

## **4. HNF4 $\alpha$ hemmt die Vermehrung von Zellen**

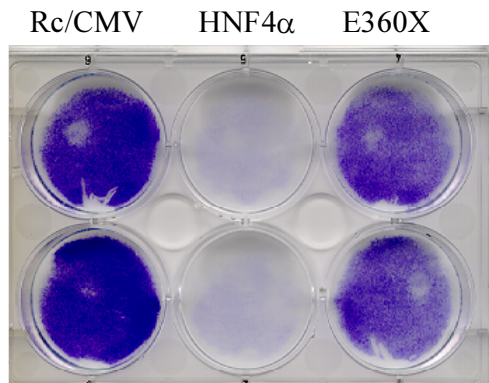
Da Menschen, die eine MODY1-Mutation tragen nicht schon bei der Geburt erkrankt sind, muss ein Faktor mit der Zeit immer wichtiger werden, bis die Erkrankung ausbricht.  $\beta$ -Zellen sind einem ständigem Austausch von Zellen unterlegen, dabei sterben  $\beta$ -Zellen durch Apoptose und werden durch Neubildung von  $\beta$ -Zellen ersetzt (Finegood et al., 1995). Eine Störung dieser Neogenese von Zellen durch MODY1-Mutationen könnte mit der Zeit zu einer Verringerung der  $\beta$ -Zell-Population führen. Daher sollte ein Einfluss von HNF4 $\alpha$  auf die Vermehrung von  $\beta$ -Zellen untersucht werden und mit MODY1-Mutanten verglichen werden. Die Mutation D69A aus den HepG2-Zellen wurde in die Untersuchungen einbezogen, da sie möglicherweise tumorassoziiert ist und veränderte Eigenschaften besitzen könnte.

### **4.1. Die Überexpression von HNF4 $\alpha$ hemmt das Aufwachsen stabiler**

#### **Klone in INS-1-Zellen**

Um einen Einfluss von HNF4 $\alpha$  auf die Vermehrung von  $\beta$ -Zellen zu untersuchen, wurde eine  $\beta$ -Zelllinie ausgewählt. Da keine  $\beta$ -Zelllinie des Menschen zur Verfügung stand, wurde auf INS-1-Zellen, eine  $\beta$ -Zelllinie der Ratte, zurückgegriffen. Diese Zellen exprimieren sowohl HNF4 $\alpha$  als auch HNF1 $\alpha$ . Ausserdem synthetisieren sie Insulin und können daher als Model für differenzierte  $\beta$ -Zellen dienen. Um einen ersten Hinweis auf einen Einfluss von HNF4 $\alpha$  auf die Zellvermehrung zu bekommen, wurde untersucht, ob HNF4 $\alpha$  das Aufwachsen von stabilen INS-1-Zellklonen stört. Bei dem verwendeten Nachweis wird ein Expressionsvektor für das zu testende Protein in die Zellen transfiziert. Auf dem eingesetzten Plasmid ist gleichzeitig ein Resistenzgen für das Antibiotikum G418 vorhanden. In einer Anzahl von transfizierten Zellen kommt es während der Antibiotikabehandlung zum stabilen Einbau des transfizierten Vektors. Diese Zellen sind dann antibiotikaresistent und können unter Antibiotikaselektion wachsen. Zu einem grossen Anteil exprimieren sie auch das Protein, dessen offener Leserahmen in den Vektor eingebracht wurde. Stört dieses Protein das Zellwachstum, so werden weniger resistente Kolonien aufwachsen als bei der Transfektion mit einem Kontrollvektor. Die Zellen wurden nach Transfektion und Selektion durch Färbung

mit Methylenblau sichtbar gemacht. Die Stärke der Blaufärbung lässt auf die Anzahl der aufgewachsenen Zellen schliessen.



**Abbildung 10:** HNF4 $\alpha$  inhibiert die Bildung von Kolonien in INS-1 Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse bei Transfektion mit dem Rc/CMV Leervektor, Rc/CMVmycHNF4 $\alpha$  und Rc/CMVmycE360X in Doppelbestimmung. Die INS-1-Zellen wurden mit 2  $\mu$ g Expressionsvektor pro 6-well-Schale transfiziert und nach 14 Tagen G418-Selektion (450  $\mu$ g/ml) mit Methylenblau angefärbt.

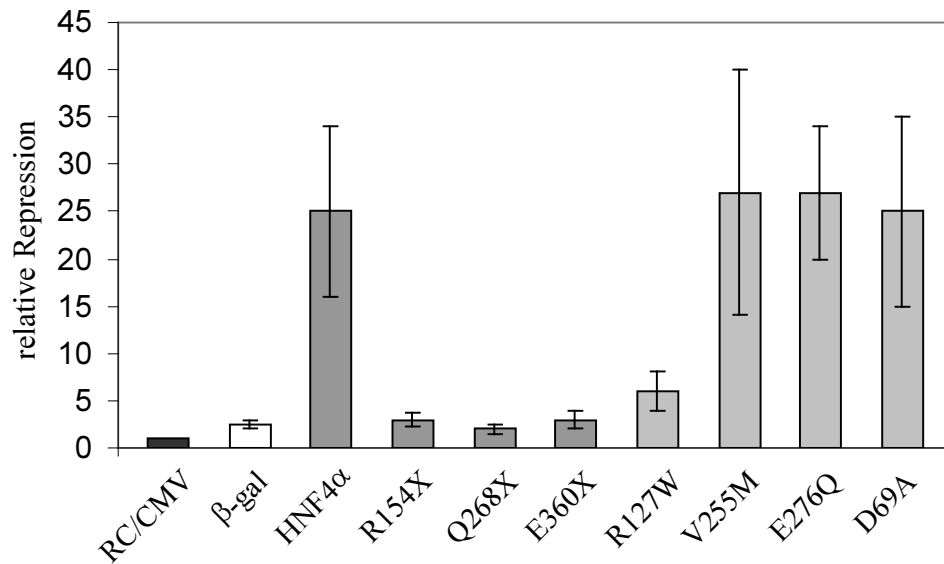
In Abbildung 10 ist gezeigt, dass Transfektion mit Expressionsvektor für HNF4 $\alpha$  das Aufwachsen von resistenten Kolonien stark inhibiert. Zum Vergleich wuchsen nach Transfektion mit dem leeren Rc/CMV Vektor eine grosse Anzahl von Kolonien auf. Die mit Expressionsvektor für die dominant-negative Mutante E360X (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997) transfizierten Zellen zeigten gegenüber dem Rc/CMV-Vektor ein leicht reduziertes, aber signifikantes Aufwachsen der Kolonien.

#### **4.2. Einige MODY1-assoziierte Mutanten reprimieren das Aufwachsen von Zellen nicht wie der Wildtyp**

Um den Einfluss von HNF4 $\alpha$  auf das Aufwachsen von Kolonien zu quantifizieren und ihn mit Mutanten von HNF4 $\alpha$  vergleichen zu können, wurde die Zellzahl nach G418-Selektion bestimmt. Eine Stichprobe ergab, dass die dadurch ermittelten Werte den Ergebnissen bei dem Auszählen der Klone entsprechen (Daten nicht gezeigt). Die INS-1-Zellen wurden mit Expressionsvektor für den HNF4 $\alpha$ -Wildtyp beziehungsweise die Mutanten transfiziert.

Die ermittelten Zellzahlen wurden auf den Wert bei Transfektion mit dem Rc/CMV-Leervektor bezogen und als relative Repression angegeben. Abbildung 11 zeigt die starke Repression der Zellvermehrung durch HNF4 $\alpha$ . Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X sowie die E360X-Mutante, reprimieren das Aufwachsen der Zellen nur in dem Maße eines Vektors, der das LacZ-Gen exprimiert ( $\beta$ -gal). Die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W verringert die Zellzahl nicht so stark wie der Wildtyp, die Repression ist hier 3-mal schwächer als beim Wildtyp-HNF4 $\alpha$ . Die MODY1-assoziierten missense-Mutanten E276Q und V255M verursachen die gleiche Reprimierung der

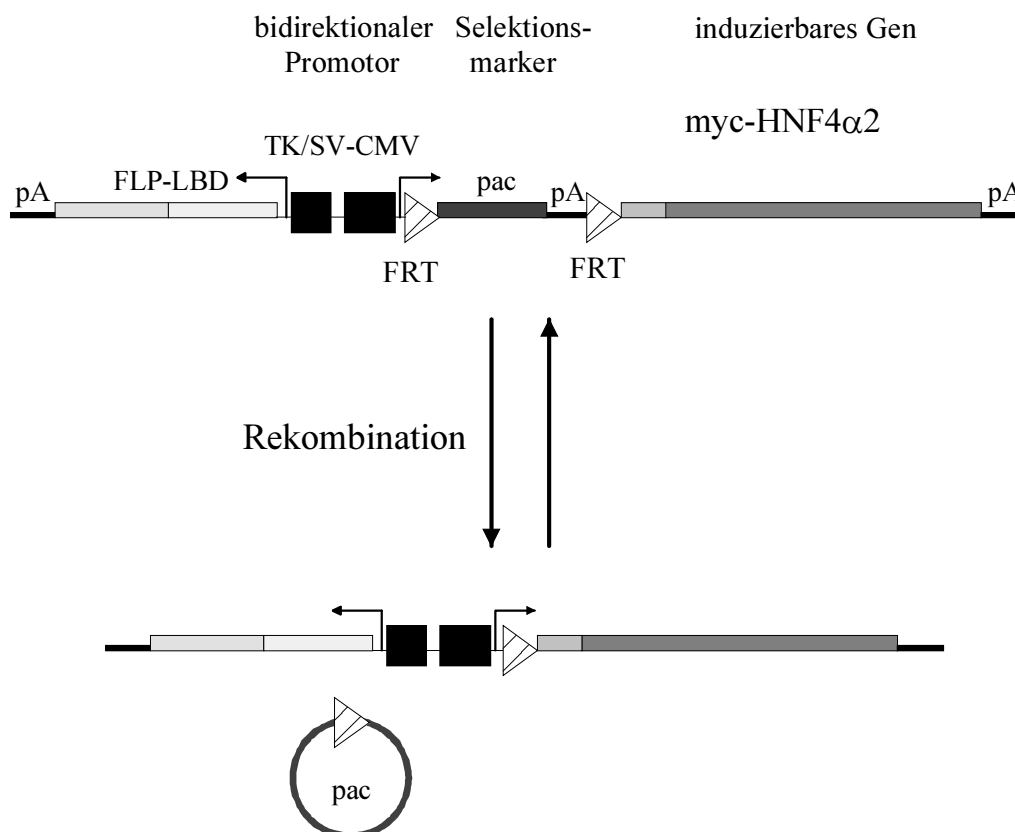
Zellvermehrung wie der Wildtyp und auch die D69A-Mutante aus den HepG2-Zellen zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp.



**Abbildung 11:** Repression des Aufwachsens von INS-1-Zellen nach Transfektion mit Rc/CMVmycHNF4 $\alpha$ . Nach Transfektion von 100,000 Zellen pro 24-well-Schale mit 600 ng der entsprechenden Expressionsvektoren und Selektion mit G418 (450  $\mu$ g/ml) für 14 Tage, wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Alle Expressionsvektoren basieren auf dem Rc/CMV-Vektor. Die Ergebnisse sind als relative Repression angegeben. Dazu wurde die Zellzahl mit dem leeren Rc/CMV-Vektor durch die Zellzahl der entsprechenden Vektoren dividiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

### 4.3. Herstellung stabiler induzierbarer Klone

Um die Rolle von HNF4 $\alpha$  in der Zellvermehrung detaillierter zu untersuchen, wurden Zellklone etabliert, die HNF4 $\alpha$  stabil überexprimieren. Der Einfluss von HNF4 $\alpha$  auf die Zellvermehrung kann während der Etablierung stabiler Klone zu einem Selektionsdruck führen. Infolgedessen entstünden nur Klone, die entweder das HNF4 $\alpha$  nicht exprimieren oder in denen der Mechanismus über den HNF4 $\alpha$  auf die Zellvermehrung wirkt gestört wäre. Um diesen Selektionsdruck zu umgehen, wurde ein System der Induktion durch Rekombination nach Angrand (Angrand et al., 1998) angewendet (Abbildung 12). Dieses System benutzt eine konstitutiv exprimierte FLP-Rekombinase, die an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Östrogenrezeptors fusioniert ist (FLP-LBD). Die Ligandenbindungsdomäne ist mutiert, so dass sie nur durch künstliche Liganden wie das Antiöstrogen Tamoxifen aktiviert wird. Nach Aktivierung leitet sie einen Rekombinationsprozess ein, der ein bisher nicht aktives Gen vor den bidirektionalen Promotor bringt und somit die Expression des Gens erlaubt



**Abbildung 12:** Das Expressionssystem zur Herstellung stabiler induzierbarer HNF4 $\alpha$ -Klone.

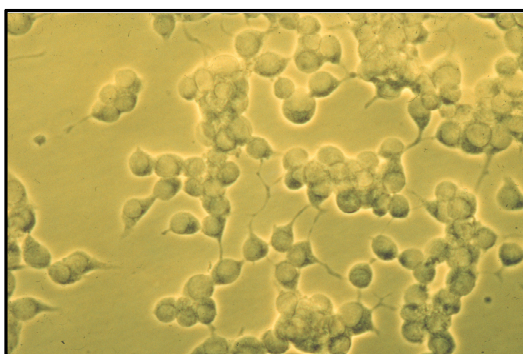
pA: Polyadenylierungssignal, FLP-LBD: FLP-Rekombinase an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, TK/SV-CMV: bidirektionaler Promotor, FRT: Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase, pac: Puromycinresistenzgen

#### 4.4. HNF4 $\alpha$ ist in stabilen INS-1-Klonen induzierbar

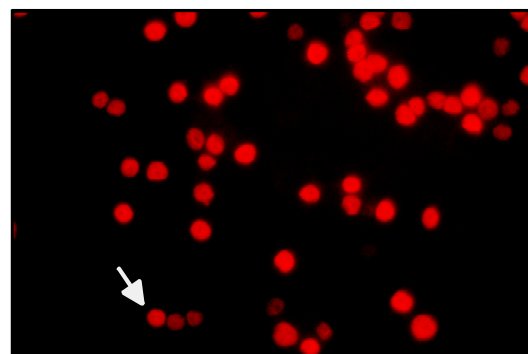
Es wurden sowohl HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klone hergestellt als auch Klone verschiedener Mutanten. Dazu zählte die MODY1 nonsense-Mutante R154X und die missense-Mutante R127W. Zudem wurde die dominant-negative Mutante E360X und die D69A-Mutante aus den HepG2-Zellen stabil in INS-1-Zellen eingeführt. Als Kontrollklone wurden zusätzlich Klone etabliert, die das LacZ-Gen induzierbar exprimieren.

Da alle HNF4 $\alpha$ -Proteine mit einem myc-tag versehen wurden, konnten die stabilen INS-1-Klone mit Hilfe des myc-tag-spezifischen Antikörpers 9E10 durch Immunfluoreszenz und Immunoblotting auf die Expression der Proteine untersucht werden. Mit Hilfe des 9E10 Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten Zweitantikörpers wurden die Klone zunächst in der Immunfluoreszenzanalyse auf die induzierbare Expression des Transgens getestet. Dabei zeigte sich, dass nur in etwa 10% aller antibiotikaresistenten Klone das Transgen induzierbar war.

Die Immunfluoreszenzanalyse eröffnete die Möglichkeit, die Expression der transgenen Proteine auf Einzelzellniveau zu untersuchen und ergab, dass nicht alle Zellen in den induzierten Klonen ein positives Signal zeigen. In vielen Klonen waren unter 10% aller Zellen Cy3-positiv. Nur in etwa 10% der Klone war die Mehrzahl der Zellen Cy3-positiv. Die Klone mit der grössten Anzahl induzierter Zellen wurden für die weiteren Analysen ausgewählt. Im nicht-induzierten Zustand sind nur einzelne Zellen Cy3-positiv. Abbildung 13 zeigt einen induzierten stabilen Klon, der in etwa 40% aller Zellen ein positives Cy3-Signal in der Immunfluoreszenz aufweist.



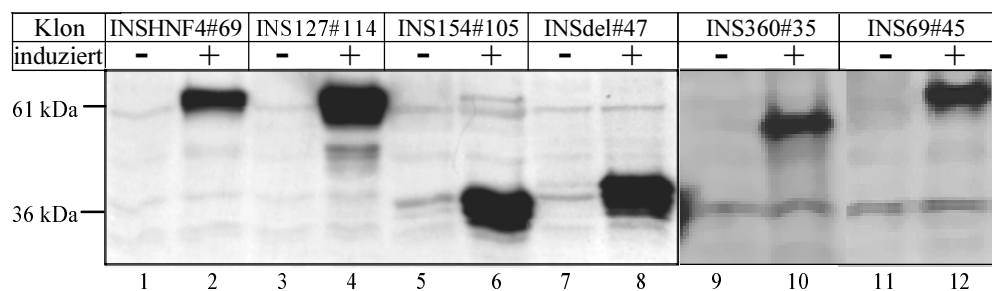
Durchlicht



Cy3-Fluoreszenz

**Abbildung 13:** Immunfluoreszenzanalyse eines stabilen induzierbaren INS-1-Klones. Die Zellen wurden ausgesät und zwei Tage mit Tamoxifen (100 nM) behandelt, danach wurden sie der Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Ein Beispiel für Zellen, die das Transgen nach der Induktion exprimieren, ist mit einem Pfeil markiert.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob in den induzierten Klonen intakte Proteine mit der erwarteten Grösse gebildet werden. Dazu wurde von den ausgewählten Klonen eine Immunoblotanalyse durchgeführt. In Abbildung 14 ist für jeden hergestellten Klontyp ein Klon in der Immunoblotanalyse dargestellt. Der HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klon INSHNF4#69 (Spur 1-2) exprimiert nach Induktion ein Protein mit der erwarteten Grösse. Der INS-127#114-Klon (Spur 3-4) exprimiert nach Induktion die MODY1 missense-Mutante R127W, das Protein läuft im Gel auf der gleichen Höhe wie der Wildtyp. Der MODY1 nonsense-Klon INS154#105 exprimiert nach Induktion das verkürzte Protein der R154X-Mutante (Spur 5-6). Der INSdel#47-Klon (Spur 7-8) ist während der Etablierung von HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klonen entstanden, er exprimiert nach Induktion ein verkürztes Protein, welches etwas grösser als das R154X-Protein ist. Der INS360#35-Klon (9-10) exprimiert wie erwartet ein verkürztes Protein. Der INS69#45-Klon (Spur 11-12) exprimiert das Protein der D69A-Mutante nach Induktion, das in der gleichen Höhe wie der Wildtyp läuft.

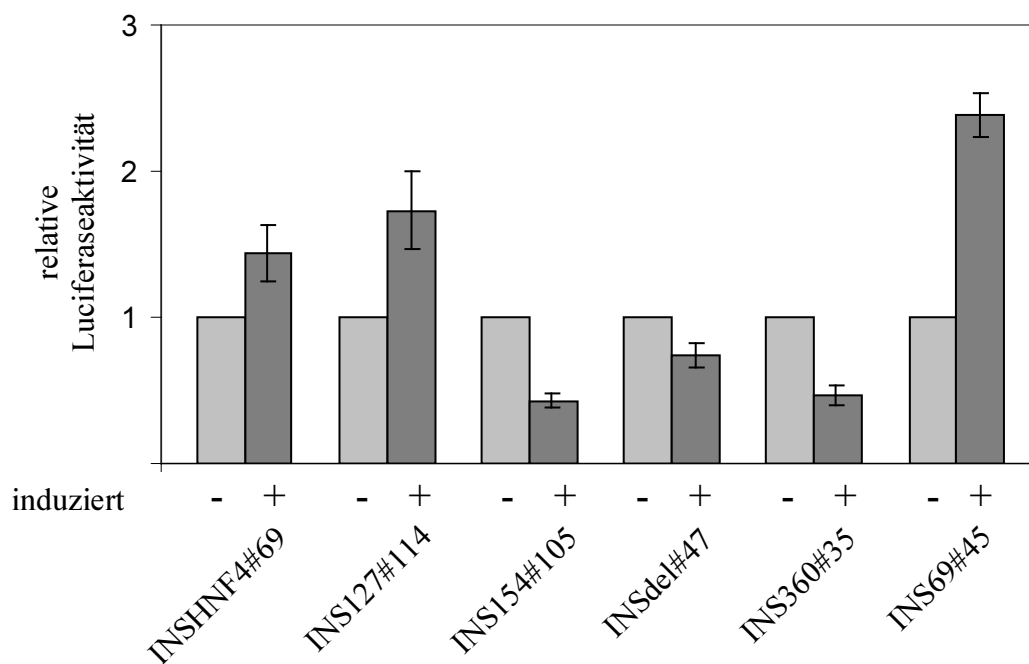


**Abbildung 14:** Immunoblotanalyse stabiler induzierbarer INS-1-Klone. Die Proteinextrakte wurden entweder von Ethanol-behandelten (-) oder von Tamoxifen-behandelten Klonen (+) hergestellt. Die INS-1-Klone INSHNF4#69, INS127#114, INS154#105, INSdel#47, INS360#35 und INS69#45 wurden durch Transfektion der beschriebenen Expressionsvektoren hergestellt, in denen die entsprechenden Leserahmen für die verschiedenen HNF4 $\alpha$ -Derivate kloniert worden waren. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Gesamtprotein für die Analyse eingesetzt, dabei wurde der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10 als Erstantikörper und ein Peroxidasegekoppelter Antikörper als Zweitantikörper verwendet. Die Spuren 1-8 und 9-12 stammen aus jeweils einem Blot. Die Expressionsstärke kann hier also nur zwischen Klonen des gleichen Blots verglichen werden.

Zur Überprüfung der Funktion der induzierten HNF4 $\alpha$ -Proteine wurde das HNF4 abhängige Reporter-gen hHNF(-325/+138)lucII in induzierte und nicht-induzierte Klone transfiziert und ein Luciferaseassay durchgeführt. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass in dem induzierten Wildtyp-Klon INSHNF4#69, dem R127W-Klon INS127#114 und auch in dem D69A-Klon INS69#45 die Aktivität der Luciferase gegenüber dem nicht-induzierten Klon erhöht ist.

Dagegen ist in dem induzierten R154X-Klon INS154#105, dem INSdel#47-Klon und dem E360X-Klon INS360#35 die Aktivität nach Induktion des Transgens erniedrigt.

Im HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klon, im R127W-Klon und im D69A-Klon transaktivieren die entsprechenden Proteine also das Reporterogen. Während das R154X-Protein einen ähnlich starken negativen Effekt auf die Transaktivierung hat wie der Klon der dominant-negativen E360X-Mutante. Das Protein des INSdel#47-Klones hemmt ebenfalls die Aktivität des Reportergens. Dies deutet auf eine Störung der Transaktivierung des endogenen HNF4 $\alpha$ -Proteins der INS-1-Zellen hin. Die Änderung der Transaktivierung ist bei den Klonen gering. Dies könnte auf eine Sättigung der Zellen mit endogenem HNF4 hindeuten.



**Abbildung 15:** Transaktivierungspotential von HNF4 $\alpha$  und seiner Mutanten nach Induktion mit Tamoxifen in stabilen induzierten Klonen. Das Transaktivierungspotential wurde durch einen Luciferaseassay nach Transfektion von 2  $\mu$ g des Reportergens hHNF1(-325/+138)lucII in nicht-induzierte und induzierte Klone bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Division der Aktivität des induzierten Klones durch die entsprechenden Aktivität des nicht induzierten Klones bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

#### 4.5. Induzierte HNF4 $\alpha$ -INS-1-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung

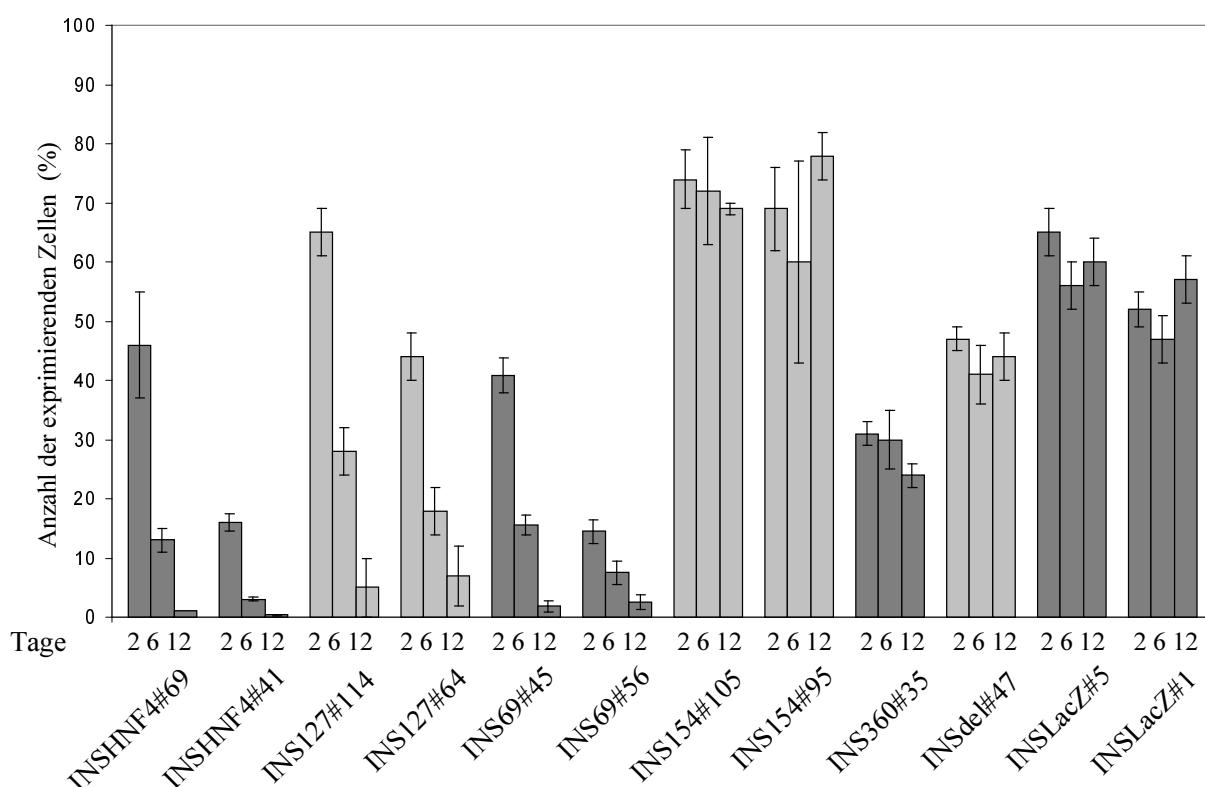
Die etablierten INS-1-stabilen Klone exprimieren das Transgen nach Induktion nur in einem Teil der Zellen. Dadurch ist es möglich, in einem einzelnen Klon zu untersuchen, ob die Zellen mit HNF4 $\alpha$ -Überexpression einen Nachteil gegenüber den Zellen haben, die das Transgen nicht exprimieren. Bei einem Nachteil in der Zellvermehrung sollte der Anteil der HNF4 $\alpha$ -positiven Zellen in dem induzierten Klon mit der Zeit abnehmen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Anteil das Transgen exprimierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion bestimmt.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieses Experiments angegeben. Der Anteil der das Transgen exprimierenden Zellen wurde durch Zählen der Cy3-positiven Zellen nach 2, 6 und zwölf Tagen ermittelt. Die HNF4 $\alpha$ -überexprimierenden Klone (INSHNF4#69, INSHNF4#41) zeigen eine deutliche Reduktion des Anteils exprimierender Zellen während der zwölf Tage. Im INSHNF4#69 Klon sind zwei Tage nach Induktion 50% aller Zellen Cy3-positiv, am sechsten Tag nur noch etwa 12% und am zwölften Tag sind kaum noch Cy3-positive Zellen vorhanden. In Klonen der R127W-Mutante (INS127#114, INS127#64), ist ebenfalls eine Reduktion des Anteils exprimierender Zellen während der Untersuchungsdauer zu beobachten, am zwölften Tag sind im Vergleich zu den HNF4 $\alpha$ -Klonen jedoch noch tendenziell mehr exprimierende Zellen übrig. In Klonen der D69A-Mutante (INS69#45, INS69#56) verringert sich der Anteil exprimierender Zellen vergleichbar mit den HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klonen.

Bei den R154X-Klonen (INS154#105, INS154#95) bleibt der Anteil der exprimierenden Zellen während der zwölf Tage stabil. Auch in dem INS360#35- und dem INSdel#47-Klon, ändert sich der Anteil exprimierender Zellen nicht. Klone, die das LacZ-Gen exprimieren (INSLacZ#5, INSLacZ#1), weisen ebenfalls eine stabile Expression des Transgens über den Zeitraum von zwölf Tagen auf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Anteil exprimierender Zellen mit der Zeit in HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-Klonen, sowie in Klonen, die die R127W- oder die D69A-Mutante exprimieren abnimmt. In Klonen welche verkürzte HNF4 $\alpha$ -Proteine exprimieren bleibt die Expression während der Zeit stabil. Auch in LacZ-Klonen, die die funktionell mit dem HNF4 nicht verwandte  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, ändert sich der Anteil der exprimierenden Zellen nicht. Die Abnahme ist also spezifisch für funktionell aktives, volllängen-HNF4 $\alpha$ .





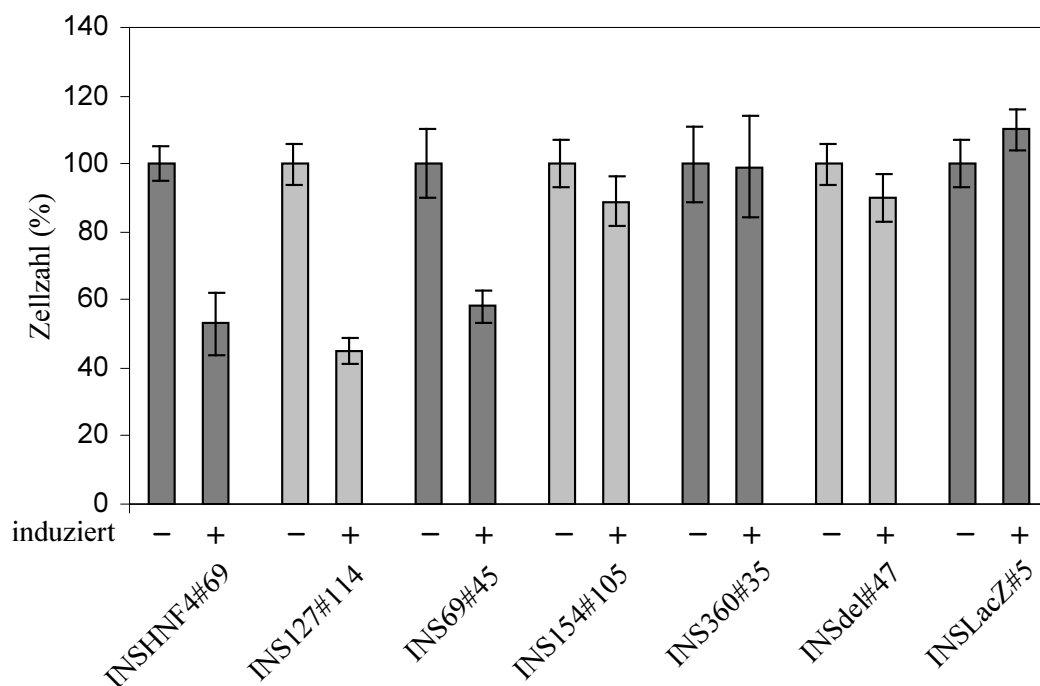
**Abbildung 16:** Die Anzahl der mycHNF4 $\alpha$  exprimierenden Zellen nimmt in induzierten INS-1-Klonen mit der Zeit ab. Stabile INS-1-Klone des HNF4 $\alpha$ -Wildtyps (INSHNF4#69 und INSHNF4#41), der R127W-Mutante (INS127#114 und INS127#64), R154X-Mutante (INS154#105 und INS154#95) und der E360X-Mutante (INS360#35) sowie der INSdel#47-Klon und die LacZ-Klone INSLacZ#5 und INSLacZ#1 wurden 2, 6 und 12 Tage nach Tamoxifen Behandlung auf die Expression des Transgens hin untersucht. Die Klone wurden durch Immunfluoreszenz mit dem myc-tag-spezifischen Antikörper 9E10 als Erstantikörper und einem Cy3-gekoppelten Antikörper als Zweitantikörper analysiert. Die LacZ-Klone wurden durch  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung analysiert. Die Werte geben den prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten.

Wenn die Abnahme der HNF4 $\alpha$ -positiven Zellen in induzierten Klonen durch eine Hemmung der Zellvermehrung verursacht wird, sollte sich dieses auch auf die Gesamtzellzahl auswirken. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde jeweils ein Klon des Wildtyps und für die verschiedenen Mutanten ausgewählt. Die stabilen Klone wurden induziert und sechs Tage kultiviert, dann wurde die Zellzahl des induzierten und des entsprechenden nicht-induzierten Klons durch Zählen ermittelt. Um die verschiedenen Klone miteinander vergleichen zu können, wurde die Zellzahl für den nicht-induzierten Klon jeweils auf 100% gesetzt.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass im induzierten HNF4 $\alpha$ -Klon INSHNF4#69 die Zellzahl um die Hälfte gegenüber dem induzierten Klon geringer ist. Eine ähnlich geringere Zellzahl gegenüber den nicht-induzierten Klonen zeigen der R127W-Klon INS127#114 und der

D69A-Klon INS69#45, auch hier ist die Zellzahl nach sechs Tagen im induzierten Klon nur halb so gross wie im nicht-induzierten Klon.

Bei den Klonen INS154#105, INS360#35 und Insdel#47 zeigt sich kein Unterschied zwischen dem induzierten und dem nicht-induzierten Klon. Auch im LacZ-Klon INSLacZ#5 ist kein Unterschied zwischen dem induzierten und dem nicht-induzierten Klon zu ermitteln. Bis auf den INS360#35-Klon exprimieren alle in der Abbildung 17 gezeigten Klone das Transgen in mindestens 40% aller Zellen. In Klonen mit geringem Anteil von positiven Zellen ist kein Unterschied in der Zellzahl zwischen induziertem und nicht-induziertem Klon festzustellen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 17:** Die Gesamtzellzahl ist in induzierten INS-1-HNF4 $\alpha$ -Klonen erniedrigt. Die stabilen Klone wurden in einer Dichte von 50,000 Zellen pro 3,3 cm-Schale ausgesät und mit Tamoxifen induziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl des nicht-induzierten Klons wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten.

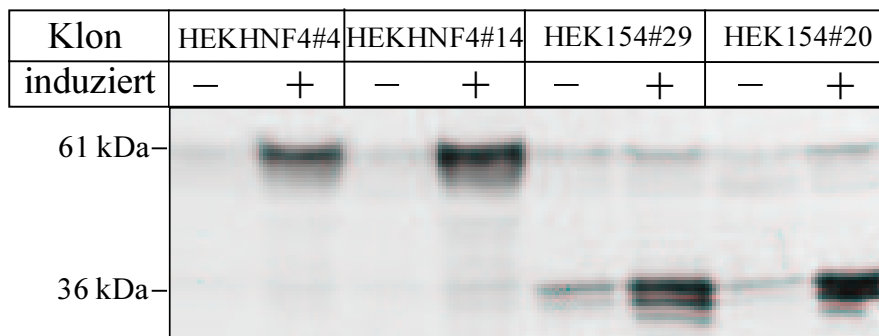
Alle Klone, die eine signifikante Verringerung des Anteils an Zellen zeigen, die das Transgen exprimieren (Abbildung 16) vermehren sich im induzierten Zustand langsamer als im nicht induzierten Zustand (Abbildung 17). Diese Klone exprimieren ein volllängen-Protein, dass in der Lage ist, ein Reporter gen zu aktivieren (Abbildung 15). In Klonen, die ein verkürztes Protein ohne Transaktivierungspotential exprimieren, ist kein Einfluss auf die Vermehrung der Zellen zu ermitteln.

#### 4.6. HNF4 ist in stabilen HEK293-Klonen induzierbar

HNF4 $\alpha$  hemmt die Zellvermehrung in der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 der Ratte. Ob dieser Effekt spezifisch für diese Zelllinie ist oder ob HNF4 $\alpha$  ein ähnliches Potential auch in anderen Zellen hat, wurde in stabilen Klonen von HEK293-Zellen untersucht. HEK293-Zellen sind immortalisierte embryonale Nierenzellen des Menschen. Diese Zellen exprimieren weder HNF4 $\alpha$  noch HNF1 $\alpha$  (Daten nicht gezeigt), daher repräsentieren sie einen relativ undifferenzierten Zelltyp wie er für Tumorzelllinien typisch ist.

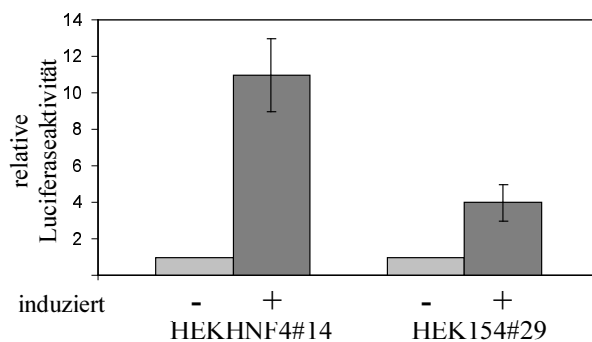
Es wurden stabile induzierbare HEK293-Klone mit dem gleichen System hergestellt wie bei den INS-1-Zellen. Der HNF4 $\alpha$ -Wildtyp und die MODY1-assoziierte R154X-Mutante wurden stabil und induzierbar in HEK293-Zellen eingebracht. Ausserdem wurden Kontrollklone hergestellt, die das LacZ-Gen nach Induktion exprimieren. In der Immunfluoreszenzanalyse wurden Klone ausgewählt, die das Transgen in einem grossen Anteil der Zellen exprimieren. Im nicht-induzierten Zustand zeigt eine Minderheit von Zellen (<1%) ein Cy3-positives Signal.

Abbildung 18 zeigt die Immunoblotanalyse mehrerer stabiler HEK293-Klone. Alle Klone zeigen eine starke Expression des Transgens nach Induktion.



**Abbildung 18:** Immunoblotanalyse stabiler induzierbarer HEK293-Klone. Die Proteinextrakte wurden entweder von Ethanol- (-) oder Tamoxifen-behandelten Klonen (+) hergestellt. Die HEK293-Klone HEKHNF4#4, HEKHNF4#14, HEK154#29 und HEK154#20 wurden durch Transfektion der beschriebenen Expressionsvektoren hergestellt, in denen die entsprechenden Leserahmen kloniert worden waren. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Gesamtprotein für die Analyse eingesetzt und dabei der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10 als Erstantikörper und ein Peroxidase-konjugierter Antikörper als Zweitantikörper verwendet.

Nach der Transfektion des hHNF1(-325/+138)lucII Reportergens in den induzierten stabilen HEKHNF4#14-Klon ist eine gegenüber dem nicht-induzierten Klon um das 11-fache erhöhte Luciferaseaktivität zu messen (Abbildung 19). Die Aktivität nach Induktion ist um einiges höher als in den INS-1-Zellen (Abbildung 15), was auf das Fehlen von endogenem HNF4 in HEK293-Zellen begründet werden kann. Im Klon HEK154#29, der die R154X nonsense-Mutante exprimiert kann nur eine 3- bis 4-fache Stimulierung des Reportergens im induzierten Klon im Vergleich zum nicht-induzierten Klon beobachtet werden.

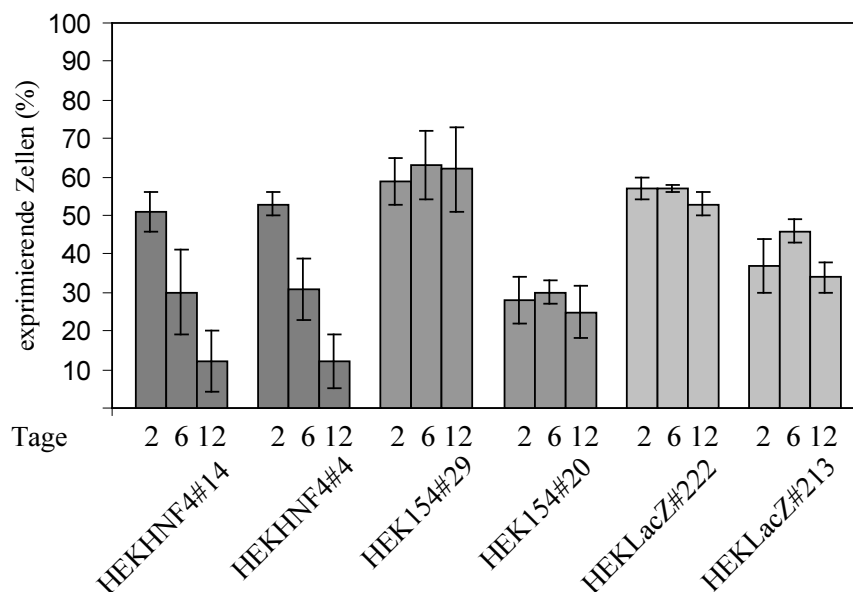


**Abbildung 19:** Transaktivierungspotential von HNF4 $\alpha$  und seiner Mutanten nach Induktion mit Tamoxifen in stabilen induzierten HEK293-Klonen. Das Transaktivierungspotential wurde durch einen Luciferasereporterassay nach Transfektion von 2  $\mu$ g des Reportergens hHNF1(-325/+138)lucII in nicht-induzierte und induzierte Klone bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Division der Aktivität des induzierten Klones durch die entsprechende Aktivität des nicht-induzierten Klones bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

#### 4.7. Induzierte HNF4 $\alpha$ -HEK293-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung

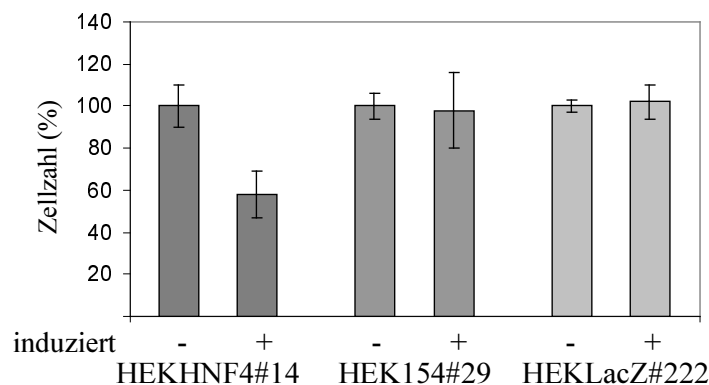
Um den Effekt von HNF4 $\alpha$  auf die Zellvermehrung zu untersuchen, wurde 2, 6 und 12 Tage nach Induktion der Anteil der exprimierenden Zellen in den stabilen Klonen bestimmt. Dabei wurde entsprechend der Analyse der stabilen induzierten INS-1-Klone der Anteil der Cy3-positiven Zellen in der Immunfluoreszenzanalyse ausgezählt. Abbildung 20 zeigt, dass in den HNF4 $\alpha$ -Wildtyp-exprimierenden Klonen HEKHNF4#14 und HEKHNF4#4 der Anteil der exprimierenden Zellen im Zeitverlauf abnimmt.

In den induzierten Klonen der MODY1-assoziierten nonsense-Mutante R154X (HEK154#29, HEK154#20) sowie den Klonen HEKLacZ#222 und HEKLacZ#213, die das LacZ-Gen exprimieren, bleibt der Anteil der exprimierenden Zellen während der Untersuchungsdauer stabil.



**Abbildung 20:** Der Anteil der HNF4 $\alpha$ -exprimierenden Zellen nimmt in induzierten HEK293-Klonen ab. Stabile HEK293-Klone von HNF4 $\alpha$  (HEKHNF4#14 und HEKHNF4#4), der R154X Mutante (HEK154#29 und HEK154#20), sowie LacZ-Klone (HEKLacZ222 und HEKLacZ213), wurden 2, 6 und 12 Tage nach Tamoxifenbehandlung auf die Expression des Transgens hin untersucht. Die Klone wurden durch Immunfluoreszenzanalyse mit dem myc-tag-spezifischen Antikörper 9E10 als Erstantikörper und einem Cy3-gekoppelten Antikörper als Zweitantikörper sowie die LacZ-Klone durch  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung analysiert. Die Werte geben den prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten an.

In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Bestimmung der Gesamtzellzahl sechs Tage nach Induktion gezeigt. Die Gesamtzellzahl ist bei dem HNF4 $\alpha$ -exprimierenden Klon HEKHNF4#14 sechs Tage nach der Induktion etwa um die Hälfte geringer als im nicht induzierten Klon. Dagegen ist die Gesamtzellzahl in dem induzierten R154X-Klon HEK154#29 und dem induzierten LacZ-Klons HEKLacZ#222 nicht gegenüber den nicht-induzierten Klone verändert. Die beobachtete Abnahme der exprimierenden Zellen in den HEKHNF4 $\alpha$ -Klonen (Abbildung 20) korreliert also mit einer geringeren Zellvermehrung.



**Abbildung 21:** Die Gesamtzellzahl ist in induzierten HEK293-HNF4 $\alpha$ -Klonen geringer als in den nicht-induzierten Klone. Die stabilen Klone wurden in einer Dichte von 50,000 Zellen pro 3,3-cm-Schale ausgesät und mit Tamoxifen induziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsiniert und die Gesamtzellzahl durch Zählen bestimmt. Die Zellzahl der nicht-induzierten Klone wurde gleich hundert Prozent gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.