

IV. Diskussion

1. Die D69A-Mutante ist auf einigen Promotoren aktiver als der Wildtyp

Die D69A-Mutante wurde bei der Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien auf Mutationen im HNF4 α -Gen in der Hepatomazelllinie HepG2 gefunden. Diese Zelllinie wurde 1980 etabliert (Knowles et al., 1980) und ist ein verbreitetes Modell für Leberfunktionen im Menschen. Die D69A-Mutation könnte ein tumorassoziiertes Ereignis sein und zur Tumorentstehung beigetragen haben. Es lag allerdings kein geeignetes Material des ursprünglichen Tumors oder des Patienten vor. Daher konnte nicht geklärt werden, ob die D69A-Mutation schon in der Keimbahn des betroffenen Menschen vorhanden war oder tumorspezifisch ist. Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass die Mutation während der Etablierung der Zelllinie entstanden ist. Da das mutierte HNF4 α Allel in dieser Zelllinie exprimiert wird (Lausen et al., 2000), könnte sich das mutierte Protein in den Zellen auswirken. Daher wurde die Mutante in dieser Arbeit funktionell charakterisiert. Es wurde sowohl die Transaktivierungsfähigkeit der D69A-Mutante als auch ihr Potential zur Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Das Transaktivierungspotential der Mutante ist auf dem HNF1 α -Promotor des *Xenopus* xHNF1(-594/-207)lucI und dem ApolipoproteinAI-Promotor aus der Ratte rApoAI(-1000/+14)lucI erhöht, während sie sich auf dem HNF1 α -Promotor des Menschen hHNF1(-325/+138)lucII wie der Wildtyp verhält. Die D69A-Mutation führt also nicht zum Verlust der Fähigkeit zu transaktivieren, sondern eher zu einer Erhöhung derselben (Abb. 2, S. 23).

Die D69A-Mutation betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Es ist bekannt, dass die P-Box bei Kernrezeptoren kritisch für die DNA-Bindung ist und die Spezifität der DNA-Bindung leistet. So hat man durch Mutationen innerhalb der P-Box, die Spezifität des Östrogenrezeptors (ER) und des Glukocorticoidrezeptors (GR) für ihre Bindestellen austauschen können (Umesono and Evans, 1989; Mader et al., 1989). Für eine im Menschen vorkommende Mutation in der P-Box des Steroidogenic-Faktor-I ist kürzlich gezeigt worden, dass sie die Spezifität des Rezeptors verändert. Die Autoren vermuten, dass eine veränderte Genexpression durch die veränderte Spezifität des Rezeptors zur Erkrankung des Betroffenen führt (Ito et al., 2000). Wenn durch die D69A-Mutation die Spezifität des Transkriptionsfaktors gegenüber seiner Bindestelle verändert wird, könnte dies die unterschiedliche Transaktivierung erklären. Der zentrale Bereich der HNF4-Bindestelle im

hHNF1(-325/+138)lucII Reporter gen ist mit der HNF4-Bindestelle des xHNF1(-549/-207)lucI Reporter gen aus dem *Xenopus* identisch, die flankierenden Bereiche unterscheiden sich jedoch. Dieser Unterschied könnte eine grössere Affinität der D69A-Mutante gegenüber der HNF4-Bindestelle des xHNF1(-549/-207)lucI Reporter gens bewirken und eine gesteigerte Transaktivierung zur Folge haben. Ob die D69A-Mutante eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Affinität zu unterschiedlichen Bindestellen hat, könnte durch Bandshift-Experimente mit Oligonukleotiden mit variierenden HNF4-Bindestellen analysiert werden. Interessanter schien jedoch zu klären ob die D69A-Mutante einen Beitrag zum Wachstum des Tumors geleistet haben könnte, daher wurde sie in die Analysen zur Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α einbezogen.

Die D69A-Mutante zeigte in INS-1-Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Hemmung der Zellvermehrung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 11, S. 37; 16, S. 43 und 17, S. 44). Die D69A-Mutation verändert die Eigenschaft des HNF4 α -Proteins das Wachstum zu hemmen nicht. Eine Beteiligung der D69A-Mutante bei der Tumorentstehung durch eine verminderte Wachstumshemmung aufgrund der Mutation ist daher wenig wahrscheinlich. Falls die D69A-Mutante jedoch wegen einer veränderten Bindspezifität andere Gene reguliert als der Wildtyp, könnte dies eine sekundäre Anpassung des Tumors sein. Wenn die D69A-Mutante zum Beispiel bevorzugt Gene anschaltet, die Tumorzellen einen Vorteil im Wachstum verschaffen, hätten diese Zellen gegenüber den anderen eine Selektionsvorteil. Solche Veränderungen in Tumoren betreffen häufig Gene, die wichtige Stoffwechselprozesse steuern (Dang and Semenza, 1999). Zum Beispiel ist die für den Glucosestoffwechsel wichtige Hexokinase in vielen Tumorzelllinien amplifiziert (Rempel et al., 1996).

2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor

Während die Mehrzahl der MODY3-assoziierten Mutationen im offenen Leserahmen des HNF1 α -Gens gefunden wurden (Ellard, 2000), liegt eine MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor (Gagnoli et al., 1997). Die Auswirkung dieser Mutation war bis zu dieser Arbeit nicht geklärt. Durch Transfektion in HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass ein Promotorkonstrukt, das die Mutation trägt, im Vergleich zum Wildtyp kaum noch durch transfiziertes HNF4 α aktiviert wird (Abb. 3, S. 25). In der β -Zelllinie INS-1 der Ratte ist der mutierte Promotor im Vergleich zum Wildtyp wenig aktiv, dies weist auf eine

wichtige Rolle der Bindestelle bei der Transaktivierung des HNF1 α -Gens in β -Zellen hin. In β -Zellen lässt sich die Aktivität des Wildtyp-Promotors durch eine dominant-negative HNF4 α -Mutante hemmen, ein Teil der Aktivierung des HNF1 α -Promotors in β -Zellen geht also von endogenem HNF4 α der INS-1-Zellen aus. Da auch hohe Konzentrationen der dominant-negativen Mutante die Aktivität des Promotors nicht weiter hemmen, könnte ein weiterer Faktor das HNF1 α -Gen über die HNF4-Bindestelle aktivieren.

In Gelretardationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die mutierte HNF4-Bindestelle eine signifikant verringerte Affinität zum HNF4 α -Protein besitzt (Abb. 4, S.27). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die HNF4-Bindestelle durch die Mutation weitgehend zerstört ist. Die Wichtigkeit der HNF4-Bindestelle für die Expression des HNF1 α -Gens ist auch im *Xenopus* gezeigt worden. Hier verhinderte eine Mutation der HNF4-Bindestelle des *Xenopus* HNF1 α -Promotors die Expression eines HNF1 α -Promotor Transgenes in der Niere (Ryffel and Lingott, 2000). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Regulation von HNF1 α durch HNF4 α bei der Entstehung von MODY wichtig ist und dass es dabei zu einer Verringerung der Expression von HNF1 α kommt. Daher ist der HNF1 α -Promotor für die Analyse von MODY1-assoziierten Mutationen des HNF4 α -Gens in Reporterstudien besonders geeignet,

3. Die MODY1-Mutationen bewirken einen Funktionsverlust des HNF4 α -Proteins

Die funktionelle Analyse der MODY1-assoziierten HNF4 α -Mutanten zeigte einen unterschiedlich starken Effekt der verschiedenen Mutationen.

Die beiden nonsense-Mutationen R154X und Q268X zeigen bei Transfektion in HeLa-Zellen kein Transaktivierungspotential (Abb. 5, S. 28). Außerdem stören sie das Wildtyp-Protein nicht, sie sind also nicht dominant-negativ (Abb. 7, S. 31). Diese Beobachtung ist für die Q268X-Mutante auch von anderen Gruppen gemacht worden. Das Fehlen eines dominant-negativen Effektes dieser Mutante wurde veränderten Eigenschaften zugeschrieben (Sladek et al., 1998). Diese Annahme konnte durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigt werden. Das Q268X-Protein ist in Kernextrakten aus transfizierten HEK293-Zellen nur in der Pelletfraktion zu finden (Abb. 9, S. 33).

Demgegenüber ist das R154X-Protein wie der Wildtyp im Kernextrakt nachweisbar. Im Gelretardationsassay zeigt sich nur nach Zugabe eines Antikörpers eine deutliche DNA-Bindung (Abb. 8, S. 32). Dies weist auf eine schwache DNA-Bindung des Proteins hin, die durch den Antikörper stabilisiert wird. Die DNA-Bindefähigkeit der R154X-Mutante ist nicht unerwartet, denn in einer Deletionsstudie zeigte eine vergleichbare C-terminale Deletionsmutante ebenfalls eine DNA-Bindung (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Im Unterschied zum Wildtyp kann die R154X-Mutante in der Immunfluoreszenzanalyse nicht nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit Methanol fixiert wurden. Bei Fixierung mit Paraformaldehyd ist die Mutante wie der Wildtyp im Kern nachweisbar. Das unterschiedliche Verhalten bezüglich der Fixierung deutet auf ein verändertes physikalisches Verhalten der Mutante hin, zum Beispiel könnte die Löslichkeit des Proteins verändert sein. Inzwischen ist die R154X-Mutante auch von anderen charakterisiert worden (Laine et al., 2000). Im Einklang mit den gezeigten Daten stellten die Autoren einen Verlust der Transaktivierungsfähigkeit bei Transfektion der Mutante in COS-1- und HIT-T15-Zellen fest. In HEK293-Zellen hat die R154X-Mutante eine Restaktivität. Diese Restaktivität in HEK293-Zellen zeigt sich auch in den in dieser Arbeit hergestellten induzierbaren HEK293-Klonen der R154X-Mutante (Abb. 19, S. 46). In HIT-T15-Zellen stellen die Autoren sogar einen leicht dominant-negativen Effekt fest.

Zusammenfassend belegen die Daten zur Q268X- und R154X-Mutante einen Funktionsverlust der Mutanten, sie stellen sogenannte „loss of function“ Mutationen dar.

Die beiden MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W und E276Q haben die Fähigkeit, ein Reportergen zu transaktivieren, nicht vollständig verloren. Sie transaktivieren jedoch deutlich schwächer als der Wildtyp (Abb. 6, S. 29). Bei der R127W-Mutante wird dies schon bei sättigender Menge transfizierten Expressionsplasmids deutlich bei der E276Q-Mutante erst bei mittleren Mengen. Die V255M-Mutante verhält sich bei hohen und mittleren Konzentrationen wie der Wildtyp, bei niedrigen Konzentrationen zeigt sich eine reduzierte Transaktivierung. Die untersuchten missense-Mutanten sind aufgrund ihrer geringeren Transaktivierung also ebenfalls „loss of function“ Mutanten.

Nach Abschluss der Transaktivierungsstudien mit den MODY1-Mutanten wurden auch von anderen Arbeitsgruppen funktionelle Daten zu diesen MODY1-Mutanten präsentiert. Demzufolge transaktivieren die R127W- und V255M-Mutanten wie der Wildtyp (Navas et al., 1999). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit untersuchten Navas et al. die Transaktivierung der Mutanten nur bei hohen Konzentrationen von Expressionsvektor, ausserdem haben sie Zelltypen für ihre Analysen benutzt, die bereits endogenes HNF4 α

besitzen. Durch die grosse Menge Wildtyp-HNF4 α könnten geringfügigere Unterschiede der Mutante gegenüber dem Wildtyp übersehen worden sein. Auch wurde die E276Q-Mutante von Navas et al. als funktionell inaktiv eingestuft. Die Autoren haben die Mutationen jedoch ins Ratten-HNF4 α und nicht ins HNF4 α des Menschen eingeführt, dies könnte den Unterschied zu den Daten aus der vorliegenden Arbeit erklären. Inzwischen ist die E276Q-Mutante jedoch, in Übereinstimmung mit meinen Daten, als aktiv beschrieben worden (Suaud et al., 1999). Die Autoren vermuten, dass eine verminderte Synergie der E276Q Mutante, mit COUP-TFII (chicken upstream ovalbumin promotor transcription factor II) zur geringeren Transaktivierung durch diese Mutante führt.

Mittlerweile sind sieben zusätzliche Mutanten im HNF4 α -Gen im Zusammenhang mit Diabetes beschrieben worden. Zwei weitere MODY1-assoziierte Mutanten sind funktionell analysiert worden, die missense-Mutanten V391I (Hani et al., 1998) und G115S (Malecki et al., 1999) zeigen ein signifikant verringertes Transaktivierungspotential. Die frameshift-Mutanten F75fs (Möller et al., 1999) und K99fs (Lehto et al., 1999a) sind mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls „loss of function“ Mutationen, da Deletionskonstrukte mit ähnlicher Länge nicht mehr aktiv sind (Jiang and Sladek, 1997). Für die MODY1-assoziierten missense-Mutanten I454V (Malecki et al., 1999) und R324H (Price et al., 2000) sowie die Insertionsmutante V328-329ins (Lehto et al., 1999b) liegen bisher keine funktionellen Daten vor.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen MODY1-Mutanten weisen eine verringerte Transaktivierung auf, diese ist jedoch je nach Mutation unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein dominant-negativer Effekt des mutierten Proteins gegenüber dem Wildtyp ist nicht allgemeiner Mechanismus der MODY1-Mutationen, denn er ist nur in schwacher Ausprägung für die R154X-Mutante ermittelt worden (Laine et al., 2000).

Für einige MODY1-Mutationen ist noch nicht endgültig geklärt, ob sie tatsächliche MODY1-Mutationen sind oder nur Polymorphismen, die mit dem wirklich für MODY verantwortlichen Genlokus kosegregieren. Um die verschiedenen Mutationen in dieser Hinsicht zu beurteilen, können mehrere Kriterien herangezogen werden. Bei einer Mutation in einer Familie mit einem grossen Stammbaum kann statistisch gut abgesichert werden, ob die Mutation mit dem Auftreten der Krankheit koreliert. Wenn eine MODY-assoziierte Mutation in mehr als einer Familie auftritt ist dies ebenfalls ein deutlicher Hinweis, dass die Mutation für die Krankheit verantwortlich ist. Einen guten Hinweis auf die Relevanz einer Mutation können funktionelle Daten geben, denn bei einer Mutation, die eine Funktionsveränderung der Mutante gegenüber dem Wildtyp verursacht ist es wahrscheinlich, dass sie sich auch im

Patienten auswirkt. Ausserdem kann die Verfügbarkeit klinischer Daten dazu beitragen zu entscheiden zu welchem Typ einer Krankheit die Mutation beiträgt. Im Fall von MODY muss zum Beispiel unterschieden werden ob eine Mutation mit MODY oder einer anderen Form von Diabetes assoziiert ist.

Für einige Mutanten ist der Zusammenhang mit MODY1 aufgrund der Verfügbarkeit grosser Familienstammbäume und der funktionellen Daten gut belegt. Zu den sicheren MODY1 Mutationen zählen aufgrund eines nachgewiesenen oder wahrscheinlichen Funktionsverlust diejenigen Mutanten, die zu einem verkürzten Protein führen (F75fs, K99fs, R154X und Q268X) sowie die missense-Mutationen G115S und die Insertionsmutante V328-329ins (siehe auch: Sladek and Seidel, 2001).

Die funktionellen Daten zur R127W-Mutation sind bisher noch kontrovers. Allerdings ist die Mutation in zwei unabhängigen Familien gefunden worden (Bulman et al., 2000; Furuta et al., 1997) und die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten belegen einen deutlichen Funktionsverlust der Mutante. Daher kann sie zu den sicheren MODY1-Mutationen gezählt werden.

Die E276Q-Mutation ist bisher nur in einer Familie gefunden worden (Bulman et al., 1997). Alle funktionellen Daten zur E276Q-Mutante sprechen allerdings für einen Funktionsverlust durch die Mutation. Daher ist es wahrscheinlich, dass die E276Q-Mutation MODY1-assoziert ist.

Die V255M wurde in 4 von 477 NIDDM Patienten gefunden (Möller et al., 1997), die jedoch nicht für klinische Untersuchungen zur Verfügung standen. Die in dieser Arbeit ermittelten funktionellen Daten zeigen nur einen geringen Funktionsverlust durch die Mutation. Daher spricht vieles dafür, dass die V255M-Mutation eher ein seltener Polymorphismus ist oder die Entwicklung von Typ-II Diabetes fördert.

4. HNF4 α hemmt das Aufwachsen von INS-1-Zellen

Um eine mögliche Rolle von HNF4 α bei der Zellvermehrung zu überprüfen, wurde zunächst das Aufwachsen von Zellen nach Transfektion mit einem Expressionsvektor für HNF4 α in INS-1-Zellen untersucht. Die INS-1-Zelllinie ist eine β -Zelllinie der Ratte. Sie exprimiert HNF4 α , HNF1 α und Insulin und ist deshalb als Modell für differenzierte β -Zellen gut geeignet.

Der Versuchsansatz ergab eine starke Repression des Aufwachsens der Zellen bei Transfektion mit HNF4 α (Abb. 11, S. 37). Im Gegensatz dazu zeigen die MODY1-assoziierten Mutanten R154X und Q268X keine und die MODY1 missense-Mutation R127W nur eine geringe Inhibition des Aufwachsens von Zellen. Dahingegen hemmt die MODY1-assoziierte missense-Mutante E276Q, die V255-Mutante, sowie die in HepG2-Zellen gefundene Mutante-D69A, das Aufwachsen von Zellen im gleichen Maße wie der Wildtyp.

Um die Auswirkung von HNF4 α in der Zellvermehrung genauer zu untersuchen, wurden stabile induzierbare Klone der Ratten β -Zelllinie INS-1 hergestellt. Dazu wurde ein System der Induktion durch Rekombination mit FLP benutzt (Abb. 12, S. 38). Das induzierbare Gen kann mit diesem System zu einem definierten Zeitpunkt durch Gabe von Tamoxifen ins Zellkulturmedium eingeschaltet werden. In den hergestellten Klonen exprimierten 30 bis 70% aller Zellen das Transgen nach Induktion. Diese unvollständige Expression innerhalb eines Klones wurde bei allen isolierten Klonen unabhängig von dem induzierten Gen beobachtet, daher scheint sie eine Eigenschaft dieses Systems zu sein. Dasselbe Phänomen wurde bei einem ähnlichen System beobachtet, das eine Cre-Rekombinase benutzt (Fuhrmann-Benzakein et al., 2000). Dies spricht dafür, dass eine Rekombination in allen Zellen eines Klones schwer zu erreichen ist.

Da in einem Klon nicht alle Zellen das Transgen nach der Induktion exprimieren, ist es möglich zu bestimmen, ob die HNF4 α -überexprimierenden Zellen in der Vermehrung einen Nachteil gegenüber den Zellen haben, die das Transgen nicht exprimieren. Dazu wurde die Prozentzahl der exprimierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion bestimmt (Abb. 16, S. 42). Es zeigte sich, dass der Anteil der HNF4 α -überexprimierenden Zellen in INS-1-HNF4 α -Klonen (INSHNF4#69, INSHNF4#41) mit der Zeit abnimmt. Die Gesamtzellzahl in dem induzierten HNF4 α -Klon (INSHNF4#69) war nach sechs Tagen in Kultur im Vergleich zu dem nicht-induzierten Klon geringer (Abb. 17, S. 44). Daher kann die

Abnahme des Anteils HNF4 α -überexprimierender Zellen mit einer verlangsamten Vermehrung der Zellen erklärt werden, die HNF4 α exprimieren.

In Klonen, die die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W exprimieren (INS127#114, INS127#64) wurde ebenfalls eine Verringerung des Anteils der exprimierenden Zellen beobachtet. Das gleiche Ergebnis zeigen Klone, die die D69A-Mutante exprimieren (INS69#45, INS69#57). In dem R127W-Klon (INS127#114) und dem D69A-Klon (INS69#45) wuchsen im induzierten Klon ebenfalls weniger Zellen auf als im nicht induzierten Klon.

Kein Effekt auf die Zellvermehrung kann hingegen im INSdel#47-Klon beobachtet werden, der nach Induktion ein verkürztes HNF4 α -Derivat exprimiert. Dieser Klon ist eine gute Kontrolle für den Versuchsansatz und zeigt, dass für die Wachstumshemmung ein intaktes HNF4 α -Protein nötig ist. Die stabilen Klone INS154#105 und INS154#95 exprimieren die MODY1-assoziierte Mutante R154X nach Induktion, in beiden Klonen kann keine Veränderung der Zellvermehrung festgestellt werden. Die Eigenschaft des Wildtyp-Proteins, die zur Hemmung der Zellvermehrung führt, ist durch die R154X-Mutation offensichtlich gestört. Für den INS360#35-Klon, der nach Induktion ein verkürztes Protein mit dominant-negativen Eigenschaften exprimiert, ist ebenfalls kein Effekt auf das Aufwachsen von Zellen zu ermitteln.

Zusammengefasst zeigte die Überexpression von HNF4 α in INS-1-Zellen, dass HNF4 α die Fähigkeit hat, die Zellvermehrung zu inhibieren, während die R154X-Mutante diese Eigenschaft des Wildtyps vollständig verloren hat. Wohingegen die R127W-Mutante, wenn überhaupt, nur einen schwachen Verlust dieser Eigenschaft aufweist. Im Gegensatz dazu verhält sich die D69A-Mutante, unter den gewählten Versuchsbedingungen, vollständig wie der Wildtyp. Die Ergebnisse legen nahe, dass für die Hemmung der Zellvermehrung ein intaktes HNF4 α -Protein erforderlich ist. Alle getesteten Mutanten, die die Vermehrung hemmen, weisen ein signifikantes Transaktivierungspotential auf. Dies unterstützt die Vorstellung die Hemmung der Zellvermehrung könnte über die genregulatorische Funktion von HNF4 α vermittelt werden. Die HNF4 α -Mutanten, die die Zellvermehrung nicht inhibieren haben kein Transaktivierungspotential mehr, sie sind allerdings auch verkürzt. Daher könnte auch eine gestörte Interaktion mit anderen Proteinen für die Hemmung verantwortlich sein. Bekannte Interaktionspartner von HNF4 α sind zum Beispiel CBP (cAMP response element binding protein binding protein) (Dell and Hadzopoulou-Cladaras, 1999) und COUP-TF (Ktistaki and Talianidis, 1997). Gerade die Interaktion von HNF4 α mit CBP ist interessant, da CPB als Tumorsuppressor fungieren kann (Kung et al., 2000) und die

Eigenschaft besitzt zwischen unterschiedlichen Signalwegen zu vermitteln (Goodman and Smolik, 2000). CPB interagiert mit dem N-Terminus von HNF4 α , der nicht durch die MODY1-Mutationen betroffen ist. Trotzdem könnten strukturelle Veränderungen des HNF4 α -Proteins durch die Mutationen zu einer gestörten Interaktion führen. Solch eine gestörte Interaktion sollte bei MODY1-Patienten allerdings von Geburt an ausgeprägt sein. Da die MODY1-Mutationsträger jedoch erst später erkranken ist es wenig wahrscheinlich, dass die Störung einer spezifischen Interaktion von HNF4 α , zum Beispiel mit CBP, zur MODY Erkrankung führt. Zudem berichtet die einzige Studie zu dieser Möglichkeit im Falle der R127W-Mutante von einer normalen Interaktion mit CBP (Yang et al., 2000).

5. HNF4 hemmt die Vermehrung von HEK293-Zellen

Da das HNF4 α -Protein in Nierentumoren herunterreguliert ist (Sel et al., 1996), könnte HNF4 α eine Rolle bei der Entwicklung von Nierenzellkarzinomen spielen. Die Beeinflussung der Zellvermehrung durch HNF4 α könnte beim Prozess der Tumorentstehung von Bedeutung sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293 ausgewählt. Diese Zelllinie repräsentiert einen relativ undifferenzierten Zelltyp, wie er typisch für eine Tumorzelllinie ist. HEK293-Zellen exprimieren kein HNF4 α oder HNF1 α . Es wurden stabile induzierbare HEK293-Zelllinien mit dem gleichen System hergestellt wie für die INS-1-Zellen beschrieben. Nach Induktion der HEK293-HNF4 α -Klon HEKHNF4#4 und HEKHNF4#14 war innerhalb der Versuchsdauer eine Reduktion des Anteils exprimierender Zellen zu beobachten (Abb. 20, S. 47). Das Auszählen der Gesamtzellzahl ergab eine Verlangsamung der Zellvermehrung im induzierten HNF4 α -Klon, im Vergleich zum nicht induzierten Klon (Abb.21, S. 48). Die Spezifität dieses Effektes wurde durch Klone belegt die nach Induktion entweder die R154X-Mutante oder β -Galaktosidase exprimieren. Diese Klone zeigen weder eine Abnahme der Prozentzahl exprimierender Zellen während der Versuchsdauer noch eine verringerte Vermehrung der Zellen.

Der Effekt von HNF4 α auf die Vermehrung von Zellen in stabilen induzierbaren Klonen der Nierenzelllinie HEK293 unterstützt die Annahme HNF4 α könnte bei der Tumorentstehung beteiligt sein, und eventuell als Tumorsuppressor wirken. Es sind bisher jedoch keine tumorassoziierten Mutationen im HNF4 α -Gen gefunden worden (persönliche Mitteilung: Prof. G.U. Ryffel, Institut für Zellbiologie, Essen). Daher kann man spekulieren, dass der

Verlust der HNF4 α -Expression in Nierenzellkarzinomen, durch den Verlust von Faktoren hervorgerufen wird, die für die HNF4 α -Expression wichtig sind. Eine interessante Beobachtung ist hier ein möglicher Zusammenhang von HNF4 α -Expression und dem TGF β - (transforming growth factor beta) Signalweg. Der TGF β -Signalweg besitzt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung. Beim TGF β -Signalweg aktivieren extrazelluläre Liganden wie Aktivin oder BMP (bone morphogenic factor) durch Binden an einen membranständigen Rezeptor eine Signalkaskade, die in der Beeinflussung der Genexpression mündet. Mutationen in diesem Signalweg sind für eine Reihe von Tumorerkrankungen ursächlich (Zusammengefasst in: Massague et al., 2000). Aus Untersuchungen im *Xenopus* weiss man, dass die Aktivierung der HNF1 α -Expression nach Aktivin-Gabe, über eine HNF4-Bindestelle vermittelt wird (Weber et al., 1996). Ausserdem induziert BMP die Expression von HNF4 α in „embryonic bodies“ (Coucouvanis and Martin, 1999). Die Beantwortung der Frage, ob eine Interaktion von HNF4 α mit dem TGF β -Signalweg für die Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α im Zusammenhang steht, könnte ein entscheidender Schritt zum Verständniss der Wirkungsweise von HNF4 α darstellen.

6. HNF4 α und Erkrankungen des Menschen

HNF4 α ist ein wichtiges Gen in der Entwicklung von Vertebraten, zudem sind Mutationen im HNF4 α -Gen ursächlich für MODY1. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten unterstützen die These, dass die Regulation von HNF1 α (MODY3) durch HNF4 α (MODY1) wichtig bei der Entstehung von MODY1 ist

Da eine mit MODY3-assoziierte Mutation die HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor zerstört, ist davon auszugehen, dass durch die Mutation die Expression des HNF1 α -Gens im betroffenen Patienten reduziert ist. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass MODY3-Mutationen im HNF1 α -Gen die Aktivität des Transkriptionsfaktors senken (Vaxillaire et al., 1999). Für eine verringerte Transaktivierung des HNF1 α -Gens aufgrund MODY1-assoziiierter Mutationen im HNF4 α -Gen spricht auch, dass die analysierten MODY1-assoziierten Mutanten ein geringeres Transaktivierungspotential auf dem HNF1 α -Promotor aufweisen als der Wildtyp. Das reduzierte Transaktivierungspotential des in einer Zelle vorhandenen HNF4 α -Proteins könnte sich dann mittelbar über eine verringerte Aktivierung des HNF1 α -

Gens auswirken. Dies würde bedeuten, dass MODY1 und MODY3 über denselben Mechanismus zum Diabetes führen. Einen wichtigen Hinweis auf diese Möglichkeit haben Zellkulturexperimente in INS-1 Zellen erbracht. Das Inhibieren von HNF1 α durch ein induzierbares, dominant-negatives Protein führt zur verringerten Expression einer Reihe von Genen, die wichtig für die Glucosehomöostase sind. Dazu gehören der Glucosetransporter-2 (GLUT-2), die L-Pyruvatkinase (L-PK), die Aldolase-B und Insulin (Wang et al., 2000a). Diese Zellen sind in ihrer Insulinsekretion gestört. In einem ähnlichen Versuchsansatz gelang es der gleichen Arbeitsgruppe, das HNF4 α -Protein in INS-1-Zellen zu inhibieren. Interessanterweise sind hier HNF1 α und auch die oben genannten HNF1 α -Zielgene herunterreguliert (Wang et al., 2000b). Genau wie bei der Inhibierung von HNF1 α zeigen auch diese Zellen eine gestörte Insulinsekretion. Das regulative Potential des HNF1 α -Gens für das Insulin-Gen des Menschen ist inzwischen belegt (Okita et al., 1999). Dies spricht für die Möglichkeit, dass sich HNF4 α -Mutationen über HNF1 α mittelbar auf die Expression des Insulin-Gens auswirken. Sowohl HNF4 α als auch HNF1 α sind für die Expression einer grossen Anzahl von Genen wichtig, die zur Glucosehomöostase beitragen. Eine Beteiligung dieser Gene bei der Entwicklung von MODY ist daher wahrscheinlich.

Diese Hypothese beantwortet jedoch nicht die Frage, warum MODY1 Mutationsträger nicht von Geburt an erkrankt sind, sondern sich die Krankheit erst im Jugendalter ausprägt. Eine Erklärung könnte sein, dass die verringerte Expression des HNF4 α -Gens eine Zeitlang kompensiert werden kann. Möglicherweise sinkt die Expressionsstärke von HNF4 α in der Jugendentwicklung, oder der Bedarf für HNF4 α steigt in der Entwicklung an, so dass sich die Mutationen zu einem späteren Zeitpunkt stärker auswirken als zur Geburt. Dafür spricht, dass sich bei MODY1-Patienten deutliche Defekte nur im Pankreas zeigen und in der Leber nur ein schwacher Einfluss auf die Genexpression, zum Beispiel des Gens für ApolipoproteinAI, berichtet wird (Shih et al., 2000). In der Leber ist aufgrund der starken Expression von HNF4 α eine verringerte HNF4 α -Aktivität sicherlich eher auszugleichen als im Pankreas, in dem HNF4 α eher schwach exprimiert wird (Miquerol et al., 1994; Sladek and Seidel, 2001). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass Mutationen in der HNF4 α -Bindestelle im Promotor für Blutgerinnungsfaktoren Hämophilie verursachen, MODY1-Patienten jedoch nicht an Hämophilie leiden. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Gens, die sich als MODY3 ausprägt und kann als Argument für eine bessere Möglichkeit zur Kompensation einer verringerten HNF4 α -Expression in Geweben ausserhalb des Pankreas gelten.

Eine weiterer Grund für die Ausprägung der MODY1-Mutationen erst im jungen Erwachsenenalter könnte eine fortschreitende Veränderung der β -Zellpopulation des endokrinen Pankreas sein. Zur Erhaltung der β -Zellmasse ist eine kontinuierliche Neubildung von β -Zellen notwendig, um den Verlust durch Apoptose auszugleichen (Finegood et al., 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Beteiligung von HNF4 an diesem Prozess nahe, der bei MODY1-Patienten gestört sein könnte. Ein veränderter HNF4 α -Status der β -Zellen könnte die Proliferation der β -Zellen verändern, so dass die Anzahl der reifen Insulinproduzierenden β -Zellen abnimmt. Es ist anzunehmen, dass im Laufe der Entwicklung die Anzahl der intakten β -Zellen kritisch wird und der Diabetes ausbricht. Dies könnte insbesondere dann der Fall sein, wenn die β -Zellmasse aufgrund eines erhöhten Bedarfs für Insulin ansteigt, wie bei Gewichtszunahme und Schwangerschaft. In diesem Fall kann man spekulieren, dass die Expression des Wildtyp HNF4 α -Allels in einigen β -Zellen mit der Zeit verloren geht. Dadurch entstünde ein Wachstumsvorteil dieser Zellen gegenüber den β -Zellen, die noch Wildtyp-HNF4 α exprimieren. Die Zellen mit inaktiviertem HNF4 α wären nun in der Insulinsekretion defekt, da sie nur noch das Allel mit der MODY1-Mutation exprimieren und würden die anderen β -Zellen überwachsen. Der Anteil der defekten β -Zellen nähme dann mit der Zeit zu und würde so zur Progression der Krankheit beitragen. Dieses Modell schlägt also eine fortschreitende Zunahme HNF4 α -defizienter β -Zellen in MODY1-Patienten als Ursache für die Krankheit vor. Die Inaktivierung des HNF4 α -Gens könnte sowohl durch somatische Mutation im bisher intakten HNF4 α -Allel, als auch durch eine Inaktivierung der Transkriptionseinheit des HNF4 α -Gens geschehen. Eine solche Inaktivierung wäre vergleichbar mit der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgenes bei der Krebsentstehung, wenn ein Allel des Gens bereits in der Keimbahn mutiert ist (Fearon, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Daten präsentiert, die eine Hemmung der Vermehrung von Zellen durch HNF4 α belegen. Eine Aufklärung des Mechanismus über den HNF4 α wirkt, könnte entscheidend zur Beantwortung der Frage beitragen wie MODY entsteht und neue Therapieansätze ermöglichen. Darüber hinaus wird zu klären sein, ob die Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α ein in der Tumorentstehung bedeutender Prozess darstellt. Die Frage ob MODY1-Patienten eine erhöhte Tumorfrequenz besitzen wurde bisher noch nicht untersucht, allerdings ist die Rate von Nierenkarzinomen in Diabetes Patienten allgemein erhöht (Lindblad et al., 1999).

V. Zusammenfassung

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α spielt eine zentrale Rolle in der Differenzierung von Hepatocysten und seine Expression geht in Nierenzellkarzinomen des Menschen verloren. In der Hepatomazelllinie HepG2 wird ein mutiertes HNF4 α -Allel exprimiert, diese Mutation betrifft die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors. Im Menschen führen Mutationen im HNF4 α -Gen zu „maturity onset diabetes of the young 1“ (MODY1), einer monogenen Form des nicht Insulin abhängigen Diabetes-mellitus. Ausserdem führt eine Mutation in der HNF4 α -Bindestelle im Promotor des HNF1 α -Gens zu MODY3.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die D69A-Mutante aus der Hepatomazelllinie HepG2 auf einigen Promotoren stärker als der Wildtyp transaktiviert. Die D69A-Mutante verhält sich im Hinblick auf die Hemmung der Zellvermehrung in stabilen INS-1-Klonen wie der Wildtyp. Die geringe Funktionsänderung gegenüber dem Wildtyp macht eine ursächliche Beteiligung der Mutante bei der Tumorentstehung wenig wahrscheinlich.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass eine MODY3-assoziierte Mutation im HNF1 α -Gen einen Verlust der HNF4 α -Bindestelle des HNF1 α -Promotors verursacht, durch diese Mutation wird im betroffenen MODY3-Patienten also wahrscheinlich die Expression des HNF1 α -Gens gestört. Die Daten zeigen weiterhin, dass die Transaktivierung durch die MODY1-assoziierten Mutanten R127W, R154X, V255M, Q268X und E276Q abhängig von der Art der Mutation im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Eine Inaktivierung des Wildtyp Proteins durch die Mutanten ist kein allgemeiner Mechanismus bei der Entstehung von MODY1, denn es gibt nur bei der R154X-Mutante Hinweise auf einen schwachen dominant-negativen Effekt.

Sowohl die verringerte Transaktivierung der MODY1-Mutanten als auch der festgestellte Funktionsverlust der HNF4 α -Bindestelle unterstützt die These, dass sich MODY1-Mutationen über eine verminderte Expression des HNF1 α -Gens auswirken.

In dieser Arbeit wurden erstmals Daten präsentiert, die eine Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α belegen. Die Überexpression von HNF4 α in der β -Zelllinie INS-1 der Ratte führt zu einer geringeren Vermehrung der Zellen, diese Eigenschaft die Zellvermehrung zu hemmen ist in einigen MODY1-Mutanten verlorengegangen. Ausserdem ist die Zellvermehrung in induzierbaren HNF4 α -INS-1-Klonen nach Induktion verlangsamt. Dies

spiegelt sich in der progressiven Verringerung des Anteils HNF4 α -exprimierender Zellen innerhalb eines Klonen wider. Eine ähnliche Verminderung des Anteils HNF4 α -exprimierender Zellen zeigt sich in induzierbaren HEK293-Klonen. Dieser Einfluss von HNF4 α in den undifferenzierten HEK293-Zellen unterstützt die Annahme HNF4 α könnte an der Entstehung von Nierentumoren beteiligt sein.

In einem Modell zur Entstehung von MODY1 wird der fortschreitende Verlust der HNF4 α -Aktivität in β -Zellen des Pankreas als Ursache für die Krankheit vorgeschlagen. Nach diesem Modell geht die Expression des intakten Allels bei MODY1-Patienten in einigen β -Zellen verloren. Diese HNF4 α -defizienten β -Zellen sind in der Insulinsekretion defekt und haben einen Wachstumsvorteil gegenüber den β -Zellen, die noch HNF4 α exprimieren. Durch den Wachstumsvorteil nimmt der Anteil der defekten β -Zellen zu, dies trägt zur Progression der Krankheit bei.

Die Eigenschaft von HNF4 α die Vermehrung von Zellen zu hemmen könnte in MODY1-Patienten gestört sein, ein Verlust dieser Eigenschaft könnte zur Entstehung von Tumoren beitragen.