

**Einfluss Diabetes-assoziiierter Mutationen
im Transkriptionsfaktor HNF4 α**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Jörn Lausen

aus Gelting

Februar 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Ryffel
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Hensel
3. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 16 Mai 2001

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Lausen,J., Thomas,H., Lemm,I., Bulman,M., Borgschulze,M., Lingott,A., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* 28, 430-43.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
I. Einleitung	1
1. Kernrezeptoren und Krankheiten des Menschen	1
2. Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α	3
3. Maturity onset diabetes of the young (MODY)	7
4. Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen	9
5. Zielsetzung der Arbeit	11
II. Material und Methoden	12
1. Chemikalien, Puffer und Enzyme	12
2. Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren	12
3. Zelllinien	15
4. Zellkultur von HeLa-, HEK293- und INS-1-Zellen	15
5. Transfektion	16
6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten Zellen	17
7. Herstellung stabiler induzierbarer Klone	17
8. Induzieren von stabilen Klonen und Bestimmen der Zellzahl	18
9. β -Galaktosidase-Färbung	18
10. Indirekte Immunfluoreszenz	18
11. Luciferaseassay	19
12. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	19

13. Immunoblotanalyse	20
14. Gelretardationsanalyse	20
III. Ergebnisse	22
1. Eine Mutation in der DNA-Bindedomäne von HNF4α verändert die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf einigen Promotoren	22
2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1α-Promotor	24
2.1. Die MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Promotors verringert die Transaktivierung durch HNF4 α	24
2.2. Der Funktionsverlust des Promotors lässt sich auf den Verlust der HNF4 α -Bindung durch die MODY3-assoziierte Mutation zurückführen	26
3. Die MODY1-Mutationen beeinflussen die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors	28
3.1. Das Transaktivierungspotential der MODY1-Mutanten	28
3.2. Die untersuchten MODY1-Mutanten sind nicht dominant-negativ	30
3.3. Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten zeigen eine verringerte DNA-Bindung	32
3.4. Subzelluläre Lokalisation der Mutanten	34
4. HNF4α hemmt die Vermehrung von Zellen	35
4.1. Die Überexpression von HNF4 α hemmt das Aufwachsen stabiler Klone in INS-1-Zellen	35
4.2. Einige MODY1-assoziierte Mutanten reprimieren das Aufwachsen von Zellen nicht wie der Wildtyp	36
4.3. Herstellung stabiler induzierbarer Klone	38
4.4. HNF4 α ist in stabilen INS-1-Klonen induzierbar	39
4.5. Induzierte HNF4 α -INS-1-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung	42
4.6. HNF4 α ist in stabilen HEK293-Klonen induzierbar	45
4.7. Induzierte HNF4 α -HEK293-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung	47

IV. Diskussion	49
1. Die D69A-Mutante ist auf einigen Promotoren aktiver als der Wildtyp	49
2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor	50
3. Die MODY1-Mutationen bewirken einen Funktionsverlust des HNF4 α -Proteins	51
4. HNF4 α hemmt das Aufwachsen von INS-1-Zellen	55
5. HNF4 α hemmt die Vermehrung von HEK293-Zellen	57
6. HNF4 α und Erkrankungen des Menschen	58
V. Zusammenfassung	61
Literatur	63

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
CDTA	Diaminocyclohexantetraacetic acid
c.p.m	counts per minute
dCTP	desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,3-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	foetal calf serum
G418	geneticin sulphate
GRBB	gel retardation bindung buffer
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
kDa	Kilodalton
PBS	phospat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	units

I. Einleitung

1. Kernrezeptoren und Krankheiten des Menschen

Die Kernrezeptoren stellen die größte Klasse der Transkriptionsfaktoren, zu ihnen gehören ligandenabhängige Rezeptoren, aber auch sogenannte Orphan-Rezeptoren, für die noch kein Ligand identifiziert worden ist oder für die keiner existiert (Mangelsdorf et al., 1995; Burris, 2001). Als Transkriptionsfaktoren spielen sie für die differentielle Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung von Organismen eine maßgebliche Rolle. Im adulten Organismus sorgen sie für den Erhalt des differenzierten Zustands von Zellen und vermitteln Anpassungen der Genexpression als Antwort auf extrazelluläre Signale wie Hormone oder intrazelluläre Signale wie Stoffwechselprodukte. Allen Mitgliedern der Kernrezeptor Superfamilie liegt eine in Domänen gegliederte Struktur zu Grunde (Kumar and Thompson, 1999; Laudet et al., 1992): N-terminal liegt die A/B-Domäne (siehe Abb. 1, Seite 9), die in manchen Rezeptoren eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF1) trägt. Dann folgt die C-Domäne, die am stärksten zwischen den verschiedenen Rezeptoren konserviert ist und zwei Zinkfinger motive beinhaltet. Im ersten Zinkfinger motiv liegt die sogenannte P-Box, die für die Spezifität der DNA-Bindung wichtig ist. Die folgende D-Domäne hat modulierende Funktion bei der DNA-Bindung, ist jedoch wenig konserviert. Für die Ligandenbindung ist die E-Domäne zuständig, sie trägt die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF2). Dieser Domäne werden Eigenschaften wie Transaktivierung, Dimerisierung und Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle zugeschrieben. Einige Rezeptoren besitzen C-terminal eine weitere Domäne, die F-Domäne.

Die Kernrezeptoren beeinflussen die Expression von Zielgenen durch das Binden spezifischer Bindestellen in Promotoren oder Enhancern. Sie sind in der Lage durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, die Genexpression auf der Ebene der Transkription zu aktivieren oder zu reprimieren (Torchia et al., 1998; Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999). Die Bindestellen für Kernrezeptoren bestehen klassischerweise aus zwei Halbseiten, die entweder als invertierte Wiederholung (IR; *inverted repeat*) oder direkte Wiederholung (DR; *direct repeat*) angeordnet sind, zwischen den Halbseiten liegt ein Spacer von unterschiedlicher Länge (Mangelsdorf and Evans, 1995). An ihre Bindestellen binden die meisten Rezeptoren entweder als Homodimer, wie zum Beispiel der Progesteronrezeptor oder als Heterodimer, wie zum Beispiel der Thyroidhormonrezeptor und der Retinsäurerezeptor.

Nach einem Modell der Funktion von Kernrezeptoren (Jiang et al., 1995) können vier Klassen von Kernrezeptoren unterschieden werden. Die Klasse-I-Rezeptoren wie der Steroidrezeptor liegen meist als Monomere in inaktiver Form an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden im Cytoplasma vor. Wenn sie mit Liganden beladen werden, dissoziieren sie von den HSP ab und translozieren in den Kern. Dort binden sie an die als HRE's (hormon response element) bezeichneten Bindestellen in Promotoren oder Enhancern ihrer Zielgene.

Klasse-II-Kernrezeptoren, zum Beispiel der Retinoid-X-Rezeptor, liegen bereits als Dimer im Kern vor, werden jedoch erst aktiv, wenn sie mit ihrem Liganden interagieren. Klasse-III-Kernrezeptoren wie der „Steroidogenic-Factor-1“ binden DNA als Monomer. Die Klasse-IV der Kernrezeptoren wird von den Mitgliedern der HNF4-Genfamilie (hepatocyte nuclear factor 4) gebildet, zu der HNF4 α , HNF4 β und HNF4 γ gehören, auf die Besonderheiten dieser Klasse wird noch eingegangen.

Die wichtige Funktion von Kernrezeptoren wird in einer Reihe von vererbaren Krankheiten des Menschen deutlich, die auf Mutationen in Kernrezeptoren zurückgehen. Liegen diese Mutationen im kodierenden Bereich des Gens, können sie die Funktion des betreffenden Proteins durch Änderungen in der Aminosäuresequenz modifizieren. Davon können unterschiedliche Eigenschaften des Proteins betroffen sein. Mutationen in der Ligandenbindedomäne können die Affinität des Kernrezeptors zu seinem Liganden vermindern und dadurch die Aktivierung des Kernrezeptors verringern. Mutationen in der Ligandenbindedomäne des Thyroidhormonrezeptors beta vermindern zum Beispiel die Bindung seines Liganden an den Rezeptor und führen so zur Ausprägung von Thyroidhormonresistenz (RTH) (Dressel and Baniahmad, 2001). Bei Patienten mit RTH kommt es unter anderem zu Hördefekten, Lernschwierigkeiten, Sprachschwierigkeiten und intellektuellen Behinderungen.

Demgegenüber liegen viele der bekannten Mutationen im Vitamin-D-Rezeptor (VDR) in der DNA-Bindedomäne des Rezeptors und beeinträchtigen die DNA-Bindung (Malloy et al., 1999). Patienten mit Mutationen im VDR-Gen leiden aufgrund von Vitamin-D Resistenz unter vererbbarer Rachitis (HVDRR: hereditary vitamin-D resistant rickets).

Die entscheidende Funktion von Aktivatoren und Repressoren bei der Genaktivierung durch Kernrezeptoren wird bei der akuten promyeloischen Leukämie deutlich (Love et al., 2000). Hierbei kann es durch eine chromosomale Translokation zu einer Fusion des Gens für den Retinsäurerezeptors (RAR) mit anderen Transkriptionsfaktoren kommen, zum Beispiel dem PML-Gen (promyelocytic leukemia protein). Dadurch entsteht ein Fusionsprotein, das wie der Wildtyp dimerisiert, an die Bindestellen für den Retinsäurerezeptor bindet und ohne Liganden

durch Repressoren inaktiviert ist. Diese Repressoren können jetzt jedoch nicht mehr bei physiologischen Konzentrationen von Liganden ihren Platz für Aktivatoren freimachen (Chung and Cooney, 2001).

Als Beispiel für die vielfältigen Funktionen, die ein einziger Kernrezeptor in Entwicklung und Krankheit ausfüllt, kann besonders der PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma) genannt werden. PPAR γ ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Adipocyten (Rosen et al., 2000). Mutationen in PPAR γ sind unter anderem ursächlich für Stoffwechselkrankheiten (Barroso et al., 1999) und werden mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Sarraf et al., 1999).

Besonders interessant ist die vor Beginn dieser Arbeit entdeckte Rolle von Mutationen im Kernrezeptor HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) bei einer Form des nicht Insulin abhängigen Typ-II Diabetes (NIDDM: non insulin dependent diabetes mellitus). Hier wurde zum ersten mal gezeigt, dass Kernrezeptoren bei dieser häufigen Form des Diabetes eine Rolle spielen können (Yamagata et al., 1996).

2. Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α

HNF4 α (NR2A1) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999, 1999) bildet mit *Xenopus*-HNF4 β (Holewa et al., 1997) und dem HNF4 γ , das in Mensch und Maus gefunden wurde (Drewes et al., 1996; Plengvidhya et al., 1999) eine eigene Unterklasse innerhalb der Kernrezeptoren. Die Mitglieder dieser Genfamilie sind in ihrer Sequenz stark homolog, die Funktion von HNF4 β und HNF4 γ sind im Vergleich zum HNF4 α jedoch wenig untersucht. Auf eine frühe evolutionäre Funktion von HNF4 deutet die weite Verbreitung im Tierreich hin. So sind HNF4-Gene ausser in Säugern und *Xenopus*, in Fischen (McNair et al., 2000) und in Insekten (Swevers and Iatrou, 1998; Kapitskaya et al., 1998) gefunden worden.

Im Unterschied zu anderen Kernrezeptoren liegt HNF4 α bereits in Lösung als Homodimer im Kern vor, es bindet an Sequenzen, die als DR1-Elemente angeordnet sind (Jiang et al., 1995). Obwohl viele Mitglieder der Kernrezeptor-Familie durch Liganden aktiviert werden, ist das Vorhandensein eines Liganden für HNF4 α umstritten. Die Aktivität von HNF4 α scheint durch Acyl-CoenzymA-Thioestern (Acyl-CoA-Thioester) moduliert zu werden (Hertz et al., 1998), die geringe Wirkung und Spezifität der Acyl-CoA-Thioester sowie neuere Strukturuntersuchungen sprechen jedoch gegen Acyl-CoA-Thioester als klassischen Liganden

von HNF4 α (Peiler et al., 2000; Bogan et al., 2000). Daher muß HNF4 α weiterhin zur der grossen Gruppe der Kernrezeptoren ohne bekannten Liganden gezählt werden, den sogenannten Orphan-Rezeptoren.

HNF4 α weist den typischen Aufbau eines Kernrezeptors auf (Abb. 1, S. 9). Es besitzt eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF1) in der A/B-Domäne (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997) und in der C-Domäne zwei Zinkfinger motive zur DNA-Bindung. Die sogenannte P-Box im ersten Zinkfinger hat bei HNF4 eine typische Aminosäuresequenz, sie unterscheidet sich von allen anderen Kernrezeptoren und gilt daher als charakteristisches Merkmal der HNF4-Genfamilie (Sladek et al., 1990). An die folgende D-Domäne schliesst sich die Ligandenbindungsdomäne an, diese E-Domäne ist bei Kernrezeptoren für die Ligandenbindung und Dimerisierung verantwortlich. Im Unterschied zu den meisten anderen Kernrezeptoren besitzt HNF4 eine relativ grosse F-Domäne, die modulierend auf die Transaktivierung wirkt (Suaud et al., 1999a).

Aus der Exon/Intron-Struktur von HNF4 α lassen sich neun mögliche Spleißvarianten von HNF4 α ableiten (HNF4 α 1-HNF4 α 9), von denen fünf nachgewiesen sind (Sladek and Seidel, 2001). Es scheint zellspezifische Unterschiede in der Expression der Varianten zu geben, was auf eine Funktion der verschiedenen Varianten hindeutet (Nakhei et al., 1998).

In Vertebraten ist HNF4 α als gewebespezifischer Transkriptionsfaktor in der Leber, der Niere, im Magen-Darmtrakt und im endokrinen Pankreas exprimiert (Sladek et al., 1990; Miquerol et al., 1994). Die wichtige Funktion von HNF4 α in der Embryogenese von Vertebraten wird durch die spezifische Inaktivierung des HNF4 α -Gens der Maus deutlich. Diese Mäuse sterben noch vor Vollendung der Gastrulation durch eine Fehlentwicklung des visceralen Endoderms (Chen et al., 1994). Wenn das viscerele Endoderm aus Wildtyp-Gewebe besteht, können die HNF4 α -defizienten Tiere die Gastrulation beenden (Duncan et al., 1997). Bei diesen Tieren zeigt sich, dass HNF4 α für die Differenzierung zu voll funktionsfähigen Leberzellen benötigt wird, die frühe Entwicklung wie die Spezifikation der Leber ist jedoch nicht beeinflusst (Li et al., 2000). Für weitere Gewebe in denen HNF4 α exprimiert wird, stehen zur Zeit noch keine Daten aus HNF4 α -defizienten Embryonen zur Verfügung. Ausserdem gibt es keine adulten HNF4 α -defiziente Tiere, da die Embryonen vor der Geburt absterben.

Ein weiterer Hinweis auf eine frühe Rolle von HNF4 α in der Embryogenese zeigt sich darin, dass es in undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus vorhanden ist (Nakhei et al.,

1998) und im *Xenopus*-Ei als maternaler Faktor vorliegt (Holewa et al., 1996). Im *Xenopus*-Ei ist HNF4 α jedoch zunächst durch einen spezifischen Inhibitor inaktiviert (Peiler et al., 2000). Eine große Anzahl von Genen besitzt funktionelle Bindestellen für HNF4, diese Gene kodieren in der Mehrzahl für Proteine, die eine Rolle im Fett-, Aminosäure- oder Glucosestoffwechsel besitzen (Sladek and Seidel, 2001). Die Rolle von HNF4 α bei der Kontrolle der Genexpression ist sowohl durch Zellkultur-Experimente, als auch durch die Analyse HNF4 α -defizienter Mäuse gut belegt. So ist in der Leber von HNF4 α -defizienten Embryonen die Expression einer Reihe von Genen herunterreguliert. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren Pregnan-X-Rezeptor und HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 alpha) sowie Gene, die zum leberspezifischen Expressionsmuster gehören, wie Apolipoproteine, Aldolase-B, Phenylalanin-Hydroxylase, Transferrin und Erythropoietin (Li et al., 2000). In Zellkultur ist gezeigt worden, dass HNF4 α die leberspezifische Genexpression aufrechterhält. So korreliert die leberspezifische Genexpression in Hepatomazellen mit der Expression von HNF4 α (Bulla, 1997; Spaeth and Weiss, 1997). Verstärkte Expression von HNF4 α aktiviert zahlreiche Gene, der Grad der Aktivierung ist dabei jedoch vom Zelltyp abhängig (Bailly et al., 1998).

Diese Experimente zeigen auch, dass HNF4 α eine zentrale Rolle in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HNF1 α besitzt (Kuo et al., 1992). HNF1 α ist ein Transkriptionsfaktor der POU/Homöobox-Familie, der ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kontrolle der leberspezifischen Genexpression ausübt (Cereghini, 1996; Tronche et al., 1997). Der HNF1 α -Promotor enthält eine Bindestelle über die HNF4 α die Transkription des HNF1 α -Gens aktiviert (Tronche and Yaniv, 1992). Während die HNF1 α -Expression in HNF4 α -defizienten Mäusen verringert ist, kann eine Überexpression von HNF4 α in *Xenopus*-Eiern die ektopische Expression von HNF1 α in den Larven auslösen (Nastos et al., 1998).

Inzwischen ist das genregulatorische Potential der Aktivierung von HNF1 α durch HNF4 α auch in pankreatischen β -Zellen nachgewiesen worden. In der β -Zelllinie INS-1 ist durch spezifische Inaktivierung des endogenen HNF4 durch ein dominant-negatives Derivat von HNF4 α sowohl das HNF1 α -Gen, als auch eine Anzahl von HNF1 α -Zielgenen herunterreguliert (Wang et al., 2000a). Zusätzlich zur Regulation von HNF1 α durch HNF4 α kann auch das Vorhandensein eines autoregulatorischen Mechanismus angenommen werden, bei dem HNF1 α die HNF4 α -Expression über eine Bindestelle im HNF4 α -Promotor stimuliert und dadurch seine eigene Expression fördert (Zhong et al., 1994).

Ausserdem weiß man, dass HNF4 α in einer Kaskade von Transkriptionsfaktoren unterhalb der Transkriptionsfaktoren HNF3 β und GATA6 angeordnet ist (Morrisey et al., 1998; Duncan et al., 1998). Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen HNF4 α und verschiedenen Transkriptionsfaktoren legen HNF4 α ins Zentrum eines Netzwerks von Transkriptionsfaktoren, welches einen spezifischen Zelltyp definiert.

Während HNF4 α für die Differenzierung und den Erhalt des differenzierten Zustands von normalen Zellen eine wichtige Rolle spielt, scheint HNF4 α in Tumoren der Niere herunterreguliert zu sein (Sel et al., 1996). Dies deutet auf eine Rolle von HNF4 α in der Tumorentstehung hin. Ob ein Verlust von HNF4 α die Ursache des dedifferenzierten Zustands der Tumorzellen oder nur Ausdruck desselben ist, ist bisher ungeklärt. Eine zu Beginn dieser Arbeit gefundene Mutation im HNF4 α -Gen der Hepatomazelllinie HepG2 (Michael Borgschulze, Institut für Zellbiologie) unterstützt die Annahme, dass Mutationen im HNF4 α -Gen mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung stehen. Diese Mutation in HepG2-Zellen führt zu einer Aminosäureänderung in der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors (siehe auch Abb. 1, Seite 9).

HNF4 α ist für die Expression einer grossen Anzahl von Genen wichtig und essentiell für die Embryonalentwicklung von Vertebraten, daher liegt es nahe, dass HNF4 α zu Erkrankungen des Menschen beiträgt. So werden Mutationen in der HNF4 α -Bindestelle von Blutgerinnungsfaktoren für die Entstehung von Hämophilie verantwortlich gemacht (Reijnen et al., 1992; Carew et al., 2000).

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde publiziert, dass Mutationen im HNF4 α -Gen zu einer erblichen Form des Typ-II Diabetes mellitus führen, dem MODY1 („maturity onset diabetes of the young 1“).

3. Maturity onset diabetes of the young (MODY)

Maturity onset diabetes of the young (MODY) ist eine autosomal dominant vererbte, monogene Form des nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM; non insulin dependent diabetes mellitus). Charakteristisch für MODY ist das frühe Ausbrechen der Krankheit, meist vor dem 25. Lebensjahr. Man nimmt an, dass die Hauptursache der Krankheit in einer Störung der β -Zellen des Pankreas liegt. Diese Störung zeigt sich in einer unzureichenden Insulinsekretion bei erhöhtem Glucosespiegel im Blut. Als klinische Definition für MODY gilt das Auftreten des Diabetes in mindestens zwei Generationen und zumindest einem Betroffenen unter dem 25. Lebensjahr (Zusammengefasst in: Hattersley, 1998; Froguel and Velho, 1999; Winter and Silverstein, 2000).

Bisher sind fünf Gene identifiziert worden, in denen heterozygote Mutationen zu MODY führen. Bei MODY1 ist das HNF4 α -Gen betroffen, weitere MODY-Gene sind die Glucokinase (GCK; MODY2), HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 alpha; MODY3), IPF1 (insulin promoter factor 1; MODY4) und HNF1 β (hepatocyte nuclear factor 1 beta; MODY5). Der molekulare Mechanismus, über den Mutationen in den betroffenen Genen zur Ausprägung der Krankheit führen, ist bisher nur für die Glucokinase (MODY2) bekannt. Die Glucokinase gehört zur Enzymgruppe der Hexokinasen, welche die Phosphorylierung von Glucose im Anfang der Glycolyse vermitteln. Als gewebespezifisches Enzym ist seine Expression auf die Leber und die β -Zellen des Pankreas beschränkt. Die Aktivität der Glucokinase bestimmt die Rate des Glucosemetabolismus in der Leber und in den β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. Die Insulinsekretion der β -Zellen wiederum ist vom Glucosemetabolismus abhängig, die Glucokinase wirkt somit als eine Art Sensor für die Glucosekonzentration. Diese Kopplung des Glucosemetabolismus der β -Zellen mit der Insulinsekretion ist durch die MODY-assoziierten Mutationen der Glucokinase gestört, infolgedessen kommt es zu einer unzureichenden Insulinsekretion.

Alle anderen Mutationen, die mit MODY in Verbindung gebracht werden, betreffen Transkriptionsfaktoren. Die Mechanismen, die hier zur Ausprägung der Krankheit führen, sind weitgehend unverstanden. Es gibt jedoch einige Hinweise aufgrund der Funktion dieser Faktoren als Regulatoren der Transkription.

Das IPF1-Gen (insulin promoter factor 1) gilt sowohl als ein Hauptregulator der Expression des Insulin-Gens als auch der Entwicklung des Pankreas (Stoffers et al., 1997a; Yamaoka and

Itakura, 1999). Heterozygote Mutationen im IPF-Gen führen zu MODY4 (Stoffers et al., 1997b), der homozygote Verlust der Genfunktion verhindert die Entwicklung des Pankreas (Stoffers et al., 1997c). Ob sich Mutationen im IPF1-Gen direkt auf das Insulin-Gen auswirken oder ob eine Störung in der Entwicklung der β -Zellen MODY4 verursacht, ist ungeklärt.

MODY3 ist mit etwa 65% die häufigste MODY-Form. Das betroffene Gen ist HNF1 α , es wird ähnlich wie HNF4 α in der Leber, der Niere, im Magen-Darmtrakt und im Pankreas exprimiert. Als Transkriptionsfaktor der POU-Homöoboxfamilie ist es für die transkriptionelle Kontrolle von Genen verantwortlich, die unter anderem für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase wichtig sind. Die Funktion von HNF1 α im Pankreas ist noch weitgehend unklar. In Zellkultur konnte durch spezifische Inhibierung von HNF1 α durch ein dominant-negatives Derivat jedoch gezeigt werden, dass HNF1 α in β -Zellen eine grosse Anzahl von Genen reguliert, die für den Glucosestoffwechsel wichtig sind. In diesen Zellen war zudem die Insulinsekretion gestört (Wang et al., 1998; Wang et al., 2000b). Transaktivierungsstudien zeigen zudem, dass das Insulin-Gen von HNF1 α aktiviert werden kann (Emens et al., 1992; Okita et al., 1999). Ob diese Regulation in MODY3-Patienten bedeutsam ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen.

Interessanterweise ist das HNF1 β -Gen, welches mit dem HNF1 α Heterodimere bilden kann auch ein MODY-Gen. HNF1 β ist strukturell und funktionell mit HNF1 α verwandt. Es bindet entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit HNF1 α an die gleichen Bindestellen von Promotoren wie HNF1 α . Möglicherweise ist die Ursache für die Entstehung von MODY bei HNF1 α und HNF1 β identisch. Inaktivierung in Mäusen führt bei HNF1 α unter anderem zur Entwicklung von Diabetes (Lee et al., 1998), bei HNF1 β jedoch zum embryonalen Tod (Barbacci et al., 1999). Ein Ausfall des einen Gens kann offensichtlich nicht durch das andere kompensiert werden. Ausserdem verursachen Mutationen im HNF1 β -Gen, im Gegensatz zum HNF1 α , zusätzlich zum Diabetes auch Nierendefekte (Bingham et al., 2000; Wild et al., 2000). Die beiden Gene sind funktionell also nicht redundant.

4. Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen

Heterozygote Mutationen im HNF4 α -Gen sind ursächlich für MODY1 (Yamagata et al., 1996). In Abbildung 1 sind die Positionen von MODY1-assoziierten Mutationen eingetragen, die zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren. Zusätzlich ist die bereits erwähnte Mutation D69A aus der Hepatomazelllinie HepG2 eingetragen.

Die MODY1-assoziierten Mutationen R154X (Lindner et al., 1997) und Q268X (Yamagata et al., 1996) sind sogenannte nonsense-Mutationen, die durch Einführung eines Stopcodons zu einem vorzeitigen Ende der Proteinsynthese führen. Die Proteine sind dadurch C-terminal verkürzt. Die missense-Mutationen R127W (Furuta et al., 1997; Bulman et al., 2000), V255M (Möller et al., 1997) und E276Q (Bulman et al., 1997) führen zur Änderung einer einzelnen Aminosäure.

Die D69A-Mutation wurde in HepG2-Zellen gefunden, sie betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Möglicherweise ist sie eine tumorassoziierte Mutation, die zur Tumorentstehung beigetragen haben könnte.

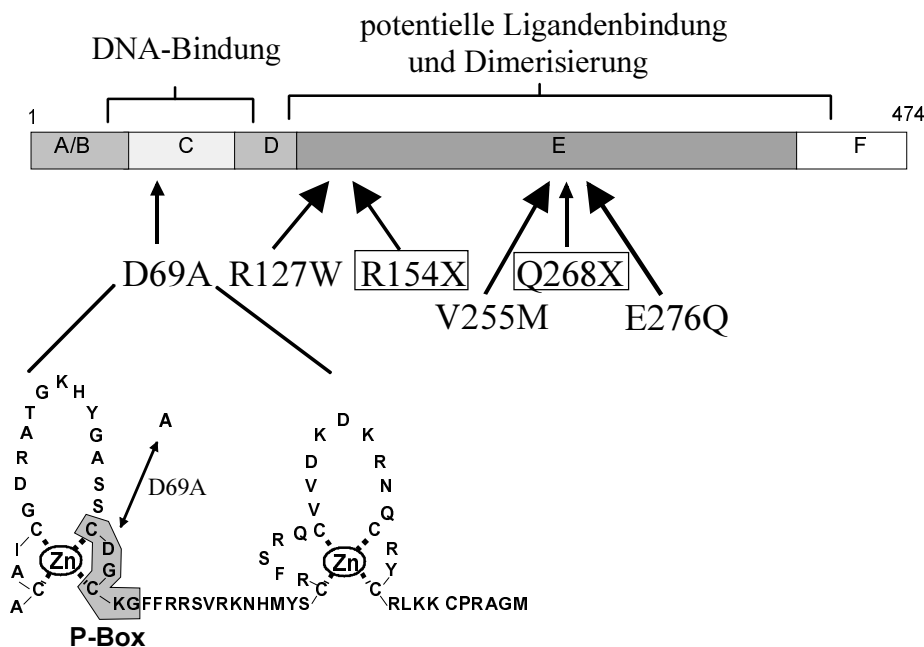


Abbildung 1: Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen. Die Domänenstruktur des HNF4 α -Proteins und die Lage der Mutationen sind gezeigt. Die D69A-Mutation wurde in der Hepatomazelllinie HepG2 gefunden und betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne. Die missense-Mutationen R127W, V255M und E276Q sind MODY1 assoziiert. Die Mutationen R154X und Q268X sind MODY1-assoziierte nonsense-Mutationen, die zu einem verkürzten Protein führen.

Ob die MODY1-assoziierten Mutationen wirklich ursächlich für die Krankheit sind oder nur Polymorphismen, die mit dem wirklich für die Erkrankung wichtigen Gen kosegregieren, war zu Beginn dieser Arbeit für die einzelnen Mutationen in unterschiedlichem Masse klar. Zum Beispiel war die Q268X-Mutation wegen des statistisch gut abgesicherten Stammbaums der betroffenen Familie mit grosser Sicherheit Ursache für MODY1. Dahingegen war die V255M-Mutante ein unsicherer MODY1-Kandidat. Da die statistische Absicherung nicht gut war (Möller et al., 1997) und die Mutation eines Valins (V) zu einem Methionin (M) eine eher konservative Veränderung darstellt.

Alle MODY1-Mutationen führen entweder zu einem verkürzten Protein mit verkürzter E-Domäne oder liegen in Bereichen, die für die Transaktivierung wichtig sein könnten. Daher bestand die Möglichkeit, dass diese Mutationen die Transaktivierungsfähigkeit des HNF4 α -Proteins beeinträchtigen. Wenn das mutierte Protein defizient in der Transaktivierung ist, aber seine Fähigkeit beibehält mit dem Wildtyp Dimere zu bilden, könnte sich ausserdem ein dominant-negativer Effekt auf das Wildtyp-Protein einstellen.

Auf die wichtige Funktion von HNF4 α für die Regulation der Expression des HNF1 α -Gens ist bereits eingegangen worden. Bei einem Funktionsverlust von HNF4 α kann daher vermutet werden, dass sich dies mittelbar durch die Fehlregulation des HNF1 α -Gens auf die Expression des Insulin-Gens auswirkt. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache unterstützt, dass eine MODY3-assoziierte Mutation in der potentiellen Bindestelle für HNF4 im Promotorbereich des HNF1 α -Gen des Menschen liegt (Gagnoli et al., 1997).

Da MODY-Patienten nicht schon bei der Geburt erkrankt sind, ist eine Fehlregulation des Insulin-Gens als alleinige Ursache für MODY1 jedoch eher unwahrscheinlich, denn dann sollte sich die Krankheit sofort ausprägen. Es ist daher anzunehmen, dass bei MODY1 die Bedeutung eines Faktors mit der Zeit zunimmt bis es zur Ausprägung des Phänotyps kommt. Ein solcher Faktor könnte die Störung der Neogenese der β -Zellen des Pankreas sein.

5. Zielsetzung der Arbeit

In der Hepatomazelllinie HepG2 ist das HNF4 α -Gen mutiert, diese Mutation könnte zur Tumorentstehung beigetragen haben. Um eine Beteiligung an der Tumorentstehung abschätzen zu können, sollte in dieser Arbeit die Auswirkung der Mutation auf die Eigenschaften von HNF4 α ermittelt werden.

Die Expression des HNF1 α -Gens (MODY3) ist eng mit der Expression des HNF4 α -Gens (MODY1) verknüpft. Daher liegt es nahe zu vermuten, dass Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren über einen gemeinsamen Mechanismus zur Erkrankung führen.

Ein Hinweis auf einen gemeinsamen Mechanismus ist eine MODY3-Mutation in einer putativen Bindestelle für HNF4 im Promotor des HNF1 α -Gens des Menschen. Die Auswirkung dieser Mutation auf die Aktivierbarkeit des HNF1 α -Promotors durch HNF4 α sollte untersucht werden.

Mutationen im zellspezifischen Transkriptionsfaktor HNF4 α führen im Menschen zu MODY1. Um Hinweise auf die Wirkungsweise der Mutationen bei der Entstehung von MODY1 zu erhalten, sollten die Folgen der MODY1-Mutationen auf die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors untersucht werden.

MODY1 entwickelt sich mit der Zeit, die Mutationsträger sind bei der Geburt gesund. Ein Ziel dieser Arbeit war daher zu ermitteln, ob ein Einfluss von HNF4 α auf die Vermehrung von β -Zellen zu der Entwicklung von MODY1 beitragen könnte. Dazu sollte ein möglicher Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung untersucht werden und mit den MODY1-Mutanten verglichen werden. Dafür sollten stabile induzierbare Zellklone der β -Zelllinie INS-1 hergestellt werden.

Da ein Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung auch zur Entstehung von Nierentumoren beitragen könnte, sollte der Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung in stabilen induzierbaren HNF4 α -Zellklonen der embryonalen humanen Nierenzelllinie HEK293 ermittelt werden.