

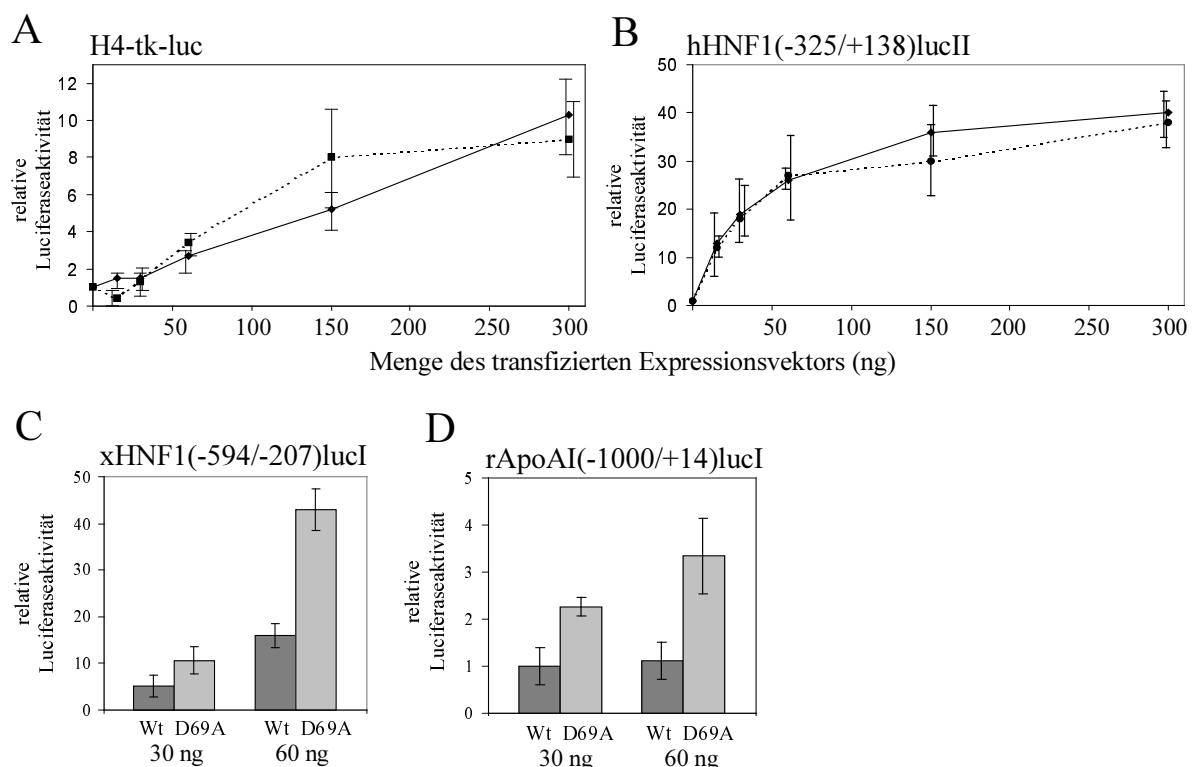
### III. Ergebnisse

#### 1. Eine Mutation in der DNA-Bindedomäne von HNF4 $\alpha$ verändert die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf einigen Promotoren

Im Rahmen einer Suche nach tumorassoziierten Mutationen im HNF4 $\alpha$ -Gen wurden von M. Borgschulze (Institut für Zellbiologie, Essen) verschiedene Tumorzelllinien untersucht. In der Hepatomazelllinie HepG2 fand er eine Mutation im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 $\alpha$ . Diese Mutation führt in der für alle Mitglieder der HNF4-Genfamilie typischen P-Box zu einem Austausch einer Asparaginsäure gegen ein Alanin an der Aminosäureposition 69 (D69A). Dieser Austausch einer sauren geladenen Aminosäure gegen eine aliphatische ungeladene Aminosäure in einem funktionell wichtigen Bereich von HNF4 $\alpha$  legt einen Einfluss auf die Funktion des Transkriptionsfaktors nahe. Daher wurde die Mutation in einen Expressionsvektor für HNF4 $\alpha$  eingeführt und seine Transaktivierungsfähigkeit auf verschiedenen Luciferasereporter genen in HeLa-Zellen getestet. HeLa-Zellen besitzen kein endogenes HNF4, das die Reporter gene beeinflussen könnte und sind daher gut für diese Reporter genassays geeignet. Die Reporter gene wurden zusammen mit einem für die D69A-Mutante kodierenden Expressionsvektor in HeLa-Zellen kotransfiziert. Anschliessend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt und mit der Aktivität bei Transfektion mit dem Wildtyp-HNF4 $\alpha$  verglichen.

Zunächst wurde eine Sättigungskurve auf dem künstlichen, HNF4-abhängigen Reporter gen H4-tk-luc erstellt, dieses besitzt vier HNF4-Bindestellen vor dem Thymidinkinase-Promotor. Es wurden steigende Mengen Expressionsvektor mit einer gleichbleibenden Menge Reporter gen in HeLa-Zellen transfiziert und am nächsten Tag ein Luciferasenachweis durchgeführt. In Abbildung 2A ist gezeigt, dass bei steigender Menge transfizierten Expressionsvektor für die D69A-Mutante (unterbrochene Linie) die Aktivität des H4-tk-luc Reporter gens in gleichem Maße zunimmt wie bei Transfektion mit steigenden Mengen des HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Vektors. Um die Funktion der D69A-Mutante auch auf einem natürlichen Zielpromotor von HNF4 zu testen wurden verschiedene Promotoren mit HNF4-Bindestellen ausgesucht. Zuerst wurde eine Sättigungskurve auf dem humanen HNF1 $\alpha$ -Promotor hHNF1(-325/+138)lucII Reporter gen erstellt. Wie aus Abbildung 2B ersichtlich, zeigt die D69A-Mutante (unterbrochene Linie) auf dem hHNF1(-325/+138)lucII Reporter gen bei allen

untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-HNF4 $\alpha$  (durchgehende Linie). Auf dem *Xenopus* HNF1 $\alpha$ -Promotor-Reportergen xHNF1(-594/-207)lucI transaktiviert die D69A-Mutante bei einer Konzentration von 60 ng Expressionsvektor 2-fach bis 3-fach stärker als der Wildtyp (Abbildung 2C). Auf dem Ratten Apolipoprotein-AI Promotor-Reportergen rApoAI(-1000/+14)lucI, kann bei Transfektion des Wildtyps keine Aktivierung des Promotors beobachtet werden. Transfektion mit der D69A-Mutante aktiviert das Reportergen jedoch 3-fach (Abbildung 2D). Die D69A-Mutante transaktiviert auf einigen Promotoren also vergleichbar mit dem Wildtyp, auf anderen Promotoren zeigt sie jedoch eine erhöhte Aktivität.



**Abbildung 2:** Transaktivierungspotential von HNF4 $\alpha$ -Wildtyp und der D69A-Mutante auf verschiedenen Promotoren. **(A und B)** Sättigungskurve des Transaktivierungspotentials des HNF4 $\alpha$ -Wildtyps (durchgehende Linie) und der D69A-Mutante (unterbrochene Linie) auf dem künstlichen HNF4-Reportergen H4-tk-luc (A) und dem humanen HNF1 $\alpha$ -Reportergen hHNF1(-325/+138)lucII (B). Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität bezogen auf den Wert nach Transfektion mit leerem Expressionsvektor pOP13, bei unterschiedlicher Konzentration von HNF4-Expressionsvektor pOPmycHNF4 $\alpha$  und D69A-Expressionsvektor pOPmycD69A. Es wurden jeweils 2  $\mu$ g Reportergen und Expressionsvektor in Mengen von 15, 30, 60, 150 und 300 ng in HeLa-Zellen kotransfiziert, die DNA-Menge wurde mit leerem pOP13-Vektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an. **(C und D)** Transaktivierungspotential des Wildtyps (Wt) und der D69A-Mutante gemessen auf dem *Xenopus* HNF1 $\alpha$ -Reportergen xHNF1(-594/-207)lucI und dem Ratten Apolipoprotein-AI-Reportergen rApoAI(-1000/+14)lucI bei den angegebenen Mengen an transfiziertem Expressionsvektor. Transfiziert wurde jeweils mit 2  $\mu$ g Reportergen bei konstanter Menge Gesamt-DNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an.

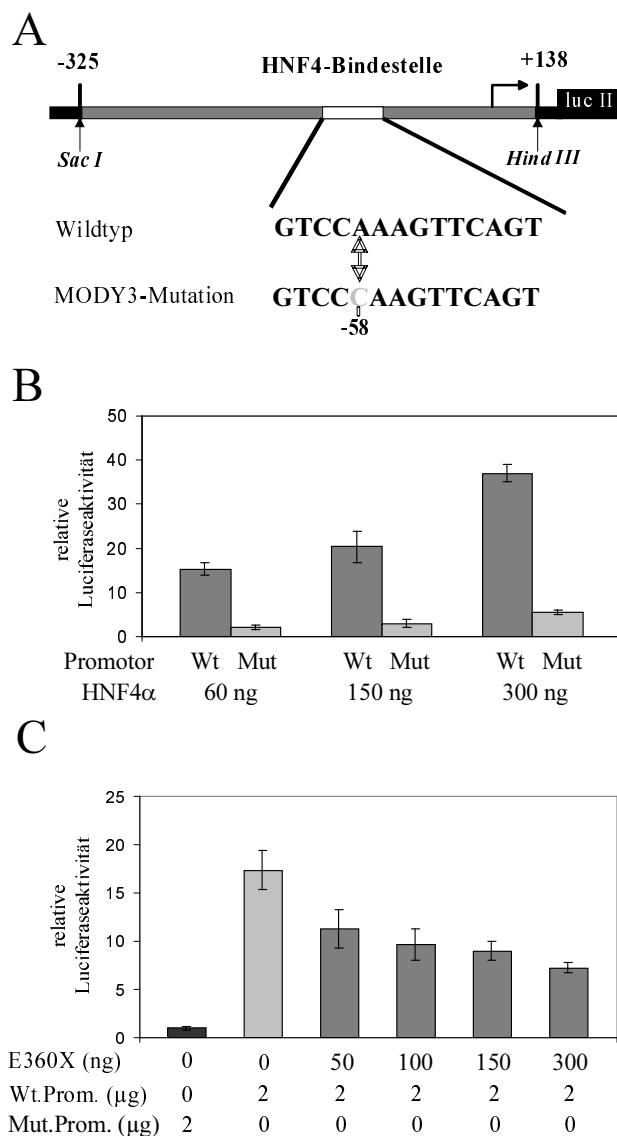
## **2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindungsstelle im HNF1 $\alpha$ -Promotor**

HNF4 $\alpha$  gilt als einer der wichtigsten Faktoren für die Expression des HNF1 $\alpha$ -Gens. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass eine Mutation in der putativen HNF4-Bindestelle im HNF1 $\alpha$ -Promotor MODY3 assoziiert ist. Es lag nahe, dass durch diese Mutation die Binfefähigkeit von HNF4 $\alpha$  an seine Bindestelle im HNF1 $\alpha$ -Promotor beeinflusst und dadurch die Expression des HNF1 $\alpha$ -Gens gestört wird. Dies würde für die Annahme sprechen, dass Mutationen im HNF4 $\alpha$ -Gen sich auf die Expression von HNF1 $\alpha$  auswirken und dadurch zum MODY1-Phänotyp beitragen.

### **2.1. Die MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 $\alpha$ -Promotors verringert die Transaktivierung durch HNF4 $\alpha$**

Um die Auswirkung der MODY3-assoziierten Mutation in der HNF4-Bindestelle des humanen HNF1 $\alpha$ -Promotors zu untersuchen, wurde die MODY3-Mutation in das Reporter-gen hHNF1(-325/+138)lucII eingeführt (Abbildung 3A). Für die Analyse des mutierten Promotors wurden jeweils 2  $\mu$ g des mutierten Reportergens mit verschiedenen Mengen Expressionsvektor für HNF4 $\alpha$  in HeLa-Zellen kotransfiziert und die Luciferaseaktivität mit dem Wildtyp verglichen. Dabei zeigte sich, dass der Luciferasewert nach Transfektion des mutierten HNF1 $\alpha$ -Promotors ohne Expressionsvektor um die Hälfte geringer war als der Wert des Wildtyp-Promotors (Daten nicht gezeigt). Da HeLa-Zellen kein HNF4 exprimieren, könnte diese Differenz von einem unbekanntem Faktor verursacht werden, der ebenfalls über die HNF4-Bindestelle aktivieren kann.

Wie aus Abbildung 3B ersichtlich, läßt sich der mutierte HNF1 $\alpha$ -Promotor durch transfiziertes HNF4 $\alpha$  im Vergleich zum Wildtyp kaum noch aktivieren. Dieser Effekt zeigt sich bei allen untersuchten Konzentrationen des Expressionsvektors. Selbst bei einer Konzentration, die für den Wildtyp sättigend ist (300 ng), läßt sich der mutierte Promotor nur um das Vierfache gegenüber mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten Zellen aktivieren, während sich der Wildtyp-Promotor bei sättigender Konzentration um das 35-fache aktivieren läßt.



**Abbildung 3:** (A) Schematische Darstellung des hHNF1(-325/+138)lucII-Konstruktes. Der Bereich der HNF4-Bindestelle und die MODY3-assoziierte Mutation an Position -58, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt, ist eingezeichnet.

(B) Vergleich der Transaktivierung des Wildtyps (Wt) des HNF1 $\alpha$ -Promotors mit dem gleichen Konstrukt, dass die MODY3-Mutation trägt (Mut). Es wurden jeweils 2  $\mu$ g Reportergen und die angegebenen Mengen pOPmycHNF4 $\alpha$  Expressionsvektor in HeLa-Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des entsprechenden Reportergens ohne Transfektion von Expressionsvektor.

(C) Die Aktivität des hHNF1(-325/+138)lucII Reportergens (Wt.Prom.) in INS-1-Zellen im Vergleich zum mutierten Reportergen hHNF1(-325/+138)mut (Mut.Prom.). Die angegebenen Mengen Expressionsvektor für die dominant-negative Mutante E360X und die Reportergene wurden in INS-1-Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität nach Transfektion mit mutiertem Reportergen. Bei allen Transfektionen wurde die Gesamtmenge DNA mit dem Leervektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

Um zu testen, ob die MODY3-assoziierte Mutation im Promotor von HNF1 $\alpha$  sich auch in  $\beta$ -Zellen auswirkt, wurden INS-1-Zellen als Modell gewählt. INS-1-Zellen sind  $\beta$ -Zellen der Ratte, die HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  und auch Insulin exprimieren (Wang et al., 1998).

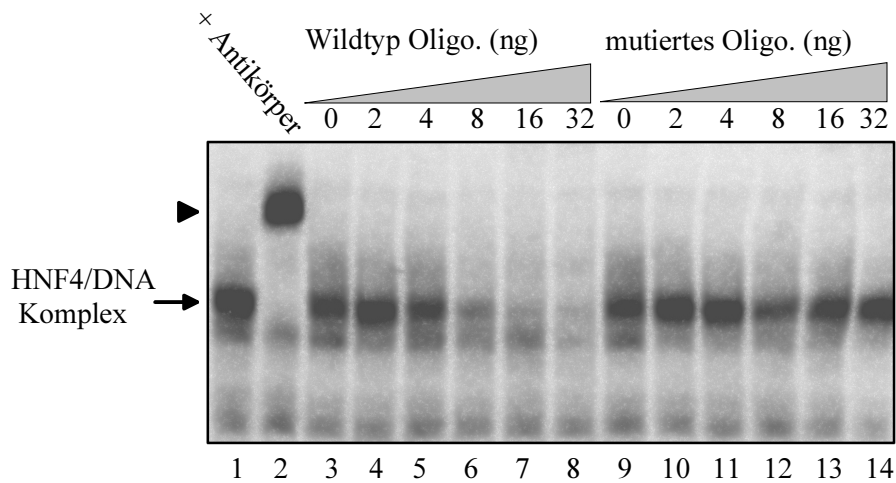
Um die Auswirkung der Mutation in der potentiellen HNF4 $\alpha$ -Bindestelle des HNF1 $\alpha$ -Promotors in INS-1-Zellen zu untersuchen, wurde das mutierte hHNF1(-325/+138)mut-Reportergen in diese Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität mit der Aktivität des Wildtyp-Promotors verglichen. Abbildung 3C zeigt, dass die Aktivität des hHNF1(-325/+138)lucII Promotors stark von der HNF4-Bindestelle abhängig ist. Der Promotor mit der MODY3-assoziierten Mutation ist um den Faktor 17 schwächer als der Wildtyp. In Abbildung 3C wird auch gezeigt, dass die Aktivierung des Wildtyp hHNF1(-325/+138)lucII zum grossen

Teil durch das endogene HNF4 der INS-1-Zellen bewirkt wird. Kotransfektion von 50 ng des Expressionsvektors für die dominant-negative Mutante (E360X), hemmt die Aktivität des Reportergens deutlich. Die Aktivität geht jedoch bei Kotransfektion mit steigenden Mengen der Mutante nicht stark zurück. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Faktoren über die HNF4-Bindestelle aktivieren, die sich nicht durch die dominant-negative Mutante hemmen lassen.

## **2.2. Der Funktionsverlust des Promotors lässt sich auf den Verlust der HNF4-Bindung durch die MODY3-assoziierte Mutation zurückführen.**

Da der mutierte HNF1 $\alpha$ -Promotor sich nicht mehr wie der Wildtyp durch HNF4 $\alpha$  transaktivieren lässt, lag es nahe, dass die Mutation die Bindung des HNF4 $\alpha$ -Proteins an den Promotor herabsetzt. Um den Verlust der HNF4 $\alpha$ -Bindung an den mutierten Promotor nachzuvollziehen wurde ein Gelretardationsassay durchgeführt. Dabei wurde ein Oligonukleotid eingesetzt, das den Bereich der Mutation umspannt. In Abbildung 4 ist die Bindung von HNF4 $\alpha$  aus Rattenleberkernextrakt an das radioaktiv markierte hHNF1Prom.-Oligonukleotid gezeigt (Spur 1). Der entstehende DNA/Proteinkomplex läßt sich mit dem gegen den N-Terminus von HNF4 $\alpha$  gerichteten Antikörper H4/55 weiter im Gel retardieren (Spur 2). Gibt man steigende Mengen unmarkiertes Oligonuklotid zum Reaktionsansatz, so verschwindet die markierte DNA/Protein-Bande mit zunehmender Konzentration (Spur 3-8). Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wird also durch unmarkiertes Oligonukleotid verdrängt. Wird das hHNF1Prom.mut.-Oligonukleotid, dass die Mutation trägt, in steigenden Mengen zum Reaktionsansatz gegeben (Spur 9-14), so verdrängt es das markierte Oligonukleotid nicht von HNF4 $\alpha$ . Dies weist die verringerte Affinität des HNF4 $\alpha$ -Proteins an die mutierte Bindestelle nach.

Zusammengefaßt zeigt sowohl die verringerte Induktion des HNF1 $\alpha$ -Promotors durch HNF4 $\alpha$  als auch die durch die Gelretardation nachgewiesene Verringerung der Affinität von HNF4 $\alpha$  für die mutierte Bindestelle, dass die MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle zu einem weitgehenden Funktionsverlust des Promotors führt.



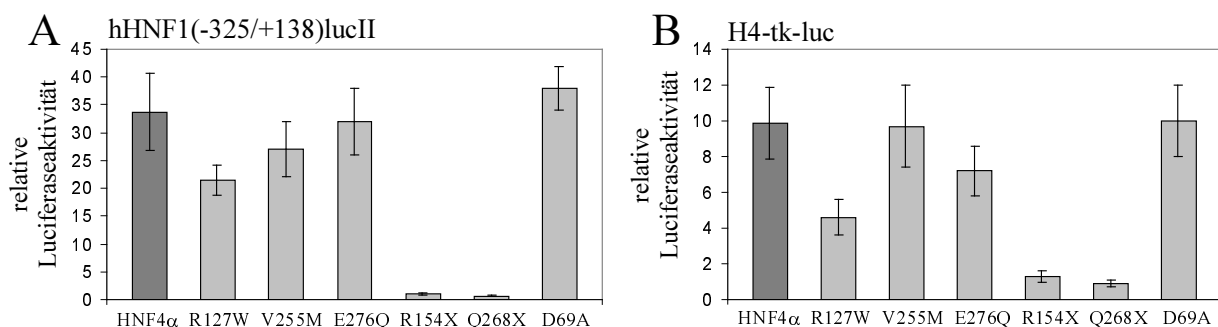
**Abbildung 4:** Gelretardationsanalyse der HNF4 $\alpha$ -Bindung an die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 $\alpha$ -Promotor im Vergleich zu der mutierten Bindestelle. Die Gelretardationsanalyse wurde mit 0,5  $\mu$ l Kernextrakt aus Rattenleber und dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hHNF1Prom. mit der Sequenz der HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 $\alpha$ -Promotor durchgeführt. Der im Gel zurückgehaltene HNF4/DNA-Komplex (Pfeil, Spur 1) wird durch den HNF4 $\alpha$  spezifischen Antikörper H4/55 weiter im Gel zurückgehalten (Pfeilspitze, Spur 2). Es wurden steigende Mengen unmarkiertes Wildtyp-Oligonukleotid hHNF1Prom. (Spur 3-8) beziehungsweise unmarkiertes mutiertes Oligonukleotid hHNF1Prom.mut. (Spur 9-14) zum Ansatz gegeben.

### 3. Die MODY1-Mutationen beeinflussen die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors

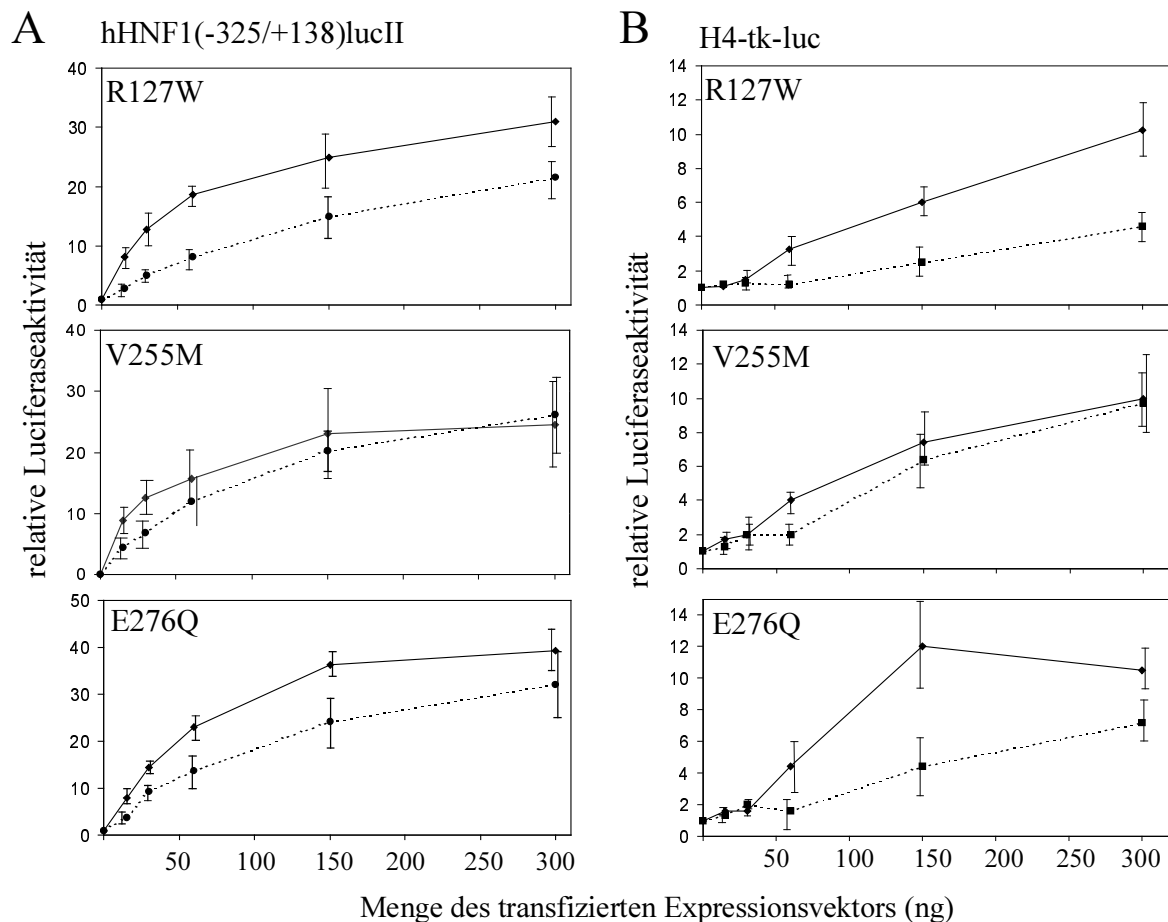
#### 3.1. Das Transaktivierungspotential der MODY1-Mutanten

Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten führen zu C-terminal verkürztem HNF4 $\alpha$ -Protein, dem ein Grossteil der E-Domäne fehlt. Die MODY1-assoziierten missense-Mutationen liegen alle in der E-Domäne und führen dort zu Aminosäureaustauschen. Da die E-Domäne von HNF4 $\alpha$  wichtig für die Transaktivierung ist, ist es naheliegend die mit MODY1-assoziierten Mutationen im HNF4 $\alpha$ -Gen mit einer Veränderung in der Transaktivierungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors in Verbindung zu bringen.

Um den Einfluß der MODY1-Mutationen auf die Transaktivierungsfähigkeit von HNF4 $\alpha$  zu testen, wurden die Mutationen zunächst in einen Expressionsvektor für HNF4 $\alpha$  (pOPmycHNF4 $\alpha$ ), eingebracht. Das Transaktivierungspotential der Mutanten wurde durch Kotransfektion der entsprechenden Expressionsvektoren mit HNF4-abhängigen Reportergenen in HeLa-Zellen getestet. Zunächst wurden die Expressionsvektoren in sättigender Menge transfiziert. In Abbildung 5A sind die Ergebnisse von Kotransfektionen der entsprechenden Vektoren mit dem hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen dargestellt, Abbildung 5B zeigt die Ergebnisse mit dem H4-tk-luc Reportergen.



**Abbildung 5:** Transaktivierungspotential von HNF4 $\alpha$  und seinen Mutanten bei der Transfektion einer sättigenden Menge der entsprechenden Expressionsvektoren (300 ng) in HeLa-Zellen. 2  $\mu$ g der Reportergene hHNF1(-325/+138)lucII (A) und H4-tk-luc (B) wurden mit 300 ng Expressionsvektor pOPmycHNF4 $\alpha$  für den Wildtyp-HNF4 $\alpha$  beziehungsweise der entsprechenden Mutante kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität bei Transfektion mit leerem pOP13-Expressionsvektor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Meßwerten an.



**Abbildung 6:** Sättigungskurven des Transaktivierungspotentials des HNF4 $\alpha$ -Wildtyps (durchgehende Linie) und der MODY1-assoziierten Mutanten (unterbrochene Linie) auf dem hHNF1(-325/+138)lucII (**A**) und dem H4-tk-luc Reporter gen (**B**). Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität bezogen auf den Wert nach Transfektion mit leerem Expressionsvektor pOP13 bei steigenden Mengen des HNF4 $\alpha$ -Expressionsvektors pOPmycHNF4 $\alpha$  und den entsprechenden Expressionsvektoren für die Mutanten. Es wurden jeweils 2  $\mu$ g Reporter gen und Expressionsvektor in Mengen von 15, 30, 60, 150, und 300 ng in HeLa-Zellen transfiziert. Die DNA-Menge wurde mit dem pOP13-Vektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an.

Mit beiden Reporter genen konnte gezeigt werden, daß die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X funktionell inaktiv sind. Die MODY1-assoziierten missense-Mutanten V255M und E276Q zeigen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-HNF4 $\alpha$ . Die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W ist jedoch auf beiden Reporter genen weniger aktiv als der Wildtyp.

Um geringfügigere Änderungen im Transaktivierungspotential feststellen zu können, wurden von den MODY1-assoziierten missense-Mutanten Sättigungskurven auf dem hHNF1(-325/+138)lucII (Abbildung 6A) und dem H4-tk-luc (Abbildung 6B) Reporter gen erstellt. Die



unterbrochenen Linien stehen für die jeweiligen Mutanten, die durchgezogenen Linien bilden den Wildtyp ab. Für die R127W-Mutante zeigt sich eine Verringerung der Transaktivierungsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp bei allen getesteten Konzentrationen des Expressionsvektors. Demgegenüber ist eine Verringerung der Transaktivierung der V255M-Mutante nur bei geringen Konzentrationen (60 ng) des Expressionsvektors und der E276Q-Mutante bei mittleren Konzentrationen (150 ng) festzustellen.

### **3.2. Die untersuchten MODY1-Mutanten sind nicht dominant-negativ**

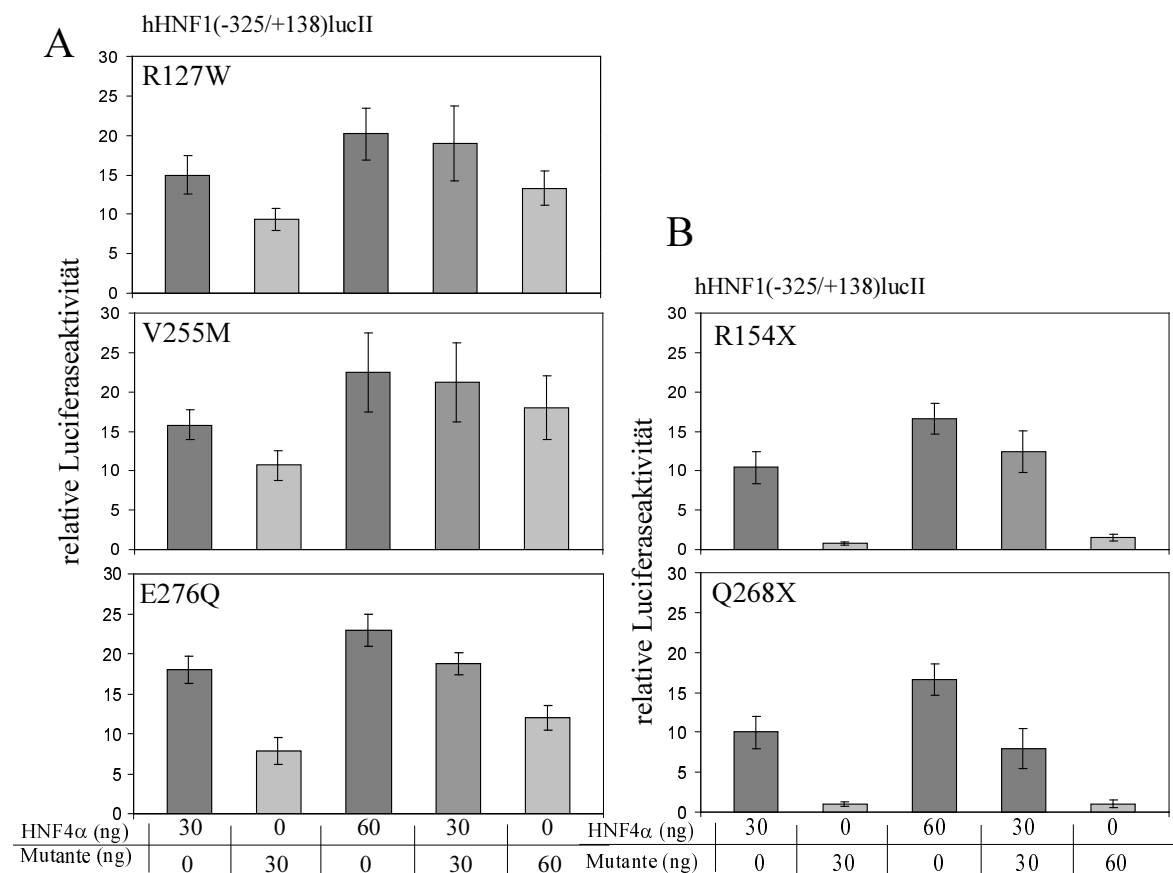
Da die MODY1-assoziierten Mutationen im Menschen heterozygot vorliegen, ist zu erwarten, dass sowohl das normale Allel als auch das mutierte Allel exprimiert wird. Behält das mutierte Protein seine Eigenschaft, Dimere zu bilden, so kann es durch Interaktion mit dem Wildtyp-Protein die Aktivität desselben hemmen. Dadurch sinkt die Gesamtaktivität des in der Zelle vorhandenen Faktors unter die Aktivität, die bei der Addition der Einzelaktivitäten von Wildtyp-Protein und mutiertem Protein zu erwarten wäre. Besonders Mutanten ohne eigene Aktivität können durch diese dominant-negative Wirkung für den weitgehenden Funktionsverlust des betroffenen Faktors in der Zelle sorgen.

Um zu testen, ob sich eine der MODY1-Mutanten dominant-negativ verhält, wurden je 30 ng Expressionsvektor für den Wildtyp-HNF4 $\alpha$  und die entsprechenden Mutanten gemischt und zusammen mit dem hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen in HeLa-Zellen transfiziert.

Da die MODY1 missense-Mutanten noch eigene Transkriptionsaktivität besitzen, ist bei Kotransfektion gleicher Mengen Expressionsvektor für Wildtyp und Mutante eine Aktivität zwischen Mutante und Wildtyp zu erwarten. Bei einem dominant-negativen Effekt ist die Gesamtaktivität von Wildtyp und Mutante zur Aktivität verschoben, die man bei Transfektion der gleichen Menge Mutante erhält. Abbildung 7A zeigt die Ergebnisse bei Mischung von 30 ng Wildtyp-Expressionsvektor mit 30 ng der MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, V255M oder E276Q. Die Gesamtaktivität von Wildtyp (30 ng) und Mutante (30 ng) liegt bei allen Mutanten zwischen dem Wert, wie er bei Transfektion der gleichen Menge Wildtyp (60 ng) beziehungsweise Mutante (60 ng) erreicht wird. Die Gesamtaktivität ist bei keiner der missense-Mutanten zum Wert der Mutante verschoben. Ein dominant-negativer Effekt konnte also nicht festgestellt werden.

Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X haben selbst kein Transaktivierungspotential und sind somit typische Kandidaten für dominant-negativ

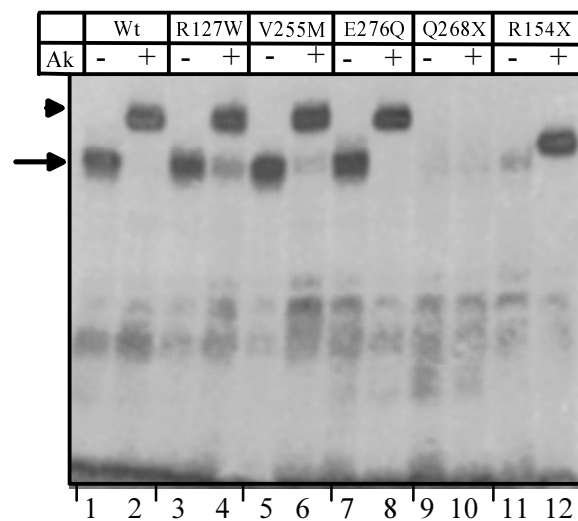
wirkende Proteine. Es wurden je 30 ng Wildtypvektor und 30 ng Mutante in HeLa-Zellen kotransfiziert. Verhält sich eine der Mutanten dominant-negativ, so ist die Gesamtaktivität zur Mutante verschoben. Im Fall dieser inaktiven Mutanten sollte die Gesamtaktivität also unter der Aktivität liegen, wie sie bei Transfektion von 30 ng Wildtyp erreicht wird. Abbildung 7B zeigt, dass bei Kotransfektion der R154X- oder Q268X-Mutante mit dem Wildtyp, die Gesamtaktivität nicht unter die Aktivität des Wildtyps sinkt. Auch bei Transfektion von dreifachem Überschuß an Mutante sinkt die Gesamtaktivität nicht unter die des Wildtyps bei Transfektion von 30 ng Expressionsvektor (Daten nicht gezeigt). Unter den gewählten Bedingungen zeigte also keine der analysierten MODY1-assoziierten Mutanten einen dominant-negativen Effekt.



**Abbildung 7:** Transaktivierungspotential von Wildtyp- und Mutanten-HNF4α auf dem humanen HNF1α-Promotor hHNF1(-325/+138)lucII. **(A)** Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp-HNF4α (pOPmycHNF4α) mit dem Expressionsvektor für die MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, V255M und E276Q. **(B)** Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp-HNF4α und den MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X. 2 µg Reportergen wurden zusammen mit den angegebenen Mengen Expressionsvektor in HeLa-Zellen transfiziert, die DNA-Menge wurde durch Zugabe von pOP13-Vektor konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität nach Transfektion mit dem Leervektor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

### 3.3. Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten zeigen eine verringerte DNA-Bindung

Die Fähigkeit, spezifische Bindestellen in regulatorischen Elementen von Genen zu besetzen, ist Voraussetzung für die Eigenschaft von HNF4 $\alpha$ , die Transkription zu beeinflussen. Eine Veränderung der DNA-Bindefähigkeit kann ein Grund sein, warum Mutationen in HNF4 $\alpha$  sich negativ auf die Transaktivierungsfähigkeit auswirken. Um festzustellen, ob die MODY1-assoziierten Mutanten noch die Fähigkeit haben, DNA zu binden, wurden HEK293-Zellen mit Expressionsvektoren für den myc-getaggten HNF4 $\alpha$ -Wildtyp beziehungsweise den MODY1-assoziierten Mutanten transfiziert und zwei Tage später Kernextrakte aus diesen Zellen hergestellt. Die HEK293-Zellen exprimieren weder HNF4 $\alpha$  noch HNF1 $\alpha$ , aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit sind sie besonders zur Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten Zellen geeignet. Die Kernextrakte wurden einem Gelretardationsassay unterzogen.



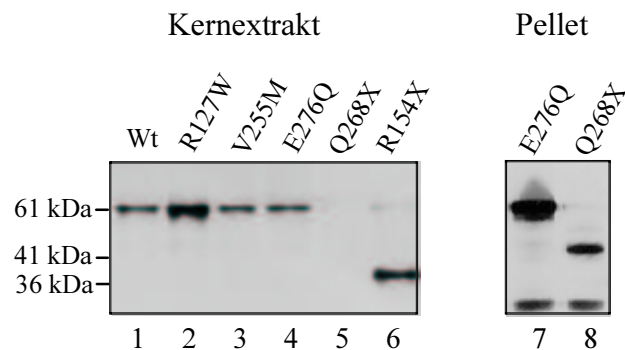
**Abbildung 8:** Gelretardationsanalyse mit Kernextrakten aus transfizierten HEK293-Zellen. 24 Stunden nach Transfektion mit den entsprechenden Vektoren wurden die Kernextrakte hergestellt. Es wurden 2  $\mu$ g Gesamtprotein der Kernextrakte und das H4-Oligonukleotid für die Gelretardation eingesetzt. Der im Gel zurückgehaltene DNA/Protein-Komplex ist durch einen Pfeil markiert. Die durch den HNF4 $\alpha$ -spezifischen monoklonalen Antikörper H4/55 weiter im Gel zurückgehaltenen Komplexe, sind durch eine Pfeilspitze markiert.

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse des Gelretardationsassays. In Spur 1 ist eine retardierte Bande zu sehen, sie besteht aus HNF4 $\alpha$ -Protein, das an das radioaktiv markierte H4-Oligonukleotid gebunden hat. Die Spezifität dieser Bindung wird durch Zugabe des HNF4 $\alpha$ -spezifischen monoklonalen Antikörpers H4/55 gezeigt. Dieser Antikörper bindet an den DNA/Protein-Komplex und retardiert ihn weiter im Gel (Spur 2).

In Gelretardationsassays mit Kernextrakten aus Zellen, die mit der R127W-Mutante transfiziert wurden (Spur 3 u. 4) zeigt sich eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bindung. Entsprechende Ergebnisse liefern Gelretardationen mit der V255M-Mutante (Spur 5 und 6) und der E276Q-Mutante (Spur 7 und 8). In Gelretardationen mit Kernextrakten von Q268X-transfizierten Zellen (Spur 9 und 10) kann keine Bindung des Proteins an das Oligonukleotid

nachgewiesen werden. Die R154X-Mutante zeigt zunächst eine schwache DNA-Bindung (Spur 11), nach Zugabe des Antikörpers bildet sich jedoch ein deutlicher DNA/Protein-Komplex (Spur 12). Dies weist auf eine schwache DNA-Bindung des R154X-Proteins hin, die durch die Bindung des Antikörpers verstärkt wird.

In Abbildung 9 ist eine Immunoblotanalyse, der für die Gelretardationen eingesetzten Kernextrakte gezeigt. Wildtyp-HNF4 $\alpha$  und die MODY1-assoziierten missense-Mutanten (Spur 1-4), sowie die nonsense-Mutante R154X (Spur 6) sind deutlich im Kernextrakt nachweisbar. Das Q268X-Protein fehlt im Kernextrakt (Spur 5). Die fehlende DNA-Bindung der Q268X-Mutante im Gelretardationsassay ist somit auf das Fehlen des Proteins im Kernextrakt zurückzuführen. Bei der Herstellung von Kernextrakten werden im letzten Schritt lösliche Kernproteine vom unlöslichen Chromatinpellet getrennt. Eine Immunoblotanalyse dieses Pellets mit dem myc-tag spezifischen Antikörper 9E10 ergab, dass sowohl Wildtyp-HNF4 $\alpha$  als auch die missense Mutanten R127W, V255M, E276Q und die nonsense-Mutante R154X im Pellet nachweisbar sind (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Kernextrakt ist jedoch auch das Q268X-Protein im Pellet nachweisbar (Spur 8), dies weist auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation des Q268X-Proteins hin.



**Abbildung 9:** Immunoblotanalyse, der für den Gelretardationsassay eingesetzten Kernextrakte. Die Kernextrakte aus HEK293-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit den entsprechenden Vektoren hergestellt. Es wurden 5  $\mu$ g Gesamtprotein des Kernextrakts beziehungsweise 10  $\mu$ l der Pelletfraktion eingesetzt. Als Erstantikörper dient der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen dem Wildtyp und den MODY1 missense-Mutanten im Gelretardationsassay kein Unterschied bezüglich der DNA-Bindefähigkeit gefunden wurde. Die Q268X-Mutante war im Kernextrakt nicht zu detektieren und konnte daher nicht im Bandshift binden. Die R154X-Mutante zeigt in der Gelretardation ein deutlich verringertes DNA-Bindevermögen.

### 3.4. Subzelluläre Lokalisation der Mutanten

Eine Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle kann die Ursache für eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors sein. Durch Mutationen im HNF4 $\alpha$  könnte die Lokalisation innerhalb der Zelle verschoben sein, so dass weniger HNF4 $\alpha$  für die Transaktivierung von Genen im Kern zur Verfügung steht.

Um dies zu überprüfen, wurde mit Hilfe des myc-tag-spezifischen Antikörpers 9E10 eine Immunfluoreszenzanalyse in transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass transfiziertes Wildtyp-HNF4 $\alpha$  ausschliesslich im Kern nachweisbar ist. Auch die MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, E276Q sowie die V255M-Mutante sind ausschliesslich im Kern nachweisbar. Die MODY1-assoziierte nonsense-Mutante R154X konnte zunächst nicht nachgewiesen werden. Durch den Austausch von Methanol durch Paraformaldehyd zur Fixierung der Zellen, konnte die R154X-Mutante jedoch deutlich im Kern lokalisiert werden. Für die Q268X-Mutante ist ebenfalls kein Signal in der Immunfluoreszenz detektierbar, eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurde jedoch nicht durchgeführt. Die Immunoblotanalyse (Abbildung 9) zeigt, dass die Q268X-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp ausschliesslich in der unlöslichen Fraktion eines Kernextraktes vorhanden ist. Daher ist anzunehmen, dass das Q268X-Protein andere physikalische Eigenschaften, wie Löslichkeit, als der Wildtyp besitzt.