. This light production is linear with the amount of enzyme during the first seconds of the reaction and can be quantified using a Luminometer.

*D-luciferin + ATP + O<sub>2</sub> Mg<sup>2+</sup> / Firefly-Luc Oxyluciferin + AMP + pyrophosphate + CO<sub>2</sub> + light (560 nm)*

The light production by luciferase is strongly influenced by Coenzyme A, which is involved in the reaction mechanism. Luc measurement in vivo is also possible because D-luciferin can pass the cell membrane. Since Luc is unique in that no other enzyme can catalyze this luminescent reaction, no correction is needed with respect to endogenous activity. The Luc assay is very sensitive, relatively cheap and faster than other enzyme assays. It is linear with respect to protein concentrations and the Luminometer used has a large dynamic range, starting at 1 Relative Luminescence Unit (RLU) to greater than 8 decades (700 molecules of luciferase can be detected).

For normalization of experimental variations such as differences in transfection efficiencies Luc-activity is normalized against *Renilla* luciferase (Rnl) activity from the same cell extract. Rnl-activity is measured using Promega's *Renilla* Luciferase Assay System. This system has been formulated with a proprietary composition that significantly reduces the coelenterazine autoluminescence commonly seen with other reagents. The typical reaction which is catalyzed by Rnl is shown below.

Coelenterazine + O<sub>2</sub> Mg<sup>2+</sup> /Renilla-Luc Renilla-Oxyluciferin + CO<sub>2</sub> + light (470 nm)

### 3 AREA OF APPLICANCE/LIMITATIONS

#### 4 DEFINITIONS AND TERMS

#### 5 SAFETY

Storage, handling and discarding of the chemicals used in this protocol, should be performed according to the AMC regulations.

See Lab info site: chapter 2.

#### 6 CHEMICALS

##### 1. Renilla Assay Kit (1000 assays)

|                                           | Amount | Storage (°C) | Storage life |
|-------------------------------------------|--------|--------------|--------------|
| Lysis buffer (5x)                         | 30 ml  | -20          | See kit      |
| Renilla Luciferase Assay buffer           | 100 ml | -20          | See kit      |
| Renilla Luciferase Assay substrate (100x) | 100 µl | -20          | See kit      |

##### 2. Other chemicals

|                                      | Mw             | Storage (°C) |
|--------------------------------------|----------------|--------------|
| ATP                                  | 605.2          | 4            |
| BSA                                  | Purity ≥ 98% 4 | 4            |
| DTT                                  | 154.2          | 4            |
| D-Luciferin (Roche)                  | 280.3          | -20          |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 246.48         | RT           |
| NaOH                                 | 40.0           | RT           |
| Tricine                              | 179.2          | RT           |

#### 6.1 Working solutions

##### 1. Tricine (100 mM, pH 7.75)

Dissolve 0.90 gram Tricine (Mw=179.2) in 45 ml H<sub>2</sub>O, adjust pH with 5 M NaOH and fill up to 50 ml.

##### 2. Luciferase substrate (D-luciferin mix)

|                                                  | For 175 ml | Final conc. |
|--------------------------------------------------|------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O                                 | 130 ml     | -           |
| Tricine (100 mM, pH 7.75)                        | 45.0 ml    | 25 mM       |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Mw=246.48) | 0.432 g    | 10 mM       |
| DTT (Dithiothreitol, Mw=154.2)                   | 0.027 g    | 1 mM        |
| ATP (Adenosine Triphosphate, Mw=605.2)           | 0.110 g    | 1 mM        |
| BSA (Purity ≥ 98%, 10 mg/ml)                     | 700 µl     | 40 µg/ml    |
| Luciferin (Roche, Mw=280.3)                      | 0.025 g    | 140 µg/ml   |

Mix well, fill out 1.5 ml in 2 ml tubes, **mark with the text Luc + date of preparation** and store tubes at -20°C in the for this purpose intended freezer drawer.

##### 3. Renilla substrate (working solution)

Add 250 µl of 100x Renilla luciferase substrate to 25 ml of Renilla Luciferase Assay Buffer in a glass

or siliconized polypropylene tube. Mix well, fill out 1.0 ml in 1.5 ml tubes, **mark with the text Rnl + date of preparation** and store in tubes at -20°C in the for this purpose intended freezer drawer.

#### 4. Lysis Buffer (1x)

Warm up 5x Buffer shortly (3-5 minutes) to RT. Mix well. Then add 1 volume of 5x Buffer to 4 volumes of distilled water and mix well. The diluted (1x) Lysis Buffer may be stored at 4°C for up to one month. However, it is recommend that Lysis Buffer be prepared in the amount needed just before each experiment.

#### 5. Practical notes

1. Keep all the components in the assigned freezer drawer!
2. Mark all the bottles after using for the first time and order a new batch after finishing up!
3. *Renilla* substrate working solution is best when prepared freshly before use. However, from practical experience it has become clear that there is no harm in preparing in advance up to 25 ml (not more!), filling it out and keeping it stored at -20°C. Under these conditions it is stable for a few months without appreciable activity loss. At RT it is stable up to 12 hours.
4. 5x Lysis Buffer can also be bought separately. ( Promega; E291A)
5. Always hide Luc and *Renilla* substrate stocks/working solution from light as much as possible!
6. *Usage Luc and Renilla substrate working solution*  
Thaw an adequate volume to perform the desired number of assays (100 µl of reagent per assay for both). Keep in mind that, you have to thaw 1 ml extra of this substrate for priming/filling up the tubes of the Luminometer! Both working solutions may be thawed at room temperature up to three times without appreciable activity loss.  
*Note: stability is defined as ≤10% decrease in activity.*
7. Working solution left-over (after use): do not put back in the stock, store for personal use only.
8. Please prepare new working solution should you take the last tube!

## 7 MATERIALS/EQUIPMENT

Promega Glomax™ 20/20

Microcentrifuge holder

1.5 ml microcentrifuge tubes

## 8 METHODS/PROCEDURES

### 8.1 Lysis of cells by scraping

The following procedure for sample preparation is recommended. This procedure/protocol has been successfully applied to several cell lines.

Researchers should optimize the cell extraction procedure for their own applications.

1. Prepare a sufficient quantity of the 1□ working solution of the Lysis Buffer.
2. Wash attached cells with 1xPBS as for transfection protocol and then remove with vacuum source.
3. Add Lysis Buffer (1□) The volume of Lysis Buffer depends on the type of dish/plate used.
  - a. 250 µl (per well of a 6 wells plate)
  - b. 150 µl (per well of a 12 wells plate)*Note: certain cell types may exhibit greater inherent resistance to lysis: optimizing the treatment conditions may be required.*
4. Place the culture plates on orbital shaker ensuring complete and even coverage of the cell monolayer with 1□ *Renilla* Lysis Buffer. Shake the plates at medium to high speed at room temperature for 15 minutes.
5. Scrape and pipette the accumulated lysate several times to obtain a homogenous suspension and transfer the lysate to a 1.5 ml tube for further handling and storage.
6. To ensure complete lysis of cells (optional): vortex gentle for ± 12 seconds.
7. Centrifuge at 14000 rpm for 2 minutes at 4°C.
8. Put the cell lysates back on ice.

*Note: freezing at -20°C is suitable for short-term storage of prepared lysates (up to 1 week). However, snap freezing in liquid nitrogen and storing at -70°C is recommended for long-term storage. Subjecting cell lysates to more than 5 freeze-thaw cycles may result in gradual loss of Renilla luciferase enzyme activity.*

## 8.2 Luc and Renilla luciferase measurements

The use of the Luminometer is only allowed after instruction and registration by authorized personnel (see "Takenlijst" AEHP\_0705B01).

1. Prior to beginning this protocol, verify that sufficient Luc and *Renilla* working solution is present at room temperature (luciferase activity is temperature dependent) and mixed prior to use.
2. Format the Luminometer to dispense 100 µl. In case the Luminometer has 2 injectors put the one which is not used in the off mode. Prime the injector with substrate. It is recommended first priming/purging all storage liquid (water) from the injector system. Priming substrate through an empty injector system prevents dilution and contamination of the primed substrate. Thus, the volume of primed substrate may be recovered and returned to the reservoir of bulk reagent for another time use.
3. Prime the injector with the Luc or *Renilla* substrate (depending on which one will be measured first).
4. Perform a signal linearity check by performing a 3-4 points titration-curve with one or two samples (e.g. pipette 1, 2, 4 and 8 µl Luc/*Renilla* activity containing sample and measure). The signal should be linear with the amount of sample. If yes, continue with the assay. If not, try to determine (by performing extra checks) whether the problem concerns the Luminometer or has to do with your samples. If finally it appears that the Luminometer is the problem contact the person who is responsible for it.
5. For each reaction, add ☐ µl cell lysate (typically 5-20 µl) for the Luc assay and **20 µl cell lysate** for the *Renilla* assay to an individual 1.5 ml tube.
6. Place sample in the Luminometer. Initiate measurement. This action will cause substrate to be injected into the reaction vessel and the measurement to be taken subsequently. Luminescence is normally integrated over 10 seconds with a 2-second delay. Other integration times may also be used.
7. If the Luminometer is not connected to a printer or computer, record the Luc and *Renilla* activity measured.
8. Clean reagent Injectors after finishing the assay. Purge substrate from the injector tubes by purging with:
  1. deionized water
  2. 70% ethanol and
  3. again deionized water
 Every step requires 3 ml at least!
9. Processing the results. Calculate the ratio Luciferase/*Renilla* according the following formula, which is a measure for promotor activity.

$$\frac{(\text{Lucvalue} - \text{Lucbackground})}{(\text{Renillavalue} - \text{Renillabackground})}$$

Background = x µl cell Lysis Buffer (without cells) in measurement .

From practical experience it is known that the background for both assays should not rise above 200 RLU.

## 9 QUALITY CONTROL

## 10 PROCESSING THE RESULTS

## 11 ACCURACY AND PRECISION

## 12 REMARKS

Comments on this protocol can be mailed to [hfr-protocol@amc.uva.nl](mailto:hfr-protocol@amc.uva.nl) or for members of the department of Anatomy, Embryology & Physiology, see Lab Info, Kwaliteitshandboek, Hoofdstuk 13, Beheer documentatie, Wijzigen SOPs.

## 13 DOCUMENTS APPLICABLE

AEHP\_0705B01 Takenlijst

AELW\_AB02 PBS

AELA\_AS07 GloMax 20/20 Luminometer

## 14 FORMS APPLICABLE

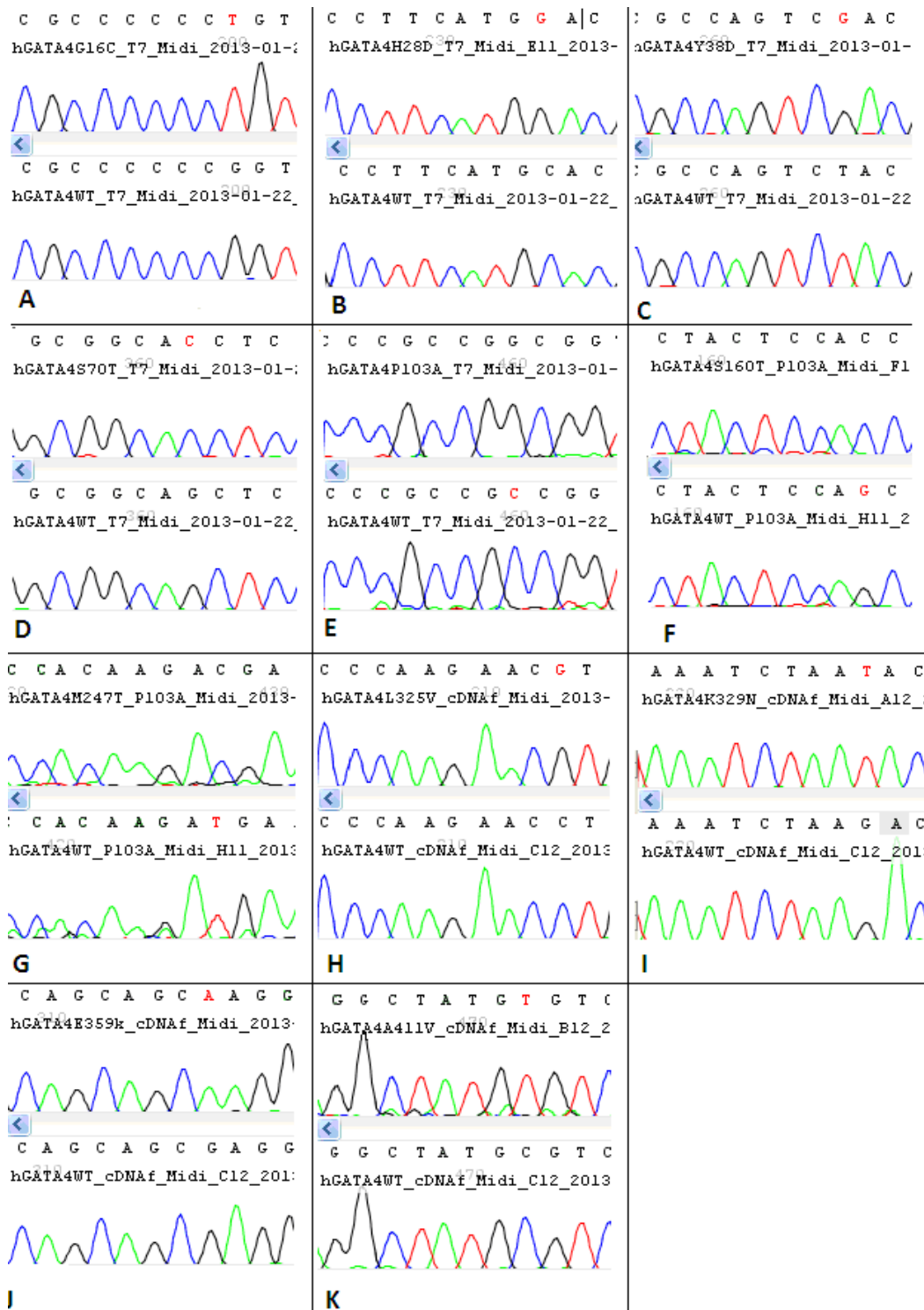
## 15 REFERENCES

1. Webster J, Chang JC, Manley ER, Spivey HO, Leach F. Buffer effects on ATP analysis by firefly luciferase. *Anal Biochem.* 1980;106:7-11.
2. Webster J, Leach F. Optimization of the firefly luciferase assay for ATP. *J Appl Biochem.* 1980;2:469-479.
3. Deluca M, McElroy WD. Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase. *Biochem Biophys Res Comm.* 1984;123:764-770.
4. De Wet JR, Wood KV, Deluca M, Helsinki DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1987;7:725-737.
5. Hooper CE, Ansorge RE, Browne HM, Tomkins P. CCD imaging of luciferase gene expression in single mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin.* 1990;5:123-130.
6. Pons M, Gagne D, Nicolas JC, Mehtali M. A new cellular model of response to estrogens; a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules. *Biotechniques* 1990;9:450-459.
7. Wood, KV. The origin of beetle luciferases. Promega Corporation, 1991
8. Promega Notes Magazine 44, 1993

## 16 APPENDICES

AELW\_EH03B01 Promega Technical Manual *Renilla* Luciferase Assay System

## Bijlage 7 Resultaten sequence midiprep



Resultaten van de midiprep na het sequencen. Per figuur is de bovenste sequence de mutant en de onderste sequence de wildtype. De rode letter geeft de positie aan waar de mutatie zit. A: mutant G16C, B: mutant H28D, C: mutant Y38D, D: mutant S70T, E: mutant P103A, F: mutant S160T, G: mutant M247T, H: mutant L325V, I: mutant K329N, J: mutant E359K en K: mutant A411V.